

Diplomarbeit

**Entwicklung und Validierung von  
Qualitätskontrollmethoden für theranostische  
Liganden des Prostataspezifischen  
Membranantigens**

eingereicht von

**Philipp Redenius**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Radiologie  
Klinische Abteilung für Nuklearmedizin**

unter der Anleitung von

**Mag.pharm. Dr.\*in rer.nat. Elisabeth Plhak  
Univ.-Prof. Dr.med. Jan Bucerius**

Graz, 1. Dezember 2025

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, am 1. Dezember 2025

Philipp Redenius eh.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Durchführung und der Erstellung dieser Diplomarbeit beigetragen haben:

Zuallererst gilt mein besonderer Dank Mag.pharm. Dr.\*in rer.nat. Elisabeth Plhak für dieses aktuelle und spannende Diplomarbeitsthema, die fortwährende Betreuung und das große entgegengebrachte Engagement.

Ebenso danke ich Univ.-Prof. Dr.med. Jan Bucerius für die liebe Betreuung und die schnelle und hilfreiche Korrektur.

Weiterhin gilt ein großes Dankeschön Mag.pharm. Christopher Pichler für die Anleitung und Hilfe während der Laborarbeit, die Strukturierung der praktischen Versuche und all die darüber hinausgehende Unterstützung.

Ich danke dem gesamten Team der Nuklearmedizin für die freundliche Aufnahme ins Team, die gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Ihr allesamt habt in mir eine große Begeisterung für die Nuklearmedizin geweckt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunde bedanken für das Korrekturlesen und die vielen lieben aufmunternden Worte.

Insbesondere bei meinen Eltern möchte ich mich bedanken, die mich von Anfang an auf diesem Weg unterstützt haben. Ohne euch wäre diese Arbeit in dieser Form und das ganze Studium nicht möglich gewesen.

## Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist das häufigste Malignom des Mannes und folglich ist die Behandlung des PCa von hoher Relevanz. Für fortgeschrittene Stadien des PCa stellt die Radioligandentherapie eine vielversprechende theranostische Behandlungsstrategie dar, bei der [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T für die Diagnostik und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T für die Therapie eingesetzt werden. Beide Radiopharmaka (RP) können auf nuklearmedizinischen Institutionen im kleinen Maßstab zur unmittelbaren klinischen Anwendung hergestellt werden. Eine umfassende Qualitätskontrolle ist dabei essentiell, um die Sicherheit und Wirksamkeit zu gewährleisten.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine Radio-Hochleistungsflüssigchromatographie (Radio-HPLC) Methode für die Qualitätskontrolle von [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T entwickelt und gemäß international anerkannten Richtlinien validiert. Die chromatographische Trennung erfolgte in einer ACE 3 C18 (150 x 3 mm) HPLC-Säule mit einem Gradienten aus 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in (A) Wasser und (B) Acetonitril bei einer Flussrate von 0,42 ml/min über 36 min. Die UV-Absorption wird bei 220 nm gemessen.

Über die ermittelte Kalibriergrade konnte im Arbeitsbereich von 1 bis 40  $\mu\text{g/ml}$  mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0,9983 ein lineares Verhältnis zwischen Konzentrationen und Absorption bewiesen werden. Für die Kalibrierstandardkonzentrationen von 2,5 bis 40  $\mu\text{g/ml}$  konnte eine Richtigkeit von 93,21 – 101,23% gezeigt werden. Als LOQ wurde die Konzentration 1,0  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt. Präzision, Spezifität und Robustheit der Methode konnten erfolgreich nachgewiesen werden. Alle Validierungsparameter wurden erfüllt und damit ist die entwickelte HPLC-Methode für die Quantifizierung von PSMA I&T in [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T Radiopharmakalösungen geeignet. Außerdem trennt die neu entwickelte Methode zuverlässig die Peaks von [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T, [ $^{\text{nat}}\text{Lu}$ ]PSMA I&T und PSMA I&T, und ermöglicht so eine Identifikation und Unterscheidung der 3 Liganden anhand der Retentionszeiten.

Die neu entwickelte Methode bildet die analytische Grundlage für die Herstellung und den zukünftigen klinischen Einsatz von theranostischen PSMA I&T Liganden auf der Klinischen Abteilung für Nuklearmedizin.

## Abstract

Prostate cancer (PCa) is the most common malignancy in men, making its treatment highly relevant. For advanced stages of PCa, radioligand therapy represents a promising theranostic treatment strategy, in which [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T is used for diagnosis and [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T for therapy. Both radiopharmaceuticals (RP) can be legally produced on a small scale for immediate clinical use at nuclear medicine institutions. Comprehensive quality control is essential to ensure safety and efficacy.

As part of this thesis, a radio-high-performance liquid chromatography (radio-HPLC) method for the quality control of [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T and [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T was developed and validated in accordance with internationally recognized guidelines. Chromatographic separation was performed in an ACE 3 C18 (150 x 3 mm) HPLC column with a gradient of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in (A) water and (B) acetonitrile at a flow rate of 0.42 ml/min over 36 min. UV absorption is measured at 220 nm.

