

# **Entwicklung von $^{68}\text{Ga}$ -Tracern für die Leberbildgebung mit Positronen-Emissions-Tomographie**

## **Dissertation**

(kumulativ)

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Dipl.-Chem. Julia Greiser  
geboren am 20.12.1989 in Gera**

Gutachter:

**1. Prof. Dr. Wolfgang Weigand, Jena**

**2. apl. Prof. Dr. Michael Gottschaldt, Jena**

**3. Prof. Dr. Gerd Wunderlich, Dresden**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.07.2019

# Inhaltsverzeichnis

---

Abkürzungsverzeichnis.....	iii
1 Publikationsliste .....	1
2 Angaben und Erklärung zu Eigenanteilen.....	2
3 Zusammenfassung .....	6
4 Einleitung.....	8
4.1 Motivation und Ziel der Arbeit.....	8
4.2 Methoden der nuklearmedizinischen Bildgebung.....	10
4.3 Leberdiagnostik - Status quo.....	14
4.3.1 Die Leber und ihre Erkrankungen.....	14
4.3.2 Magnetresonanztomographie.....	14
4.3.3 Konventionelle Nuklearmedizin – Szintigraphische Methoden .....	17
4.3.4 Leberdiagnostik mit PET.....	21
4.4 <sup>68</sup> Ga – das PET-Nuklid aus der Dose.....	24
4.5 Koordinationschemie des [ <sup>68</sup> Ga]Ga <sup>III</sup> .....	27
4.6 Forschungsansatz.....	30
5 Publikationen .....	32
5.1 Publierte Originalarbeit P1.....	32
Synthesis and Characterization of Ga <sup>III</sup> , In <sup>III</sup> and Lu <sup>III</sup> Complexes of a Set of dtpa Bis-Amide Ligands. Greiser J, Hagemann T, Niksch T, Traber P, Kupfer S, Gräfe S, Görls H, Weigand W, Freesmeyer M. <i>Eur. J. Inorg. Chem.</i> 4125–4137, <b>2015</b> .	
5.2 Publierte Originalarbeit P2.....	52
Investigations on the Ga(III) Complex of EOB-DTPA and its <sup>68</sup> Ga Radiolabeled Analogue. Greiser J, Niksch T, Weigand W, Freesmeyer M. <i>J. Vis. Exp.</i> 114, <b>2016</b> .	

5.3	Publizierte Originalarbeit P3.....	66
	<i>N</i> ,1,4-Tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-DAZA: efficient one-pot synthesis and labelling with <sup>68</sup> Ga for PET liver imaging <i>in ovo</i> . Greiser J, Kühnel C, Görls H, Weigand W, Freesmeyer M. <i>Dalton Trans.</i> 47, 9000 – 9007, <b>2018</b> .	
6	Weitere Ergebnisse .....	99
6.1	Zielstrukturen .....	99
6.2	Experimenteller Teil.....	101
6.2.1	Synthese und Charakterisierung der Liganden und [ <sup>nat</sup> Ga]Ga <sup>III</sup> -Komplexe.....	101
6.2.2	Markierung mit <sup>68</sup> Ga und Bestimmung der <i>in-vitro</i> -Stabilität.....	114
6.2.3	<i>In-ovo</i> -Bildgebung mit PET/CT .....	127
7	Zusammenfassende Diskussion .....	129
7.1	Strukturen und Synthese der Liganden .....	129
7.2	[ <sup>nat</sup> Ga] und [ <sup>68</sup> Ga]Ga <sup>III</sup> -Komplexsynthesen und -analytik.....	134
7.3	<i>In-vitro</i> -Stabilitäten der <sup>68</sup> Ga-Tracer .....	143
7.4	<i>In-ovo</i> -PET/CT-Bildgebung und Ausblick.....	147
8	Literaturverzeichnis.....	155
9	Danksagung.....	164
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	165
11	Anlagen.....	166



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

AAZTA	1,4-Bis(hydroxycarbonylmethyl)-6-[bis(hydroxycarbonylmethyl)]-amino-6-methylperhydro-1,4-diazepin
ACN	Acetonitril
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
Bq	Becquerel
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CT	Computertomographie
d	Tag
DATA	1,4-Diazepan-6-amin- <i>N</i> ,1,4-triessigsäure
DAZA	1,4-Diazepan-6-amin
Dedpa	<i>N,N'</i> -[6-(carboxy)-pyridin-2-yl]-1,2-diaminoethan
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7-10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTAGA	1,4,7-10-Tetraazacyclododekan-1-glutarsäure-4,7,10-tetraessigsäure
DO3A	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHIDA	<i>N</i> -(2,6-Diethylphenylcarbamoylemethyl)iminodiessigsäure
EHPG	<i>N,N'</i> -Ethylenbis[2-( <i>o</i> -hydroxyphenyl)glycin]
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EOB	4-Ethoxybenzyl
EO <sub>2</sub> B	2,4-Diethoxybenzyl
EOHB	4-Ethoxy-2-hydroxybenzyl
EtOH	Ethanol
EtOHB	4-Ethoxy-2-hydroxybenzyl – synonym zu EOHB, nur verwendet in Zusammenhang mit dem in P3 publizierten Liganden TEOHB-DAZA
FDG	2-Deoxy-2-fluor-D-glucose
FLT	3'-Fluor-3'-deoxy-L-thymidin
FMISO	1-(2-Nitro-imidazolyl)-3-fluor-2-propanol
FNH	Fokale nodulare Hyperplasie

## Abkürzungsverzeichnis

---

g	Gramm
GBq	Gigabecquerel
GMP	Good Manufacturing Practice
GSA	Galactosyl Human Serum Albumin
h	Stunde
HBED	<i>N,N'</i> -bis(2-hydroxybenzyl)-1,2-ethylenediamine- <i>N,N'</i> -diessigsäure
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HSA	Human Serum Albumin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HWZ	Halbwertszeit
IDA	Iminodiessigsäure
<i>i.v.</i>	intravenös
K	Komplexbildungskonstante
l	Liter
log	dekadischer Logarithmus
M	Molar, mol/l
MBq	Megabecquerel
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
mol	Mol, $6.022 \cdot 10^{23}$ Teilchen
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
NET	Neuroendokriner Tumor
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
NMR	Nuklearmagnetische Resonanz
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

NODAGA	1,4,7-Triazacyclononane-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure
NO2A	1,4,7-Triazacyclononan-1,4-diessigsäure
NOPO	1,4,7-triazacyclononan-1,4-bis[methylene(hydroxymethyl)- phosphinsäure]-7-[methylen(2-carboxyethyl)phosphinsäure]
NTCP	Natrium/Gallensäure-Kotransporter
OATP	Organische Anionentransporter
Octapa	<i>N,N'</i> -bis(6-carboxy-2-pyridylmethyl)ethyldiamin- <i>N,N'</i> -diessigsäure
PBS	Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung (0.9%)
PET	Positronen-Emissions-Computertomographie
<i>p.i.</i>	post Injektion
pmol	Picomol
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RCP	radiochemische Reinheit
RCY	radiochemische Ausbeute
$R_f$	Retentionsfaktor
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SPE	Festphasenextraktion
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Dünnschichtchromatographie
TRAP	Triazacyclononan-triphosphinat
TREN	Tris(2-aminoethyl)amin
TOC	Tyr <sup>3</sup> -Octreotide

## 1 Publikationsliste

---

### **Synthesis and Characterization of Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> Complexes of a Set of dtpa Bis-Amide Ligands**

Julia Greiser, Tino Hagemann, Tobias Niksch, Philipp Traber, Stephan Kupfer, Stefanie Gräfe, Helmar Görls, Wolfgang Weigand,\* Martin Freesmeyer\*

*Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 4125–4137, 10.1002/ejic.201500436.

### **Investigations on the Ga(III) complex of EOB-DTPA and its <sup>68</sup>Ga radiolabeled Analogue**

Julia Greiser, Tobias Niksch, Wolfgang Weigand,\* Martin Freesmeyer\*

*J. Vis. Exp.* **2016**, 114, e54334/1-e54334/13.

### **N,1,4-Tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-DAZA: Efficient one-pot synthesis and labelling with <sup>68</sup>Ga for PET liver imaging *in ovo***

Julia Greiser, Christian Kühnel, Helmar Görls, Wolfgang Weigand\*, Martin Freesmeyer\*

*Dalton Trans.* **2018**, 47, 9000 – 9007, 10.1039/c8dt01038b.

## 2 Angaben und Erklärung zu Eigenanteilen

### Synthesis and Characterization of Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> Complexes of a Set of dtpa Bis-Amide Ligands

Julia Greiser<sup>1</sup>, Tino Hagemann<sup>2</sup>, Tobias Nicksch<sup>3</sup>, Philipp Traber<sup>4</sup>, Stephan Kupfer<sup>5</sup>, Stefanie Gräfe<sup>6</sup>, Helmar Görls<sup>7</sup>, Wolfgang Weigand<sup>8</sup>, Martin Freesmeyer<sup>9</sup>

*Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 4125–4137, 10.1002/ejic.201500436.

Beteiligt an	Autoren								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Konzeption des Forschungsansatzes	x							x	x
Planung der Untersuchungen	x			x	x			x	
Datenerhebung – Synthese und Analytik	x	x							
Datenerhebung - Kristallstrukturanalyse							x		
Datenerhebung – DFT-Kalkulationen				x					
Datenanalyse und -interpretation	x			x	x				
Schreiben des Manuskriptes	x			x	x	x			
Diskussion des Manuskriptes	x		x					x	
<b>Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente</b>	1,0								

**Investigations on the Ga(III) complex of EOB-DTPA and its <sup>68</sup>Ga radiolabeled Analogue**

Julia Greiser<sup>1</sup>, Tobias Niksch<sup>2</sup>, Wolfgang Weigand<sup>3</sup>, Martin Freesmeyer<sup>4</sup>

*J. Vis. Exp.* **2016**, 114, e54334/1-e54334/13.

Beteiligt an	Autoren			
	1	2	3	4
Konzeption des Forschungsansatzes	x	x		x
Planung der Untersuchungen	x			
Datenerhebung	x			
Datenanalyse und -interpretation	x			
Schreiben des Manuskriptes	x			
Diskussion des Manuskriptes	x		x	
<b>Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente</b>	1,0			

**N,1,4-Tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-DAZA: Efficient one-pot synthesis and labelling with <sup>68</sup>Ga for PET liver imaging *in ovo***

Julia Greiser<sup>1</sup>, Christian Kühnel<sup>2</sup>, Helmar Görts<sup>3</sup>, Wolfgang Weigand<sup>4</sup>, Martin Freesmeyer<sup>5</sup>

*Dalton Trans.* **2018**, 47, 9000 – 9007, 10.1039/c8dt01038b.

Beteiligt an	Autoren				
	1	2	3	4	5
Konzeption des Forschungsansatzes	x				x
Planung der Untersuchungen	x				
Datenerhebung	x	x			
Datenerhebung – Kristallstrukturanalyse			x		
Datenanalyse und -interpretation	x				
Schreiben des Manuskriptes	x				
Diskussion des Manuskriptes	x			x	x
<b>Vorschlag Anrechnung Publikationsäquivalente</b>	1,0				

**Erklärung zu den Eigenanteilen der Promovendin sowie der weiterer Doktoranden/Doktorandinnen als Koautoren an den Publikationen und Zweitpublikationsrechten bei einer kumulativen Dissertation.**

Für alle in dieser kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte liegen die notwendigen Genehmigungen der Verlage für die Zweitpublikation vor.

Die Ko-Autoren der in dieser kumulativen Dissertation verwendeten Manuskripte sind sowohl über die Nutzung, als auch über die oben angegebenen Eigenanteile informiert und stimmen dem zu.

Ich bin mit der Abfassung der Dissertation als publikationsbasiert, d. h. kumulativ, einverstanden und bestätige die vorstehenden Angaben. Eine entsprechend begründete Befürwortung mit Angabe des wissenschaftlichen Anteils des Doktoranden an den verwendeten Publikationen werde ich parallel an den Rat der Medizinischen Fakultät richten.

Dipl.-Chem. Julia Greiser                      Jena                      \_\_\_\_\_

PD Dr. med. Martin Freesmeyer              Jena                      \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Wolfgang Weigand                      Jena                      \_\_\_\_\_



## 3 Zusammenfassung

---

Diese Dissertationsschrift beschreibt die Entwicklung neuartiger leberspezifischer  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka für die hepatobiliäre Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

In der bildgebenden Leberdiagnostik sind insbesondere die Magnetresonanztomographie (MRT) unter Verwendung leberspezifischer Kontrastmittel sowie die hepatobiliäre Funktionsszintigraphie mit leberspezifischen Radiopharmaka etabliert. Die MRT ist durch Kontraindikationen allerdings bei einigen Patienten nicht anwendbar und birgt darüber hinaus das Risiko von Nebenwirkungen der eingesetzten Kontrastmittel. Die hepatobiliäre Funktionsszintigraphie hingegen ist aufgrund der eingeschränkten räumlichen Auflösung und des Projektionscharakters limitiert. Die Bildgebung mit hepatotropen PET-Tracern könnte diese Nachteile überwinden und würde daher eine Alternative zu den genannten etablierten Verfahren der Leberbildgebung darstellen, ggf. diese sogar ablösen. Allerdings steht bisher kein geeignetes Diagnostikum für die hepatobiliäre PET-Bildgebung zur Verfügung.

Der Entwicklungsprozess der leberspezifischen  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer umfasst die Synthese neuartiger Liganden, die chemische bzw. radiochemische Komplexbildung der Metallionen  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{3+}$  und  $[\text{68Ga}]\text{Ga}^{3+}$ , die ausführliche Charakterisierung aller Verbindungen sowie *in-vitro*-Stabilitätsstudien aller  $[\text{68Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe durch Inkubation in Serum. Er beinhaltet weiterhin eine bildgebende *in-ovo*-Evaluation einiger ausgewählter  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer hinsichtlich ihrer Biodistribution anhand eines präklinischen Straußenembryonenmodells.

Die erfolgreichen Synthesen verschiedener Aminocarboxylate, Aminopicolinate und Aminophenolate als Chelatoren sind beschrieben. Alle Liganden weisen hierbei als funktionales hepatotropes Strukturelement mindestens eine 4-Alkoxyphenyleinheit auf, welche in den Aminophenolaten um eine 2-Hydroxygruppe am Aromaten erweitert ist. Die Liganden wurden mit  $^{68}\text{Ga}$  in Radiomarkierungsreaktionen zu den jeweiligen  $[\text{68Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexen umgesetzt und für jeden  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer ein Verfahren zur Aufreinigung entwickelt.

In Stabilitätsuntersuchungen *in-vitro* konnte gezeigt werden, dass die  $[\text{68Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe der Aminophenolate TMeOHB-DAZA, TEtOHB-DAZA und EO-HBED

eine hohe kinetische Inertheit besitzen, während die  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe der hierin beschriebenen Aminocarboxylate und Aminopicolinate durchweg zur Demetallierung neigen. In Folge der Ergebnisse dieser Stabilitätsstudie konnten die vier vielversprechendsten  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer ausgewählt und ihre Biodistribution anhand des *in-ovo*-Straußenembryonenmodells mit PET-Bildgebung untersucht werden. Die Verbindungen  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -TMeOHB-DAZA und  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -TEtOHB-DAZA zeigten hierbei den höchsten Leberuptake (bis zu 27%) und nachfolgende Exkretion in den Darm über das biliäre System. Es konnte bestätigt werden, dass diese  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer hinsichtlich der angestrebten Leberbildgebung erfolgversprechende Leitstrukturen darstellen. Darüber hinaus ermöglichte auch der Komplex  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED die Darstellung der Leber mittels PET, zeigte jedoch geringeren Uptake von bis zu 7%. Als Vertreter von kinetisch labilen  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexen zeigte  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA aufgrund rascher Demetallierung *in-ovo* eine unspezifische Aktivitätsverteilung im Blutpool bei gleichzeitig geringer Leberaufnahme (max. 5%), was mit einer nur unzureichenden Abgrenzung des Organs mittels PET-Bildgebung einherging.

Abseits des angestrebten Einsatzes von TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA als hepatotrope Liganden sind diese Strukturen auch aus koordinationschemischer Sicht interessant, da sie einen neuartigen Chelatortyp darstellen, der durch eine neu entwickelte, effektive Ein-Topf-Synthese per indirekter reduktiver Alkylierung gewonnen werden kann. Ausgehend von diesen Liganden könnten auch neue bifunktionelle Chelatoren für spezifische Fragen der Krebsdiagnostik effektiv zugänglich gemacht werden, z. B. durch Funktionalisierung des exozyklischen Aminostickstoffatoms.

Die leberspezifischen Verbindungen  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -TMeOHB-DAZA,  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -TEtOHB-DAZA und  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED werden aktuell am präklinischen *in-ovo*-Straußeneimodell mittels Sektionen der Embryos hinsichtlich der Biodistribution und Metabolisierung untersucht. Eine Radiosynthese der Tracer im Sinne der Guten Herstellungspraxis (GMP) für die klinische Anwendung ist in Entwicklung.

## 4 Einleitung

---

### 4.1 Motivation und Ziel der Arbeit

Als größte Drüse im menschlichen Körper kommt der Leber zentrale Bedeutung für den Stoffwechsel zu. Sie reinigt anderthalb Liter Blut pro Minute und hat als Verdauungs- und Ausscheidungsorgan erheblichen Einfluss auf die Gesundheit (Feine und Zum Winkel 1995). Zu ihren wichtigsten Aufgaben zählen die Verwertung und Speicherung von Nährstoffen, Abbau und Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Medikamenten und Giftstoffen, und die Produktion von Galle, Cholesterin und Proteinen sowie die Regulierung des Hormonhaushaltes.

Umso wichtiger ist die diagnostische Abklärung von Lebererkrankungen. Neben den Verfahren der Sonographie und der Computertomographie (CT) ist hierfür die sog. „molekulare Bildgebung“ von Relevanz. Der Begriff umfasst sowohl das bildgebende Verfahren der MRT, die auf der Kernspinresonanz in einem Magnetfeld beruht, als auch die nuklearmedizinischen Bildgebungsmethoden, bei denen durch Kernzerfälle emittierte Strahlung (Radioaktivität) detektiert wird. Diese Verfahren erlauben die Charakterisierung von Gewebeeigenschaften durch die spezifische Darstellung der Verteilung und Wechselwirkung verabreichter Diagnostika im Körper. Neben der Morphologie dienen sie der Darstellung des Metabolismus sowie der Interaktion zwischen Arzneimitteln und biologischen Targets und sind daher diagnostisch auf vielfältigste Weise einsetzbar (Alfke et al. 2001, Meikle et al. 2006).

Bei der MRT beruht die Bildgebung auf der Relaxation von Atomkernen (meist Wasserstoffkernen), welche zuvor in einem starken magnetischen Feld ausgerichtet und mittels Radiofrequenz-Impulsen angeregt werden. Der Gehalt an Wasserstoffkernen und die Relaxationszeiten unterscheiden sich in verschiedenen Gewebebereichen (Fett, Hirnsubstanz etc.), sodass diese als anatomische Bereiche von abstufter Helligkeit dargestellt werden können. Zur Verstärkung des Kontrastes werden häufig paramagnetische Substanzen wie Eisenpartikel,  $Mn^{II}$ - oder  $Gd^{III}$ -Verbindungen als Kontrastmittel (KM) eingesetzt, welche die Relaxationszeit der Wasserstoffkerne verkürzen (Fischbach und Fischbach 2017). In der Leberdiagnostik kommt der als Primovist® vermarktete  $Gd^{III}$ -EOB-DTPA-

Komplex zum Einsatz. Neben der anatomischen Bildgebung der Leber ist hier auch funktionelle Stoffwechselbildgebung möglich, basierend auf der frühen Phase der Anflutung und hepatischen Aufnahme des KM sowie der späteren hepatobiliären Exkretionsphase (biliär = den Gallengang betreffen). Leberfremde Tumore können abgegrenzt werden, da diese i. d. R keinen Lebermetabolismus aufweisen (Fischbach und Fischbach 2017).

In der nuklearmedizinischen Bildgebung hingegen werden Arzneimittel (sog. Radiopharmaka bzw. Radiotracer) verwendet, in denen Radionuklide an ein Molekül oder einen Stoff gebunden sind. Diese Radionuklide senden radioaktive Strahlung in Form von Partikeln und Photonen aus, die mit hochempfindlichen Detektoren erfasst werden können. Je nach Art der Strahlung wird hierbei zwischen szintigraphischen Methoden (Einzelphotonenemission) unter Verwendung von Gammastrahlern und der PET, bei der Positronenemitter eingesetzt werden, unterschieden. In der nuklearmedizinischen Bildgebung werden Stoffwechselprozesse dargestellt, wobei die Methoden nur sehr begrenzt die anatomische Zuordnung krankhafter Befunde erlaubt. Daher werden die Methoden heute in der Regel durch eine Computertomographie (CT) ergänzt, die anatomische Bildinformationen liefert und darüber hinaus eine Schwächungskorrektur erlaubt (Rahmim und Zaidi 2008). Die Kombination aus einem Positronenemissions- und einem Computertomographen nennt man PET/CT.

Die MRT besitzt gegenüber den nuklearmedizinischen Methoden eine höhere Ortsauflösung bis in den Submillimeterbereich (Alfke et al. 2001, Levin 2005, Meikle et al. 2006, Khalil et al. 2011). Jedoch sind die nuklearmedizinischen Methoden um ein Vielfaches empfindlicher; sodass für die Aufnahme eines hochaufgelösten Tomogramms bereits Stoffmengen des Radiotracers im Picomolbereich genügen (Alfke et al. 2001, Levin 2005, Meikle et al. 2006). Daher sind in der nuklearmedizinischen Bildgebung Nebenwirkungen abgesehen von der Strahlendosis weitestgehend unbekannt. In der MRT hingegen erzeugen die im Vergleich dazu hohen applizierten Mengen der Kontrastmittel im Millimolbereich regelmäßig und weithin bekannt Nebenwirkungen, die von Hitzegefühl, Übelkeit, Schwindel und Kopfschmerzen bis hin zu starker allergischer Reaktion und lebensbedrohlichem anaphylaktischen Schock reichen (Bayer 2017). Des

Weiteren zeigt die Forschung der letzten Jahre Berichte über Gadoliniumablagerungen im Gehirn von Patienten nach multiplen MRT-Kontrastmitteladministrationen; ein Effekt der verstärkt bei der Anwendung von „linearen“ KM (d. h. Gd-Komplexe azyklischer Liganden) wie Primovist® beobachtet wird (Olchowy et al. 2017). Die gesundheitlichen Folgen hieraus sind noch weitestgehend ungeklärt, es besteht jedoch der Verdacht, dass die Ablagerungen nephrogene systemische Fibrose (NSF) auslösen (Takahashi 2009). Des Weiteren werden freie Gd<sup>3+</sup>-Ionen als toxisch eingestuft (Rogosnitzky und Branch 2016, Olchowy et al. 2017). Entsprechend eines im Januar 2018 veröffentlichten Rote-Hand-Briefes zahlreicher Kontrastmittelhersteller in Zusammenarbeit mit der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) und dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) ruhen seit Februar die Zulassungen für mehrere Gd-haltige Kontrastmittel aufgrund der nicht abschätzbaren Nebenwirkungen der Ablagerungen des Schwermetalls (Borsch 2018, Rote-Hand-Brief 2018). Bereits 2017 hatte die EMA das Verbot von vier linearen Gd-Kontrastmitteln erwogen (RME 2017). Abgesehen von den Nebenwirkungen verhindern die starken Magnetfelder des MRT-Gerätes, dass Patienten mit Metallimplantaten (z. B. Herzschrittmacher, Stents, Spiralen zur Empfängnisverhütung) oder Klaustrophobie untersucht werden können. Auch bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion (Niereninsuffizienz) ist der Einsatz von MRT-Kontrastmittel kontraindiziert, da der Körper die gesundheitlich bedenklichen Kontrastmittel nicht rasch ausscheiden kann (Dill 2008).

Aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen und Kontraindikationen der leberspezifischen Gd-haltigen MRT-Kontrastmittel ist die Etablierung einer adäquaten nuklearmedizinischen Alternative wünschenswert. Das Ziel dieser Dissertation ist daher die Entwicklung eines auf dem Nuklid <sup>68</sup>Ga basierenden PET-Radiopharmakons, welches sich einerseits durch die Aufnahme in die Hepatozyten und andererseits durch die hepatobiliäre Ausscheidung auszeichnet und dessen Applikation die Standard-MRT-Leberdiagnostik ersetzen könnte.

### **4.2 Methoden der nuklearmedizinischen Bildgebung**

Da die für die nuklearmedizinische Bildgebung verwendeten Radionuklide in der Regel eine kurze physikalische Halbwertszeit aufweisen, sind die bildgebenden

Radiopharmaka meist nur wenige Stunden haltbar. Daher werden in der Nuklearmedizin keine off-the-shelf-Produkte verwendet, sondern der radioaktive Tracer wird unmittelbar vor der Anwendung am Patienten und oft sogar patientenindividuell hergestellt. Grundprinzip ist hierbei eine sog. „Markierung“, d. h. die Anbindung des Radionuklids an speziell für die diagnostische Frage entwickelte Moleküle. Je nach der chemischen Natur des Radionuklids erfolgt die Anbindung koordinativ durch Liganden oder als kovalente Bindung.

Die Art der emittierten Strahlung bestimmt die Methodik der Bildgebung in der Nuklearmedizin. Mittels Szintigraphie werden einzelne Gammaphotonen detektiert, wobei die dabei entstehenden „konventionellen“ planaren Darstellungen (Szintigramme) mit einer Gammakamera aufgenommen werden. Für die ergänzende Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) werden mehrere bewegliche Kameraköpfe eingesetzt (Abb. 1).



Abb. 1. Links: SPECT mit zwei Kameraköpfen (Siemens 2018). Rechts: PET/CT mit Detektorring (Stomp 2012).

Die Kameraköpfe nehmen gleichzeitig Szintigramme aus verschiedenen Winkeln auf und können um den Patienten rotieren, sodass mittels computergestützter Rekonstruktion dreidimensionale Schnittbilder errechnet werden können. Die Photonen werden durch einen Detektor (bestehend aus einer Vielzahl an Szintillationskristallen, häufig aus thalliumdotiertem Natriumiodid) und Photomultiplier in Licht und dieses wiederum in ein elektrisches Signal umgewandelt (Abb. 2, Meikle et al. 2006). Hierbei ist der Einsatz von Kollimatoren notwendig, die nur Photonen mit richtigem Einfallswinkel passieren lassen, während die restliche Strahlung im Kollimatormaterial (Blei oder Wolfram) absorbiert wird (Levin 2005). Dieses Vorgehen verhindert die Detektion von

Streuphotonen als „falsche“ Ereignisse und erhöht so den Bildkontrast. Gleichzeitig bedeutet dies jedoch auch, dass im SPECT nur ein sehr geringer Anteil (0,01% gegenüber ca. 1% in der PET) der ausgesandten Photonen tatsächlich für die Bildgebung verwendet wird (Levin 2005, Rahmim 2006). Verbreitet eingesetzte Gammaemitter sind die Nuklide  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$  oder  $^{111}\text{In}$  (Meikle et al. 2006). Insbesondere das Nuklid  $^{99m}\text{Tc}$ , das „Arbeitspferd“ der Nuklearmedizin, kommt aufgrund der einfachen radiochemischen Markierungsstrategie und der Verfügbarkeit durch  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generatoren nicht nur in Kliniken sondern auch flächendeckend in nuklearmedizinischen Praxen zum Einsatz. Das sog. Kit-Prinzip, bei dem eine radioaktive  $^{99m}\text{Tc}$ -Lösung aseptisch mit einem vorab portionierten Chelator zur Reaktion gebracht wird, ermöglicht auch weniger spezialisiertem Personal die Herstellung von  $^{99m}\text{Tc}$ -Radiotracern für unterschiedliche Diagnostikverfahren (z. B. Herzperfusion, Skelettszintigramm, statische und dynamische Nierenuntersuchungen).

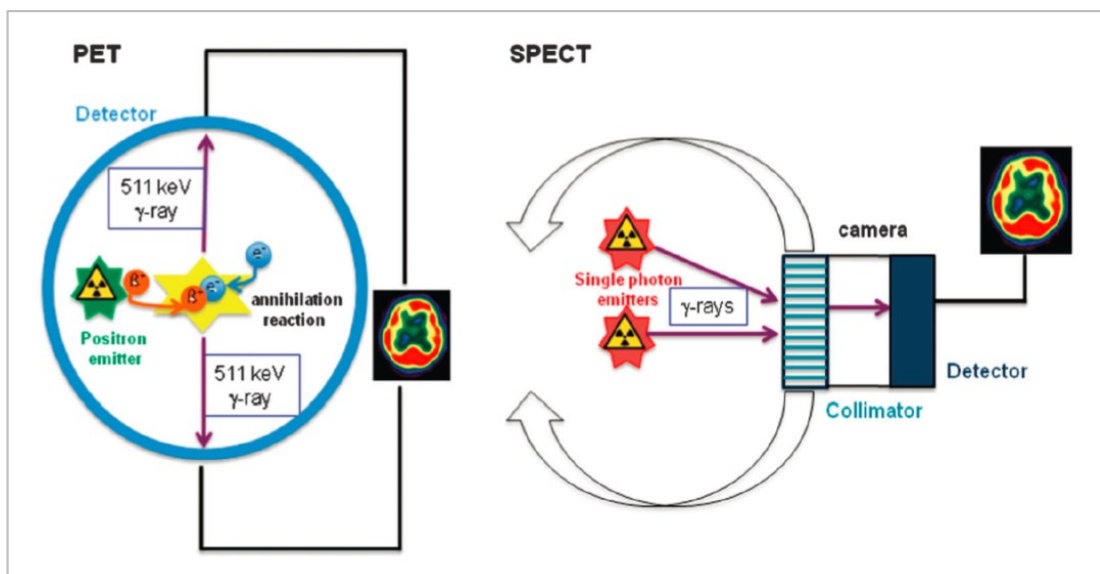


Abb. 2. Bildgebungsprinzip in der PET und der SPECT im Vergleich (Noel et al. 2013).

Im Rahmen der PET kommen Positronenemitter zum Einsatz. Positronen sind Antimaterieteilchen, die im Gewebe eine kurze Reichweite (sog. Positronenreichweite) besitzen, auf der Strecke dieser Positronenreichweite verlieren sie kinetische Energie, bis es zur Annihilation (Vernichtung) mit einem Elektron kommt. Dabei entstehen gemäß der Masse-Energie-Äquivalenz gleichzeitig zwei Gammaphotonen, die in entgegengesetzter Bewegungsrichtung



mit einer charakteristischen Photonenenergie von jeweils 511 keV emittiert werden (Abb. 2). Durch die Detektion dieser Annihilationsphotonen (Koinzidenz) ist die exakte Bestimmung des Ortes der Annihilation mittels elektronischer Kollimation möglich, ohne dass es wie bei der SPECT einer physikalischen Kollimation mit der entsprechend stark verringerten Detektionsrate bedarf (Levin 2005). Daher weist die PET eine höhere Empfindlichkeit auf und benötigt noch geringere Konzentrationen des Radiotracers ( $10^{-11}$ - $10^{-12}$  mol/L) als die SPECT ( $10^{-10}$ - $10^{-11}$  mol/L) (Levin 2005, Meikle et al. 2006, Rahmim 2006, Rahmim und Zaidi 2008). Aufgrund der höheren Energie der Photonen besteht der Detektorring des PET aus größeren Szintillationskristallen mit hoher Ordnungszahl; z. B. Bismutgermaniumoxid oder Cer-dotiertem Lutetiumoxyorthosilicat (Levin 2005).

Die räumliche Auflösung in der PET beträgt abhängig von der nuklidspezifischen Positronenreichweite für klinische Geräte ca. 4-6 mm, wohingegen in der SPECT am Patienten nur 8-12 mm erreicht werden (Alfke et al. 2001, Levin 2005, Rahmim 2006, Khalil et al. 2011). Mit der Pinholedetektionstechnik kann zwar in der SPECT bis zum Sub-Millimeter-Bereich aufgelöst werden, diese wird allerdings bisher nur in präklinischen Mikro-SPECT-Geräten für die Forschung am Kleintier eingesetzt (Levin 2005, Rahmim 2006).

Auch die zeitliche Auflösung ist beim PET höher, da die Scanzeiten aufgrund der höheren Empfindlichkeit gegenüber dem SPECT bei gleicher Bildqualität kürzer sind. Des Weiteren bedingt der Aufbau des SPECT, dass die Kameraköpfe während der Aufnahme langsam um den Patienten bewegt werden, was den Zeitaufwand für einen vollständigen Scan der gewünschten Körperregion verlängert (Rahmim 2006). Der Detektorring des PET hingegen ermöglicht die gleichzeitige dreidimensionale und dynamische Akquisition aus allen Richtungen, sodass kurze Zeitframes im sog. List-Mode aufgezeichnet werden können (Rahmim 2006). Insbesondere in der Leberbildgebung ist aufgrund der schnellen Anflutung und Hepatozytenaufnahme eines potentiellen Radiotracers eine hohe zeitliche Auflösung im Sinne einer dynamischen Bildgebung relevant. Die Voraussetzungen hierfür sind bei der PET deutlich besser als bei der SPECT. Eine weitere Stärke der PET gegenüber der SPECT liegt in ihrer Möglichkeit zur exakten Quantifizierung der Tracerkinetiken (Meikle et al. 2006).



PET, SPECT bzw. die CT-gekoppelten Hybridverfahren PET/CT und SPECT/CT und die Bildgebung mit MRT sind in erster Linie komplementäre Techniken diagnostischer Bildgebung, die sich ergänzen statt zu konkurrieren (Meikle et al. 2006). Aus den genannten Gründen erscheint jedoch die PET vor allem für die hochauflösende dynamische Stoffwechselbildgebung und somit für die Leberfunktionsbildgebung prädestiniert.

### 4.3 Leberdiagnostik - Status quo

#### 4.3.1 Die Leber und ihre Erkrankungen

Die Leber setzt sich aus dem Leberparenchym – dem eigentlichen Organ – und den Versorgungsgefäßen in sog. Portalfeldern zusammen. Das Parenchym wiederum besteht aus den Leberzellen (sog. Hepatozyten) und den Kupfferschen Sternzellen. Letztere gehören zum Retikulendothelialsystem (RES) und somit zum Immunsystem. Der Leber wird durch die Portalvene (75-85% d. Gesamtblutzufuhr) und die *Arteria hepatica* (15-25%) Blut zugeführt, drei Lebervenen dienen als abführende Blutgefäße. Von der Leber führen intra- und extrahepatische Gallengänge, welche über die Gallenblase in den Dünndarm ableiten (Feine und Zum Winkel 1995).

Zu den häufigsten Lebererkrankungen gehören Zirrhose, Hepatitis und primäre, d. h. lebereigene Tumore, sowie Steatose (Fettleber), medikamenteninduzierte Erkrankungen und Hämochromatose (Blachier et al. 2013). Auch leberfremde Metastasen, z. B. bösartiger Darmtumore und endokriner Tumore, können in der Leber wuchern (Ronot et al. 2016). Man unterscheidet gutartige Läsionen der Leber wie Zysten, Hämangiome, fokale nodulare Hyperplasie (FNH) und biliäre Hamartome sowie die selteneren Adenome von den bösartigen Malignomen wie dem hepatozellulären Karzinom (HCC) und dem cholangiozellulären Karzinom (CCC) (Ba-Ssalamah et al. 2004). Neben der primären Diagnostik der genannten Krankheitsbilder dienen bildgebende Verfahren auch der Therapiekontrolle, z. B. nach Chemotherapie, chirurgischen Verfahren und Lebertransplantation (Blachier et al. 2013).

#### 4.3.2 Magnetresonanztomographie

Aufgrund des guten Weichteilkontrastes und der hohen räumlichen Auflösung bis in den Submillimeterbereich (Alfke et al. 2001, Meikle et al. 2006) ist die MRT eine

exzellente Methode zur Darstellung von Lebertumoren und des Gallengangsystems (Ba-Ssalamah et al. 2004, Fischbach und Fischbach 2017). Für die MRT der Leber werden sowohl unspezifische als auch hepatozytenspezifische Kontrastmittel verwendet. Unspezifische KM (z. B. Gd-DTPA, Magnevist®) verteilen sich im Gefäßsystem und im Extrazellularraum. Die Charakterisierung von Lebertumoren erfolgt anhand des Bildkontrasts, der aufgrund der unterschiedlichen Perfusion in der frühen arteriellen Phase ca. 20 s nach Verabreichung des Kontrastmittels entsteht. Viele Lebertumore sind überwiegend arteriell versorgt im Gegensatz zum normalen Leberparenchym, das eine überwiegend venöse Blutversorgung aufweist (Ba-Ssalamah et al. 2004). Dieser Kontrast geht nach ca. 60 s mit Eintritt in die portalvenöse Phase verloren. Hepatozytenspezifische KM hingegen verhalten sich in der Frühphase zunächst wie extrazelluläre KM, reichern sich aber anschließend im Leberparenchym an, da sie durch Transportersysteme in die Leberzellen aufgenommen werden (Ba-Ssalamah et al. 2004, Fischbach und Fischbach 2017). Verantwortlich sind hierbei hauptsächlich die unspezifischen Organischen Anionentransporter (OATP) OATP1B1 und OATP1B3, sowie der Natrium/Gallensäure-Kotransporter (NTCP) (Leonhardt et al. 2010, Van Beers et al. 2012, Jia et al. 2012, Fischbach und Fischbach 2017). In der anschließenden hepatobiliären Phase erfolgt die Ausscheidung des KM in das Gallengangsystem (Fischbach und Fischbach 2017). Alle KM werden üblicherweise im Bolus venös verabreicht. Die schnelle Anflutung in der Frühphase, die nachfolgende hepatische Aufnahme und die hepatobiliäre Ausscheidung werden in dynamischen, zeitlich eng aufeinander folgenden Sequenzen aufgezeichnet (Fischbach und Fischbach 2017). Leberspezifische KM können neben der Charakterisierung fokaler Leberveränderungen allgemeine Informationen über die Funktionsweise der Leber liefern. Darüber hinaus ermöglichen sie die Kontrastierung der Gallenblase und der Gallenwege (Ba-Ssalamah et al. 2004). Indikationen für den Einsatz leberspezifischer KM sind deshalb nicht nur die Differenzierung unklarer Leberläsionen und die Detektion kleiner maligner Läsionen, sondern auch die Untersuchung der Gallenwege (Abb. 3, Stroszczyński et al. 2004).

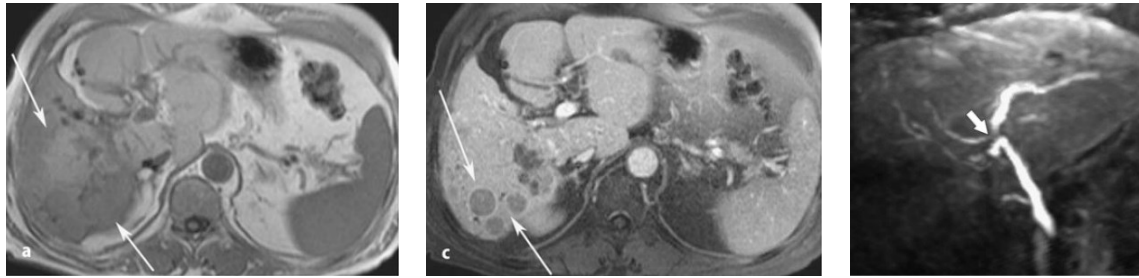


Abb. 3. Links: Darstellung eines HCC im MRT der Leber ohne KM. Mitte: In der Spätaufnahme nach Applikation von  $Gd^{III}$ -haltigem KM erscheint das HCC hypointens (Ba-Ssalamah et al. 2004). Rechts: Darstellung der Gallenwege nach Applikation von Mangafodipir® (Seale et al. 2009).

Das am häufigsten verwendete Leber-KM ist Primovist® („Gadoxetsäure“), ein  $Gd^{III}$ -Komplex einer funktionalisierten Diethylenetriaminpentaessigsäure (DTPA, Abb. 4, Weinmann et al. 1991, Vogler 2006, Van Beers et al. 2012). Es weist eine hepatozytenspezifische Aufnahme von 50% auf und ist somit einem weiteren leberspezifischen KM, MultiHance® (auch Gadobensäure oder Gd-BOPTA genannt) überlegen, welches nur 3-5% Aufnahme zeigt. Primovist® zeigt dadurch insbesondere in der Spätphase Vorteile bzgl. der Differenzierung und Detektion von Läsionen (Fischbach und Fischbach 2017). Der einzige strukturelle Unterschied zwischen den beiden KM ist die 4-Ethoxybenzylgruppe (EOB), die sich beim Primovist® an einer der Ethylenbrücken befindet, während Eovist® stattdessen einen Benzyloxymethylsubstituenten an einer Acetateinheit beinhaltet (Abb. 4). Da demzufolge die EOB-Gruppe offenkundig maßgeblichen Einfluss auf die Hepatozytenspezifität nimmt, wurde sie als zentrale leberdirigierende Einheit bei der Modellierung neuartiger hepatotroper Liganden im Rahmen dieser Dissertation verwendet.

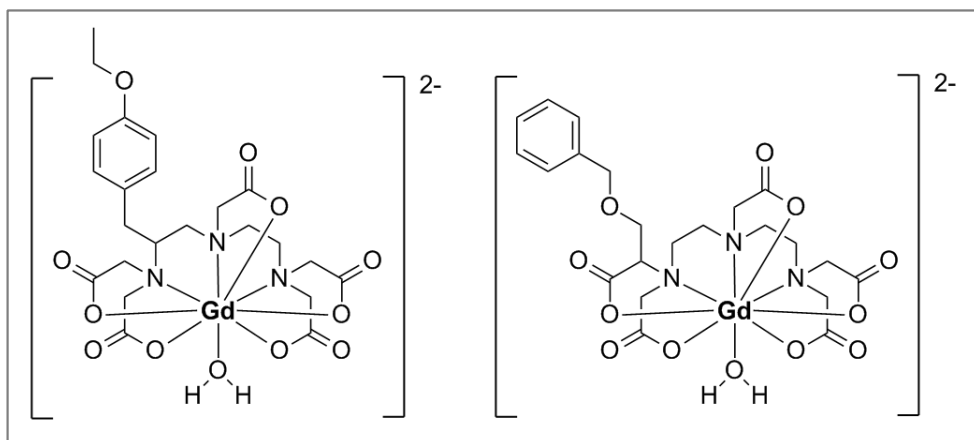


Abb. 4. Struktur von  $Gd^{III}$ -EOB-DTPA (Primovist®, links) und  $Gd^{III}$ -BOPTA (MultiHance®, rechts).

Die Primovist® Fachinformation warnt vor möglichen Nebenwirkungen wie anaphylaktischem Schock sowie allergieartigen Reaktionen (Bayer 2017). In Studien kam es bei 10% der Patienten zu mindestens einem unerwünschten Ereignis, 4% der Patienten berichteten über Nebenwirkungen unterschiedlicher Schwere (Bayer 2014). Bevor es 2012 durch den Hersteller vom Markt genommen wurde, kam auch das Mn<sup>II</sup>-haltige Mangafodipir® als leberspezifisches KM zum Einsatz, welches sich allerdings nicht nur in der Leber sondern auch in Pankreas, Nieren und Nebennieren anreichert (Ba-Ssalamah et al. 2004). Aktuell wird erwogen, Mangafodipir® als Alternative zu Gd<sup>III</sup>-haltigen KM zurück auf den Markt zu bringen (Bendergruppe 2018). Auch kolloidbasierte KM, welche das RES in der Leber ansprechen, können zur Leberdiagnostik eingesetzt werden (Ba-Ssalamah et al. 2004). Diese sog. SPIOs ermöglichen jedoch keine Aussagen über das Gallensystem, da sie über den Eisenstoffwechsel abgebaut werden (Stroszczyński et al. 2004).

### 4.3.3 Konventionelle Nuklearmedizin – Szintigraphische Methoden

Es gibt verschiedene Methoden der szintigraphischen Leberdiagnostik. Unterschieden werden statische Leberszintigraphie, Perfusionsszintigraphie und hepatobiliäre Funktionsszintigraphie. Für die Erkennung und Differentialdiagnose von Raumforderungen haben CT, MRT und Sonographie heutzutage allerdings größere Bedeutung (Buck et al. 2007).

Zunächst mit Radiogoldkolloiden durchgeführt, wurde die statische Leberszintigraphie ab Mitte der 60er Jahre durch mit <sup>99m</sup>Tc-markierte Schwefelkolloide klinisch etabliert (Feine und Zum Winkel 1995). Auch denaturierte Albuminkolloide sowie radiomarkiertes Phytat kamen zum Einsatz (Büll et al. 2001). Die statischen Aufnahmen ermöglichen die Bestimmung der Lage (z. B. bei Zweifelhernie, Zystenleber) und des Volumens (z. B. bei Zirrhose o. Hepatitis) des funktionellen Lebergewebes (Abb. 5, Büll et al. 2001). Die bevorzugte Speicherung kolloidaler Substanzen in der Leber erfolgt in den Kupfferschen Sternzellen, die nur 15% der Leber, jedoch über 90% des gesamten RES im Körper ausmachen (Feine und Zum Winkel 1995). Somit können bestimmte Speichermuster, Veränderungen des Leber-Milz-Quotienten und Störungen der Durchblutungsverhältnisse diagnostiziert werden. Inhomogene Speicherungen lassen auf Parenchymausfälle, z. B. aufgrund primärer

Leberkarzinome, Lebermetastasen, Lebervenenenthrombosen, Zirrhosen und vielen weiteren Krankheitsbildern schließen. Ein Nachteil der Methode besteht neben ihrer geringen Spezifität und niedrigen Bildqualität darin, dass auch die Zellen des RES in Milz und Knochenmark die radioaktiven Kolloide speichern, sodass diese Organe einer erhöhten Strahlenbelastung ausgesetzt sind (Feine und Zum Winkel 1995, Buck et al. 2007).

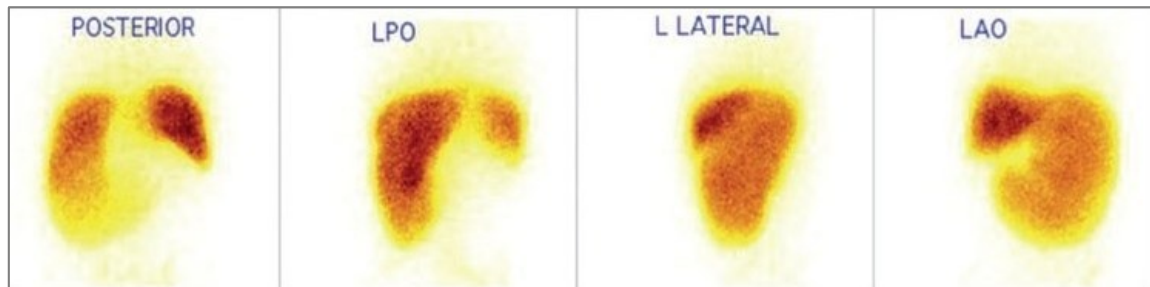


Abb. 5.  $^{99m}\text{Tc}$ -Schwefelkolloidszintigramme einer Leber mit nicht-zirrhosischer portaler Fibrose, Aufnahme des Kolloids in die Leber und Milz ist sichtbar (Chakraborty et al. 2010).

Die Perfusionsszintigraphie nutzt die doppelte Blutversorgung der Leber, um diagnostische Aussagen bezüglich der Durchblutungsverhältnisse zwischen arteriellem und portalvenösem Blutflussanteil zu treffen. Die Bildgebung erfolgt nach Bolusinjektion von  $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-DTPA. Im Gegensatz zur statischen Szintigraphie werden Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten angefertigt, um biphasische Zeit-Aktivitätskurven zu ermitteln. Mit Hilfe der Perfusionsszintigraphie können beispielsweise Thrombosen der Pfortader oder der *Arteria hepatica* diagnostiziert werden, sowie Hinweise auf das Vorliegen einer Leberzirrhose oder einer Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantationen gewonnen werden. Die Perfusionsszintigraphie kann darüber hinaus zur Verlaufskontrolle nach Anlegen eines Leberumgehungskreislaufes (eine Art künstlicher Ableitung für portales Blut bei vermindertem Leberdurchfluss) genutzt werden (Büll et al. 2001).

Die aktuell am häufigsten genutzte Methode zur nuklearmedizinischen Leberbildgebung ist die dynamische hepatobiliäre Funktionsszintigraphie (sog. Choleszintigraphie) (Buck et al. 2007). Anders als bei den kolloidalen Substanzen der statischen Szintigraphie werden hierbei Tracer verwendet, welche aktiv von den Hepatozyten aufgenommen und anschließend in die Gallengänge ausgeschieden werden (Feine und Zum Winkel 1995, Büll et al. 2001). Nach anfänglichen Versuchen mit radiomarkiertem Bengalrosa, Bromsulfan, Biligram

und Iodtetrinsäure gelang der entscheidende Durchbruch 1976 mit  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten Lidocainderivaten, sog. IDAs (Iminodiacetate). Diese sind aufgrund ihrer höheren Anreicherung in den Leberzellen, der stärkeren Ausscheidung über die Gallengänge in das Duodenum (oberer Teil des Dünndarms) sowie der rascheren Blutclearance den bis dato verwendeten Substanzen überlegen (Feine und Zum Winkel 1995). Mebrofenin (Bridatec® oder Cholecis®) und EHIDA (Etifenin®, Abb. 6) sind als Kits für die  $^{99m}\text{Tc}$ -Markierung zugelassen und kommen in der Leberszintigraphie zum Einsatz (Fritzberg und Klingensmith 1982). Sie ermöglichen Aussagen über die regionale und globale Leberfunktion sowie auch die Diagnostik der Gallenkinetik selbst bei hohen Bilirubinspiegeln (Feine und Zum Winkel 1995, Büll et al. 2001).

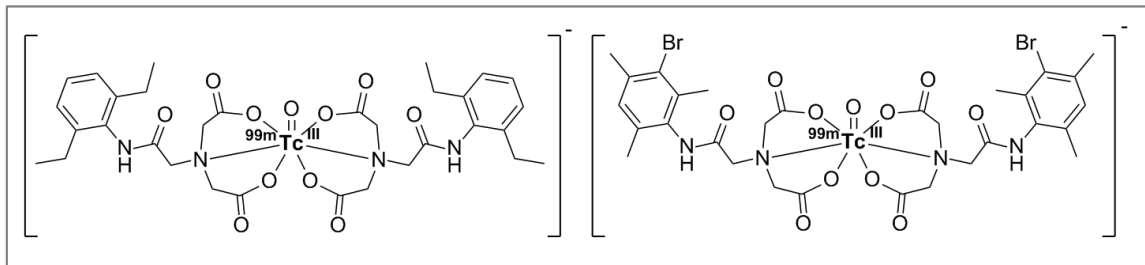


Abb. 6. Struktur von  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -EHIDA (links) und  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -Mebrofenin (rechts).

Die biologische Halbwertszeit  $^{99m}\text{Tc}$ -markierter IDA-Derivate im Blut beträgt aufgrund der raschen Aufnahme in die Hepatozyten lediglich 3-5 min. In der szintigraphischen Darstellung der Leber sind Effekte, die auf der doppelten Blutversorgung der Leber beruhen, insbesondere in den ersten Minuten messbar, sodass bei der Choleszintigraphie direkt nach intravenöser Applikation aufeinander folgende Szintigramme von 2-10 s Akquisitionszeit innerhalb der ersten 2 min akquiriert werden. Anschließend werden die Akquisitionszeiten auf 15-30 s verlängert. Mit Eintritt in die Parenchymphase (bei  $10 \pm 3$  min) werden bis 20 min nach Injektion (*p.i.*) Szintigramme über 2 min aufgenommen (Büll et al. 2001). Kurz nach der Parenchymphase beginnt die Exkretionsphase mit der Ausscheidung in den Hauptgallengang (bei  $10 \pm 4$  min), in die Gallenblase ( $15 \pm 5$  min) und ins Duodenum ( $20 \pm 8$  min, Abb. 7, Büll et al. 2001). Zwischen 20-45 min *p.i.* ist in der Regel die Darstellung der vollen Gallenblase möglich, während das Parenchym bei normaler Leberfunktion nach 60 min weitestgehend aktivitätsfrei sein sollte (Feine und Zum Winkel 1995, Büll et al. 2001). Statische

Spätaufnahmen folgen den frühen dynamischen Aufnahmen etwa 2-3 h *p.i.*, bei verzögerter Dünndarmaktivität oder Gallenwegsstauung sogar bis zu 24 h später (Büll et al. 2001).

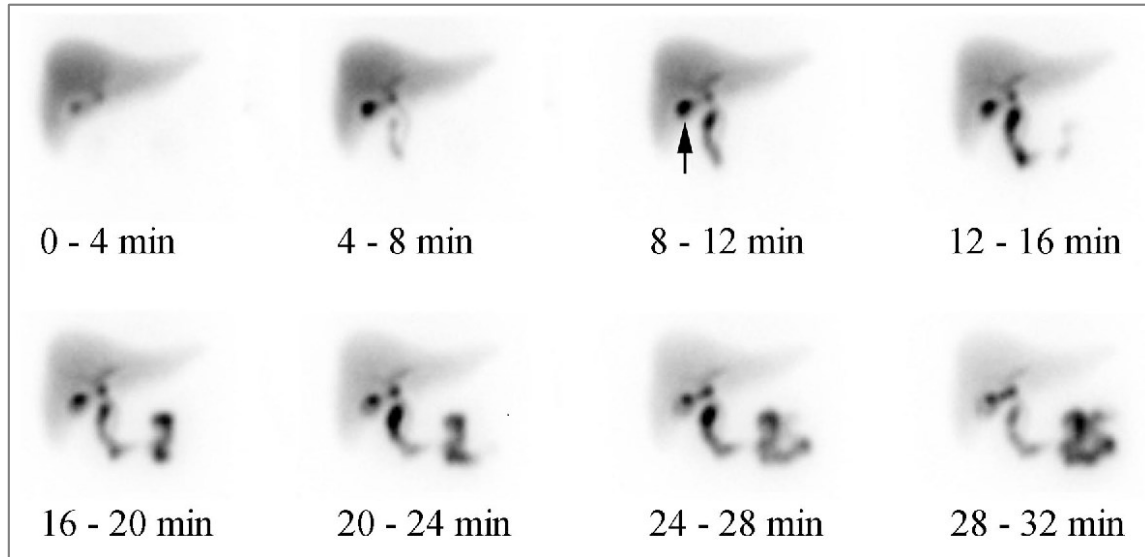


Abb. 7. Dynamische Serie von planaren HIDA-Szintigrammen zu den respektiven Zeitpunkten *p.i.* Die Entleerung der Gallenblase (Pfeil) aufgrund visueller appetitanregender Stimulation ist im Verlauf zu sehen (Tulchinsky 2011).

Die Choleszintigraphie ermöglicht aufgrund der zeitlich aufgelösten Darstellung der Leberspeicherung und Exkretion eine umfassende Diagnostik verschiedenster Krankheitsbilder der Leber, darunter Parenchymschäden (z. B. biliäre Zirrhose Abb. 8), Gallenwegsverschlüsse, Gallenblasenentzündung und Gallenleckagen (Feine und Zum Winkel 1995, Büll et al. 2001). Auch Hämangiome (die häufigsten quartigen Lebertumore), HCCs (Abb. 8) sowie Adenome und FNH können szintigraphisch dargestellt und differenziert werden. Neben der Choleszintigraphie ist die Blutpoolszintigraphie eine weitere dynamische Untersuchung. Dabei wird durch Injektion  $^{99m}\text{Tc}$ -markierter intakter Eigenblut-Erythrozyten der Blutfluss dargestellt, was z. B. die Detektion von Leberhämangiomen ermöglicht (Buck et al. 2007).

In der Szintigraphie bzw. der SPECT bedingen kurze Zeitframes im Rahmen dynamischer Aufnahmen einen Verlust der Bildqualität, sodass eine der MRT vergleichbare dynamische und zugleich räumlich hochauflösende Bildgebung nicht möglich ist. Mit Hilfe der PET allerdings lässt sich dieser Nachteil der konventionellen nuklearmedizinischen Methode überwinden, zeitlich und räumlich hochaufgelöste Aufnahmen werden ermöglicht.



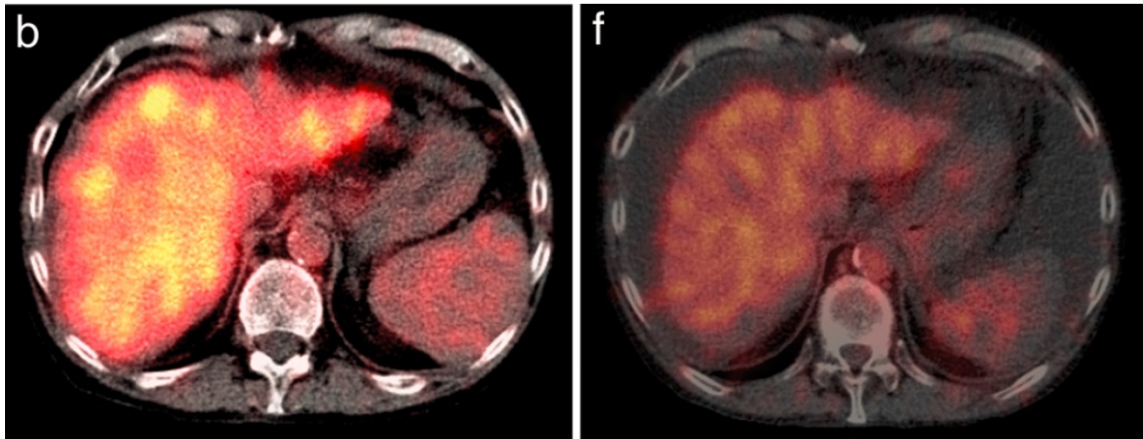


Abb. 8. SPECT/CT-Scan mit [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Mebrofenin einer zirrhotischen Leber (zu sehen an der ungleichmäßigen Aktivitätsverteilung). Links: HCC als Speicherungsdefekt im oberen linken Segment vor der Therapie. Rechts: Geschrunppte Leber nach Therapie (Radioembolisation) (Braat et al. 2017).

### 4.3.4 Leberdiagnostik mit PET

Die Leberdiagnostik mit PET bzw. PET/CT hat vor allem für onkologische Fragestellungen seit einigen Jahren an Bedeutung gewonnen (Buck et al. 2007). So werden HCCs und CCCs häufig mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG detektiert und auch der kurzlebige Tracer [ $^{11}\text{C}$ ]-Acetat (Abb. 9) hat sich bewährt (Ho et al. 2003, Wang et al. 2006, Cheung et al. 2013, Ijichi et al. 2013, Schierz et al. 2013, Detry et al. 2015, Boussouar et al. 2016). Metastasen neuroendokriner Tumore hingegen können bevorzugt mit  $^{68}\text{Ga}$ -markierten Somatostatinanaloga wie [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-DOTATOC identifiziert werden (Ronot et al. 2016). Radiomarkierte Antagonisten von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren, sog. RGD-Konjugate, können neben einer Reihe weiterer PET-Tracer wie [ $^{18}\text{F}$ ]FLT und [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO ebenfalls Lebertumore identifizieren (Haubner et al. 2001, Haubner et al. 2004, Buck et al. 2007, Haubner et al. 2016). Durch Targeting des Transferrinrezeptors auf Tumoren konnten durch Einsatz von [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-Citrat, einem schwachen Komplex welcher *in-vivo* zum [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-Transferrin transcheliiert, teilweise HCCs in der Leber eines Patienten dargestellt werden (Detektionsrate 30%). Da Transferrin ein Blutprotein ist, war ebenfalls eine persistent hohe Blutpool-Aktivität mit entsprechend vermindertem Bildkontrast, sowie auch die unspezifische Aufnahme von Aktivität in nicht-maligne Gewebeteile der Leber zu verzeichnen (Aparici et al. 2017). Der veränderte Kupfermetabolismus von HCCs gegenüber normalem Lebergewebe ermöglicht die Detektion der Tumore mit [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-chlorid, was an Mäusen gezeigt wurde (Wachsmann und Peng 2016).



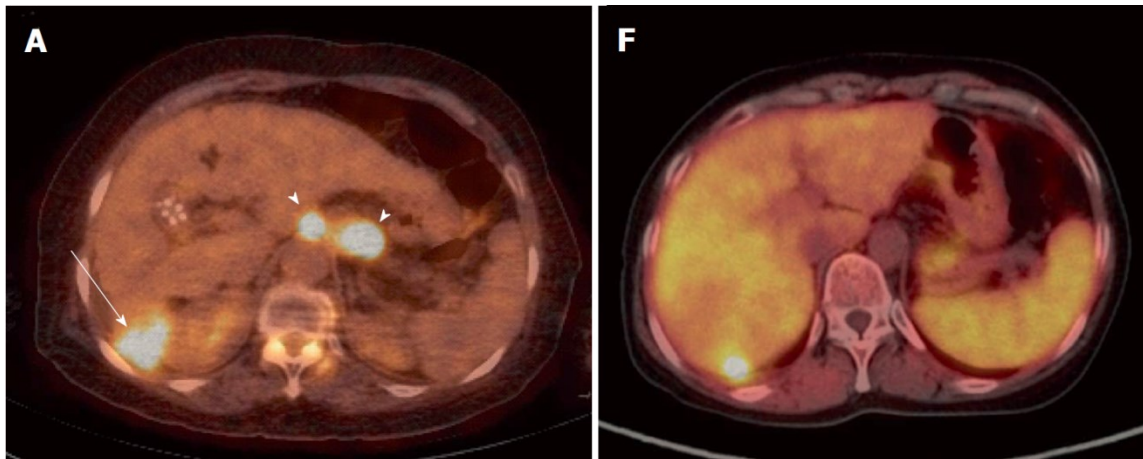


Abb. 9. Links: Detektion von HCC mit [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, rechts: Detektion von HCC mit [ $^{11}\text{C}$ ]-Acetat (Eo et al. 2014).

Ein PET-Analogon zur statischen Leberszintigraphie mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Schwefelkolloid wurde bereits 1981 in Form von  $^{68}\text{Ga}$ -Eisenhydroxidkolloiden entwickelt und zeigte eine dedizierte Akkumulation in der Leber, jedoch sind erwartungsgemäß keine dynamischen Studien und Gallengangsuntersuchungen möglich, da die Kolloide im RES gespeichert und nicht biliär ausgeschieden werden (Kumar et al. 1981). Intraarteriell injizierte  $^{68}\text{Ga}$ -markierte Mikropartikel zeigten eine selektive Akkumulation in HCCs in Rattenlebern und könnten zur Evaluierung vor einer selektiven internen Radiotherapie von Lebertumoren eingesetzt werden (Verger et al. 2016). Ein ähnlicher, auf Radioembolisation basierender Ansatz umfasste die intraarterielle Injektion von in Lipiodol dispergiertem [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-Oxin, welches eine selektive Leberanreicherung zeigte, trotz beobachteter Leckage von freiem  $^{68}\text{Ga}$  aus dem Lipiodol ins Serum (Ghosh et al. 2016). Ein Ansatz über die Blutpoldarstellung mit  $^{68}\text{Ga}$ -markiertem NOTA-konjugiertem Evans Blue (NEB), welches an Serumalbumin bindet, ermöglichte die Detektion von fokalen hepatischen Läsionen (Hämangiome zeigten Positivkontrast, HCC, Zysten und NET-Metastasen zeigten Negativkontrast, Zhang et al. 2015).

Eine bemerkenswerte Arbeit über einen potentiellen  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer für die Leberfunktionsbildgebung stammt bereits aus dem Jahre 1983 (Schuhmacher et al. 1983). Nachdem dieselbe Arbeitsgruppe zuvor kolloidbasiertes  $^{68}\text{Ga}$ -Alizarin als RES-gängigen Lebertracer vorstellte (Schuhmacher et al. 1980), zeigte ein  $^{68}\text{Ga}$ -markiertes Bromokresolphthalein-IDA-Derivat nicht nur eine hohe Stabilität sondern auch hohe Akkumulation in der Leber und sukzessive biliäre Exkretion (Schuhmacher et al. 1983). Die Substanzen wurden jeweils an gesunden

Freiwilligen getestet und lieferten vielversprechende Resultate, ein weiterer klinischer Einsatz war danach jedoch nicht mehr zu verzeichnen (Schuhmacher et al. 1980, Schuhmacher et al. 1983). Alle weiteren Ansätze zur funktionalen Leberbildgebung mit PET befinden sich noch im präklinischen Forschungsstadium. Haubner et al. zielten auf die Darstellung der funktionalen Lebermasse durch  $^{68}\text{Ga}$ -markiertes GSA (Galactosyl Human Serum Albumin), welches an den Asialoglycoproteinrezeptor bindet, der ausschließlich auf den Hepatozytenoberflächen von Säugetieren exprimiert wird. Die zunächst mangelnde Stabilität im Serum bei Verwendung eines DTPA-konjugierten GSA wurde durch die schnelle Aufnahme in die Leber ausgeglichen, sodass eine PET-Bildgebung der Leber in Ratten möglich war (Haubner et al. 2013). Durch Entwicklung eines NOTA-konjugierten GSA konnte die Serumstabilität *in-vivo* signifikant verbessert werden bei vergleichbarem diagnostischen Wert (Haubner et al. 2017). Ähnliche Ansätze auf Basis von NOTA-konjugiertem Human Serum Albumin (HSA), verknüpft mit Lactose- anstatt Galactoseeinheiten, erzielten vergleichbare Ergebnisse (Choi et al. 2014, Yu et al. 2018). Über das Exkretionsverhalten und die Möglichkeit zur Diagnose der Gallenkinetik wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht berichtet.

Die Visualisierung der Lebertransporterproteine, insbesondere des Anionentransporters OATP1B1, der auch für die Aufnahme von  $\text{Gd}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA in die Hepatozyten verantwortlich ist, konnte durch Einsatz von  $^{18}\text{F}$ -markierten Gallensäurederivaten erfolgreich gezeigt werden (Testa et al. 2017). Das  $^{18}\text{F}$ -fluorinierte Lithocolsäurederivat zeigte eine rasche Aufnahme in die Leber und anschließende Exkretion in die Gallenwege und ist einer von mehreren  $^{18}\text{F}$ -markierten Substraten für die funktionelle PET-Leberdiagnostik (Jia et al. 2014, Wanek et al. 2016, Testa et al. 2017). Zuvor waren bereits eine Reihe von Arzneimitteln mit bekanntermaßen hepatischer Exkretion mit  $^{11}\text{C}$  markiert und hinsichtlich ihrer Eignung als PET-Tracer für Lebertransporter- und allgemeine Leberfunktionsbildgebung untersucht worden. Testa et al. und Langer et al. geben über diese verschiedenen  $^{11}\text{C}$ -Tracer wie z. B. das [ $^{11}\text{C}$ ]C-Cholylsarcosin (Frisch et al. 2012, Orntoft et al. 2018) einen guten Überblick (Testa et al. 2015, Langer 2016). Ein bedeutender Nachteil liegt in der kurzen Halbwertszeit des  $^{11}\text{C}$ -Nuklides (ca. 20 min), was ausschließlich die Produktion in PET-Zentren erlaubt (Testa et

al. 2017) und darüber hinaus keine Spätaufnahmen (nach mehreren Stunden, z. B. bei pathologisch verzögerter Exkretion) gestattet. Ein Forschungsansatz, der ebenfalls auf funktionalisierte Gallensäuren zielt, welche das Radiometallnuklid  $^{64}\text{Cu}$  binden, wurde 2015 publiziert, jedoch fehlen bislang Ergebnisse von *in-vivo*-Studien (Chong et al. 2015). Das PET-Isotop  $^{64}\text{Cu}$  wäre aufgrund seiner vergleichsweise langen Halbwertszeit (HWZ) von 12.7 h u. a. interessant für Spätaufnahmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass abgesehen von der erwähnten Arbeit von Schuhmacher et al. noch kein geeigneter  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer entwickelt wurde, der eine den  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IDA-Derivaten oder dem Primovist® gleichwertige spezifische Leberaufnahme und hepatobiliäre Clearance zeigt. Auf den PET-Nukliden  $^{18}\text{F}$  und  $^{11}\text{C}$  basierende Ansätze sind zwar vielversprechend, erfordern aber die Nähe zu einem Zyklotron und stellen generell höhere Anforderungen an das Markierungsprozedere, welches im Falle des  $^{11}\text{C}$  aufgrund der kurzen Halbwertszeit auch noch ein zeitliches Problem darstellen kann. Demgegenüber wäre eine Markierung mit  $^{68}\text{Ga}$  aufgrund transportabler Generatoren unabhängig von der unmittelbaren Nähe eines Zyklotrons möglich. Auch besteht die Aussicht für diagnostische Fragestellungen, welche Spätaufnahmen erfordern, ein kurzlebiges Radiometall wie  $^{68}\text{Ga}$  vergleichsweise unproblematisch durch ein längerlebigeres metallisches Radionuklid wie  $^{64}\text{Cu}$  zu ersetzen, welches ähnlich starke Affinitäten zu O- und N-Donoren aufweist (Cutler et al. 2013).

### 4.4 $^{68}\text{Ga}$ – das PET-Nuklid aus der Dose

Neben dem am häufigsten eingesetzten PET-Nuklid  $^{18}\text{F}$ , welches nicht nur zur Herstellung von [ $^{18}\text{F}$ ]FDG sondern auch zur Markierung anderer Biomoleküle wie z. B. Aminosäuren verwendet wird, hat die Bedeutung des  $^{68}\text{Ga}$ -Nuklids seit Beginn der 2000er Jahre stark zugenommen (Roesch 2013). Die Radiomarkierung mit  $^{18}\text{F}$  erfordert i. d. R. vielstufige Syntheseabläufe, häufig unter Verwendung organischer Lösemittel, Schutzgruppenstrategien und komplizierten Aufreinigungsverfahren, und sie ist nur in Produktionslabors in der Nähe zu einem Zyklotron durchführbar. Für die Metallkomplexbildung von Radiometallen hingegen genügt meist die Zugabe eines entsprechenden Chelators in einem üblicherweise gepufferten System für eine schnelle, spezifische und effektive Markierungs-

reaktion. Die vielseitige Derivatisierung und Funktionalisierung etablierter Chelatoren, z. B. mit rezeptorspezifischen Peptiden und Proteinen (wie DOTATOC, PSMA, RGD oder Exendin-4, Velikyan 2015a) oder stoffwechselspezifischen Einheiten (Notni et al. 2012), macht ein theoretisch unbegrenztes Spektrum an Tracern für patientenindividuelle diagnostische oder therapeutische Fragestellungen zugänglich.

Der bedeutendste Grund für den Erfolg des  $^{68}\text{Ga}$ -Nuklides ist seine Zugänglichkeit über Generatorsysteme (Roesch 2013). Generatoren basieren auf dem Prinzip der stationären Imprägnierung eines radioaktiven Mutternuklides - hier ist es  $^{68}\text{Ge}$  -, aus welchem das Tochternuklid durch entsprechende physikalische Trennverfahren wie z. B. Chromatographie gewonnen werden kann (Abb. 10). Dies ermöglicht die Bereitstellung des Tochternuklids durch simple Techniken innerhalb von wenigen Minuten in hoher radiochemischer Reinheit und mit guten Ausbeuten. Weitere Vorteile dieser Generatoren gegenüber einem Zyklotron oder Reaktor bestehen in ihrer geringen Größe, Transportierbarkeit und der vielfachen, z. T. sehr langen Nutzbarkeit auch durch weniger spezialisiertes Personal (Roesch 2013, Velikyan 2015a, Chakravarty et al. 2016). Anfängliche Modelle von  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren in den 1960er Jahren, die zunächst noch auf Flüssig-Flüssig-Extraktion basierten, wurden von Festphasensystemen abgelöst, in denen das  $^{68}\text{Ge}$  je nach Modell auf verschiedenen anorganischen (z. B.  $\text{TiO}_2$  oder  $\text{SnO}_2$ ) und organischen Matrices (z. B. Dodecylgallat auf Silicagel) adsorbiert ist (Roesch 2013, Velikyan 2015b). Während die ersten Modelle mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) eluiert wurden, wird spätestens mit der Etablierung des „Obninsk“-Generators das  $^{68}\text{Ga}$  nun standardmäßig als salzsaures chelatorfreies Eluat gewonnen (Roesch 2013, Velikyan 2015b). Inzwischen liefern die meisten Generatoren Eluate von hoher Radionuklidreinheit, Sterilität und Pyrogenfreiheit und zeigen eine ausreichend lange Lebensdauer, sodass die ersten Produkte bereits für den pharmazeutischen Markt zugelassen wurden. Die Erforschung und Entwicklung von  $^{68}\text{Ga}$ -Tracern mit zunehmender klinischer Anwendungsbreite ist ein wachsendes Interessengebiet (Velikyan 2015a).

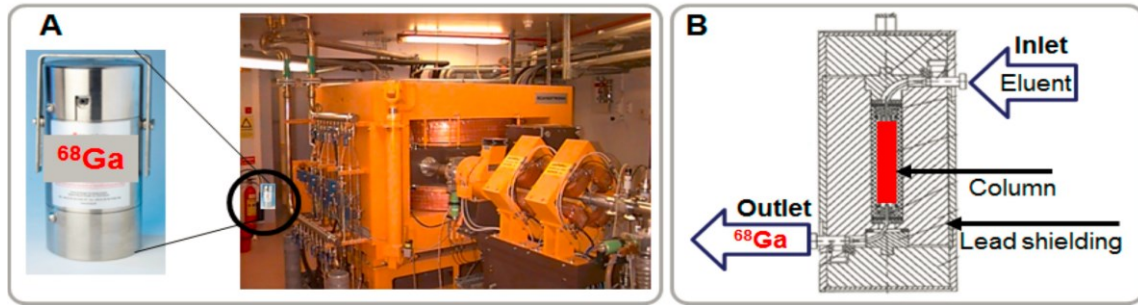


Abb. 10. Darstellung eines Zyklotrons gegenüber der Größe eines üblichen  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators (A), Aufbauprinzip eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators (B) (Velikyan 2015b).

Für  $^{68}\text{Ga}$  gilt, wie auch für andere Radionuklide, dass aufgrund der geringen Mengen des radioaktiven Metalls in den Markierungslösungen (1 GBq Aktivität entspricht  $5,9 \cdot 10^{12}$   $^{68}\text{Ga}$ -Atomen, also ca. 10 pmol) höchste Anforderungen an die Reinheit der eingesetzten Reagenzien sowie auch an das Eluat selbst gerichtet werden müssen. Vor allem metallische Verunreinigungen gehen oft mit einer drastisch verschlechterten Markierungsausbeute einher, sodass die  $^{68}\text{Ga}$ -Eluate aus den Generatoren i. d. R. einer Aufreinigung zur Abtrennung des Mutternuklides  $^{68}\text{Ge}$  sowie des aus dem Zerfall des  $^{68}\text{Ga}$  stammenden Enkeltochternuklides  $^{68}\text{Zn}$  unterzogen werden. Weiterhin sollten vor allem keine eisenhaltigen Substanzen mit den Lösungen in Berührung kommen, da  $\text{Fe}^{\text{III}}$  und  $\text{Ga}^{\text{III}}$  sich chemisch stark ähneln und bezüglich der Komplexbildung in Konkurrenz zueinander treten. Auch auf die regelmäßige Elution der Generatoren zur Verhinderung langer Standzeiten und der damit verbundenen Akkumulation des  $^{68}\text{Zn}$  muss für Radiosynthesen geachtet werden (Fani et al. 2008, Velikyan 2015b, Velikyan 2015a).

Auch die physikalischen Charakteristika haben  $^{68}\text{Ga}$  zu einem der wichtigsten PET-Nuklide werden lassen: Die HWZ von 68 min ist ausreichend lang, um die Radiomarkierung und Aufreinigung sowie Qualitätskontrolle der produzierten Tracer zu ermöglichen und gleichzeitig kurz genug, um unnötige Strahlenbelastungen der untersuchten Patienten zu minimieren. Aufgrund der HWZ ist  $^{68}\text{Ga}$  geeignet für Aufnahmen bis zu ca. 3 h *p.i.* und deckt somit den Standarduntersuchungszeitraum der Leberdiagnostik ab. Der Zerfallsweg des Nuklides liefert zu 89% Positronen durch Beta-Plus-Zerfall, welche mit einer mittleren Positronenenergie von 740 keV eine ausreichend hohe Auflösung mit PET/CT ermöglichen (Fani et al. 2008, Price et al. 2016). Darüber hinaus ermöglicht das Vorhandensein der natürlichen stabilen Isotope  $^{69}\text{Ga}$  und  $^{71}\text{Ga}$  (im

Folgenden zusammengefasst als  $^{nat}\text{Ga}$ ) die Synthese der  $[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe zum Zwecke der Charakterisierung und Analytik hinsichtlich der chemisch identischen  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer.

#### 4.5 Koordinationschemie des $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$

Aufgrund seiner Härte bevorzugt das  $\text{Ga}^{3+}$ -Ion N- und O-Donoren (Green und Welch 1989). Koordinationsverbindungen mit S-Donoren sind ebenfalls bekannt (Fani et al. 2008, Price et al. 2016). Generell gilt, dass das  $\text{Ga}^{3+}$ -Ion eine große Ähnlichkeit zum  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion zeigt, da beide sich in ihrer Ladung gleichen, ähnliche Ionenradien aufweisen und Hexakoordinationen bevorzugen (Green und Welch 1989, Price et al. 2016). Im Wässrigen liegt das hydratisierte  $\text{Ga}^{3+}$ -Ion nur bei niedrigen pH-Werten als Hexaaquakomplex vor; ab pH-Werten  $> 3$  beginnt bereits die Bildung von kolloidalem  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Hydroxid (im radiopharmazeutischen wie auch im folgenden Kontext als „ $^{68}\text{Ga}$ -Kolloid“ bezeichnet), welches die Komplexbildung inhibiert. Das  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Hydroxid agiert als Säure-Base-Amphoter und geht bei höheren pH-Werten unter Bildung von Tetrahydroxogallat wieder in Lösung (Green und Welch 1989). Aufgrund dieser Eigenschaften findet die  $^{68}\text{Ga}$ -Tracerherstellung üblicherweise im sauren pH-Bereich statt (Tsionou et al. 2017).

Die Anfänge der Bildgebung mit  $^{68}\text{Ga}$  umfassten den Einsatz von vergleichsweise labilen Komplexen wie  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Citrat, welches in Analogie zum früheren szintigraphisch eingesetzten  $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Citrat zur Bildgebung von Entzündungsherden eingesetzt wurde. Der Effekt beruht hierbei auf der *in-vivo*-Transchelierung des  $^{68}\text{Ga}$  vom schwachen Citratliganden auf das eisenaffine Blutprotein Transferrin (Jensen et al. 2013). Aufgrund der erwähnten Ähnlichkeit der Metallionen  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Ga}^{3+}$  sind auch Siderophore wie Desferrioxamin (Smith-Jones et al. 1994, Mathias et al. 2003) oder Enterobactin (Moerlein und Welch 1981, Kappel et al. 1985) als Chelatoren für  $\text{Ga}^{\text{III}}$  geeignet. Frühe Studien konzentrierten sich daher auch auf bekannte Eisenbinder wie HBED (Bergeron et al. 1998), PLED (Green et al. 1985a) und EHPG (Madsen et al. 1992). Auch wurden Salicylaldimine bereits früh als Liganden für  $\text{Ga}^{\text{III}}$  entdeckt (Green et al. 1984, Green et al. 1985b, Evans und Jakubovic 1988).

Nach Ansätzen unter Verwendung der Polyaminocarboxylate EDTA (Moskin et al. 1986, Pozzilli et al. 1988, von Holst et al. 1989) und DTPA (Wagner und Welch



1979, Moerlein et al. 1991), welche bis heute für bestimmte diagnostische Fragen zum Einsatz kommen (Hofman et al. 2015), begann der Siegeszug der Makrozyklen DOTA und NOTA und deren zahlreicher Derivate wie DOTAGA bzw. NODAGA, DO3A und NO2A (Cutler et al. 2013, Price et al. 2016). Diese Makrozyklen bilden die Grundlage für zahlreiche aktuell klinisch eingesetzte  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer wie  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Somatostatinanaloga und  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -PSMA (Velikyan 2015a, Zhu et al. 2015). Eine Weiterentwicklung des NOTA-Zyklus sind die phosphorsäurehaltigen TRAP (Notni et al. 2011) und NOPO (Simecek et al. 2013), die ebenfalls hervorragende Koordinationsfähigkeiten für  $^{68}\text{Ga}$  aufweisen. Die Azacyklen AAZTA und DATA kombinieren aufgrund ihres flexiblen Siebenrings die hohen Komplexstabilitäten von Makrozyklen mit der schnellen Markierungskinetik von azyklischen Chelatoren (Parker und Waldron 2013, Waldron et al. 2013, Roesch et al. 2014, Nock et al. 2017). Die sog. „pa“-Familie umfasst azyklische, picolinatbasierte Chelatoren, von denen die Verbindungen Dedpa und Octapa auf dem Ethylendiamingerüst basieren und sich als geeignete Liganden für  $^{68}\text{Ga}$  (Boros et al. 2010, Boros et al. 2011a, Boros et al. 2012c, Ramogida et al. 2015a, Ramogida et al. 2015c) und  $^{64}\text{Cu}$  (Boros et al. 2011b, Boros et al. 2012a, Ramogida et al. 2016a) erwiesen haben. Es existieren noch zahlreiche weitere Chelatorsysteme, die hier nicht alle erschöpfend gelistet werden können. Die genannten Liganden stellen die am häufigsten angewendeten bzw. die vielversprechendsten Chelatoren für  $^{68}\text{Ga}$  dar und wurden daher im Rahmen dieser Dissertation als Leitstrukturen für das Koordinationsgerüst verwendet.

Ein optimaler Chelator für  $^{68}\text{Ga}$  vereint günstige Markierungseigenschaften, d. h. eine rasche Koordination des Metallions bei möglichst niedrigen Temperaturen und möglichst geringen Mengen des Liganden, mit einer hohen  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexstabilität. Aufgrund der sehr niedrigen Konzentration der  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -Ionen in der Radiomarkierungslösung und dem entsprechend hohen Überschuss der Liganden laufen die Reaktionen meist innerhalb wenigen Minuten quantitativ ab, jedoch existieren Unterschiede bezüglich der Effektivität der Koordination, die sich in den Reaktionsbedingungen widerspiegeln: Die Komplexbildung mit azyklischen Liganden wie DTPA und HBED ist kinetisch begünstigt und findet daher schon bei Raumtemperatur quantitativ statt, während die rigiden Makrozyklen wie DOTA und NOTA erhöhte Reaktionstemperaturen erfordern (Price et al. 2016). Während der

Markierungsreaktion wird meist ein pH-Bereich von 3,5-4,0 realisiert, um die Bildung von  $^{68}\text{Ga}$ -Kolloid als Konkurrenz zur Komplexbildung zu vermeiden. Die Neigung des  $\text{Ga}^{\text{III}}$  zur Bildung von Tetrahydroxogallat kann den Zerfall der Metallkomplexe im basischen Milieu verursachen; sehr labile Komplexe demetallieren bereits bei physiologischem pH-Wert (Pfeifer-Leeg et al. 2016).

Im Körper wird die Stabilität der Radiometallkomplexe durch Demetallierung (durch Hydrolyse), Transchelierung (z. B. durch Transferrin) und ungewünschte Metabolisierung limitiert. Sie müssen in der Lage sein, natürliche Barrieren zu überwinden (Zellwände, Blut-Hirn-Schranke etc.) um sich in den Zielstrukturen anzureichern. Vor allem die hohe Bindungsaffinität des Transferrin zum  $^{68}\text{Ga}$  (Komplexbildungskonstante  $\log K = 20,3$ )<sup>76</sup> macht dieses Protein zum bedeutsamsten Konkurrenten um das  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -Ion in der Anwendung der Komplexe *in-vivo* (Fani et al. 2008, Price et al. 2016). Es gilt der generelle Konsens, dass kinetische Inertheit für die Unversehrtheit des Tracers *in-vivo* wichtiger ist als thermodynamische Komplexstabilität (Fani et al. 2008, Farkas et al. 2017). Makrozyklen haben daher häufig einen Vorteil gegenüber azyklischen Liganden, deren  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe kinetisch labiler sind und rascher durch Ligandenaustausch entsprechend dem Prinzip „easy in, easy out“ zersetzt werden (Ramogida et al. 2015b).

Nach der intravenösen (*i.v.*) Applikation eines Tracers ist die Leber aufgrund ihrer starken Durchblutungsrate eines der ersten Organe, welche passiert werden und den  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer somit aufnehmen können. Insofern muss ein potentieller  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer für die Leberfunktionsbildgebung eine ausreichende Stabilität aufweisen, um nicht bereits im Blut demetalliert oder metabolisiert zu werden, ehe er von den Hepatozyten aufgenommen werden kann. Dies kann durch die Auswahl eines geeigneten Ligandengerüsts gewährleistet werden.

### 4.6 Forschungsansatz

Ziel dieser Dissertation ist die Entwicklung von auf  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexen basierenden PET-Radiopharmaka, welche sich durch eine hepatozytenspezifische Aufnahme in die Leber und eine hepatobiliäre Ausscheidung über die Gallenwege auszeichnen.



Bei der Modellierung hepatotroper Liganden dient EOB-DTPA als Leitstruktur, da dieser Ligand dem leberspezifischen Gd-MRT-Kontrastmittel Primovist® zugrunde liegt. Neben EOB-DTPA ist die Isolierung weiterer hepatotroper Liganden geplant. Es ist beabsichtigt, mindestens hexakoordinierende Chelatorsysteme zu synthetisieren, um die bevorzugt sechsfache Koordinationssphäre des  $\text{Ga}^{3+}$ -Ions zu erfüllen. Liganden auf Grundlage der IDA-Strukturen, die als  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}$ -Komplex in der Choleszintigraphie eingesetzt werden, gelten generell als ungeeignete Chelatoren für  $^{68}\text{Ga}$ , da es sich um dreizählige Liganden handelt. Die entsprechenden Bischelatkomplexe mit  $\text{Ga}^{\text{III}}$  weisen eine zu geringe Stabilität auf, sodass die Anwendbarkeit nicht aussichtsreich ist (Pfeifer-Leeg et al. 2016). Eine Ausnahme bildet hierbei das bereits erwähnte IDA-Derivat, dessen Stabilität auf die zusätzliche vom Kresolphthalein abgeleitete Struktureinheit zurückzuführen ist, welche u. a. durch phenolische Hydroxygruppen zur Koordination beiträgt, sodass sich ein Monochelatkomplex bildet (Schuhmacher et al. 1983). Der Forschungsansatz zielt daher auf die Synthese von hepatotropen Liganden auf Grundlage geeigneter Chelatorsysteme, wie sie in Kap. 4.5 genannt sind. Der die Leber ansprechende EOB-Substituent soll in diesen neuartigen Liganden als Struktureinheit enthalten sein und ggf. am aromatischen System zur Optimierung der Lipophilie und Spezifität erweitert oder modifiziert werden.

Die mit diesen Liganden hergestellten  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe sollen mittels der Isolierung der nicht radioaktiven  $[\text{}^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe zunächst charakterisiert und analysiert werden. In der präklinischen Phase ist geplant, die  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer hinsichtlich ihrer Stabilität anhand von *in-vitro*-Verdrängungsexperimenten zu untersuchen. Anschließend sollen die Tracer mit Hilfe eines Tier-im-Ei-Modells, eines sog. *in-ovo*-Modells, hinsichtlich ihrer Leberspezifität untersucht werden. Dieses Modell hat gegenüber anderen *in-vivo*-Modellen eine Reihe von Vorteilen, u. a. die vereinfachte Realisierung aufgrund der Durchführbarkeit innerhalb klinischer Einrichtungen ohne dedizierte Räumlichkeiten, Personal und Methodik für Tierversuchslabore (Freesmeyer et al. 2018). Darüber hinaus entspricht das Modell den Intentionen des Tierschutzes, da es hilft, Versuche an sonst üblicherweise verwendeten Säugetieren zu vermeiden. Als *in-ovo*-Untersuchungsobjekt sollen bebrütete Straußenembryonen verwendet werden, da diese aufgrund ihrer Größe PET-Bildgebung mit höherer anatomischer

Genauigkeit gestatten als z. B. Hühnerembryonen. Die Bildgebung kann hierbei mit einem klinischen PET/CT-Scanner realisiert werden und erfordert kein dediziertes Gerät für Kleintiere (Mikro-PET).

## 5 Publikationen

---

### 5.1 Publierte Originalarbeit P1

#### Synthesis and Characterization of Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> Complexes of a Set of dtpa Bis-Amide Ligands

Julia Greiser, Tino Hagemann, Tobias Nicksch, Philipp Traber, Stephan Kupfer, Stefanie Gräfe, Helmar Görls, Wolfgang Weigand, Martin Freesmeyer

*Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 4125–4137, 10.1002/ejic.201500436.

Ausgehend von der Struktur des Liganden EOB-DTPA wurden zwei Carboxygruppen des DTPA zu Amidgruppen mit Alkoxyphenylsubstituenten derivatisiert. Durch Variation der Kettenlänge und der Position der Alkoxygruppen am Phenylring sollten somit sechszählige Liganden mit potentiell gesteigerter Lipophilie gegenüber EOB-DTPA zugänglich gemacht werden. Die [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe fünf verschiedener DTPA-bisamide wurden synthetisiert und mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Elementaranalyse charakterisiert. Exemplarische DFT-Rechnungen für die Verbindung Ga<sup>III</sup>-DTPA-*N,N'*-bis(3-ethoxy-phenylamid) bestätigen, dass in Lösung wahrscheinlich mehrere Koordinationsisomere nebeneinander existieren, was ebenfalls NMR-spektroskopisch beobachtet wurde. Auch die entsprechenden [<sup>nat</sup>In]In<sup>III</sup>- und [<sup>nat</sup>Lu]Lu<sup>III</sup>-Komplexe der DTPA-bisamide wurden synthetisiert und gleichsam charakterisiert, ergänzt durch Einkristallstrukturanalysen zur Bestimmung der Koordinationssphäre. Beide Metalle besitzen nuklearmedizinisch interessante Isotope (<sup>111</sup>In, <sup>177</sup>Lu). Diese Verbindungen sind für die vorliegende Dissertation allerdings von nachrangiger Bedeutung, da sich im weiteren Verlauf auf <sup>68</sup>Ga-Verbindungen als potentielle PET-Tracer für die Diagnostik fokussiert wurde.

Als repräsentatives Exemplar aus dieser Gruppe von Liganden wurde DTPA-*N,N'*-bis(4-ethoxyphenylamid), im Folgenden als DTPA-bis(EOP-amid) bezeichnet, mit <sup>68</sup>Ga radiomarkiert und der Komplex hinsichtlich seiner *in-vitro*-Stabilität untersucht. Diese Ergebnisse waren zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht Bestandteil der Publikation und sind daher in Kapitel 6.2.2 dieser Arbeit dargelegt und in den Kapiteln 7.2 und 7.3 diskutiert.

DOI:10.1002/ejic.201500436

## Synthesis and Characterization of Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> Complexes of a Set of dtpa Bis-Amide Ligands

Julia Greiser,<sup>[a]</sup> Tino Hagemann,<sup>[b]</sup> Tobias Nicksch,<sup>[a]</sup>  
 Philipp Traber,<sup>[c]</sup> Stephan Kupfer,<sup>[c]</sup> Stefanie Gräfe,<sup>[c]</sup>  
 Helmar Görls,<sup>[b]</sup> Wolfgang Weigand,<sup>\*,[b]</sup> and Martin Freesmeyer<sup>\*,[a]</sup>

**Keywords:** N,O ligands / Amides / Gallium / Indium / Lutetium

The synthesis and characterization of five new diethylenetriaminepentaacetic acid (dtpa) ligands, (dtpa)-*N,N'*-bis(alkoxyphenylamide), and their complexation with Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> are reported. The procedures for the synthesis of all complexes in aqueous media are described as well as a synthetic pathway for the preparation of Ga<sup>III</sup> complexes in chloroform. All substances were characterized by NMR spectroscopy, mass spectrometry, elemental analysis and HPLC. Single-crystal structure analysis was performed where appli-

cable, which revealed the presence of hepta- and octa-coordinated isomers for In<sup>III</sup> complexes and a nine-fold coordination of Lu<sup>III</sup> ions in the solid state. Additional NMR experiments suggested a hepta-coordinated In<sup>III</sup> species in solution, whereas the Ga<sup>III</sup> complexes appear to be hexa-coordinated and the Lu<sup>III</sup> complexes to be octa-coordinated. Both NMR and HPLC studies indicated the presence of a single isomer in every complex.

### Introduction

Diethylenetriaminepentaacetic acid (dtpa) is a well-known chelator that has been used since the 1960s as an agent for treating heavy-metal poisoning and radioactive contamination.<sup>[1–3]</sup> Its metal complexes are useful tools, one major field of interest being medical imaging.

One approved contrast agent for MRI is gadoteric acid, also known as Eovist<sup>®</sup> or Primovist<sup>®</sup>, which was first described in 1991.<sup>[4]</sup> It is the Gd<sup>III</sup> complex of EOB-dtpa, a dtpa ligand bearing a *p*-ethoxybenzyl moiety on the diethylenetriamine backbone that improves the lipophilicity of the compound. This property results in a specific uptake of the agent by liver hepatocytes by means of an organic anion transporter.<sup>[5]</sup> The high liver specificity of gadoteric acid enables the localization of focal lesions and hepatic tumours by MRI techniques. Although it is a frequently used con-

trast agent, it does have its drawbacks. As an open-chain-based Gd<sup>III</sup> complex it cannot be applied to patients in cases of renal impairment or drug intolerance to this often quite toxic agent. Additionally, MRI cannot be used for patients with metallic MRI-incompatible implants (e.g., cardiac pacemakers) or claustrophobia.

dtpa derivatives structurally similar to EOB-dtpa might be promising tracers for liver-specific molecular imaging upon labelling with suitable radionuclides, therefore providing an alternative to MRI. The derivatization of dtpa usually involves either the introduction of structural moieties into the ethylene or methylene groups of the backbone structure<sup>[6,7]</sup> or the amidation of one or several of the five carboxy groups.<sup>[8–11]</sup>

Although EOB-dtpa is only accessible through a multi-step synthesis in which the lipophilic *p*-ethoxybenzyl moiety is introduced in an early step,<sup>[12]</sup> dtpa amides can be synthesized much more efficiently by using dtpa bis-anhydride as the starting material. The variety of available anilines used in the amidation step makes a diversity of dtpa bis-amides accessible. Alterations of the amide moiety and the chain length of substituents influence the lipophilicity of complexes thereof and consequently their specificity to hepatocytes and suitability for hepatobiliary imaging. Therefore a set of dtpa-*N,N'*-bis(alkoxyphenylamides) with a different substitution pattern of the phenyl moiety and variable chain lengths were designed and synthesized.

dtpa amides are able to bind a variety of metal ions, ranging from lanthanides<sup>[11,13–18]</sup> and d elements<sup>[19–22]</sup> to alkaline-earth metals,<sup>[23]</sup> pnictogens<sup>[24]</sup> as well as elements of the boron group.<sup>[19,24–32]</sup> Among this last group, Ga<sup>III</sup> is of

- [a] University Hospital Jena, Clinic of Nuclear Medicine, Bachstraße 18, 07743 Jena, Germany  
 E-mail: martin.freesmeyer@med.uni-jena.de  
<http://www.nuklearmedizin.uniklinikum-jena.de/Startseite.html>
- [b] Institute for Inorganic and Analytical Chemistry, Friedrich-Schiller-University Jena, Humboldtstraße 8, 07743 Jena, Germany  
 E-mail: wolfgang.weigand@uni-jena.de  
<http://www.chemgeo.uni-jena.de/Institute/Institut+für+Anorganische+und+Analytische+Chemie/Prof.+W.+Weigand+.html>
- [c] Institute for Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich-Schiller-University Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany  
 E-mail: s.graefe@uni-jena.de  
<http://www.ipc.uni-jena.de/Institut.html>
- Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.201500436>.

particular interest due to its radioactive isotope  $^{68}\text{Ga}$ , which is commonly used in positron emission tomography (PET).

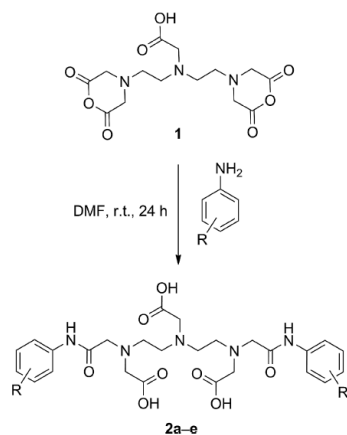
$\text{Ga}^{\text{III}}$  complexes of dtpa and its derivatives are generally considered not suitable for medical applications due to a lack of kinetic inertness,<sup>[33–35]</sup> which may result in rapid trans-chelation to transferrin *in vivo*.<sup>[27,36–38]</sup> Nevertheless, some promising results in the field can be found. For example,  $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$  complexes of dtpa coupled to proteins through an amide bond have been reported to be stable *in vivo* over a period of hours.<sup>[29,30]</sup> A dtpa-conjugated chalcone derivative labelled with  $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$  also showed only slow degradation in human serum.<sup>[31]</sup>

Although the properties of the  $^{68}\text{Ga}^{\text{III}}$  complexes of dtpa amides have been intensively examined,<sup>[27,29–31]</sup> investigations of the solution chemistry and the structural behaviour of non-radioactive equivalents are scarcer.<sup>[28]</sup> To provide new insights into this subject, this study focuses on the synthesis and characterization of  $\text{Ga}^{\text{III}}$  complexes of novel dtpa bis-amide ligands. For means of comparison of their solution chemistry and structural behaviour the respective  $\text{In}^{\text{III}}$  and  $\text{Lu}^{\text{III}}$  complexes have been synthesized as well.

## Results and Discussion

### Synthesis

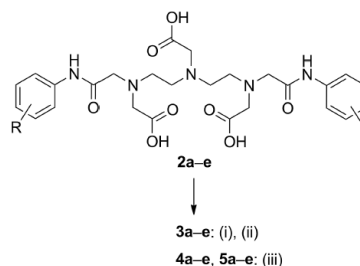
The dtpa-*N,N'*-bis(alkoxyphenylamides) were readily synthesized by the addition of 2 equiv. of the respective aniline bearing the desired substituent to dtpa bis-anhydride **1** in dmf at room temperature (Scheme 1). After stirring for 24 h at room temperature and evaporation of the solvent, recrystallization of the residue from ethanol gave compounds **2a–e** in yields of 57–82%.



Scheme 1. Synthesis of ligands **2a–e**: R = *m*- $\text{OCH}_3$  (**2a**), *o*- $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  (**2b**), *m*- $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  (**2c**), *p*- $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  (**2d**) and *p*- $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$  (**2e**).

Complexes of compounds **2a–e** were prepared by combining equimolar amounts of the respective metal chloride

and the ligand either in an aqueous solution or in chloroform. The syntheses in aqueous systems were performed at pH 3.3 for  $\text{Ga}^{\text{III}}$  complexes using an acetate buffer solution and at pH 7.5 for  $\text{In}^{\text{III}}$  and  $\text{Lu}^{\text{III}}$  complexes (Scheme 2). Owing to the poor solubility of the ligands in aqueous media, the yields were improved by dissolving the dtpa bis-amides **2a–e** in boiling water and then cooling to room temperature followed by the addition of the respective metal chloride.



Scheme 2. Synthesis of the  $\text{Ga}^{\text{III}}$  (**3a–e**),  $\text{In}^{\text{III}}$  (**4a–e**) and  $\text{Lu}^{\text{III}}$  complexes (**5a–e**). Reagents and conditions: (i)  $\text{GaCl}_3$  (aq.), acetate buffer, water, pH 3.3, 30 min; (ii)  $(n\text{Bu})_4\text{N}^+\text{OH}^-$ ,  $\text{GaCl}_3$ , chloroform, room temp., 12 h; (iii)  $\text{M}^{\text{III}}\text{Cl}_3$  (M = In, Lu), NaOH, water, pH 7.5, room temp., 12 h.

The  $\text{Ga}^{\text{III}}$  complexes **3a–e** precipitated from the reaction mixture and the crude products were isolated by filtration. Despite a pH below 3.5, considerable amounts of hydrolysis products formed, as proven by elemental analysis. Recrystallization from boiling methanol afforded analytically pure compounds **3a–e** in yields of 15–45%. The absence of free ligands **2a–e** was additionally confirmed by reversed-phase HPLC.

Owing to the persistent presence of hydrolysed  $\text{Ga}^{\text{III}}$  in the crude product, other synthetic conditions were investigated. Despite their poor solubility in organic solvents, bis-amides **2a–e** could be dissolved in chloroform after treatment with 3 equiv. of a methanolic solution of tetra-*n*-butylammonium hydroxide. Subsequent addition of  $\text{Ga}^{\text{III}}$  chloride in *n*-pentane resulted in the formation of the desired compounds. Although **3e** precipitated directly from the reaction mixture within 12 h, the synthesis of compounds **3a–3d** demanded the precipitation by diffusion of diethyl ether into the solution.

The  $\text{In}^{\text{III}}$  and  $\text{Lu}^{\text{III}}$  species in aqueous media were synthesized by using sodium hydroxide solution to adjust the pH to 7.5. Separation of the metal complexes from inorganic impurities represents a problem owing to the poor solubility of the former in organic media and the rather good solubility of both in water. For the  $\text{In}^{\text{III}}$  (**4c–e**) and  $\text{Lu}^{\text{III}}$  complexes (**5c–e**), the best results were obtained by evaporation of the solvent from the reaction mixture *in vacuo* and washing of the residue with minimum amounts of water. After drying *in vacuo*, the complexes were obtained analytically pure in yields of 39–74%. In contrast, compounds **4a,b** and **5a,b**, which are readily soluble in aqueous media, were purified by column chromatography

on silica using highly polar solvents. However, this procedure provided lower yields of 15–26%.

### Crystal Structures

All attempts to isolate suitable crystals of compounds **3a–e** for single-crystal structure analysis usually yielded needles lacking adequate thickness. Until now there was no crystallographic evidence for any Ga<sup>III</sup> complex of dtpa derivatives. Crystals of **4a** suitable for single-crystal structure analysis were obtained upon slow evaporation of a concentrated solution of the complex in a mixture of water/methanol (1:1). Complexes **4c** and **5c** were crystallized by dissolving the compounds in hot water and subsequent slow evaporation of the solvent. Selected crystallographic data are listed in Table 1.

Table 1. Crystal data and refinement details for the X-ray structure determinations of compounds **4a**, **4c** and **5c**.

	<b>4a</b>	<b>4c</b>	<b>5c</b>
Formula	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> InN <sub>5</sub> O <sub>10</sub> · 0.25(CH <sub>3</sub> OH) · 5.25(H <sub>2</sub> O)	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> InN <sub>5</sub> O <sub>10</sub> · 4.5(H <sub>2</sub> O)	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> LuN <sub>5</sub> O <sub>11</sub> · 8(H <sub>2</sub> O)
<i>M</i> [g mol <sup>-1</sup> ]	768.47	820.01	965.77
<i>T</i> [°C]	–140(2)	–140(2)	–140(2)
Crystal system	monoclinic	triclinic	triclinic
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>n</i>	<i>P</i> 1̄	<i>P</i> 1̄
<i>a</i> [Å]	13.4668(2)	13.3851(3)	7.9065(6)
<i>b</i> [Å]	18.3357(3)	17.0855(5)	10.0450(8)
<i>c</i> [Å]	26.4406(5)	17.7590(5)	25.268(2)
<i>a</i> [°]	90	64.707(1)	89.419(2)
<i>β</i> [°]	90.747(1)	78.872(2)	89.515(3)
<i>γ</i> [°]	90	77.591(2)	81.644(4)
<i>V</i> [Å <sup>3</sup> ]	6528.24(19)	3562.58(17)	1985.4(3)
<i>Z</i>	8	4	2
<i>P</i> [g cm <sup>-3</sup> ]	1.564	1.529	1.616
<i>μ</i> [cm <sup>-1</sup> ]	7.96	7.38	25.68
Measured data	52352	25868	8929
Data with <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )	13347	13332	8109
Unique data/ <i>R</i> <sub>int</sub>	14832/0.0414	14308/0.0252	8929/0.0553
<i>wR</i> <sub>2</sub> (all data, on <i>F</i> <sub>o</sub> ) <sup>[a]</sup>	0.1163	0.1161	0.1254
<i>R</i> <sub>1</sub> [ <i>I</i> > 2σ( <i>I</i> )] <sup>[a]</sup>	0.0501	0.0517	0.0505
<i>S</i> <sup>[b]</sup>	1.136	1.276	1.131
Max./min. resid. dens. [e Å <sup>-3</sup> ]	1.502/–0.690	1.472/–0.584	1.330/–2.388
Abs. method	multi-scan	multi-scan	multi-scan
Abs. corr. <i>T</i> <sub>min</sub> / <i>T</i> <sub>max</sub>	0.6912/0.7456	0.6767/0.7456	0.5261/0.7456

[a] Definition of *R* indices:  $R_1 = (\sum |F_o| - |F_c|) / \sum |F_o|$ ;  $wR_2 = \{ \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2] \}^{1/2}$  with  $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (aP)^2 + bP$ ;  $P = [2F_c^2 + \max(F_o^2)]/3$ . [b]  $s = \{ \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / (N_o - N_p) \}^{1/2}$ .

[In<sup>III</sup>(dtpa)] was the first complex found to contain an octa-coordinated In<sup>III</sup> ion, which came as a surprise because the ion had been considered too small to coordinate so many donors.<sup>[33]</sup> To the best of our knowledge, the only crystal structure determination of an open-chain dtpa bis-amide to have been reported also revealed an octa-coordinated In<sup>III</sup> complex.<sup>[9]</sup> In addition, an In<sup>III</sup> complex of a cyclic derivative crystallizing in a hepta-coordinated structure has also been reported.<sup>[10]</sup> In accordance with these previous studies, an octa-coordination was also expected for **4a**. Much to our surprise, the single-crystal structure analy-

sis of **4a** revealed the presence of two species; both a hepta- and octa-coordinated isomer were identified, denoted **4a**<sup>hepta</sup> and **4a**<sup>octa</sup>, respectively (Figure 1).

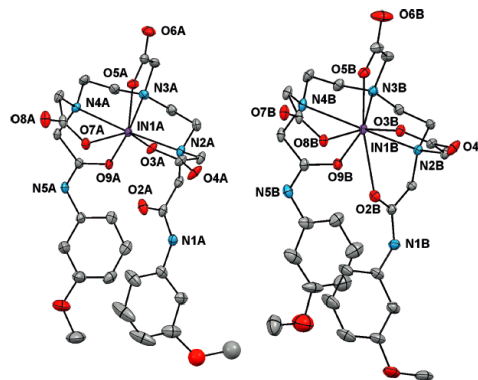


Figure 1. ORTEP drawing of the two crystallized structural isomers **4a**<sup>hepta</sup> (left) and **4a**<sup>octa</sup> (right). Ellipsoids are drawn at the 35% probability level. Solvent molecules and hydrogen atoms have been omitted for the purpose of clarity. In **4a**<sup>hepta</sup>, one of the methoxy moieties shows a structural disorder in two positions, of which only one isotropically refined group is depicted.

In the isomers, the respective donor atoms arrange comparably, forming a distorted mono- (**4a**<sup>hepta</sup>) or bicapped (**4a**<sup>octa</sup>) trigonal-prismatic coordination sphere, which in the case of **4a**<sup>octa</sup> can also be interpreted as a strongly distorted square antiprism. As none of the idealized polyhedra matches satisfactorily and for reasons of comparability, the distorted bicapped trigonal-prismatic structure is preferentially discussed in this paper. In this structure, one triangular plane is formed by the three carboxylate moieties of **2a**<sup>3-</sup>, O3, O5 and O7 (**4a**<sup>hepta</sup>) or O8 (**4a**<sup>octa</sup>), respectively. The opposite plane is defined by one [N<sub>2</sub>O] donor set, formed by the central (N3) and one terminal (N2) nitrogen atom of the dtpa structure and the oxygen atom (O9) of the distant amide group.

The monocapped structure in **4a**<sup>hepta</sup> is completed by the coordination of the remaining nitrogen atom (N4) of the dtpa structure and additional coordination of the second amide oxygen atom (O2) completes the formation of the bicapped trigonal prism in **4a**<sup>octa</sup>. As expected, the distances between the central In<sup>III</sup> ion and the atoms in the capping positions are elongated compared with the atoms forming the trigonal prism (Table 2).

A comparison of the bond lengths of **4a**<sup>hepta</sup> and **4a**<sup>octa</sup> reveals that the additional coordination of the second amide oxygen atom in **4a**<sup>octa</sup> results in a weakening and elongation of the oppositely arranged In–O5 bond to 2.240(3) Å from 2.170(3) Å in **4a**<sup>hepta</sup>. The differences in bond lengths between In<sup>III</sup> and the amide oxygen atoms O2 and O9 in **4a**<sup>octa</sup>, 2.565(3) Å compared with 2.247(3) Å, can be explained by the capping position of the O2 oxygen atom. In addition to that, the crowding of the central metal ion and steric factors like packing effects might influence



Table 2. Selected bond lengths for the hepta- and octa-coordinated isomers of **4a**.

	Bond length [Å] <sup>[a]</sup>	
	<b>4a</b> <sup>hepta</sup>	<b>4a</b> <sup>octa</sup>
In1–N2	2.361(3)	2.379(3)
In1–N3	2.398(3)	2.382(3)
In1–N4	2.497(3)	2.516(3)
In1–O3	2.171(3)	2.178(3)
In1–O5	2.170(3)	2.240(3)
In1–O7/O8 <sup>[b]</sup>	2.194(3)	2.194(3)
In1–O9	2.206(3)	2.247(3)
In1–O2	3.083 <sup>[c]</sup>	2.565(3)

[a] Intramolecular bond lengths. [b] In1–O7 in **4a**<sup>hepta</sup> and In1–O8 in **4a**<sup>octa</sup>. [c] Non-bonding interatomic distance In<sup>III</sup>–O2.

the structure in the solid state, as has been reported previously for the structure of [In<sup>III</sup>(dtpa)].<sup>[33]</sup> However, the differences in bond lengths and therefore in the bond strengths might favour the dissociation of the amide oxygen atom O2 in **4a**<sup>octa</sup> in solution.

The supramolecular arrangement of the molecules is affected by intermolecular hydrogen bonding between an amide nitrogen atom and a carboxy oxygen atom of a neighbouring molecule of the same isomer, resulting in the formation of chains (Figure 2). The interatomic distances were determined to be 2.756 Å (O4A<sup>hepta</sup>⋯N5A) and 2.782 Å (O4B<sup>octa</sup>⋯N5B) in the chains of **4a**<sup>hepta</sup> and **4a**<sup>octa</sup>, respectively, which indicates strong hydrogen bonding in the solid state with distances closer than the sum of the van der Waals radii.<sup>[39]</sup> These chains are further interlinked by weak hydrogen bonding between the second amide nitrogen atom N1A of **4a**<sup>hepta</sup> and two carboxy oxygen atoms of a molecule of **4a**<sup>octa</sup> of a neighbouring chain with interatomic distances of 3.035 Å (N1A<sup>hepta</sup>⋯O8B) and 3.211 Å

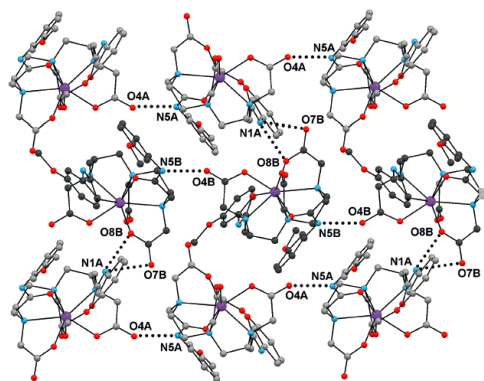


Figure 2. ORTEP drawings of the supramolecular arrangement in the crystal containing **4a**<sup>hepta</sup> and **4a**<sup>octa</sup>. Hydrogen bonding is indicated by dotted lines. Owing to structural disorder, only one of the isotropically refined methoxy moieties of **4a**<sup>hepta</sup> is depicted. To facilitate distinction, carbon atoms of molecules of **4a**<sup>hepta</sup> are coloured light grey, whereas the carbon atoms of **4a**<sup>octa</sup> appear in dark grey. Non-coordinating solvent molecules and hydrogen atoms have been omitted for reasons of clarity.

(N1A<sup>hepta</sup>⋯O7B). These bonds align the molecules in a two-dimensional network.

The single-crystal structure analysis of **4c** verifies the presence of two symmetry-independent molecules in the unit cell, both displaying an octa-coordinated complex (Figure 3, left). The bond lengths between the In<sup>III</sup> ion and the surrounding donor atoms indicate that one In–N and one In–O bond are remarkably longer than the respective metal donor bonds (Table 3). As the coordination sphere can be described as a bicapped trigonal prism, it is evident that the corresponding atoms, N4 and O1, occupy the capping positions therein. The structure of the coordination sphere is comparable to the one discussed for **4a**<sup>octa</sup>, as is

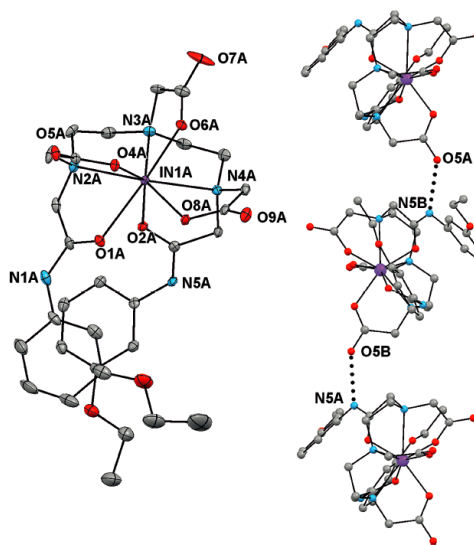


Figure 3. ORTEP drawings of **4c** (left, only one of the symmetry-independent molecules is displayed) and the supramolecular arrangement in the crystal (right). Ellipsoids (left) are drawn at the 35% probability level. Non-coordinating solvent molecules and hydrogen atoms have been omitted for reasons of clarity. Hydrogen bonding (right) is indicated by dotted lines.

Table 3. Selected bond lengths for **4c** and **5c**·H<sub>2</sub>O.

	Bond length [Å] <sup>[a]</sup>	
	<b>4c</b> <sup>[b]</sup>	<b>5c</b> ·H <sub>2</sub> O
M–N2	2.371(4), 2.337(4)	2.745(5)
M–N3	2.383(4), 2.363(4)	2.553(5)
M–N4	2.522(4), 2.517(4)	2.602(5)
M–O4	2.175(3), 2.190(3)	2.228(4)
M–O6	2.224(3), 2.230(3)	2.265(4)
M–O8	2.191(3), 2.159(3)	2.299(4)
M–O1	2.435(3), 2.481(6)	2.406(4)
M–O2	2.266(3), 2.283(3)	2.401(4)
M–O11W	–	2.313(4)

[a] M = In (**4c**), Lu (**5c**·H<sub>2</sub>O). [b] Values for two symmetry-independent molecules are given.

the overall alignment of the donors. Although three carboxylato groups (O4, O6, O8) of  $2c^{3-}$  define one triangular face, the other plane is formed by the central (N3) and one terminal amine nitrogen atom (N2) and the distant amide oxygen atom (O2). Intermolecular hydrogen bonding (Figure 3, right) is observed between one terminal carboxylato group and an amide nitrogen atom of an adjacent molecule, resulting in the formation of chains. The interatomic distances were determined to be 2.695 Å for O5A...N5B and 2.739 Å for O5B...N5A and thus are a little shorter than those observed in **4a**. However, in contrast to **4a**, no bonding between adjacent chains is observed.

In the solid state, the  $\text{Lu}^{\text{III}}$  complex  $5c \cdot \text{H}_2\text{O}$  displays a nona-coordinated central metal ion, binding to all eight donor sites of the ligand moiety and an additional water molecule (Figure 4). The bonds between Lu and the carbonyl oxygen atoms of the amide moieties, O1 and O2, are the longest Lu–O bonds of the coordination sphere (Table 3), which suggests that the coordination of the amide pendant arms to the metal centre is weaker than the carboxy oxygen donors. The three Lu–N bonds are longer than all the Lu–O bonds in the coordination sphere. It has been assumed that the Lu–N bonds have lower bond strengths due to their lower polarity in comparison with the more ionic Lu–O bonds.<sup>[15]</sup> However, due to the impossibility of all three nitrogen atoms occupying capping positions in the trigonal prism,<sup>[9,40]</sup> the nitrogen atom N3 occupies a corner and the O11W of the water molecule is capping instead.

The coordination sphere around the central  $\text{Lu}^{\text{III}}$  ion can be described as a distorted tricapped trigonal prism, with O1, O2, O4 and O6, O8, N3 occupying the corners of a triangular plane, respectively. The bond length Lu–N2 and Lu–N4 are the longest in the coordination sphere and therefore N2 and N4 occupy a capping position each. The third

capping position is occupied by the oxygen atom of the water molecule, O11W. According to Caravan et al., this is in accordance with the description of the *cis* isomer.<sup>[40]</sup>

However, the coordination sphere in **5c** might also be described as a distorted monocapped square antiprism in which O2, N4, O8 and O11W define one square plane and O1, O4, N3 and O6 form the other. In this way, the latter is capped by N2, which is in agreement with the respective bond (Lu–N2) being the longest in the coordination sphere. This description is associated with the *syn* isomer, as described by Aime et al.<sup>[15]</sup>

The supramolecular arrangement is determined by intermolecular hydrogen-bonding interactions between the water ligand and the uncoordinated terminal carboxy oxygen atom O5 of an adjacent molecule (Figure 4). The interatomic distance O11W...O5 measures 2.624 Å. A second, though weaker hydrogen bond measuring 2.846 Å is detected between the oxygen atom O7 of the central carboxylato moiety and the amide nitrogen atom N5 of a neighbouring molecule. These bonds cause a net-like structure in the crystal.

Furthermore, it should be mentioned that the phenyl rings of each molecule are almost coplanar, with the dihedral angle of the averaged ring planes determined to be 175.1°. However, this might solely be explained by packing effects, as neither sandwich nor parallel-displaced  $\pi$ – $\pi$  stacking interactions could be detected.

It has been agreed that the geometries of  $\text{Lu}^{\text{III}}$  complexes of this nature range between the square-antiprismatic and the trigonal-prismatic description, although the latter is generally favoured.<sup>[9,15]</sup> A comparison of the dihedral angles in both geometric arrangements assumed for  $5c \cdot \text{H}_2\text{O}$  with the respective values for idealized polyhedra shows that a distorted tricapped trigonal prism is the best-match-

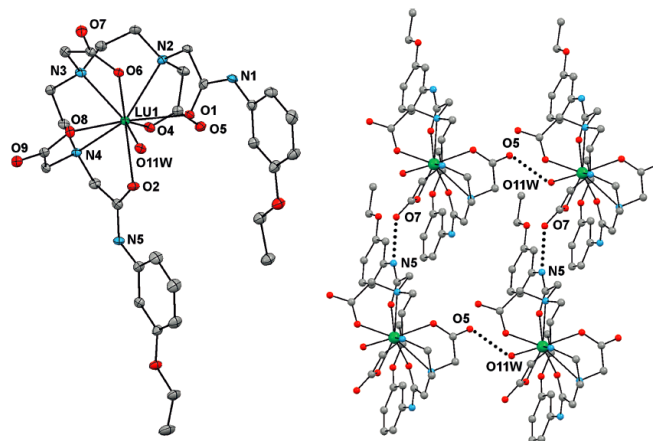


Figure 4. ORTEP drawing of  $5c \cdot \text{H}_2\text{O}$  (left) and the supramolecular arrangement in the crystal (right). Ellipsoids (left) are drawn at the 35% probability level. Non-coordinating solvent molecules and hydrogen atoms have been omitted for reasons of clarity. Hydrogen bonding (right) is indicated by dotted lines.



ing description (Table 4). For comparison, the dihedral angles determined for **4a**<sup>octa</sup> and **4c** are also given. In particular, the angles between the neighbouring planes forming the edges that connect the base and top face of the trigonal prism indicate that neither of the idealized polyhedra describes its structure adequately. For the sake of completeness, when assuming a square antiprismatic structure in **4a**<sup>octa</sup> and **4c**, one square plane is formed by the central and one terminal [NO] donor set, each formed by the amine nitrogen atom and carboxy oxygen atom. The opposite square plane is spanned by the remaining terminal [NO] donor set and both amide oxygen atoms.

Table 4. Dihedral angles between trigonal faces in idealized polyhedra and for the assumed trigonal prismatic structures of **4a**<sup>octa</sup>, **4c** and **5c**·H<sub>2</sub>O.

	Dihedral angle [°]	
	Opposite planes <sup>[a]</sup>	Neighbouring planes <sup>[b]</sup>
Trigonal prism <sup>[c]</sup>	180	26.4
Square antiprism <sup>[c]</sup>	163.5	0
<b>4a</b> <sup>octa</sup>	168.7 <sup>[d]</sup>	14.5 <sup>[e]</sup>
<b>4c</b>	168.4, 167.8 <sup>[f]</sup>	14.9, 12.2 <sup>[g]</sup>
<b>5c</b> ·H <sub>2</sub> O	175.0 <sup>[h]</sup>	27.3, 22.3, 16.8 <sup>[i]</sup>

[a] Base and top face of the trigonal prismatic structure. [b] Planes spanned by capping atom and two neighbouring atoms of an edge of the trigonal prism connecting its base and top face. [c] Values for respective idealized polyhedra, see ref.<sup>[40]</sup> [d]  $\angle[(N2-N3-O9)\|(O8-O3-O5)]$ . [e]  $\angle[(O2-O9-O8)\|(O9-O8-N4)]$ . [f]  $\angle[(O4-O6-O8)\|(N2-N3-O2)]$ , values for two symmetry-independent molecules. [g]  $\angle[(O2-O8-O1)\|(O2-O8-N4)]$ , values for two symmetry-independent molecules. [h]  $\angle[(O1-O2-O4)\|(O6-O8-N3)]$ . [i] Dihedral angles for  $\angle[(N2-O1-O6)\|(O11W-O1-O6)]$ ,  $\angle[(O11W-O2-O8)\|(N4-O2-O8)]$  and  $\angle[(N4-O4-N3)\|(N2-O4-N3)]$ , respectively.

### NMR Spectroscopy

In ligands **2a**–**e**, the amide pendant arms are chemically equal due to the symmetry of the molecules, exhibiting only one set of signals for each moiety in all spectra. In the <sup>1</sup>H NMR spectra, the amide and carboxylic protons appear as singlets, and in the aliphatic region, the anticipated patterns assigned to the dtpa backbone structure and the respective alkoxy moieties could be detected in both the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR spectra.

### Room-Temperature NMR Spectroscopy

As expected, the aliphatic protons of the dtpa backbone of all the <sup>1</sup>H NMR spectra of complexes **3**–**5** show a complex signal pattern with overlap of multiple couplings, that is, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> and <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>, induced by the chirality of the terminal nitrogen atoms and the non-equivalence of the methylene and ethylene protons upon ligand complexation. The investigation of this spectral region did not allow reliable conclusions to be drawn on the conformation of the complexes in solution. Thus, the following discussion focuses on the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR signals of the amide pendant arms.

The amide protons serve as an expedient indicator for the prediction of the coordination environment of the central metal ions. The amide protons are inequivalent in all

the complexes and are detected as two separated singlets in the <sup>1</sup>H NMR spectra recorded in [D<sub>6</sub>]dms<sub>o</sub>. Although the signals show very similar shifts in the spectra of **3a**–**e**, **5c** and **5d**, indicative of a comparable chemical environment, a remarkable difference is observed in the spectra of **4c** and **4d**. This is suggestive of a hepta-coordinated In<sup>III</sup> ion containing both a coordinating and a non-coordinating amide moiety, as observed in the solid state for **4a**.

As expected, in nearly all the spectra of the complexes recorded in [D<sub>6</sub>]dms<sub>o</sub>, the amide protons are shifted to higher frequencies compared with the respective ligands by about 0.3 ppm in **3a** and **3e**–**e** and 0.8 ppm in the Lu<sup>III</sup> species **5c** and **5d**. This observation can be explained by non-coordinating amide nitrogen donor atoms in the former and the coordination of the amide moieties in the latter. This is in good accordance with the expectation of hexa-coordinated Ga<sup>III</sup> complexes and an increased coordination number in the Lu<sup>III</sup> species. There is a third singlet merging with the signals of the amide protons in **5c**, which can be assigned to the protons of a coordinated water ligand.

A summary of the NMR spectroscopic data assigned to the moieties of the pendant arms (Figure 5) of **2c** and its three metal complexes is presented in Table 5. The following discussion focuses on **3c**–**5c** as representatives of the complexes **3**–**5**.

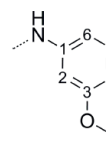


Figure 5. Atomic labelling of the aromatic moieties of **2c**–**5c**.

It is apparent that, in addition to the amide signals, the aromatic structure and the ethoxy moiety of both pendant arms exhibit a double set of signals in both the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR spectra upon complexation. Structural moieties positioned farther from the coordination centre may still appear as only one signal set though (e.g., the CH<sub>3</sub> moiety of the ethoxy chain in **3c** and **5c**). A comparison of related signal sets shows that the differences in chemical shifts between respective moieties are usually more pronounced in **4c**. This observation is in accordance with a hepta-coordinated complex, in which the amide pendant arms of **4c** possess a clearly different chemical environment compared with those in **3c** and **5c**, in which the double set of signals is likely caused by a different chemical environment of the pendant arms due to the chirality of the complex.

The Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> complexes of the dtpa bis-amides can exist in different diastereomeric forms.<sup>[9,15,28,40,41]</sup> However, in every diastereomer the amide pendant arms may appear as a double set of signals due to their different chemical environment. If several diastereomers exist in solution and interconversion is slow

Table 5. Selected NMR spectroscopic data of **2c–5c** in [D<sub>6</sub>]dmsO (600 MHz).

	$\delta$ [ppm]								
	<b>2c</b>		<b>3c</b>		<b>4c</b>		<b>5c</b>		
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H}	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H}	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H}	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H}	<sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H}
CH(1)	–	139.9	–	139.6	–	139.7	–	129.6	129.6
CH(2)	7.34	105.5	7.31 (s)	105.6	7.53 (s)	106.6	7.32 (s)	107.2	107.2
CH(3)	–	158.8	–	158.7	–	158.9	–	158.8	158.8
CH(4)	6.69 (d)	109.3	6.64 (d)	109.8	6.77 (dd)	111.8	6.76 (d)	110.3	110.3
CH(5)	7.14 (dd)	129.4	7.21–7.18 (dd)	129.5	6.63 (dd)	109.7	6.73 (d)	110.1	110.1
CH(6)	7.18 (d)	111.5	7.12–7.11 (m)	111.5	7.30–7.28 (dd)	129.8	7.27–7.23	138.7	138.7
OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3.96 (q)	62.9	3.98 (q)	62.9	7.21–7.18	129.5	7.25–7.22	138.4	138.4
OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1.30 (t)	14.7	1.32 (t)	14.6	7.13–7.12 (m)	112.3	7.38–7.37 (m)	112.7	112.7
NH–C=O	10.03	–	7.09–7.07 (m)	111.4	7.09–7.08 (m)	111.6	7.32–7.30 (m)	112.4	112.4
C=O	–	173.1	10.26 (s)	–	4.10–4.05 (m)	63.3	4.04–4.00 (m)	63.1	63.1
		169.7	–	170.6	4.00–3.97 (m)	62.9	4.02–3.98 (m)	63.0	63.0
		169.4	–	170.5	1.34 (t)	14.6	1.30 (t)	14.6	14.6
			–	170.2	1.32 (t)	14.5	1.29 (t)	–	–
			–	166.3	11.44 (s)	–	10.81 (s)	–	–
			–	165.9	10.31 (s)	–	10.78 (s)	–	–
			–			171.4		175.7	175.7
			–			171.2		175.2	175.2
			–			170.6		174.9	174.9
			–			170.5		174.2	174.2
			–			166.9		173.3	173.3

compared with the NMR timescale, more than one set of double signals should be observable for the pendant arms.

As this was not observed in the spectra of **3c–5c**, only one detectable isomer for each complex may be present in solution. Furthermore, the <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR spectral assignment of the aliphatic carbon signals was performed for **3c–5c** by using two-dimensional NMR spectroscopy. In no case were more than nine carbon signals of the dtpa backbone detected. Additionally, only five signals for the carboxy and carbonyl carbon atoms were detected in total for **3c**, contrary to a previously reported similar complex.<sup>[28]</sup>

However, it remains unknown whether the detection of a single isomer is caused by fast interconversion between several conformers at room temperature or is due to the preference of a certain diastereomer in solution. Because coalescence might be reached at higher temperatures and abolished at lower temperatures, additional <sup>1</sup>H NMR spectroscopic studies of **3c–5c** were performed at 85 and –50 °C.

#### High-Temperature NMR Spectroscopy

There are three types of isomerism in dtpa amide complexes, induced by “wagging” of the diethylenetriamine backbone, “shuffling” of the two [NO<sub>2</sub>] donor sets or inversion at the two terminal nitrogen atoms.<sup>[8]</sup> Even at elevated temperatures, no coalescence of the signals of In<sup>III</sup> or Lu<sup>III</sup> complexes was reported and therefore it was concluded that even at high temperatures, inversion of the terminal nitrogen donors occurs slowly compared with the NMR timescale.<sup>[9,15]</sup> It should be noted that these NMR measurements were performed in D<sub>2</sub>O whereas we had to use [D<sub>6</sub>]dmsO. Therefore the results should be compared with caution.

At 85 °C, only one set of proton signals was detected for the amide pendant arms of **3c**. However, the aliphatic re-

gion maintains some of its characteristic signal groups and coupling pattern, proving the integrity of the complex. Apparently, at elevated temperatures the pendant arms of **3c** become chemically equivalent. In the presumed octahedral structure this might be due to a strong fluctuation of the complex as well as interconversion between different conformations, which might occur quickly compared with the NMR timescale. In contrast, a double set of aromatic proton signals is observed in **4c** at elevated temperatures. This double set of signals indicates that the complex maintains its hepta-coordinated structure even at 85 °C. Surprisingly, in the <sup>1</sup>H NMR spectra of **5c**, the signals of the aromatic protons 2-H, 5-H and 6-H show exceptionally strong overlap, which prevents definitive assignment. However, the proton 4-H is clearly detectable as a single doublet at these elevated temperatures. Although the amide protons merge into one singlet, the signal assigned to the water ligand is no longer detectable. The remarkable overlapping indicates strong fluxional behaviour.

#### Low-Temperature NMR Spectroscopy

Fast interconversion between several conformers might result in the observed detection of a single double set of signals suggesting the presence of only one diastereomer. However, more signals might evolve at low temperatures. Therefore the NMR spectra of **3c–5c** were recorded at –50 °C in [D<sub>7</sub>]dmf as solvent.

For comparison, NMR spectra were also recorded at room temperature in the same solvent, and were comparable to the spectra recorded in [D<sub>6</sub>]dmsO. Double sets of signals can be seen for the pendant arms of **3c** and **4c**, whereas in **5c** remarkable overlap and broadening of the signals are observed. The differences in the chemical shifts

between respective signal groups of the pendant arms are again most pronounced in **4c**.

No additional signal sets appeared in any of the spectra of **3c–5c** at  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The protons of the pendant arms maintain their pattern of double signal sets, and there are still only nine signals detected for the dtpa backbone structure in the  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra. One could assume that even at these low temperatures interconversion might still occur easily enough to result in only one isomer being detectable. But these results rather corroborate our assumption, that only one diastereomer is present in solution, in contrast to previous research of similar metal<sup>III</sup> complexes in which usually several diastereomers were detected by NMR spectroscopy.<sup>[9,15,28]</sup>

Additionally, quantum chemical calculations performed on **3c** did not yield precise information on the existence of a preferred structure of the complex because the energy differences between the isomers were all within the error range. Detailed data are given in the Supporting Information.

#### HPLC Analysis

Although theoretically complexes of the type **3–5** may exist as diastereomers, their respective HPLC chromatograms show only a single peak. This is in accordance with previous observations and was associated with fast interconversion between different diastereomers.<sup>[9,41]</sup> Although this would require the inversion of a terminal nitrogen atom, which was acknowledged to occur slowly even at high temperatures on the basis of NMR studies, the low concentrations of the complexes during HPLC analysis were considered to facilitate the process due to dissociation of the  $[\text{NO}_2]$  donor set.<sup>[9]</sup> As supported by our previous NMR studies, we assume the exclusive existence of one diastereomer for the described metal complexes.

The In<sup>III</sup> compounds **4a–d** show lower retention than the corresponding Ga<sup>III</sup> compounds **3a–d**, whereas **4e** shows higher retention than **3e**. However, the differences are only 0.1–0.3 min, and the compounds therefore exhibit a comparable degree of lipophilicity. For comparison, Lu<sup>III</sup> complexes **5a–e** show an additional prolonged retention of approximately 0.5 min and thus are more lipophilic. Owing to the fact that all the complexes are uncharged, the relative lipophilicity is mostly affected by the nature of the coordination sphere of the central metal ion.

It has been noted before that uncoordinated amide moieties possess the ability to form hydrogen bonds with water molecules from the solvent, resulting in increased hydrophilicity.<sup>[9,41]</sup> This is in agreement with the fact that the Lu<sup>III</sup> complexes most likely feature strong bonding of the amide moieties and are therefore the most lipophilic species. Apparently, the Ga<sup>III</sup> and In<sup>III</sup> complexes have more similar coordination spheres than the respective Lu<sup>III</sup> complexes. As the Ga<sup>III</sup> complexes most likely show a hexa-coordinated central metal ion, we suppose that the In<sup>III</sup> complexes also show at least partial dissociation of the two amide pen-

dant arms in aqueous solution. Furthermore, the dissociation might be followed by association of water ligands, making the In<sup>III</sup> complexes even slightly more hydrophilic than the respective Ga<sup>III</sup> species.

#### Conclusions

We have successfully synthesized and characterized five dtpa bis(alkoxyphenyl)amides and their Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> complexes. Elemental analysis, mass spectrometry and NMR spectroscopy confirmed that one ligand chelates one metal ion. The NMR spectra indicated the existence of hexa-coordinated Ga<sup>III</sup> species. We found that the In<sup>III</sup> complex **4a** crystallizes in both a hepta- and octa-coordinated form, whereas the NMR spectra revealed the exclusive existence of the hepta-coordinated species. The Lu<sup>III</sup> ion coordinates a water molecule in addition to the eight donor atoms of the ligands to form a nona-coordinated complex.

Although the results of quantum-chemical calculations on **3c** indicated that several isomers may exist in solution, the results of our NMR and HPLC analyses strongly indicate the sole existence of a single diastereomer in solution for all complexes.

#### Experimental Section

**General:** All reagents were purchased from commercial sources and used without further purification. dmf was distilled from sodium prior to use and stored under nitrogen over molecular sieves (4 Å). Diethyl ether was stored over KOH plates. dtpa bis-anhydride **1** and the dtpa bis-amides **2** were synthesized under nitrogen using standard vacuum-line and Schlenk techniques.

Ga<sup>III</sup> chloride (1.42 g) was dissolved in 0.3 M acetate buffer (100 mL) to prepare a stock solution with a pH of 1.9. For the syntheses in chloroform, a 0.5 M solution of Ga<sup>III</sup> chloride in *n*-pentane was used.

For the HPLC analyses a system equipped with a binary pump (HP 1100, G1312A), UV/Vis detector (HP 1100, G1315A) and column (ACE C18-PFP; 150 × 3 mm) was used. Reported values indicate the purity of the compounds as detected by means of their UV absorbance at 220 nm. The following gradient was used: 0–3 min 80% A, 3–6 min 80% A → 0% A, 6–10 min 0% A [A: water/trifluoroacetic acid (99.9%/0.1%); B: acetonitrile/trifluoroacetic acid (99.9%/0.1%)].

Unless stated otherwise,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectra were recorded at room temperature with either a Bruker AVANCE 400 or 600 spectrometer. The NMR spectra of the ligands were recorded in deuterated dms<sub>o</sub>, which had been dried prior to use over 4 Å molecular sieves and stored under nitrogen. The NMR spectra of the complexes were recorded in  $[\text{D}_6]\text{dms}_o$  or  $[\text{D}_4]\text{MeOH}$ . Additionally, the NMR spectra of complexes **3c–5c** were recorded at 85 °C in  $[\text{D}_6]\text{dms}_o$  and at room temperature as well as  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  in deuterated anhydrous  $[\text{D}_2]\text{dmf}$  ( $\geq 99.5\%$ ). In these spectra some of the proton signals of the complexes merge with the signal of residual water in the solvent. The residual peaks of the solvents were used as internal reference.

Mass spectra were recorded with either a Finnigan SSQ 710 (DEI, FAB) or a MAT 95 XL (ESI) spectrometer. Elemental analyses



were performed as single determinations using a Vario EL III CHNS instrument (Elementaranalysesystem GmbH, Hanau, Germany).

**Structure Determinations:** The intensity data of the compounds were collected with a Nonius-KappaCCD diffractometer using graphite-monochromated Mo- $K_{\alpha}$  radiation. Data were corrected for Lorentzian and polarization effects and absorption was taken into account on a semi-empirical basis using multiple scans.<sup>142–144</sup>

The structures were solved by direct methods (SHELXS<sup>145</sup>) and refined by full-matrix least-squares techniques against  $F_o^2$  (SHELXL-97<sup>146</sup>). The hydrogen atoms of the amine groups N1A and N1B of compound **4c** were located by difference Fourier synthesis and refined isotropically. All other hydrogen atoms were included at calculated positions with fixed thermal parameters. All non-disordered non-hydrogen atoms were refined anisotropically.<sup>145</sup> The crystallographic data as well as structure solution and refinement details are summarized in Table 1.

CCDC-1048431 (for **4a**), -1048432 (for **4c**) and -1048433 (for **5c**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

**Synthesis of dtpa Bis-anhydride 1:** This compound was synthesized according to a literature procedure.<sup>146</sup> Under nitrogen, dtpa (49 g, 125 mmol) was suspended in dry pyridine (62 mL, 770 mmol) and acetic anhydride (53 mL, 560 mmol) and stirred at 65 °C for 24 h. The precipitate was filtered and washed three times with diethyl ether to afford a colourless solid, yield 42 g (117.5 mmol, 94%). <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 3.71 [s, 8 H, N(CH<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O], 3.31 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>COOH), 2.75 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 171.9 (COOH), 165.8 [N(CH<sub>2</sub>CO)<sub>2</sub>O], 54.6 (CH<sub>2</sub>COOH), 52.6 ppm.

**General Procedure for the Preparation of dtpa-N,N'-Bis(alkoxyphenylamides) 2a–e:**<sup>147,48</sup> Under nitrogen, dtpa bis-anhydride **1** (2 g, 5.6 mmol) was dissolved in dry dmf (50 mL), the respective aniline (11.2 mmol) was added and the solution was stirred for 24 h at room temperature. The solvent was removed in vacuo and the residue was recrystallized from hot ethanol to yield dtpa bis-amides **2a–e** as colourless solids.

**dtpa-N,N'-Bis(m-methoxyphenylamide) (2a):** Prepared from *m*-methoxyaniline (1.25 mL, 1.38 g, 11.2 mmol), yield 2.67 g (4.4 mmol, 79%). <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 11.92 (br. s, 1.5 H, COOH), 10.03 (s, 2 H, NH-CO), 7.35 (t, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.9 Hz, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.19–7.14 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 6.61–6.59 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 3.70 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>), 3.53 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>COO<sub>central</sub>), 3.44 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.42 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.02 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.93 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 173.1 (C=O), 169.7 (C=O), 169.4 (C=O), 159.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 139.9 (N-C<sub>Ar</sub>), 129.4 (C<sub>Ar</sub>), 111.6 (C<sub>Ar</sub>), 108.8 (C<sub>Ar</sub>), 105.1 (C<sub>Ar</sub>), 58.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.0 (OCH<sub>3</sub>), 52.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. MS (DEI): calcd. for [M]<sup>+</sup> 603; found 604 [M + H]<sup>+</sup>, 587 [M - OH]<sup>+</sup>, 164 [H<sub>3</sub>C-O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·0.5H<sub>2</sub>O (612.26): calcd. C 54.89, H 6.25, N 11.43; found C 54.55, H 6.35, N 11.11.

**dtpa-N,N'-Bis(o-ethoxyphenylamide) (2b):** Prepared from *o*-ethoxyaniline (1.47 mL, 1.54 g, 11.1 mmol), yield 2.82 g (4.5 mmol, 80%). <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 12.31 (br. s, 2.8 H, COOH), 9.75 (s, 2 H, NH-CO), 8.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.0 Hz, 2 H, H<sub>Ar</sub>),

7.01–6.97 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 6.89–6.86 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 4.01 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.40 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.29 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.28 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>COO<sub>central</sub>), 2.79–2.76 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.71–2.69 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 172.2 (C=O), 172.0 (C=O), 169.0 (C=O), 147.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 127.4 (N-C<sub>Ar</sub>), 123.6 (C<sub>Ar</sub>), 120.4 (C<sub>Ar</sub>), 118.9 (C<sub>Ar</sub>), 111.8 (C<sub>Ar</sub>), 63.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 59.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (DEI): calcd. for [M]<sup>+</sup> 631; found 632 [M + H]<sup>+</sup>, 614 [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·H<sub>2</sub>O (649.30): calcd. C 55.46, H 6.67, N 10.78; found C 55.23, H 6.64, N 10.69.

**dtpa-N,N'-Bis(m-ethoxyphenylamide) (2c):** Prepared from *m*-ethoxyaniline (1.49 mL, 1.54 g, 11.2 mmol), yield 2.79 g (4.4 mmol, 79%). <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 11.93 (br. s, 1.7 H, COOH), 10.02 (s, 2 H, NH-CO), 7.73 (s, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.18–7.11 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 7.59–7.57 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 3.95 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.52 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>COO<sub>central</sub>), 3.43 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.42 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.03–3.01 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.94–2.92 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 173.5 (C=O), 170.1 (C=O), 169.8 (C=O), 159.2 (O-C<sub>Ar</sub>), 140.3 (N-C<sub>Ar</sub>), 129.8 (C<sub>Ar</sub>), 111.9 (C<sub>Ar</sub>), 109.8 (C<sub>Ar</sub>), 106.0 (C<sub>Ar</sub>), 63.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 58.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 15.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (DEI): calcd. for [M]<sup>+</sup> 631; found 632 [M + H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·H<sub>2</sub>O (649.30): calcd. C 55.46, H 6.67, N 10.78; found C 55.25, H 6.62, N 10.71.

**dtpa-N,N'-Bis(p-ethoxyphenylamide) (2d):** Prepared from *p*-ethoxyaniline (1.45 mL, 1.54 g, 11.2 mmol), yield 2.89 g (4.6 mmol, 82%). <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 11.86 (br. s, 0.7 H, COOH), 9.91 (s, 2 H, NH-CO), 7.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 6.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 3.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.50 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>COO<sub>central</sub>), 3.43 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.40 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.03–3.01 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.93–2.90 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.28 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 173.0 (C=O), 169.5 (C=O), 168.7 (C=O), 154.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 131.8 (N-C<sub>Ar</sub>), 120.8 (C<sub>Ar</sub>), 114.2 (C<sub>Ar</sub>), 63.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 58.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M]<sup>+</sup> 631; found 654 [M + Na]<sup>+</sup>, 632 [M + H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·H<sub>2</sub>O (649.30): calcd. C 55.46, H 6.67, N 10.78; found C 55.86, H 6.54, N 10.87.

**dtpa-N,N'-Bis(p-butoxyphenylamide) (2e):** Prepared from *p*-butoxyaniline (1.85 g, 11.2 mmol), yield 2.20 g (3.2 mmol, 57%). <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 11.50 (br. s, 0.3 H, COOH), 9.91 (s, 2 H, NH-CO), 7.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 6.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 3.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.53 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>COO<sub>central</sub>), 3.43 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.41 (s, 4 H, CH<sub>2</sub>C=O), 3.04 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.92 (m, 4 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.65 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.40 (m, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.91 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO):  $\delta$  = 173.0 (C=O), 169.5 (C=O), 168.8 (C=O), 154.7 (O-C<sub>Ar</sub>), 131.8 (N-C<sub>Ar</sub>), 120.8 (C<sub>Ar</sub>), 114.3 (C<sub>Ar</sub>), 67.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 58.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 30.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.7

(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M]<sup>+</sup> 687; found 710 [M + Na]<sup>+</sup>, 688 [M + H]<sup>+</sup>. C<sub>34</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·1.5H<sub>2</sub>O (714.37): calcd. C 57.13, H 7.33, N 9.80; found C 57.28, H 7.30, N 9.77.

**General Procedure for the Preparation of Ga<sup>III</sup> Complexes 3a–e:** Two procedures, one in aqueous and one in organic media, have been developed. Either method is suitable for all the described Ga<sup>III</sup> complexes.

**Procedure A:** Acetate buffer (100 mL, 0.3 M, pH 4.5) was added to Ga<sup>III</sup> chloride (1.42 g, 8.2 mmol) to give a stock solution of Ga<sup>III</sup> (82 mM, pH 1.9). An aliquot of the stock solution was transferred into a flask, followed by the addition of 1 equiv. of ligand, which had been dissolved in hot deionized water. The more lipophilic **2e** did not dissolve completely, resulting in a suspension that could be used for the reaction without remarkably affecting the reaction yield. A stirrer and pH electrode was added to the clear solution or suspension. At room temperature, a solution of 0.3 M acetate buffer (pH 4.5) was added dropwise to raise the pH to 3.2–3.3 upon which a colourless precipitate formed immediately. The solution was stirred at room temperature for 30 min with the pH increasing to 3.5 at most. The precipitate was filtered off and washed thoroughly with deionized water to remove buffer and inorganic salts. The solid was dried in vacuo. Subsequent recrystallization from hot methanol yielded the complexes as colourless solids.

**Procedure B:** In a flask 1 equiv. of ligand was added to 3 equiv. of a solution of tetra-*n*-butylammonium hydroxide in methanol (1.0 M). Chloroform (20 mL) was added to the mixture to give a clear solution. A stirrer and 1 equiv. of a solution of Ga<sup>III</sup> chloride in *n*-pentane (0.5 M) was added to the mixture at room temperature. The mixture was stirred at room temperature overnight. Complex **3e** precipitated from the solution as a colourless solid and could be isolated by filtration, followed by washing with chloroform and drying in vacuo. Slow diffusion of diethyl ether into the reaction mixture afforded precipitation of compounds **3a–d**.