Using the determined calibration line, a linear relationship between concentrations and absorption was demonstrated in the working range of 1 to 40  $\mu\text{g/ml}$  with a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.9983. For the calibration standard concentrations of 2.5 to 40  $\mu\text{g/ml}$ , an accuracy of 93.21–101.23% was demonstrated. The concentration of 1.0  $\mu\text{g/ml}$  was identified as the LOQ. The precision, specificity, and robustness of the method were successfully demonstrated. All validation parameters were met, making the developed HPLC method suitable for the quantification of PSMA I&T in [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T and [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T radiopharmaceutical solutions. In addition, the newly developed method reliably separates the peaks of [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T, [ $^{\text{nat}}\text{Lu}$ ]PSMA I&T, and PSMA I&T, enabling identification and differentiation of the three ligands based on retention times.

The newly developed method forms the analytical basis for the production and future clinical use of theranostic PSMA I&T ligands at the Clinical Department of Nuclear Medicine.

# Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungen und deren Erklärung .....	IX
II. Abbildungsverzeichnis .....	X
III. Tabellenverzeichnis .....	X
1. Naturwissenschaftliche Grundlagen .....	1
1.1. Einleitung .....	1
1.2. Radioaktivität.....	2
1.3. Arten von Strahlung und ihre biologischen Effekte.....	4
1.4. Bereitstellung von Radionukliden zur medizinischen Anwendung .....	7
1.5. Radioaktive Arzneimittel .....	10
1.6. Physiologische Grundlagen und Pathophysiologie des Prostatakarzinoms .....	12
1.7. Prostataspezifisches Membranantigen und seine Bedeutung als Target in der Nuklearmedizin .....	14
1.8. Ausgewählte theranostisch relevante PSMA-Liganden.....	15
1.9. Molekulare Bildgebung mittels PSMA PET/CT und SPECT .....	18
1.10. Radioliganden- Therapie des Prostatakarzinoms .....	20
1.11. In-house Markierung und Qualitätskontrolle theranostisch relevanter PSMA-Liganden .....	22
1.12. Radio-HPLC und chromatographisches Trennprinzip .....	23
2. Problemstellung .....	25
2.1. Ausgangssituation .....	25
2.2. Zielsetzung.....	28
3. Material und Methoden .....	28
3.1. Verwendete Materialien für die Radio-HPLC .....	28
3.2. Referenzsubstanzen und Chemikalien .....	29
3.3. Materialien für die Testsynthese von [ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA I&T .....	33
4. Validierungsparameter und Durchführung .....	33
4.1. Richtigkeit (Accuracy).....	33

4.2. Präzision (Precision).....	34
4.3. Spezifität (Specificity) .....	34
4.4. Linearität (Linearity).....	35
4.5. Bestimmungsgrenze (Limit of Detection (LOD) und Limit of Quantification (LOQ))	35
4.6. Arbeitsbereich (Range).....	36
4.7. Robustheit (Robustness) .....	36
5. Ergebnisse.....	37
5.1. Methodenentwicklung.....	37
5.2. Validierungsergebnisse .....	39
5.3. Validierungsergebnisse Radioaktivitätsdetektor.....	46
6. Diskussion .....	48
7. Literaturverzeichnis.....	51

## I. Abkürzungen und deren Erklärung

ADT	Androgen deprivation therapy
CRPC	castration resistant PCa
CTX	Cabazitaxel
DRU	digitale rektale Untersuchung
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTX	Docetaxel
EANM	European Association of Nuclear Medicine
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
EMA	European Medicines Agency
GMP	Good Manufacturing Practice
HGPIN	high-grade prostatische intraepitheliale Neoplasie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HSPC	hormone sensitive PCa
LET	linearer Energietransfer
mCRPC	metastatic castration resistant prostate cancer
MRT	Magnetresonanztomographie
PCa	Prostatakarzinom
PET	Positronen-Emission-Tomographie
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RP	Radiopharmakon
RSD	Relative Standardabweichung
SBRT	stereotactic body radiotherapy
SPECT	Single-Photon-Emission-Computed-Tomography
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau Tracer nach Dietlein et al. (11) .....	11
Abbildung 2: Aufbau der PSMA-Liganden - eigene Graphik nach Wester & Schottelius (30)...	16
Abbildung 3: Arzneibuch-HPLC-Methode für [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA I&T, Messung 250630.002 .....	27
Abbildung 4: Chromatogramm des SST-Standards unter Verwendung der ersten HPLC-Methode, Messung: 250514.002 .....	38
Abbildung 5: Kalibriergrade aus den gemittelten Flächen .....	41
Abbildung 6: Spezifitätsstandard (PSMA I&T 10 µg/ml in Produktmatrix, 250617.010).....	43
Abbildung 7: Genitisinsäure-Standard (c = 250 µg/ml) .....	44
Abbildung 8: Linearitätsbestimmung des Radioaktivitätsdetektors durch wiederholte Injektionen über 189 Minuten .....	47
Abbildung 9: UV- (oben) und Radioaktivitätschromatogramm (unten) von [ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA I&T (Injektion zum Zeitpunkt t <sub>0</sub> ) .....	47