**[Ga<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*m*-methoxyphenylamide)}] (3a):** Prepared following procedure A from Ga<sup>III</sup> chloride (3.7 mL, 0.30 mmol) and **2a** (183 mg, 0.30 mmol), yield 90 mg (0.13 mmol, 45%). HPLC: 4.3 min, 96.8%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 10.40 (s, 1 H, NH-CO), 10.28 (s, 1 H, NH-CO), 7.32–7.27 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.23–7.20 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.14–7.09 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 6.66–6.65 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 4.06–2.81 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.72 (s, 6 H, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 170.7 (C=O), 170.5 (C=O), 170.2 (C=O), 166.3 (C=O), 165.9 (C=O), 159.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 129.6 (N-C<sub>Ar</sub>), 111.6 (C<sub>Ar</sub>), 111.5 (C<sub>Ar</sub>), 109.2 (C<sub>Ar</sub>), 108.9 (C<sub>Ar</sub>), 105.1 (C<sub>Ar</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.0 (OCH<sub>3</sub>), 54.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M(<sup>71</sup>Ga)]<sup>+</sup> 671, [M(<sup>69</sup>Ga)]<sup>+</sup> 669; found *m/z* (%) = 695 (22) [M(<sup>71</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 694 (74) [M(<sup>71</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>, 693 (33) [M(<sup>69</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 692 (100) [M(<sup>69</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>. C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>GaN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·H<sub>2</sub>O (688.33): calcd. C 48.86, H 5.27, N 10.17; found C 48.53, H 5.28, N 10.06.

**[Ga<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*o*-ethoxyphenylamide)}] (3b):** Prepared following procedure A from Ga<sup>III</sup> chloride (3 mL, 0.25 mmol) and **2b** (150 mg, 0.24 mmol), yield 33 mg (0.05 mmol, 20%). HPLC: 4.6 min, 96.6%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 9.66–9.60 (m, 2 H, NH-CO), 7.85–7.72 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.11–7.09 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.04–7.03 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 6.91–6.89 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 4.07 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.14–2.85 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.41–1.36 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz,

[D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 170.7 (C=O), 170.6 (C=O), 170.1 (C=O), 166.4 (C=O), 166.0 (C=O), 150.2 (O-C<sub>Ar</sub>), 149.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 126.5 (N-C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>), 126.4 (N-C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>), 125.6 (N-C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>), 125.1 (N-C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>), 124.0 (N-C<sub>Ar</sub>-C<sub>Ar</sub>), 123.1 (C<sub>Ar</sub>), 120.0 (C<sub>Ar</sub>), 112.4 (C<sub>Ar</sub>), 63.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.9 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M(<sup>71</sup>Ga)]<sup>+</sup>, 699, [M(<sup>69</sup>Ga)]<sup>+</sup> 697; found *m/z* (%) = 723 (25) [M(<sup>71</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 722 (76) [M(<sup>71</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>, 721 (36) [M(<sup>69</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 720 (100) [M(<sup>69</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>GaN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·2 H<sub>2</sub>O (734.40): calcd. C 49.06, H 5.76, N 9.54; found C 49.37, H 5.74, N 9.54.

**[Ga<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*m*-ethoxyphenylamide)}] (3c):** Prepared following procedure A from Ga<sup>III</sup> chloride (2.6 mL, 0.21 mmol) and **2c** (130 mg, 0.21 mmol), yield 22 mg (0.03 mmol, 15%). HPLC: 4.8 min, 94.5%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO, 22 °C): δ = 10.38 (s, 1 H, NH-CO), 10.26 (s, 1 H, NH-CO), 7.31–7.26 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.21–7.18 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.12–7.07 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 6.64–6.63 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 4.00–3.96 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.10–2.82 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.32–1.30 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO, 85 °C): δ = 10.12 (s, 2 H, NH-CO), 7.27 (s, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.11–7.10 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 6.66 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.1 Hz, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 4.03 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.97–3.23 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO, room temp.): δ = 170.6 (C=O), 170.5 (C=O), 170.2 (C=O), 166.3 (C=O), 165.9 (C=O), 158.7 (O-C<sub>Ar</sub>), 139.6 (N-C<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 111.5 (C<sub>Ar</sub>), 111.3 (C<sub>Ar</sub>), 109.8 (C<sub>Ar</sub>), 109.8 (C<sub>Ar</sub>), 105.5 (C<sub>Ar</sub>), 62.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M(<sup>71</sup>Ga)]<sup>+</sup> 699, [M(<sup>69</sup>Ga)]<sup>+</sup> 697; found *m/z* (%) = 723 (25) [M(<sup>71</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 722 (76) [M(<sup>71</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>, 721 (36) [M(<sup>69</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 720 (100) [M(<sup>69</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>GaN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·2 H<sub>2</sub>O (734.40): calcd. C 49.06, H 5.76, N 9.54; found C 48.98, H 5.51, N 9.63.

**[Ga<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*p*-ethoxyphenylamide)}] (3d):** Prepared following procedure A from Ga<sup>III</sup> chloride solution (2.6 mL, 0.21 mmol) and **2d** (135 mg, 0.21 mmol), yield 35 mg (0.05 mmol, 23%). HPLC: 4.7 min, 95.6%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 10.27 (s, 1 H, NH-CO), 10.16 (s, 1 H, NH-CO), 7.51–7.47 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 6.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 3.99–3.96 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.04–2.84 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.31–1.29 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 170.7 (C=O), 170.5 (C=O), 168.7 (C=O), 165.3 (C=O), 154.7 (O-C<sub>Ar</sub>), 154.6 (O-C<sub>Ar</sub>), 131.6 (N-C<sub>Ar</sub>), 122.7 (C<sub>Ar</sub>), 120.8 (C<sub>Ar</sub>), 114.7 (C<sub>Ar</sub>), 114.4 (C<sub>Ar</sub>), 63.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 60.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M(<sup>71</sup>Ga)]<sup>+</sup> 699, [M(<sup>69</sup>Ga)]<sup>+</sup> 697; found *m/z* (%) = 723 (25) [M(<sup>71</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 722 (76) [M(<sup>71</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>, 721 (36) [M(<sup>69</sup>Ga) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 720 (100) [M(<sup>69</sup>Ga) + Na]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>GaN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (743.41): calcd. C 48.47, H 5.84, N 9.42; found C 48.09, H 5.40, N 9.31.

**[Ga<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*p*-butoxyphenylamide)}] (3e):** Prepared following procedure B from Ga<sup>III</sup> chloride solution (0.6 mL, 0.32 mmol),

tetra-*n*-butylammonium hydroxide solution (0.87 mL, 0.87 mmol) and **2e** (200 mg, 0.29 mmol), yield 120 mg (0.16 mmol, 55%). HPLC: 5.6 min, 95.0%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 10.26 (s, 1 H, *NH*-CO), 10.14 (s, 1 H, *NH*-CO), 7.51–7.46 (m, 4 H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.86 (m, 4 H, *H*<sub>Ar</sub>), 4.02–2.84 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>CO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, 4H OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.68–1.62 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.41 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.91 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 170.7 (C=O), 170.6 (C=O), 170.3 (C=O), 165.8 (C=O), 165.3 (C=O), 155.0 (O-C<sub>Ar</sub>), 154.9 (O-C<sub>Ar</sub>), 131.5 (N-C<sub>Ar</sub>), 120.9 (C<sub>Ar</sub>), 120.8 (C<sub>Ar</sub>), 114.5 (C<sub>Ar</sub>), 67.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 51.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 30.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, – mode): calcd. for [M(<sup>71</sup>Ga)]<sup>+</sup> 755, [M(<sup>69</sup>Ga)]<sup>+</sup> 753; found *m/z* (%) = 755 (29) [M(<sup>71</sup>Ga) + 1 – H]<sup>+</sup>, 754 (76) [M(<sup>71</sup>Ga) – H]<sup>+</sup>, 753 (40) [M(<sup>69</sup>Ga) + 1 – H]<sup>+</sup>, 752 (100) [M(<sup>69</sup>Ga) – H]<sup>+</sup>. C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>GaN<sub>2</sub>O<sub>10</sub>·2H<sub>2</sub>O (790.50); calcd. C 51.66, H 6.38, N 8.86; found C 51.46, H 6.08, N 8.68.

**General Procedure for the Preparation of the In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> Complexes 4a–e and 5a–e:** dtpa-*N,N'*-bis(alkoxyphenyl)amide **2a–d** (1 equiv.) was dissolved or, in the case of **2e**, suspended in hot water, cooled to room temperature and an aqueous solution of In<sup>III</sup> chloride (1 equiv.) or Lu<sup>III</sup> chloride hexahydrate (1 equiv.) was added, respectively. The pH of the mixture was raised to 7.5 by the dropwise addition of 2.0 M NaOH solution. The solution was stirred at room temperature overnight and the solvent was evaporated.

**Procedure A:** The residue was suspended in deionized water and washed thoroughly with water to remove all traces of soluble inorganic salts. The colourless solids were dried in vacuo.

**Procedure B:** The complexes with a higher solubility in water were redissolved in a small amount of hot methanol and purified by silica column chromatography. The colourless solids were dried in vacuo.

[In<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*m*-methoxyphenyl)amide}] (**4a**): Prepared following procedure B from In<sup>III</sup> chloride (127 mg, 0.58 mmol) and **2a** (350 mg, 0.58 mmol). Purification by column chromatography (silica, MeOH/H<sub>2</sub>O, 1:1), yield 100 mg (0.14 mmol, 24%). HPLC: 4.2 min, 99.0%. <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 7.38–6.58 (m, 8 H, *H*<sub>Ar</sub>), 4.12–2.78 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 177.0 (C=O), 176.5 (C=O), 176.0 (C=O), 175.9 (C=O), 175.8 (C=O), 175.7 (C=O), 175.5 (C=O), 175.4 (C=O), 170.3 (C=O), 168.5 (C=O), 161.6 (O-C<sub>Ar</sub>), 161.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 161.4 (O-C<sub>Ar</sub>), 140.3 (N-C<sub>Ar</sub>), 140.2 (N-C<sub>Ar</sub>), 130.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.8 (C<sub>Ar</sub>), 130.6 (C<sub>Ar</sub>), 114.4 (C<sub>Ar</sub>), 113.7 (C<sub>Ar</sub>), 113.5 (C<sub>Ar</sub>), 113.4 (C<sub>Ar</sub>), 113.1 (C<sub>Ar</sub>), 111.2 (C<sub>Ar</sub>), 111.1 (C<sub>Ar</sub>), 110.9 (C<sub>Ar</sub>), 107.9 (C<sub>Ar</sub>), 107.3 (C<sub>Ar</sub>), 107.2 (C<sub>Ar</sub>), 106.7 (C<sub>Ar</sub>), 63.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 62.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 61.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 61.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.9 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.8–55.7 (OCH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M(<sup>115</sup>In)]<sup>+</sup> 715, [M(<sup>113</sup>In)]<sup>+</sup> 713; found *m/z* (%) = 739 (34) [M(<sup>115</sup>In) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 738 (100) [M(<sup>115</sup>In) + Na]<sup>+</sup>, 736 (5) [M(<sup>113</sup>In) + Na]<sup>+</sup>. C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>InN<sub>2</sub>O<sub>10</sub>·0.5CH<sub>3</sub>OH (749.45); calcd. C 45.67, H 5.11, N 9.34; found C 45.94, H 4.88, N 9.03. The content of methanol was established from its X-ray structure.

[In<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*o*-ethoxyphenyl)amide}] (**4b**): Prepared following procedure B from In<sup>III</sup> chloride (52 mg, 0.24 mmol) and **2b** (150 mg, 0.24 mmol). Purification by column chromatography (silica, MeOH/H<sub>2</sub>O, 2:1) followed by flash chromatography (silica, MeOH), yield 36 mg (0.05 mmol, 20%). HPLC: 4.2 min, 95.6%. <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 8.01–7.80 (m, 2 H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.42–6.77 (m, 6 H, *H*<sub>Ar</sub>), 4.15–2.89 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.44–1.39 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 175.8 (C=O), 175.6 (C=O), 172.1 (C=O), 169.1 (C=O), 152.0 (O-C<sub>Ar</sub>), 151.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 128.7 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 127.3 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 127.2 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 125.9 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 125.6 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 124.7 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 121.7 (C<sub>Ar</sub>), 121.4 (C<sub>Ar</sub>), 113.3 (C<sub>Ar</sub>), 113.1 (C<sub>Ar</sub>), 65.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 65.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.9 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 58.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 15.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 15.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M(<sup>115</sup>In)]<sup>+</sup> 743, [M(<sup>113</sup>In)]<sup>+</sup> 741; found *m/z* (%) = 767 (34) [M(<sup>115</sup>In) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 766 (100) [M(<sup>115</sup>In) + Na]<sup>+</sup>, 764 (5) [M(<sup>113</sup>In) + Na]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>InN<sub>2</sub>O<sub>10</sub>·3.5H<sub>2</sub>O (806.52); calcd. C 44.68, H 5.62, N 8.68; found C 44.30, H 5.16, N 8.41.

[In<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*m*-ethoxyphenyl)amide}] (**4c**): Prepared following procedure A from In<sup>III</sup> chloride (122 mg, 0.55 mmol) and **2c** (350 mg, 0.55 mmol), yield 230 g (0.31 mmol, 55%). HPLC: 4.5 min, 98.8%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO, 25 °C): δ = 11.44 (s, 1 H, *NH*-CO), 10.31 (s, 1 H, *NH*-CO), 7.54 (s, 1 H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.31–7.27 (m, 2 H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.18 (m, 1 H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.12–7.10 (m, 2 H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.77 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1 H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1 H, *H*<sub>Ar</sub>), 4.10–2.61 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35–1.30 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO, 85 °C): δ = 10.11 (s, 0.3 H, *NH*-CO), 7.48 (s, 0.5 H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.33–7.09 (m, 5.5 H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.77 (s, 1 H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.65 (s, 1 H, *H*<sub>Ar</sub>), 4.13–2.39 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.38–1.31 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 171.4 (C=O), 171.2 (C=O), 170.5, (C=O) 170.4 (C=O), 166.9, 158.9 (O-C<sub>Ar</sub>), 158.7 (O-C<sub>Ar</sub>), 139.7 (N-C<sub>Ar</sub>), 138.0 (N-C<sub>Ar</sub>), 129.7 (C<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 112.3 (C<sub>Ar</sub>), 111.8 (C<sub>Ar</sub>), 111.6 (C<sub>Ar</sub>), 109.7 (C<sub>Ar</sub>), 106.6 (C<sub>Ar</sub>), 105.6 (C<sub>Ar</sub>), 63.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 60.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 50.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M(<sup>115</sup>In)]<sup>+</sup> 743, [M(<sup>113</sup>In)]<sup>+</sup> 741; found *m/z* (%) = 767 (34) [M(<sup>115</sup>In) + 1 + Na]<sup>+</sup>, 766 (100) [M(<sup>115</sup>In) + Na]<sup>+</sup>, 764 (5) [M(<sup>113</sup>In) + Na]<sup>+</sup>, 744 (115) [M(<sup>115</sup>In) + H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>InN<sub>2</sub>O<sub>10</sub>·H<sub>2</sub>O (761.57); calcd. C 47.32, H 5.29, N 9.20; found C 47.52, H 5.06, N 9.20.

[In<sup>III</sup>{dtpa-*N,N'*-bis(*p*-ethoxyphenyl)amide}] (**4d**): Prepared following procedure A from In<sup>III</sup> chloride (127 mg, 0.58 mmol) and **2d** (350 mg, 0.58 mmol), yield 168 mg (0.23 mmol, 39%). HPLC: 4.7 min, 96.7%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 11.47 (s, 1 H, *NH*-CO), 10.22 (s, 1 H, *NH*-CO), 7.59 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2 H, *H*<sub>Ar</sub>), 7.50 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, 2 H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, 2 H, *H*<sub>Ar</sub>), 6.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, 2 H, *H*<sub>Ar</sub>), 4.03–2.66 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32–1.28 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 171.4 (C=O), 171.1 (C=O), 170.7 (C=O), 196.3 (C=O), 166.3 (C=O), 164.8 (C=O), 156.0 (O-C<sub>Ar</sub>), 154.7 (O-C<sub>Ar</sub>), 131.6 (N-C<sub>Ar</sub>), 129.8 (N-C<sub>Ar</sub>), 122.0 (C<sub>Ar</sub>), 120.9 (C<sub>Ar</sub>), 114.6 (C<sub>Ar</sub>), 114.3 (C<sub>Ar</sub>), 62.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 60.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.9 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.1



(CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 54.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 50.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M<sup>(115)In</sup>]<sup>+</sup> 743, [M<sup>(113)In</sup>]<sup>+</sup> 741; found *m/z* (%) = 767 (34) [M<sup>(115)In</sup> + 1 + Na]<sup>+</sup>, 766 (100) [M<sup>(115)In</sup> + Na]<sup>+</sup>, 764 (5) [M<sup>(113)In</sup> + Na]<sup>+</sup>, 744 (8) [M<sup>(115)In</sup> + H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>LuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·3H<sub>2</sub>O (797.51): calcd. C 45.18, H 5.56, N 8.78; found C 45.02, H 5.30, N 8.64.

[In<sup>III</sup>{dtpa-N,N'-bis(*p*-butoxyphenylamide)}] (4e): Prepared following procedure A from In<sup>III</sup> chloride (112 mg, 0.51 mmol) and 2e (350 mg, 0.51 mmol), yield 170 mg (0.21 mmol, 41%). HPLC: 5.8 min, 95.5%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 7.60–6.69 (m, 8 H, H<sub>Ar</sub>), 3.94–2.75 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.76–1.61 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.52–1.37 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.99–0.88 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 177.1 (C=O), 175.9 (C=O), 175.6 (C=O), 173.9 (C=O), 169.3 (C=O), 157.7 (O-C<sub>Ar</sub>), 157.5 (O-C<sub>Ar</sub>), 157.0 (O-C<sub>Ar</sub>), 131.9 (N-C<sub>Ar</sub>), 129.0 (N-C<sub>Ar</sub>), 123.2 (C<sub>Ar</sub>), 122.7 (C<sub>Ar</sub>), 118.2 (C<sub>Ar</sub>), 116.6 (C<sub>Ar</sub>), 115.6 (C<sub>Ar</sub>), 115.2 (C<sub>Ar</sub>), 68.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 68.8 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 57.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 32.7 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M<sup>(115)In</sup>]<sup>+</sup> 799, [M<sup>(113)In</sup>]<sup>+</sup> 797; found *m/z* (%) = 822 (14) [M<sup>(115)In</sup> + Na]<sup>+</sup>, 801 (34) [M<sup>(115)In</sup> + 1 + H]<sup>+</sup>, 800 (100) [M<sup>(115)In</sup> + H]<sup>+</sup>. C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>LuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·3H<sub>2</sub>O (853.70): calcd. C 47.84, H 6.14, N 8.20; found C 47.71, H 5.78, N 8.01.

[Lu<sup>III</sup>{dtpa-N,N'-bis(*m*-methoxyphenylamide)}] (5a): Prepared following procedure B from Lu<sup>III</sup> chloride hexahydrate (225 mg, 0.58 mmol) and 2a (350 mg, 0.58 mmol), yield 120 mg (0.15 mmol, 26%). HPLC: 4.7 min, 99.0%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 7.38–7.18 (m, 6 H, H<sub>Ar</sub>), 6.81–6.74 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 3.84–3.43 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 181.3 (C=O), 180.6 (C=O), 180.4 (C=O), 180.1 (C=O), 177.0 (C=O), 175.4 (C=O), 175.3 (C=O), 161.8 (O-C<sub>Ar</sub>), 161.6 (O-C<sub>Ar</sub>), 139.3 (N-C<sub>Ar</sub>), 139.1 (N-C<sub>Ar</sub>), 131.0 (C<sub>Ar</sub>), 130.9 (C<sub>Ar</sub>), 130.8 (C<sub>Ar</sub>), 114.4 (C<sub>Ar</sub>), 114.3 (C<sub>Ar</sub>), 112.4 (C<sub>Ar</sub>), 112.0 (C<sub>Ar</sub>), 108.2 (C<sub>Ar</sub>), 108.1 (C<sub>Ar</sub>), 68.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 64.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.5 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 56.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 55.8 (OCH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M]<sup>+</sup> 793, [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 775; found *m/z* (%) = 798 (100) [M – H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>, 776 (15) [M – H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>. C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>LuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·4H<sub>2</sub>O (847.62): calcd. C 39.68, H 4.99, N 8.26; found C 39.68, H 4.58, N 8.22.

[Lu<sup>III</sup>{dtpa-N,N'-bis(*o*-ethoxyphenylamide)}] (5b): Prepared following procedure B from Lu<sup>III</sup> chloride hexahydrate (111 mg, 0.29 mmol) and 2b (180 mg, 0.29 mmol), yield 35 mg (0.04 mmol, 15%). Purification by column chromatography (silica, MeOH/H<sub>2</sub>O, 2:1). HPLC: 5.2 min, 96.5%. <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 7.95–7.69 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 7.27–6.82 (m, 6 H, H<sub>Ar</sub>), 4.16–2.43 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>CO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.45–1.30 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 181.2 (C=O), 180.6 (C=O), 180.4 (C=O), 180.3 (C=O), 180.1 (C=O), 177.3 (C=O), 175.8 (C=O), 169.9 (C=O), 152.8 (O-C<sub>Ar</sub>), 151.6 (O-C<sub>Ar</sub>), 128.7 (N-C<sub>Ar</sub>), 128.2 (N-C<sub>Ar</sub>), 128.0 (N-

C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 126.5 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 126.4 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 126.1 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 126.0 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 125.2 (N-C<sub>Ar</sub>, C<sub>Ar</sub>), 121.6 (C<sub>Ar</sub>), 121.3 (C<sub>Ar</sub>), 113.4 (C<sub>Ar</sub>), 113.1 (C<sub>Ar</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 65.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 65.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.4 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 15.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 15.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M]<sup>+</sup> 821, [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 803; found *m/z* (%) = 826 (100) [M – H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>, 804 (26) [M – H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>LuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (848.66): calcd. C 42.46, H 5.11, N 8.25; found C 42.57, H 4.95, N 7.94.

[Lu<sup>III</sup>{dtpa-N,N'-bis(*m*-ethoxyphenylamide)}] (5c): Prepared following procedure A from Lu<sup>III</sup> chloride hexahydrate (215 mg, 0.55 mmol) and 2c (350 mg, 0.55 mmol), yield 325 mg (0.40 mmol, 74%). HPLC: 5.3 min, 98.6%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO, 25 °C): δ = 10.82–10.77 (m, 2 H, NH-CO, H<sub>2</sub>O<sub>ligand</sub>), 7.38–7.16 (m, 6 H, H<sub>Ar</sub>), 6.77–6.72 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 4.24–4.21 (m, 0.8 H), 4.25–2.27 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>CO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.31–1.28 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO, 85 °C): δ = 10.45 (s, 1.2 H, NH-CO), 7.29–7.23 (m, 6 H, H<sub>Ar</sub>), 6.75–6.74 (m, 2 H, H<sub>Ar</sub>), 4.04 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.16–2.38 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>CO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 1.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (150.9 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 175.7 (C=O), 75.2 (C=O), 174.9 (C=O), 173.3 (C=O), 158.8 (O-C<sub>Ar</sub>), 138.7 (N-C<sub>Ar</sub>), 138.4 (N-C<sub>Ar</sub>), 129.6 (C<sub>Ar</sub>), 129.5 (C<sub>Ar</sub>), 112.7 (C<sub>Ar</sub>), 112.4 (C<sub>Ar</sub>), 110.4 (C<sub>Ar</sub>), 110.1 (C<sub>Ar</sub>), 107.2 (C<sub>Ar</sub>), 106.7 (C<sub>Ar</sub>), 66.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 62.2 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 62.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 58.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.9 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.9 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M]<sup>+</sup> 821, [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 803; found *m/z* (%) = 826 (100) [M – H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>, 804 (26) [M – H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>LuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·3H<sub>2</sub>O (875.66): calcd. C 42.01, H 5.17, N 8.17; found C 41.89, H 5.10, N 8.09.

[Lu<sup>III</sup>{dtpa-N,N'-bis(*p*-ethoxyphenylamide)}] (5d): Prepared following procedure A from Lu<sup>III</sup> chloride hexahydrate (215 mg, 0.55 mmol) and 2d (350 mg, 0.55 mmol), yield 196 mg (0.24 mmol, 44%). HPLC: 5.1 min, 97.0%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 10.79 (s, 2 H, NH-CO), 7.71–7.58 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 6.95–6.86 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 4.22–2.57 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.34–1.30 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>6</sub>]dmsO): δ = 175.8 (C=O), 175.3 (C=O), 175.6 (C=O), 175.0 (C=O), 173.7 (C=O), 173.0 (C=O), 172.5 (C=O), 155.6 (O-C<sub>Ar</sub>), 155.3 (O-C<sub>Ar</sub>), 130.7 (N-C<sub>Ar</sub>), 130.4 (N-C<sub>Ar</sub>), 121.9 (C<sub>Ar</sub>), 121.8 (C<sub>Ar</sub>), 121.6 (C<sub>Ar</sub>), 114.5 (C<sub>Ar</sub>), 114.4 (C<sub>Ar</sub>), 114.3 (C<sub>Ar</sub>), 66.7 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 63.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 62.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 61.6 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 58.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 55.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 14.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M]<sup>+</sup> 821, [M – H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 803; found *m/z* (%) = 826 (100) [M – H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>, 804 (5) [M – H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup>. C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>LuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·4H<sub>2</sub>O (875.68): calcd. C 41.15, H 5.29, N 7.98; found C 41.45, H 5.12, N 8.00.

[Lu<sup>III</sup>{dtpa-N,N'-bis(*p*-butoxyphenylamide)}] (5e): Prepared following procedure A from Lu<sup>III</sup> chloride hexahydrate (198 g, 0.51 mmol) and 2e (350 g, 0.51 mmol), yield 225 mg (0.26 mmol, 51%). HPLC: 6.1 min, 95.5%. <sup>1</sup>H NMR (600.1 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 7.58–7.45 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 6.91–6.78 (m, 4 H, H<sub>Ar</sub>), 4.00–2.46 (m, 22 H, CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.78–1.68 (m, 4 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.55–1.44 (m, 4 H,

- OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.00–0.95 (m, 6 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, [D<sub>4</sub>]MeOH): δ = 181.2 (C=O), 180.7 (C=O), 180.2 (C=O), 174.7 (C=O), 174.5 (C=O), 158.4 (O-C<sub>Ar</sub>), 158.3 (O-C<sub>Ar</sub>), 131.1 (N-C<sub>Ar</sub>), 131.0 (N-C<sub>Ar</sub>), 123.9 (C<sub>Ar</sub>), 123.1 (C<sub>Ar</sub>), 122.9 (C<sub>Ar</sub>), 115.8 (C<sub>Ar</sub>), 115.6 (C<sub>Ar</sub>), 115.5 (C<sub>Ar</sub>), 69.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 68.9 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 68.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 63.1 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 60.0 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 59.8 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 57.3 (CH<sub>2</sub>C=O, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 32.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm. MS (ESI, + mode): calcd. for [M]<sup>+</sup> 877, [M - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 859; found *m/z* (%) = 882 (100) [M - H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>. C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>LuN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>·4H<sub>2</sub>O (931.78): calcd. C 43.83, H 5.84, N 7.52; found C 43.65, H 5.51, N 7.52.
- Supporting Information** (see footnote on the first page of this article): NMR spectra of **3c–5c** in [D<sub>7</sub>]dmf and detail of the quantum chemical calculations.
- [1] A. Catsch, *Naturwissenschaften* **1968**, *55*, 473.
  - [2] A. Catsch, L. Du Khuong, D. Chambault, *Int. J. Radiat. Biol.* **1964**, *8*, 35.
  - [3] H. E. Kay, *J. Clin. Pathol.* **1964**, *17*, 579.
  - [4] H. J. Weinmann, G. Schuhmann-Giampieri, H. Schmitt-Willich, H. Vogler, T. Frenzel, H. Gries, *Magn. Reson. Med.* **1991**, *22*, 223.
  - [5] B. E. Van Beers, C. M. Pastor, H. Hussain, *J. Hepatol.* **2012**, *57*, 421.
  - [6] L. Lattuada, A. Barge, G. Cravatto, G. B. Giovenzana, L. Tei, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3019.
  - [7] J. D. G. Correia, A. Paulo, P. D. Raposinho, I. Santos, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6144.
  - [8] S. Liu, E. Cheung, M. Rajopadhye, N. E. Williams, K. L. Overy, D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 84.
  - [9] W.-Y. Hsieh, S. Liu, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 6006.
  - [10] M. B. Inoue, M. Inoue, Q. Fernando, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *271*, 207.
  - [11] L. K. Chinen, K. P. Galen, K. T. Kuan, M. E. Dyszlweski, H. Ozaki, H. Sawai, R. S. Pandurang, F. G. Jacobs, R. B. Dorshow, R. Rajagopalan, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 957.
  - [12] H. Schmitt-Willich, M. Brehm, C. L. J. Ewers, G. Michl, A. Müller-Farnow, O. Petrov, B. Radüchel, D. Sülzle, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1134.
  - [13] A. D. Sherry, W. P. Cacheris, K. T. Kuan, *Magn. Reson. Med.* **1988**, *8*, 180.
  - [14] J. Feng, G. Sun, F. Pei, M. Liu, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 3359.
  - [15] S. Aime, F. Benetollo, G. Bombieri, S. Colla, M. Fasano, S. Paoletti, *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *254*, 63.
  - [16] M. Cremonesi, M. Ferrari, M. Chinol, M. G. Stabin, C. Frana, G. Prisco, C. Robertson, G. Tosi, G. Paganelli, *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 110.
  - [17] M. S. Konings, W. C. Dow, D. B. Love, K. N. Raymond, S. C. Quay, S. M. Rocklage, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1488.
  - [18] S. Dutta, J.-A. Park, J.-C. Jung, Y. Chang, T.-J. Kim, *Dalton Trans.* **2008**, 2199.
  - [19] C. J. Anderson, T. S. Pajean, W. B. Edwards, E. L. Sherman, B. E. Rogers, M. J. Welch, *J. Nucl. Med.* **1995**, *36*, 2315.
  - [20] Y.-C. Liu, S.-L. Ma, Q.-L. Guo, J. Zhang, M.-Q. Xu, W.-X. Zhu, *Inorg. Chem. Commun.* **2005**, *8*, 574.
  - [21] Y.-C. Liu, J. Zhang, Q. Luo, S.-L. Ma, M.-Q. Xu, W.-X. Zhu, *Chin. J. Chem.* **2005**, *23*, 1012.
  - [22] Z. Jaszberenyi, I. Banyai, E. Bruecher, R. Kiraly, K. Hideg, T. Kalai, *Dalton Trans.* **2006**, 1082.
  - [23] E. N. Rizkalla, G. R. Choppin, W. Cacheris, *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 582.
  - [24] A. S. Georgopoulou, S. Ulvenlund, D. M. P. Mingos, I. Baxter, D. J. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, 547.
  - [25] T. J. Kim, Y. M. Jang, J. A. Park, *PCT Int. Appl., WO* 2011016605 A1 20110210, **2011**.
  - [26] R. Zhuo, G. Yan, Faming Zhuanli Shengqing Gongkai Shuomingshu, CN 1306863 A 20010808, **2001**.
  - [27] R. Haubner, D. R. Vera, S. Fashchi-Heydari, A. Hebok, C. Rangger, D. Putzer, I. J. Virgolini, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2013**, *40*, 1245.
  - [28] C. F. G. C. Galdes, R. Delgado, A. M. Urbano, J. Costa, F. Jasanada, F. Nepveu, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 327.
  - [29] S. J. Wagner, M. J. Welch, *J. Nucl. Med.* **1979**, *20*, 428.
  - [30] S. M. Moerlein, A. Daugherty, B. E. Sobel, M. J. Welch, *J. Nucl. Med.* **1991**, *32*, 300.
  - [31] K. Chauhan, A. Datta, A. Adhikari, K. Chuttani, A. Kumar Singh, A. K. Mishra, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7328.
  - [32] M. I. M. Prata, A. C. Santos, S. W. A. Bligh, A. H. M. S. Chowdhury, C. F. G. C. Galdes, J. J. P. de Lima, *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27*, 605.
  - [33] H. R. Maecke, A. Riesen, W. Ritter, *J. Nucl. Med.* **1989**, *30*, 1235.
  - [34] M. F. Ferreira, G. Pereira, J. P. Andre, M. I. M. Prata, P. M. T. Feirreia, J. A. Martins, C. F. G. C. Galdes, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 8037.
  - [35] S. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 445.
  - [36] R. Chakravarty, S. Chakraborty, A. Dash, M. R. A. Pillai, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 197.
  - [37] K. Prinsen, J. Li, H. Vanbilloen, P. Vermailen, E. Devos, L. Mortelmans, G. Bormans, Y. Ni, A. Verbruggen, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5274.
  - [38] D. J. Clevette, C. Orvig, *Polyhedron* **1990**, *9*, 151.
  - [39] A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441.
  - [40] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurphy, R. B. Lauffer, *Chem. Rev. (Washington, DC)* **1999**, *99*, 2293.
  - [41] S. Liu, D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 630.
  - [42] COLLECT, Data Collection Software, Nonius B.V., Delft, The Netherlands, **1998**.
  - [43] *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode* (Eds.: Z. Otwinowski, W. Minor, C. W. Carter, R. M. Sweet), *Methods in Enzymology*, vol. 276, Macromolecular Crystallography, part A, Academic Press, **1997**, p. 307–326.
  - [44] SADABS, v. 2.10, Bruker-AXS, Inc., Madison, WI, USA, **2002**.
  - [45] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A* **2008**, *64*, 112.
  - [46] A. D'Aleo, M. Allali, A. Picot, P. L. Baldeck, L. Toupet, C. Andraud, O. Maury, *C. R. Chim.* **2010**, *13*, 681.
  - [47] A. Leydier, Y. Lin, G. Arrachart, R. Turgis, D. Lecerle, A. Favre-Reguillon, F. Taran, M. Lemaire, S. Pellet-Rostaing, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1163.
  - [48] M. Wolf, W. E. Hull, W. Mier, S. Heiland, U. Bauder-Wuest, R. Kischerf, U. Haberkorn, M. Eisenhut, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 139.

Received: April 21, 2015  
 Published Online: July 23, 2015



*Eur. J. Inorg. Chem.* **2015** · ISSN 1099–0682

**SUPPORTING INFORMATION**

**DOI:** 10.1002/ejic.201500436

**Title:** Synthesis and Characterization of Ga<sup>III</sup>, In<sup>III</sup> and Lu<sup>III</sup> Complexes of a Set of dtpa Bis-Amide Ligands

**Author(s):** Julia Greiser, Tino Hagemann, Tobias Nicksch, Philipp Traber, Stephan Kupfer, Stefanie Gräfe, Helmar Görts, Wolfgang Weigand,\* Martin Freesmeyer\*

## Additional NMR spectra

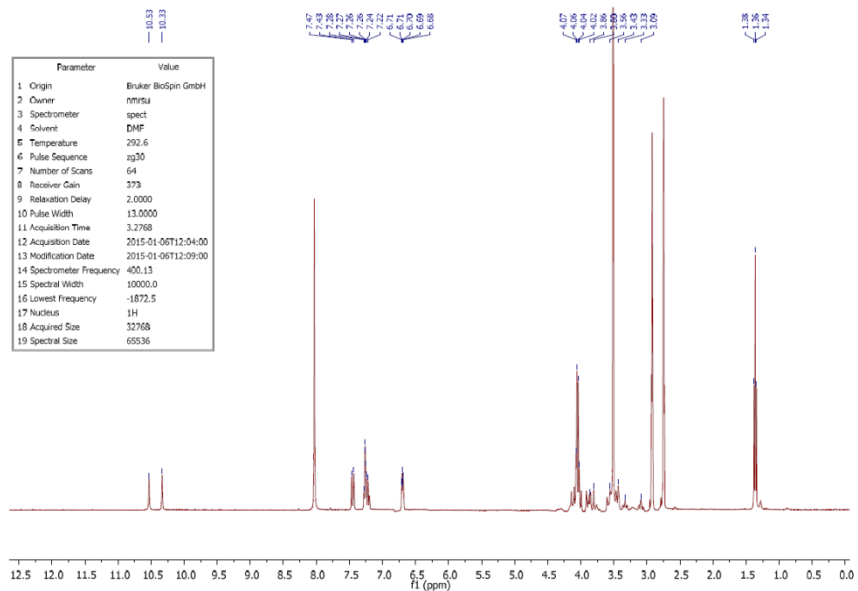
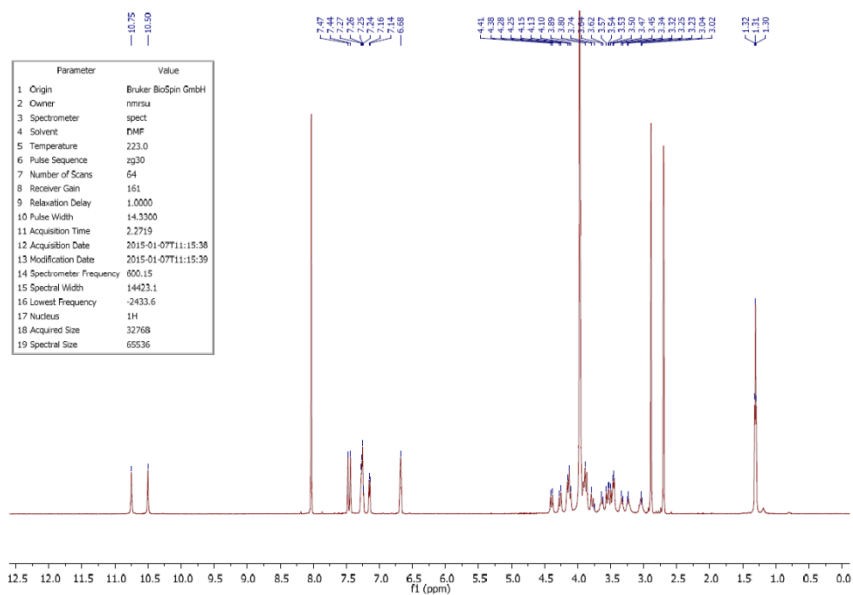
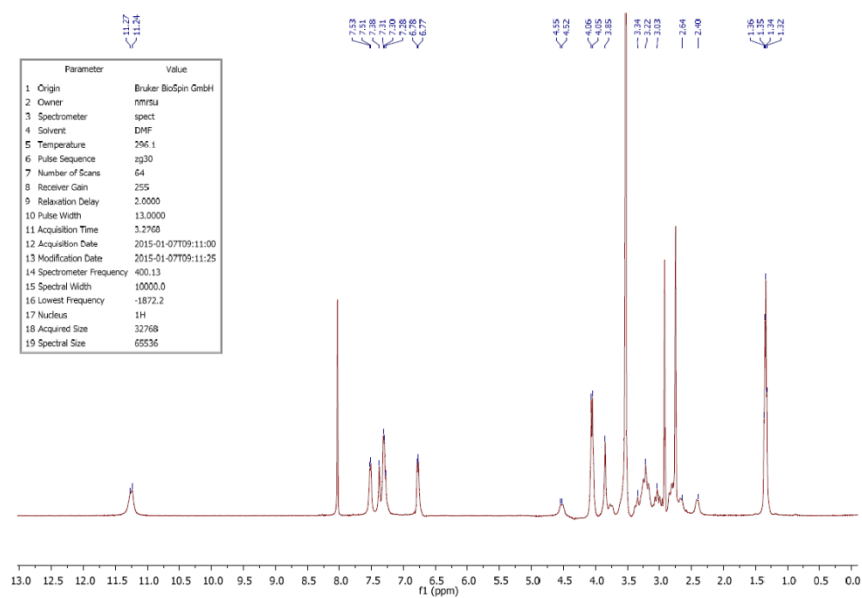
Figure S1.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3c in DMF- $d_7$  at 20 °C



Figure S4  $^1\text{H}$  NMR spectra of 4c in  $\text{DMF-d}_7$  at  $-50\text{ }^\circ\text{C}$ Figure S5  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 5c in  $\text{DMF-d}_7$  at  $23\text{ }^\circ\text{C}$

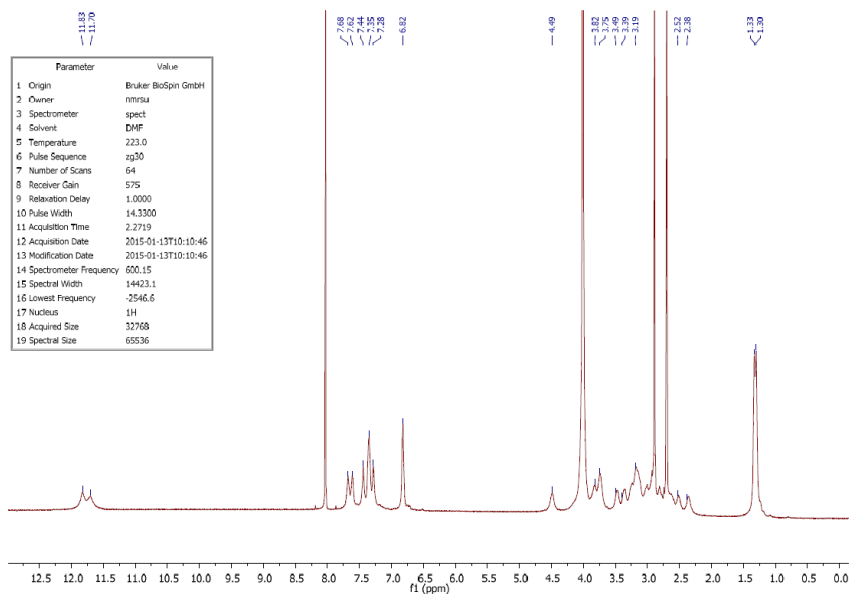
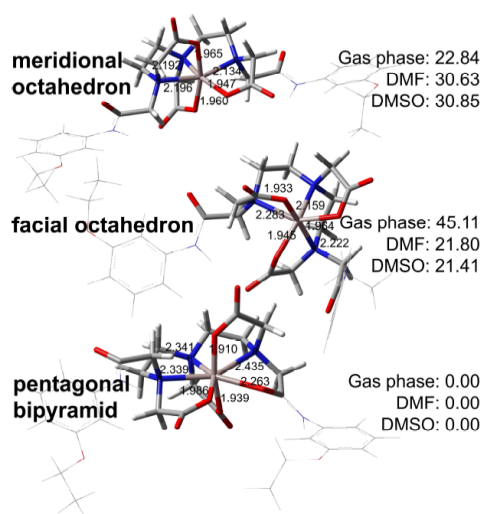


Figure S6  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 5c in DMF- $d_7$  at  $-50\text{ }^\circ\text{C}$

### Quantum chemical results

In order to obtain detailed insight into the structure of 3c quantum chemical calculations have been performed. Starting from 1000 conformers generated by the program RDKit<sup>[1]</sup>, 360 conformers have been further investigated by means of the semi-empirical PM6 method<sup>[2]</sup> as well as density functional theory (DFT). Exemplarily, an overview of the DFT results obtained with the M06-2X global-hybrid functional<sup>[3]</sup> and the 6-31G(d) double- $\zeta$  basis set<sup>[4]</sup> (for hydrogen, carbon, nitrogen, and oxygen) as well as the MWB-28 effective core potential<sup>[5]</sup> for gallium, implemented in the Gaussian 09 program<sup>[6]</sup>, are presented. Fully relaxed geometry optimizations have been carried out in gas phase as well as in the solvents DMF and DMSO, whereas effects of solvation have been taken into account by means of the integral equation formalism of the polarizable continuum model.<sup>[7]</sup> Subsequent vibrational analyses proved that the optimized geometries correspond to minima of the 3N-6 dimensional potential energy (hyper-)surface.

Besides octahedral coordination spheres with meridional and facial isomers also a manifold of other structures have been obtained, e.g. structures with a pentagonal bipyramidal coordination sphere (Figure 7). The pentagonal bipyramid can be considered as an intermediate between the two octahedral isomers, while the Ga carbonyl oxygen bond is elongated by approximately 0.3 Å with respect to the carboxylato groups ( $\sim 1.95\text{ \AA}$ ). However, all calculations (gas phase, DMF and DMSO) predict the energy differences between meridional and facial octahedron and pentagonal bipyramid to be within the typical error range of DFT methods,<sup>[8,9]</sup> hence, at the given level of theory no unambiguous prediction can be given with respect to the equilibrium structure of 3c. The performed PM6 and DFT calculations of the 360 conformers rather point to the possibility that several isomers are present in solution.



**Figure S7.** Isomers (meridional octahedron, facial octahedron, and pentagonal bipyramid) fully optimized at the DFT level of theory using the M06-2X functional and the 6-31G(d) basis set as well as the MWB-28 effective core potential (gallium) addressing effects of solvation by means of a polarizable continuum model (DMF and DMSO). Relative electronic ground state energies are given in kJ/mol. Gallium atom and coordination sphere are highlighted.

- [1] G. Landrum, *RDKit: Open-source cheminformatics*; <http://www.rdkit.org/>.
- [2] J. J. P. Stewart, *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173.
- [3] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215.
- [4] P. C. Hariharan, J. A. Pople, *Theor. Chim. Acta.* **1973**, *28*, 213.
- [5] D. Andrae, U. Häußermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuß, *Theor. Chim. Acta* **1990**, *77*, 123.
- [6] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. L. Caricato, X. J. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.1*; Gaussian, Inc., Wallingford, CT, **2009**.
- [7] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999.
- [8] F. Neese, W. Frank, A. Hansen, U. Becker, *Chem. Phys.* **2009**, *356*, 98.
- [9] L. Goerigk, S. Grimme, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 6670.

## 5.2 Publierte Originalarbeit P2

### Investigations on the Ga(III) Complex of EOB-DTPA and its $^{68}\text{Ga}$ Radiolabeled Analogue

Julia Greiser, Tobias Niksch, Wolfgang Weigand, Martin Freesmeyer

*J. Vis. Exp.* **2016**, 114, 10.3791/54334.

In dieser Publikation wurden der  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ - sowie der  $[^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplex des Liganden EOB-DTPA synthetisiert und charakterisiert. Ziel war die Herstellung eines nuklearmedizinischen Analogon zum leberspezifischen MRT-Kontrastmittel Primovist® ( $\text{Gd}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA) durch Austausch des paramagnetischen  $\text{Gd}^{3+}$ -Ions gegen das  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Ion. Für eine effektive Gewinnung des Liganden wurde EOB-DTPA statt durch eine vielstufige Synthese direkt aus dem kommerziell erwerblichen Metallkomplex Primovist® erhalten, indem das Zentralmetallion  $\text{Gd}^{3+}$  als schwerlösliches  $\text{Gd}^{\text{III}}$ -oxalat gefällt und quantitativ abgetrennt wurde. Auch andere Liganden, die als Basis für  $\text{Gd}^{\text{III}}$ - oder  $\text{Mn}^{\text{II}}$ -haltige Kontrastmittel dienen, könnten durch das gezeigte oder vergleichbare Verfahren gewonnen und für die Komplexsynthese bzw. die Radiotracer-synthese eingesetzt werden.

Der Komplex  $[^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA wurde zum Zwecke der chemischen Charakterisierung isoliert und mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Elementaranalyse charakterisiert. Der potentielle PET-Radiotracer  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA wurde hinsichtlich seiner *in-vitro*-Stabilität sowie der Lipophilie in Form des LogD-Koeffizienten charakterisiert. Bei dieser Publikation handelt es sich um einen Videoartikel. Das dazugehörige Skript ist nachfolgend eingefügt. Das Video ist als Anlage dieser Dissertation in elektronischer Form beigefügt.

In weiteren Untersuchungen wurde anhand des *in-ovo*-Modells an bebrüteten Straußeneiern die Anwendbarkeit des Tracers  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA für die PET-Bildgebung geprüft. Die Ergebnisse waren zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht Bestandteil der Publikation und sind daher in Kapitel 6.2.3 dieser Arbeit dargelegt und in Kapitel 7.4 diskutiert.



## Video Article

Investigations on the Ga(III) Complex of EOB-DTPA and Its  $^{68}\text{Ga}$  Radiolabeled AnalogueJulia Greiser<sup>1</sup>, Tobias Niksch<sup>1</sup>, Wolfgang Weigand<sup>2</sup>, Martin Freesmeyer<sup>1</sup><sup>1</sup>Clinic of Nuclear Medicine, University Hospital Jena<sup>2</sup>Friedrich Schiller UniversityCorrespondence to: Martin Freesmeyer at [Martin.Freesmeyer@med.uni-jena.de](mailto:Martin.Freesmeyer@med.uni-jena.de)URL: <http://www.jove.com/video/54334>DOI: [doi:10.3791/54334](https://doi.org/10.3791/54334)

Keywords: Chemistry, Issue 114, gallium-68, PET, metal complexes, ligand, EOB-DTPA, gadoteric acid, liver function imaging, molecular imaging, radiopharmaceuticals, nuclear medicine

Date Published: 8/17/2016

Citation: Greiser, J., Niksch, T., Weigand, W., Freesmeyer, M. Investigations on the Ga(III) Complex of EOB-DTPA and Its  $^{68}\text{Ga}$  Radiolabeled Analogue. *J. Vis. Exp.* (114), e54334, doi:10.3791/54334 (2016).

## Abstract

We demonstrate a method for the isolation of EOB-DTPA (3,6,9-triaza-3,6,9-tris(carboxymethyl)-4-(ethoxybenzyl)-undecanedioic acid) from its Gd(III) complex and protocols for the preparation of its novel non-radioactive, *i.e.*, natural Ga(III) as well as radioactive  $^{68}\text{Ga}$  complex. The ligand as well as the Ga(III) complex were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, mass spectrometry and elemental analysis.  $^{68}\text{Ga}$  was obtained by a standard elution method from a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator. Experiments to evaluate the  $^{68}\text{Ga}$ -labeling efficiency of EOB-DTPA at pH 3.8–4.0 were performed. Established analysis techniques radio TLC (thin layer chromatography) and radio HPLC (high performance liquid chromatography) were used to determine the radiochemical purity of the tracer. As a first investigation of the  $^{68}\text{Ga}$  tracers' lipophilicity the *n*-octanol/water distribution coefficient of  $^{68}\text{Ga}$  species present in a pH 7.4 solution was determined by an extraction method. *In vitro* stability measurements of the tracer in various media at physiological pH were performed, revealing different rates of decomposition.

## Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/54334/>

## Introduction

Gadoteric acid, a common name for the Gd(III) complex of the ligand EOB-DTPA<sup>1</sup>, is a frequently used contrast agent in hepatobiliary magnetic resonance imaging (MRI).<sup>2,3</sup> Due to its specific uptake by liver hepatocytes and high percentage of hepatobiliary excretion it enables the localization of focal lesions and hepatic tumors.<sup>2-5</sup> However, certain limitations of the MRI technique (*e.g.*, toxicity of the contrast agents, limited applicability in patients with claustrophobia or metal implants) call for an alternative diagnostic tool.

Positron emission tomography (PET) is a molecular imaging method, wherein a small amount of a radioactive substance (tracer) is administered, upon which its distribution in the body is recorded by a PET scanner.<sup>6</sup> PET is a dynamic method that allows for high spatial and temporal resolution of images as well as quantification of the results, without having to deal with the side-effects of MRI contrast agents. The informative value of the obtained metabolic information can be further increased by combination with anatomical data received from additional imaging methods, as most commonly achieved by hybrid imaging with computed tomography (CT) in PET/CT scanners.

The chemical structure of a tracer suitable for PET must include a radioactive isotope serving as positron emitter. Positrons have a short life-span since they almost immediately annihilate with electrons of the atom shells of surrounding tissue. By annihilation two 511 keV gamma photons with opposite direction of movement are emitted, which are recorded by the PET scanner.<sup>7,8</sup> To form a tracer, PET nuclides may be bound covalently to a molecule, as is the case in 2-deoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroglucose (FDG), the most extensively used PET tracer.<sup>7</sup> However, a nuclide may also form coordinative bonds to one or several ligands (*e.g.*, [ $^{68}\text{Ga}$ ]-DOTATOC<sup>9,10</sup>) or be applied as dissolved inorganic salts (*e.g.*, [ $^{18}\text{F}$ ] sodium fluoride<sup>11</sup>). Altogether, the structure of the tracer is crucial as it determines its biodistribution, metabolism and excretion behavior.

A suitable PET nuclide should combine favorable characteristics like convenient positron energy and availability as well as a half-life adequate for the intended investigation. The  $^{68}\text{Ga}$  nuclide has become an essential force in the field of PET over the last two decades.<sup>12,13</sup> This is mainly due to its availability through a generator system, which allows on-site labeling independently from the vicinity of a cyclotron. In a generator, the mother nuclide  $^{68}\text{Ge}$  is absorbed on a column from which the daughter nuclide  $^{68}\text{Ga}$  is eluted and subsequently labeled to a suitable chelator.<sup>5,14</sup> Since the  $^{68}\text{Ga}$  nuclide exists as a trivalent cation just like Gd(III)<sup>10,13</sup>, chelating EOB-DTPA with  $^{68}\text{Ga}$  instead would yield a complex with the same overall negative charge as gadoteric acid. Accordingly, that  $^{68}\text{Ga}$  tracer might combine a similar characteristic liver specificity with the suitability for PET imaging. Although gadoteric acid is purchased and administered as disodium salt, in the following context we will refer to it as Gd[EOB-DTPA] and to the non-radioactive Ga(III) complex as Ga[EOB-DTPA], or  $^{68}\text{Ga}$ [EOB-DTPA] in case of the radiolabeled component for the sake of convenience.

To evaluate their applicability as tracers for PET, radioactive metal complexes need to be examined extensively *in vitro*, *in vivo* or *ex vivo* experiments first. To determine the suitability for a respective medical problem, various tracer characteristics like biodistribution behavior and clearance profile, stability, organ specificity and cell or tissue uptake need to be investigated. Due to their non-invasive character, *in vitro* determinations are often performed prior to *in vivo* experiments. It is generally acknowledged that DTPA and its derivatives are of limited suitability as chelators for  $^{68}\text{Ga}$  due to these complexes lacking kinetic inertness, resulting in comparably fast decomposition when administered *in vivo*.<sup>14,20</sup> This is primarily caused by apo-transferrin acting as a competitor for  $^{68}\text{Ga}$  in plasma. Nevertheless, we investigated this new tracer concerning its possible application in hepatobiliary imaging, wherein diagnostic information may be provided within minutes post-injection<sup>3,4,21-23</sup>, thereby not necessarily requiring long-term tracer stability. For this purpose we isolated EOB-DTPA from gadoxetic acid and initially performed the complexation with natural Ga(III), which exists as mixture of two stable isotopes,  $^{69}\text{Ga}$  and  $^{71}\text{Ga}$ . The complex thus obtained served as non-radioactive standard for the following chelation of  $^{68}\text{Ga}$ . We used established methods and simultaneously evaluated their suitability for determining the  $^{68}\text{Ga}$  labeling efficiency of EOB-DTPA and to investigate the lipophilicity of the new  $^{68}\text{Ga}$  tracer and its stability in different media.

## Protocol

### 1. Preparation of EOB-DTPA and Ga[EOB-DTPA]

Caution: Please consult all relevant material safety data sheets (MSDS) of the used organic solvents, acids and alkalines before use. Perform all steps in a fume hood and use personal protective equipment (safety glasses, gloves, lab coat).

#### 1. Isolation of EOB-DTPA from gadoxetic acid

- Put 3 ml of 0.25 M gadoxetic acid injectable solution into a flask. Add 500 mg (5.6 mmol) of oxalic acid to the stirred solution.
- After stirring for 1 hr, filter the suspension through a frit using reduced pressure. Wash the residue three times with 3 ml of water, respectively.
- Combine the aqueous filtrates and equip the solution with a pH electrode. Add 12 M hydrochloric acid to the filtrate until the pH is about -0.1.
- Remove the solvent *in vacuo* to yield a colorless residue. Store under inert gas.
- Wash the residue thoroughly (at least three times) with ethyl acetate to remove the excess of oxalic acid. Dry the residue *in vacuo*.
- Redissolve the residue in 2 ml of water at room temperature and then cool the solution in an ice bath. Without removing the ice bath, add 0.5 M aqueous sodium hydroxide solution dropwise until the formation of a colorless gluey solid is observed.
- Remove the water by decantation. Wash the solid two more times with 1 ml of cold water. Dry the solid *in vacuo* to yield the first product fraction.
- Isolate a second product fraction from the combined fractions of decanted water *via* column chromatography (silica, methanol/water 4/1).<sup>24</sup> Remove the solvent *in vacuo*.
- If the thus obtained solid is not pure white, redissolve it in 1 ml of water, add 10 ml of ethanol and subsequently 10 ml of diethyl ether to precipitate the product. Filter through a frit using reduced pressure and dry *in vacuo*.
- Combine both solid fractions of EOB-DTPA and perform NMR spectroscopic,<sup>25</sup> mass spectrometric<sup>26</sup> and elemental<sup>27</sup> analyses.

#### 2. Synthesis of Ga[EOB-DTPA]

CAUTION: Store solid Ga(III) chloride under a dry inert atmosphere, since upon contact with air, moisture or grease decomposition takes place, resulting in corrosive fumes and formation of yellow, brown or black impurities.

- Prepare a 0.11 M stock solution by dissolving 1.94 g (11.0 mmol) of Ga(III) chloride in 100 ml of water. Dilute 1 ml of 25% aqueous ammonia solution with 4 ml of water.
- Dissolve 80 mg (0.15 mmol) of EOB-DTPA in a flask in 10 ml of water. If necessary, heat the solvent to achieve complete dissolution.
- Add 1.4 ml (0.15 mmol) of the Ga(III) chloride stock solution. Equip the flask with a stirrer and pH-electrode. Add diluted aqueous ammonia solution dropwise until the pH of the solution is approximately 4.1. Stir at room temperature for 30 min.
- Remove the solvent *in vacuo*. Place the residue in a flask, equipped with a stillhead with a central and parallel side neck. Equip the central neck with a cooling finger and the side neck with a vacuum pump outlet.
- Heat the residue under reduced pressure (125 °C, 0.6 mbar). Periodically remove sublimated ammonium chloride (visible as white coating of the glass surface) from the cooling finger and still head, as well as from the upper parts of the flask with a slightly wet cloth. Continue the process until there is no visible formation of new sublimate.
- To remove final traces of ammonium chloride wash the residue three times with 0.5 ml of hot methanol, respectively. Dry the colorless residue *in vacuo*. Perform NMR spectroscopic,<sup>25</sup> mass spectrometric<sup>26</sup> and elemental<sup>27</sup> analyses.

### 2. General Labeling Procedure

CAUTION: All experiments including direct or indirect contact with radioactive substances must be undertaken by trained personnel only. Please use appropriate shielding equipment. Collect any radioactive waste separately and store and dispose in accordance with valid regulations.

#### 1. Elution of the generator

Note: A 40 mCi  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator with the mother nuclide bound as oxide on dodecyl-3,4,5-trihydroxybenzoate silica was used. Elution and purification may be performed manually or, as was the case in this procedure, as a combined automated process using a peristaltic pump and dispenser unit.

- Prepare solutions of 5.5 M, 1.0 M and 0.05 M hydrochloric acid. Prepare a solution of 5.0 M sodium chloride containing 25  $\mu\text{l}$  of 5.5 M hydrochloric acid per ml. Prepare a buffer solution of pH 4.6 by combining 4.1 g sodium acetate, 1 ml HCl (30%) and 2.5 ml glacial acetic acid and diluting the mixture with water to 50 ml.
- Precondition the PS-H<sup>+</sup> cartridge by flushing it slowly with 1 ml of 1.0 M hydrochloric acid and subsequently 5 ml of water.
- Elute the silica column of the generator with 4 ml 0.05 M HCl.<sup>12</sup> Load the  $^{68}\text{Ga}$  eluate onto the PS-H<sup>+</sup> cartridge.

4. Flush the cartridge with 5 ml of water and subsequently dry it with 5 ml of air. Elute the  $^{68}\text{Ga}$  from the cartridge with 1 ml 5.0 M acidified sodium chloride solution.<sup>28</sup>
2. **Labeling of EOB-DTPA with  $^{68}\text{Ga}$** 
  1. Dissolve 1 mg (1.9  $\mu\text{mol}$ ) of EOB-DTPA in 1 ml of water. From this solution take 100  $\mu\text{l}$  (0.19  $\mu\text{mol}$ ) and dilute them with 9.9 ml of water to prepare a 19  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stock solution of EOB-DTPA.
  2. Remove 50  $\mu\text{l}$  (equating 22-29 MBq) of the solution containing  $^{68}\text{Ga}$  and put into a vial. Add 50  $\mu\text{l}$  (0.5  $\mu\text{g}$ ) of a 19 mM stock solution of EOB-DTPA and 300  $\mu\text{l}$  of buffer to raise the pH to 4.0. Shake briefly and incubate the solution at room temperature for 5 min. Remove an aliquot of 1-5  $\mu\text{l}$  and put to HPLC or TLC analysis.
  3. Perform radio HPLC analysis on a reversed phase (RP) C18 column.<sup>29</sup> Use the following mobile phase: A - water/trifluoroacetic acid (99.9%/0.1%), B - acetonitrile/trifluoroacetic acid (99.9%/0.1%), gradient: 06 min 80% A  $\rightarrow$  0% A (0.5 ml/min), 610 min 0% A (0.5 ml/min).
  4. Determine the peak intensities of the radio HPLC signals as area under curve. Calculate the labeling yield as radiochemical purity (RCP) of the tracer as follows:  

$$\text{RCP} = \frac{A_{\text{Ga-EOB-DTPA}}}{(A_{\text{Ga}} + A_{\text{Ga-EOB-DTPA}})} \cdot 100\%$$

$$A_{\text{Ga-EOB-DTPA}}: \text{area under curve of } ^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}]$$

$$A_{\text{Ga}}: \text{area under curve of free } ^{68}\text{Ga}$$

### 3. Labeling Efficiency

1. Perform labeling procedures as described in section 2. Use a consistent range of starting activity of  $^{68}\text{Ga}$  eluate, e.g., 22-29 MBq (40-140  $\mu\text{l}$ , depending on the freshness of the eluate).
2. Add the required amount of buffer solution to adjust the pH to 3.8-4.0 (40-190  $\mu\text{l}$ , depending on the volume of  $^{68}\text{Ga}$  eluate). Add the required amount of ligand stock solution (10-70  $\mu\text{l}$  of a 19 mM solution).
3. Add the required amounts of water to adjust the overall volume of each labeling probe to 1.75 ml. Mix thoroughly and let the sample stand for 5 min at room temperature. Perform HPLC analysis as described in section 2 to determine the labeling yield.
4. Perform labeling procedures with amounts of ligand between 0.1  $\mu\text{g}$  and 0.7  $\mu\text{g}$  in steps of 0.1  $\mu\text{g}$ . Perform experiments in triplicates for each ligand concentration. Calculate the mean yield and standard deviation.

### 4. In Vitro Stability

1. **General procedure and preparations**
  1. Dissolve a tablet of phosphate buffered saline (PBS) in 200 ml of deionized water to prepare a PBS stock solution with a phosphate concentration of 10 mM.
  2. Perform labeling of 22-29 MBq  $^{68}\text{Ga}$  with 0.5  $\mu\text{l}$  of EOB-DTPA stock solution, as described in section 2. Depending on the volume of the  $^{68}\text{Ga}$  eluate, adjust the amount of buffer, as described in section 3. Withdraw samples of labeling solution containing 6-12 MBq of tracer to perform stability measurements.
  3. Perform radio TLC analysis on 80 mm silica gel coated aluminum plates using 0.1 M aqueous sodium citrate as eluent and analyze the plates with a TLC radioactivity scanner.<sup>30</sup> Determine the intensities of the TLC signals as area under curve. Calculate the RCP of the tracer as follows:  

$$\text{RCP} = \frac{A_{\text{Ga-EOB-DTPA}}}{(A_{\text{Ga-free}} + A_{\text{Ga-EOB-DTPA}} + A_{\text{Ga-colloidal}})} \cdot 100\%$$

$$A_{\text{Ga-EOB-DTPA}}: \text{area under curve of } ^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}]$$

$$A_{\text{Ga-free}}: \text{area under curve of free } ^{68}\text{Ga}$$

$$A_{\text{Ga-colloidal}}: \text{area under curve of colloidal } ^{68}\text{Ga}$$
  4. Calculate RCP/RCP<sub>0</sub> for every time point. Plot the thus standardized RCP vs. time difference since the starting point  $t = 0$  min.  

$$\text{RCP}_t = \text{RCP of } ^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}] \text{ at time point } t$$

$$\text{RCP}_0 = \text{RCP of } ^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}] \text{ at } t = 0 \text{ min.}$$
2. **Stability in phosphate buffered saline (A)**
  1. To 65  $\mu\text{l}$  of labeling solution add 150  $\mu\text{l}$  of PBS stock solution and 60  $\mu\text{l}$  of sodium hydroxide solution (0.1 M) to raise the pH to 7.4. Mix thoroughly.
  2. Remove an aliquot of 1-5  $\mu\text{l}$  to perform TLC analysis ('starting point'). Immediately store the solution in an incubator at 37  $^{\circ}\text{C}$  and remove aliquots to perform TLC analysis at representative time points over 3 hr.
3. **Stability towards excess of apo-transferrin in PBS (B)**
  1. To 120  $\mu\text{l}$  of labeling solution add 50  $\mu\text{l}$  of PBS stock solution and 430  $\mu\text{l}$  of sodium hydroxide solution (0.1 M) to raise the pH to 7.4. Add 40  $\mu\text{l}$  of a solution of apo-transferrin (25 mg/ml). Mix thoroughly.
  2. Remove an aliquot of 1-5  $\mu\text{l}$  to perform TLC analysis ('starting point'). Immediately store the solution in an incubator at 37  $^{\circ}\text{C}$  and remove aliquots to perform TLC analysis at representative time points over 3 hr.
4. **Stability in human serum (C)**
  1. To 500  $\mu\text{l}$  of human serum add 25  $\mu\text{l}$  of labeling solution and 45  $\mu\text{l}$  of sodium hydroxide solution (0.1 M) to raise the pH to 7.4. Mix thoroughly.
  2. Remove an aliquot of 1-5  $\mu\text{l}$  to perform TLC analysis ('starting point'). Immediately store the solution in an incubator at 37  $^{\circ}\text{C}$  and remove aliquots to perform TLC analysis at representative time points over 3 hr.

## 5. Determination of Distribution Coefficient LogD

1. Perform labeling procedures as described in section 2. To 50  $\mu\text{l}$  of labeling solution add 20  $\mu\text{l}$  of PBS stock solution and 170  $\mu\text{l}$  of sodium hydroxide solution (0.1 M) to raise the pH to 7.4.
2. Withdraw 200  $\mu\text{l}$  from that solution and put it into a plastic V-vial. Add 200  $\mu\text{l}$  of *n*-octanol. Close the vial and vortex for 2 min. Then centrifuge the sample at 1,600  $\times$  g for 5 min.
3. Remove triplicates of 40  $\mu\text{l}$  from the *n*-octanol phase and the aqueous phase each and put them in separate V-vials. Be careful not to mix up the layers.
4. Measure the activity of each sample in a gamma well counter for 30 sec. For each sample immediately repeat the measurement twice and thereof calculate the mean activity  $\bar{A}_t$  in counts per minute (cpm). List the thus gained  $\bar{A}_{t,W1}$ ,  $\bar{A}_{t,W2}$  and  $\bar{A}_{t,W3}$  (activities in aqueous samples) and  $\bar{A}_{t,O1}$ ,  $\bar{A}_{t,O2}$ ,  $\bar{A}_{t,O3}$  (activities in *n*-octanol) along with the respective time point *t* of their determination.
5. Define the time point of the measurement of the last sample as  $t_0$ . Determine and list  $\Delta t$  in min by calculating  $\Delta t = t - t_0$ . Perform decay correction of  $\bar{A}_t$ , using the following formula:  

$$\bar{A}_0 = \bar{A}_t \cdot 2^{(\Delta t / 68 \text{ min})}$$
6. Calculate  $\bar{A}_{0,W}$  as the mean of  $\bar{A}_{0,W1}$ ,  $\bar{A}_{0,W2}$  and  $\bar{A}_{0,W3}$  as well as  $\bar{A}_{0,O}$  as the mean of  $\bar{A}_{0,O1}$ ,  $\bar{A}_{0,O2}$  and  $\bar{A}_{0,O3}$ . Calculate logD using the following formula:  

$$\log D = \log[(\bar{A}_{0,O} \cdot 40 \mu\text{g}) / (\bar{A}_{0,W} \cdot 33 \mu\text{g})]$$
7. Perform the entire experiment in triplicates and calculate the mean logD along with its standard deviation.

### Representative Results

The ligand EOB-DTPA and the non-radioactive Ga(III) complex were analyzed via  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectroscopy, mass spectrometry and elemental analysis. The results listed in **Table 1** and depicted in **Figures 1-6** verify the purity of the substances.

Elution of the  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator yielded solutions of 400-600 MBq  $^{68}\text{Ga}$ . The described labeling procedure results in the formation of the desired tracer  $^{68}\text{Ga}$ [EOB-DTPA], indicated as radio HPLC peak exhibiting a retention time of 2.8 min (**Figure 7**). Comparison with the retention time of the Ga[EOB-DTPA] standard in the UV-vis detector at 220 nm (2.7 min, **Figure 8**) confirms successful labeling. Uncoordinated  $^{68}\text{Ga}$  is detected as radio peak at 2.1 min (**Figure 7**). The  $^{68}\text{Ga}$ -labeling efficiency of EO-BDTPA was investigated by determining the labeling yield as a function of the ligand concentration via HPLC (**Figure 9**). The yields were determined in triplicate and standard deviations were calculated.

Depending on the pH and the concentration of anions present in solution, uncoordinated or non-labeled  $^{68}\text{Ga}$  may exist in various species, e.g., gallates or insoluble hydroxide.<sup>31</sup> The generalized term "free  $^{68}\text{Ga}$ "<sup>32</sup> is used for all non-labeled species in solution except the hydroxide, which is generally referred to as "colloidal  $^{68}\text{Ga}$ ". Under the described analysis conditions, free  $^{68}\text{Ga}$  moves with the solvent front ( $R_f = 1.0$ ) on a TLC plate. Colloidal  $^{68}\text{Ga}$  cannot be detected via HPLC, while on a TLC plate it appears as activity at the origin ( $R_f = 0$ ). A representative chromatogram of a TLC plate analyzed with a TLC radioactivity scanner is shown in **Figure 10**. The tracer exhibits different retention behavior, depending on whether a sample of labeling solution (pH 3.8-4.0,  $R_f = 0.3$ ) or a sample of physiological pH ( $R_f = 0.5$ ) was analyzed.

To investigate the stability of the tracer, freshly labeled  $^{68}\text{Ga}$ [EOB-DTPA] was added to samples of physiological pH, containing diluted PBS (phosphate concentration 5.5 mM, **A**), excess of apo-transferrin (1.6 mg/ml in diluted PBS with a phosphate concentration of 0.8 mM, **B**) and human serum (**C**), respectively. Over time, the radiochemical purity (RCP<sub>t</sub>) of tracer in the samples was determined via TLC. The percentage of intact tracer was calculated as the ratio of RCP<sub>t</sub> at the respective time points and RCP<sub>0</sub> at the starting point (**Table 2**). This was necessary due to the labeling solutions containing tracer of differing RCP<sub>0</sub> (93-96%). The thus standardized percentage of intact tracer is depicted as a function of time in **Figure 11**.

For the determination of logD aqueous samples of tracer in a diluted PBS solution were prepared. The samples were mixed with *n*-octanol, centrifuged and subsequently aliquots were removed to determine the activity concentration in both phases. Activity values and subsequent calculation of logD thereof are depicted in **Table 3**. The mean logD value is  $3.54 \pm 0.08$ .

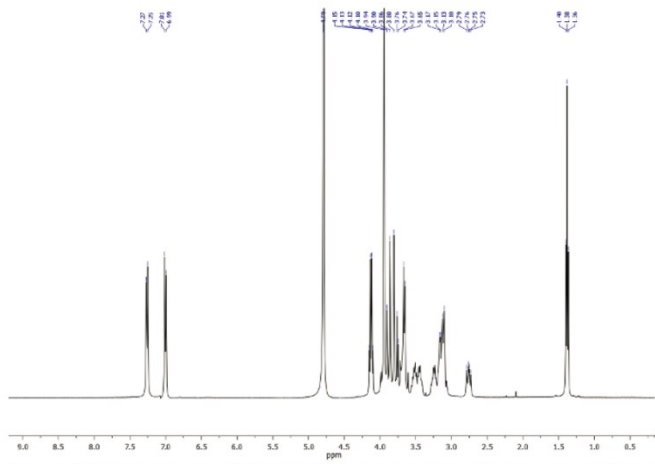


Figure 1.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of EOB-DTPA. The spectrum was recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  at 400.1 MHz. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

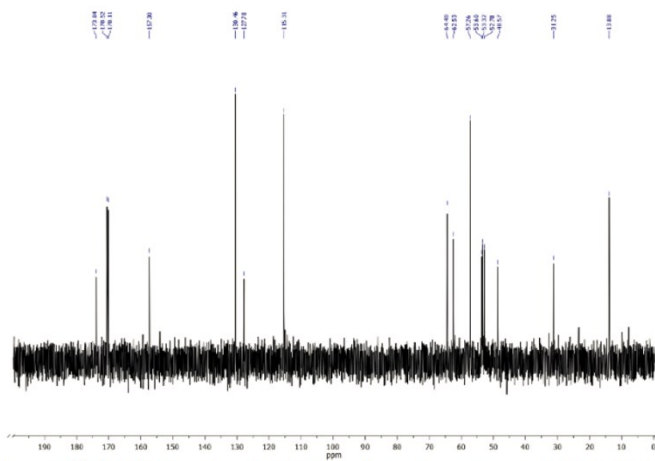


Figure 2.  $^{13}\text{C}(^1\text{H})$ -NMR spectrum of EOB-DTPA. The spectrum was recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  at 100.6 MHz. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

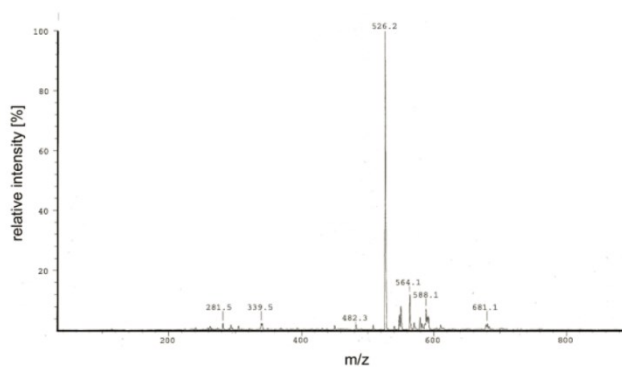


Figure 3. MS of EOB-DTPA (electrospray ionization (ESI), methanol, negative mode). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

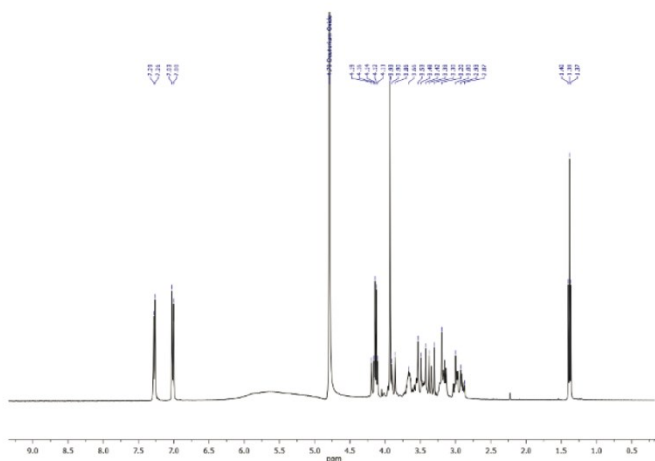


Figure 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Ga[EOB-DTPA]. The spectrum was recorded in D<sub>2</sub>O at 400.1 MHz. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



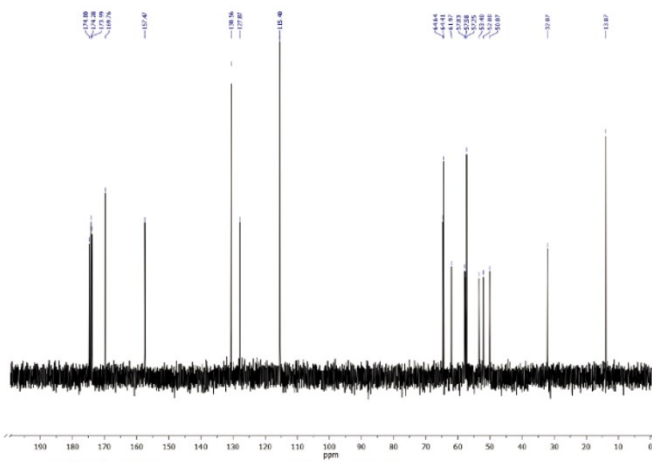


Figure 5.  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR spectrum of Ga[EOB-DTPA]. The spectrum was recorded in  $\text{D}_2\text{O}$  at 100.6 MHz. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

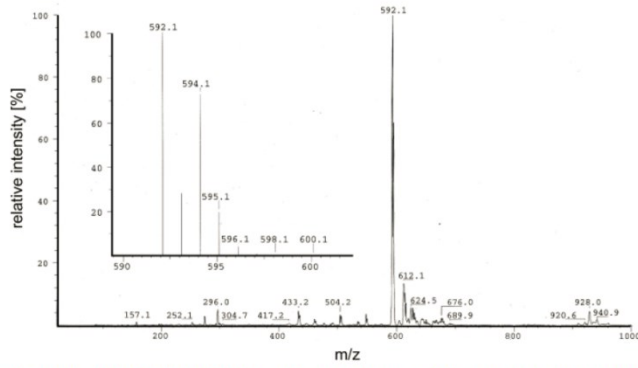
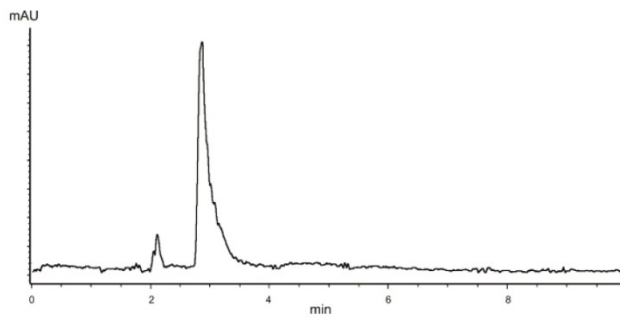
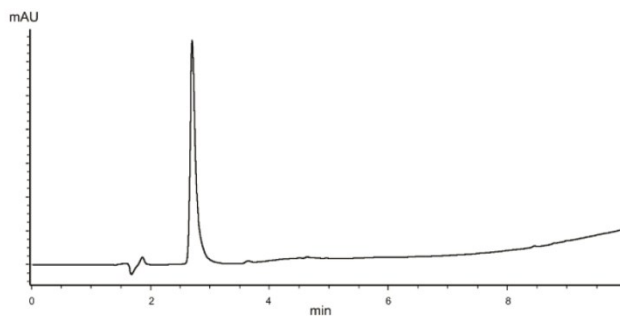


Figure 6. MS of Ga[EOB-DTPA] (ESI, methanol, negative mode), along with a detailed depiction of the isotope pattern of the molecular peak. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

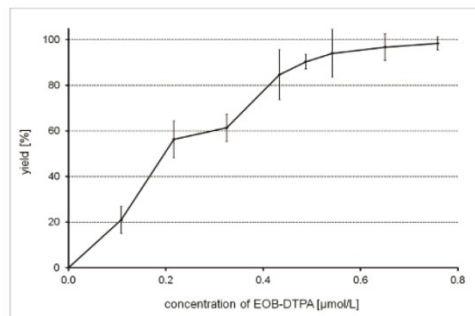




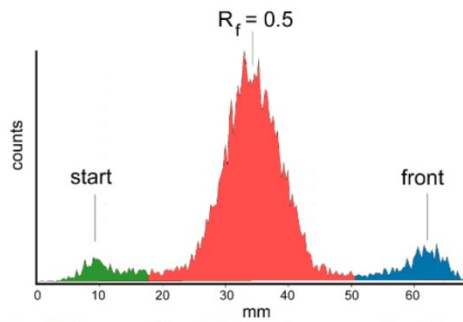
**Figure 7.** Representative HPLC chromatogram of a sample of  $^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}]$  containing in parts uncoordinated  $^{68}\text{Ga}$ , as recorded by the radioactivity detector. Uncoordinated  $^{68}\text{Ga}$  exhibits a retention time of 2.1 min, while the tracer is detected at 2.8 min. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



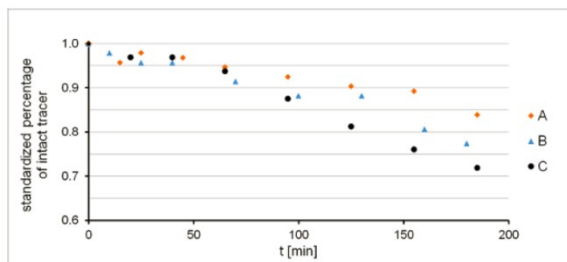
**Figure 8.** Representative HPLC chromatogram of the standard substance  $\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}]$ , as detected in the UV-vis channel at 220 nm. The retention time of the cold standard is 2.7 min. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 9.** Depiction of  $^{68}\text{Ga}$ -labeling efficiency of EOB-DTPA. The labeling yield as determined via HPLC is plotted as a function of the concentration of EOB-DTPA (22-29 MBq starting activity, pH 3.8-4.0, 5 min, RT). The standard deviation is depicted by error bars. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 10. Representative TLC chromatogram revealing different  $^{68}\text{Ga}$  species.** A sample of  $^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}]$  in diluted PBS (phosphate concentration 5.5 mM, pH = 7.4) was analyzed after 110 minutes of incubation. Exemplary distribution of colloidal  $^{68}\text{Ga}$  ( $R_f = 0$ ),  $^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}]$  ( $R_f = 0.5$ ) and free  $^{68}\text{Ga}$  ( $R_f = 1.0$ ) on a 70 mm TLC plate as detected by a TLC radioactivity scanner is presented. Counts are decay corrected. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 11. Stability determinations of  $^{68}\text{Ga}[\text{EOB-DTPA}]$  in different media.** The decay corrected, standardized percentage of intact tracer as determined via TLC, is depicted as a function of time. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

analysis	unity	result of analysis						
		EOB-DTPA			Ga[EOB-DTPA]			
<sup>1</sup> H NMR (D <sub>2</sub> O, 400.1 MHz)	δ	7.26 (d, <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 2H)					7.27 (d, <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, 2H)	
		7.00 (d, <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 2H)					7.02 (d, <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 8.6 Hz, 2H)	
		4.13 (q, <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 2H)					4.20-2.91 (m, 21H)	
		3.91-2.78 (m, 19H)					1.38 (t, <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 3H)	
		1.38 (t, <sup>3</sup> J <sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 3H)						
<sup>13</sup> C{ <sup>1</sup> H} NMR (D <sub>2</sub> O, 100.6 MHz)	δ	173.8, 170.5, 170.1, 157.3, 130.5,				174.8, 174.3, 174.0, 169.8, 157.5,		
		127.8, 115.3, 64.4, 62.5, 57.3, 53.6,				130.6, 127.9, 115.4, 64.6, 64.4, 62.0,		
		53.3, 52.8, 48.6, 31.3, 13.9				57.8, 57.6, 57.3, 53.4, 52.0, 50.1,	32.1, 13.9	
MS (ESI, negative mode)	m/z	calcd.			calcd.			
		527.2 [M]			595.1 (67%) [M( <sup>71</sup> Ga)]			
					594.1 (26%) [M( <sup>69</sup> Ga)+1]			
					593.1 (100%) [M( <sup>69</sup> Ga)]			
		found			found			
		526.2 [M-H]			595.1 (19%) [M( <sup>69</sup> Ga)-H+1]			
					594.1 (70%) [M( <sup>71</sup> Ga)-H]			
					593.1 (27%) [M( <sup>69</sup> Ga)-H+1]			
					592.1 (100%) [M( <sup>69</sup> Ga)-H]			
EA	%	C	H	N	C	H	N	
		calcd.	calcd.	calcd.	calcd.	calcd.	calcd.	calcd.
		50.64	6.47	7.70	42.92	5.68	8.17	
		found	found	found	found	found	found	found
		50.66	6.16	7.71	42.72	5.42	7.98	

**Table 1. Results of NMR spectroscopic, MS and elemental analyses performed for EOB-DTPA and Ga[EOB-DTPA].** Relative MS peak intensities are given in %, assignment to peaks are given in square brackets. Elemental CHN values were calculated for C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>·H<sub>2</sub>O (EOB-DTPA) and (NH<sub>4</sub>)<sub>0.75</sub>H<sub>1.25</sub>[C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>GaN<sub>3</sub>O<sub>11</sub>]·2H<sub>2</sub>O (Ga[EOB-DTPA]).

A			B			C		
t [min]	composition	RCP <sub>t</sub> /RCP <sub>0</sub>	t [min]	composition	RCP <sub>t</sub> /RCP <sub>0</sub>	t [min]	composition	RCP <sub>t</sub> /RCP <sub>0</sub>
0	93 / 2 / 5	1.00	0	93 / 3 / 4	1.00	0	96 / 1 / 3	1.00
15	89 / 6 / 5	0.96	10	91 / 4 / 5	0.98	20	93 / 4 / 3	0.97
25	91 / 5 / 4	0.98	25	89 / 5 / 6	0.96	40	93 / 5 / 2	0.97
45	90 / 6 / 4	0.97	40	89 / 6 / 5	0.96	65	90 / 8 / 2	0.94
65	88 / 7 / 5	0.95	70	85 / 8 / 7	0.91	95	84 / 13 / 3	0.88
95	86 / 8 / 6	0.92	100	82 / 12 / 6	0.88	125	78 / 19 / 3	0.81
125	84 / 10 / 6	0.90	130	82 / 13 / 5	0.88	155	73 / 22 / 5	0.76
155	83 / 13 / 4	0.89	160	75 / 18 / 7	0.81	185	69 / 28 / 3	0.72
185	78 / 13 / 9	0.84	180	72 / 20 / 8	0.77			

**Table 2. Stability determination of <sup>68</sup>Ga[EOB-DTPA] in different media.** The RCP of <sup>68</sup>Ga[EOB-DTPA] in media A, B and C was determined via TLC at given time points. The composition of the samples is given as percentages in % of tracer / free <sup>68</sup>Ga / colloidal <sup>68</sup>Ga. The percentage of intact tracer is standardized as ratio of RCP<sub>t</sub>/RCP<sub>0</sub>. RCP<sub>0</sub> is the respective RCP of the tracer at t = 0 min.

phase	$\bar{A}_{0,x}$			$\bar{A}_0$	logD
	1	2	3		
W	561479	574321	574847	570216	-3.47
O	152	160	166	159	
W	683769	689959	702529	692086	-3.63
O	131	132	139	134	
W	704161	718133	715094	712463	-3.51
O	177	187	186	183	
logD ± SD					
-3.54 ± 0.08					

**Table 3. Determination of logD.** Decay corrected values  $\bar{A}_{0,x}$  of three aliquots (x = 1, 2, 3) removed from each phase (W: aqueous, O: n-octanol) of a sample. All activities are given in cpm. LogD is calculated as described in section 5 of the protocol. The experiment was repeated twice.

## Discussion

EOB-DTPA is accessible through a multi-step synthesis<sup>33</sup> but may just as well be isolated from available contrast agents containing gadoteric acid. For this purpose, the central Gd(III) ion can be precipitated with an excess of oxalic acid. After removing Gd(III) oxalate and oxalic acid the ligand can be isolated by precipitation in cold water at pH 1.5. However, in order to enhance yields column chromatography of the filtrate can be performed instead or as a follow-up procedure. Either method yields the analytically pure ligand in total yields of 70% (Figures 1-3, Table 1).

We found that in order to isolate Ga[EOB-DTPA] adjusting the pH with ammonia solution is advantageous compared to the use of sodium hydroxide, since the by-product ammonium chloride may be removed from the very hydrophilic residue via sublimation. Under the aforementioned conditions this process takes place slowly. Since non-negligible amounts of chloride were still detectable after five days, the remaining salt was washed out with methanol. Although this work-up procedure results in partial loss of Ga[EOB-DTPA], the product was obtained in analytical purity with an overall yield of 46% (Figures 4-6, Table 1). For the isolation of both EOB-DTPA and its Ga(III) complex, the use of reversed phase chromatography should be considered as an alternative method of purification, especially since decomposition of silica gel is likely when using highly polar solvents.

The labeling process of EOB-DTPA required the use of highly pure solvents, chemicals and metal-free equipment to avoid the presence of competing metal ions, due to <sup>68</sup>Ga being present in nanomolar amounts (2 MBq of <sup>68</sup>Ga in a 1.75 ml sample equal a nuclide concentration of 0.14 nM). Labeling of EOB-DTPA to <sup>68</sup>Ga occurs at pH 3.8-4.0 within five minutes at room temperature. Investigations on the <sup>68</sup>Ga-labeling efficiency require determination of the labeling yield while keeping the reaction conditions pH, temperature and reaction time as well as starting activity of <sup>68</sup>Ga constant or in a justifiable range. For each data point (i.e., ligand concentration) the experiment should be performed at least three times to provide a reasonable confidence level, since the concentrations of both ligand and <sup>68</sup>Ga are very low and the labeling yield therefore sensitive to even slight deviations of the reaction conditions. For example, as the <sup>68</sup>Ga eluate ages, aliquots of increasing volume need to be withdrawn to provide a constant starting activity, thereby requiring increasing volumes of buffer. Furthermore, aging of the eluate results in increasing concentrations of the decay product <sup>68</sup>Zn, which itself might act as a competitor for <sup>68</sup>Ga, thus negatively affecting labeling efficiency.<sup>13,34,35</sup> Practically quantitative labeling of 22-29 MBq <sup>68</sup>Ga is achieved under the aforementioned conditions with amounts of EOB-DTPA  $\geq 0.7 \mu\text{g}$  (Figure 9), with contents of free <sup>68</sup>Ga  $\leq 2\%$  and about 5% of colloidal <sup>68</sup>Ga present in samples.

While HPLC provided superior baseline separation of free <sup>68</sup>Ga and <sup>68</sup>Ga[EOB-DTPA], it is not suited to detect colloidal <sup>68</sup>Ga. We therefore chose TLC to determine the RCP during stability measurements, wherein the quantification of transferrin or protein-bound <sup>68</sup>Ga was required. We found baseline separation acceptable for this purpose (Figure 10); however, the use of size exclusion chromatography or filtration methods<sup>15,36</sup> to remove colloidal fractions, followed by HPLC analysis, might be considered as alternatives. The <sup>68</sup>Ga complex exhibits a stronger retention on TLC plates ( $R_f = 0.3$ ) if the sample is withdrawn directly from labeling solution as opposed to samples at physiological pH ( $R_f = 0.5$ ). We suggest this observation might be explained by different protonation states of the complex.

*In vitro* stability determinations of <sup>68</sup>Ga tracers are usually performed in PBS<sup>15,17</sup> or alternative buffer systems mimicking the physiological pH<sup>37</sup>, as well as in solutions containing apo-transferrin<sup>37</sup>, which is the main competitor for <sup>68</sup>Ga in blood, or in human serum<sup>15,17</sup>. In our experiments the addition of 0.1 M sodium hydroxide solution to PBS was required to adjust the pH of the samples to 7.4. We could not assert that the phosphate concentration influences the rate of degradation, since stability experiments in solutions of varying phosphate concentration (0.8 mM and 5.5 mM (A)) yielded non-reproducible results. However, we found that a solution B, containing apo-transferrin (1.6 mg/ml, which is within range of the normal plasma content<sup>35</sup>) and 0.8 mM phosphate (human blood usually exhibits a phosphate level of 0.8–1.5 mM<sup>39,40</sup>), causes decomposition at a rate comparable to that observable in human serum (C). In solutions AC, after 185 min the content of colloidal <sup>68</sup>Ga had increased by about 24%, while the content of free <sup>68</sup>Ga had increased by 11% in solution A, 17% in solution B and 27% in solution C (Table 2). The fact that <sup>68</sup>Ga formed by tracer decomposition is predominantly present as free <sup>68</sup>Ga as opposed to colloidal or protein-bound <sup>68</sup>Ga in B and C might be due to transferrin saturation or comparably slow transferrin binding rates.<sup>41</sup> The observed overall low stability (Figure 11) of <sup>68</sup>Ga[EOB-DTPA] is comparable to tracers featuring similar DTPA derived chelators.<sup>15,16,18</sup> Usually, information on the early arterial and venous perfusion phase of the liver are gained by performing MRI scans within the first 3 minutes<sup>4,21</sup> after administering Gd[EOB-DTPA], while the hepatocyte presence is detected in the delayed phase 20 minutes<sup>3,4,23</sup> up to several hours<sup>21,22</sup> after injection. After 20 minutes in human serum 93% of <sup>68</sup>Ga[EOB-DTPA] remain intact. Expectedly, the signal-to-noise ratio by that time would have deteriorated due to increasing amounts of <sup>68</sup>Ga-transferrin, which is present in plasma and tissue expressing transferrin receptors, as well as free <sup>68</sup>Ga gallate.<sup>41,42</sup>

For predicting a tracers tissue distribution *n*-octanol/water partition coefficients logP or distribution coefficients logD can be determined as ratio of activity concentrations in the two phases. By definition, the logD parameter does not differentiate between multiple species present in a medium, which makes it suitable for our experiments due to the possibility of different protonation states of the tracer as well as its decomposition in the aqueous phase. To determine logD by extraction the aqueous medium is usually buffered with PBS to mimic blood conditions.<sup>17,43-45</sup> For aforementioned reasons we used diluted PBS, exhibiting a phosphate concentration of 0.8 mM and physiological pH. Following extraction with *n*-octanol and centrifugation, the removal of several aliquots from the same phase allows for inaccuracies caused by pipetting to be reduced. Due to the very low activity concentrations in *n*-octanol one should be careful to avoid cross-contamination with the aqueous phase and to ensure quantitative transfer into a separate vial. Distribution coefficients determined by this procedure were reproducible, and while they allow for a rough estimation of lipophilicity, a direct comparison to a logP of Gd[EOB-DTPA] is not possible. Due to the specificity of Gd[EOB-DTPA] resulting not primarily from lipophilicity but rather its hepatobiliary uptake additional experiments in living subjects or cells would be necessary to provide more extensive information on the biodistribution as well as stability *in vivo* of <sup>68</sup>Ga[EOB-DTPA]. Altogether, an application as imaging agent for the perfusion and early hepatobiliary phase is imaginable.

## Disclosures

The authors have nothing to disclose.

### Acknowledgements

The authors have no acknowledgements.

### References

- Weinmann, H. J. *et al.* A new lipophilic gadolinium chelate as a tissue-specific contrast medium for MRI. *Magn. Reson. Med.* **22**, 233-237 (1991).
- Stroszczynski, C. *et al.* Aktueller Stand der MRT-Diagnostik mit leberspezifischen Kontrastmitteln. *Radiologe*. **44**, 1185 (2004).
- Van Beers, B. E., Pastor, C. M., & Hussain, H. K. Primovist, Eovist - what to expect. *J. Hepatol.* **57**, 421-429 (2012).
- Zech, C. J., Herrmann, K. A., Reiser, M. F., & Schoenberg, S. O. MR Imaging in Patients with Suspected Liver Metastases: Value of Liver-specific Contrast Agent Gd-EOB-DTPA. *Magn. Reson. Med. Sci.* **6**, 43-52 (2007).
- Leonhardt, M. *et al.* Hepatic Uptake of the Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Gd-EOB-DTPA: Role of Human Organic Anion Transporters. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 1024-1028 (2010).
- Wadas, T. J., Wong, E. H., Weisman, G. R., & Anderson, C. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *J. Chem. Rev.* **110**, 2858-2902 (2010).
- Ametamey, S. M., Honer, M., & Schubiger, P. A. Molecular Imaging with PET. *Chem. Rev.* **108**, 1501-1516 (2008).
- Cutler, C. S., Hennkens, H. M., Sisay, N., Huclier-Markai, S., & Jurisson, S. S. Radiometals for Combined Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **113**, 858-883 (2013).
- Henze, M. *et al.* PET Imaging of Somatostatin Receptors Using [68Ga]DOTA-D-Phe1-Tyr3-Octreotide: First Results in Patients with Meningiomas. *J. Nucl. Med.* **42**, 1053-1056 (2001).
- Hofmann, M. *et al.* Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand 68Ga-DOTATOC: preliminary data. *Eur. J. Nucl. Med.* **28**, 1751-1757 (2001).
- Blau, M., Nagler, W., & Bender, M. A. Fluorine-18: a new isotope for bone scanning. *J. Nucl. Med.* **3**, 332-334 (1962).
- Green, M. A., & Welch, M. J. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. B.* **16**, 435-448 (1989).
- Rösch, F. Past, present and future of 68Ge/68Ga generators. *Appl. Radiat. Isot.* **76**, 24-30 (2013).
- Liu, S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **33**, 445-461 (2004).
- Haubner, R. *et al.* Development of (68)Ga-labelled DTPA galactosyl human serum albumin for liver function imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* **40**, 1245-1255 (2013).
- Yang, W., Zhang, X., & Liu, Y. Asialoglycoprotein Receptor-Targeted Radiopharmaceuticals for Measurement of Liver Function. *Curr. Med. Chem.* **21**, 4-23 (2014).
- Chauhan, K. *et al.* 68Ga based probe for Alzheimer's disease: synthesis and preclinical evaluation of homodimeric chalcone in  $\beta$ -amyloid imaging. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 7328-7337 (2014).
- Chakravarty, R., Chakraborty, S., Dash, A., & Pillai, M. R. A. Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted 68Ga with different bifunctional chelators. *Nucl. Med. Biol.* **40**, 197-205 (2013).
- Clevette, D. J., & Orvig, C. Comparison of ligands of differing denticity and basicity for the in vivo chelation of aluminum and gallium. *Polyhedron.* **9**, 151-161 (1990).
- Prinsen, K. *et al.* Development and evaluation of a 68Ga labeled pamoic acid derivative for in vivo visualization of necrosis using positron emission tomography. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 5274-5281 (2010).
- Vogl, T. J. *et al.* Liver tumors: comparison of MR imaging with Gd-EOB-DTPA and Gd-DTPA. *Radiology.* **200**, 59-67 (1996).
- Reimer, P. *et al.* Phase II clinical evaluation of Gd-EOB-DTPA: dose, safety aspects, and pulse sequence. *Radiology.* **199**, 177-183 (1996).
- Ba-Ssalamah, A. *et al.* MRT der Leber. *Radiologe*. **44**, 1170-1184 (2004).
- Scott, R. P. W. *Journal of Chromatography Library*. Vol. 22A A137-A160 Elsevier Scientific Publishing Co. (1983).
- Reichenbaecher, M., & Popp, J. *Strukturanalytik organischer und anorganischer Verbindungen*. 1st edition edn, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden (2007).
- Gross, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer (2004).
- Ma, T. S., & Rittner, R. C. *Modern Organic Elemental Analysis*. Marcel Dekker, Inc. (1979).
- Mueller, D. *et al.* Simplified NaCl Based 68Ga Concentration and Labeling Procedure for Rapid Synthesis of 68Ga Radiopharmaceuticals in High Radiochemical Purity. *Bioconjugate Chem.* **23**, 1712-1717 (2012).
- Roberts, T. R. Radio-column chromatography. *Journal of Chromatography Library.* **14**, 103-132 (1978).
- Roberts, T. R. Radio-thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography Library.* **14**, 45-83 (1978).
- Green, M. A., & Welch, M. J. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Nucl. Med. Biol.* **16**, 435-448 (1989).
- Notni, J., Plutnar, J., & Wester, H.-J. Bone-seeking TRAP conjugates: surprising observations and their implications on the development of gallium-68-labeled bisphosphonates. *EJNMMI Res.* **2**, 13 (2012).
- Schmitt-Willich, H. *et al.* Synthesis and Physicochemical Characterization of a New Gadolinium Chelate: The Liver-Specific Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Gd-EOB-DTPA. *Inorg. Chem.* **38**, 1134-1144 (1999).
- Zhernosekov, K., & Nikula, T. 68Ga generator for positron emission tomography. DE102010037964B3 (2012).
- Simecek, J., Hermann, P., Wester, H.-J., & Notni, J. How is 68Ga Labeling of Macrocyclic Chelators Influenced by Metal Ion Contaminants in 68Ge/68Ga Generator Eluates? *ChemMedChem.* **8**, 95-103 (2013).
- Baur, B. *et al.* Synthesis, Radiolabelling and In Vitro Characterization of the Gallium-68-, Yttrium-90- and Lutetium-177-Labelled PSMA Ligand, CHX-A''-DTPA-DUPA-Pep. *Pharmaceuticals (Basel).* **7**, 517-529 (2014).
- Boros, E. *et al.* RGD conjugates of the H2dedpa scaffold: synthesis, labeling and imaging with 68Ga. *Nucl. Med. Biol.* **39**, 785-794 (2012).
- Beck, W. S. *Hematology*. 5th edn, MIT press, Cambridge, Massachusetts (1998).
- Patel, V., & Morrissey, J. *Practical and Professional Clinical Skills*. 1 edition edn, Oxford University Press Inc., New York (2001).
- Bartke, A., & Constanti, A. *Basic Endocrinology*. 1 edition edn, CRC Press (1998).
- Bernstein, L. R. Mechanisms of Therapeutic Activity for Gallium. *Pharmacol. Rev.* **50**, 665-682 (1998).
- Clausen, J., Edeling, C.-J., & Fogh, J. 67Ga Binding to Human Serum Proteins and Tumor Components. *Cancer Res.* **34**, 1931-1937 (1974).



43. Dumont, R. A. *et al.* Novel  $^{64}\text{Cu}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -Labeled RGD conjugates show improved PET imaging of  $\alpha\text{v}\beta 3$  integrin expression and facile radiosynthesis [Erratum to document cited in CA156:116856]. *J. Nucl. Med.* **52**, 1498 (2011).
44. Pohle, K. *et al.*  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-RGD is a suitable substitute for  $^{18}\text{F}$ -Galacto-RGD and can be produced with high specific activity in a cGMP/GRP compliant automated process. *Nucl. Med. Biol.* **39**, 777-784 (2012).
45. Notni, J., Pohle, K., & Wester, H.-J. Be spoilt for choice with radiolabelled RGD peptides: Preclinical evaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP(RGD) $_3$ . *Nucl. Med. Biol.* **40**, 33-41 (2013).



### 5.3 Publierte Originalarbeit P3

#### ***N*,1,4-Tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-DAZA: efficient one-pot synthesis and labelling with <sup>68</sup>Ga for PET liver imaging *in ovo***

Julia Greiser, Christian Kühnel, Helmar Görls, Wolfgang Weigand, Martin Freesmeyer

*Dalton Trans.* **2018**, 47, 9000 – 9007, 10.1039/c8dt01038b.

Für die Entwicklung von leberspezifischen [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexen mit hoher Stabilität wurden lipophile Liganden auf Grundlage des Azacyklus 1,4-Diazepan-6-amin (DAZA) synthetisiert. Statt Aminocarboxylate wie in P1 und P2 wurden nunmehr Aminophenolate als Koordinationsgerüst gewählt, da diese Liganden im Allgemeinen hohe [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexstabilitäten und durch die Phenoleinheiten einen gegenüber Carboxylaten höheren Lipophiliegrad aufweisen. Die überraschend selektive und ungewöhnliche Alkylierungsreaktion zur Isolierung der Chelatoren TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA wurde mittels Massenspektrometrie zur Detektion von Intermediaten analysiert und ein Mechanismus postuliert. Die Synthese stellt eine neuartige Möglichkeit einer reduktiven *N*-Alkylierung ausgehend von *N,N'*-verbrückenden Aminen dar.

Die [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe der DAZA-Derivate wurden vollständig mit temperaturabhängiger NMR-Spektroskopie, inklusive <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}- und <sup>71</sup>Ga-NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Elementaranalyse charakterisiert. Die radioaktiven [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe von TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA wurden hinsichtlich ihrer *in-vitro*-Stabilität in Serum untersucht. Durch *in-ovo*-Applikation an ein präklinisches Straußenembryonenmodell und anschließende PET/CT-Bildgebung konnte die hohe Affinität dieser [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe zur Aufnahme in die Leber und eine Ausscheidung in den Dünndarm demonstriert werden. Die Publikation enthält eine Darstellung der dynamischen PET-Aufnahmen als zusätzliches Videosupplement, welches in elektronischer Form als Anlage dieser Dissertation beigefügt ist.

## PAPER



Cite this: *Dalton Trans.*, 2018, 47, 9000

## *N*,1,4-Tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-DAZA: efficient one-pot synthesis and labelling with $^{68}\text{Ga}$ for PET liver imaging *in ovo*†

Julia Greiser,<sup>a</sup> Christian Kühnel,<sup>a</sup> Helmar Görts,<sup>b</sup> Wolfgang Weigand <sup>\*b</sup> and Martin Freesmeyer <sup>\*a</sup>

We report the isolation of a new type of 1,4-diazepan-6-amine (DAZA)-based ligand. Condensation of aldehydes with DAZA gives a novel class of 1,5-diazabicyclo[3.2.1]octanes in nearly quantitative yields. Subsequent reductive cleavage of these bicyclic aminal species with sodium borohydride selectively leads to *N*,1,4-tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-1,4-diazepan-6-amines (alkoxy = Me: TMeOHB-DAZA; alkoxy = Et: TEOHB-DAZA) via a unique reductive alkylation reaction in which a substituent is added to the DAZA moiety without the presence of an alkylating agent. Mass spectrometry studies of the intermediates suggest that the mechanism involves insertion of *in situ* released carbonyl species into an aminal bond to form hemiaminal intermediates, and subsequent reduction. TMeOHB-DAZA and TEOHB-DAZA are hexadentate ligands suitable for effectively coordinating Ga(III) ions. Chelation of the radionuclide  $^{68}\text{Ga}$  was achieved within 5 min at 100 °C. *In vitro* stability studies in PBS and human serum confirmed the kinetic inertness of the tracers as no  $^{68}\text{Ga}$  demetallation was observed over a period of 4 h. Positron emission tomography (PET)/computed tomography (CT) imaging after *in ovo* administration to incubated ostrich eggs showed a high uptake in the liver, namely 27% (60 min post injection), and subsequent biliary excretion. These results suggest that [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-TMeOHB-DAZA and [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-TEOHB-DAZA have excellent potential as hepatobiliary PET/CT imaging agents.

Received 17th March 2018,

Accepted 12th June 2018

DOI: 10.1039/c8dt01038b

rs.c.li/dalton

### Introduction

Positron emission tomography (PET) is a powerful diagnostic tool in the field of molecular imaging. This method, which involves administration and detection of small amounts of radioactive pharmaceuticals, *i.e.* tracers, enables non-invasive diagnosis of cancerous or inflammatory diseases, and provides functional or metabolic information. PET scanners record the spatial and temporal distributions, as well as the metabolism,

of PET tracers in physiological systems by specific detection of annihilation gamma photons from beta plus decay. A combination of PET with computed tomography (CT), *i.e.* the hybrid PET/CT technique, provides additional anatomical data and enables correlation with metabolic information and attenuation correction. Overall, quantifiable high quality images are obtained.<sup>1</sup> A molecule or substance that is used as a PET tracer must contain a radioactive nuclide that emits beta plus radiation (*i.e.* positrons). The structural design of a tracer is crucial because it influences the biodistribution, metabolism, and clearance from the body and therefore determines the diagnostic applicability. In the development of new and enhanced radiopharmaceuticals, one major strategy involves chelating metallic radionuclides with specifically designed ligands. The  $^{68}\text{Ga(III)}$  ion is one of the most commonly used positron emitters because its steady supply by portable, long-lived  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generators allows on-site radiochemical production in any nuclear medical department without the need for proximity to a cyclotron or radionuclide production centre.<sup>2–5</sup> Moreover, the half-life of the radiometal  $^{68}\text{Ga}$ , *i.e.* 68 min, is long enough to enable radiochemical preparation, purification, quality control, subsequent administration to patients, accumulation, and detection, but also short enough

<sup>a</sup>University Hospital Jena, Clinic of Nuclear Medicine, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Germany. E-mail: martin.freesmeyer@med.uni-jena.de; Tel: +49-3641-9329801

<sup>b</sup>Institute for Inorganic and Analytical Chemistry, Friedrich-Schiller-University, Humboldtstrasse 8, 07743 Jena, Germany. E-mail: wolfgang.weigand@uni-jena.de; Tel: +49-3641-948160

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic procedures for isolation of 1, 2, 3a, 4a, TMeOHB-DAZA and TEOHB-DAZA and their Ga(III) complexes,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  and  $^{71}\text{Ga}$  NMR spectra of Ga-TMeOHB-DAZA and Ga-TEOHB-DAZA at different temperatures, mass spectra of reductive alkylation reactions, radio HPLC and TLC chromatograms of the radioactive tracers following purification and during *in vitro* stability determinations, dynamic PET scan of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-TEOHB-DAZA (Fig. 4). CCDC 1820196 for 1, CCDC 1820197 for TMeOHB-DAZA, and 1820198 for TEOHB-DAZA. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c8dt01038b

to prevent long-term radiation exposure. The use of  $^{68}\text{Ga}$  for imaging requires fast and effective binding to the chelator and high *in vivo* stability of the  $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}(\text{III})]$  complex. Among a wide range of ligands, polyazamacrocycles such as DOTA,<sup>6–8</sup> DO3A,<sup>9,10</sup> NOTA,<sup>8,9,11</sup> DATA,<sup>8,12,13</sup> TRAP,<sup>14</sup> and open-chain chelators such as HBED<sup>15,16</sup> and pyridine carboxylates known as the ‘pa’ family<sup>17,18</sup> are the most suitable, and have facilitated the development of a growing and diverse range of bifunctional ligands. Much interest has recently focused on the azacycle 1,4-diazepan-6-amine (DAZA)<sup>19</sup> and its most commonly used polyaminocarboxylate derivatives DATA<sup>12,20</sup> and AAZTA,<sup>21,22</sup> because they can be labelled with  $^{68}\text{Ga}$  rapidly and efficiently at mild temperatures and the obtained tracers have high kinetic inertness which makes them suitable for PET/CT imaging and binding studies.<sup>13,23</sup>

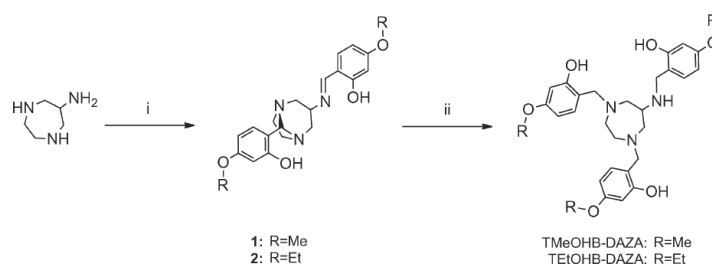
We tried to establish a liver-specific PET tracer to provide an alternative to hepatobiliary magnetic resonance imaging (MRI),<sup>24</sup> thereby overcoming the main drawbacks and limitations of the MRI technique: side effects of contrast agents,<sup>25</sup> toxicity of deposited Gd,<sup>26,27</sup> and limited applicability to patients who suffer from claustrophobia or carry metal implants. Although these negative effects could also be avoided by using liver-specific radiotracers such as  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ TeEHIDA<sup>28</sup> in single-photon-emission computed tomography (SPECT), this scintigraphic imaging technique is inferior to PET/CT in terms of spatial and temporal resolution. In tracer design, aromatic moieties, preferably substituted with alkyl,<sup>29–32</sup> alkoxy,<sup>24,33,34</sup> or hydroxyl groups,<sup>32,35,36</sup> have been identified as essential parts of the ligand structure because their presence increases lipophilicity and therefore liver specificity. Moreover, phenolic hydroxyl groups show a high affinity for the oxophilic Ga(III) ion.<sup>31,37–41</sup> Nitrogen functionalization of the DAZA scaffold, *e.g.* with acetic acid,<sup>42–45</sup> phosphonic acid,<sup>46</sup> or salicylic<sup>12</sup> or picolinate moieties,<sup>47</sup> is commonly performed by alkylation with halides, and usually involves multiple-step synthesis and sometimes the introduction of protecting groups. In contrast, we used an effective and straightforward method, namely nitrogen alkylation *via* carbonyl-amine condensation of DAZA with 4-alkoxy-2-hydroxybenzaldehydes. Two equivalents of the benzyl moiety were introduced

into the molecule: one by Schiff base formation at the primary amino group, and the second by forming a bisaminal bridge between two secondary nitrogen atoms of the azacycle *via* hemiaminal and iminium intermediates.<sup>48,49</sup> We discovered that these 1,5-diazabicyclo[3.2.1]octane derivatives undergo an unusual and highly specific reaction with sodium borohydride, resulting in aminal bond cleavage and additional nitrogen alkylation, without the presence of an alkylating species. This novel reaction pathway efficiently gives selective *N*,1,4-trialkylation of DAZA. Furthermore, it can be performed *via* a one-pot synthesis and enables production of chelators with high liver specificity that are suitable for  $^{68}\text{Ga}$  labelling and subsequent *in ovo* PET/CT liver imaging.

## Results and discussion

### Syntheses of ligands and single-crystal X-ray diffraction analysis

The formation of Schiff bases and bridging amins<sup>33,34</sup> through condensation of carbonyl compounds and amines is well known. The reaction of DAZA with two equivalents of an appropriate aldehyde is efficient; the novel 1,5-diazabicyclo[3.2.1]octane derivatives **1** and **2** were isolated in nearly quantitative yields (Scheme 1). Yellow crystals of **1** were obtained from a saturated solution in chloroform/methanol (1/1) through slow evaporation of the solvent. Single-crystal X-ray diffraction analysis showed a monoclinic ( $P2_1/n$ ) structure with hydrogen bonds between phenolic oxygen atoms and the nitrogen atoms of the aminal (O1–N2; 2.600 Å) and imino (O3–N3; 2.614 Å) groups (Fig. 1). The lack of a hydrogen bond at N2 might be one reason for the difference between the aminal bond lengths C1–N1 (1.475(4) Å) and C1–N2 (1.494(4) Å). As part of the bridged bicyclic structure, the five-membered azacycle adopts an envelope conformation with the aminal carbon atom C1 in the N1–C1–N2 plane protruding from the N2–C6–C5–N1 plane at an angle of 44.97°. Because of the chair conformation of the six-membered azacycle, the seven-membered bridged DAZA ring adopts a boat conformation.



**Scheme 1** Synthetic pathway to TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA. (i) RO-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OH)-CHO (2 equiv.), methanol; (ii) NaBH<sub>4</sub> (2 equiv.) methanol/chloroform (1/1, R = Me), methanol (R = Et).

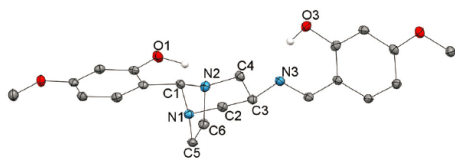


Fig. 1 ORTEP diagram of **1**. Hydrogen atoms are omitted for clarity. Protons forming hydrogen bonds are shown at located positions. Ellipsoids are drawn at 30% probability level.

The addition of sodium borohydride to a methanol/chloroform (1/1) solution of **1** and a methanolic suspension of **2**, respectively, results in quick reduction of the Schiff base and aminal moiety, indicated by disappearance of the yellow colour, and conversion to TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA, which are precipitated from methanol. Borohydride can be added directly to the reaction solutions of **1** or **2** on completion of the first step; completion should be ensured by a sufficient reaction time (1–2 h). The ligands can therefore be synthesized *via* a one-pot strategy. Crystals suitable for single-crystal X-ray diffraction analysis were obtained from saturated solutions in chloroform/methanol (1/1) through slow evaporation of the solvent. In both ligands hydrogen bonds are formed between phenolic oxygen atoms and amino groups (TMeOHB-DAZA: O1–N1 2.699 Å, O3–N2 2.676 Å, O5–N3 2.703 Å; TEtOHB-DAZA: O1–N3 2.679 Å, O3–N1 2.759 Å, O5–N2 2.729 Å). The aminal bridge is opened to form one of the amine pendant arms, therefore the seven-membered DAZA ring adopts a twisted conformation in both structures (Fig. 2).

#### Reductive alkylation reactions

Previous reports have indicated that reactions between bridging aminal bonds and hydride species always result in reductive alkylation at one nitrogen atom only, with addition of a proton to the second nitrogen atom.<sup>50–56</sup> The initial step was identified as C–N bond cleavage.<sup>50</sup> In contrast, during the single reduction step with sodium borohydride, we observed a selective increase in nitrogen alkylation from two benzylic moieties in bicyclic aminals **1** and **2** to three moieties in TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA. This suggests inter-

molecular transfer of benzyl moieties and involvement of the reactive aminal bridge. For pentacyclic aminal structures, Denat *et al.* observed carbonyl insertion of benzaldehyde, Ph–CH=O, into an N–C(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>)–N' aminal bridge to give N–(Ph)CH–O–C(R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>)–N'.<sup>57</sup> Although in most cases the insertion reaction was immediately followed by an intramolecular rearrangement, the intermediate could be identified by mass spectrometry (MS). This specific reaction was observed either when one equivalent of benzaldehyde was added to the aminal species or when diethyl oxalate was added, which releases benzaldehyde *in situ* following nucleophilic attack at the aminal bond. The same reaction was observed on addition of sodium borohydride;<sup>57</sup> this suggests that benzaldehyde is also released under these reductive conditions. This last observation was most relevant to our study because it mirrors the conditions we used to synthesize TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA. We clarified the mechanism by investigating the reactivity of bicyclic aminal **1** with various substrates

Table 1 Reaction of **1** with equimolar amounts of various species in mixture of methanol and chloroform (1/1) and identified products

Reactant	Conditions <sup>a</sup>	Products identified by ESI-MS <sup>b</sup>
A	i	I
	ii	I and III
	iii	IV
B	i	I
	ii	3a (starting material), 3b (R = Me) I and III
	iii	3a (starting material), 3b (R = Me) IV
C	i	I
	ii	4a (starting material), 4b (R = Me) I
	iii	4a (starting material), 4b (R = Me) IV
D <b>2</b>	i	I
	ii	I
	iii	IV

<sup>a</sup> Reaction conditions: (i) rt, 24 h; (ii) rt, 2 weeks; (iii) 2 equiv. NaBH<sub>4</sub>.  
<sup>b</sup> In all experiments, in identification of I, III, and IV at least two (I) or three (III and IV) different product signals were detected for each structure because of various permutations of the substituents R (all R = Me or Et, and R = mixture of Me/Et).

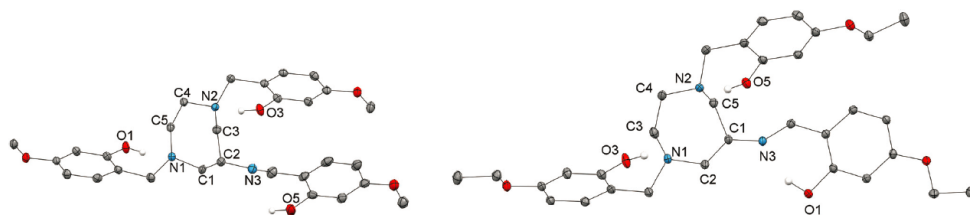


Fig. 2 ORTEP diagram of TMeOHB-DAZA (left) and TEtOHB-DAZA (right). Hydrogen atoms are omitted for clarity. Protons forming hydrogen bonds are shown at located positions. Ellipsoids are drawn at 30% probability level.



under reductive and non-reductive conditions (Table 1). All the substrates had either a free carbonyl group (A) or a potential carbonyl-releasing site, *i.e.* an imine (B) or aminal (C), or both (D). Chromatographic separation of the reaction mixtures prior to analysis was not possible because imino groups are prone to hydrolysis on silica, therefore we used electrospray ionisation (ESI)-MS to identify the products. In all the reactions without a reducing agent (i, ii), we observed a partial conversion of **1** (both R = Me) to **2** (both R = Et) *via* a bicyclic intermediate with mixed substitution (one R = Me, one R = Et). Furthermore, the reactants **3a** and **4a** (R = Et) were converted to **3b** and **4b** (R = Me), respectively. These observations can be explained by partial hydrolysis of an imino or aminal bond in **1** and subsequent recondensation with the carbonyl compound 4-ethoxy-2-hydroxybenzaldehyde, which could be released through hydrolysis of **2**, **3a**, or **4a**. The solvents were not dried prior to use therefore traces of water were present in all reactions. On the basis of the assumption that reactive carbonyl moieties were present during the formation of TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA, we formulated a reductive alkylation mechanism featuring carbonyl insertion into the aminal bond of bicyclic structure **I** as the initial step (Scheme 2). The molecular ion peaks of insertion product **II**, which is formulated based on the observations of Denat *et al.*,<sup>57</sup> were not observed in any of the mass spectra. However, when the reaction time was increased (Table 1, Aii and Bii) a signal set was detected in the *m/z* range 567–595. This indicates the presence of insertion products, which we suggest to be hemiaminals **III**. It is unclear whether subsequent condensation to the respective iminium species occurs, as is the case in direct reductive alkylation,<sup>58</sup> or whether the hemiaminals are reduced directly to the corresponding amines by hydride species.<sup>59–61</sup> In all cases, reduction with sodium borohydride (Aiii–Diii) gave a mixture of trialkylated DAZA derivatives **IV**.

The tentative mechanism shown in Scheme 2 was postulated solely on the basis of MS studies because isolation of the intermediates was not possible. We also considered alternative reaction pathways such as intermolecular aminal bridge formation and reactions between amines stemming from imino group reduction and aminals, but found no spectroscopic evidence for such behaviour.

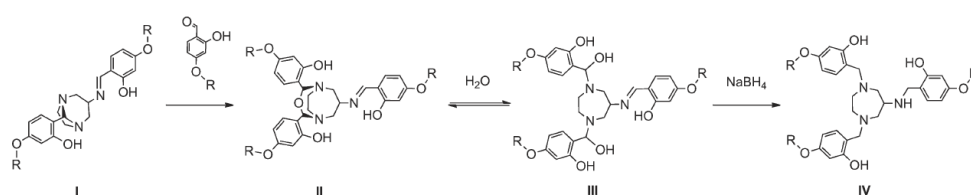
Theoretically, the maximum yield in the synthesis of **IV** should be 66% because no additional alkylating agent was

used to convert the dialkylated structure **I** to trialkylated DAZA derivatives **IV**. The ligands TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA, which are 2-hydroxy-4-alkoxy-substituted, were isolated in yields of 52–60%, indicating high selectivity of the reductive alkylation for trisubstituted products. In contrast, the reduction of bicyclic aminals lacking either the hydroxy or alkoxy substituent led to a mixture of mono-, di-, and tri-substituted DAZA derivatives. This indicates a dependency of the selectivity on the aromatic substitution, perhaps as a consequence of aromatic electron density.

#### Ga(III) complex characterisation and <sup>68</sup>Ga radiolabelling

Non-radioactive <sup>nat</sup>Ga(III) complexes of TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA were prepared, characterised by NMR spectroscopy, MS and elemental analysis and used as HPLC standards for the respective radioactive <sup>68</sup>Ga species. Due to the poor solubility of the complexes in water, DMSO-*d*<sub>6</sub> and MeOH-*d*<sub>4</sub> were used as solvents. Successful chelation of Ga(III) is indicated in all <sup>1</sup>H NMR spectra by the appearance of several doublets between 4.40 and 2.60 ppm (AB spin system, <sup>2</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 12.5–14.5 Hz) caused by geminal coupling between methylene protons of the benzyl pendant arms or of the diazepan scaffold. Expectedly, those protons become non-equivalent upon Ga(III) coordination. In the <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR spectra of both complexes more than one set of carbon signals was detected, indicating the presence of more than one complex diastereomer.

In DMSO-*d*<sub>6</sub> Ga-TMeOHB-DAZA and Ga-TEtOHB-DAZA show a broad singlet in the <sup>71</sup>Ga NMR at 249 ppm with a line width of 170 Hz and 211 Hz at room temperature and 153 Hz (50 °C) and 217 Hz (70 °C) at elevated temperatures, respectively. The narrowness of the signals indicate a relatively high grade of symmetry of the N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> coordination sphere around the quadrupolar nucleus <sup>71</sup>Ga.<sup>62</sup> Contrastingly, in the <sup>71</sup>Ga NMR spectrum of Ga-TMeOHB-DAZA in MeOH-*d*<sub>4</sub> the signal is shifted to 72 ppm with a significantly greater line width (1007 Hz), indicating a strong influence of the solvent on the symmetry around the metal centre. A comparison to <sup>71</sup>Ga NMR shifts and line widths in similar N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> complexes should therefore be drawn with care, since so far published <sup>71</sup>Ga NMR data were usually recorded in D<sub>2</sub>O. While diastereomers of the complexes likely exist in solution, as indicated by <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR, signal line width probably prevents resolution, resulting in a single resonance. High temperature NMR



Scheme 2 Proposed mechanism of reductive alkylation following carbonyl insertion into aminal bond of **I** and subsequent reduction to **IV**. R = Me, Et.

spectra revealed insignificant change in all spectra of Ga-TMeOHB-DAZA recorded in MeOH-d<sub>4</sub>, and considerable broadening and loss of fine structure in all <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR spectra performed in DMSO-d<sub>6</sub>. Recording of low temperature NMR spectra was only possible for Ga-TMeOHB-DAZA in MeOH-d<sub>4</sub>. Since the long time of cooling during measurement required for <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR spectra could cause damage to the shim foil, only <sup>1</sup>H and <sup>71</sup>Ga NMR spectra were recorded. However, the <sup>71</sup>Ga NMR signal disappeared at -40 °C, likely due to reduced solubility of the complex, thus not providing further information.

HPLC analysis of TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA gave a single peak, which can be explained by rapid interconversion between isomers following dissociation and reassociation of the benzylic pendant arms. Elemental analysis and MS confirmed a metal-ligand stoichiometry of 1.

TMeOHB-DAZA and TEtOHB-DAZA were labelled with the <sup>68</sup>Ga eluate from a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator at pH 3.8–4.0 for 5 min at 100 °C. The HPLC retention times of the radioactive <sup>68</sup>Ga species were in accordance with those of the corresponding non-radioactive standards. After cartridge purification, the <sup>68</sup>Ga tracers were isolated at radiolabelling yields of up to 80% (decay corrected) and with radiochemical purity (RCP) ≥99.6%, determined by radio HPLC and radio TLC.

#### *In vitro* stability

Samples of [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA and [<sup>68</sup>Ga]Ga-TEtOHB-DAZA (250–350 MBq) in PBS (pH 7.4) and human serum were incubated at 37 °C. Aliquots were taken every hour and analyzed *via* radio HPLC and radio TLC. Prior to HPLC analysis, the samples were purified by passing through a cartridge to remove colloids and proteins. At each time point no more than 2% of total activity was left on the cartridge, indicating that no significant amounts of protein-bound or colloidal <sup>68</sup>Ga species were formed. Even after 4 h, radio TLC and HPLC both confirmed RCP values ≥99.0%, demonstrating high stability of the complexes under physiological conditions. This result is in accordance with the well-known kinetic inertness of <sup>68</sup>Ga complexes formed from DAZA-derived ligands<sup>22</sup> and aminophenolates.<sup>37</sup>

#### *In ovo* PET/CT imaging

The tracer biodistribution was evaluated with an *in ovo* ostrich imaging model (accepted for publication). Imaging agents were administered at day 34 of egg development. For PET/CT imaging, samples of [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA and [<sup>68</sup>Ga]Ga-TEtOHB-DAZA, as well as [<sup>68</sup>Ga]Ga-chloride, were injected. A contrast-enhanced CT image was acquired prior to injection to provide an anatomical reference (Fig. 3A). PET images were acquired dynamically (list mode, Fig. 4, ESI†) for 90 min. A conventional clinical standard in hepatobiliary diagnostics, namely the established SPECT radiotracer [<sup>99m</sup>Tc]Tc-EHIDA, was injected for comparison with the DAZA tracers in terms of uptake, image quality, and excretion. Acquisition was performed dynamically for 60 min, followed by a static SPECT scan.

After injection and influx *via* the vitelline vein of the embryo, both [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA and [<sup>68</sup>Ga]Ga-TEtOHB-DAZA accumulated rapidly in the liver, with no notable difference between the uptake levels (27%, 60 min post injection) of the tracers (Fig. 3B and C). Additionally, low-level activity was detected in the kidneys, and excretion *via* the bile into the bowel began after 30 min (Fig. 4, ESI†). Non-chelated [<sup>68</sup>Ga]Ga-chloride was mainly distributed within the blood pool because of <sup>68</sup>Ga binding to the blood protein *apo*-transferrin<sup>6,7</sup> and no specific organ uptake was observed (Fig. 3D). In contrast, the high liver uptake and low levels of activity in the blood pool confirmed that there was no significant release of <sup>68</sup>Ga from the DAZA chelators, indicating that the complexes are stable *in ovo* towards demetallation. The SPECT scan showed comparable liver uptake and biliary excretion of [<sup>99m</sup>Tc]Tc-EHIDA, although with decisively lower spatial resolution, which causes image blur and, in contrast to the PET scans, does not enable distinction of single intestinal loops or give clear outlines of the organs (Fig. 3E). In terms of liver specificity, [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA and [<sup>68</sup>Ga]Ga-TEtOHB-DAZA can therefore equal the hepatobiliary SPECT standard and are superior in terms of image quality, thereby providing more precise physiological information.

In general the *in ovo* approach, which is commonly applied using chicken eggs, is a valuable and serious alternative to animal studies, aiming to reduce the number of animal tests

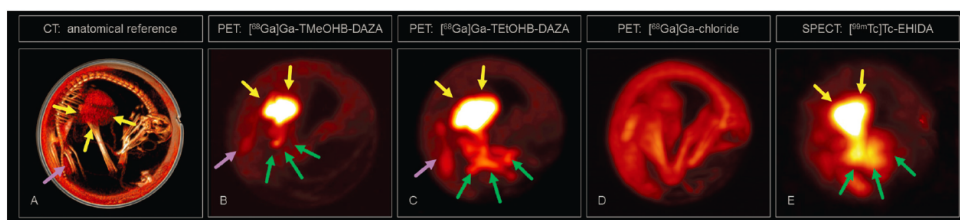


Fig. 3 Images of ostrich egg and discernible organs indicated by arrows: liver (yellow), kidneys (purple), bowels (green). CT scan additionally visualizing skeleton and vessels (A), PET scan with [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA (B), PET scan with [<sup>68</sup>Ga]Ga-TEtOHB-DAZA (C), PET scan with [<sup>68</sup>Ga]Ga-chloride (D), and SPECT scan with [<sup>99m</sup>Tc]Tc-EHIDA (E). PET and SPECT images (B–E) show the biodistribution 60 min post injection.



while providing comparable information on *in vivo* behaviour and stability.<sup>63</sup> At the current state the novel *in ovo* ostrich model described herein serves as an imaging model for radiopharmaceutical research, allowing for an initial proof of principle study on the biodistribution of new <sup>68</sup>Ga tracers. Following the development of methods for *ex vivo* biodistribution and metabolite studies suiting the special requirements of ostrich eggs we believe that the *in ovo* ostrich model may become a suitable model for preclinical imaging. Besides the good quality of the images the approach does not require a licence for animal testing and certified animal testing sites. Furthermore, due to the size of the ostrich egg imaging is possible on routine clinical PET/CT scanners rather than requiring special micro-PET/CT equipment, which facilitates the use of the model in clinical institutions of nuclear medicine and therefore allowing a broader application of the *in ovo* technique.

## Conclusions

We synthesized a novel type of DAZA-based <sup>68</sup>Ga tracer with potential application as a new hepatotropic imaging agent for PET/CT (patent pending). *In ovo* imaging in ostrich eggs confirmed suitably high liver uptake and low blood pool activity of [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA and [<sup>68</sup>Ga]Ga-TeOHB-DAZA. Further preclinical and clinical studies will be undertaken to evaluate the use of these tracers in hepatobiliary diagnosis and to gain further information on biodistribution and *in vivo* stability, since so far the *in ovo* ostrich imaging model cannot replace standard animal studies and comparability to reference compounds is limited. However, following further development of the model it could provide significant preclinical data outside of animal testing and thus become an alternative especially attractive to researchers in facilities lacking animal testing sites. Once established, the application of [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA and [<sup>68</sup>Ga]Ga-TeOHB-DAZA would avoid the side effects of the MRI technique and poor image quality of scintigraphic imaging methods. The reaction pathway used for ligand synthesis is considered to be unique because the reductive alkylation of bicyclic structures **1** and **2** is achieved using only sodium borohydride, possibly *via in situ* release of a carbonyl species as an alkylating agent. Further studies of the transferability of this specific reaction to azacycles of varying size and animals with differing substitution patterns will be performed.

## Experimental

### Materials and instrumentation

All reagents and solvents were purchased from commercial sources and used without further purification. DAZA was purchased from Enamine Ltd who synthesized it according to a published procedure.<sup>19</sup> 4-Methoxy-2-hydroxybenzaldehyde, cycloheptylamine, homopiperazine and Ga(III) chloride were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). 4-Ethoxy-2-hydroxybenzaldehyde was purchased from aber GmbH

(Karlsruhe, Germany). A <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator from iTHEMA LABS (Somerset West, South Africa) was used.

Unless stated otherwise, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} and <sup>71</sup>Ga NMR spectra were recorded at room temperature with either a Bruker AVANCE 400 or 600 spectrometer. Residual signals of the solvents were used as internal references. For <sup>71</sup>Ga NMR spectroscopy (122 MHz) a 1.1 M solution of <sup>nat</sup>Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O was used as reference. Mass spectra were recorded with either a Finnigan SSQ 710 (DEI, FAB) or a MAT 95 XL (ESI) spectrometer. Elemental analyses were performed as single determinations using a Vario EL III CHNS instrument (Elementar analysensystem GmbH, Hanau, Germany). For HPLC analyses, a system equipped with a binary pump (HP 1100, G1312A, SN DE720001720), UV/vis detector (HP 1100, G1315A, SNDE74602913), radio detector (EGRC Berthold, LB 509-230, SN 29530-10, Bad Wildbach, Germany), and column (Eurospher, 100-5 C18, 124 × 4 mm) was used, with the following eluent gradient: 0–2 min 99.0% A (1 mL min<sup>-1</sup>), 2–10 min 99.0% A → 0.0% A (1 mL min<sup>-1</sup>), 10–12 min 0.0% A (1 mL min<sup>-1</sup>); A: water/trifluoroacetic acid (99.9%/0.1%); B: acetonitrile/trifluoroacetic acid (99.9%/0.1%). TLC was performed using silica TLC plates with 0.1 M sodium citrate as the eluent. TLC plates were analysed with a TLC radioactivity scanner (B00003875, SN 1301065, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Germany). Imaging was performed with a PET/CT scanner (Biograph mCT40, Siemens, Erlangen, Germany) and a SPECT camera (Symbia E, Siemens, Erlangen, Germany) for clinical investigations in humans. Ostrich eggs were incubated in a Grumbach Compact MF GTFS 84 incubator (ProCon Automatic Systems GmbH & Co. KG, Mücke/Sellnrod, Germany).

### Structure determination

X-ray diffraction patterns were recorded using a Nonius Kappa CCD diffractometer with graphite-monochromated Mo K $\alpha$  radiation. Data were corrected for Lorentz and polarization effects; absorption was taken into account on a semi-empirical basis by performing multiple scans.<sup>64–66</sup> The structures were solved by a direct methods (SHELXS<sup>67</sup>) and refined by full-matrix least-squares techniques against  $F_o^2$  (SHELXL-97<sup>67</sup>). The hydrogen atoms of the O1 and O3 hydroxyl groups of compound **1**, the O1, O3, and O5 hydroxyl groups and N3 imine group of TeOHB-DAZA, and all hydrogen atoms of TMeOHB-DAZA were located by difference Fourier synthesis and refined isotropically. All other hydrogen atoms were included at calculated positions with fixed thermal parameters. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically.<sup>67</sup> Crystallographic data as well as structure solution and refinement details are summarized in Table S1.† MERCURY<sup>68</sup> was used for structure representations.

### Labelling with <sup>68</sup>Ga

The <sup>68</sup>Ga eluate from a <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator (elution with 0.6 M HCl) was purified over a cation exchange cartridge (elution with 5 M NaCl containing 0.13 M HCl). The ligands TMeOHB-DAZA and TeOHB-DAZA were labelled with <sup>68</sup>Ga by

combining an aqueous ligand stock solution (80  $\mu\text{L}$ , 1 mg mL<sup>-1</sup>, containing 30% HCl (1 M) and 30% ethanol) with <sup>68</sup>Ga solution (ca. 1600 MBq) in acetate buffer (3.4 M) at pH 3.8–3.9. After labelling for 5 min at 100 °C, the solution was loaded onto a pre-conditioned C8 cartridge. After flushing with water to remove residual <sup>68</sup>Ga, the <sup>68</sup>Ga tracer was eluted with 50% ethanol (2 mL; yield: 65–80%, decay corrected). The isolated <sup>68</sup>Ga tracers had radiochemical purities  $\geq 99.6\%$ , determined by radio TLC and radio HPLC.

#### *In vitro* stability

The pH of a solution of purified tracer containing a maximum of 20% ethanol was raised to 7.31–7.35 by adding PBS (10 mM). Part of the sample (1 mL, 250–350 MBq) was combined with human serum (1 mL; Sigma Aldrich), homogenized by briefly shaking, and incubated at 37 °C. The mixture was analysed after 30 min, 60 min, and then every hour for 4 h. TLC probes were taken directly from the sample. For HPLC analysis, an aliquot (150–200  $\mu\text{L}$ ) was passed through a reversed-phase (C8) cartridge and eluted with ethanol (200  $\mu\text{L}$ , 70%). The eluates were combined. The eluate activity of each sample and the activity remaining on the cartridge were measured with a gamma counter to determine the amounts of colloidal <sup>68</sup>Ga. The eluates were analysed by radio HPLC.

#### Preparation of ostrich eggs and radiotracer application

Ostrich eggs were kept in an incubator at 36.4–36.5 °C and 30% relative humidity. The egg position was changed twice per day. The viabilities of the embryos were checked with a light-intensive candling lamp during incubation and prior to injection. The eggs were used for imaging from day 31 of development. Candling was necessary to identify suitable vessels in the amniotic membrane. A rectangular piece of egg shell (2.5 cm  $\times$  5 cm) was removed with a rotating cutter, while ensuring that the inner shell membrane remained intact. A vitelline vein was punctured with a thin cannula, which was fixed to the eggshell with tape and locked with a stopper when not in use. Formation of blood clots was prevented by flushing with heparin (0.1 mL).

For imaging, an egg was placed on a PET/CT or SPECT scanner. Prior to PET acquisition, full-dose CT was performed for attenuation correction and to provide an anatomical reference. Without moving the egg, the appropriate radiotracer was injected (10 MBq in 0.3–0.7 mL) through the cannula using a small syringe (1 mL), immediately followed by injection of saline (0.6–1 mL, 0.9%) to rinse the tubing. Samples of the radiotracers, *i.e.* [<sup>68</sup>Ga]Ga-TMeOHB-DAZA, [<sup>68</sup>Ga]Ga-TEtOHB-DAZA, and [<sup>68</sup>Ga]Ga-chloride in PBS buffer for PET/CT, and [<sup>99m</sup>Tc]Tc-EHIDA in saline for SPECT, were used. Injection was performed at the beginning of a dynamic scan. When image acquisition was complete, the eggs were promptly put back in the incubator. Between radiotracer administrations the eggs were kept in the incubator for at least 20 h to allow for sufficient decay of radioactivity. Embryos were sacrificed by freezing on day 38 at the latest.

A detailed paper on the use of ostrich eggs for *in ovo* research in nuclear medicine is accepted for publication in the Journal of Nuclear Medicine.<sup>69</sup>

#### Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

#### Acknowledgements

We are thankful to Thomas Opfermann, PhD and Steffen Wiegand for ostrich egg preparation, image acquisition and technical support.

#### Notes and references

- 1 J. J. Vaquero and P. Kinahan, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2015, **17**, 385–414.
- 2 M. Fani, J. P. Andre and H. R. Maecke, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2008, **3**, 67–77.
- 3 D. L. Smith, W. A. P. Breeman and J. Sims-Mourtada, *Appl. Radiat. Isot.*, 2013, **76**, 14–23.
- 4 I. Velikyan, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 2015, **58**, 99–121.
- 5 F. Roesch, *Appl. Radiat. Isot.*, 2013, **76**, 24–30.
- 6 C. F. Ramogida and C. Orvig, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 4720–4739.
- 7 M. D. Bartholoma, A. S. Louie, J. F. Valliant and J. Zubieta, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2903–2920.
- 8 E. W. Price and C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 260–290.
- 9 T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman and C. Anderson, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2858–2902.
- 10 T. W. Price, J. Greenman and G. J. Stasiuk, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 15702–15724.
- 11 C. S. Cutler, H. M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai and S. S. Jurisson, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 858–883.
- 12 F. Roesch, B. P. Waldron and D. Parker, *WO 2014198478A2*, 2014.
- 13 B. A. Nock, A. Kaloudi, J. Nagel, J. P. Sinnes, F. Roesch and T. Maina, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 14584–14590.
- 14 J. Notni, J. Simecek, P. Hermann and H.-J. Wester, *Chemistry*, 2011, **17**, 14718–14722.
- 15 F. L'Eplattenier, I. Murase and A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 837–843.
- 16 F. C. Hunt, *Nuklearmedizin*, 1984, **23**, 123–125.
- 17 C. F. Ramogida, J. F. Cawthray, E. Boros, C. L. Ferreira, B. O. Patrick, M. J. Adam and C. Orvig, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 2017–2031.
- 18 E. Boros, C. L. Ferreira, J. F. Cawthray, E. W. Price, B. O. Patrick, D. W. Wester, M. J. Adam and C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15726–15733.

- 19 J. Romba, D. Kuppert, B. Morgenstern, C. Neis, S. Steinhäuser, T. Weyhermueller and K. Hegetschweiler, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, 314–328.
- 20 J. Seemann, B. P. Waldron, F. Roesch and D. Parker, *ChemMedChem*, 2015, **10**, 1019–1026.
- 21 N. Vologdin, G. A. Rolla, M. Botta and L. Tei, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 1683–1690.
- 22 B. P. Waldron, D. Parker, C. Burchardt, D. S. Yufit, M. Zimny and F. Roesch, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 579–581.
- 23 Z. Wu, Z. Zha, S. R. Choi, K. Plossl, L. Zhu and H. F. Kung, *Nucl. Med. Biol.*, 2016, **43**, 360–371.
- 24 B. E. Van Beers, C. M. Pastor and H. K. Hussain, *J. Hepatol.*, 2012, **57**, 421–429.
- 25 M. Takahashi, *Nichidai Igaku Zasshi*, 2009, **68**, 174–180.
- 26 C. Olchoway, K. Cebulski, M. Lasecki, R. Chaber, A. Olchoway, K. Kalwak and U. Zaleska-Dorobisz, *PLoS One*, 2017, **12**, e0171704.
- 27 C. Thakral, J. Alhariri and J. L. Abraham, *Contrast Media Mol. Imaging*, 2007, **2**, 199–205.
- 28 H. Lambie, A. M. Cook, A. F. Scarsbrook, J. P. A. Lodge, P. J. Robinson and F. U. Chowdhury, *Clin. Radiol.*, 2011, **66**, 1094–1105.
- 29 F. C. Hunt, *Nucl. Med. Biol.*, 1988, **15**, 659–664.
- 30 D. A. Moore, P. E. Fanwick and M. J. Welch, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 1504–1506.
- 31 C. J. Mathias, Y. Sun, M. J. Welch, M. A. Green, J. A. Thomas, K. R. Wade and A. E. Martell, *Nucl. Med. Biol.*, 1988, **15**, 69–81.
- 32 F. C. Hunt, *Appl. Radiat. Isot.*, 1988, **39**, 349–352.
- 33 M. Leonhardt, M. Keiser, S. Oswald, J. Kühn, J. Jia, M. Grube, H. Kroemer, W. Siegmund and W. Weitschies, *Drug Metab. Dispos.*, 2010, **38**, 1024–1028.
- 34 E. Boros, C. L. Ferreira, B. O. Patrick, M. J. Adam and C. Orvig, *Nucl. Med. Biol.*, 2011, **38**, 1165–1174.
- 35 J. Schuhmacher, *J. Nucl. Med.*, 1983, **24**, 593–602.
- 36 S. M. Moerlein and M. J. Welch, *J. Nucl. Med.*, 1981, **22**, 710–719.
- 37 D. J. Berry, Y. Ma, J. R. Ballinger, R. Tavares, A. Koers, K. Sunassee, T. Zhou, S. Nawaz, G. E. D. Mullen, R. C. Hider and P. J. Blower, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 7068–7070.
- 38 C. H. Taliaferro and A. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, 1984, **85**, 9–15.
- 39 J. Schuhmacher, G. Klivenyi, W. E. Hull, R. Matys, H. Hauser, H. Kalthoff, W. H. Schmiegel, W. Maier-Borst and S. Matzku, *Int. J. Radiat. Appl. Instrum., Part B*, 1992, **19**, 809–824.
- 40 D. J. Clevette and C. Orvig, *Polyhedron*, 1990, **9**, 151–161.
- 41 R. J. Motekaitis, A. E. Martell and M. J. Welch, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 1463–1467.
- 42 S. Aime, L. Calabi, C. Cavallotti, E. Gianolio, G. B. Giovenzana, P. Losi, A. Maiocchi, G. Palmisano and M. Sisti, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 7588–7590.
- 43 P. Minazzi, L. Lattuada, I. G. Menegotto and G. B. Giovenzana, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 6915–6921.
- 44 D. Parker and B. P. Waldron, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 2827–2838.
- 45 G. Gugliotta, M. Botta, G. B. Giovenzana and L. Tei, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 3442–3444.
- 46 C. Guanci, R. Pinalli, S. Aime, E. Gianolio, L. Lattuada and G. B. Giovenzana, *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, 1994–1997.
- 47 C. Guanci, G. Giovenzana, L. Lattuada, C. Platas-Iglesias and L. J. Charbonniere, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 7654–7661.
- 48 N. Kalyanam and S. G. Manjunatha, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 420–423.
- 49 D. Brogini, V. Lellek, S. Lochner, N. S. Mani, A. Maurer, D. J. Pippel and L. Young, *PCT Int. Appl.*, WO2010107897A2, 2010.
- 50 H. Yamamoto and K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 4186–4194.
- 51 C. Hureau, L. Sabater, F. Gonnet, G. Blain, J. Sainon and E. Anxolabehere-Mallart, *Inorg. Chim. Acta*, 2006, **359**, 339–345.
- 52 E. Boyd, G. S. Coumbarides, J. Eames, R. V. H. Jones, R. A. Stenson and M. J. Suggate, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 3479–3484.
- 53 Y. Zhang, L. Zheng, F. Yang, Z. Zhang, Q. Dang and X. Bai, *Tetrahedron*, 2015, **71**, 1930–1939.
- 54 Y. W. Zhang, L. Y. Zheng, F. Z. Yang, Z. Q. Zhang, Q. Dang and X. Bai, *Tetrahedron*, 2015, **71**, 1930–1939.
- 55 R. W. Alder, E. Heilbronner, E. Honegger, A. B. McEwen, R. E. Moss, E. Olefirowicz, P. A. Petillo, R. B. Sessions, G. R. Weisman, J. M. White and Z.-Z. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6580–6591.
- 56 R. Tripier, J. M. Lagrange, E. Espinosa, F. Denat and R. Guillard, *Chem. Commun.*, 2001, 2728–2729.
- 57 F. Denat, R. Tripier, F. Boschetti, E. Espinosa and R. Guillard, *ARKIVOC*, 2006, 212–233.
- 58 A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff and R. D. Shah, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 3849–3862.
- 59 V. I. Tararov, R. Kadyrov, T. H. Riermeier and A. Borner, *Adv. Synth. Catal.*, 2002, **344**, 200–208.
- 60 H. M. Seifert, K. Ramirez Trejo and E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, **138**, 10916–10924.
- 61 Evonik Degussa AG, Degussa AG40474 Duesseldorf, Germany, *Ger. Offen*, DE10133782A1, 2003.
- 62 J. P. Andre and H. R. Macke, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **97**, 315–323.
- 63 S. Haller, S. M. Ametamey, R. Schibli and C. Muller, *Nucl. Med. Biol.*, 2015, **42**, 226–233.
- 64 COLLECT, *Data Collection Software*, Nonius B.V., Netherlands, 1998.
- 65 Z. Otwinowski and W. Minor, *Methods Enzymol.*, 1997, **276**, 307–326.
- 66 SADABS, 2.10, Bruker-AXS inc., Madison, WI, U.S.A., 2002.
- 67 G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, 2008, **64**, 112–122.
- 68 C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler and J. van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, **39**, 453–457.
- 69 M. Freesmeyer, C. Kühnel, T. Opfermann, T. Niksch, S. Wiegand, R. Stolz, R. Huonker, O. W. Witte and T. Winkens, The use of ostrich eggs for in ovo research – Making preclinical imaging research affordable and available, *J. Nucl. Med.*, 2018, accepted.