## III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der mobilen Phasen während der Messung .....	29
Tabelle 2: Herstellung der Kalibrierstandards .....	31
Tabelle 3: Maximale Probenkonzentrationen .....	36
Tabelle 4: Erste HPLC-Methode als Ausgangspunkt für die weitere Methodenentwicklung ...	37
Tabelle 5: Zweite Methode, Messung 250514.008 .....	39
Tabelle 6 : Peakintegrale der PSMA I&T Standardreihe, rot: < LOQ, hellgrün: LOQ, grün: restlicher Arbeitsbereich .....	40
Tabelle 7: Validierungsparameter Wiederholbarkeit .....	41
Tabelle 8: Validierungsergebnisse der intermediären Präzision.....	42
Tabelle 9: Validierungsergebnisse der Spezifität .....	42
Tabelle 10: Versuche zur Robustheit .....	45
Tabelle 11: Injizierte Aktivitäten und gemessene Counts über 189 Minuten.....	47

# 1. Naturwissenschaftliche Grundlagen

## 1.1. Einleitung

PCa betreffen nicht nur Männer, sondern können bei allen Menschen mit Prostata auftreten. Das bedeutet unter anderem Cis-Männer, Trans-Frauen und intersexuelle Personen. Außerdem finden sich bei vielen Frauen Paraurethraldrüsen (oder Skene-Drüsen), die auch als weibliche Prostata bezeichnet werden und in seltenen Fällen auch PCa-ähnlich entarten können (1-3). Folglich wird in dieser Arbeit gegendert.

Das Prostatakarzinom ist beim Mann in Österreich das häufigste Malignom und nach dem Lungenkrebs das Malignom mit der zweithöchsten Sterblichkeit (1). Weltweit kommt es zu 1,3 Millionen Neudiagnosen und 360.000 Todesfällen pro Jahr. Aufgrund des üblicherweise langsamen Wachstums und des symptomarmen Verlaufs sind PCa trotz der hohen Inzidenz oft nicht die primäre Todesursache (2).

Deutlich mehr Patient\*Innen sterben mit als an ihrem PCa (3) und die 5-Jahres-Überlebensrate in Österreich betrug 2022 93,8% (4). Trotzdem gibt es aufgrund der Häufigkeit dieser Erkrankung auch viele Patient\*Innen mit fortgeschrittener Erkrankung (5, 6).

Ein wichtiges diagnostisches Tool für diese Patient\*Innen ist die PET/CT mit radioaktiv markierten PSMA-Liganden, mit der Primärtumore gut beurteilt und Metastasen höchst sensitiv gefunden werden können (5, 6). Ein Radiopharmakon (RP) für die PSMA-PET/CT ist [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T (5).

Bei Patient\*Innen mit metastasiertem, kastrationsresistentem (also fortgeschrittenem) PCa, die zuvor mittels Inhibition des Androgenrezeptor-Signalwegs und taxanbasierter Chemotherapie behandelt wurden ist eine empfohlene Therapie die RLT mit [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 und [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T (5).

Der Ligand PSMA I&T kann, in Kopplung mit dem Positronenemittenten Gallium-68 diagnostisch und in Kopplung mit dem  $\beta^-$  - und  $\gamma$ - Strahler Lutetium-177 therapeutisch verwendet werden. Solch eine Verzahnung von Therapie und Diagnostik wird auch als Theranostik bezeichnet und soll helfen frühzeitig und

symptomunabhängig Krankheiten beziehungsweise ein Krankheitsfortschreiten zu erkennen und patient\*innenspezifisch zu behandeln (7).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Validierung einer Qualitätskontrollmethode für die theranostisch nutzbaren Liganden des prostataspezifischen Membranantigens  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA I\&T}$  und  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA I\&T}$ . Damit diese RP in unserem Labor synthetisiert und Patient\*Innen verabreicht werden dürfen, müssen Qualität und Sicherheit nach den gültigen Regelwerken bestätigt werden.

## 1.2. Radioaktivität

Materie ist in der Physik alles, was Platz einnimmt und eine Masse hat. Sie setzt sich aus Atomen zusammen, die wiederum aus kleineren miteinander interagierenden Teilchen besteht (8). Die Atomsorte, aus der sich ein Stoff zusammensetzt, wird Nuklid genannt. Nuklide werden durch die Protonenzahl  $Z$ , die Neutronenzahl  $N$  und die Massenzahl  $A$  als Summe der beiden gekennzeichnet. Die Protonenzahl entspricht hierbei der Ordnungszahl im Periodensystem (9).

Uran-235 hat beispielsweise eine Massenzahl von 235, eine Ordnungszahl und Protonenzahl von 92 und somit eine Neutronenzahl von  $235-92=143$ .

Atome sind üblicherweise von Elektronen umgeben, wobei die Trägheit der Elektronen viel geringer als die der Kernteilchen (Protonen und Neutronen) ist. Bei ungeladenen Atomen entspricht die Anzahl der negativ geladenen Elektronen der Anzahl der positiv geladenen Protonen. Nuklide des gleichen Elements haben stets dieselbe Protonenzahl, können allerdings verschiedene Neutronenzahlen und damit auch Massenzahlen aufweisen. In diesem Fall spricht man auch von Isotopen. Natürlich vorkommende Elemente bestehen aus einem Isotopengemisch (9).