## Electronic Supplementary Information

**N,1,4-Tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-DAZA: Efficient one-pot synthesis and labelling with <sup>68</sup>Ga for PET liver imaging *in ovo***Julia Greiser,<sup>a</sup> Christian Kühnel,<sup>a</sup> Helmar Görls,<sup>b</sup> Wolfgang Weigand<sup>\*b</sup> and Martin Freesmeyer<sup>\*a</sup>**Synthetic procedures****Synthesis of bicyclic amins****Synthesis of 1**

1,4-Diazepan-6-amine (65 mg, 0.57 mmol) and 4-methoxy-2-hydroxybenzaldehyde (172 mg, 1.13 mmol) were added to methanol (10 mL) and the mixture was stirred at rt for 1 h. The yellow residue was removed by filtration, washed with methanol, and dried *in vacuo* (205 mg, 0.54 mmol, 94%).

<sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.17 (s, broad), 11.85 (s, broad), 8.28 (s, 2H), 7.26–7.23 (m, 1H), 7.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 1H), 6.45–6.36 (m, 4H), 5.21 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.71–3.64 (m, 1H), 3.37–2.90 (m, 8H).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.0, 163.7, 163.5, 161.2, 158.5, 132.7, 128.0, 112.5, 106.9, 105.5, 101.8, 101.2, 87.4, 60.6, 59.1, 55.6, 55.3, 50.6.

MS (DEI): *m/z* 383.2 ([M]<sup>+</sup>, 100%).

EA (%) (for C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): C 65.46 (65.78), H 6.72 (6.57), N 11.07 (10.96).

**Synthesis of 2**

The synthesis was performed as described for 1 but with 1,4-diazepan-6-amine (30 mg, 0.26 mmol) and 4-ethoxy-2-hydroxybenzaldehyde (86 mg, 0.52 mmol). Yield: 100 mg, 0.24 mmol, 94%.

<sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.16 (s, broad), 11.84 (s, broad), 8.27 (s, 2H), 7.24–7.22 (m, 2H), 7.12–7.09 (m, 2H), 6.45–6.41 (m, 2H), 6.38–6.35 (m, 4H), 5.21 (s, 1H), 4.07–3.96 (m, 4H), 3.72–3.64 (m, 1H), 3.49–2.90 (m, 8H), 1.43–1.36 (m, 6H).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 165.0, 163.4, 163.0, 160.5, 158.5, 132.7, 128.0, 112.3, 107.4, 106.1, 102.3, 101.6, 87.4, 63.8, 63.5, 60.6, 59.1, 50.6, 15.0, 14.8.

MS (ESI positive, methanol): *m/z* 434.2 ([M + Na]<sup>+</sup>, 100%), 412.2 ([M + H]<sup>+</sup>, 45%).

EA (%) (for C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): C 66.90 (67.13), H 7.13 (7.10), N 10.26 (10.21).

**Synthesis of DAZA ligands****Synthesis of TMeOHB-DAZA**

NaBH<sub>4</sub> (71 mg, 1.89 mmol) was added to a suspension of 1 (200 mg, 0.52 mmol) in a chloroform/methanol mixture (1/1, 15 mL). The mixture was stirred for 1 h at rt. Solvents were removed under reduced pressure and the residue was suspended in methanol. The suspension was filtered and the colourless residue was washed with methanol and dried *in vacuo* (163 mg, 0.31 mmol, 60%).

<sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, 2H), 6.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.4 Hz, 1H), 6.41–6.35 (m, 5H), 6.27 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1H), 3.82 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 13.4 Hz, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.74 (s, 3H), 3.67 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 13.4 Hz, 2H), 3.37 (s, 2H), 2.98–2.72 (m, 9H).

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 161.1, 160.6, 159.2, 158.7, 129.7, 129.2, 114.4, 114.0, 105.9, 105.2, 102.1, 102.0, 62.5, 58.3, 57.9, 55.4, 54.7, 51.0, 49.4.

MS (ESI positive, methanol): *m/z* 546.2 ([M + Na]<sup>+</sup>, 45%), 524.3 ([M + H]<sup>+</sup>, 100%).



EA (%) (for  $C_{29}H_{37}N_3O_6 \cdot 0.5 \text{ MeOH}$ ): C 65.58 (65.66), H 7.07 (7.28), N 7.89 (7.79).

### Synthesis of TETOHB-DAZA

$\text{NaBH}_4$  (22 mg, 0.58 mmol) was added to a stirred suspension of **2** (120 mg, 0.29 mmol) in methanol. The yellow suspension turned to a colourless solution within 10 min. The solution was stirred for 1 h at rt and then left to stand overnight. A colourless residue was precipitated. The residue was removed by filtration, washed with methanol, and dried *in vacuo* (85 mg, 0.15 mmol, 52%).

$^1\text{H NMR}$  (400.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.86 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1 \text{ Hz}$ , 2H), 6.51 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3 \text{ Hz}$ , 1H), 6.40–6.33 (m, 5H), 6.25 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3 \text{ Hz}$ ,  $^2J_{\text{H,H}} = 2.5 \text{ Hz}$ , 1H), 3.96 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$ , 6H), 3.82 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 13.4 \text{ Hz}$ , 2H), 3.66 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 13.4 \text{ Hz}$ , 2H), 3.35 (s, 2H), 2.98–2.71 (m, 9H), 1.41–1.36 (m, 6H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  160.4, 159.9, 159.2, 158.6, 129.7, 129.2, 114.3, 113.9, 106.4, 105.6, 102.6, 102.6, 63.5, 63.4, 62.5, 57.9, 54.6, 49.4, 15.0.

MS (ESI positive, methanol):  $m/z$  588.4 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 100%), 566.4 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 62%), 438.3 ( $[\text{M} - (\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OOC}_2\text{H}_5) + \text{Na}]^+$ , 25%), 416.3 ( $[\text{M} - (\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OOC}_2\text{H}_5) + \text{H}]^+$ , 46%).

EA (%) (for  $C_{32}H_{43}N_3O_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): C 65.49 (65.84), H 7.43 (7.77), N 7.27 (7.20).

### Synthesis of **3a** and **4a** for mechanistic studies

#### Synthesis of **3a**

Cycloheptylamine (41 mg, 0.36 mmol) and 4-ethoxy-2-hydroxybenzaldehyde (60 mg, 0.36 mmol) were combined in methanol and stirred at rt overnight. Removal of the solvent *in vacuo* gave **3a** as a yellow solid in quantitative yield.

$^1\text{H NMR}$  (400.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.26 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.04 ( $^3J_{\text{H,H}} = 8.5 \text{ Hz}$ , 1H), 6.36–6.31 (m, 2H), 4.03 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$ , 2H), 3.44–3.39 (m, 1H), 1.91–1.53 (m, 12H), 1.40 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$ , 3H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167.8, 163.4, 160.7, 132.6, 112.1, 106.8, 102.1, 67.9, 63.6, 36.4, 28.4, 24.2, 14.8.

MS (ESI positive, methanol):  $m/z$  284.4 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 100%), 262.3 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 85%).

#### Synthesis of **4a**

Homopiperazine (30 mg, 0.31 mmol) and 4-ethoxy-2-hydroxybenzaldehyde (51 mg, 0.31 mmol) were combined in dichloromethane. Å3 molecular sieves were added and the mixture was stirred at rt overnight. The mixture was filtered and removal of the solvent from the filtrate gave **4a** as a colourless solid (60 mg, 0.24 mmol, 78%).

$^1\text{H NMR}$  (400.1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.42 (s, 1H), 7.20–7.17 (m, 1H), 6.34–6.32 (m, 2H), 5.12 (s, 1H), 3.97 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$ , 2H), 3.35–3.27 (m, 2H), 3.05–2.82 (m, 7H), 2.06–1.92 (m, 1H), 1.37 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.0 \text{ Hz}$ , 3H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  167.3, 158.8, 127.7, 113.3, 105.8, 102.2, 88.1, 63.4, 54.4, 50.0, 18.7, 15.0.

MS (DEI):  $m/z$  248.2 ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

### Synthesis of Ga(III) complexes

#### Synthesis of Ga-TMeOHB-DAZA

An aqueous solution of Ga(III) chloride (0.11 M; 0.1 mmol, 0.87 mL) was added to a solution of TMeOHB-DAZA (50 mg, 0.10 mmol) in methanol/chloroform (1/1, 10 mL). Aqueous ammonia (20%) was added dropwise to raise the pH of the solution to 3.8. The solution was stirred for 2 h at rt, and then the solvent was removed under reduced pressure. The residue was redissolved in ethanol and purified by reversed-phase chromatography (RP-C18- silica, water  $\rightarrow$  ethanol) to yield the Ga(III) complex as a colourless solid (20 mg, 0.03 mmol, 35%).

$^1\text{H NMR}$  (400.1 MHz, 25°C,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  7.51–7.26 (m, 1H), 6.95–6.88 (m, 2H, three doublets visible with  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3 \text{ Hz}$ , 8.3 Hz, 8.0 Hz), 6.62–6.22 (m, 6H), 4.38–4.17 (m, 3H), 3.80–3.44 (m, 13H, underlying doublet with  $^2J_{\text{H,H}} = 12.8 \text{ Hz}$ ), 3.22–2.78 (m, 8H).

$^1\text{H NMR}$  (300.1 MHz, 25°C,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$  6.86 (s, 0.4H), 6.85 (s, 0.1H), 6.83 (s, 0.5H), 6.79 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.2 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{H,H}} = 3.3 \text{ Hz}$ , 1.8H), 6.54 (m, 1.0H), 6.44 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.4 \text{ Hz}$ , 1.0H), 6.30 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5 \text{ Hz}$ , 2.5Hz, 0.5H), 6.27 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5 \text{ Hz}$ , 2.5Hz, 0.9H),

6.25 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 2.5Hz, 0.4H), 6.3 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 2.5Hz, 0.5H), 6.20 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 2.5Hz, 0.4H), 4.61 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.5$  Hz, 1.0H), 4.21 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.5$  Hz, 1.0H), 4.06 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 12.1$  Hz, 1.0H), 3.96 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 13.1$  Hz, 1.0H), 3.77 (s, 2.8H), 3.74 (s, 3.0H), 3.70-3.56 (m, 3.2H), 3.54 (s, 2.7H), 3.38-3.35 (m, 1.2H), 3.06-2.75 (m, 6.1H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100.6 MHz, 25°C, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  165.8, 164.3, 163.6, 163.1, 162.7, 132.6, 132.5, 131.8, 116.4, 115.1, 106.9, 106.6, 106.4, 105.6, 104.7, 103.4, 62.5, 60.8, 59.9, 55.8, 55.6, 55.5, 55.4, 47.0.

MS (ESI positive, methanol):  $m/z$  614.1 ( $[\text{M}^{71}\text{Ga}] + \text{Na}^+$ , 75%), 612.1 ( $[\text{M}^{69}\text{Ga}] + \text{Na}^+$ , 100%), 592.2 ( $[\text{M}^{71}\text{Ga}] + \text{H}^+$ , 55%), 590.2 ( $[\text{M}^{69}\text{Ga}] + \text{H}^+$ , 75%).

EA (%) (for  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{GaN}_3\text{O}_6 \cdot \text{MeOH}$ ): C 58.09 (57.90), H 6.08 (6.15), N 6.42 (6.75).

### Synthesis of Ga-TetOHb-DAZA

An aqueous solution of Ga(III) chloride (0.11 M, 0.09 mmol, 0.8 mL) was added to a solution of TetOHb-DAZA (50 mg, 0.09 mmol) in hot methanol (35 mL). Aqueous ammonia (20%) was added dropwise to raise the pH of the solution to 3.8. The solution was stirred for 2 h at rt and then the solvent was removed under reduced pressure. The residue was washed with water to yield the Ga(III) complex as a colourless solid (37 mg, 0.06 mmol, 67%).

$^1\text{H}$  NMR (500.3 MHz, 25°C, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.05 (s, 0.2H), 9.58 (s, 0.6H), 7.34-7.09 (m, 0.5), 6.92-6.90 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$  Hz, 1H), 6.87-6.82 (m, 0.9H), 6.78 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$  Hz, 0.3H), 6.47 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.1$  Hz, 0.2H), 6.42 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 0.2H), 6.36 (s, 0.4H), 6.35 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$  Hz, 0.5H), 6.25 (s, 0.8), 6.22 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 0.2H), 6.20-6.17 (m, 2.7H), 6.09 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 0.4H), 4.36 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 14.2$  Hz, 0.2H), 4.20 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 13.0$  Hz, 0.8H), 4.04-3.74 (m, 9.8H), 3.33-3.16 (m, 2.7H), 3.08-2.97 (m, 1.7H, underlying doublet visible with  $^2J_{\text{H,H}} = 14.1$  Hz), 2.94-2.59 (m, 5.4H), 1.32-1.15 (m, 9.1H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100.6 MHz, 25°C, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.1, 165.0, 163.6, 160.6, 160.4, 159.9, 159.4, 157.4, 156.3, 133.7, 131.4, 130.7, 128.8, 116.6, 114.8, 114.1, 113.7, 111.6, 106.7, 106.0, 105.4, 105.1, 104.8, 104.5, 103.4, 101.9, 101.5, 62.8, 62.6, 62.3, 60.8, 59.5, 58.9, 55.7, 55.1, 54.2, 49.3, 14.8, 14.6.

MS (ESI positive, methanol):  $m/z$  656.3 ( $[\text{M}^{71}\text{Ga}] + \text{Na}^+$ , 75%), 654.3 ( $[\text{M}^{69}\text{Ga}] + \text{Na}^+$ , 100%), 634.3 ( $[\text{M}^{71}\text{Ga}] + \text{H}^+$ , 50%), 632.3 ( $[\text{M}^{69}\text{Ga}] + \text{H}^+$ , 65%).

EA (%) (for  $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{GaN}_3\text{O}_6 \cdot 2.75\text{H}_2\text{O}$ ): C 56.12 (56.43), H 6.19 (6.73), N 5.78 (6.17).

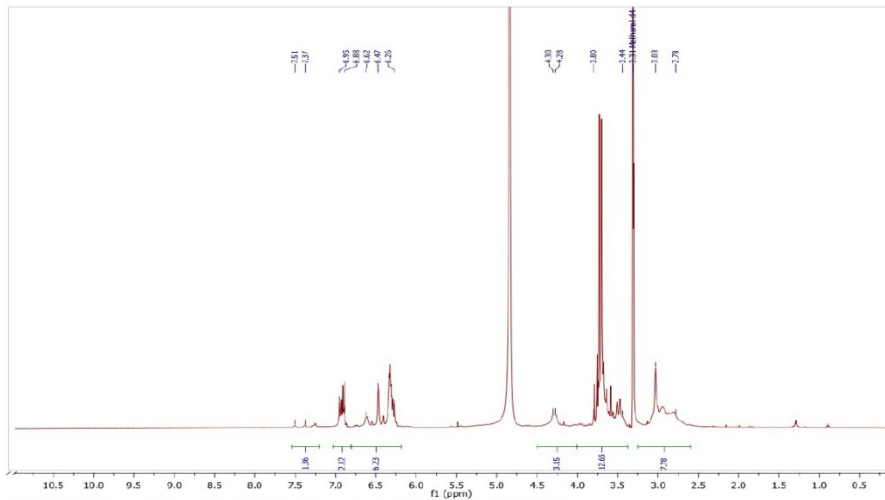


**Additional Figures**

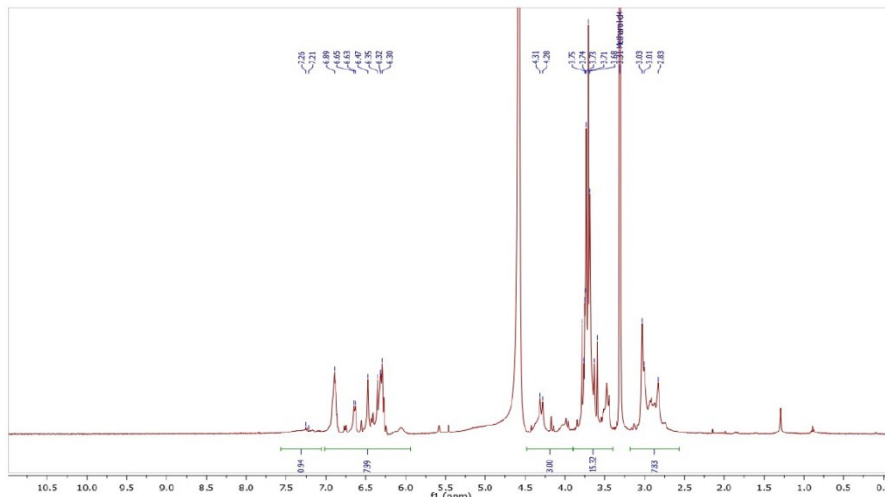
**Fig 4** Exemplary dynamic 90 min PET scan of [<sup>68</sup>Ga]Ga-TetOHB-DAZA administered to an incubated ostrich egg at breeding day 35. The dynamic scan visualizes tracer injection and influx via the vitelline vein (1min) followed by blood circulation (app. 1-5 min) and rapid liver enhancement starting at ca. 5 min post injection. Hepatobiliary excretion into the bowel began about 30 min post injection. For anatomical reference CT images of the skeletal and vessel structure as well as the egg shell are shown.

Fig 4 is provided as a separate mp4 file.

**NMR spectra of Ga-TMeOHB-DAZA**



**Fig. S1** <sup>1</sup>H NMR spectrum of Ga-TMeOHB-DAZA in MeOH-d<sub>4</sub> at 25°C (400 MHz).



**Fig. S2** <sup>1</sup>H NMR spectrum of Ga-TMeOHB-DAZA in MeOH-d<sub>4</sub> at 50°C (400 MHz).

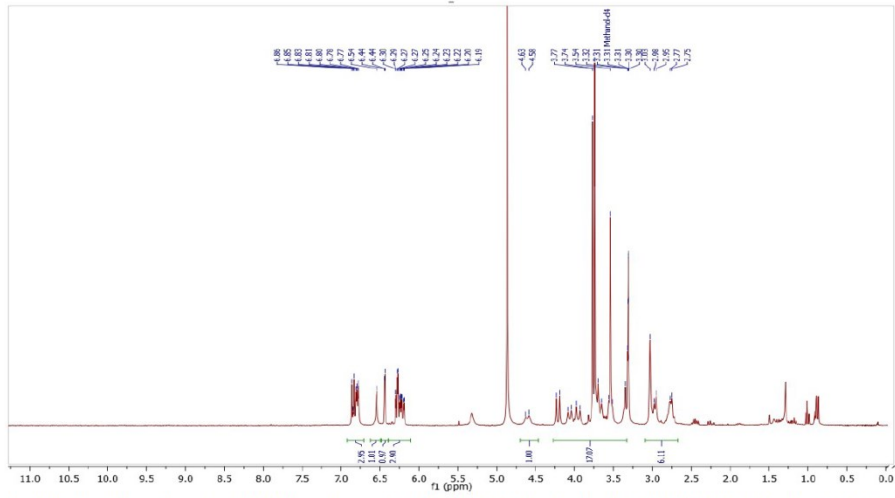


Fig. S3 Particularly well resolved  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Ga-TMeOHb-DAZA in  $\text{MeOH-d}_4$  at  $25^\circ\text{C}$  (300 MHz). Signals at  $\delta$  1.29-0.86 likely stem from grease.

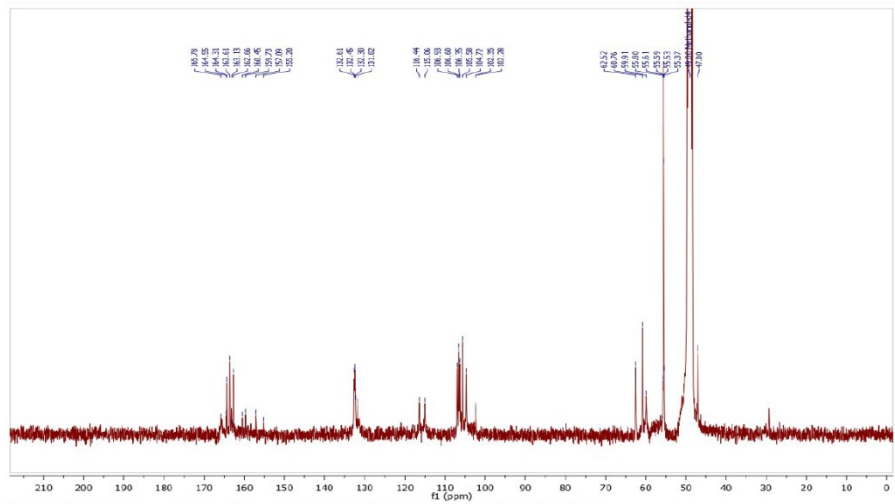


Fig. S4  $^{13}\text{C}$ ( $^1\text{H}$ ) NMR spectrum of Ga-TMeOHb-DAZA in  $\text{MeOH-d}_4$  at  $25^\circ\text{C}$  (100 MHz).

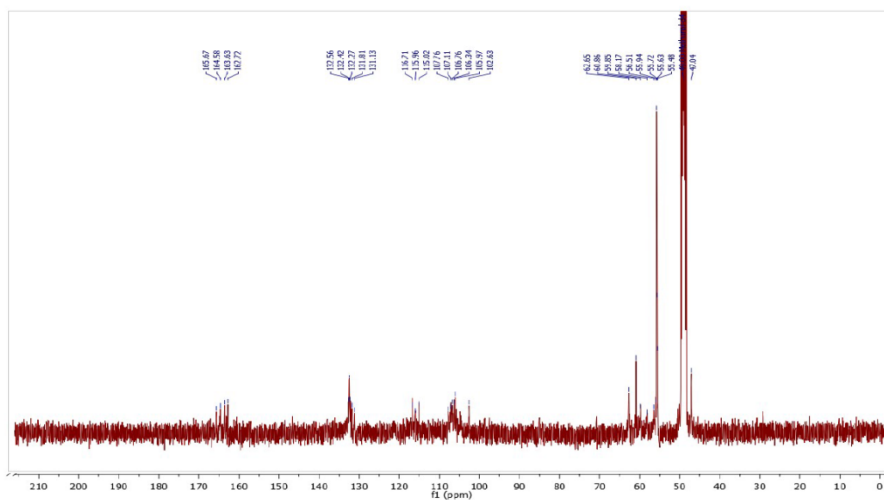


Fig. S4  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectrum of Ga-TMeOHB-DAZA in  $\text{MeOH-d}_4$  at  $50^\circ\text{C}$  (100 MHz).

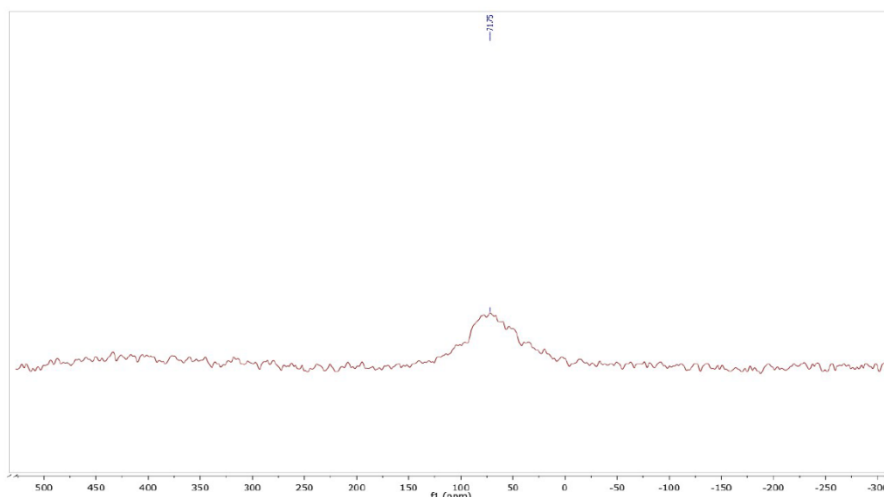


Fig. S5  $^{71}\text{Ga}$  NMR spectrum of Ga-TMeOHB-DAZA in  $\text{MeOH-d}_4$  at  $25^\circ\text{C}$  (122 MHz). Number of Scans: 20480.



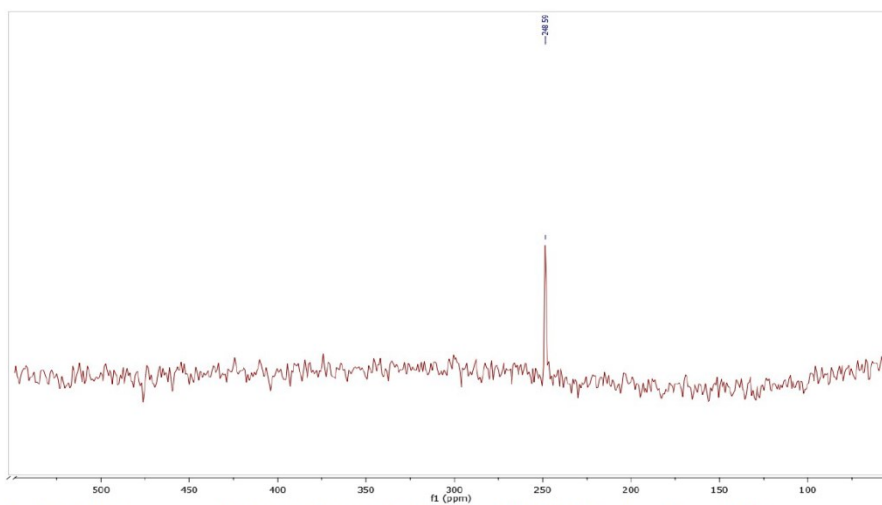


Fig. S8  $^{71}\text{Ga}$  NMR spectrum of Ga-TMeOHB-DAZA in  $\text{DMSO-d}_6$  at  $25^\circ\text{C}$  (122 MHz). Number of Scans: 20480.

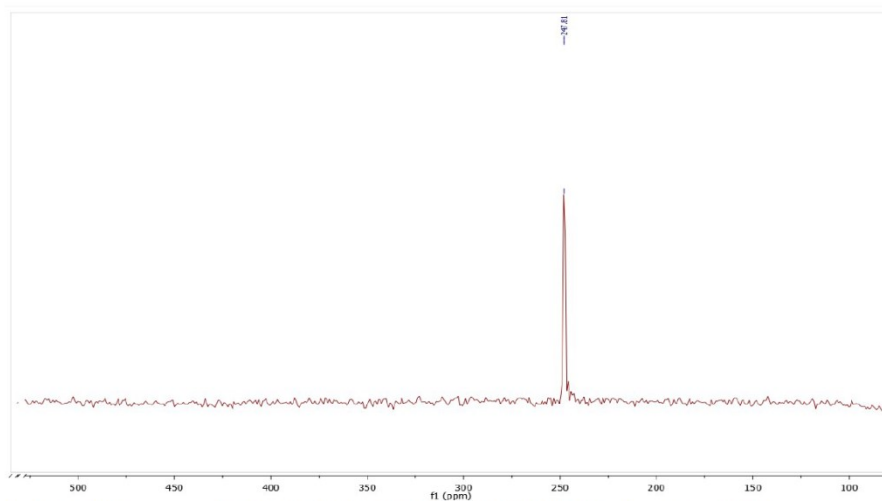


Fig. S9  $^{71}\text{Ga}$  NMR spectrum of Ga-TMeOHB-DAZA in  $\text{DMSO-d}_6$  at  $50^\circ\text{C}$  (122 MHz). Number of Scans: 20480.





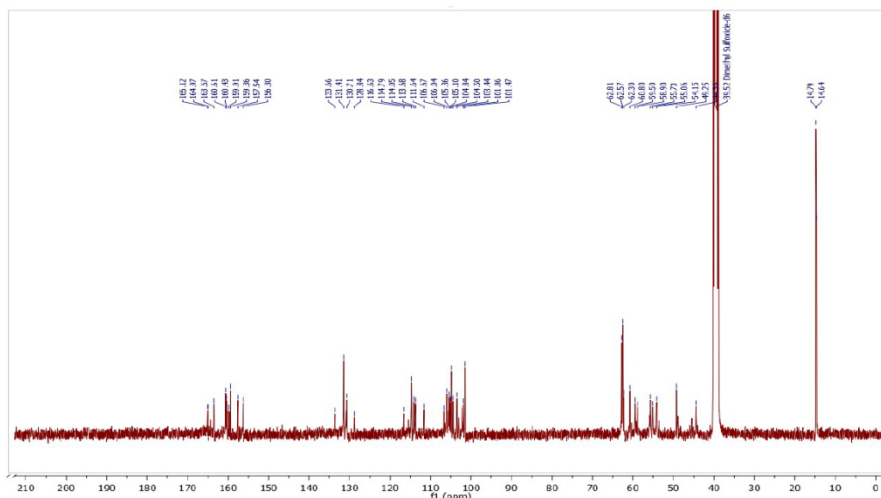


Fig. S12  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectrum of Ga-TetOHb-DAZA in DMSO- $d_6$  at 25°C (100 MHz).

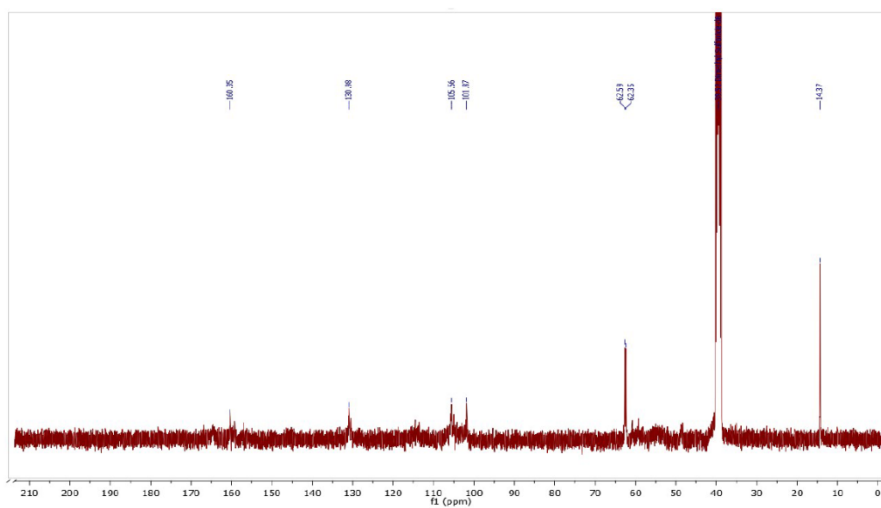


Fig. S13  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR spectrum of Ga-TetOHb-DAZA in DMSO- $d_6$  at 70°C (100 MHz).

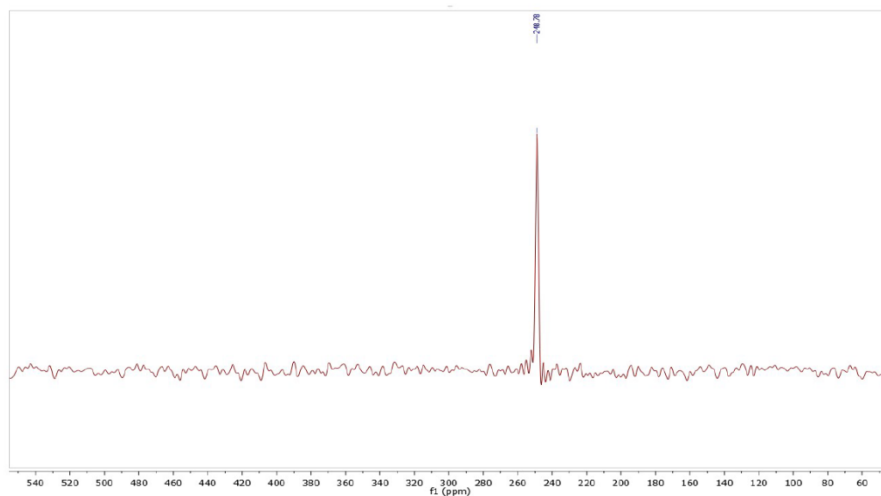


Fig. S14  $^{71}\text{Ga}$  NMR spectrum of Ga-TEtOHb-DAZA in  $\text{DMSO-d}_6$  at  $25^\circ\text{C}$  (122 MHz). Number of Scans: 20480.

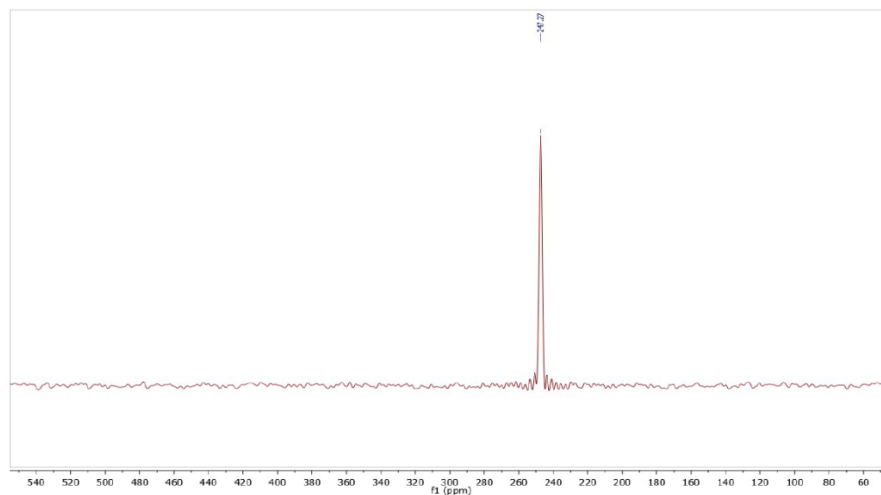


Fig. S15  $^{71}\text{Ga}$  NMR spectrum of Ga-TEtOHb-DAZA in  $\text{DMSO-d}_6$  at  $70^\circ\text{C}$  (122 MHz). Number of Scans: 18461.

Examples of mass spectra (ESI positive, methanol/chloroform) from mechanistic studies (Table 1)

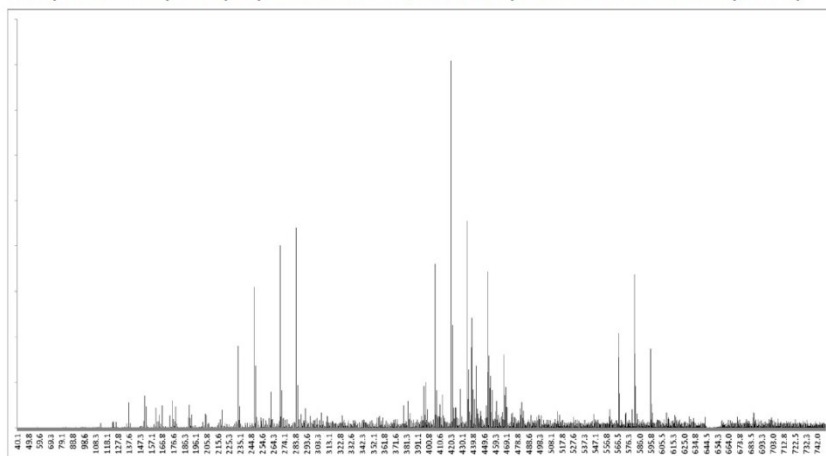


Fig. S16 Mass spectrum of Aii. Reaction Conditions: **1** (1 eq.) and 4-ethoxybenzaldehyde (1 eq.) in methanol/chloroform (1/1), rt, two weeks.

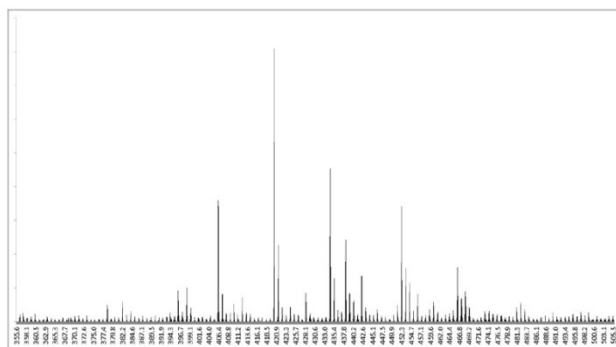


Fig. S17 Signal set for bicyclic structures (**1**) in mass spectrum of Aii:  $m/z$  406.2 ( $[M + Na]^+$ , two R = Me, **1**), 420.2 ( $[M + Na]^+$ , one R = Me, one R = Et), 434.2 ( $[M + Na]^+$ , two R = Et, **2**), 438.3 ( $[M + Na + MeOH]^+$ , two R = Me, **1**), 452.3 ( $[M + Na + MeOH]^+$ , one R = Me, one R = Et), 466.3 ( $[M + Na + MeOH]^+$ , two R = Et, **2**).

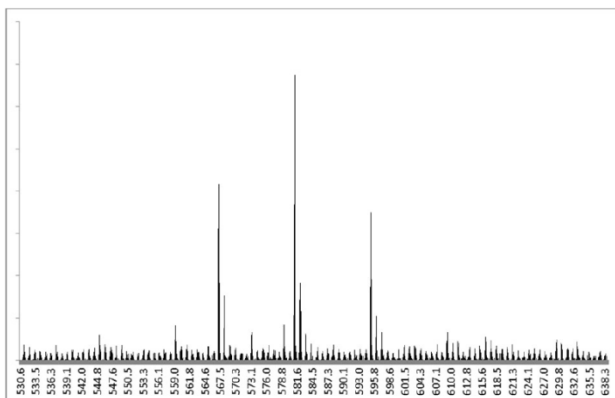


Fig. S18 Signal set for hemiaminals (III) in mass spectrum of Aii:  $m/z$  567.2 ( $[M^+]$ , two R = Me, one R = Et), 581.1 ( $[M^+]$ , one R = Me, two R = Et), 595.2 ( $[M^+]$ , all R = Et).

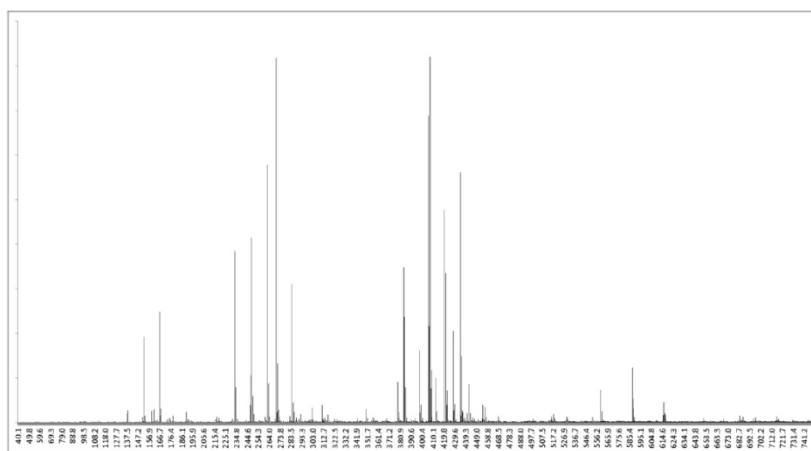


Fig. S19 Mass spectrum of Bi. Reaction Conditions: **1** (1 eq.) and **3a** (1 eq.) in methanol/chloroform (1/1), rt, 24h.

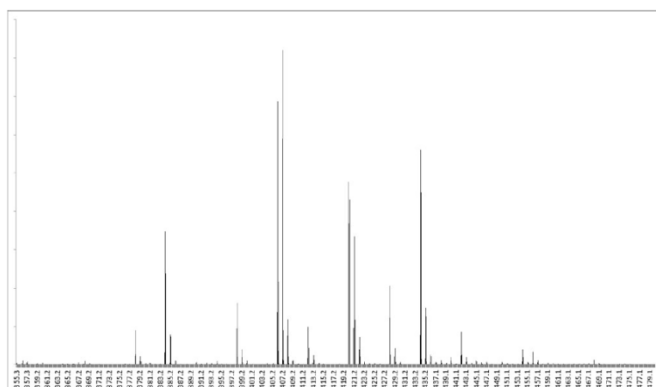


Fig. S20 Signal set for bicyclic structures (**1**) in mass spectrum of Bi:  $m/z$  384.2 ( $[M + H]^+$ , two R = Me, **1**), 398.2 ( $[M + H]^+$ , one R = Me, one R = Et), 406.2 ( $[M + Na]^+$ , two R = Me, **1**), 412.3 ( $[M + H]^+$ , two R = Et, **2**), 420.2 ( $[M + Na]^+$ , one R = Me, one R = Et), 434.2 ( $[M + Na]^+$ , two R = Et, **2**).

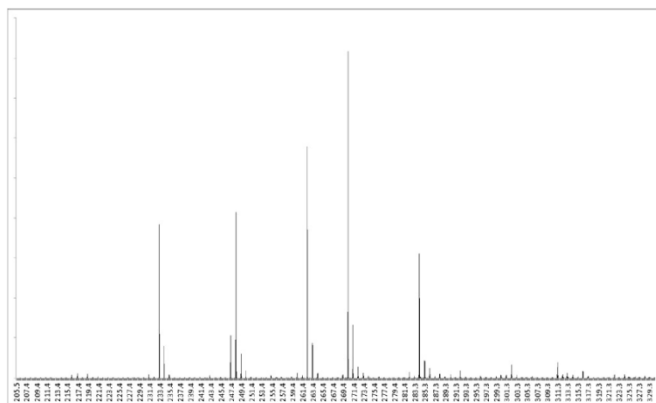


Fig. S21 Signal set for starting material (3a) and 3b in mass spectrum of Bi:  $m/z$  248.2 ( $[M + H]^+$ , 3b), 262.2 ( $[M + H]^+$ , 3a), 270.2 ( $[M + Na]^+$ , 3b), 284.2 ( $[M + Na]^+$ , 3a).



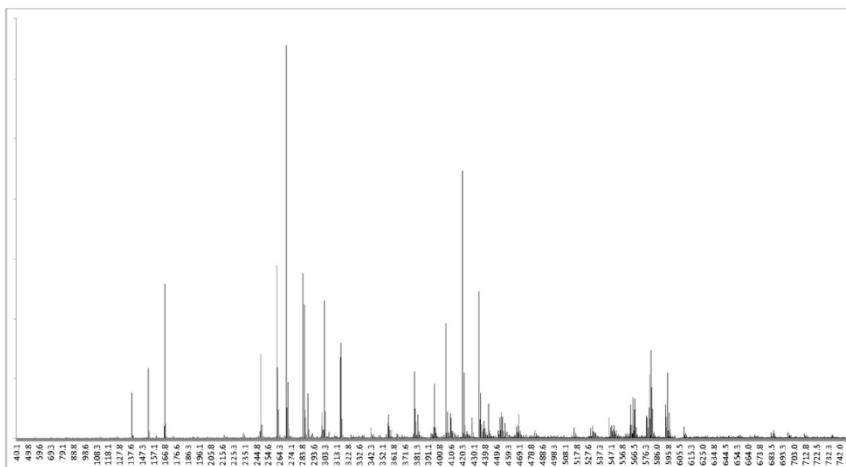


Fig. S22 Mass spectrum of Bii. Reaction Conditions: **1** (1 eq.) and **3a** (1 eq.) in methanol/chloroform (1/1), rt, two weeks.

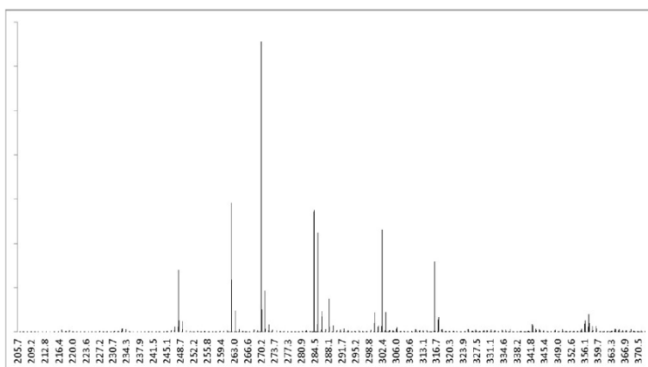


Fig. S23 Signal set for starting material (**3a**) and **3b** in mass spectrum of Bii:  $m/z$  248.2 ( $[M + H]^+$ , **3b**), 262.2 ( $[M + H]^+$ , **3a**), 270.2 ( $[M + Na]^+$ , **3b**), 284.2 ( $[M + Na]^+$ , **3a**).

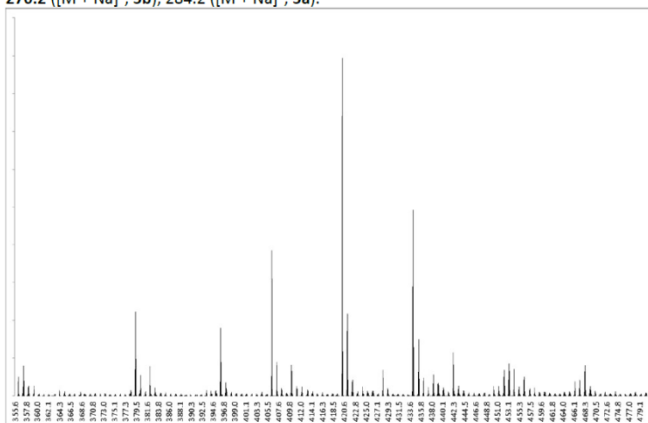


Fig. S24 Signal set for bicyclic structures (**I**) in mass spectrum of Bii:  $m/z$  406.2 ( $[M + Na]^+$ , two R = Me, **1**), 420.2 ( $[M + Na]^+$ , one R = Me, one R = Et), 434.2 ( $[M + Na]^+$ , two R = Et, **2**).

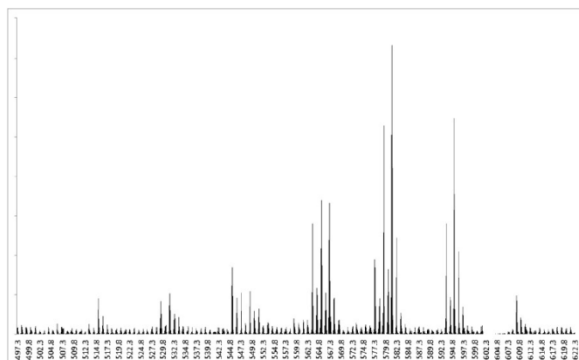


Fig. S25 Signal set for hemiaminals (III) in mass spectrum of Bii:  $m/z$  567.2 ( $[M]^+$ , two R = Me, one R = Et), 581.2 ( $[M]^+$ , one R = Me, two R = Et), 595.2 ( $[M]^+$ , all R = Et).

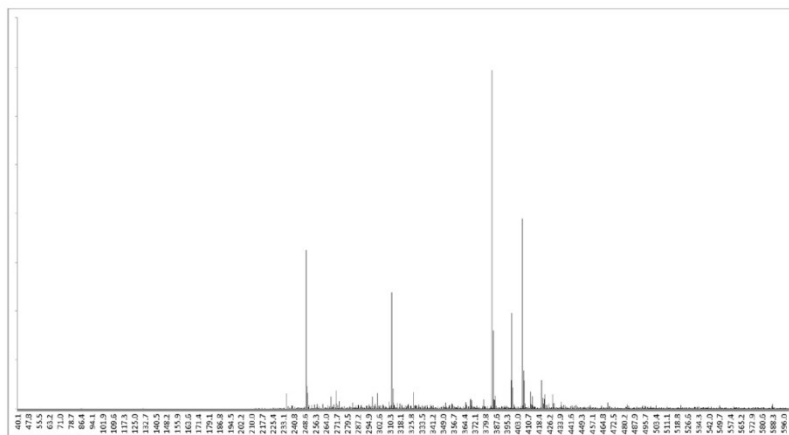


Fig. S26 Full mass spectrum of Cii. Reaction Conditions: **1** (1 eq.) and **4a** (1 eq.) in methanol/chloroform (1/1), rt, two weeks.

Signal set for starting material (**4a**) and **4b** in mass spectrum of Cii:  $m/z$  235.2 ( $[M + H]^+$ , **4b**), 249.2 ( $[M + H]^+$ , **4a**), 271.2 ( $[M + Na]^+$ , **4a**).

Signal set for bicyclic structures (**1**) in mass spectrum of Cii:  $m/z$  = 384.2 ( $[M + H]^+$ , two R = Me, **1**), 398.2 ( $[M + H]^+$ , one R = Me, one R = Et), 406.2 ( $[M + Na]^+$ , two R = Me, **1**), 420.2 ( $[M + Na]^+$ , one R = Me, one R = Et).

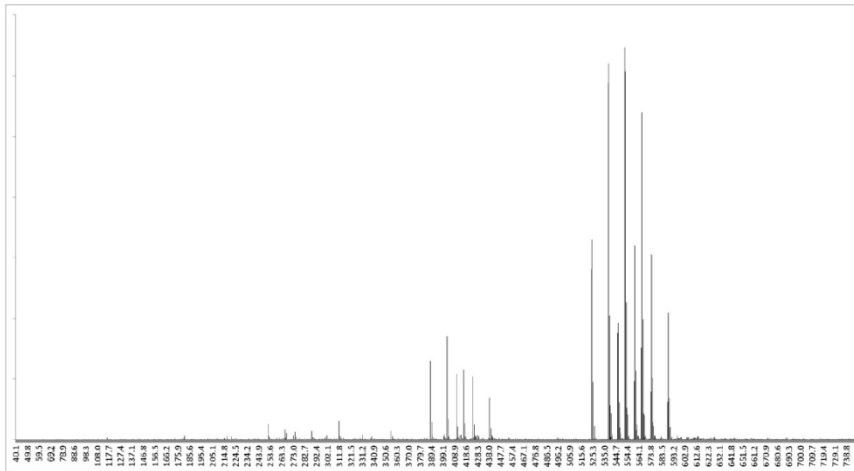


Fig. S27 Mass spectrum of Diii. Reaction Conditions: **1** (1 eq.) and **2** (1 eq.) with  $\text{NaBH}_4$  (2 eq.) in methanol/chloroform (1/1), rt, 24h.

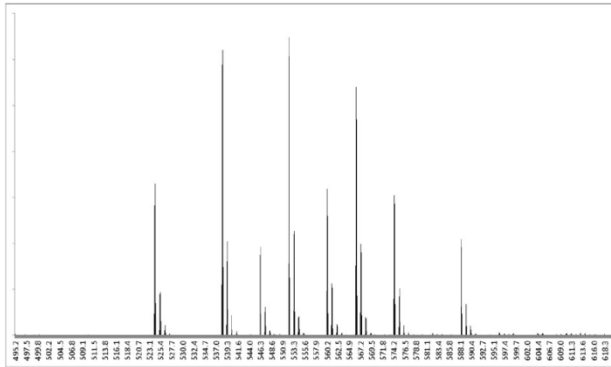


Fig. S28 Signal set for trialkylated DAZA (IV) in mass spectrum of Diii:  $m/z$  524.2 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , three R = Me, TMeOHB-DAZA), 538.2, ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , two R = Me, one R = Et), 546.2 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , three R = Me, TMeOHB-DAZA), 552.3 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , one R = Me, two R = Et), 560.2 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , two R = Me, one R = Et), 566.3 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , three R = Et, TEtOHB-DAZA), 574.2 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , one R = Me, two R=Et), 588.3 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , three R = Et, TEtOHB-DAZA).

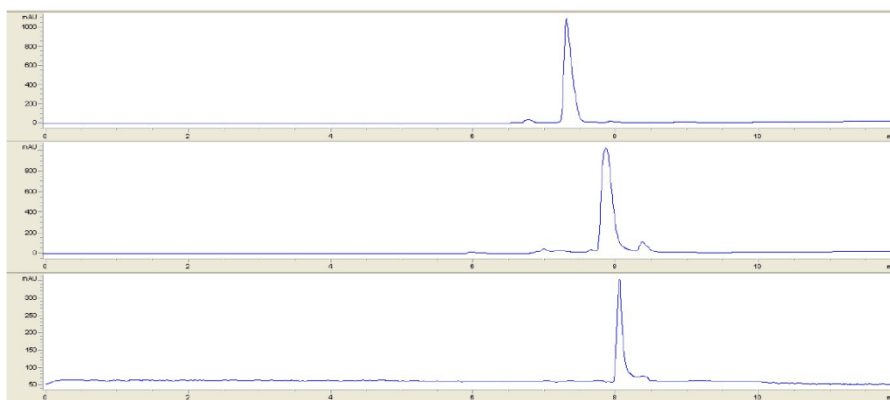
Radiolabelling and stability determination of  $^{68}\text{Ga}$ Ga-species

Fig. S29 HPLC chromatograms of ligand TMeOHB-DAZA (top, UV-vis channel 254 nm), cold Ga-TMeOHB-DAZA (middle, UV-vis channel 254 nm) and  $^{68}\text{Ga}$ Ga-TMeOHB-DAZA (bottom, radioactive channel). The slight shift between the retention time of Ga-TMeOHB-DAZA and  $^{68}\text{Ga}$ Ga-TMeOHB-DAZA is due to the UV-vis detector and the radioactive detector being connected in series.

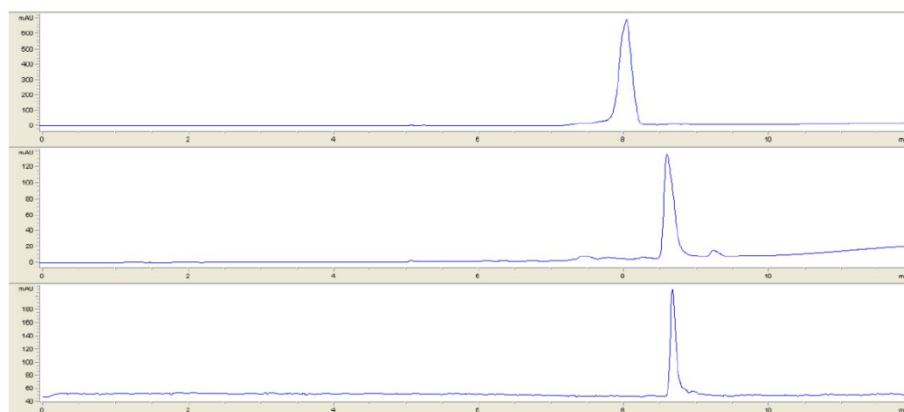
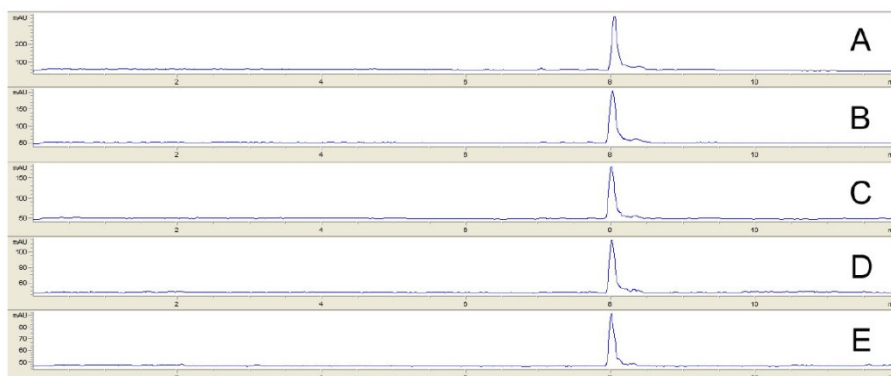
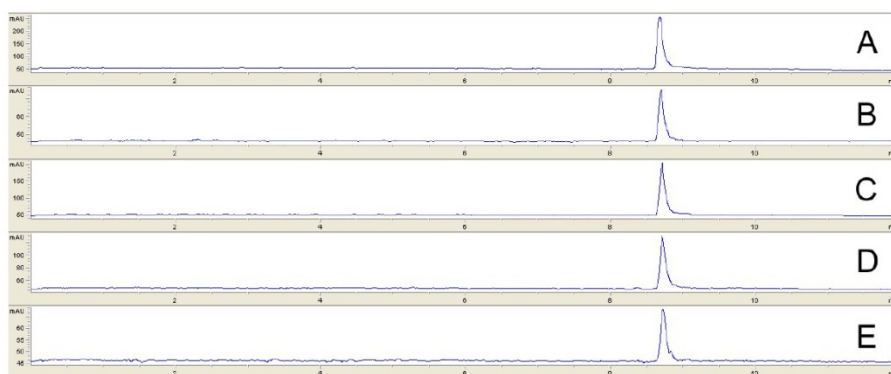


Fig. S30 HPLC chromatograms of ligand TEOHB-DAZA (top, UV-vis channel 254 nm), cold Ga-TEtOHB-DAZA (middle, UV-vis channel 254 nm) and  $^{68}\text{Ga}$ Ga-TEtOHB-DAZA (bottom, radioactive channel). The slight shift between the retention time of Ga-TEtOHB-DAZA and  $^{68}\text{Ga}$ Ga-TEtOHB-DAZA is due to the UV-vis detector and the radioactive detector being connected in series.



**Fig. S31** Radio HPLC chromatograms of aliquots of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-TMeOHB-DAZA}$  in PBS buffered human serum (pH 7.4) incubated at 37°C. Samples were taken before incubating (A) and following incubation for 1h (B), 2h (C), 3h (D) and 4h (E), respectively. Prior to HPLC analysis aliquots were passed through a C18 cartridge to remove colloids.



**Fig. S32** Radio HPLC chromatograms of aliquots of  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-TetOHB-DAZA}$  in PBS buffered human serum (pH 7.4) incubated at 37°C. Samples were taken before incubating (A) and following incubation for 1h (B), 2h (C), 3h (D) and 4h (E), respectively. Prior to HPLC analysis aliquots were passed through a C18 cartridge to remove colloids.

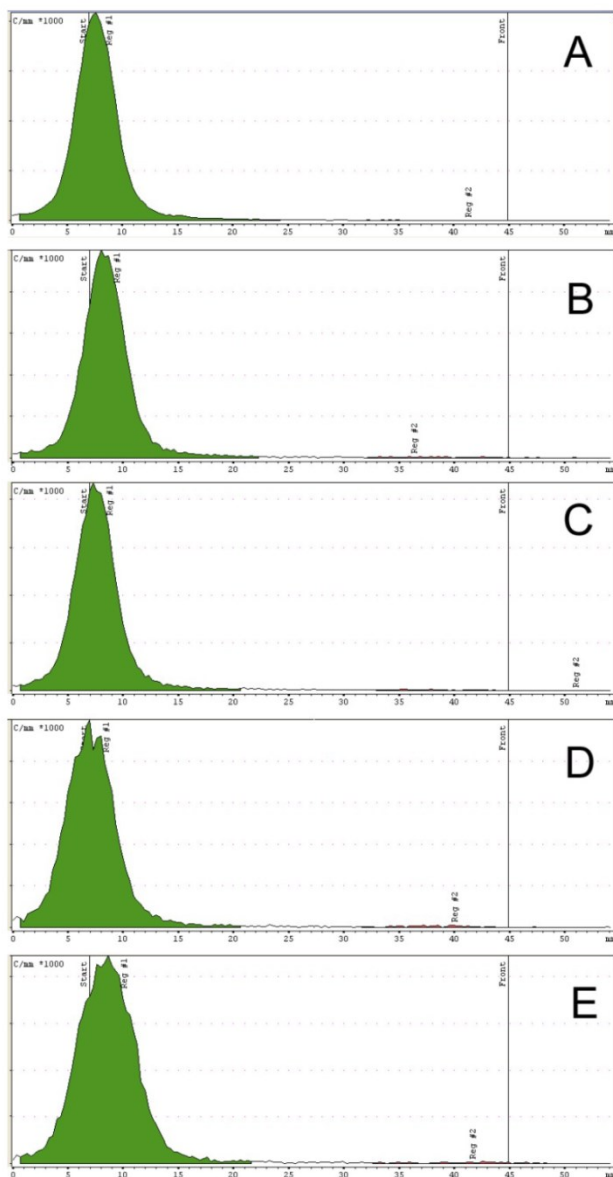


Fig. S33 Radio TLC chromatograms (silica coated alumina plates, 0.1 M sodium citrate) of samples of  $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-TMeOHB-DAZA in PBS buffered human serum (pH 7.4) incubated at 37°C. Aliquots were taken before incubating (A) and following incubation after 1h (B), 2h (C), 3h (D) and 4h (E).



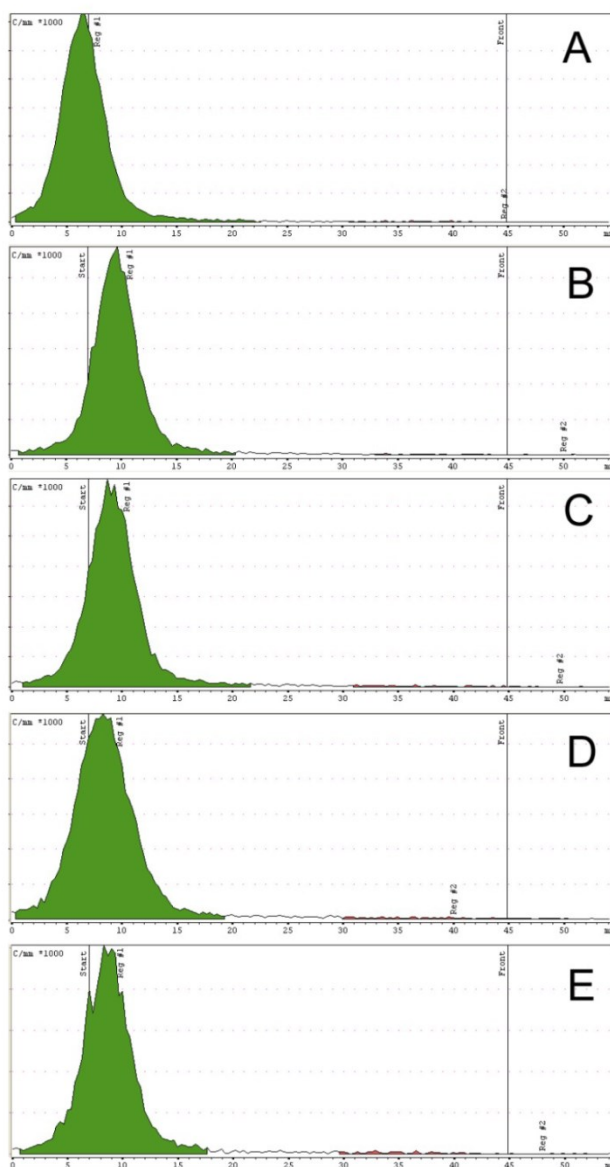


Fig. S34 Radio TLC chromatograms (silica coated alumina plates, 0.1 M sodium citrate) of samples of  $[^{66}\text{Ga}]\text{Ga-TetOHB-DAZA}$  in PBS buffered human serum (pH 7.4) incubated at  $37^\circ\text{C}$ . Aliquots were taken before incubating (A) and following incubation after 1h (B), 2h (C), 3h (D) and 4h (E).

## 5 Publikationen

**Table S1** Crystallographic data and refinement details for X-ray structure determination of **1**, TMeOHB-DAZA, and TEtOHB-DAZA

Compound	<b>1</b>	TMeOHB-DAZA	TEtOHB-DAZA
Formula	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
Fw (g mol <sup>-1</sup> )	383.44	523.62	565.69
T (°C)	-140(2)	-140(2)	-140(2)
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Triclinic
Space group	P2 <sub>1</sub> /n	P2 <sub>1</sub> /c	Pī
a (Å)	11.6451(6)	14.0088(5)	7.2228(2)
b (Å)	15.7066(7)	5.7639(2)	11.9597(3)
c (Å)	11.7436(6)	33.2059(14)	17.8857(4)
α (°)	90	90	77.175(2)
β (°)	117.744(2)	98.854(2)	87.679(2)
γ (°)	90	90	79.603(1)
V (Å <sup>3</sup> )	1901.02(16)	2649.27(17)	1481.73(6)
Z	4	4	2
ρ (g cm <sup>-3</sup> )	1.340	1.313	1.268
μ (cm <sup>-1</sup> )	0.94	0.92	0.88
Measured data	12 803	24 731	9072
Data with I > 2σ(I)	2805	4444	5403
Unique data (R <sub>int</sub> )	4248/0.1051	6023/0.0509	6573/0.0308
wR <sub>2</sub> (all data, on F <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	0.1607	0.1836	0.1338
R <sub>1</sub> (I > 2σ(I)) <sup>a</sup>	0.0846	0.0805	0.0660
S <sup>b</sup>	1.186	1.056	1.130
Res. dens. (e Å <sup>-3</sup> )	0.333/-0.259	0.732/-0.373	0.303/-0.251
Absorption method	Multiscan	Multiscan	Multiscan
Absorpt. corr. T <sub>min</sub> /max	0.6223/0.7456	0.6511/0.7456	0.4405/0.7456
CCDC No.	1820196	1820197	1820198

<sup>a</sup>Definition of R indices:  $R_1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$ ;  $wR_2 = \frac{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{\sum [w(F_o^2)^2]}^{1/2}$  with  $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (aP)^2 + bP$ ;  $P = [2F_c^2 + \text{Max}(F_o^2)]/3$ .  
<sup>b</sup> $S = \frac{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{(N_o - N_p)^{1/2}}$ .

## 6 Weitere Ergebnisse

### 6.1 Zielstrukturen

Neben der Gruppe der DTPA-bis(alkoxyphenylamide) (P1) und des EOB-DTPA (P2) sowie den sehr vielversprechenden *N*,1,4-Tri(4-alkoxy-2-hydroxybenzyl)-DAZA-Liganden (P3) wurden vier weitere Chelatoren durch die EOB-Gruppe oder ähnlich modifizierte Benzylgruppen funktionalisiert (Abb. 11). Der Ligand HBED wurde aufgrund seiner bereits bekannten intrinsischen Hepatotropie (Mathias et al. 1988) und hohen Komplexbildungskonstante mit  $\text{Ga}^{\text{III}}$  sowie aufgrund der Tatsache, dass der  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplex erwartungsgemäß eine negative Gesamtladung analog zum Primovist® aufweist, als Grundgerüst für die Zielstruktur EO-HBED gewählt (Price et al. 2016, Green und Welch 1989).

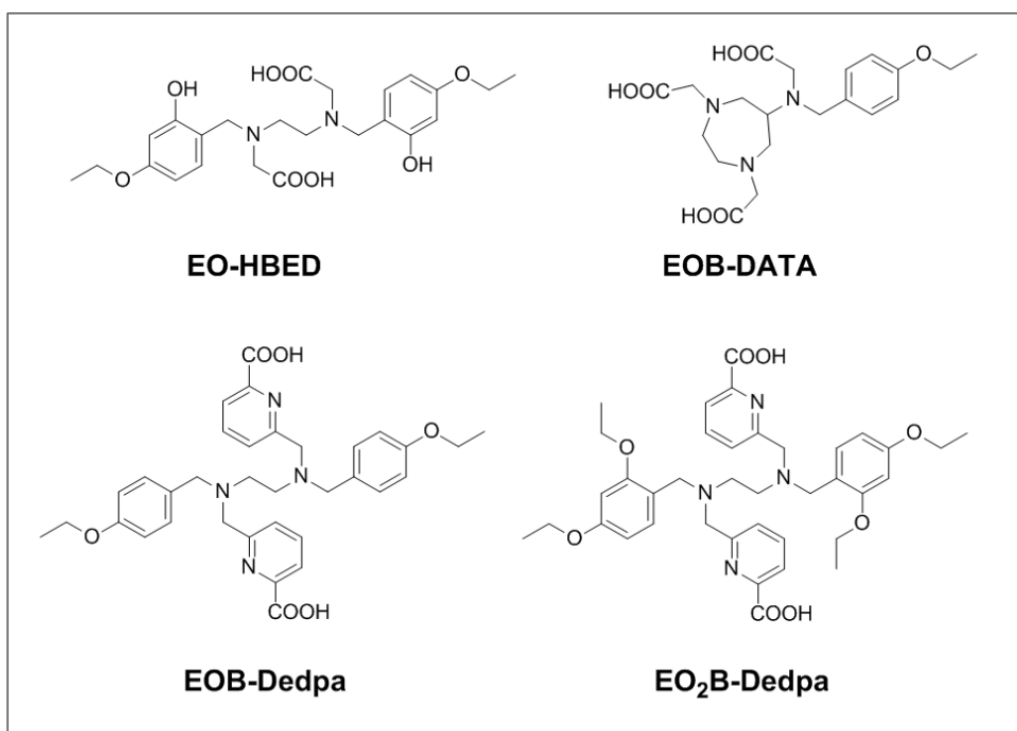


Abb. 11. Strukturen weiterer noch nicht publizierter, potentiell hepatotroper Liganden, die im Rahmen dieser Dissertation synthetisiert und charakterisiert wurden.

Der  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplex des Dedpa besitzt bekanntermaßen ebenfalls eine hohe Stabilität (Boros et al. 2010). Außerdem können die sekundären Aminstickstoffatome der Ethylendiaminbrücke effektiv funktionalisiert werden, sodass ein mit EOB-Gruppen (EOB-Dedpa) als auch mit

2,4-Diethoxybenzylgruppen (EO<sub>2</sub>B-Dedpa) alkylierter Chelator isoliert werden konnte. Als weiterer Ligand wurde EOB-DATA auf Grundlage des DAZA-Zyklus synthetisiert, da von diesem Aminocarboxylat eine hohe kinetische Inertheit der [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe erwartet wurde (Parker und Waldron 2013, Waldron et al. 2013, Roesch et al. 2014, Nock et al. 2017).

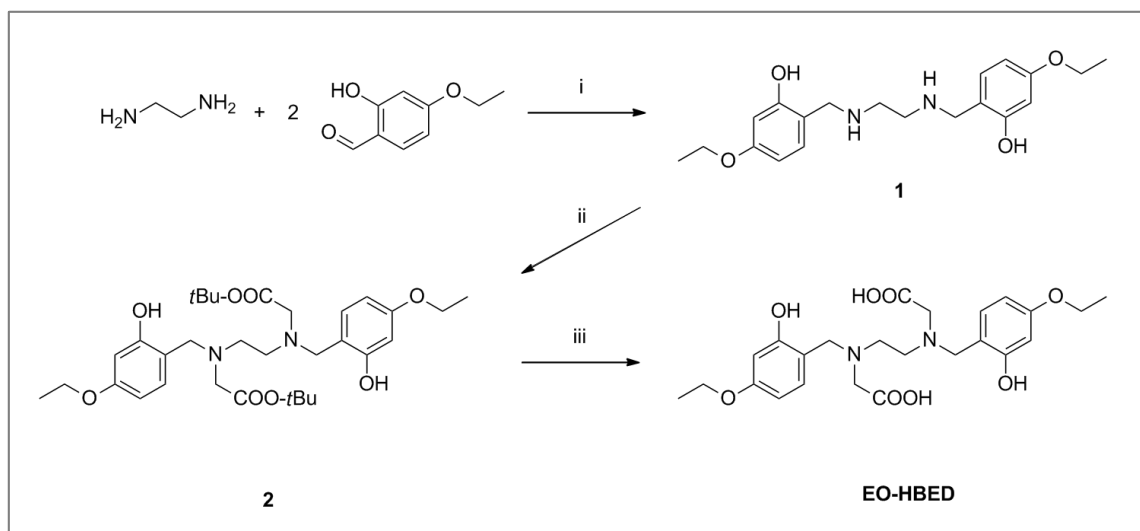
Die [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>- und die [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe der vier neuartigen Liganden wurden synthetisiert. In Fortsetzungsarbeiten der publizierten Ergebnisse wurde <sup>68</sup>Ga ebenfalls mit DTPA-bis(EOP-amid) (vgl. P1) komplexiert. Die *in vitro*-Stabilität dieser fünf [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe wurde durch Inkubation in Serum bestimmt, analog zu den Stabilitätsexperimenten der in P2 und P3 beschriebenen Komplexe. Ebenso wie die DAZA-basierten <sup>68</sup>Ga-Tracer (vgl. P3) wurden [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED und der Primovist®-analoge Radiotracer [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DTPA (vgl. P2) anhand des Straußenembryomodells bzgl. der *in ovo*-Verteilung untersucht.

Die Synthese und Isolierung der dargestellten Liganden sowie deren nicht radioaktiver [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe, die Radiomarkierung mit <sup>68</sup>Ga und die Durchführung und exemplarischen Ergebnisse der *in-vitro*-Stabilitätsstudien in Form von Radio-TLC und Radio-HPLC-Chromatogrammen sind im nachfolgenden experimentellen Teil zusammengefasst. Die Methodik zur Präparation der Straußenembryonen sowie der PET-Aufnahmen ist ebenfalls kurz zusammengefasst, eine ausführliche Beschreibung des Verfahrens ist bereits publiziert (Freesmeyer et al. 2018, vgl. auch P3).

## 6.2 Experimenteller Teil

### 6.2.1 Synthese und Charakterisierung der Liganden und $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe

#### 6.2.1.1 Synthese von EO-HBED und $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED



Schema 1. Synthese von EO-HBED. i: MeOH,  $\text{NaBH}_4$ , ii: *tert*-Butylbromacetat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , THF,  $\text{N}_2$ , RT, 48 h. iii: HCl (4.0 M)/EtOH 1/3, RT, 24 h.

#### Synthese von 1

Ethylendiamin (144 mg, 2,4 mmol) und 4-Ethoxy-2-hydroxybenzaldehyd (795 mg, 4,8 mmol) wurden in 40 ml Methanol vereinigt. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur (RT) gerührt und der sich gebildete gelbe Niederschlag anschließend filtriert. Der Niederschlag wurde in 40 ml Methanol suspendiert und  $\text{NaBH}_4$  (360 mg, 9,4 mmol) portionsweise hinzugegeben. Nach 1 h Rühren bei RT wurde der farblose Niederschlag filtriert, mit kaltem Methanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet (680 mg, 1,9 mmol, 79%).

$^1\text{H-NMR}$  (300,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 6,85 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,2$  Hz, 2H), 6,41 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2,3$  Hz, 2H), 6,33 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,4$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2,3$  Hz, 2H), 3,99 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7,1$  Hz, 4H), 3,93 (s, 4H), 2,75 (s, 4H), 2,82 (t, 4H), 1,39 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7,1$  Hz, 6H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 160,0, 159,2, 129,1, 114,5, 105,9, 102,6, 63,5, 52,2, 47,8, 14,9.

MS (DEI):  $m/z$  360 ( $[\text{M}]^+$ , 40%), 151 (Benzylfragment, 100%).

EA [%] (für  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ ): C 66,66 (66,64), H 7,92 (7,83), N 7,65 (7,77).

## Synthese von **2**

Die Synthese erfolgte in Analogie zu einem publizierten Verfahren (Cleeren et al. 2016). Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden zu einem durch ein Eisbad gekühlten Gemisch aus **1** (673 mg, 1,9 mmol) und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (797 mg, 5,6 mmol) in trockenem THF (destilliert über Natrium, 35 ml) *tert*-Butylbromacetat (737 mg, 3,8 mmol) in 5 ml THF tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion 48 h bei RT gerührt. Der Feststoff wurde filtriert und mit Chloroform gewaschen. Die Filtrate wurden vereinigt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das ölige Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert, und **2** als farbloser Feststoff isoliert (350 mg, 0,59 mmol, 31%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,1 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 6,77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,3 Hz, 2H), 6,41 (d, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,4 Hz, 2H), 6,32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,4 Hz, 2H), 3,98 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 4H), 3,65 (s, 4H), 3,15 (s, 4H), 2,67 (s, 4H), 1,45 (s, 18H), 1,38 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170,3, 160,2, 158,6, 129,9, 114,0, 105,8, 102,6, 82,1, 63,4, 57,5, 55,5, 50,1, 28,2, 15,0.

**MS** (ESI pos., Methanol): *m/z* 611 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100%), 589 ([M+H]<sup>+</sup>, 23%).

**EA** [%] (für C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> · 0,5 CH<sub>3</sub>OH): C 64,59 (64,55), H 8,06 (8,33), N 4,63 (4,63).

## Synthese von **EO-HBED**

Zu einer Suspension von **2** (150 mg, 0,25 mmol) in Ethanol (9 ml) wurden 3 ml Salzsäure (4,0 M) gegeben und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Aus der entstehenden farblosen Lösung wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Aus dem Rohprodukt wurde **EO-HBED** durch Umkristallisation aus Ethanol als leicht rosafarbener Feststoff erhalten (120 mg, 0,21 mmol, 85%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,1 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ = 7,27 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,3 Hz, 2H), 6,52-6,48 (m, 4H), 4,45 (2, 4H), 4,07 (s, 4H), 4,03 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 4H), 3,73 (s, 4H), 1,38 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ = 168,6, 163,8, 159,4, 135,4, 107,8, 102,8, 64,7, 55,2, 53,9, 49,7, 15,0.

**MS** (ESI pos., Methanol):  $m/z$  499 ( $[M+Na]^+$ , 100%), 477 ( $[M+H]^+$ , 60%).

**EA** [%] (für  $C_{24}H_{32}N_2O_8 \cdot 1,8 HCl \cdot 0,5 C_2H_5OH$ ): C 53,50 (53,13), H 6,81 (6,56), N 4,97 (4,96), Cl 11,60 (11,29).

### Synthese von $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -EO-HBED

**EO-HBED** (34 mg, 0,06 mmol) wurden in 5 ml einer Mischung aus Wasser und Methanol (1/1) gelöst. Hierzu wurden 0,55 ml einer wässrigen 0,11 M Lösung von  $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -chlorid (0,06 mmol) gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mit einer pH-Elektrode versehen. Verdünnte Ammoniaklösung (20%) wurde tropfenweise zugegeben, bis der pH-Wert der Reaktion bei 3,9 lag. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Aus dem Feststoff wurde in einem Kolben bei 0,3 mbar und 125°C das Nebenprodukt Ammoniumchlorid sublimiert, um den verbleibenden Feststoff  $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -EO-HBED (27 mg, 0,05 mmol, 80%) zu gewinnen.

**$^1H$ -NMR** (400,1 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 8,31 (s, 0,3H), 6,71 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8,2 Hz, 2H), 6,10 (d,  $^4J_{H,H}$  = 2,5 Hz, 2H), 6,04 (dd,  $^3J_{H,H}$  = 8,2 Hz,  $^4J_{H,H}$  = 2,5 Hz, 2H), 4,11 (d,  $^2J_{H,H}$  = 12,6 Hz, 2H), 3,90 (q,  $^3J_{H,H}$  = 7,0 Hz, 2H), 3,53 (d,  $^2J_{H,H}$  = 12,6 Hz, 2H)<sup>1</sup>, 3,25 (d,  $^2J_{H,H}$  = 17,5 Hz, 2H), 2,99 (d,  $^2J_{H,H}$  = 17,5 Hz, 2H), 2,91 (d,  $^2J_{H,H}$  = 9,4 Hz, 2H), 2,75 (d,  $^2J_{H,H}$  = 9,3 Hz, 2H), 1,27 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7,0 Hz, 3H).

**$^{13}C\{^1H\}$ -NMR** (100,6 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172,2, 164,5, 160,1, 131,1, 113,5, 105,4, 101,8, 62,6, 60,4, 55,8, 55,3, 15,0.

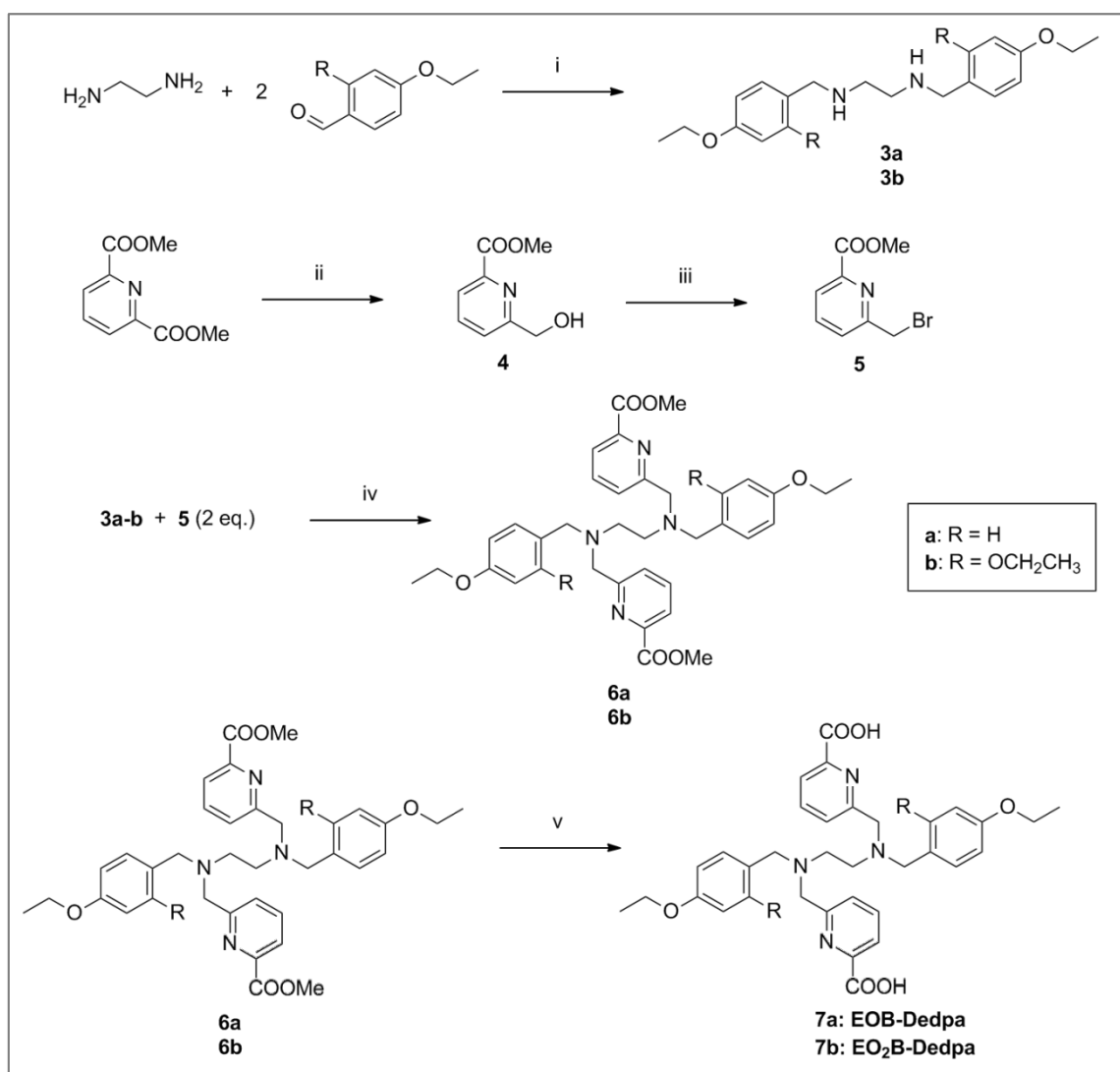
**$^{71}Ga$ -NMR** (122,0 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 248,6 (Halbwertsbreite 150 Hz).

**MS** (ESI neg., Methanol):  $m/z$  543 ( $[M(^{71}Ga)]^-$ , 70%), 541 ( $[M(^{69}Ga)]^-$ , 100%).

**EA** [%] (für  $C_{24}H_{29}GaN_2O_8 \cdot CH_3OH$ ): C 52,43 (52,20), H 5,65 (5,78), N 4,39 (4,87).

<sup>1</sup> Das Dublett wird vom Signal der HDO-Protonen überlagert, konnte jedoch mittels HSQC-NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert werden.



6.2.1.2 Synthese von EOB-Dedpa, EO<sub>2</sub>B-Dedpa und deren [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe

Schema 2. Synthese von EOB-Dedpa und EO<sub>2</sub>B-Dedpa. i.: MeOH, NaBH<sub>4</sub>, ii: NaBH<sub>4</sub>, iii: PBr<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, iv: ACN, N<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, v: **7a**) HCl (4,0 M); **7b**) LiOH (5 eq.), THF/Wasser 3/1.

**Synthese von 3a**

Ethylendiamin (0,79 g, 13,2 mmol) und 4-Ethoxybenzaldehyd (4,37 g, 26,4 mmol) wurden in 90 ml Methanol (zuvor getrocknet über Molsieb 3 Å für 24 h) vereint. Die Reaktion wurde für 2 h bei RT gerührt, anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck partiell auf ca. 20 ml reduziert und die resultierende Suspension filtriert. Der Filtrerrückstand wurde dreimal mit *n*-Hexan gewaschen. Die aus den vereinigten Filtraten bei -20°C kristallisierte Feststofffraktion wurde mit dem Filtrerrückstand vereinigt und in 50 ml Methanol suspendiert. NaBH<sub>4</sub> (1,94 g, 51,0 mmol) wurde portionsweise über 1 h zugegeben. Die Mischung wurde für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde unter Kühlung des Kolbens in

einem Eisbad 20 ml Wasser zugegeben. Die resultierende wässrige Lösung wurde unter vermindertem Druck auf ca. 20 ml eingengt und anschließend dreimal mit jeweils 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösemittel anschließend *in vacuo* entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (3,03 g, 9,2 mmol, 70%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,70 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,4 Hz, 4H), 6,84 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,4 Hz, 4H), 4,02 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 4H), 3,71 (s, 4H), 2,75 (s, 4H), 1,40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 158,3, 132,8, 129,4, 114,7, 63,7, 53,5, 48,9, 15,0.

**MS** (DEI): *m/z* 328 ([M]<sup>+</sup>, 30%), 136 ([EOB]<sup>+</sup>, 100%).

### Synthese von 3b

Die Synthese erfolgte analog der für **3a** beschriebenen Methode mit Ethylendiamin (155 mg, 2,6 mmol) und 2,4-Diethoxybenzaldehyd (1,0 g, 5,1 mmol) in 30 ml Methanol. Die Schiffsche Base wurde mit NaBH<sub>4</sub> (390 mg, 10,2 mmol) reduziert. **3b** wurde als rötliches Öl erhalten (1,06 g, 2,55 mmol, 93%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,08 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,1 Hz, 2H), 6,41 (d, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,3 Hz, 2H), 6,38 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2,3 Hz, 2H), 4,00 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 4H), 3,98 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 4H), 3,70 (s, 4H), 2,69 (s, 4H), 1,38 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 12H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 159,3, 158,0, 130,4, 121,2, 104,3, 99,8, 63,6, 63,5, 48,8, 48,6, 15,0, 14,9.

**MS** (ESI pos., Methanol): *m/z* 417 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%).

**EA** [%] (für C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 0,25 H<sub>2</sub>O): C 68,06 (68,46), H 8,65 (8,74), N 6,44 (6,65).

### Synthese von 4

Die Synthese wurde nach einem publizierten Prozedere durchgeführt (Price et al. 2012). Dimethylpyridin-2,6-dicarboxylat (6,0 g, 30,8 mmol) wurde in 150 ml Methanol suspendiert und mit einem Eisbad gekühlt. NaBH<sub>4</sub> (2,03 g, 53,4 mmol) wurde über den Verlauf von 1 h portionsweise hinzugefügt. Nach der Zugabe wurde die Mischung 3 h bei RT gerührt und anschließend das Lösemittel unter

vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit 150 ml wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und viermal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösemittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Silica, Ethylacetat) um **4** als farblosen Feststoff zu erhalten (3,05 g, 18,2 mmol, 34%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,7 Hz, 1H), 7,87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,7 Hz, 1H), 7,54 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,00 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 165,6, 160,5, 147,0, 137,9, 124,1, 124,0, 64,7, 53,0.

**MS** (DEI): *m/z* 167 ([M]<sup>+</sup>, 65%), 166 ([M-H]<sup>+</sup>, 97%), 109 ([C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N-CH<sub>2</sub>OH]<sup>+</sup>, 100%).

### Synthese von **5**

Die Synthese wurde nach einem publizierten Prozedere durchgeführt (Price et al. 2012). In einem Dreihalskolben wurde **4** (2,9 g, 17,4 mmol) sekuriert, mit 80 ml Chloroform versetzt und mit einem Eisbad gekühlt. Unter Ausschluss von Sauerstoff wurden zur Lösung langsam unter Rühren 5,05 g (18,9 mmol) Phosphortribromid in 10 ml Chloroform zugetropft, woraufhin sich eine Suspension bildete. Nach dreistündigem Rühren bei 0°C wurden 50 ml wässrige NaCO<sub>3</sub>-Lösung zugegeben. Die Phasen wurden anschließend im Scheidetrichter separiert und die wässrige Phase dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Lösemittel anschließend im Vakuum entfernt, um **5** als farblosen Feststoff (3,55 g, 15,5 mmol, 89%) zu erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,06 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 1H), 7,87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 1H), 7,69 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 1H), 4,65 (s, 2H), 4,01 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 165,4, 157,6, 147,7, 138,4, 127,3, 124,6, 53,3, 33,2.

**MS** (DEI): *m/z* 231 ([M, <sup>81</sup>Br]<sup>+</sup>, 8%), 229 ([M, <sup>79</sup>Br]<sup>+</sup>, 8%), 201 ([M - OMe, <sup>81</sup>Br]<sup>+</sup>, 34%), 199 ([M - OMe, <sup>79</sup>Br]<sup>+</sup>, 34%), 173 ([C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N-CH<sub>2</sub>, <sup>81</sup>Br]<sup>+</sup>, 80%), 171 ([C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N-CH<sub>2</sub>, <sup>79</sup>Br]<sup>+</sup>, 100%).

**Synthese von 6a**

Die Synthese wurde nach einem publizierten Prozedere durchgeführt (Price et al. 2012). Die Substanzen **3a** (400 mg, 1,2 mmol) und **5** (586 mg, 2,6 mmol) wurden mit wasserfreiem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (504 mg, 4,8 mmol) unter einer Stickstoffatmosphäre in 25 ml trockenem Acetonitril (destilliert über Calciumhydrid, gelagert über Molsieb 3 Å) vereinigt und für 24 h bei 60°C gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert und der Filtrerrückstand mit Chloroform gewaschen. Das Lösemittel wurde aus den vereinigten Filtraten unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde erneut in Chloroform aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit *n*-Hexan versetzt, unlösliche Anteile wurden filtriert und aus dem Filtrat das Produkt als dunkles Öl durch Entfernen des Lösemittels im Vakuum gewonnen (710 mg, 1,1 mmol, 95%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,95 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6,8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1,5 Hz, 2H), 7,72-7,66 (m, 4H), 7,14 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,4 Hz, 4H), 6,77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,4 Hz, 4H), 4,01-3,96 (m, 10H), 3,78 (s, 4H), 3,48 (s, 4H), 2,63 (s, 4H), 1,39 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166,1, 161,5, 158,1, 147,1, 137,4, 130,9, 130,0, 126,0, 123,6, 114,3, 63,5, 60,5, 58,6, 53,0, 51,9, 15,0.

**MS** (DEI): *m/z* 626 ([M]<sup>+</sup>, 9%), 135 ([CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 100%).

**EA** [%] (für C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 0,5 H<sub>2</sub>O): C 68,30 (68,01), H 6,99 (6,82), N 8,41 (8,81).

**Synthese von 6b**

Die Synthese erfolgte wie für **6a** beschrieben durch die Reaktion von **3b** (952 mg, 2,3 mmol), **5** (1,1 g, 4,8 mmol) und wasserfreiem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (943 mg, 8,9 mmol) unter einer Stickstoffatmosphäre in 55 ml trockenem Acetonitril. **6b** wurde als rotes Öl isoliert (1,56 mg, 2,2 mmol, 95%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,93 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,6 Hz, 2H), 7,74 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 2H), 7,68-7,62 (m, 2H), 7,19 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,5 Hz, 2H), 6,35-6,32 (m, 4H), 3,98 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 4H), 3,98 (s, 6H), 3,91 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 4H), 3,83 (s, 4H), 3,54 (s, 4H), 2,69 (s, 4H), 1,39 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 6H), 1,33-1,30 (m, 6H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 166,1, 162,2, 159,2, 158,2, 147,0, 137,2, 130,8, 126,0, 123,4, 104,7, 99,7, 63,6, 63,5, 60,8, 53,0, 52,6, 15,0, 14,9.

**MS** (ESI pos., Methanol.): *m/z* 715 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%), 737 ([M+Na]<sup>+</sup>, 30%).

**EA** [%] (für  $C_{40}H_{50}N_4O_8 \cdot 1,5 H_2O$ ): C 64,46 (64,76), H 6,96 (7,20), N 7,25 (7,55).

### Synthese von 7a (EOB-Dedpa)

**6a** (700 mg, 1,11 mmol) wurde mit 20 ml 4,0 M wässriger Salzsäure versetzt und die Reaktionslösung für 48 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **5a** wurde durch Umkristallisation aus heißem Ethanol isoliert (370 mg, 0,53 mmol, 48%).

**$^1H$ -NMR** (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  = 8,08-8,03 (m, 4H), 7,57 (dd,  $^3J_{H,H}$  = 6,6 Hz,  $^4J_{H,H}$  = 2,3 Hz, 2H), 7,21 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8,6 Hz, 4H), 6,68 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8,6 Hz, 4H), 4,49 (s, H), 4,19 (s, 4H), 3,92 (q,  $^3J_{H,H}$  = 7,1 Hz, 2H), 3,57 (s, 4H), 1,29 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7,1 Hz, 3H).

**$^{13}C\{^1H\}$ -NMR** (100,6 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  = 166,9, 150,3, 146,5, 140,6, 132,6, 127,0, 125,4, 121,3, 114,9, 64,2, 59,7, 56,7, 48,7, 13,7.

**MS** (ESI pos., Methanol):  $m/z$  599 ( $[M+H]^+$ , 100%).

**EA** [%] (für  $C_{34}H_{38}N_4O_6 \cdot 2 HCl \cdot 1,5 H_2O$ ): C 58,41 (58,45), H 6,01 (6,20), N 8,10 (8,02), Cl 10,23 (10,15).

### Synthese von 7b (EO<sub>2</sub>B-Dedpa)

**6b** (500 mg, 0,70 mmol) wurden in 20 ml einer THF/Wasser-Mischung (3/1) mit 85 mg (3,5 mmol) LiOH versetzt und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde mit 4,0 M wässriger Salzsäure auf pH 5-6 gebracht. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (RP18-Silica, Wasser  $\rightarrow$  Methanol, Produkt befindet sich in der Wasser/Methanol (1/1) – Fraktion) und **EO<sub>2</sub>B-Dedpa** daraus als farbloser Feststoff gewonnen (260mg, 0,36 mmol, 52%).

**$^1H$ -NMR** (400 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  = 7,97 (d,  $^3J_{H,H}$  = 7,4 Hz, 2H), 7,84 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7,6 Hz, 2H), 7,44 (d,  $^3J_{H,H}$  = 7,6 Hz, 2H), 7,15 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8,4 Hz, 2H), 6,40 (d,  $^4J_{H,H}$  = 2,1 Hz, 2H), 6,36 (dd,  $^3J_{H,H}$  = 8,4 Hz,  $^4J_{H,H}$  = 2,1 Hz, 2H), 4,23 (s, 4H), 4,01 (s, 4H), 3,99-3,92 (m, 8H), 3,28 (s, 4H), 1,34 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7,0 Hz, 6H), 1,27 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7,0 Hz, 6H).

**$^{13}C\{^1H\}$ -NMR** (100,6 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  = 170,1, 162,5, 160,0, 155,6, 152,7, 139,4, 134,6, 126,7, 124,7, 114,1, 106,6, 100,6, 65,0, 64,6, 58,6, 53,9, 50,4, 15,1.

**MS** (ESI neg., Methanol):  $m/z$  685 ( $[M-H]^-$ , 100%).

**EA** [%] (für  $C_{38}H_{46}N_4O_6 \cdot 1,5 H_2O$ ): C 63,62 (63,84), H 6,55 (6,92), N 8,24 (7,85).

### Synthese von $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -EOB-Dedpa

Zu 8 ml einer wässrigen Lösung von **EOB-Dedpa** (80 mg, 0,11 mmol) wurde 1 ml (0,11 mmol) einer 0,11 M Lösung von  $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -chlorid in Wasser gegeben und das Reaktionsgefäß mit einer pH-Elektrode versehen. Verdünnte Ammoniaklösung (20%) wurde tropfenweise zugegeben, bis der pH-Wert der Reaktion bei 3,7 lag. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Aus dem Feststoff wurde in einem Kolben bei 0,3 mbar und 125°C das Nebenprodukt Ammoniumchlorid sublimiert und  $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -EOB-Dedpa (80 mg, 0,11 mmol, 95%) als farbloser Feststoff erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400,1 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  = 8,66 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7,8 Hz, 2H), 8,45 (d,  $^3J_{H,H}$  = 7,8 Hz, 2H), 8,14 (d,  $^3J_{H,H}$  = 7,8 Hz, 2H), 7,27 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8,6 Hz, 4H), 7,03 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8,6 Hz, 4H), 4,72 (d,  $^2J_{H,H}$  = 16,9 Hz, 2H)<sup>2</sup>, 4,36 (d,  $^2J_{H,H}$  = 16,9 Hz, 2H), 4,15 (q,  $^3J_{H,H}$  = 7,0 Hz, 4H), 4,99 (d,  $^2J_{H,H}$  = 14,0 Hz, 2H), 3,61 (d,  $^2J_{H,H}$  = 14,0 Hz, 2H), 3,26 (d,  $^2J_{H,H}$  = 11,5 Hz, 2H), 2,90 (d,  $^2J_{H,H}$  = 11,5 Hz, 2H), 1,39 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7,0 Hz, 6H).

**$^{13}C\{^1H\}$ -NMR** (100,6 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  = 165,2, 159,0, 150,6, 147,2, 143,2, 133,3, 128,7, 124,5, 121,5, 114,9, 64,4, 56,2, 54,7, 46,5, 13,8.

**MS** (ESI pos., Methanol):  $m/z$  668 ( $[M+1(^{71}Ga)]^+$ , 28%), 667 ( $[M(^{71}Ga)]^+$ , 75%), 666 ( $[M+1(^{69}Ga)]^+$ , 40%) 665 ( $[M(^{69}Ga)]^+$ , 100%).

**EA** [%] (für  $C_{34}H_{36}ClGaN_4O_8 \cdot 3 H_2O$ ): C 54,04 (54,02), H 5,35 (5,60), N 7,45 (7,41), Cl 4,54 (4,69).

### Synthese von $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -EO<sub>2</sub>B-Dedpa

Zu 9 ml einer Lösung von **EO<sub>2</sub>B-Dedpa** (60 mg, 0,08 mmol) in Wasser/Methanol (8/1) wurden 0,76 ml (0,08 mmol) einer 0,11 M Lösung von  $[^{nat}Ga]Ga^{III}$ -chlorid in Wasser gegeben und das Reaktionsgefäß mit einer pH-Elektrode versehen. Verdünnte Ammoniaklösung (20%) wurde tropfenweise zugegeben, bis der pH-

<sup>2</sup> Die Dubletts werden vom Signal der HDO-Protonen überlagert, wurden jedoch mittels HSQC-NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert.

Wert der Reaktion bei 3,9 lag. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet, und 50 mg [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO<sub>2</sub>B-Dedpa (0,06 mmol, 75%) isoliert.

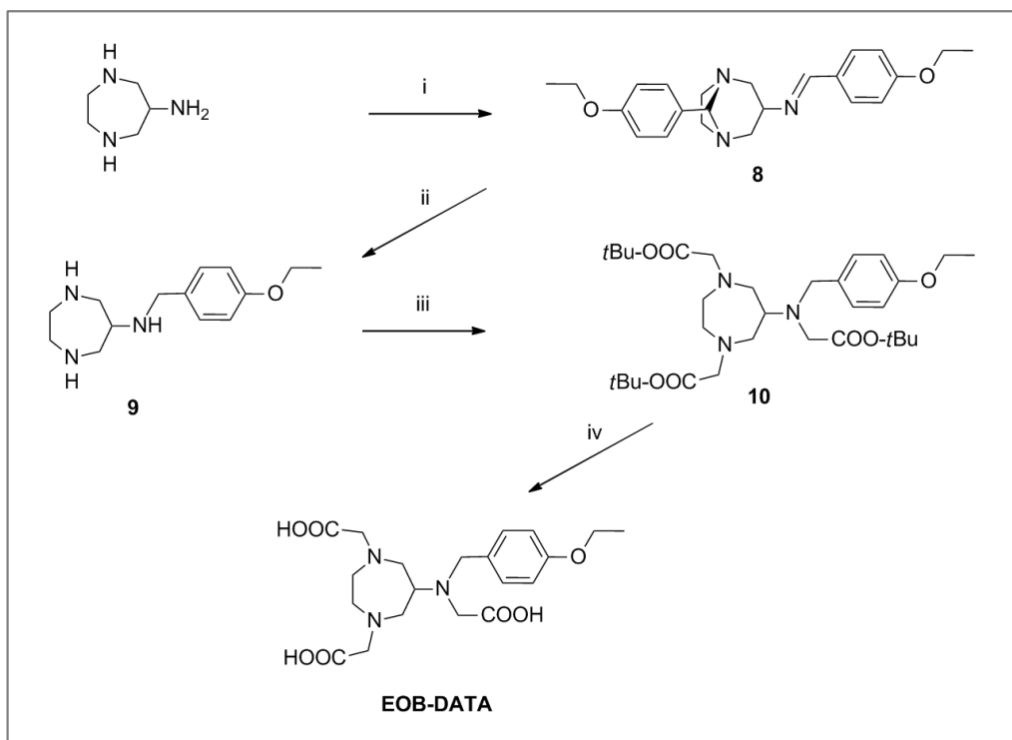
**<sup>1</sup>H-NMR** (400,1 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ = 8,67 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 2H), 8,43 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,4 Hz, 2H), 8,21 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,8 Hz, 2H), 7,32-7,30 (m, 2H), 6,57-6,56 (m, 4H), 4,78 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 16,8 Hz, 2H)<sup>2</sup>, 4,40 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 16,8 Hz, 2H), 4,07-3,91 (m, 10H), 3,62 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 13,8 Hz, 2H), 3,12 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 10,8 Hz, 2H), 2,91 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 10,8 Hz, 2H), 1,37 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 6H), 1,20 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7,0 Hz, 6H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ = 164,9, 163,1, 160,3, 152,3, 148,2, 145,8, 135,5, 129,6, 125,2, 111,1, 107,3, 100,9, 65,3, 64,8, 57,7, 50,6, 49,2, 15,1, 15,0.

**MS** (ESI pos., Methanol): *m/z* 756 ([M+1(<sup>71</sup>Ga)]<sup>+</sup>, 28%), 755 ([M(<sup>71</sup>Ga)]<sup>+</sup>, 75%), 754 ([M+1(<sup>69</sup>Ga)]<sup>+</sup>, 40%) 753 ([M(<sup>69</sup>Ga)]<sup>+</sup>, 100%).

**EA** [%] (für C<sub>38</sub>H<sub>44</sub>GaClN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 2 H<sub>2</sub>O): C 55,21 (55,26), H 5,72 (5,86), N 7,16 (6,78), Cl 4,79 (4,29).



6.2.1.3 Synthese von EOB-DATA und [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DATA

Schema 3. Synthese von EOB-DATA. i: 4-Ethoxybenzaldehyd (2 eq.), MeOH. ii: MeOH, NaBH<sub>4</sub>. iii: *tert*-Butylbromacetat, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>. iv: LiOH (5 eq.), EtOH, RT.

**Synthese von 8**

4-Ethoxybenzaldehyd (700 mg, 4,66 mmol) und DAZA (268 mg, 2,33 mmol) wurden in 50 ml Methanol vereint und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittelvolumen unter vermindertem Druck auf 5 ml reduziert. Die sich daraus gebildeten, farblosen Kristalle wurden filtriert (840 mg, 2,22 mmol, 95%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300,2 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8,23 (s, 1H), 7,64 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,9 Hz, 1H), 7,49 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,3 Hz, 1H), 6,91-6,83 (m, 4H), 5,15 (s, 1H), 4,10-3,99 (m, 4H), 3,76-3,63 (m, 1H), 3,46-2,73 (m, 8H), 1,45-1,38 (m, 6H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 160,8, 158,6, 129,9, 127,8, 114,8, 114,3, 88,0, 63,8, 63,6, 62,2, 60,9, 51,0, 15,4, 14,9.

**MS** (ESI pos., CHCl<sub>3</sub> und Methanol): *m/z* 402 ([M+Na]<sup>+</sup>, 90%), 380 ([M+H]<sup>+</sup>, 100%).

**EA** [%] (für C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>): C 72,81 (72,79), H 7,69 (7,70), N 11,08 (11,07).

**Synthese von 9**

Zu einer Lösung von **8** (980 mg, 2,6 mmol) in 30 ml Methanol wurde portionsweise  $\text{NaBH}_4$  (220 mg, 5,8 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung anschließend für 2 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde 1 ml Salzsäure (4,0 M) hinzugegeben und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethanol suspendiert, filtriert und zweimal mit Ethanol sowie zweimal mit Chloroform gewaschen. Der Rückstand wurde als Hydrochlorid von **9** identifiziert (1,02 g, 2,7 mmol). Der farblose Feststoff wurde in 10 ml Wasser mit Natronlauge (1,0 M) versetzt, bis der pH-Wert  $> 9$  war. Die wässrige Phase wurde viermal mit Chloroform extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösemittel anschließend im Vakuum entfernt, um **9** als farbloses Öl zu erhalten (460 mg, 1,85 mmol, 71%).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400,1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,21$  d( $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$  Hz, 2H), 6,83 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$  Hz, 2H), 4,00 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7,0$  Hz, 2H), 3,00-2,78 (m, 9H), 1,39 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7,0$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$**  (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 158,1, 132,7, 129,3, 114,5, 63,5, 59,1, 53,5, 52,2, 50,9, 15,0$ .

**MS** (DEI):  $m/z$  249 ( $[\text{M}]^+$ , 100%).

**EA** [%] (für  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O} \cdot 3 \text{HCl} \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ ): C 43,76 (43,59), H 7,04 (7,58), N 10,57 (10,89), Cl 27,20 (27,59).

**Synthese von 10**

Zu einer Suspension von **9** (150 mg, 0,60 mmol) und wasserfreiem  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (414 mg, 3,0 mmol) in 25 ml trockenem Acetonitril (destilliert über Calciumhydrid, gelagert über Molsieb 3 Å) wurde unter Verwendung eines Eisbads zur Kühlung tropfenweise *tert*-Butylbromacetat (350 mg, 1,80 mmol) in trockenem Acetonitril (5 ml) gegeben. Nach Beenden der Zugabe wurde die Reaktionsmischung 48 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Mischung filtriert, der Filtrückstand mit Chloroform gewaschen, die Filtrate vereinigt und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silica, Chloroform  $\rightarrow$  Ethylacetat) aufgereinigt und **10** als farbloses Öl (170 mg, 0,29 mmol, 48%) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400,1 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7,25$  (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$  Hz, 2H), 6,79 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$  Hz, 2H), 3,99 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7,0$  Hz, 2H), 3,71 (s, 2H), 3,36-2,56 (m, 15H), 1,44-1,36 (m, 30H).

**$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$**  (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 171,2, 170,8, 158,1, 131,8, 129,1, 114,3, 80,9, 80,5, 63,5, 61,1, 59,4, 57,1, 55,0, 53,0, 28,3, 28,2, 15,0$ .

**MS** (ESI pos., Methanol):  $m/z$  614 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 100%), 592 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 50%).

**EA** [%] (für  $\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_7 \cdot 0,3 \text{CHCl}_3$ ): C 61,41 (61,49), H 8,47 (8,51), N 6,56 (6,65).

### Synthese von **EOB-DATA**

Zu einer Lösung von **10** (100 mg, 0,16 mmol) in 5 ml Ethanol wurde LiOH (50 mg, 2,10 mmol) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 48 h bei 50°C gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit 1 ml Salzsäure (4,0 M) angesäuert, das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (RP18-Silica, Wasser  $\rightarrow$  Methanol). Die vereinigten methanolischen Fraktionen wurden mit Salzsäure angesäuert, das Lösemittel anschließend im Vakuum entfernt und hieraus **EOB-DATA** durch Umkristallisation aus Ethanol/Ether (1/4) als farbloser Feststoff (26 mg, 0,05 mmol, 30%) gewonnen.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400,1 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 7,49$  (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$  Hz, 2H), 7,06 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8,5$  Hz, 2H), 4,31-3,56 (m, 15H), 4,16 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7,0$  Hz, 2H), 1,40 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7,0$  Hz, 3H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 170,6, 170,5, 132,4, 123,1, 115,2, 64,5, 57,4, 57,1, 57,0, 53,4, 52,6, 51,1, 13,9$ .

**MS** (ESI pos., Methanol):  $m/z$  446 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 50%), 424 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100%).

**EA** (für  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_7 \cdot 2,3 \text{HCl} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ): C 44,39 (44,21), H 6,28 (6,55), N 7,41 (7,73), Cl 15,26 (15,01).

### Synthese von **$[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-DATA}$**

Zu 4 ml einer Lösung von **EOB-DATA** (30 mg, 0,06 mmol) in Wasser wurden 0,51 ml (0,06 mmol) einer 0,11 M Lösung von  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -chlorid in Wasser gegeben und das Reaktionsgefäß mit einer pH-Elektrode versehen. Verdünnte Ammoniaklösung (20%) wurde tropfenweise zugegeben, bis der pH-Wert der Reaktion bei 3,8 lag. Bereits bei pH 2,0 wurde die rasche Bildung eines feinkristallinen Niederschlages in der Reaktionsmischung beobachtet. Die

Reaktionslösung wurde 1 h bei RT gerührt und anschließend filtriert. Der farblose Rückstand [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DATA wurde im Vakuum getrocknet (17 mg, 0,03 mmol, 62%).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400,1 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7,32 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,6 Hz, 2H), 6,96 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8,6 Hz, 2H), 4,13-4,01 (m, 4H), 3,90 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 14,3 Hz, 1H), 3,80 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 18,6 Hz, 1H), 3,74-3,64 (m, 3H), 3,56 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 15,2 Hz, 1H), 3,51 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 18,2 Hz, 1H), 3,32-3,16 (m, 5H), 3,08 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 15,4 Hz, 1,4H), 3,03-2,95 (m, 2H), 1,32 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6,9 Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR** (100,6 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 170,9, 170,7, 170,1, 158,8, 132,9, 123,4, 114,4, 63,1, 61,9, 60,2, 59,0, 58,0, 57,4, 54,2, 54,1, 52,9, 50,0, 14,6.

**<sup>71</sup>Ga-NMR** (122,0 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ = 107 (Halbwertsbreite 275 Hz).

**MS** (ESI pos., Methanol): *m/z* 515 ([M(<sup>71</sup>Ga)+Na+1]<sup>+</sup>, 16%), 514 ([M(<sup>71</sup>Ga)+Na]<sup>+</sup>, 75%), 754 ([M(<sup>69</sup>Ga)+Na+1]<sup>+</sup>, 22%) 512 ([M(<sup>69</sup>Ga)+Na]<sup>+</sup>, 100%).

**EA** (für C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>GaN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2 H<sub>2</sub>O): C 45,88 (45,65), H 5,41 (5,75), N 8,44 (7,99).

### 6.2.2 Markierung mit <sup>68</sup>Ga und Bestimmung der *in-vitro*-Stabilität

Das Verfahren zur Radiomarkierung der Liganden mit <sup>68</sup>Ga wurde stets nach dem gleichen Prozedere durchgeführt, welches in den Publikationen P2 und P3 beschrieben ist. Hierfür wurde salzsaures (0,6 M-1,0 M) Eluat aus einem <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generator (Hersteller: iThemba Labs) mittels Kationenaustauscherkartusche (Chromafix®, PS-H<sup>+</sup>) aufkonzentriert und anschließend die Aktivität mit schwach salzsaurer 5,0 M Kochsalzlösung in ein Probenröhrchen eluiert. Dieses Verfahren stellt neben einer Aufkonzentration der Aktivität gleichzeitig eine Abtrennung von Verunreinigungen des langlebigen Mutternuklides <sup>68</sup>Ge (HWZ 270 d) sicher. Alle Liganden wurden in einem pH-Bereich von 3,7-4,0 unter Verwendung von Acetatpuffer mit <sup>68</sup>Ga markiert.

Die Identifikation des Zielkomplexes, insbesondere bei unvollständiger Markierung bzw. Gegenwart mehrere radioaktiver Spezies in der Reaktionslösung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten der jeweiligen [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe im UV/Vis-Detektionskanal der HPLC mit den Retentionszeiten der radioaktiven <sup>68</sup>Ga-Verbindungen im Radioaktivdetektorkanal. Nebenprodukte der Markierung und Anteile von freiem [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-chlorid sowie <sup>68</sup>Ga-Kolloid wurden von der Zielverbindung abgetrennt, indem die jeweilige Reaktionslösung einer SPE-

Kartuschenaufreinigung unterzogen wurde. Die Kartusche wurde nach der Beladung mit Wasser (2 ml) gewaschen, um freies [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-chlorid oder hydrophile  $^{68}\text{Ga}$ -Spezies abzutrennen. Die Elution des Zielkomplexes von der jeweiligen SPE-Kartusche (C8- oder C18-Silica) erfolgte je nach Lipophilie der Verbindung mit verschiedenen konzentrierten wässrigen Ethanollösungen (10-50 Vol%, 1-2 ml). Eine Tabelle mit allen gelisteten Markierungsbedingungen der verschiedenen Liganden befindet sich in Kapitel 7.2. Im Anschluss an die Aufreinigung enthielten die Lösungen die [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-Komplexe stets in radiochemischen Reinheiten RCP  $\geq 95,0\%$  und waren somit zur *in-vitro*-Stabilitätsuntersuchung bzw. zur *in-ovo*-Bildgebung geeignet.

Die Lösungen der [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-Komplexe wurden für die *in-vitro*-Stabilitätsstudien stets mit Wasser verdünnt, um einen Ethanolgehalt von max. 10% in den Proben zu erreichen. Die Einstellung des physiologischen pH-Bereiches erfolgte mit 10 mM PBS-Lösung und Natronlauge (1,0 M), um die Zugabe großer Mengen PBS zu vermeiden und somit Proben möglichst hoher Aktivitätskonzentration zu erhalten. Dies sollte nachfolgend die Nachweisbarkeit mittels HPLC-Analyse auch nach 4 Stunden (entsprechend ungefähr 4 Halbwertszeiten) noch ermöglichen. Zu stark verdünnte Proben könnten sonst aufgrund der begrenzten Injektionsmenge der HPLC (20  $\mu\text{l}$ ) nicht mehr hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysiert werden. Von den gepufferten Lösungen wurde stets ein Aliquot zur Stabilitätsstudie in PBS inkubiert. Ein weiteres PBS-gepuffertes Aliquot wurde 1:1 mit einer Lösung von Serum (Human Serum, Sigma Aldrich) versetzt und ebenfalls bei 37°C inkubiert. Eine detaillierte Verfahrensweise ist in P2 schriftlich als auch in Form eines Videos dargelegt.

Während der Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden aus den Proben jeweils Aliquote zu definierten Zeitpunkten genommen und mittels Radio-TLC und Radio-HPLC analysiert (vgl. P2 und P3). Das verwendete TLC-System (Silica, 1,0 M Natriumcitratlösung) ist ein Standardsystem zur Auftrennung zwischen intakten [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-Tracern (i. d. R.  $R_f = 0$  bis 0,5) und freiem [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-chlorid ( $R_f = 1,0$ ) und ermöglicht so die Quantifizierung von während der Inkubation durch Demetallierung freigesetztem [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-chlorid. Vor einer HPLC-Analyse der Proben wurden kolloidale Serumbestandteile mittels Festphasenextraktion (SPE) über eine SPE-Kartusche abgetrennt und nur das entsprechende Eluat injiziert.

Um festzustellen, ob und welcher Anteil von serumproteingebundenen oder kolloidalen  $^{68}\text{Ga}$ -Verbindungen auf der SPE-Kartusche verbleiben, welche in der HPLC nicht nachweisbar wären, wurde die Aktivität auf der Kartusche und die Aktivität des Eluates jeweils vermessen.

Nachfolgende HPLC-Chromatogramme zeigen exemplarisch die Peaks der jeweiligen Liganden und ihrer  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe im UV/Vis-Kanal sowie das Signal der  $[\text{68Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe im Radiodetektorkanal. Für die HPLC wurde eine RP-18-modifizierte Säule verwendet (Eurospher, 100-5 C18, 125x4 mm) mit einem Elutionsgradienten von: 0-2 min 99,0% A ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ), 2-10 min 99,0% A  $\rightarrow$  0,0% A ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ), 10-12 min 0,0% A ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ); A: Wasser/Trifluoressigsäure(TFA) (99,9%/0,1%); B: Acetonitril(ACN)/TFA (99,9%/0,1%) für die Analyse der Verbindungen von EO-HBED, EOB-Dedpa, EOB-DATA. Für EO<sub>2</sub>B-Dedpa wurde aufgrund der hohen Lipophilie und späten Retentionszeit der Zielverbindung der Elutionsgradient wie folgt angepasst: 0-2 min 99,0% A ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ), 2-7 min 99,0% A  $\rightarrow$  0,0% A ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ), 7-10 min 0,0% A ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ). Für DTPA-bis(EOP-amid) wurde der folgende Gradient verwendet: 0-6 min 80,0% A  $\rightarrow$  0,0% A ( $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ ), 6-10 min 0,0% A ( $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ ).

Weiterhin sind im Folgenden exemplarische HPLC- und TLC-Chromatogramme während der *in-vitro*-Stabilitätsstudien dargestellt, welche die jeweilige Zusammensetzung der Proben anzeigen. Eine graphische Darstellung der Stabilitätswerte aller untersuchten Tracer über die Zeit findet sich als Übersicht in Kapitel 7.3.

6.2.2.1 Identifikation der  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe mittels HPLC-Analyse

Radiomarkierung von EO-HBED

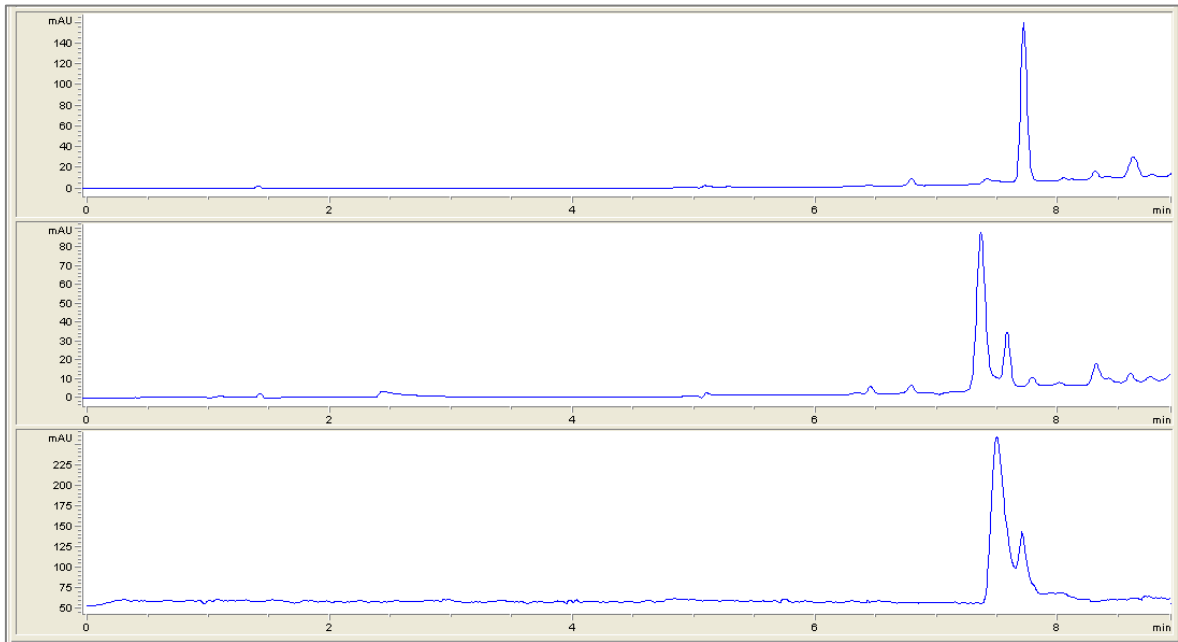


Abb. S1. HPLC-Chromatogramm des Liganden EO-HBED (254nm, oben) und des Komplexes  $[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED (254nm, Mitte) sowie Radio-HPLC-Spur des  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED (unten).

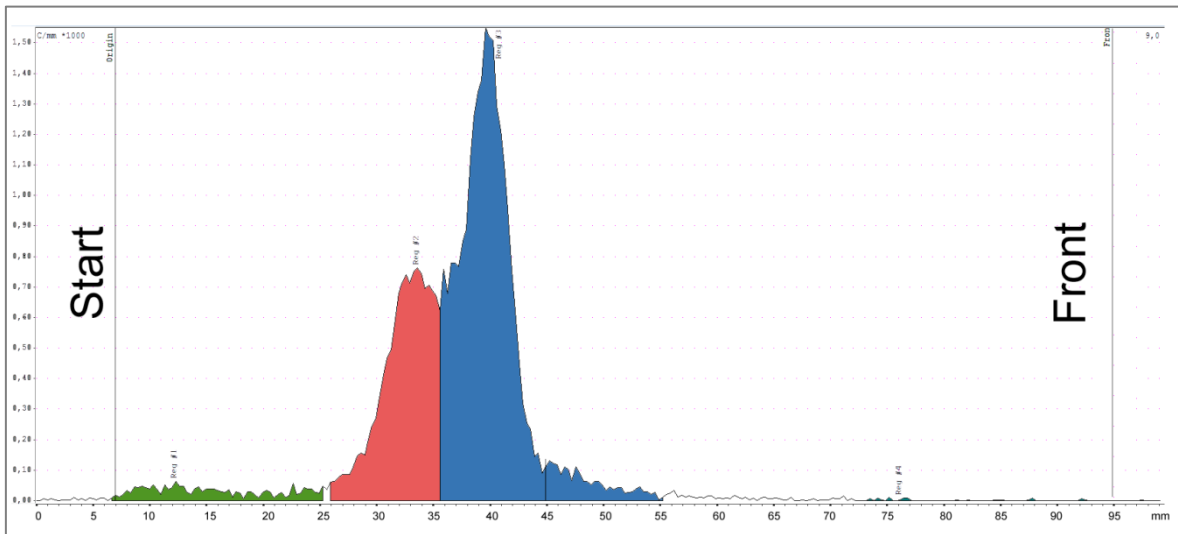


Abb. S2. Radio-TLC-Chromatogramm von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED (Streifenlänge 100 mm).



**Radiomarkierung von EOB-Dedpa**



Abb. S3. HPLC-Chromatogramm des Liganden EOB-Dedpa (254nm, oben) und des Komplexes  $[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-Dedpa}$  (254nm, Mitte) sowie Radio-HPLC-Chromatogramm des  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-Dedpa}$  (unten).

**Radiomarkierung von EO<sub>2</sub>B-Dedpa**

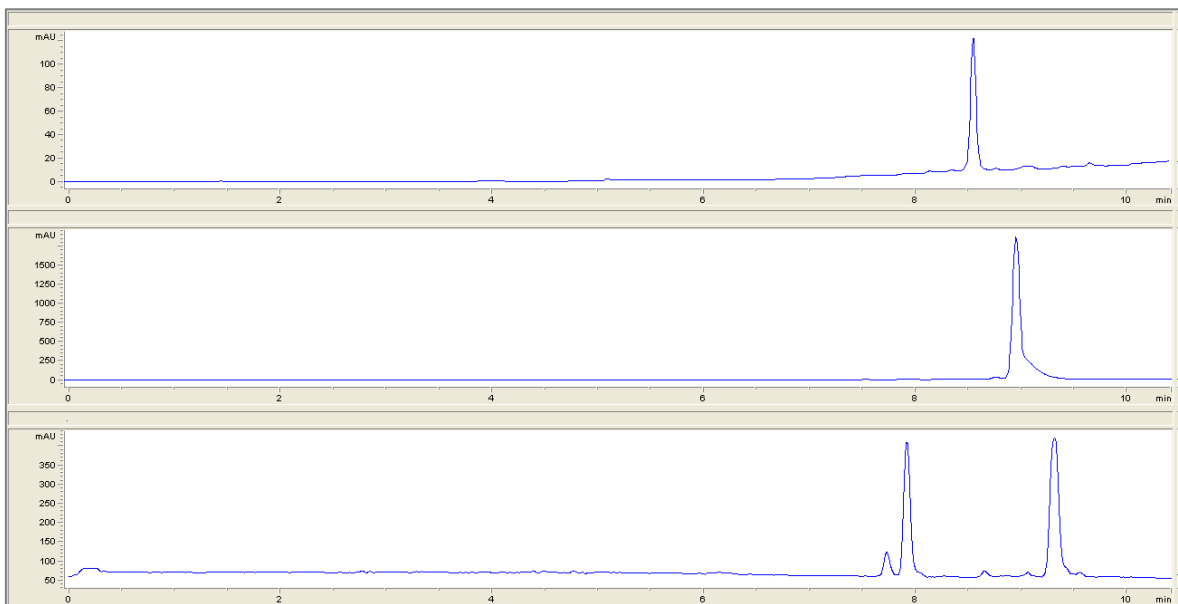


Abb. S4. HPLC-Chromatogramm des Liganden EO<sub>2</sub>B-Dedpa (254 nm, oben) und des Komplexes  $[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO}_2\text{B-Dedpa}$  (254 nm, Mitte) sowie Radio-HPLC-Chromatogramm des  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO}_2\text{B-Dedpa}$  (unten). Als Zielkomplex wurde die Spezies mit der längeren Retentionszeit (9,2 min) identifiziert, bei den beiden Produkten bei ca. 8 min handelt es sich um Nebenprodukte der Radiomarkierung.

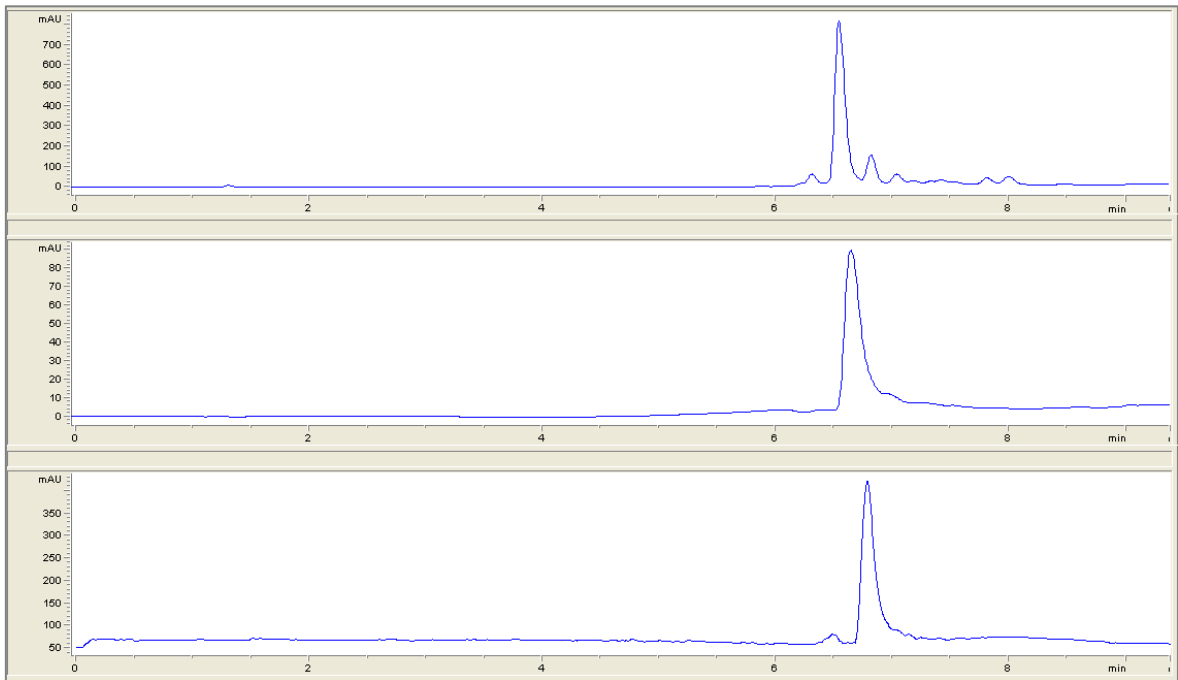
**Radiomarkierung von EOB-DATA**

Abb. S5. HPLC-Chromatogramm des Liganden EOB-DATA (254nm, oben) und des Komplexes  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-DATA}$  (254nm, Mitte) sowie Radio-HPLC-Chromatogramm des  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-DATA}$  (unten).

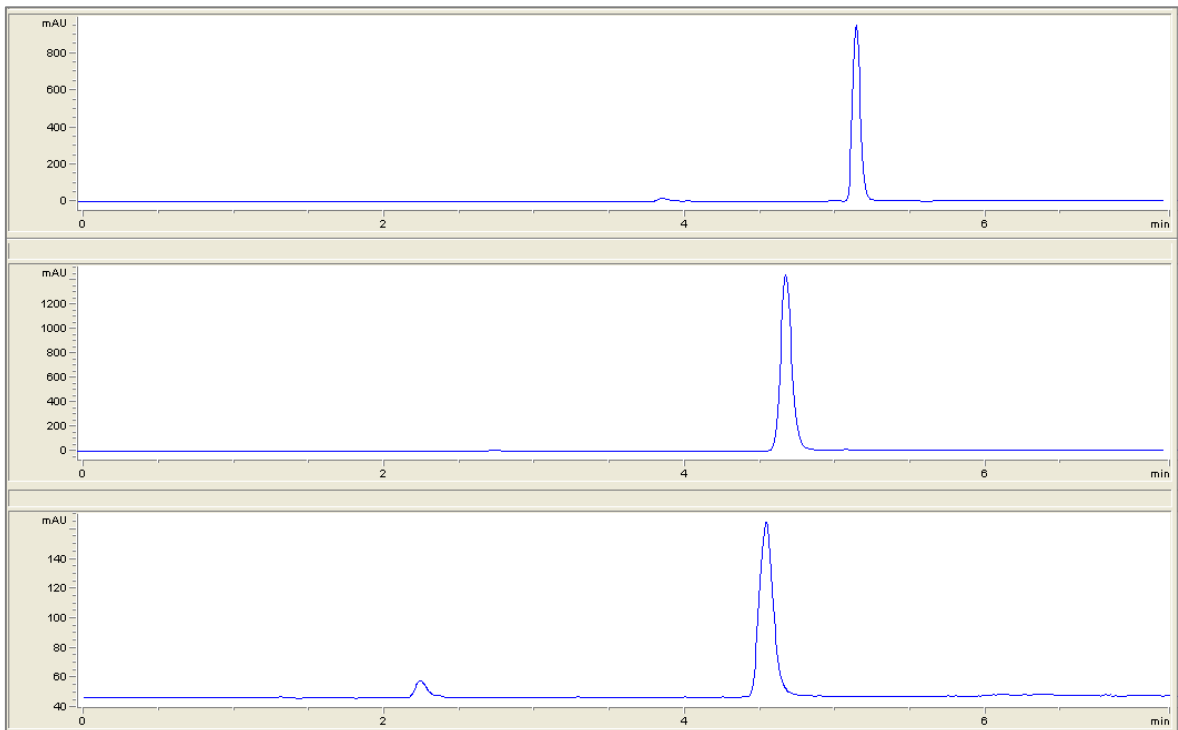
**Radiomarkierung von DTPA-bis(EOP-amid)**

Abb. S6. HPLC-Chromatogramm des Liganden DTPA-bis(EOP-amid) (254nm, oben) und des Komplexes  $[\text{}^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-DTPA-bis(EOP-amid)}$  (254nm, Mitte) sowie Radio-HPLC-Chromatogramm des  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-DTPA-bis(EOP-amid)}$  (unten).

6.2.2.2 HPLC- und TLC-Analyse während der *in-vitro*-Stabilitätsstudien

***In-vitro*-Stabilität von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED**

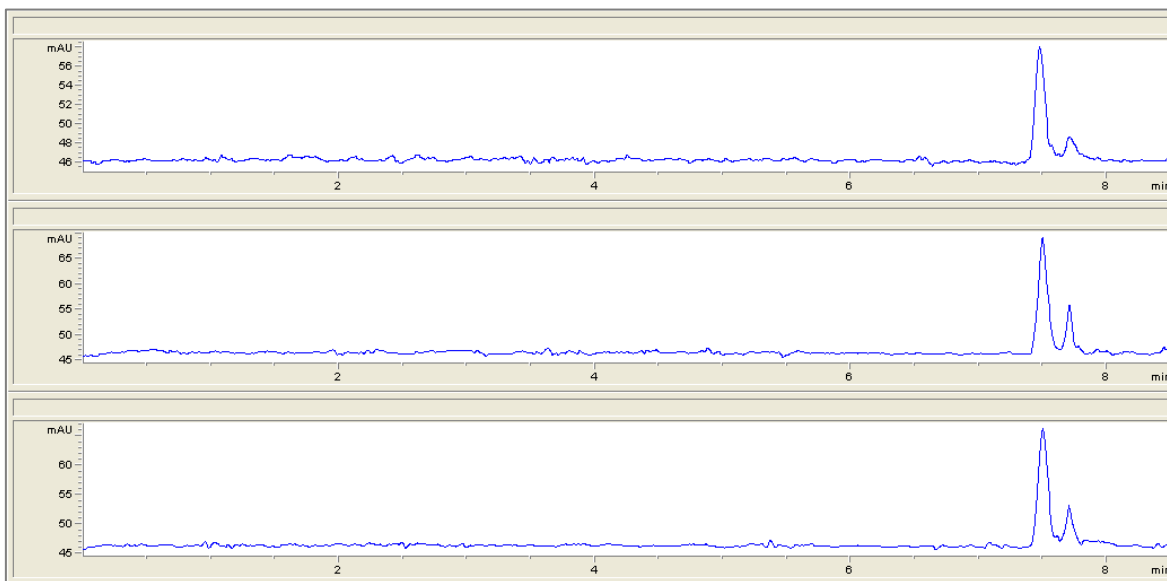


Abb. S7. Inkubation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED in Serum: Radio-HPLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 60, 100 und 160 min (von oben nach unten).

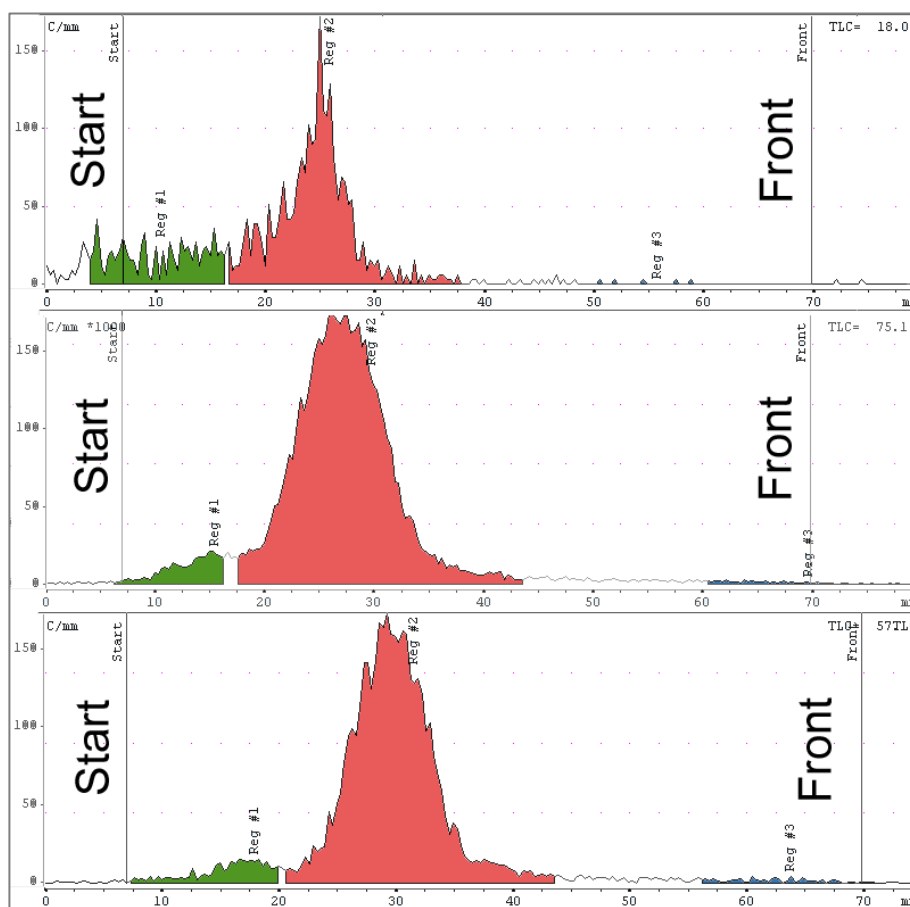


Abb. S8. Inkubation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED in Serum: Radio-TLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 60, 100 und 220 min (von oben nach unten).

**In-vitro-Stabilität von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa**

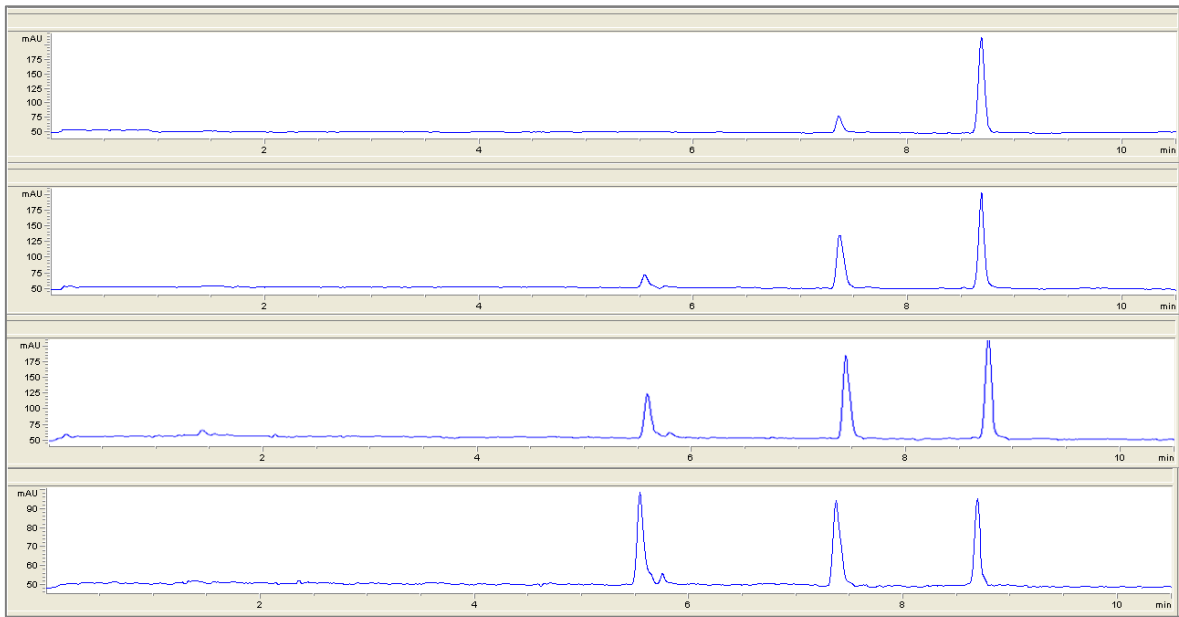


Abb. S9. Inkubation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa in PBS: Radio-HPLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 20, 60, 100 und 180 min (von oben nach unten).

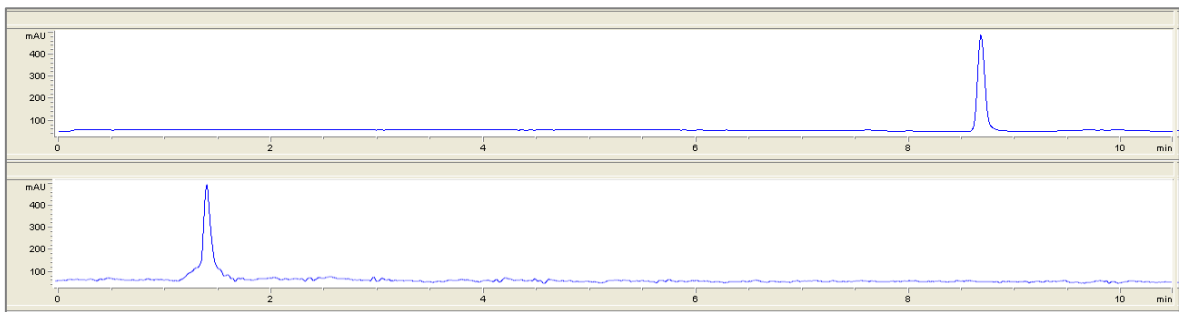


Abb. S10. Inkubation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa in Serum: Radio-HPLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 0 und 60 min (von oben nach unten).

## 6 Weitere Ergebnisse

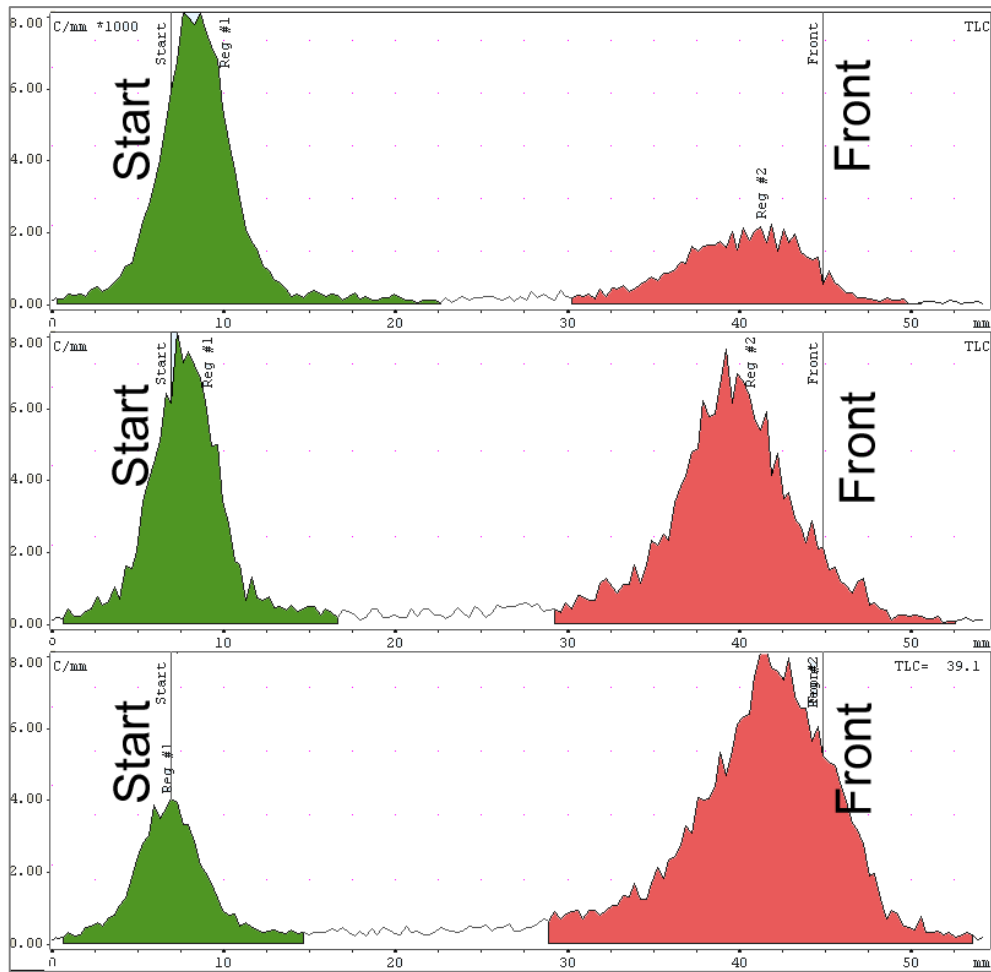


Abb. S11. Inkubation von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-Dedpa}$  in Serum: Radio-TLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 20, 40 und 60 min (von oben nach unten).

**In-vitro-Stabilität von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO}_2\text{B-Dedpa}$**

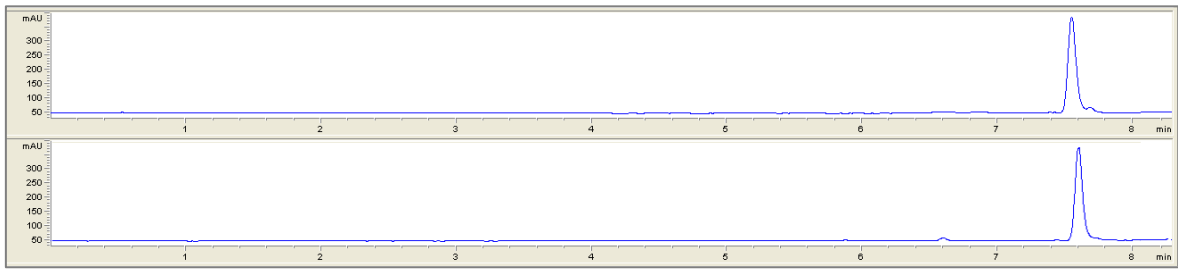


Abb. S12. Inkubation von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO}_2\text{B-Dedpa}$  in PBS: Radio-HPLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 40 und 180 min (von oben nach unten).