Uran-238 ist beispielsweise ein stabileres Isotop des bereits erwähnten Uran-235.

Atomkerne haben eine außerordentlich hohe Dichte, in der die positiven Protonen aufgrund der starken Kernkraft zusammengehalten werden. Diese Kraft ist stärker als die elektrostatische Abstoßung zwischen den Protonen, hat allerdings eine deutlich geringere Reichweite. Hierdurch bedingt müssen große Kerne, um stabil zu sein, mehr Neutronen als Protonen enthalten. Kleine stabile Atome enthalten die

Kernbausteine etwa im Verhältnis 1:1, bei schwereren Kernen verschiebt sich dieses Verhältnis bis hin zu etwa 1,5:1. Wenn die Nukleonenzusammensetzung ungünstiger ist, wird der Kern instabil und kann sich unter Aussendung ionisierender Strahlung in einen stabileren Kern umwandeln. Dieser Prozess wird als Radioaktivität bezeichnet (10).

Radioaktive Kerne verfügen über potenzielle Energie, die teilweise als kinetische Energie in Form geladener Teilchen und teilweise als elektromagnetische Strahlungsenergie in Form von Photonen abgegeben wird. Der Zeitpunkt dieser Energieabgabe kann nicht vorausgesagt werden, es kann nur eine Wahrscheinlichkeit angegeben werden, mit der der Zerfall nach einer Sekunde stattfindet. Diese Zerfallswahrscheinlichkeit wird mit der Zerfallskonstante  $\lambda$  ( $s^{-1}$ ) beschrieben. Die Radioaktivität  $A$  gibt die mittlere Anzahl der Zerfälle in einer Sekunde an, die bei  $N$  vorhandenen Kernen zu erwarten ist und wird mit der SI-Einheit Becquerel ( $s^{-1}$ ) angegeben.

$$A = \lambda \times N \quad (\text{Gl. 1})$$

1 Becquerel = 1 Bq und entspricht der Stoffmenge eines Nuklids, bei der 1 Zerfall pro Sekunde stattfindet (11).

Die Anzahl der noch nicht zerfallenen Kerne und demnach auch die Radioaktivität nehmen mit der Zeit exponentiell ab. In der Praxis wird dieser Zeitverlauf in der Regel nicht mit der Zerfallskonstante  $\lambda$  sondern mit der Halbwertszeit (HWZ)  $T_{1/2}$  angegeben. Es gilt:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (\text{Gl. 2})$$

Die HWZ ist also diejenige Zeit, nach der von der Anfangsstoffmenge noch die Hälfte vorhanden ist. Die andere Hälfte ist zerfallen (9).

Neben der bereits beschriebenen HWZ, welche auch als physikalische HWZ bezeichnet wird, sind in der Nuklearmedizin auch die biologische und die effektive HWZ von Bedeutung. Die biologische HWZ ist die Zeit, nachdem die Hälfte eines

betrachteten Stoffs (z.B. eines RP) ausgeschieden bzw. abgebaut ist. Stoffwechsel und Funktion der Ausscheidungsorgane können diese Zeit wesentlich beeinflussen. Die effektive Halbwertszeit ist die Kombination von physikalischer und biologischer Halbwertszeit – also die Zeit, nach der aufgrund von physikalischen und biologischen Prozessen nur mehr die Hälfte der Menge des betrachteten Stoffs vorliegt. Sie ist immer kürzer als die kürzere der beiden Halbwertszeiten und lässt sich ausdrücken als (12):

$$T_{1/2} \text{effektiv} = \frac{T_{1/2} \text{physikalisch} * T_{1/2} \text{biologisch}}{T_{1/2} \text{physikalisch} + T_{1/2} \text{biologisch}}$$

### 1.3. Arten von Strahlung und ihre biologischen Effekte

Grundsätzlich kann Strahlung nur dann auf ein biologisches Objekt wirken, wenn sie zum Teil oder zur Gänze absorbiert wird. Hierbei kann Strahlung in Korpuskularstrahlung und elektromagnetische unterschieden werden. Beide Strahlenarten können Energie an die durchdrungene Materie abgeben. Physikalisch kann es zu einer Wechselwirkung in Form von einer **Anregung** von Elektronen kommen (Elektronen werden auf ein anderes Energieniveau gehoben) oder es kann eine **Ionisation** stattfinden (Elektronen verlassen das Atom). Um die zu erwartende Wirkung darzustellen, wird die **Ionisationsdichte** verwendet (entspricht der Ionisationszahl/Weg). Weil sich die Ionisationsdichte allerdings technisch kaum bemessen lässt, wird sie mithilfe des mittleren Energieverlustes ( $\Delta E$ ) über den Weg ( $\Delta S$ ) des Primärstrahls indirekt ermittelt. Sie wird als **linearer Energietransfer (LET)** bezeichnet und in keV/ $\mu\text{m}$  angegeben:

$$LET = \frac{\Delta E}{\Delta S} \quad (\text{Gl. 3})$$

Die ionisierende Strahlenwirkung kann entweder durch Stöße direkt im bestrahlten Molekül erfolgen, oder die Strahlung kann andere Moleküle als das Zielmolekül so verändern, dass aufgrund von sekundären Radikalreaktionen andere Strukturen geschädigt werden (13).

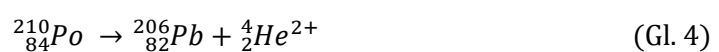
Es kann beispielsweise zu einer Radiolyse des Wassers kommen:

- Ionisieren von Wassermolekülen:  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$
- Zerfall des positiven Ions  $\text{H}_2\text{O}^+ \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^*$
- Reaktion des Elektrons mit einem weiteren Wassermolekül  $\text{e}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH}^- + \text{H}^*$

Zudem kann auch Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entstehen, das eine große biologische Wirksamkeit hat. Zellschäden bis zur Nekrose oder Apoptose der Zellen entstehen vor allem aufgrund von DNA-Schädigung. Diese wird durch die oben beschriebenen Mechanismen ausgelöst und tritt in Form von Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen, Basenschäden (irreversible Strukturveränderungen der DNA-Basen) und DNA-Protein-Verbindungen, sowie Anhäufungen und Kombination dieser Veränderungen auf. Hierdurch kann es im Gewebe zu Mutationen, Genaktivierungen, Zellzyklusverlängerungen oder Zelltod bzw. reproduktiven Zelltod (Verlust der Teilungsfähigkeit der Zelle) kommen. Vor allem letztere Mechanismen sind besonders günstig zur Therapie von Malignomen, da diese sich unter anderem durch schnelle, unkontrollierte Teilungen auszeichnen. Hinzu kommt, dass die Strahlenempfindlichkeit von Zellen auch von ihrer Position im Zellzyklus abhängt und während der Mitose besonders hoch ist. Somit ist eine Bestrahlung von Tumorzellen besonders effektiv und erzeugt biologisch besonders hilfreiche Effekte (14).

#### $\alpha$ -Strahlung:

Bei der  $\alpha$ -Strahlung wird ein zweifach positiv geladener Helium-Atomkern abgespalten, also ein Teilchen mit 2 Protonen und 2 Neutronen. Es entsteht demnach ein neues chemisches Element mit einer um zwei geringeren Ordnungszahl und einer um vier geringeren Massenzahl. Die Masse der Zerfallsprodukte ist hierbei geringer als die des Mutterkerns. Beim Zerfall von Polonium-210 (s.u.) beträgt diese Massendifferenz z.B. 0,0058 u was einer Energie von 5,4 MeV entspricht.



Die „verlorene“ Masse wird als kinetische Energie an das  $\alpha$ -Teilchen und den Mutterkern abgegeben oder der Tochterkern bleibt in angeregtem Zustand und gibt die Energie als  $\gamma$ -Strahlung ab um wieder in den Grundzustand zu gelangen (10).

Das Durchdringungsvermögen von  $\alpha$ -Strahlung ist in Luft einige cm (9), im Gewebe weniger als 100  $\mu\text{m}$ . Der LET ist also außerordentlich hoch. Für eine therapeutische Anwendung muss das Nuklid folglich sehr nah an das zu bestrahlende Gewebe gebracht werden (11).

### $\beta$ -Strahlung:

Bei  **$\beta$ -Strahlung** werden negativ geladene Elektronen und bei der  **$\beta^+$ -Strahlung** werden deren Antiteilchen also positiv geladene Positronen abgegeben. Die maximal abgegebene Energie dieser Teilchen wird in der Nuklidkarte angegeben, die tatsächliche Energie ist allerdings variabel und kann in einem kontinuierlichen  $\beta$ -Spektrum angegeben werden.  $\beta$ -strahlende Nuklide zerfallen, indem ein Neutron unter Aussendung eines Elektrons (und eines Elektron-Antineutrinos) in ein Proton umgewandelt wird. Hierdurch erhöht sich die Ordnungszahl des Atoms bei gleichbleibender Massenzahl um eins. Diese Zerfallsart findet sich z.B. bei Lutetium-177 (11).

Im Mittel wird bei jedem  $\beta$ -Zerfall ein Drittel der maximalen Energie abgegeben und die Reichweite des emittierten Teilchens in Wasser und Gewebe korreliert bei  $\beta$ -Zerfall fast linear mit der abgegebenen Energie. Bei einer  $\beta$ -Strahlenenergie von 1 MeV ergibt sich eine Reichweite von etwa 3 mm. Beim Lutetium-177 Zerfall beträgt die durchschnittliche Reichweite der emittierten Teilchen bei 670  $\mu\text{m}$  aufgrund der geringeren Zerfallsenergie (15). Die maximale Energie ist vom Nuklid abhängig und kann bis zu 12 MeV betragen. Hierdurch kann mit  $\beta$ -Strahlern eine hohe Strahlendosis in einem ziemlich begrenzten Areal erreicht werden (11).