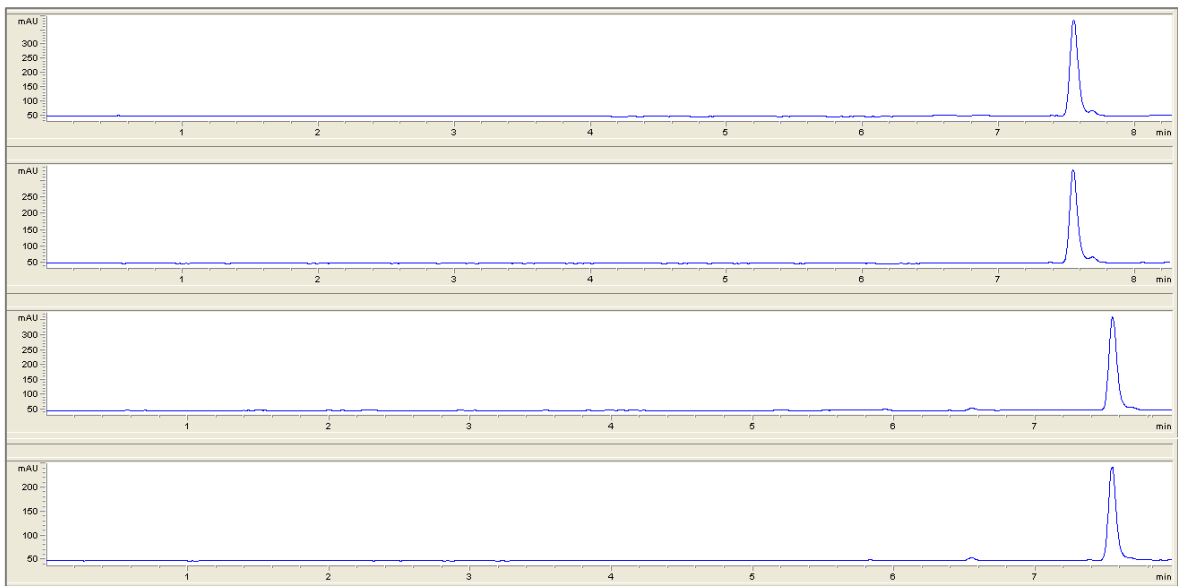


Abb. S13. Inkubation von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO}_2\text{B-Dedpa}$  in Serum: Radio-HPLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 40, 60, 100 und 180 min (von oben nach unten).

## 6 Weitere Ergebnisse

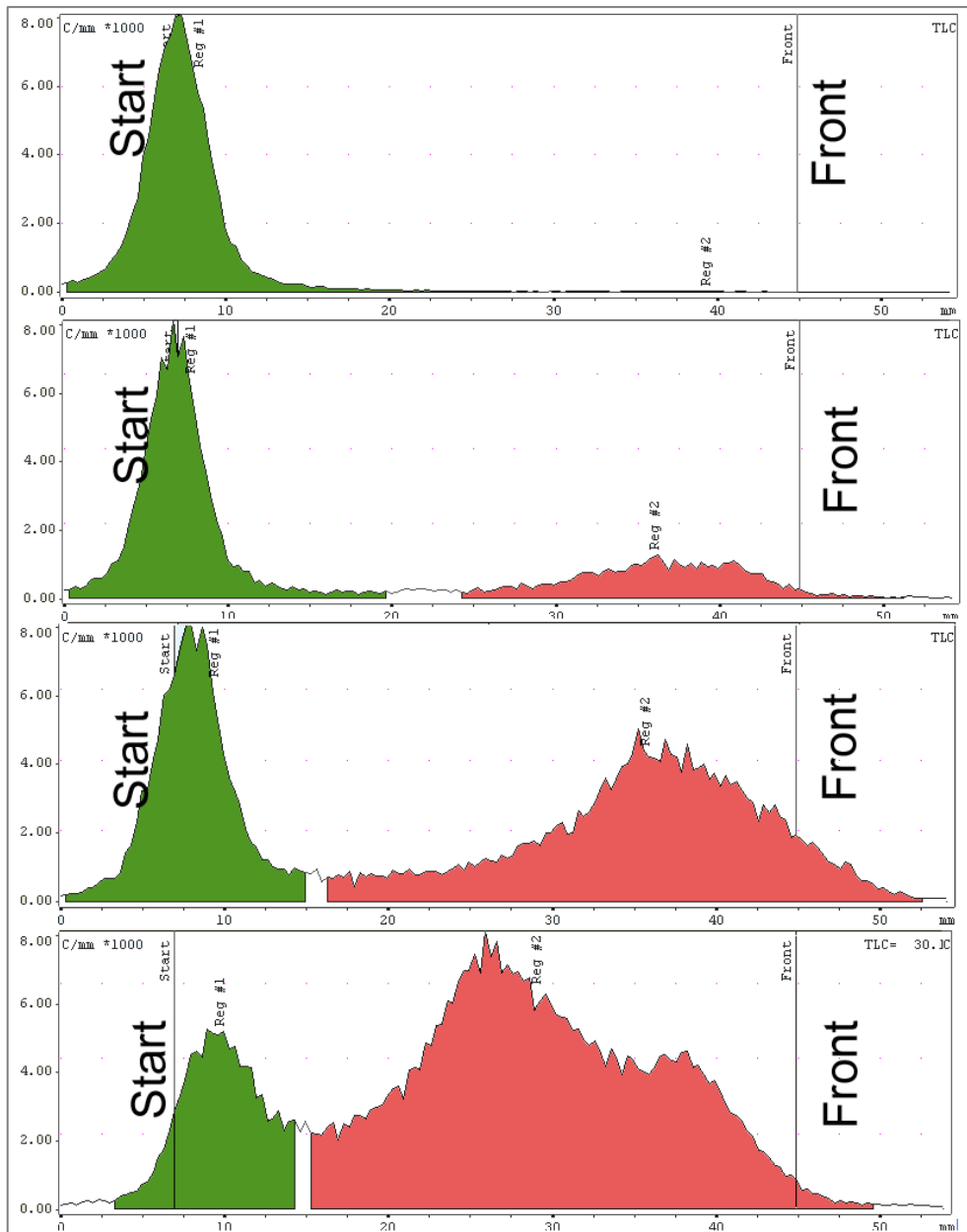


Abb. S14. Inkubation von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO}_2\text{B-Dedpa}$  in Serum: Radio-TLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 0, 60, 120 und 180 min (von oben nach unten).



**In-vitro-Stabilität von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DATA**

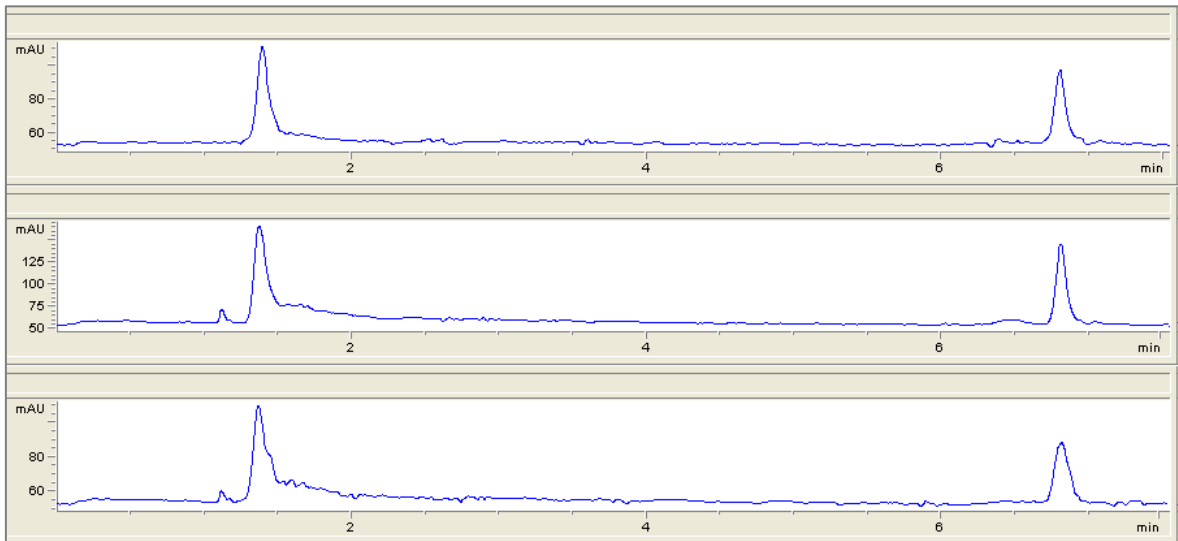


Abb. S15. Inkubation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DATA in Serum: Radio-HPLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 10, 60 und 110 min (von oben nach unten).

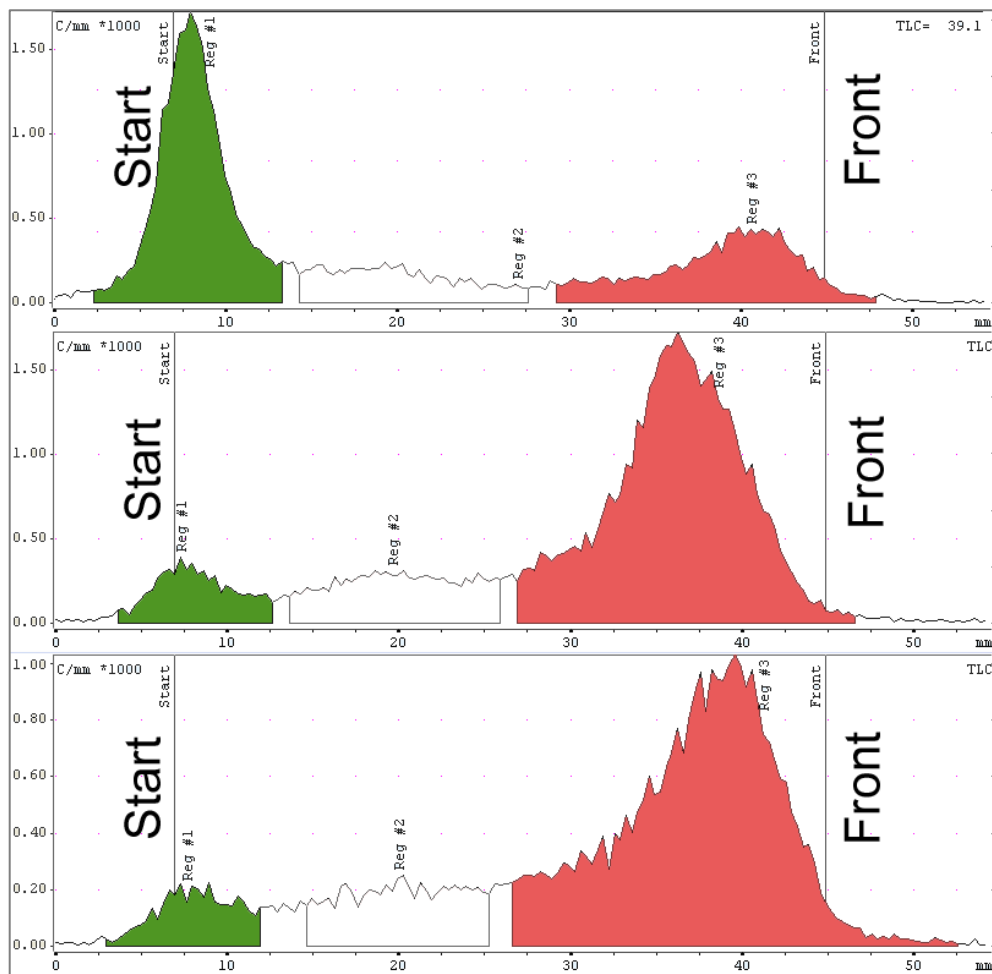


Abb. S16. Inkubation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DATA in Serum: Radio-TLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 10, 60 und 110 min (von oben nach unten).

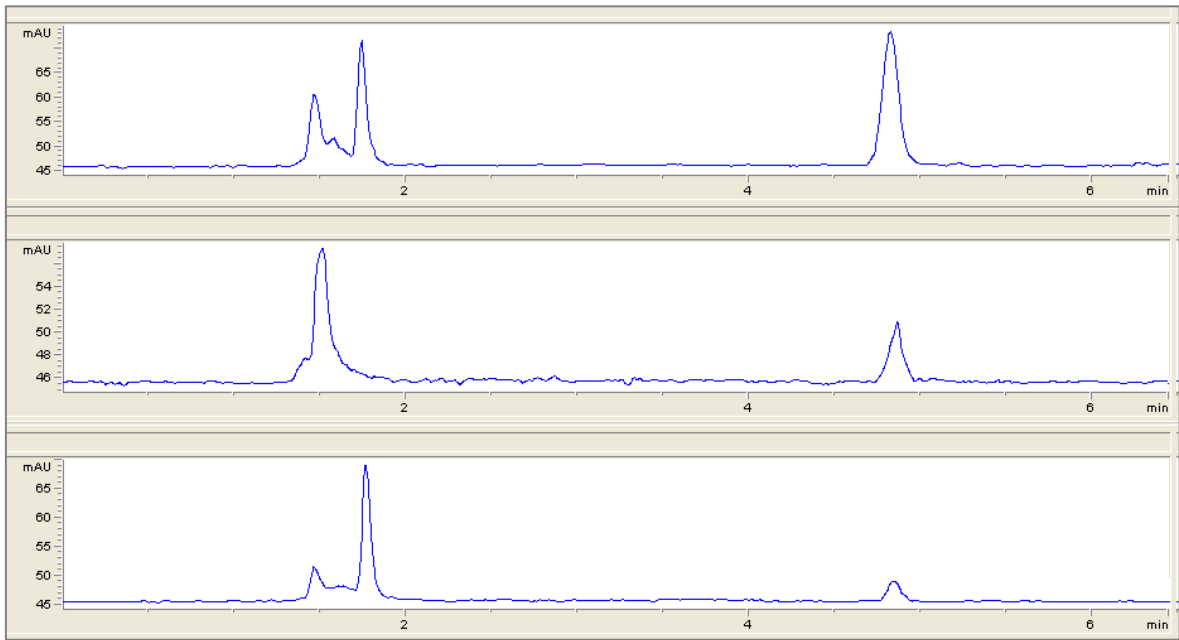
**In-vitro-Stabilität von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-DTPA-bis(EOP-amid)}$** 

Abb. S17. Inkubation von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-DTPA-bis(EOP-amid)}$  in Serum: Radio-HPLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 60, 90 und 180 min (von oben nach unten).

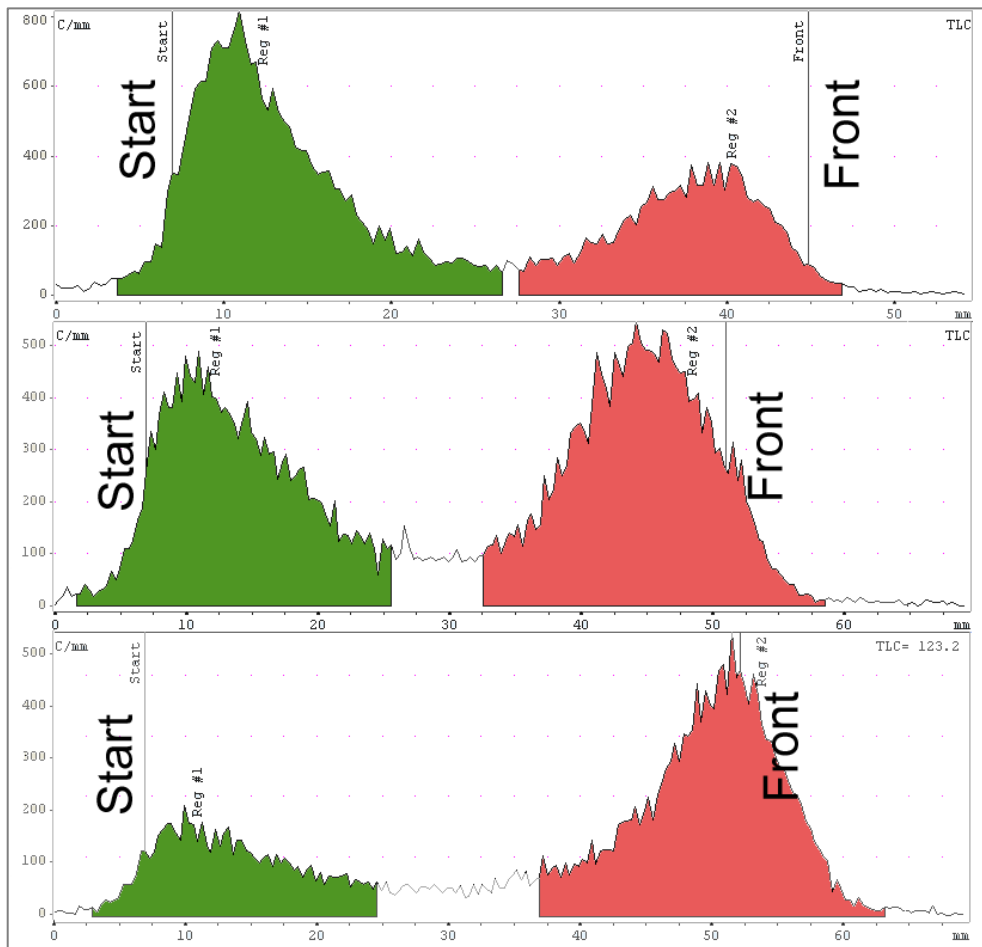


Abb. S18. Inkubation von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-DTPA-bis(EOP-amid)}$  in Serum: Radio-TLC-Chromatogramme von Aliquoten nach 30, 90 und 180 min (von oben nach unten).

### 6.2.3 In-ovo-Bildgebung mit PET/CT

Aufgereinigte und mit PBS-verdünnte Aliquote von [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED und [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-EOB-DTPA (jeweils 10 MBq) wurden bebrüteten Straußenembryonen zwischen Bruttag 34-38 appliziert. Zum Vergleich wurde ebenfalls ein Aliquot von 10 MBq [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-chlorid appliziert, um die Aktivitätsverteilung von chelatorfreiem  $^{68}\text{Ga}$ , welches bei Demetallierung instabiler Radiotracer gebildet würde, darzustellen (vgl. P3).

Die Präparation der Straußeneier erfolgte durch Öffnen eines Fensters in der Kalkschale des Eies unmittelbar vor der Untersuchung. Dabei wurde besonders vorsichtig vorgegangen, um die darunterliegende Eihaut nicht zu verletzen. Mit Hilfe einer dünnen Kanüle oder Flexüle wurde ein möglichst großes Versorgungsgefäß (*vena vitellina*) punktiert. Diese Gefäße verlaufen vom Dottersack zum Embryo (Abb. 12). Durch regelmäßiges Spülen des Zugangs mit kleinen Mengen (ca. 0,1-0,2 ml) einer Heparinlösung zur Hemmung der Blutgerinnung wurde ein Verschließen des Gefäßes verhindert.

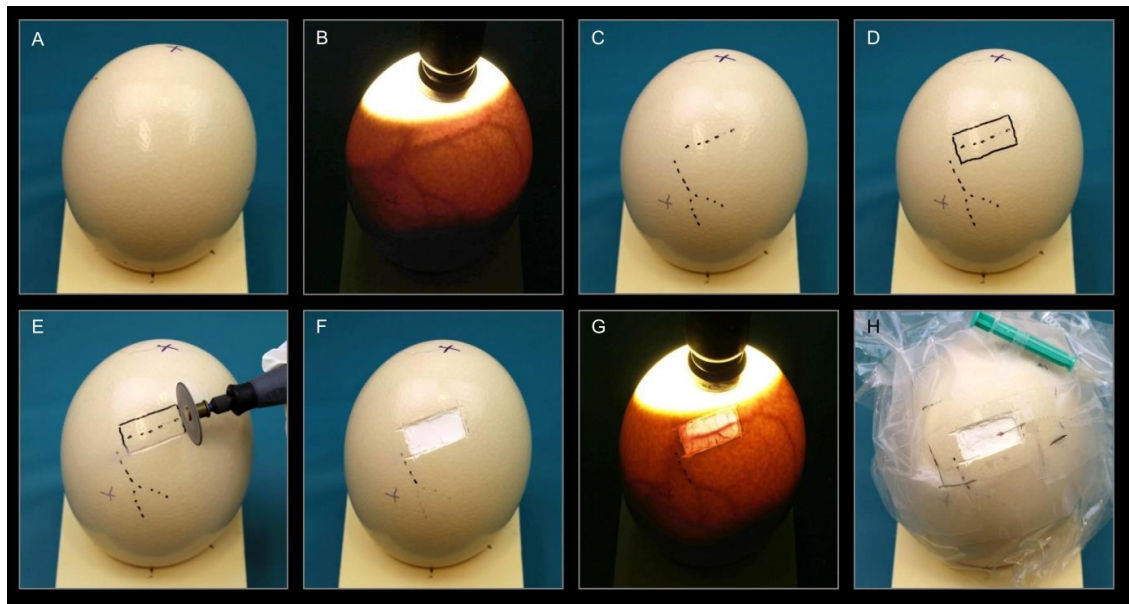


Abb. 12. Präparation eines Straußeneis. A Platzierung auf Unterlage. B Sichtbarmachung von Gefäßen mittels Schierlampe. C Anzeichnen der Gefäße auf der Eischale. D Markierung eines Bereiches zur Fenestrierung. E Fenestrierung mittels Rotationsschneider. F Entfernen der Eischale. G Wiederholte Sichtbarmachung von Gefäßen mittels Schierlampe zur Identifizierung der Punktionsstelle. H Punktion und Befestigung einer Kanüle (Freesmeyer et al. 2018).

Nach der Platzierung des Eies im PET/CT-Scanner erfolgte die Applikation des jeweiligen  $^{68}\text{Ga}$ -Tracers unmittelbar nach dem Start einer dynamischen List-Mode-

Akquisition, die über 90 min erfolgte. Diese in der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Jena entwickelte neuartige Methode der *in-ovo*-PET/CT-Bildgebung wurde kürzlich publiziert und ist ebenso in P3 dargelegt (Freesmeyer et al. 2018).

## 7 Zusammenfassende Diskussion

---

### 7.1 Strukturen und Synthese der Liganden

Der Vorteil der DTPA-bis(alkoxyphenylamide) (P1) ist ihre Zugänglichkeit über eine Zweistufensynthese ausgehend von DTPA-bisanhydrid. Durch den Einsatz verschieden substituierter Phenylamine bei der Reaktion kann die Lipophilie der Liganden variiert werden, was die gezielte Beeinflussung der Lebergängigkeit der daraus synthetisierten  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer ermöglicht. Die zehnstufige Synthese von EOB-DTPA ist hingegen deutlich aufwändiger und die hepatotrope EOB-Einheit wird bereits zu Beginn in der Struktur verankert (Schmitt-Willich et al. 1999). Daher ist dieser Ligand nur schwer hinsichtlich des Lipophiliegrades modifizierbar. Um EOB-DTPA für  $^{68}\text{Ga}$ -Markierungsversuche schnell und effizient zu gewinnen, wurde der Ligand direkt aus dem kommerziell verfügbaren MRT-Kontrastmittel Primovist® durch quantitatives Ausfällen des Zentralions  $\text{Gd}^{3+}$  in Form eines Oxalatkomplexes isoliert (P2). Diese auf der DTPA-Struktur basierenden, azyklischen Aminocarboxylate haben sich, wie in nachfolgenden Kapiteln diskutiert, aufgrund der mangelnden Stabilität der  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer als wenig geeignete Liganden erwiesen. Infolgedessen wurden die für die Koordination von  $^{68}\text{Ga}$  vielseitig verwendeten, auf Ethylendiamin (EDA) basierenden Chelatoren HBED und Dedpa als Ligandengerüst ausgewählt und mit EOB- bzw. EOB-ähnlichen Struktureinheiten für eine hohe Leberspezifität erweitert. Diese Modifikation erfolgte beim HBED durch jeweils eine zusätzliche Ethoxy-(EO)-gruppe an den Benzylringen (EO-HBED), bei den Dedpa-basierten Liganden durch jeweils zwei EOB- bzw.  $\text{EO}_2\text{B}$ -Gruppen an den Stickstoffatomen des EDA-Gerüsts.

Für die Synthese der Liganden EO-HBED (Schema 1, Kap. 6.2.1.1), EOB-Dedpa und  $\text{EO}_2\text{B}$ -Dedpa (Schema 2, Kap. 6.2.1.2) wurden die primären Aminogruppen des EDA im ersten Schritt stets durch indirekte reduktive Alkylierung (über die jeweilige Schiffsche Base als Zwischenstufe) mit den entsprechend substituierten Alkoxybenzaldehyden monoalkyliert. Im Anschluss erfolgte die zweite *N*-Alkylierung am EDA-Gerüst mit den entsprechenden Alkylbromiden (*tert*-Butylbromacetat für EO-HBED, **5** für die Dedpa-Derivate), wobei die Carboxygruppen in diesem Schritt geschützt als Ester vorlagen. Im Falle des EO-HBED erfolgte die *N*-Alkylierung des Ausgangsstoffes **1** zur Isolierung von **2** in

verhältnismäßig guten Ausbeuten (31%) in Gegenwart ungeschützter phenolischer OH-Gruppen. Dies wurde durch die Verwendung von THF als Lösemittel sowie der vergleichsweise ungewöhnlichen Base  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in Analogie zu einer publizierten Methode ermöglicht (Cleeren et al. 2016). Dieser Synthesepfad erspart zwei Reaktionsschritte; namentlich die Einführung einer Schutzgruppe für die phenolische OH-Gruppe (z. B. Silylether) und deren spätere Abspaltung.

Die Entschützung der Carboxygruppen erfolgte für EO-HBED und EOB-Dedpa durch saure Esterhydrolyse mit 4,0 M HCl. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass der Ligand als Hydrochlorid direkt aus der Reaktionslösung oder durch Umkristallisation gewonnen werden konnte. Dahingegen wurde bei Versuchen zur sauren Esterhydrolyse für die Isolierung von  $\text{EO}_2\text{B}$ -Dedpa und EOB-DATA der Zerfall des Ligandengerüsts beobachtet. Als Hauptfraktionen wurden nach der Reaktion Hydrochloride der Picolinateinheit (für  $\text{EO}_2\text{B}$ -Dedpa) bzw. der DAZA-Einheit (für EOB-DATA)  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch nachgewiesen, während keine Signale der  $\text{EO}_2\text{B}$ - bzw. EOB-Substituenten mehr identifizierbar waren. Daher wurde als Alternative eine basische Verseifung unter Verwendung eines Überschusses von LiOH gewählt, was schließlich die Isolierung von  $\text{EO}_2\text{B}$ -Dedpa und EOB-DATA in guten Ausbeuten ermöglichte. Das überschüssige LiOH wurde nach dem Ende der Reaktion und anschließendes Ansäuern des Rohproduktes mit Salzsäure in Form von LiCl chromatographisch über eine reverse C18-Phase abgetrennt.

Die Synthesewege zu EO-HBED, EOB-Dedpa,  $\text{EO}_2\text{B}$ -Dedpa und EOB-DATA umfassen also stets eine mehrfache, heterogene Alkylierung der Stickstoffatome des jeweiligen, das Grundgerüst bildenden, Amins (EDA bzw. DAZA) mit mindestens einer rein koordinativen Einheit (Carboxylate bzw. Picolinate) sowie der charakteristischen EOB- bzw.  $\text{EO}_2\text{B}$ -Einheit, welche bei EO-HBED zusätzlich durch eine phenolische OH-Gruppe funktionalisiert ist. Zur schrittweisen Einbringung dieser Struktureinheiten ist eine mehrstufige Schutzgruppenstrategie erforderlich. Ein im Vergleich dazu sehr simpler Syntheseweg ermöglicht hingegen die Isolierung der mit 4-Alkoxy-2-hydroxybenzylgruppen trialkylierten Makrozyklen TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA (P3). Diese neuartigen Liganden weisen keine Carboxygruppen mehr auf, die Koordinationsfähigkeit wird stattdessen ausschließlich durch die Aminophenolatstruktur gewährleistet. Die durch eine OH-

Gruppe erweiterte EOB-Einheit erhält hier, wie auch bereits im EO-HBED, somit zugleich leberspezifische als auch koordinierende Funktion, aus „EOB“ wird „EOHB“ (bzw. EtOHB, vgl. P3). Aminophenolate sind hinsichtlich ihrer Eignung als Liganden für Ga<sup>III</sup> schon lange erwiesen, Ansätze umfassen z. B. Strukturen auf Grundlage des azyklischen Tris(2-aminoethyl)amin (TREN, Liu et al. 1992, Sahoo et al. 2009, Karpishin et al. 1993b, Karpishin et al. 1993a, Albrecht et al. 1994, Baret et al. 1997, Cohen et al. 1999, Launay et al. 2001, Jurchen und Raymond 2006, Lukas et al. 2013, Schramm et al. 2013) und anderer Polyethylenamine (Madsen et al. 1992, Caravan und Orvig 1997, Roesch et al. 2014, Silva et al. 2015), Salicylaldimine (Green et al. 1984, Evans und Jakubovic 1988, Wei und Atwood 1998, Tarkia et al. 2012, Lange et al. 2016) sowie siderophorartige (Stack et al. 1992, Karpishin et al. 1993b, Silva et al. 2015) und naphtholderivatisierte Strukturen (Baret et al. 1998). Untersuchungen zur Radiomarkierung dieser Liganden mit <sup>68</sup>Ga sind bis jetzt jedoch eher selten und umfassen vor allem Salicylaldimine (Green et al. 1985b, Hsiao et al. 2009, Yang et al. 2010, Thews et al. 2010, Mendes et al. 2011, Tarkia et al. 2012, Sharma et al. 2014). Insofern stellen TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA nicht nur neue Liganden sondern einen neuen zyklischen Chelatorotyp für <sup>68</sup>Ga dar (Abb. 13, **A**).

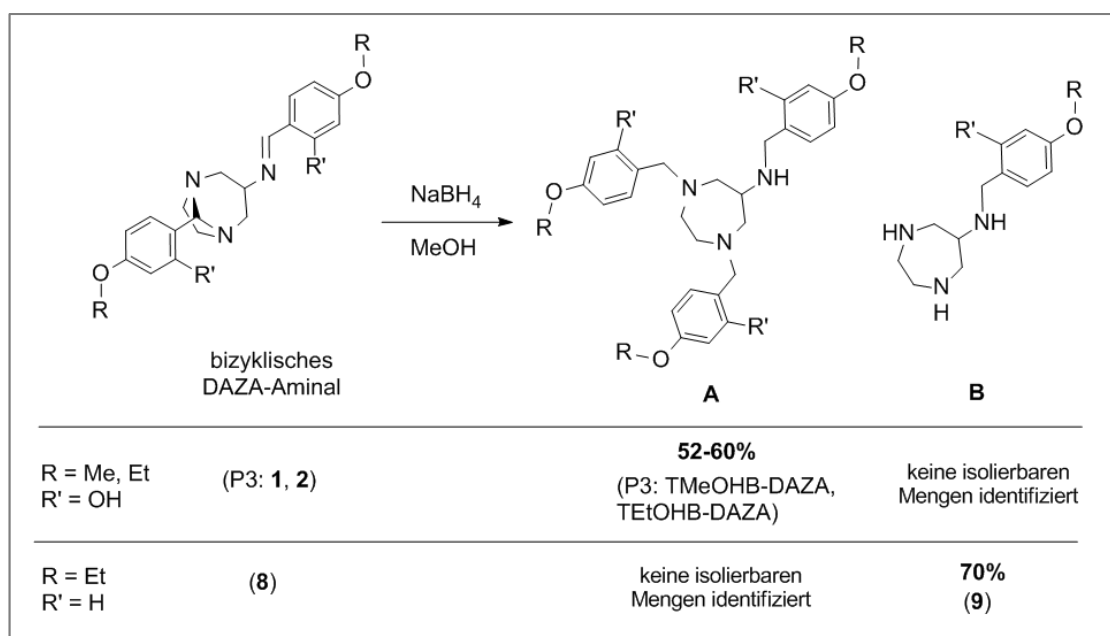


Abb. 13: Ausbeuten des trialkylierten (**A**) bzw. des monoalkylierten Produktes (**B**) bei der Reduktion bicyclischer DAZA-Aminale in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster (R und R') am Aromaten.



Im Gegensatz zur häufig notwendigen mehrstufigen Schutzgruppenstrategie sind diese Liganden über eine Ein-Topf-Synthese zugänglich, die lediglich DAZA, den entsprechenden Aldehyd und  $\text{NaBH}_4$  erfordert. Die Eleganz, Einfachheit und Effektivität dieser Synthese verlangte eine eingehendere Untersuchung ihres zugrundeliegenden Mechanismus. In P3 ist diese ungewöhnlich selektive, reduktive Alkylierung, die ausgehend von einem entsprechenden bicyklischen DAZA-Aminal in hohen Ausbeuten (52-60%) zu den trialkylierten DAZA-Zyklen (Abb. 13, **A**) führt, ausführlich diskutiert. Es zeigte sich weiterhin, dass die Selektivität hinsichtlich des *N*-Alkylierungsgrades der Produkte **A** und **B** vom Substitutionsmuster am Benzylring beeinflusst wird. Bei Abwesenheit der phenolischen Hydroxygruppe ( $\text{R}=\text{Et}$ ,  $\text{R}'=\text{H}$ ) bildete sich so aus dem bicyklischen DAZA-Aminal **8** (Abb. 14) das monoalkylierte *N*-EOB-DAZA (**9**) als Hauptprodukt **B** (Abb. 13). Ein *N*,1,4-trialkylierter DAZA-Zyklus **A** hingegen konnte mit diesem Substitutionsmuster nicht identifiziert werden. Aus *N*-EOB-DAZA (**9**) wurde durch *N*-Alkylierung mit *tert*-Butylbromacetat und anschließende Entschützung das Aminocarboxylat EOB-DATA gewonnen (Schema 3, Kap. 6.2.1.3).

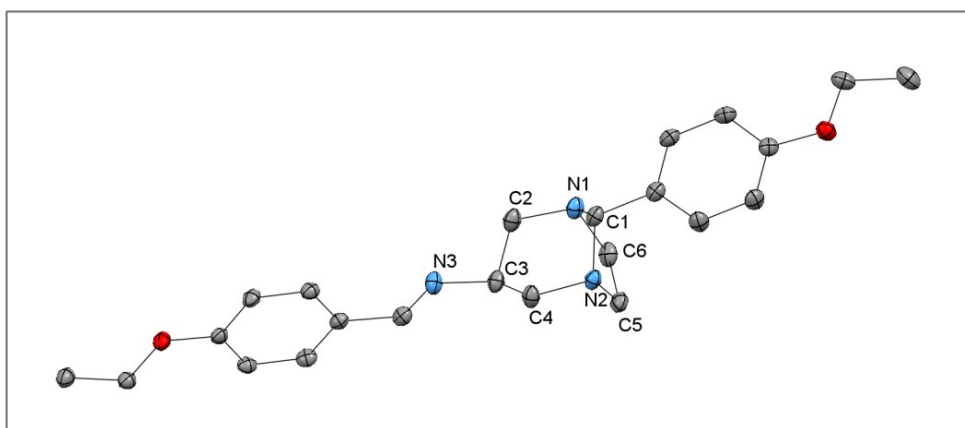


Abb. 14. Struktur des EOB-substituierten bicyklischen DAZA-Aminals **8** (Ausgangsstoff für EOB-DATA) im Kristall (ORTEP, Ellipsoide der thermischen Schwingung mit 30% Aufenthaltswahrscheinlichkeit). Wasserstoffatome sind zum Zweck der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Der postulierte Mechanismus der reduktiven Alkylierung beschreibt die Insertion einer *in-situ* freigesetzten Carbonylspezies in die verbrückende C-N-Aminalbindung, was zur Bildung eines intermediären Halbaminals und anschließender Reduktion zum *N*,1,4-trialkylierten DAZA-Zyklus **A** führt (P3). Hingegen wird bei der Bildung der monoalkylierten DAZA-Zyklen (**B**) die

Aminalbrücke reaktiv abgespalten. Die nachgewiesene unterschiedliche Selektivität der Reaktion bei Gegenwart (Bildung von **A**) bzw. Abwesenheit (Bildung von **B**) der phenolischen Hydroxygruppe lässt vermuten, dass diese Gruppe die Bildung von intermediären Halbaminale und damit die Bildung von **A** begünstigt. Ursache hierfür könnte zum einen ein dirigierender Effekt bei der Insertion der Carbonylkomponente sein. Zum anderen könnte die Hydroxygruppe im Halbaminal unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken auch stabilisierend auf das Intermediat wirken (Abb. 15).

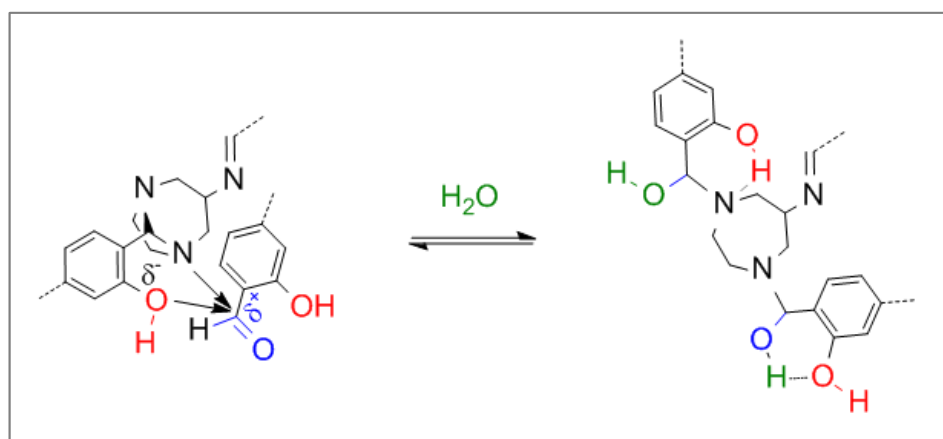


Abb. 15. Vor C-N-Insertion (links): Dirigierende Funktion der phenolischen Hydroxygruppe (rot) bei Näherung der Carbonylspezies (blau). Nach C-N-Insertion und Bildung des Halbaminals (rechts): Stabilisierende Funktion durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der phenolischen Hydroxygruppe (rot) und Struktureinheiten des Halbaminals (dem Aminstickstoffatom oder der OH-Einheit).<sup>3</sup>

Zusammenfassend wurde somit eine Reihe von EOB, EO<sub>2</sub>B- bzw. EOHB-funktionalisierten Liganden isoliert, die sich hinsichtlich ihrer Koordinationseigenschaften basierend auf unterschiedlicher Kombination von Carboxylat-, Picolinat-, Phenolat- und Amindonoren unterscheiden, sowie auch hinsichtlich ihrer Natur als azyklische bzw. zyklische Chelatoren. Abgesehen von EOB-DTPA (Anzahl der Donoren = 8) handelt es sich bei den Strukturen durchweg um hexakoordinierende Liganden, welche somit die bevorzugte Koordinationszahl des Ga<sup>III</sup> erfüllen können.

<sup>3</sup> Die Alkoxy substituenten sowie die Struktur des Imin substituenten sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur durch gestrichelte Linien angedeutet.

## 7.2 [<sup>nat</sup>Ga] und [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexsynthesen und -analytik

Neben den hierin diskutierten [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexen wurden stets die nicht radioaktiven [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe synthetisiert (z. B. [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa, Abb. 16). Die Identität dieser Komplexe konnten unter anderem mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie aufgrund der charakteristischen geminalen Kopplungsmuster (<sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 12-18 Hz) im Bereich der aliphatischen Methylen- und Ethylenprotonen verifiziert werden. Darüber hinaus erfolgte die vollständige Analyse mittels <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Elementaranalyse. Die [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe wurden stets auch einer HPLC-Analyse unterzogen und der Produktpeak als Referenz genutzt, um die Identität des entsprechenden radioaktiven [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexes zu bestätigen.

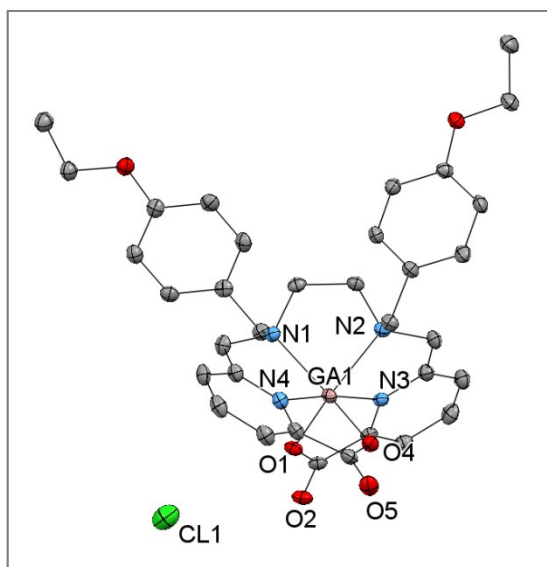


Abb. 16. Struktur im Kristall (ORTEP, Ellipsoide der thermischen Schwingung mit 30% Aufenthaltswahrscheinlichkeit) von [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa. Wasserstoffatome sind zum Zweck der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Im Allgemeinen sind die untersuchten [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe in Wasser gering bis schwer löslich.<sup>4</sup> Dies ist vor allem für die neutral geladenen Komplexe der Liganden TEOHB-DAZA, TMeOHB-DAZA und EOB-DATA sowie sämtlicher DTPA-bis(alkoxyphenylamide) zu beobachten. Auch die Verbindungen [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED und [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO<sub>2</sub>B-Dedpa lösten sich nur zu geringen Teilen in Wasser, sodass lediglich von [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa und [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DTPA die NMR-spektroskopische Untersuchung in D<sub>2</sub>O erfolgen konnte, während für die

<sup>4</sup> Entsprechend einer Löslichkeit von max. 10 mg/ml.

anderen Verbindungen auf weniger polare Lösemittel wie MeOH-d<sub>4</sub> und DMSO-d<sub>6</sub> ausgewichen werden musste. Die geringe Löslichkeit im Wässrigen ist in der Anwendung der [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe als PET-Tracer jedoch kein zu erwartendes Hindernis, da aufgrund der niedrigen Konzentrationen des Radiometalls (im pico- bis nanomolaren Bereich) ein Erreichen der Löslichkeitsprodukte unwahrscheinlich ist.

Die Löslichkeit kann bereits ein Hinweis auf den lipophilen Charakter der [<sup>nat</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe sein. Eine dedizierte Bestimmung der Lipophilie in Form der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP) würde einen Vergleich der Komplexe untereinander gestatten. Jedoch besitzt der logP-Wert nur eine limitierte Voraussagekraft bezüglich der *in-vivo*-Verteilung und hepato-spezifischen Aufnahme eines <sup>68</sup>Ga-Tracers, da die Leber aufgrund der erwähnten unterschiedlichen Aufnahmesysteme (z. B. OATP, NTCP, passive Diffusion (Testa et al. 2015, Testa et al. 2017)) Substanzen mit unterschiedlich ausgeprägter Lipophilie und verschiedener Gesamtladung aufzunehmen vermag. Der vergleichsweise hydrophile Gd<sup>III</sup>-EOB-DTPA-Komplex (Primovist®) ist mit einer hepatozytenspezifischen Aufnahme von 50% das beste Beispiel hierfür. Daher wurde auf die Bestimmung und das Vergleichen von logP-Werten der <sup>68</sup>Ga-Tracer verzichtet (mit Ausnahme von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DTPA, vgl. P2). Stattdessen sollte die PET-Bildgebung am *in-ovo*-Modell zuverlässigere Aussagen bezüglich der Leberspezifität liefern. Ein Vergleich der relativen Lipophilie der <sup>68</sup>Ga-Tracer untereinander anhand der HPLC-Retentionszeiten ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1. Auflistung der Retentionszeit (in min, Zeile 1) sowie die Gesamtladung (Zeile 2) der Ga<sup>III</sup>-Komplexe (bei physiologischem pH-Wert) und Art und Anzahl der aromatischen Einheiten (Zeile 3).

EOB-DATA	EOB-DTPA	EO-HBED	DTPA-bis(EOP-amid)	TMeOHB-DAZA	EOB-Dedpa	TEtOHB-DAZA	EO <sub>2</sub> B-Dedpa
6,5	6,7	7,5	7,6	8,0	8,2	8,7	9,3
neutral	-2	-1	neutral	neutral	+1	neutral	+1
1x EOB	1x EOB	2x EOHB	2x EOP	3x MeOHB	2x EOB, 2x Picolinat	3x EOHB	2x EO <sub>2</sub> B, 2x Picolinat

Verwendetes HPLC-System: Eurospher 100-5 C18 (125x4 mm), Gradient: 0-2 min 99,0% A (1 ml min<sup>-1</sup>), 2-10 min 99,0% A → 0,0% A (1 ml min<sup>-1</sup>), 10-12 min 0,0% A (1 ml min<sup>-1</sup>); A: Wasser/TFA (99,9%/0,1%); B: ACN/TFA (99,9%/0,1%).

Der Komplex  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO-HBED}$  zeigt als einzige von allen untersuchten Verbindungen auch nach der Aufreinigung mittels SPE stets zwei nah beieinander liegende Signale im Radio-HPLC-Chromatogramm (Abb. S1). Bei Verwendung eines ausreichend langen Streifens der stationären Phase können auch mittels Radio-TLC-Analyse zwei Signale identifiziert werden (Abb. S2). Um auszuschließen, dass es sich bei einem der Signale um ein Neben- oder Zerfallsprodukt handelte, wurde das Radio-HPLC-Chromatogramm mit dem HPLC-Chromatogramm von  $[^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO-HBED}$  verglichen. Dieses zeigt ebenfalls beide charakteristischen Signale bei gleicher Retention (Abb. S1), sodass die Vermutung naheliegt, dass es sich hierbei um Komplexdiastereomere handelt. Das parallele Vorliegen von RR-, RS- und SS-Diastereomeren aufgrund der Chiralität der koordinierenden N-Donoren des EDA-Gerüsts ist für  $\text{Ga}^{\text{III}}\text{-HBED}$ -Komplexe bekannt (Schuhmacher et al. 1992, Tsionou et al. 2017) und führt zur Detektion mehrerer Signale mittels HPLC (Eder et al. 2014, Tsionou et al. 2017).

Die für die HPLC-Analyse verwendete Probe von  $[^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO-HBED}$  wurde in  $\text{DMSO-d}_6$  NMR-spektroskopisch untersucht. Hierbei konnten keine Hinweise auf vorhandene Diastereomere oder Nebenprodukte erhalten werden, da nur ein einziges Signalset im  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum als auch im  $^{71}\text{Ga}$ -NMR-Spektrum zu beobachten war. Es ist zu vermuten, dass im verwendeten Lösemittel  $\text{DMSO-d}_6$  nur ein Diastereomer bevorzugt vorliegt und weitere Diastereomere erst im wässrigen System des HPLC-Solvens gebildet werden. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung von  $[^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO-HBED}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  war aufgrund der schlechten Löslichkeit der Substanz nicht möglich, jedoch wurden einer Probe von  $[^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO-HBED}$  in  $\text{DMSO-d}_6$  nach der initialen Untersuchung ca. 25%  $\text{D}_2\text{O}$  hinzugefügt und diese anschließend erneut NMR-spektroskopisch analysiert. Hierbei zeigten sich jedoch aufgrund der bereits deutlich herabgesetzten Löslichkeit und somit verminderten Signalintensität im  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum keine eindeutigen Hinweise auf die Bildung eines zweiten Signalsets (Abb. 17).

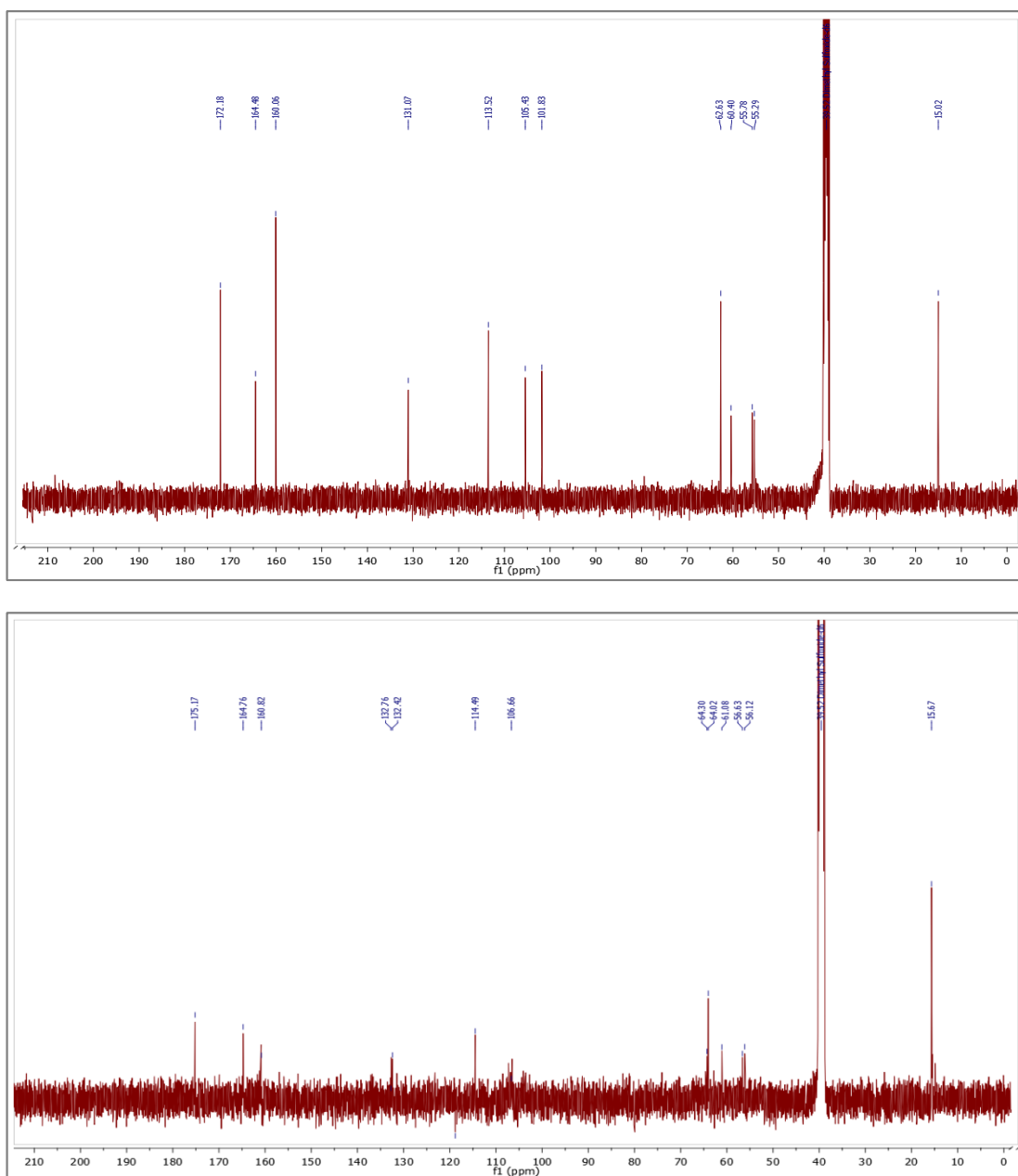


Abb. 17.  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum von  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED in  $\text{DMSO-d}_6$  (oben) und in  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  (4/1) (unten).

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bestätigte durch das Vorhandensein der geminalen Kopplungsmuster ( $^2J_{\text{H,H}} = 12\text{-}18\text{ Hz}$ ), erzeugt durch die in Folge der Koordination an das  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Zentrum inequivalenten Methylenprotonen, weiterhin die Existenz des intakten Komplexes (Abb. 18.). Das Signal des Komplexes im  $^{71}\text{Ga}$ -NMR-Spektrum war nach Zugabe von  $\text{D}_2\text{O}$  zur Probe nicht länger detektierbar. Dies lässt sich mit einer starken Zunahme der Signalhalbwertsbreite erklären, welche mit dem Verlust einer gewissen, zur Signalbildung in der  $^{71}\text{Ga}$ -NMR-Spektroskopie erforderlichen, Symmetrie um den Quadrupolkern  $^{71}\text{Ga}$  einhergeht (Abb. 19, Andre

und Macke 2003). Grund hierfür können Lösemittelleffekte, z. B. erhöhte Fluktuation der Koordinationsumgebung um das  $\text{Ga}^{3+}$ -Zentrum in  $\text{D}_2\text{O}$  gegenüber  $\text{DMSO-d}_6$  sein. Eine ähnliche lösemittelabhängige Halbwertsbreite in  $\text{DMSO-d}_6$  gegenüber  $\text{MeOH-d}_4$  ist auch für die  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe der DAZA-Derivate in P3 beschrieben.

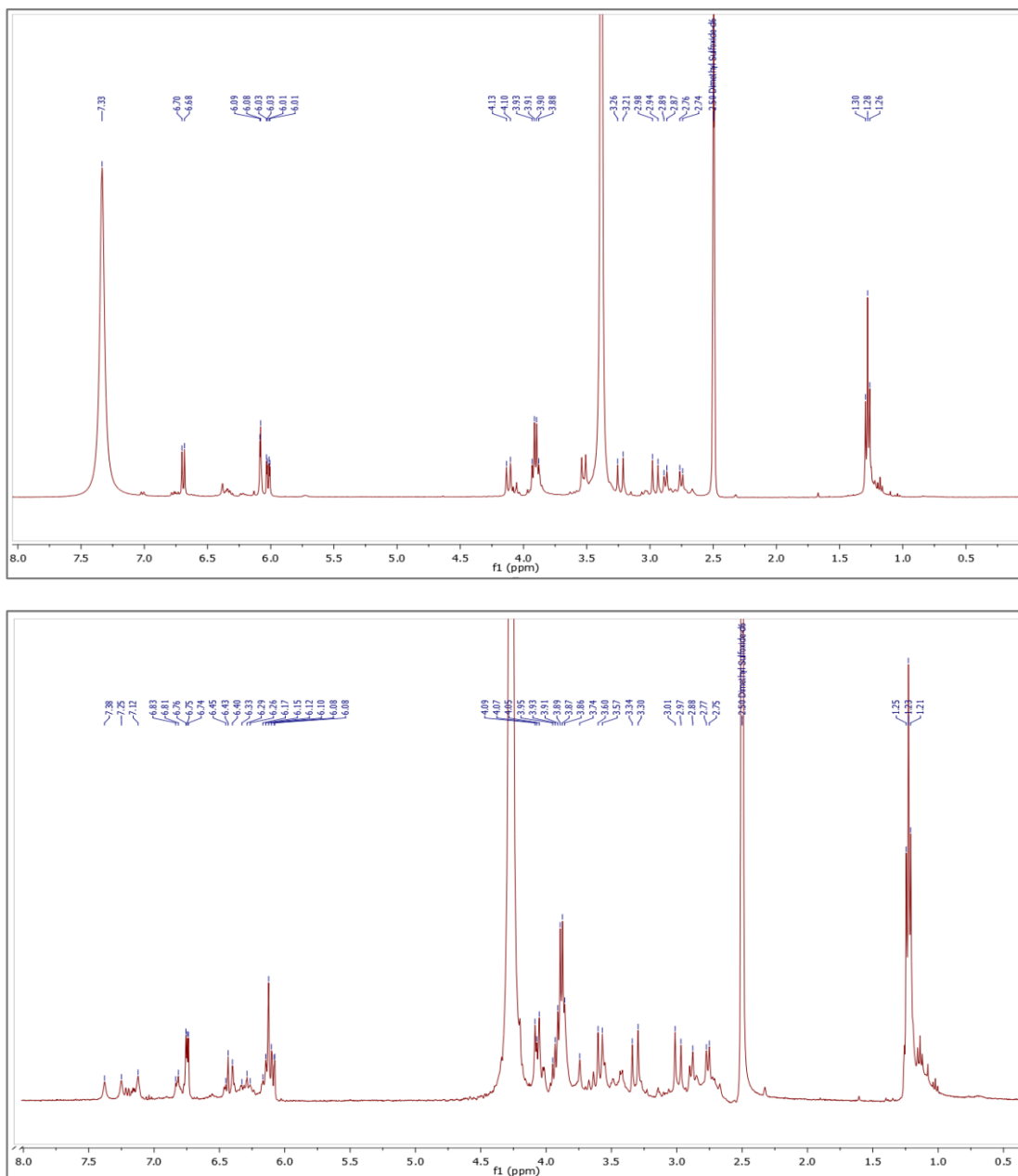


Abb. 18.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED in  $\text{DMSO-d}_6$  (oben) und in  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  (4/1) (unten).



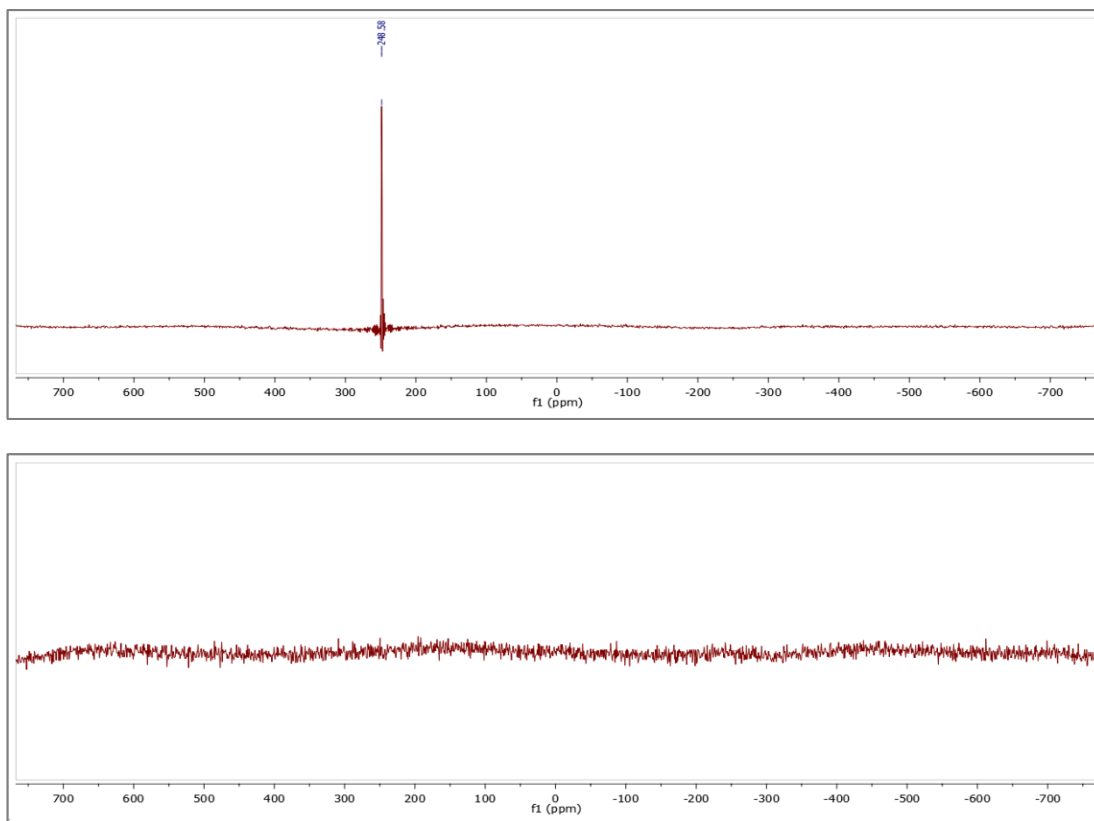


Abb. 19.  $^{71}\text{Ga}$ -NMR-Spektrum von  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED in  $\text{DMSO-d}_6$  (oben) und in  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$  (4/1) (unten).

Die  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe der DTPA-bisamide (P1) und der DAZA-Derivate (P3) zeigen in den  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren jeweils stets mehrere Signalsets und somit die Anwesenheit mehrerer Komplexdiastereomere. Dahingegen wurde stets nur ein Signalset in den  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren der  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe von EOB-DTPA, EOB-Dedpa und  $\text{EO}_2\text{B}$ -Dedpa detektiert. Auch mittels Einkristallstrukturanalyse von  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-Dedpa konnte nur das *RR*-Diastereomer identifiziert werden (Abb. 16). Dies ist in Übereinstimmung mit Beobachtungen aus der Literatur bzgl. des zugrundeliegenden Komplexes  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Dedpa (Boros et al. 2010). Auch der Komplex  $[\text{natGa}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DATA zeigt im  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum nur ein Signalset und nur eine Resonanz im  $^{71}\text{Ga}$ -NMR-Spektrum, was ebenfalls mit publizierten Ergebnissen zu ähnlichen DATA-Komplexen untermauert wird, welche in der Koordination eine Pseudo-Twist-Chair-Konformation bevorzugen (Parker et al. 2013). Die HPLC-Chromatogramme der  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe aller Liganden außer EO-HBED zeigen stets nur ein Signal für jede Metallkomplexspezies, was auf schnelle Umwandlung der Diastereomere - sofern sie existieren - ineinander hindeutet.

Die Radiomarkierung von EOB-DTPA (P2) sowie TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA (P3) mit  $^{68}\text{Ga}$  zeigte gemäß der Radio-HPLC-Analyse der Reaktionslösung nur das Signal des  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexes ohne weitere detektierbare Nebenprodukte. Dementsprechend waren die radiochemischen Ausbeuten (radiochemical yield, RCY) bei diesen Tracern am höchsten, wobei anzumerken ist, dass auf TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA aufgrund der Publikation P3 besonderer Fokus lag und demgemäß das Radiomarkierungsverfahren besonders gezielt optimiert wurde. Aus den Reaktionslösungen von  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-Dedpa und insbesondere  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO<sub>2</sub>B-Dedpa hingegen zeigte die HPLC-Analyse stets erhebliche Mengen an hydrophileren (d. h. mit kürzeren Retentionszeiten retardierenden) Nebenprodukten, welche für die Isolierung der  $^{68}\text{Ga}$ -Zielkomplexe durch fraktionierte Festphasenextraktion (SPE) abgetrennt wurden (Tab. 2). Derartige Beobachtungen bei der Radiomarkierung von lipophilen Dedpa-Derivaten sind bekannt (Ramogida et al. 2016b). Hierbei wurde die Möglichkeit diskutiert, dass zum einen Verunreinigungen im Liganden sowie auch Radiolyseeffekte für die Bildung der Nebenprodukte verantwortlich sein können (Ramogida et al. 2016b). Auch die Markierung von EO-HBED, EOB-DATA und DTPA-bis(EOP-amid) verliefen unter Bildung von hydrophilen Nebenprodukten. Für die Anwendung als Radiopharmakon ist es jedoch absolut erforderlich, dass in der Formulierung nur eine einzige dedizierte  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexspezies vorliegt<sup>5</sup>, was aufgrund des großen Überschusses des Liganden gegenüber dem Metallion<sup>6</sup> in der Radiometallkomplexchemie auch üblicherweise beobachtet wird.

Bei der Radiomarkierung ist aufgrund der geringen Konzentration der  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Ionen jede Verunreinigung der verwendeten Lösemittel, Substanzen, Oberflächen und eingesetzten Liganden unbedingt zu vermeiden. Die hier eingesetzten Chelatoren besaßen alle chemische Reinheit (zur Synthese oder purum), welche mittels analytischer HPLC als auch elementaranalytisch und NMR-spektroskopisch nachgewiesen wurde. Durch Aufreinigung mittels SPE konnten alle Nebenprodukte der Radiomarkierung stets abgetrennt und die diskutierten  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexe in RCP  $\geq 95,0\%$  für die weiteren Untersuchungen isoliert werden.

---

<sup>5</sup> Dies gilt für Moleküle, die sich durch eine einzige dedizierte Koordinationsstelle auszeichnen – also für reine Chelatoren bzw. für mit nur einem Chelator funktionalisierte Biomoleküle. Für unselektive Radiomarkierungen, z. B. von Aminosäureeinheiten in Proteinen, gilt dies u. U. nicht.

<sup>6</sup> 20-70  $\mu\text{g}$  Ligand entsprechen einer Stoffmenge von ca. 100 nmol gegenüber 0,01 nmol  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Ionen (entsprechend einer Aktivität von 1 GBq).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher zunächst von einer weiteren Aufreinigung der Liganden abgesehen, vielmehr lag der Fokus auf der Beurteilung der Einsetzbarkeit der  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer hinsichtlich Stabilität und Leberspezifität. Für eine Etablierung als Radiomarkierungsprecursor ist jedoch prospektiv anzustreben, die vielversprechendsten Chelatoren auf höchsten Reinheitsgrad (Reinst- oder Analysegrad, ggf. sogar ultrarein) zu bringen, z. B. mittels präparativer HPLC. Ohne die Bildung von Nebenprodukten würde die Aufarbeitung der Radiomarkierungslösung vereinfacht und die Sicherheit und Robustheit der Tracersynthese gewährleistet.

Tab. 2. Ergebnisse der  $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierung der untersuchten Liganden.

Ligand	T [°C]	Aufreinigung (SPE-Kartusche, Eluent)	RCY [%]	Beobachtung/Anmerkung
<b>TEtOHB- DAZA (P3)</b>	100	Sep-Pak-C8 (Plus)	80	Markierung erfolgt auch bei RT, aber mit verminderter RCY, Markierung verläuft ohne Bildung von Nebenprodukten
<b>TMeOHB- DAZA (P3)</b>	100	EtOH (50%)	80	
<b>EO-HBED</b>	RT	Sep-Pak-C8 (Plus) EtOH (40%)	50	5-10% hydrophileres Nebenprodukt, mittels fraktionierter Elution mit EtOH (10%) abgetrennt
<b>EOB-DTPA (P2)</b>	RT	Sep-Pak-C18 (Classic) EtOH (30%)	65	Markierung verläuft ohne Bildung von Nebenprodukten
<b>DTPA-bis- (EOP-amid)</b>	RT	Sep-Pak-C18 (Classic) EtOH (70%)	50	5-10% hydrophileres Nebenprodukt
<b>EOB-Dedpa</b>	RT	Sep-Pak-C8 (Plus)	55	Nebenprodukt mittels fraktionierter Elution mit EtOH (10%) abgetrennt
<b>EO<sub>2</sub>B-Dedpa</b>	RT	EtOH (30%)	25	Erhebliche Anteil an Nebenprodukt (50%), mittels fraktionierter Elution mit EtOH (10%) abgetrennt
<b>EOB-DATA</b>	RT	Sep-Pak-C8 (Plus) EtOH (10%)	30	Markierung verläuft z.T. sehr unvollständig (bis zu 50% unchelatisiertes $^{68}\text{Ga}$ ) unter Bildung eines hydrophileren Nebenproduktes (5-10%)

Die Startaktivität des  $^{68}\text{Ga}$ -Eluates betrug 800-1000 MBq, die eingesetzte Menge der Liganden 20-70µg. Reaktionszeit: 5-10min. Die Angaben zur Aufreinigung enthalten die Bezeichnung der SPE-Kartusche und den Eluenten. Die Markierungsausbeute (RCY) ist halbwegszeitkorrigiert angegeben.

Die Aufreinigung der  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer für die finale Formulierung mittels SPE ist ein Standardverfahren zur Abtrennung von [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-chlorid als Resultat einer

unvollständigen Markierung, als auch von  $^{68}\text{Ga}$ -Kolloid. Insbesondere die Gegenwart kolloidaler Spezies im Produkt ist zu vermeiden, da diese sich ebenfalls durch eine Aufnahme in die Leber auszeichnen und somit spätere Bildgebungsstudien beeinflussen können (Petrik et al. 2015). Für die Analyse der Radiotracer besitzt die Radio-HPLC eine bessere Auflösung als die Radio-TLC, kann jedoch  $^{68}\text{Ga}$ -Kolloide nicht detektieren, da diese auf der stationären Phase verbleiben statt zu eluieren. Daher wurden die sich ergänzenden Radio-HPLC- und Radio-TLC-Methoden stets kombiniert, um alle Nebenprodukte zu detektieren und somit die radiochemische Reinheit (RCP) der  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer zu bestimmen.

Zusammenfassend gilt, dass die azyklischen Chelatoren DTPA-bis(EOP-amid), EOB-DTPA, EO-HBED und die Dedpa-Derivate erwartungsgemäß schnell innerhalb von 5-10 min bei Raumtemperatur mit  $^{68}\text{Ga}$  markiert werden können. Dies entspricht der allgemeinen Beobachtung, dass azyklische Liganden hinsichtlich der Komplexbildung kinetisch effektiver sind als Makrozyklen wie DOTA und NOTA oder die hierin beschriebenen zyklischen DAZA-Derivate (P3). Auch EOB-DATA ist ein Azazyklus, kann mit  $^{68}\text{Ga}$  jedoch wie ein azyklischer Ligand bereits bei Raumtemperatur markiert werden, was in Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen ist und die Attraktivität der DATA- sowie der verwandten AAZTA-Verbindungen erklärt (Waldron et al. 2013, Seemann et al. 2015b, Seemann et al. 2015a, Seemann et al. 2017, Farkas et al. 2017). TMeOHB-DAZA und TEtOHB-DAZA hingegen erfordern für eine quantitative Markierung mit  $^{68}\text{Ga}$  hohe Temperaturen, was auf eine schlechtere Markierungskinetik hinweist. Neben dem zyklischen Charakter kann dies auch mit dem geringeren Säurecharakter von Phenolaten gegenüber Carboxylaten und der damit verbundenen Hemmung der Koordinationskinetik gerade im sauren pH-Bereich der Radiomarkierung (3,5-4,0) erklärt werden (Price et al. 2016). Die Verwendung von HEPES als Alternative zum Acetatpuffer während der Reaktion könnte hier Vorteile bringen; generell werden bei Einsatz dieses Puffers höhere Markierungsausbeuten bzw. eine verbesserte Koordinationskinetik erzielt (Martins et al. 2013). Generell ist stets eine möglichst hohe spezifische Aktivität, d. h. Aktivität des  $^{68}\text{Ga}$  pro eingesetzte Masse des Liganden, anzustreben. Experimente zur Optimierung der Markierungsbedingungen hinsichtlich pH-Wert, Temperatur und Bestimmung der spezifischen Aktivität sind im Rahmen der Etablierung einer

GMP-konformen Tracersynthese geplant, der primäre Fokus dieser Arbeit liegt jedoch zunächst auf der Identifizierung der vielversprechendsten Chelatoren und Bestimmung der Stabilität und Leberspezifität der  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer.

### 7.3 *In-vitro*-Stabilitäten der $^{68}\text{Ga}$ -Tracer

Die gemäß P1 synthetisierten DTPA-bisamide (exemplarisch an  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -DTPA-bis(EOP-amid) demonstriert) zeigen als Chelatoren für  $^{68}\text{Ga}$  ebenso wie EOB-DTPA (P2) eine geringe Stabilität im Blutserum (Abb. 20). Dies wird durch die Zunahme der Integrale von  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -chlorid<sup>7</sup> auf den Radio-TLC- als auch Radio-HPLC-Chromatogrammen aufgrund der Demetallierung im Verlauf der Inkubation angezeigt und entspricht dem allgemeinen Konsens, dass  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe azyklischer Aminocarboxylate zu kinetischer Labilität neigen (Price et al. 2016).

Die Komplexbildungskonstante des  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -HBED-Komplexes ( $\log K = 37,7\text{-}39,6$ , Green und Welch 1989, Price et al. 2016)<sup>8</sup> ist die mit Abstand höchste in einer Reihe von  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexen, die über die frühen Liganden wie EDTA ( $\log K = 21,7$ ) und DTPA ( $\log K = 23,3\text{-}25,1$ , Green und Welch 1989, Price et al. 2016) zu den in der gegenwärtigen radiochemischen Forschung verbreitet eingesetzten Liganden DOTA ( $\log K = 26,1$ ) und NOTA ( $\log K = 31,0$ ) reichen (Price et al. 2016). Den Erwartungen entsprechend weist die Verbindung  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED eine hohe *in-vitro*-Stabilität mit einer RCP  $\geq 98\%$  nach 4 h Inkubation in Serum auf. Dies gilt für beide Signale der Diastereomere, die während der Stabilitätsuntersuchung mittels Radio-HPLC stets im gleichen Verhältnis detektiert wurden. Entsprechend des zyklischen Charakters der Liganden sind auch die Komplexe  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -TMeOHB-DAZA und  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -TEtOHB-DAZA erwartungsgemäß stabil *in-vitro* (P3). Dahingegen besitzen  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-Dedpa und  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO<sub>2</sub>B-Dedpa sowie auch  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DATA unerwartet geringe *in-vitro*-Stabilitäten in Serum (Abb. 20).

Ogleich eine hohe *in-vitro*-Stabilität sowie thermodynamische Komplexbildungskonstante für  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Dedpa berichtet ist (Boros et al. 2010), wurden bei  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexen von Dedpa-Derivaten wiederholt Instabilitäten der Tracer

---

<sup>7</sup>  $R_f$  (Radio-TLC)= 0,8-1,0, Radio-HPLC: Retention mit dem Injektionspeak.

<sup>8</sup> Die Angaben für  $\log K$  in der Literatur weichen geringfügig voneinander ab, daher wird ein Bereich angegeben.

gegenüber *apo*-Transferrin beobachtet (Boros et al. 2011a, Boros et al. 2012b, Ramogida et al. 2015a). Dies ging jedoch nicht notwendig mit einer Einschränkung der Anwendbarkeit einher, wie anhand von Tiermodellen demonstriert wurde (Boros et al. 2011a, Boros et al. 2012b).