**$\beta^+$ -strahlende** Nuklide kommen natürlich nur selten vor, können allerdings künstlich hergestellt werden. Bei deren Zerfall wird unter Abgabe eines Positrons (und eines Elektron-Neutrinos) ein Proton in ein Neutron umgewandelt. Es verringert sich also bei gleichbleibender Massenzahl die Ordnungszahl des Atoms um eins. Dieser Zerfall ist z.B. die häufigste Zerfallsart von Gallium-68:



Das Positron ist das Antiteilchen des Elektrons und hat also die gleiche Masse bei entgegengesetzter Ladung. Das Positron trifft sehr schnell auf ein Elektron und annihiliert mit diesem. Dabei werden beide Teilchen vernichtet und dafür 2 Photonen diametral im Winkel von  $180^\circ$  mit einer Energie von jeweils 0,511 MeV emittiert (11). Die erzeugte Strahlung wird als Vernichtungsstrahlung bezeichnet (10).

#### $\gamma$ -Strahlung:

Bei der  $\gamma$ -Strahlung gibt ein metastabiler Kern elektromagnetische Strahlung mit sehr kleiner Wellenlänge ab, um in einen stabileren Zustand zu übergehen. Dabei ändern sich weder Ordnungs- noch Massenzahl. Die Energie wird hierbei als Quanten mit definierter Energie abgegeben. Die Energie wird durch den Übergang des Kerns zwischen bestimmten Energieniveaus freigesetzt. Radioaktive Zerfälle wie der oben gezeigte Zerfall von Lutetium-177 werden oft von  $\gamma$ -Strahlung begleitet. Lu-177 kann entweder die gesamte Zerfallsenergie direkt abgeben oder es wird ein weniger energiereiches Elektron abgegeben und der Kern bleibt im metastabilen Zustand:



In einem weiteren Schritt kann die Energie dann als  $\gamma$ -Quant abgegeben werden (10).



### 1.4. Bereitstellung von Radionukliden zur medizinischen Anwendung

Die Radionuklide, die für die medizinische Anwendung verwendet werden, haben kurze Halbwertszeiten und kommen somit in der Natur nicht oder nur in geringen Mengen vor. Um ausreichende Mengen bereitstellen zu können müssen sie also künstlich erzeugt werden und das erfolgt im Wesentlichen auf drei Wegen:

- Mithilfe eines Generatorsystems
- Mithilfe eines Teilchenbeschleunigers (Zyklotron)
- Im Kernreaktor

Eine Möglichkeit Radionuklide bereitzustellen ist ein **Generatorsystem**, erklärt am Beispiel des  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators. Im Generator befindet sich eine Glassäule, die mit fester Matrix gefüllt ist auf der das Mutternuklid Germanium-68 adsorbiert ist. Dieses zerfällt mit einer Halbwertszeit von 270,95 Tagen unter Elektroneneinfang kontinuierlich zum kurzlebigen Gallium-68 (HWZ 68 min). Wird die Säule mit Salzsäure durchspült kann Gallium-68 als  $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$  eluiert werden. Neben Gallium-68 werden auch dessen Zerfallsprodukt (stabiles Zink-68) und eine sehr geringe Menge Germanium-68 als Verunreinigung eluiert. Das Eluat wird in mehreren Schritten aufbereitet, sodass Gallium-68 mit wenigen Verunreinigungen und in einer geringen Menge Lösungsmittel mit geeignetem pH-Wert gewonnen werden kann (16, 17)). Bei zugelassenen Generatoren, wie zum Beispiel beim GalliaPharm (Eckert&Ziegler) kann das Eluat auch direkt in Kombination mit einem zugelassenen Herstellungskit zur Präparation eines Radiopharmakons verwendet werden, wobei der Hersteller eine ausreichende Qualität garantiert.

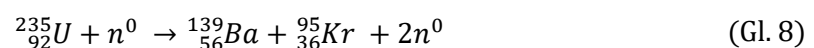
Im **Teilchenbeschleuniger** werden geladene Teilchen (z.B. Protonen) beschleunigt und somit auf eine ausreichende kinetische Energie gebracht, um bei Teilchenkollision eine Kernreaktion hervorrufen zu können. Dafür macht man sich zu Nutze, dass geladene Teilchen ihre Energie verändern, wenn sie in ein Magnetfeld eingebracht werden (18).

Die gebräuchlichsten Teilchenbeschleuniger zur Bereitstellung von Radionukliden, vor allem im medizinischen Bereich, sind als **Zyklotrone** konstruiert. Sie bestehen aus zwei hohlen D-förmigen Elektroden „Dees“ genannt. Die beiden Dees sind durch einen schmalen Spalt voneinander getrennt. Im Zentrum des Zyklotrons befindet sich eine Ionenquelle. Hier werden beispielweise aus Wasserstoffgas geladene Teilchen erzeugt, die später auf die Zielnuklide geschossen werden, um Kernreaktionen auszulösen. Mit einem Zyklotron wird z.B. Fluor-18 für  $^{18}\text{F}$ FDG über eine sogenannte  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  Reaktion erzeugt. Von der Ionenquelle im Zentrum wird ein negativ geladenes Wasserstoffatom ( $\text{H}^-$ ) erzeugt. Durch seine negative Ladung wird es in Richtung des positiv geladenen Dee beschleunigt und wird in dessen Inneren, aufgrund einer durch ein orthogonal verlaufendes Magnetfeld wirkenden Lorenzkraft, zentripetal abgelenkt. Sobald es wieder den Spalt zwischen den Dees erreicht, kommt es zu einer Spannungsumkehr. Der vorher positive Dee ist nun negativ und umgekehrt. Durch diese Wechselfeldspannung