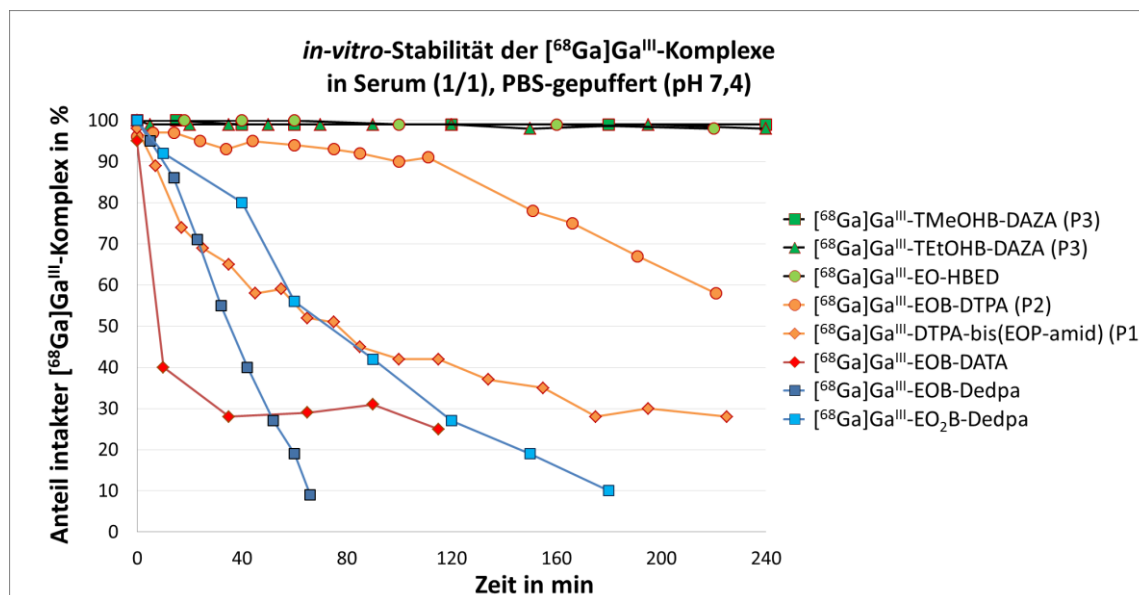


Abb. 20: Übersicht über die *in-vitro*-Stabilität der diskutierten  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe, mittels Radio-TLC bestimmt. Dargestellt ist der Anteil des intakten  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexes im Verhältnis zu allen  $^{68}\text{Ga}$ -Verbindungen in der Inkubationslösung zu respektiven Probenahmezeitpunkten.

Insbesondere die Arbeit von Boros et al. ist hierbei relevant, da die darin beschriebenen Dedpa-Derivate z. T. starke Ähnlichkeit zu den hierin beschriebenen Liganden EOB-Dedpa und EO<sub>2</sub>B-Dedpa aufweisen (Boros et al. 2011a). Die  $^{68}\text{Ga}$ -Verbindungen, von denen aufgrund ihrer positiven Gesamtladung bei gleichzeitig stark lipophilem Charakter eine erhöhte Aufnahme ins Herz erwartet wurde, wiesen ohne Ausnahme auch stets hohe Leberakkumulationen und hepatotrope Ausscheidungsprofile auf, was wiederum zeigt, dass Alkoxyphenylstrukturen bestens geeignet sind, um die Leber als metabolisierendes Organ anzusprechen (Hsiao et al. 2009, Boros et al. 2011a). Im Vergleich zur hierin beschriebenen Instabilität von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-Dedpa (20% intakter Komplex nach 1 h) und  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO<sub>2</sub>B-Dedpa (ca. 50% nach 1 h, 30% nach 2 h) gegen Serum waren die Ergebnisse von Boros et al. aussichtsreicher (91% nach 2 h für die Verbindung  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -18, Boros et al. 2011a) – es handelt sich jedoch in der Publikation um *apo*-Transferrin-Konkurrenzexperimente. Dass die Zersetzungsraten in Serum davon abweichen können, zeigt sich z. B. an den

unterschiedlichen Stabilitäten von Ga<sup>III</sup>-Dedpa gegen *apo*-Transferrin (> 99% nach 2 h, Boros et al. 2010) im Vergleich zu Serum (78% nach 2 h, Ramogida et al. 2015b).

Die Beobachtung, dass mit zunehmender Anzahl lipophiler Alkoxygruppen am Liganden auch das Maß der kinetischen Inertheit der [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe steigt, wurde von den Autoren damit begründet, dass derartige Strukturen schlechter in die polare Metallbindungstasche des Transferrin passen (Boros et al. 2011a). Damit lässt sich auch die höhere *in-vitro*-Stabilität des [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO<sub>2</sub>B-Dedpa gegenüber [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa erklären. Erwähnenswert ist, dass bereits bei der Inkubation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-Dedpa in PBS mehrere hydrophile Zersetzungsprodukte mittels HPLC nachgewiesen wurden, während in Serum [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-chlorid als einziges Zersetzungsprodukt identifiziert wurde (Abb. S9-10). [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO<sub>2</sub>B-Dedpa hingegen war in PBS stabil, erst bei Zusatz von Serum fand Demetallierung statt (Abb. S12-13).

Durch die Derivatisierung von Dedpa zu CHXDedpa, welche sich durch eine in eine zusätzliche Cyclohexylstruktur (CHX) integrierte und somit rigidere Ethylendiaminbrücke auszeichnet, kann neben einer erhöhten Lipophilie (Ramogida et al. 2016b) auch ggf. eine verbesserte kinetische Inertheit der Metallkomplexe bewirkt werden, was durch Stabilitätsstudien in Serum belegt wurde (Ramogida et al. 2015b, Ramogida et al. 2015c). Eine Serie von mit Alkoxybenzyleinheiten derivatisierten <sup>68</sup>Ga-CHXDedpa-Verbindungen zeigte jedoch weiterhin Instabilität gegen *apo*-Transferrin (Ramogida et al. 2016b), sodass es zweifelhaft ist, ob eine CHX-Derivatisierung für die hierin beschriebenen EOB- und EO<sub>2</sub>B-Dedpa zur Verbesserung der Stabilität der [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-Komplexe beitragen könnte. Im Allgemeinen scheint die Funktionalisierung des Liganden Dedpa an den Stickstoffatomen des EDA-Gerüsts einen negativen Effekt auf die Komplexstabilität zu nehmen, ggf. aufgrund ungünstiger sterischer Effekte oder einer Änderung der Elektronendichte an den koordinierenden Stickstoffatomen (Ramogida et al. 2015b). Eine alternative lipophile Funktionalisierung des Liganden könnte stattdessen auf die Einführung von EOB-Einheiten oder Alkoxysubstituenten an der Picolinateinheit zielen. Die somit sekundären Stickstoffatome des EDA-Gerüsts könnten sich dann stabilisierend auf die Koordinationssphäre auswirken oder ggf. mit



zusätzlichen koordinierenden Einheiten wie Acetatgruppen (entspricht Octapa, Price et al. 2012) oder Salicylgruppen funktionalisiert werden.

Strukturell ist der Ligand EOB-DATA dem EOB-DTPA vergleichsweise ähnlich, da es sich ebenfalls um ein reines Aminocarboxylat, funktionalisiert mit einer EOB-Gruppe handelt. Allerdings wurde von diesem Azazyklus eine höhere Stabilität des  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexes im Vergleich zu  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA (P2) erwartet. Publierte Ergebnisse verweisen wiederholt auf die kinetische Inertheit von  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -DATA-Komplexen sowie auch deren Verwandten, den AAZTA-Verbindungen (Seemann et al. 2015a, Seemann et al. 2017, Nock et al. 2017, Farkas et al. 2017). Überraschenderweise wurde jedoch eine rasche Demetallierung des  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DATA im Serum beobachtet (Abb. 20, Abb. S15-16). Die Funktionalisierung am exozyklischen Aminostickstoffatom durch die EOB-Einheit nimmt hier - ähnlich wie bereits bei den Dedpa-Derivaten beschrieben – möglicherweise Einfluss auf die Komplexstabilität. Es ist bekannt, dass DATA- und AAZTA-basierte Chelatoren auch weniger stabile, „kinetisch eingefrorene“<sup>9</sup>  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe formen können (Parker et al. 2013, Parker und Waldron 2013, Waldron et al. 2013). Dies gilt vor allem für AAZTA und ähnliche DATA-basierte Liganden, die ein dreifach alkyliertes exozyklisches Aminostickstoffatom aufweisen (Waldron et al. 2013). Hingegen bringen sterisch anspruchsvolle Substituenten am C-6-Kohlenstoffatom den DAZA-Ring in eine für die Bindung des Metalls bevorzugte Konformation und erhöhen somit die Stabilität der Komplexe (Waldron et al. 2013). Demzufolge wäre die Anknüpfung des EOB-Substituenten am C-6-Kohlenstoffatom statt am exozyklischen Aminostickstoffatom möglicherweise von Vorteil hinsichtlich der Erhöhung der Stabilität.

Für eine Anwendung als  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer ist stets eine hohe kinetische Inertheit des Komplexes neben weiteren Anforderungen wie Spezifität und rascher Clearance aus nicht angezielten Ausscheidungsorganen für einen besseren Bildkontrast wünschenswert. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass eine sehr rasche Anreicherung in einem stark durchbluteten Organ wie der Leber eine mangelnde *in-vivo*-Stabilität ausgleichen kann, da sich der Tracer in einem solchen Fall nur

---

<sup>9</sup> Der Terminus in den Publikationen bezeichnet die  $\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe als „kinetically trapped“, welche aufgrund sterischer Repulsion am exozyklischen Aminostickstoffatom eine ungünstigere Ringkonformation um das Metallzentrum einnehmen, statt in die stabilere Konformation überzugehen. Dieses Phänomen wird in dieser Arbeit als „kinetisch eingefroren“ übersetzt.

sehr kurze Zeit im Blut befinden würde (Haubner et al. 2013). Daher ist ein *in-vitro* vergleichsweise labiler  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer nicht unbedingt als nicht anwendbar zu verwerfen. Um dies zu prüfen, wurde neben den *in-vitro* durchweg stabilen Komplexen  $^{68}\text{Ga}$ ][ $\text{Ga}^{\text{III}}$ -TMeOHB-DAZA,  $^{68}\text{Ga}$ ][ $\text{Ga}^{\text{III}}$ -TEtOHB-DAZA (P3) und  $^{68}\text{Ga}$ ][ $\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED auch das im Serum labilere  $^{68}\text{Ga}$ ][ $\text{Ga}^{\text{III}}$ -EOB-DTPA (P2) an einem *in-ovo*-Embryonenmodell untersucht.

#### 7.4 *In-ovo*-PET/CT-Bildgebung und Ausblick

Die PET-Scans der *in-ovo*-applizierten  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer wurden im kontinuierlichen List-Mode-Verfahren vom Zeitpunkt der *i.v.*-Applikation bis zu 90 min *p.i.* aufgezeichnet. Aktivitätsansammlungen in dedizierten Bereichen können bei PET-Aufnahmen quantifiziert werden. Größe und Gewicht der Leber unterscheiden sich naturgemäß zwischen einzelnen Embryoindividuen und sind darüber hinaus von der Entwicklungsstufe (Brutttag) abhängig, sodass die Anreicherung stets als prozentuale Aktivitätsmenge (Uptake) der applizierten Gesamtaktivität angegeben ist. Für die anatomische Zuordnung der in den PET-Aufnahmen detektierten Bereiche erhöhter Aktivitätsanreicherung zu den entsprechenden Organen wurden CT-Aufnahmen aller untersuchten Embryonen, ggf. unter Zuhilfenahme von CT-Kontrastmittel, gemacht. Dies stellt eine Analogie zur allgemeinen klinischen Praxis dar, in der PET-Aufnahmen standardmäßig mit einem CT-Scan kombiniert werden, um einerseits die anatomische Referenzierung und andererseits die Schwächungskorrektur des PET-Datensatzes zu ermöglichen (Abb. 21).

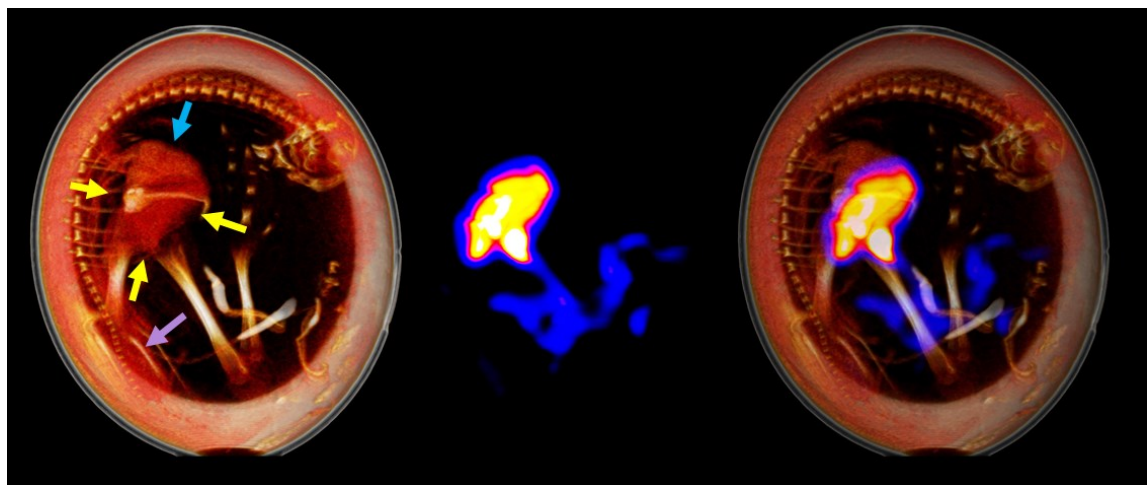


Abb 21. KM-CT nach Bolusinjektion (links) eines Straußenembryos im Ei ermöglicht die Zuordnung zu den Organen Herz (blau), Leber (gelb) und Nieren (violett). PET-Scan (Mitte) und kombinierte PET/CT-Darstellung (rechts) nach der Applikation von  $^{68}\text{Ga}$ ][ $\text{Ga}^{\text{III}}$ -TEtOHB-DAZA.

Es zeigt sich, dass von den untersuchten Tracern [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-TMeOHB-DAZA und [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-TEtOHB-DAZA mit 20-27% den mit Abstand höchsten Uptake in die Leber aufweisen (Tab. 3). Die spezifische Akkumulation der Aktivität in diesem Organ ist bereits wenige Minuten *p.i.* zu beobachten und bleibt über den Zeitraum der PET-Aufnahmen annähernd konstant (Abb. 22, vgl. auch Supplement von P3). Aufgrund des hohen Bildkontrasts ist die visuelle Abgrenzung der Leber einfach möglich, so dass diese Tracer potentiell für die diagnostische Bildgebung geeignet sind. Mit deutlich geringerem Kontrast sind auch die Nieren zu identifizieren, was anzeigt, dass ein Teil des Tracers über den renalen Weg ausgeschieden wird. Ab ca. 30 min *p.i.* ist zusätzlich eine Exkretion in den Darm zu beobachten, welche sich bis zur 90. Minute fortsetzt (P3). Da Strauße keine Gallenblase besitzen, erfolgt die Ausscheidung erwartungsgemäß direkt über die zentralen Gallenwege in den Darm. Insofern verhalten sich diese Tracer ähnlich zum hepatobiliär ausgeschiedenen KM Primovist® sowie zu [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-IDA-Komplexen.

Tab. 3. Leberuptake verschiedener Radiotracer zu dedizierten Zeitpunkten *p.i.* als prozentualer Anteil der injizierten Dosis (ID). Die Quantifizierung erfolgte aus PET-Aufnahmen (List-Mode) derselben Applikation.

	Leberuptake (%ID/Organ)			
	15 min	30 min	60 min	90 min
[ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga <sup>III</sup> -TMeOHB-DAZA	21	24	27	26
[ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga <sup>III</sup> -TEtOHB-DAZA <sup>10</sup>	25	28	27	24
	19	23	24	25
[ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga <sup>III</sup> -EO-HBED	7	7	6	5
[ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga <sup>III</sup> -EOB-DTPA	5	5	5	5
[ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga <sup>III</sup> -chlorid	4	3	2	2

Auch die Applikation von [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED zeigt eine spezifische Anreicherung in der Leber, allerdings mit geringerem Uptake von 5-7% (Tab. 3). Aufgrund des ausreichenden Bildkontrastes wäre die Leberbildgebung auch mit diesem Tracer vorstellbar (Abb. 23). Eine Ausscheidung in den Darm ab 30 min ist gerade noch erkennbar, da vergleichsweise wenig Aktivität des Tracers durch die Leber aufgenommen und dementsprechend anteilmäßig weniger ausgeschieden

<sup>10</sup> Der Tracer wurde zwei verschiedenen Embryonen entsprechend einer Doppelbestimmung injiziert.

wird. Mit ebenfalls geringem Kontrast akkumuliert weiterhin ein Teil der Aktivität in den Nieren.

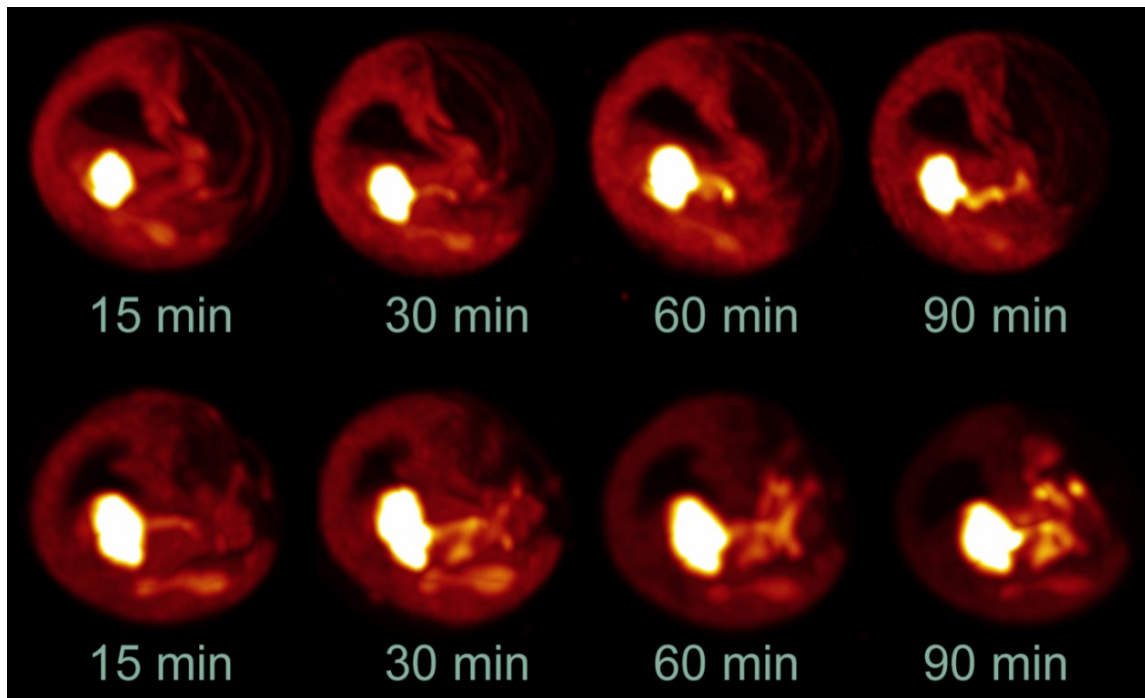


Abb. 22. Dynamische *in-ovo*-PET-Aufnahmen eines Straußenembryos nach der Applikation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TMeOHB-DAZA. (oben) und [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TEtOHB-DAZA (unten).

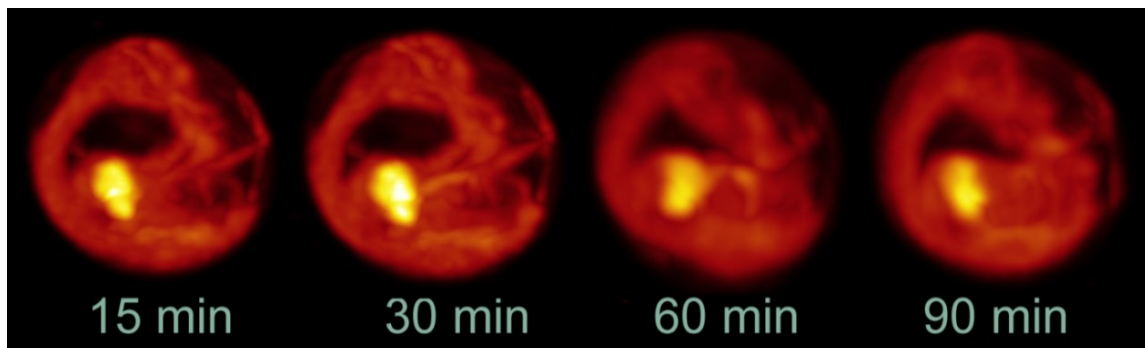


Abb. 23. Dynamische *in-ovo*-PET-Aufnahmen eines Straußenembryos nach der Applikation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED.

Der vergleichsweise geringe Leberuptake des [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED gegenüber [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TMeOHB-DAZA und [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TEtOHB-DAZA deutet auf eine geringere Leberspezifität des Komplexes. Eine Ursache hierfür könnten unterschiedliche Aufnahmemechanismen in die Hepatozyten sein. Während der negativ geladene [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED-Komplex erwartungsgemäß OATPs

ansprechen sollte,<sup>11</sup> werden die neutral geladenen [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-DAZA-Tracer möglicherweise verstärkt über passive Diffusion oder andere Transporterproteine akkumuliert. Das leberspezifische KM Primovist® als auch die [<sup>99m</sup>Tc]Tc-IDA-Komplexe für die Choleszintigraphie stellen negativ geladene Metallkomplexe dar. Daher sollten deren Aufnahmemechanismen mit denen der neuartigen <sup>68</sup>Ga-Tracer verglichen werden (Jia et al. 2012). Als Erklärung für den höheren Leberuptake der [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-DAZA-Tracer kommt ebenfalls deren erhöhte Lipophilie aufgrund einer größeren Anzahl hepatotroper Gruppen (drei EtOHB- bzw. MeOHB-Gruppen pro Ligand in den DAZA-Derivaten gegenüber nur zwei EOHB-Gruppen im EO-HBED) in Betracht.

Einen zu [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED vergleichbaren Leberuptake von 5% weist auch [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DTPA auf, jedoch mit deutlich schlechterem Bildkontrast. Eine leberspezifische Aufnahme in der frühen Anflutungsphase analog zu Primovist® in der MRT kann folglich mit diesem strukuranalogen <sup>68</sup>Ga-Tracer nicht realisiert werden, die Leber ist erst zwischen 60-90 min *p.i.* abzugrenzen. Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis (zwischen Leber und umliegendem Gewebe bzw. Gefäßen) kann hier mit einer erhöhten Aktivität im Blutpool erklärt werden (Abb. 24). *In-vitro* wurde gezeigt, dass [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EOB-DTPA zur Demetallierung in Serum neigt. Erwartungsgemäß sollten freie, d. h. nicht chelator- bzw. protein- oder gewebegebundene [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>3+</sup>-Ionen vorzugsweise über die Nieren ausgeschieden werden. Eine eindeutige Darstellung der Nieren ist jedoch zu keinem Zeitpunkt zu beobachten. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Konsens, dass freie [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>3+</sup>-Ionen im Blutpool von Transferrin gebunden werden (Aparici et al. 2017). Die unspezifische Verteilung von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-chlorid *in-ovo* bestätigt dies (Abb. 24). [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-chlorid zeigt neben der persistenten Blutpoolaktivität auch eine Anreicherung mit anschließender Auswaschung aus dem Myokard bzw. der Leber<sup>12</sup> in der frühen Phase *p.i.* (bis zu 30 min) sowie, vor allem in der späten Phase, eine Akkumulation im Bereich der Wirbelsäule, Beckenknochen und des

---

<sup>11</sup> Die negative Gesamtladung des [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED gilt nur für den Fall einer Hexakoordination unter Deprotonierung beider Phenolatdonoren. Eine Pentakoordination, bei welcher nur eine Phenolatgruppe am Ga<sup>III</sup>-Zentrum koordiniert, ergäbe einen neutral geladenen Komplex. Eine solche Spezies wurde nachgewiesen, man geht jedoch davon aus, dass in Lösung auch hexakoordinierte Ga<sup>III</sup>-HBED-Komplexe vorliegen (Tsionou et al. 2017).

<sup>12</sup> Im Straußenembryo umschließt die Leber das Herz beinahe vollständig, sodass aus den PET-Aufnahmen allein nicht sicher gesagt werden kann, in welchem Organ sich die erhöhte Aktivität befindet. Die vergleichsweise schnelle „Auswaschung“ ab ca. 30 min (Abb. 24) deutet jedoch auf das Myokard.



Schnabels (Abb. 24). Eine Exkretion in den Darm kann für  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-DTPA}$  als auch für  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-chlorid}$  nicht identifiziert werden.

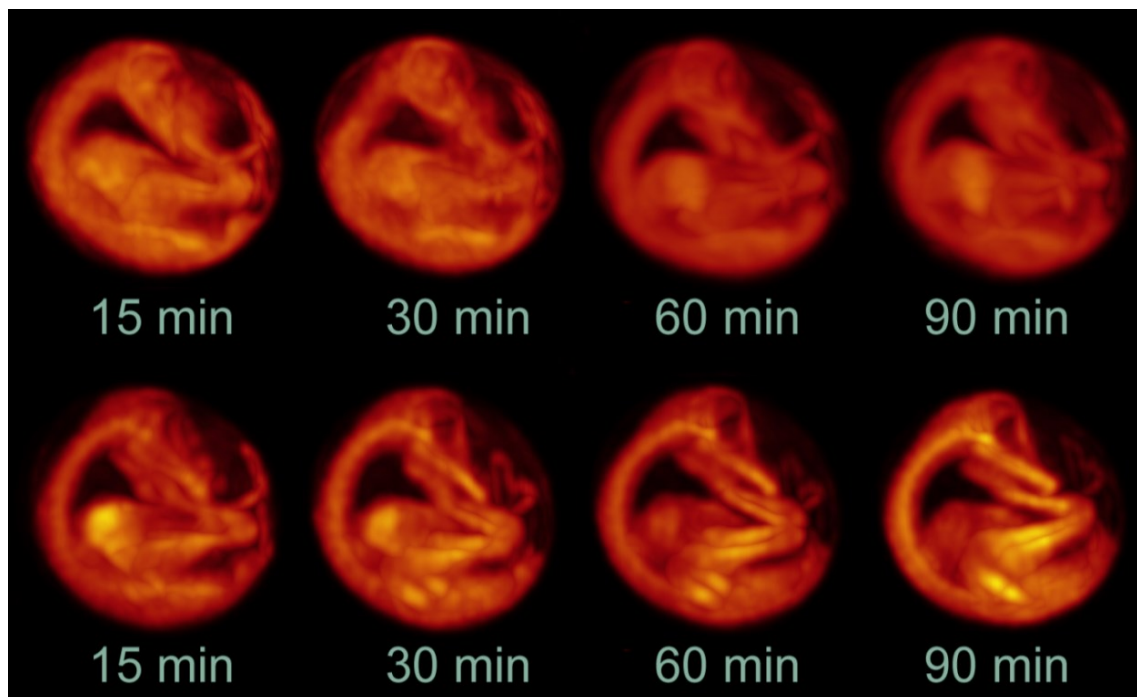


Abb. 24. Dynamische *in-ovo*-PET-Aufnahmen eines Straußenembryos nach der Applikation von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-DTPA}$  (oben) und  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-chlorid}$  (unten).

Zusammenfassend zeigt sich, dass  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe mit 4-Alkoxy-2-hydroxybenzyleinheiten eine dedizierte Leberdarstellung mittels PET ermöglichen, wobei die neutralen Komplexe  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-TMeOH-DAZA}$  und  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-TEtOH-DAZA}$  hinsichtlich der Leberspezifität deutlich höhere Akkumulation zeigen als die negativ geladene Komplexverbindung  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EO-HBED}$ . Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass phenolische Strukturen und Alkoxyphenyleinheiten im Allgemeinen die Aufnahme und Ausscheidung durch die Leber begünstigen (Hsiao et al. 2009, Boros et al. 2011a, Schuhmacher et al. 1983). Die phenolischen OH-Donoren sorgen überdies für eine hohe kinetische Inertheit der Komplexverbindungen. Bei  $^{68}\text{Ga}$ -Tracern wie  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}\text{-EOB-DTPA}$ , welche aufgrund ihrer kinetischen Labilität *in-vitro* demetallisieren, muss durch die Bindung des  $^{68}\text{Ga}$  an Transferrin mit einer erhöhten Aktivität im Blutpool und folglich dem Verlust der Leberspezifität gerechnet werden. Daher wurde auf eine *in-ovo*-Applikation der *in-vitro* ebenfalls labilen  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{\text{III}}$ -Komplexe von DTPA-bis(EOP-amid), EOB-Dedpa, EO<sub>2</sub>B-Dedpa und EOB-DATA verzichtet.

Obgleich hohe *in-vitro*-Stabilitäten für [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TMeOHB-DAZA, [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TEtOHB-DAZA und [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED nachgewiesen wurden, sollten sich im Rahmen der *in-ovo*-Studien prospektive Untersuchungen zur Analyse von Radiometaboliten anschließen. Probenahmen aus dem Blut, der Leber und weiteren Organen, wie Darm oder Nieren, würden Aufschluss über die Stabilität bzw. Metabolisierung der Tracer im physiologischen System geben. Auch die Aktivitätsbestimmung der einzelnen Organe durch Euthanasierung, Sektion, Wiegen und Vermessen in einem Radioaktivitätsmesssystem sollte für die Quantifizierung der Biodistribution erfolgen. Erste Sektionen nach der Applikation von [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TMeOHB-DAZA, [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-TEtOHB-DAZA und [<sup>68</sup>Ga]Ga<sup>III</sup>-EO-HBED als vielversprechendste <sup>68</sup>Ga-Tracer wurden bereits durchgeführt und konnten die aus den PET-Aufnahmen errechneten Leberuptakes bekräftigen (Abb. 25). Auch erste Metabolitenuntersuchungen sind bereits erfolgt und lieferten vielversprechende Resultate.

Hinsichtlich der Übertragbarkeit vom präklinischen *in-ovo*-Modell hin zur Routinediagnostik von Patienten liegen die Unterschiede auf der Hand: Ein Embryo im Ei weist ein zum voll entwickelten Lebewesen verschiedenes Exkretionsverhalten auf, da Darm und Nieren bei Vogeltieren über die im Vogelembryo noch nicht voll funktionsfähige Kloake ausscheiden. Stattdessen besitzt ein Straußenembryo eine externe embryonale Harnblase (Allantois), allerdings keine Gallenblase. Des Weiteren kann sich der Tracer auch im Dottersack verteilen, der einen erheblichen Gewichtsanteil am Embryo einnimmt und somit die Biodistribution beeinflusst. Selbstredend existieren Unterschiede im allgemeinen Metabolismus sowie hinsichtlich der Expression verschiedener Transporterproteine auf den Hepatozyten zwischen Vogelembryonen, Säugetiermodellen und Menschen. Studien am Hühnereimodell zeigten allerdings vergleichbare hepatobiliäre Exkretion zu Mäusemodellen (Haller et al. 2015). Die Übertragbarkeit zum Mensch müsste in klinischen Studien (Phase I) bzw. an freiwilligen Probanden getestet werden.





Abb. 25. Links oben: Darstellung eines geöffneten Straußeneis nach der Euthanasierung des Embryo. Rechts oben: Straußenembryo mit geöffnetem Brustkorb, zu sehen sind die Leber (gelbe Pfeile), die das Herz (blau) umschließt, sowie Magen (grau) und Darm (grün). Links unten: Entnommene Organe aus einem Straußenembryo – eine Niere, Herz und Leber (v. l. n. r.). Rechts unten: Detailaufnahme einer entnommenen Leber.

Anhand der in dieser Dissertation beschriebenen Forschungsergebnisse wurde die Eignung des *in-ovo*-Modells als initiales präklinisches Bildgebungsmodell zur Abschätzung der Biodistribution demonstriert. Seine Anwendung eröffnet die Möglichkeit, aus einer Reihe von neuen Radiotracern schnell die vielversprechendsten Verbindungen im Sinne des *proof-of-principle* zu identifizieren. Darüber hinaus kann durch Sektionen die quantitative Bestimmung der Biodistribution und Metabolitenstudien erfolgen. Dies zeigt, dass das Straußembryonenmodell eine Alternative zu Säugetiermodellen als auch zum etablierten Hühnereimodell (Haller et al. 2015) ist, wobei hervorzuheben ist, dass die Anwendung sogar in klinischen Routineeinrichtungen möglich ist.

Um zu klären, inwiefern die Kontrastierung und Identifizierung von Tumoren sowie die Diagnostik von krankhaftem Lebergewebe und Gallenwegserkrankungen durch den Einsatz von [ $^{68}\text{Ga}$ ] $\text{Ga}^{\text{III}}$ -TMeOHB-DAZA, [ $^{68}\text{Ga}$ ] $\text{Ga}^{\text{III}}$ -TEtOHB-DAZA oder [ $^{68}\text{Ga}$ ] $\text{Ga}^{\text{III}}$ -EO-HBED ermöglicht wird, sind weitere Untersuchungen unerlässlich.

Vor einem Einsatz in Studien am Menschen muss zunächst die Radiomarkierung der Liganden im Sinne der Guten Herstellungspraxis (GMP) optimiert, etabliert und validiert werden. Die zukünftigen Radiopharmaka müssen durch den sicheren Herstellprozess die hohen Qualitätsansprüche (u. a. Pyrogenfreiheit, Sterilität, Stabilität usw.) an Injektionslösungen erfüllen. Neben der Weiterentwicklung des *in-ovo*-Straußenembryonenmodells ist dies daher der aktuelle Fokus in Fortsetzungsarbeiten dieser Dissertation.

## 8 Literaturverzeichnis

- Albrecht M, Franklin SJ, Raymond KN. 1994. Macrobicyclic Tris(catecholate ligand) complexes: Spectroscopy, Electrochemistry, and the Structure of  $K_2[(H_2\text{-biccappedTRENCAm})MoO_2]$ . *Inorg Chem*, 33(25):5785-5793.
- Alfke H, Nocken F, Heverhagen JT, Klose KJ. 2001. Molecular radiology. II: Molecular imaging. *Rofo*, 173(5):391-398.
- Andre JP, Macke HR. 2003. NMR spectroscopy of Group 13 metal ions: biologically relevant aspects. *J Inorg Biochem*, 97(4):315-323.
- Aparici CM, Behr SC, Seo Y, Kelley RK, Corvera C, Gao KT, Aggarwal R, Evans MJ. 2017. Imaging hepatocellular carcinoma with  $^{68}Ga$ -citrate PET: first clinical experience. *Mol Imaging*, 16(Jan.-Dec.):1-4.
- Ba-Ssalamah A, Happel B, Kettenbach J, Dirisamer A, Wrba F, Längle F, Schima W. 2004. MRT der Leber. *Radiologe*, 44(12):1170-1184.
- Baret P, Beaujolais V, Gaude D, Coulombeau C, Pierre J-L. 1997. Control of the helical chirality in octahedral complexes by a chiral macrobicyclic cavity possessing six convergent hydroxyl groups. *Chem - Eur J*, 3(6):969-973.
- Baret P, Beaujolais V, Bougault C, Gaude D, Pierre JL. 1998.  $^1H$  NMR studies of the diamagnetic gallium(III) and paramagnetic iron(III) complexes of a chiral macrobicyclic ligand of biccapped tris(binaphthol) type. *J Chim Phys Phys-Chim Biol*, 95(1):112-121.
- Bayer Vital GmbH. 2014. Informationen zu Primovist.
- Bayer Vital GmbH. 2017. Fachinformationen zu Primovist.
- Bendergruppe. 2018. MRT-Kontrastmittel auf Manganbasis kommt zurück auf den Markt. Healthcare in Europe. <https://healthcare-in-europe.com/de/story/20134-mrt-kontrastmittel-auf-manganbasis-kommt-zurueck-auf-den-markt.html> (09.05.2018).
- Bergeron RJ, Wiegand J, Brittenham GM. 1998. HBED: a potential alternative to deferoxamine for iron-chelating therapy. *Blood*, 91(4):1446-1452.
- Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F. 2013. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*, 58(3):593-608.
- Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, Price EW, Patrick BO, Wester DW, Adam MJ, Orvig C. 2010. Acyclic Chelate with Ideal Properties for  $^{68}Ga$  PET Imaging Agent Elaboration. *J Am Chem Soc*, 132:15726-15733.
- Boros E, Ferreira CL, Patrick BO, Adam MJ, Orvig C. 2011a. New Ga derivatives of the  $H_2dedpa$  scaffold with improved clearance and persistent heart uptake. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(8):1165-1174.
- Boros E, Lin Y-HS, Ferreira CL, Patrick BO, Haefeli UO, Adam MJ, Orvig C. 2011b. One to chelate them all: investigation of a versatile, bifunctional chelator for  $^{64}Cu$ ,  $^{99m}Tc$ , Re and Co. *Dalton Trans*, 40(23):6253-6259.
- Boros E, Cawthray JF, Ferreira CL, Patrick BO, Adam MJ, Orvig C. 2012a. Evaluation of the  $H_2dedpa$  Scaffold and its cRGDyK Conjugates for Labeling with  $^{64}Cu$ . *Inorg Chem*, 51:6279-6284.
- Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, Gill RK, Price EW, Adam MJ, Orvig C. 2012b. RGD conjugates of the  $H_2dedpa$  scaffold: synthesis, labeling and imaging with  $^{68}Ga$ . *Nuclear Medicine and Biology*, 39:785-794.
- Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, Gill RK, Price EW, Adam MJ, Orvig C. 2012c. RGD conjugates of the  $H_2dedpa$  scaffold: synthesis, labeling and imaging with  $^{68}Ga$ . *Nucl Med Biol*, 39(6):785-794.
- Borsch J. 2018. Zulassungen für Gadolinium-haltige Arzneimittel ruhen. *Deutsche Apotheker Zeitung*. <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2018/02/27/zulassungen-fuer-gadolinium-haltige-arzneimittel-ruhen> (27.02.2018).

- Boussouar S, Chiaradia M, Baranes L, Pigneur F, Rahmouni A, Luciani A, Itti E, Decaens T, Chiaradia M, Calderaro J, Laurent A, Duvoux C, Azoulay D, Costentin C, Rahmouni A, Luciani A, Itti E, Evangelista E, Chalaye J, Baranes L, Itti E, Itti E, Lin S-J, Decaens T, Duvoux C, Costentin C, Calderaro J, Calderaro J, Laurent A, Luciani A, Laurent A, Azoulay D. 2016. Functional imaging of hepatocellular carcinoma using diffusion-weighted MRI and (18)F-FDG PET/CT in patients on waiting-list for liver transplantation. *Cancer Imaging*, 16:4.
- Braat MNGJA, de Jong HW, Scholten MV, van den Bosch MAAJ, Lam MGEH, Seinstra BA. 2017. Hepatobiliary scintigraphy may improve radioembolization treatment planning in HCC patients. *EJNMMI Res*, 7(1):2.
- Buck AK, Stollfuss JC, Stahl A, Beer AJ, Meisetschlager G, Schwaiger M. 2007. Nuclear medical diagnostics for liver tumors. *Internist (Berl)*, 48(1):21-24, 26-29.
- Büll U, Schicha H, Biersack H-J, Knapp WH, Reiners C, Schober O. 2001. *Nuklearmedizin*. 3. Auflage Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Caravan P, Orvig C. 1997. Tripodal Aminophenolate Ligand Complexes of Aluminum(III), Gallium(III), and Indium(III) in Water. *Inorg Chem*, 36(2):236-248.
- Chakraborty D, Sunil HV, Mittal BR, Bhattacharya A, Singh B, Chawla Y. 2010. Role of Tc99m sulfur colloid scintigraphy in differentiating non-cirrhotic portal fibrosis from cirrhosis liver. *Indian J Nucl Med*, 25(4):139-142.
- Chakravarty R, Chakraborty S, Ram R, Vatsa R, Bhusari P, Shukla J, Mittal BR, Dash A. 2016. Detailed evaluation of different 68Ge/68Ga generators: an attempt toward achieving efficient 68Ga radiopharmacy. *J Labelled Compd Radiopharm*, 59(3):87-94.
- Cheung TT, Ho CL, Lo CM, Chen S, Chan SC, Chok KSH, Fung JY, Chan ACY, Sharr W, Yau T, Poon RTP, Fan ST. 2013. 11C-acetate and 18F-FDG PET/CT for clinical staging and selection of patients with hepatocellular carcinoma for liver transplantation on the basis of Milan criteria: surgeon's perspective. *J Nucl Med*, 54(2):192-200.
- Choi J, Jeong JM, Yoo BC, Hong MK, Kim YJ, Lee Y-S, Lee DS, Chung J-K. 2014. Ga-68-labeled neolactosylated human serum albumin (LSA) for PET imaging of hepatic asialoglycoprotein receptor. *Nucl Med Biol*, 42(1):53-58.
- Chong H-S, Chen Y, Kang CS, Sun X, Wu N. 2015. Novel 64Cu-radiolabeled bile acid conjugates for targeted PET imaging. *Bioorg Med Chem Lett*, 25(5):1082-1085.
- Cleeren F, Lecina J, Billaud EMF, Ahamed M, Verbruggen A, Bormans GM. 2016. New Chelators for Low Temperature Al18F-Labeling of Biomolecules. *Bioconjugate Chem*, 27(3):790-798.
- Cohen SM, Petoud S, Raymond KN. 1999. A Novel Salicylate-Based Macrobicyclic with a "Split Personality". *Inorg Chem*, 38(20):4522-4529.
- Cutler CS, Hennkens HM, Sisay N, Huclier-Markai S, Jurisson SS. 2013. Radiometals for Combined Imaging and Therapy. *Chem Rev*, 113(2):858-883.
- Detry O, Govaerts L, Deroover A, Vandermeulen M, Meurisse N, Malenga S, Bletard N, Mbendi C, Lamproye A, Honore P, Meunier P, Delwaide J, Hustinx R. 2015. Prognostic value of 18F-FDG PET/CT in liver transplantation for hepatocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 21(10):3049-3054.
- Dill T. 2008. Contraindications to magnetic resonance imaging: non-invasive imaging. *Heart*, 94(7):943-948.
- Eder M, Neels O, Muller M, Bauder-Wust U, Remde Y, Schafer M, Hennrich U, Eisenhut M, Kopka K, Afshar-Oromieh A, Haberkorn U. 2014. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals*, 7(7):779-796.
- Eo JS, Paeng JC, Lee DS. 2014. Nuclear imaging for functional evaluation and theragnosis in liver malignancy and transplantation. *World J Gastroenterol*, 20(18):5375-5388.
- Evans DF, Jakubovic DA. 1988. Water-soluble hexadentate Schiff-base ligands as sequestering agents for iron(III) and gallium(III). *J Chem Soc, Dalton Trans*, (12):2927-2933.

- Fani M, Andre JP, Maecke HR. 2008.  $^{68}\text{Ga}$ -PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging*, 3(2):67-77.
- Farkas E, Toth I, Brucher E, Nagel J, Rosch F, Waldron B, Parker D, Baranyai Z. 2017. Equilibrium, kinetic and structural properties of gallium(III)- and some divalent metal complexes formed with the new DATAm and DATA5m ligands. *Chemistry*, 23(43):10358-10371.
- Feine U, Zum Winkel K. 1995. *Nuklearmedizin - Szintigraphische Diagnostik*. 2. Auflage Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Fischbach F, Fischbach K. 2017. *MRT der Leber - Diagnostik, Differenzialdiagnose, Therapieansätze*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Freesmeyer M, Kuehnel C, Opfermann T, Nicksch T, Wiegand S, Winkens T, Stolz R, Huonker R, Witte OW. 2018. The use of ostrich eggs for in ovo research - Making preclinical imaging research affordable and available. *J Nucl Med*, 59(12):1901-1906.
- Frisch K, Jakobsen S, Sorensen M, Munk OL, Alstrup AKO, Ott P, Hofmann AF, Keiding S. 2012. N-methyl- $^{11}\text{C}$ ]cholylsarcosine, a novel bile acid tracer for PET/CT of hepatic excretory function: radiosynthesis and proof-of-concept studies in pigs. *J Nucl Med*, 53(5):772-778.
- Fritzberg AR, Klingensmith WC, III. 1982. Quest for the perfect hepatobiliary radiopharmaceutical. *J Nucl Med*, 23(6):543-546.
- Ghosh S, Das T, Sarma HD, Banerjee S. 2016. Preparation and preliminary bioevaluation of  $^{68}\text{Ga}$ -oxine in lipiodol as a potential liver imaging agent. *J Radioanal Nucl Chem*, 311(1):263-268.
- Green MA, Welch MJ, Huffman JC. 1984. Synthesis and crystallographic characterization of a gallium salicylaldimine complex of radiopharmaceutical interest. *J Am Chem Soc*, 106(12):3689-3691.
- Green MA, Welch MJ, Mathias CJ, Taylor P, Martell AE. 1985a. Evaluation of PLED as a chelating ligand for the preparation of gallium and indium radiopharmaceuticals. *Int J Nucl Med Biol*, 12(5):381-386.
- Green MA, Welch MJ, Mathias CJ, Fox KAA, Knabb RM, Huffman JC. 1985b. Gallium-68 1,1,1-tris(5-methoxysalicylaldiminomethyl) ethane: a potential tracer for evaluation of regional myocardial blood flow. *J Nucl Med*, 26(2):170-180.
- Green MA, Welch MJ. 1989. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. *Int J Radiat Appl Instrum B* 16(5):435-448.
- Haller S, Ametamey SM, Schibli R, Muller C. 2015. Investigation of the chick embryo as a potential alternative to the mouse for evaluation of radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol*, 42(3):226-233.
- Haubner R, Wester H-J, Weber WA, Mang C, Ziegler SI, Goodman SL, Senekowitsch-Schmidtke R, Kessler H, Schwaiger M. 2001. Noninvasive imaging of  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin expression using  $^{18}\text{F}$ -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res*, 61(5):1781-1785.
- Haubner R, Kuhnast B, Mang C, Weber WA, Kessler H, Wester H-J, Schwaiger M. 2004. [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD: synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates. *Bioconjugate Chem*, 15(1):61-69.
- Haubner R, Vera DR, Farshchi-Heydari S, Helbok A, Rangger C, Putzer D, Virgolini IJ. 2013. Development of ( $^{68}\text{Ga}$ )-labelled DTPA galactosyl human serum albumin for liver function imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 40(8):1245-1255.
- Haubner R, Finkenstedt A, Stegmayr A, Rangger C, Decristoforo C, Zoller H, Virgolini IJ. 2016. [ $^{68}\text{Ga}$ ]NODAGA-RGD - Metabolic stability, biodistribution, and dosimetry data from patients with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 43(11):2005-2013.
- Haubner R, Schmid AM, Maurer A, Rangger C, Roig LG, Pichler BJ, Virgolini IJ. 2017. [ $^{68}\text{Ga}$ ]NOTA-Galactosyl Human Serum Albumin: a Tracer for Liver Function Imaging with Improved Stability. *Mol Imaging Biol*, 19(5):723-730.



- Ho C-L, Yu SCH, Yeung DWC. 2003. <sup>11</sup>C-acetate PET imaging in hepatocellular carcinoma and other liver masses. *J Nucl Med*, 44(2):213-221.
- Hofman M, Binns D, Johnston V, Siva S, Thompson M, Eu P, Collins M, Hicks RJ. 2015. <sup>68</sup>Ga-EDTA PET/CT imaging and plasma clearance for glomerular filtration rate quantification: comparison to conventional <sup>51</sup>Cr-EDTA. *J Nucl Med*, 56(3):405-409.
- Hsiao Y-M, Mathias CJ, Wey S-P, Fanwick PE, Green MA. 2009. Synthesis and biodistribution of lipophilic and monocationic gallium radiopharmaceuticals derived from N,N'-bis(3-aminopropyl)-N,N'-dimethylethylenediamine: potential agents for PET myocardial imaging with <sup>68</sup>Ga. *Nucl Med Biol*, 36(1):39-45.
- Ijichi H, Shirabe K, Taketomi A, Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y. 2013. Clinical usefulness of <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Hepatol Res*, 43(5):481-487.
- Jensen SB, Nielsen KM, Mewis D, Kaufmann J. 2013. Fast and simple one-step preparation of <sup>68</sup>Ga citrate for routine clinical PET. *Nucl Med Commun*, 34(8):806-812.
- Jia J, Keiser M, Nassif A, Sigmund W, Oswald S. 2012. A LC-MS/MS method to evaluate the hepatic uptake of the liver-specific magnetic resonance imaging contrast agent gadoxetate (Gd-EOB-DTPA) in vitro and in humans. *J Chromatogr B*, 891-892(20-26).
- Jia L, Jiang D, Hu P, Li X, Shi H, Cheng D, Zhang L. 2014. Synthesis and evaluation of <sup>18</sup>F-labeled bile acid compound: A potential PET imaging agent for FXR-related diseases. *Nucl Med Biol*, 41(6):495-500.
- Jurchen KMC, Raymond KN. 2006. Terephthalamide-Containing Analogues of TREN-Me-3,2-HOPO. *Inorg Chem*, 45(3):1078-1090.
- Kappel MJ, Pecoraro VL, Raymond KN. 1985. Ferric Ion Sequestering Agents - Lipophilic Enterobactin Analogs - Stabilities of the Gallium and Ferric Ion Complexes of Terminally N-Substituted Catecholamides. *Inorganic Chemistry*, 24(15):2447-2452.
- Karpishin TB, Stack TDP, Raymond KN. 1993a. Octahedral versus trigonal prismatic geometry in a series of catechol macrobicyclic ligand-metal complexes. *J Am Chem Soc*, 115(1):182-192.
- Karpishin TB, Stack TDP, Raymond KN. 1993b. Stereoselectivity in chiral iron(III) and gallium(III) tris(catecholate) complexes effected by nonbonded weakly polar interactions. *J Am Chem Soc*, 115(14):6115-6125.
- Khalil MM, Tremoleda JL, Bayomy TB, Gsell W. 2011. Molecular SPECT Imaging: An Overview. *Int J Mol Imaging*:796025.
- Kumar B, Miller TR, Siegel BA, Mathias CJ, Markham J, Ehrhardt GJ, Welch MJ. 1981. Positron tomographic imaging of the liver: <sup>68</sup>Ga iron hydroxide colloid. *AJR Am J Roentgenol*, 136(4):685-690.
- Lange JL, Hayne DJ, Roselt P, McLean CA, White JM, Donnelly PS. 2016. A gallium(III) Schiff base-curcumin complex that binds to amyloid- $\beta$  plaques. *J Inorg Biochem*, 162:274-279.
- Langer O. 2016. Use of PET Imaging to Evaluate Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *J Clin Pharmacol*, 56(S7):S143-S156.
- Launay F, Alain V, Destandau E, Ramos N, Bardez E, Baret P, Pierre J-L. 2001. From 8-hydroxy-5-sulfoquinoline to new related fluorogenic ligands for complexation of aluminum(III) and gallium(III). *New J Chem*, 25(10):1269-1280.
- Leonhardt M, Keiser M, Oswald S, Kühn J, Jia J, Grube M, Kroemer H, Siegmund W, Weitschies W. 2010. Hepatic Uptake of the Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Gd-EOB-DTPA: Role of Human Organic Anion Transporters. *Drug Metab Dispos*, 38(7):1024-1028.
- Levin CS. 2005. Primer on molecular imaging technology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32(14):325-345.
- Liu S, Rettig SJ, Orvig C. 1992. Polydentate ligand chemistry of Group 13 metals: effects of the size and donor selectivity of metal ions on the structures and properties of aluminum, gallium,

- and indium complexes with potentially heptadentate (N4O3) amine phenol ligands. *Inorg Chem*, 31(26):5400-5407.
- Lukas M, Doessel K, Schramm A, Fuhr O, Stroh C, Mayor M, Fink K, v. Loehneysen H. 2013. A Tripodal Molecule on a Gold Surface: Orientation-Dependent Coupling and Electronic Properties of the Molecular Legs. *ACS Nano*, 7(7):6170-6180.
- Madsen SL, Welch MJ, Motekaitis RJ, Martell AE. 1992. Gallium-68-THM2BED: a potential generator-produced tracer of myocardial perfusion for positron emission tomography. *Nucl Med Biol*, 19(4):431-444.
- Martins AF, Prata MIM, Rodrigues SPJ, Geraldes CFGC, Riss PJ, Amor-Coarasa A, Burchardt C, Kroll C, Roesch F. 2013. Spectroscopic, radiochemical, and theoretical studies of the Ga<sup>3+</sup>-N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer) system: evidence for the formation of Ga<sup>3+</sup>- HEPES complexes in 68 Ga labeling reactions. *Contrast Media Mol Imaging*, 8(3):265-273.
- Mathias CJ, Sun Y, Welch MJ, Green MA, Thomas JA, Wade KR, Martell AE. 1988. Targeting radiopharmaceuticals: comparative biodistribution studies of gallium and indium complexes of multidentate ligands. *Nucl Med Biol*, 15(1):69-81.
- Mathias CJ, Lewis MR, Reichert DE, Laforest R, Sharp TL, Lewis JS, Yang Z-F, Waters DJ, Snyder PW, Low PS, Welch MJ, Green MA. 2003. Preparation of 66Ga- and 68Ga-labeled Ga(III)-deferoxamine-folate as potential folate-receptor-targeted PET radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol*, 30(7):725-731.
- Meikle SR, Beekman FJ, Rose SE. 2006. Complementary molecular imaging technologies: High resolution SPECT, PET and MRI. *Drug Discov Today Technol*, 3(2):187-194.
- Mendes F, Paulo A, Santos I. 2011. Metalloprobes for functional monitoring of tumour multidrug resistance by nuclear imaging. *Dalton Trans*, 40(20):5377-5393.
- Moerlein SM, Welch MJ. 1981. Tricatecholamide Analogs of Enterobactin as Gallium- and Indium-Binding Radiopharmaceuticals. *J Nucl Med*, 22:710-719.
- Moerlein SM, Daugherty A, Sobel BE, Welch MJ. 1991. Metabolic imaging with gallium-68- and indium-111-labeled low-density lipoprotein. *J Nucl Med*, 32(2):300-307.
- Moskwin M, von HH, Ericson K, Noren G. 1986. The blood tumour barrier in intracranial tumours studied with X-ray computed tomography and positron emission tomography using 68-Ga-EDTA. *Neuroradiology*, 28(3):259-263.
- Nock BA, Kaloudi A, Nagel J, Sinnes JP, Roesch F, Maina T. 2017. Novel bifunctional DATA chelator for quick access to site-directed PET (68)Ga-radiotracers: preclinical proof-of-principle with [Tyr(3)]octreotide. *Dalton Trans*, 46(42):14584-14590.
- Noel S, Cadet S, Gras E, Hureau C. 2013. The benzazole scaffold: a SWAT to combat Alzheimer's disease. *Chem Soc Rev*, 42(19):7747-7762.
- Notni J, Simecek J, Hermann P, Wester H-J. 2011. TRAP, a powerful and versatile framework for gallium-68 radiopharmaceuticals. *Chemistry*, 17(52):14718-14722.
- Notni J, Plutnar J, Wester H-J. 2012. Bone-seeking TRAP conjugates: surprising observations and their implications on the development of gallium-68-labeled bisphosphonates. *EJNMMI Res*, 2(1):13.
- Olchowyc C, Cebulski K, Lasecki M, Chaber R, Olchowyc A, Kalwak K, Zaleska-Dorobisz U. 2017. The presence of the gadolinium-based contrast agent depositions in the brain and symptoms of gadolinium neurotoxicity - A systematic review. *PLoS One*, 12(2):e0171704.
- Orntoft N, Ott P, Frisch K, Keiding S, Sorensen M. 2018. Functional assessment of hepatobiliary secretion by (11)C-cholylsarcosine positron emission tomography. *Biochim Biophys Acta*, 1864(4 Pt B):1240-1244.
- Parker D, Waldron BP. 2013. Conformational analysis and synthetic approaches to polydentate perhydro-diazepine ligands for the complexation of gallium(III). *Org Biomol Chem*, 11(17):2827-2838.



- Parker D, Waldron BP, Yufit DS. 2013. 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*, 42(22):8001-8008.
- Petrik M, Vlckova A, Novy Z, Urbanek L, Haas H, Decristoforo C. 2015. Selected <sup>68</sup>Ga-siderophores versus <sup>68</sup>Ga-colloid and <sup>68</sup>Ga-citrate: biodistribution and small animal imaging in mice. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 159(1):60-66.
- Pfeifer-Leeg M, Szabo G, Baranyai Z, Niksch T, Weigand W, Freesmeyer M. 2016. Synthesis and Characterization of GaIII, YIII, and LuIII Complexes with Etifenin and Analogues. *Z Anorg Allg Chem*, 642(6):486-491.
- Pozzilli C, Bernardi S, Mansi L, Picozzi P, Iannotti F, Alfano B, Bozzao L, Lenzi GL, Salvatore M, Conforti P, et al. 1988. Quantitative assessment of blood-brain barrier permeability in multiple sclerosis using <sup>68</sup>Ga-EDTA and positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51(8):1058-1062.
- Price EW, Cawthray JF, Bailey GA, Ferreira CL, Boros E, Adam MJ, Orvig C. 2012. H<sub>4</sub>octapa: An Acyclic Chelator for <sup>111</sup>In Radiopharmaceuticals. *J Am Chem Soc*, 134:8670–8683.
- Price TW, Greenman J, Stasiuk GJ. 2016. Current advances in ligand design for inorganic positron emission tomography tracers <sup>68</sup>Ga, <sup>64</sup>Cu, <sup>89</sup>Zr and <sup>44</sup>Sc. *Dalton Trans*, 45(40):15702-15724.
- Rahmim A. 2006. PET vs. SPECT: in the Context of Ongoing Developments. *Iran J Nucl Med*, 14(25):1-20.
- Rahmim A, Zaidi H. 2008. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl Med Commun*, 29(3):193-207.
- Ramogida CF, Murphy L, Cawthray JF, Ross JD, Adam MJ, Orvig C. 2015a. Novel "bi-modal" H<sub>2</sub>dedpa derivatives for radio- and fluorescence imaging. *J Inorg Biochem*, 162:253-262.
- Ramogida CF, Cawthray JF, Boros E, Ferreira CL, Patrick BO, Adam MJ, Orvig C. 2015b. H<sub>2</sub>CHXdedpa and H<sub>4</sub>CHXoctapa-Chiral Acyclic Chelating Ligands for <sup>67/68</sup>Ga and <sup>111</sup>In Radiopharmaceuticals. *Inorg Chem*, 54(4):2017-2031.
- Ramogida CF, Pan J, Ferreira CL, Patrick BO, Rebullar K, Yapp DTT, Lin K-S, Adam MJ, Orvig C. 2015c. Nitroimidazole-Containing H<sub>2</sub>dedpa and H<sub>2</sub>CHXdedpa Derivatives as Potential PET Imaging Agents of Hypoxia with <sup>68</sup>Ga. *Inorg Chem*, 54(10):4953-4965.
- Ramogida CF, Boros E, Patrick BO, Zeisler SK, Kumlin J, Adam MJ, Schaffer P, Orvig C. 2016a. Evaluation of H<sub>2</sub>CHXdedpa, H<sub>2</sub>dedpa- and H<sub>2</sub>CHXdedpa-N,N'-propyl-2-NI ligands for <sup>64</sup>Cu(II) radiopharmaceuticals. *Dalton Trans*, 45(33):13082-13090.
- Ramogida CF, Schindler D, Schneider C, Tan YLK, Huh S, Ferreira CL, Adam MJ, Orvig C. 2016b. Synthesis and characterization of lipophilic cationic Ga(III) complexes based on the H<sub>2</sub>CHXdedpa and H<sub>2</sub>dedpa ligands and their <sup>67/68</sup>Ga radiolabeling studies. *RSC Adv*, 6(105):103763-103773.
- RME. 2017. EMA erwägt Verbot von vier MRT-Kontrastmitteln. *Ärzteblatt*. <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/73573/EMA-erwaegt-Verbot-von-vier-MRT-Kontrastmitteln> (14.03.2017).
- Roesch F. 2013. Past, present and future of <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generators. *Appl Radiat Isot*, 76:24-30.
- Roesch F, Waldron BP, Parker D. 2014. Bifunctional chelating agents based on the 1,4-diazepine scaffold (DAZA) for non-invasive molecular imaging Johannes Gutenberg-Universitaet Mainz, Germany .
- Rogosnitzky M, Branch S. 2016. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals*, 29(3):365-376.
- Ronot M, Clift AK, Frilling A, Vilgrain V. 2016. Functional imaging in liver tumours. *J Hepatol*, 65(5):1017-1030.
- Rote-Hand-Brief. 2018. Gadolinium-haltige Kontrastmittel: Aktualisierte Empfehlungen nach Bewertung von Gadoliniumablagerungen im Gehirn und anderen Geweben. 08.01.2018.

- Sahoo SK, Kanungo BK, Baral M. 2009. Complexation of a tripodal amine-catechol ligand tris((2,3-dihydroxybenzylamino)ethyl)amine towards Al(III), Ga(III), and In(III). *Monatsh Chem*, 140(2):139-145.
- Schierz J-H, Opfermann T, Steenbeck J, Lopatta E, Settmacher U, Stallmach A, Marlowe RJ, Freesmeyer M. 2013. Early dynamic <sup>18</sup>F-FDG PET to detect hyperfusion in hepatocellular carcinoma liver lesions. *J Nucl Med*, 54(6):848-854.
- Schmitt-Willich H, Brehm M, Ewers CLJ, Michl G, Müller-Farnow A, Petrov O, Platzek J, Radüchel B, Sülzle D. 1999. Synthesis and Physicochemical Characterization of a New Gadolinium Chelate: The Liver-Specific Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Gd-EOB-DTPA. *Inorg Chem*, 38(6):1134-1144.
- Schramm A, Stroh C, Doessel K, Lukas M, Fischer M, Schramm F, Fuhr O, von Loehneysen H, Mayor M. 2013. Tripodal MIII Complexes on Au(111) Surfaces: Towards Molecular "Lunar Modules". *Eur J Inorg Chem*, 2013(1):70-79.
- Schuhmacher J, Maier-Borst W, Wellman HN. 1980. Positron scintigraphy of liver and kidney with gallium-68-labeled dihydroxyanthraquinones. *Radioakt Isot Klin Forsch*, 14(2):517-522.
- Schuhmacher J, Matys R, Hauser H, Clorius JH, Maier-Borst W. 1983. A Ga-68-labeled tetrabromophthalein (Ga-68 BP-IDA) for positron imaging of hepatobiliary function: concise communication. *J Nucl Med*, 24(7):593-602.
- Schuhmacher J, Klivenyi G, Hull WE, Matys R, Hauser H, Kalthoff H, Schmiegel WH, Maier-Borst W, Matzku S. 1992. A bifunctional HBED-derivative for labeling of antibodies with <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In and <sup>59</sup>Fe. Comparative biodistribution with <sup>111</sup>In-DPTA and <sup>131</sup>I-labeled antibodies in mice bearing antibody internalizing and non-internalizing tumors. *Int J Rad Appl Instrum B*, 19(8):809-824.
- Seale MK, Catalano OA, Saini S, Hahn PF, Sahani DV. 2009. Hepatobiliary-specific MR contrast agents: role in imaging the liver and biliary tree. *Radiographics*, 29(6):1725-1748.
- Seemann J, Waldron BP, Roesch F, Parker D. 2015a. Approaching 'Kit-Type' Labelling with <sup>68</sup>Ga: The DATA Chelators. *ChemMedChem*, 10(6):1019-1026.
- Seemann J, Eppard E, Waldron BP, Ross TL, Roesch F. 2015b. Cation exchange-based post-processing of <sup>68</sup>Ga-eluate: A comparison of three solvent systems for labelling of DOTATOC, NO2APBP and DATAm. *Appl Radiat Isot*, 98:54-59.
- Seemann J, Waldron B, Roesch F, Parker D. 2017. DATATOC: a novel conjugate for kit-type <sup>68</sup>Ga labelling of TOC at ambient temperature. *EJNMMI Radiopharm Chem*, 1(1):4.
- Sharma V, Sivapackiam J, Harpstrite SE, Prior JL, Gu H, Rath NP, Piwnica-Worms D. 2014. A generator-produced gallium-68 radiopharmaceutical for PET imaging of myocardial perfusion. *PLoS One*, 9(10):e109361.
- Siemens Healthcare GmbH. 07.12.2018. Symbia E  
<https://www.healthcare.siemens.com/molecular-imaging/spect-and-spect-ct/symbia-e>.
- Silva F, Campello MPC, Gano L, Fernandes C, Santos IC, Santos I, Ascenso JR, Joao Ferreira M, Paulo A. 2015. Chemical, radiochemical and biological studies of new gallium(III) complexes with hexadentate chelators. *Dalton Trans*, 44(7):3342-3355.
- Simecek J, Zemek O, Hermann P, Notni J, Wester H-J. 2013. Tailored Gallium(III) Chelator NOPO: Synthesis, Characterization, Bioconjugation, and Application in Preclinical Ga-68-PET Imaging. *Mol Pharmaceutics*, 11(11):3893-3903.
- Smith-Jones PM, Stolz B, Bruns C, Albert R, Reist HW, Fridrich R, Maecke HR. 1994. Gallium-67/Gallium-68-[DFO]-Octreotide- A potential radiopharmaceutical for PET imaging of somatostatin receptor-positive tumors: Synthesis and radiolabeling in vitro and preliminary in vivo studies. *J Nucl Med*, 35(2):317-325.
- Stack TDP, Karpishin TB, Raymond KN. 1992. Structural and spectroscopic characterization of chiral ferric tris-catecholamides: Unraveling the design of enterobactin. *J Am Chem Soc*, 114(4):1512-1514.

- Stomp W. 2012. Siemens Biograph mCT PET-CT System Receives FDA Clearance <https://www.medgadget.com/>.
- Stroszczynski C, Gaffke G, Gnauck M, Streitparth F, Wieners G, Lopez-Häninnen E. 2004. Aktueller Stand der MRT-Diagnostik mit leberspezifischen Kontrastmitteln. *Der Radiologe*, 44(12):1185.
- Takahashi M. 2009. Current topics on side effects of iodine-containing x-ray contrast agents and gadolinium-containing MRI contrast agents. *Nichidai Igaku Zasshi*, 68(3):174-180.
- Tarkia M, Saraste A, Saanijoki T, Oikonen V, Vahasilta T, Strandberg M, Stark C, Tolvanen T, Teras M, Savunen T, Green MA, Knuuti J, Roivainen A. 2012. Evaluation of <sup>68</sup>Ga-labeled tracers for PET imaging of myocardial perfusion in pigs. *Nucl Med Biol*, 39(5):715-723.
- Testa A, Zanda M, Elmore CS, Sharma P. 2015. PET Tracers To Study Clinically Relevant Hepatic Transporters. *Mol Pharm*, 12(7):2203-2216.
- Testa A, Dall'Angelo S, Mingarelli M, Augello A, Schweiger L, Welch A, Elmore CS, Sharma P, Zanda M. 2017. Design, synthesis, in vitro characterization and preliminary imaging studies on fluorinated bile acid derivatives as PET tracers to study hepatic transporters. *Bioorg Med Chem*, 25(3):963-976.
- Thews O, Dillenburg W, Fellner M, Buchholz H-G, Bausbacher N, Schreckenberger M, Roesch F. 2010. Activation of P-glycoprotein (Pgp)-mediated drug efflux by extracellular acidosis: in vivo imaging with <sup>68</sup>Ga-labelled PET tracer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37(10):1935-1942.
- Tsionou MI, Knapp CE, Foley CA, Munteanu CR, Cakebread A, Imberti C, Eykyn TR, Young JD, Paterson BM, Blower PJ, Ma MT. 2017. Comparison of macrocyclic and acyclic chelators for gallium-68 radiolabelling. *RSC Adv*, 7(78):49586-49599.
- Tulchinsky M. 2011. Unexpected gallbladder emptying from visual stimulation: controlling sensory factors in hepatobiliary scintigraphy. *Clin Nucl Med*, 36(11):1065-1068.
- Van Beers BE, Pastor CM, Hussain HK. 2012. Primovist, Eovist - what to expect. *J Hepatol*, 57(2):421-429.
- Velikyan I. 2015a. Continued rapid growth in <sup>68</sup>Ga applications: update 2013 to June 2014. *J Labelled Compd Radiopharm*, 58(3):99-121.
- Velikyan I. 2015b. <sup>68</sup>Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application Relationship. *Molecules*, 20(7):12913-12943.
- Verger E, Drion P, Meffre G, Bernard C, Duwez L, Lepareur N, Couturier O, Hindre F, Hustinx R, Lacoeyille F. 2016. <sup>68</sup>Ga and <sup>188</sup>Re starch-based microparticles as theranostic tool for the hepatocellular carcinoma: radiolabeling and preliminary in vivo rat studies. *PLoS One*, 11(10):e0164626/0164621-e0164626/0164617.
- Vogler H. 2006. MRT Kontrastmittel - Strukturen und Wirkungsweisen. *Kind & Radiologie*, 2(8):51.
- von Holst H, Ericson K, Edner G. 1989. Positron emission tomography with <sup>68</sup>-Ga-EDTA and computed tomography in patients with subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*, 97(3-4):146-149.
- Wachsmann J, Peng F. 2016. Molecular imaging and therapy targeting copper metabolism in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 22(1):221-231.
- Wagner SJ, Welch MJ. 1979. Gallium-68 labeling of albumin and albumin microspheres. *J Nucl Med*, 20(5):428-433.
- Waldron BP, Parker D, Burchardt C, Yufit DS, Zimny M, Roesch F. 2013. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. *Chem Commun (Cambridge, U K)*, 49(6):579-581.
- Wanek T, Halilbasic E, Visentin M, Mairinger S, Roemermann K, Stieger B, Kuntner C, Mueller M, Langer O, Trauner M. 2016. Influence of 24-Nor-Ursodeoxycholic Acid on Hepatic Disposition of [<sup>18</sup>F]Ciprofloxacin, a Positron Emission Tomography Study in Mice. *J Pharm Sci*, 105(1):106-112.

- Wang X-l, Li H, Wang Q-s, Zhang X-l. 2006. Clinical value of pre- and postoperative <sup>18</sup>F-FDG PET/CT in patients undergoing liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Nanfang Yike Daxue Xuebao*, 26(8):1087-1091, 1095.
- Wei P, Atwood DA. 1998. Syntheses and reactions of Saltren-Group 13 complexes. *J Organomet Chem*, 563(1-2):87-93.
- Weinmann HJ, Schuhmann-Giampieri G, Schmitt-Willich H, Vogler H, Frenzel T, Gries H. 1991. A new lipophilic gadolinium chelate as a tissue-specific contrast medium for MRI. *Magn Reson Med*, 22(2):233-237.
- Yang BY, Jeong JM, Kim YJ, Choi JY, Lee Y-S, Lee DS, Chung J-K, Lee MC. 2010. Formulation of <sup>68</sup>Ga BAPEN kit for myocardial positron emission tomography imaging and biodistribution study. *Nucl Med Biol*, 37(2):149-155.
- Yu H-M, Chan C-H, Chen J-H, Chien C-Y, Wang P-Y, Juan W-C, Yang C-H, Hsia H-T, Wang M-H, Lin W-J. 2018. Development of single vial kits for preparation of <sup>68</sup>Ga-labelled hexavalent lactoside for PET imaging of asialoglycoprotein receptor. *J Labelled Compd Radiopharm*, 61(12):885-894.
- Zhang J, Lang L, Zhu Z, Li F, Niu G, Chen X. 2015. Clinical translation of an albumin-binding PET radiotracer <sup>68</sup>Ga-NEB. *J Nucl Med*, 56(10):1609-1614.
- Zhu H, Xie Q, Li N, Tian H, Liu F, Yang Z. 2015. Radio-synthesis and mass spectrometry analysis of <sup>68</sup>Ga-DKFZ-PSMA-617 for non-invasive prostate cancer PET imaging. *J Radioanal Nucl Chem*, 309(2):575-581.

## 9 Danksagung

---

Mein ausdrücklicher Dank geht an PD Dr. Martin Freesmeyer für die Überlassung dieses interdisziplinären Forschungsthemas, die ununterbrochene Unterstützung, sein Vertrauen und sein reges Engagement bei der gemeinsamen Entwicklung dieses wie auch vieler weiterer Forschungsprojekte.

Ich bedanke mich ebenfalls ausdrücklich bei Prof. Wolfgang Weigand für die langjährige ausgezeichnete Betreuung, das beständige Vertrauen und die wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen der Ergebnisse.

Ein herzlicher Dank geht an das gesamte Team der Klinik für Nuklearmedizin für das schöne Arbeitsklima, die Freundlichkeit und Unterstützung. Ganz besonderer Dank gebührt hierbei den Kollegen des naturwissenschaftlichen Zweiges und der Radiopharmazie – für den tatkräftigen, intellektuellen, bürokratischen und emotionalen Support, für die Wohlfühlatmosphäre und für Schokolade.

## 10 Ehrenwörtliche Erklärung

---

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,  
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,  
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Martin Freesmeyer, Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Weigand, Prof. Dr. rer. nat. Stefanie Gräfe, Dr. rer. nat. Stephan Kupfer, Philipp Traber, Dr. rer. nat. Tobias Niksch, Dr. rer. nat. Thomas Opfermann, Christian Kühnel, Steffen Wiegand, Gregor Anslinger,  
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,  
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 23.01.2019

---

Julia Greiser

## 11 Anlagen

---

Zur publizierten Originalarbeit P2 liegt der Videoartikel digital auf CD vor.

Titel: Greiser\_P2\_Jove\_54334

Zur publizierten Originalarbeit P3 liegt ein Video als Supplement digital auf CD vor.

Titel: Greiser\_P3\_Dalton\_Trans\_Supplement\_Fig. 4