wirkt auf das  $H^+$  - Ion innerhalb des Spalts ein elektrisches Feld, und es wird in Richtung der positiven Ladung angezogen und beschleunigt. Mit jedem Umlauf gewinnt das  $H^+$  - Ion so an Energie und Geschwindigkeit und der Radius der Kreisbahn wird immer größer. Das Ion bewegt sich demnach spiralförmig. Die Frequenz der Wechselspannung ist auf die Umlauffrequenz des Teilchens abgestimmt. So wird es bei jedem Durchgang im richtigen Moment beschleunigt. Am äußeren Rand des Zyklotrons trifft das  $H^+$  - Ion auf eine geladene Extraktionsfolie, wo es seine beiden Elektronen verliert. Es entsteht ein Proton, das durch seine positive Ladung von der Kreisbahn in Richtung Target abgelenkt wird. Um Fluor-18 zu synthetisieren wird als Target Sauerstoff-18 eingesetzt. Wenn der Sauerstoff-18 Kern ein energiereiches Proton einfängt, bildet sich ein extrem kurzlebiger Zwischenzustand und ein Neutron wird rasch abgegeben. Der neue Kern hat eine höhere Ordnungszahl. Es findet dementsprechend eine Elementumwandlung zu Fluor-18 statt (16).

Um das Isotop Lutetium-177 herzustellen wird ein **Kernreaktor** eingesetzt. Hierfür werden Neutronen verwendet, die folgendermaßen gewonnen werden:

Schwere instabile Kerne können sich in leichtere Kerne und freie Neutronen spalten. Eine Kernspaltung kann spontan erfolgen, schwere Kerne können aber auch durch Neutroneneinfang instabiler gemacht werden, wodurch eine weitere Kernspaltung ausgelöst werden kann die wiederum Neutronen freisetzt und eine Kettenreaktion startet. Bsp.:



Mit diesen Neutronen kann nun auf direktem oder indirektem Weg Lutetium-177 erzeugt werden.

Beim **direkten Weg** wird angereichertes Lutetium-176 mit Neutronen beschossen und durch eine Neutroneneinfangreaktion entstehen die Kernisotope Lutetium-177 und Lutetium-177m. Dieser Syntheseweg ist relativ einfach, aufgrund des hohen Wirkungsquerschnitts von Lutetium-176 gut skalierbar, kostengünstig und produziert wenig radioaktiven Abfall. Es entstehen dabei jedoch Nebenprodukte wie stabiles Lutetium-175 und Lutetium-177m. Letzteres Isotop hat eine lange HWZ von 160,4 d, was nicht nur zu einer unerwünschten  $\gamma$ -Bestrahlung des Patienten führt,

sondern auch die Entsorgung aufwendiger macht. Zudem lässt sich das fertige Produkt vom Ausgangsprodukt Lutetium-176 nicht zur Gänze abtrennen. Das auf diesem Weg produzierte Lutetium-177 wird wegen der enthaltenen isotopengleichen Nebenprodukte auch als „carrier added“ bezeichnet (15).

Den **indirekten Weg** stellt der Neutroneneinfang von Ytterbium-176 dar, durch den Ytterbium-177 (HWZ 1,9 h) entsteht, das unter  $\beta$ -Zerfall zu Lutetium-177 zerfällt. Das Lutetium kann durch aufwendige radiochemische Trenn- und Aufbereitungsverfahren vom Ytterbium getrennt werden, wodurch eine hohe Reinheit und spezifische Aktivität des Produkts erreicht werden können. Dadurch, dass im Endprodukt keine isotopengleichen Nebenprodukte enthalten sind, wird es auch als „no carrier added“ bezeichnet. Durch die hohe Reinheit bleibt die spezifische Aktivität des Lutetium-177 auch nach einer längeren Lagerungszeit hoch und die Entsorgung gestaltet sich durch das Fehlen langlebiger Nebenprodukte einfach. Dieser Produktionsweg ist allerdings aufgrund des geringen Wirkungsquerschnitts von Ytterbium-176 deutlich weniger effektiv und somit schlechter skalierbar. Außerdem entstehen beim Produktionsprozess größere Mengen radioaktiver Abfall, entsprechend ist das Verfahren auch teurer (15).

## 1.5. Radioaktive Arzneimittel

Arzneimittel die ein oder mehrere radioaktive Isotope enthalten und medizinisch zur Diagnostik oder Therapie eingesetzt werden, werden als RP bezeichnet. Radiopharmaka für die Diagnostik werden auch Radiotracer genannt. Sie enthalten ein Nuklid, das Strahlung in Form von Gammastrahlen oder Positronen aussendet. Diese Strahlung wird mit Hilfe von bildgebenden Verfahren wie Szintigraphie, Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) beziehungsweise Positronen-Emission-Tomographie (PET) detektiert. Je nach ihren pharmakologischen Eigenschaften können RP sich beispielweise durch Teilnahme an Stoffwechselprozessen oder Bindung an eine bestimmte Zielstruktur in bestimmten Geweben und Organen anreichern. Dadurch ermöglichen sie die Darstellung biologischer, physiologischer und pathophysiologischer Prozesse mittels bildgebender Verfahren (11).

Radiopharmaka zur Therapie enthalten  $\beta$ - Strahler oder  $\alpha$ -Strahler, deren Strahlung gezielt Zellschäden verursacht. Ziel ist, diese Radionuklide beispielsweise

möglichst nah an die Tumorzellen zu bringen und somit die biologischen Strahleneffekte direkt am Zielgewebe zu induzieren (19).

Den Aufbau dieser RP beschreibt das **Tracer-Prinzip**, wonach RP aus einem Träger (Carrier), einem Linker, dem Radionuklid und falls notwendig einem Chelator bestehen (Abb. 1). Der Carrier bindet spezifisch an eine biologische Zielstruktur (z. B. das Membranprotein PSMA) oder nimmt an physiologischen Prozessen teil und bestimmt somit die Verteilung des Radiotracers im Körper (11). Bisher verwendete Carrier-Formen sind Antikörper, Peptide, Nukleinsäuren, kleine Moleküle oder Nanopartikel (19).

Das Radionuklid ermöglicht je nach Strahlungsart den Gewinn diagnostischer Informationen und/oder erzeugt einen biologischen Effekt. Der Linker stellt eine stabile Brücke zwischen Targetvektor und dem Radionuklid her (11).

Bei metallischen Radionukliden wie zum Beispiel Gallium-68, werden außerdem Komplexbildner (Chelatoren) wie z.B. DOTAGA als Teil des Moleküls benötigt, um eine stabile Bindung des Radionuklids an das RP zu erreichen. Wird anstelle eines primär diagnostischen Radionuklids ein therapeutisch wirksames Nuklid (z. B. Lutetium-177) eingesetzt, verwendet man das gleiche Prinzip, spricht dann eher von einem RP als von einem Tracer (19).

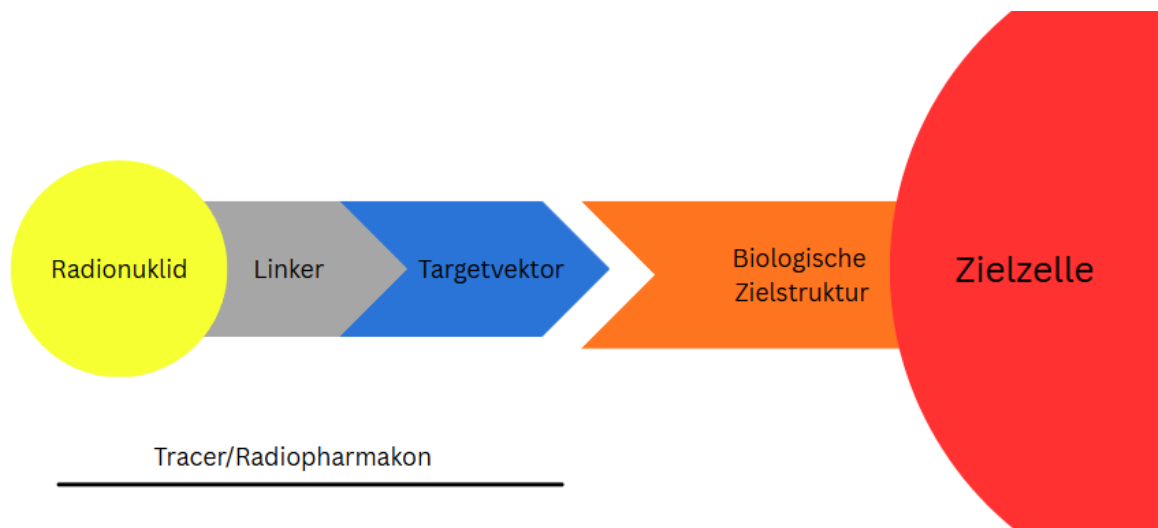


Abbildung 1: Aufbau Tracer nach Dietlein et al. (11)

## 1.6. Physiologische Grundlagen und Pathophysiologie des Prostatakarzinoms

Die primäre **Ursache für die Entstehung** eines PCa ist wie bei vielen Malignomen unbekannt (3). Faktoren mit einem deutlich erhöhten Risiko für das Auftreten von PCa sind fortgeschrittenes Alter, Ethnizität (vor allem afroamerikanische), genetische Faktoren und PCa in der nahen Familie. Eine schwächere Korrelation zeigt sich zu Faktoren wie Ernährung, Übergewicht, Bewegungsmangel, Entzündungszuständen, Hyperglykämie, geringer Anzahl an Ejakulationen pro Monat (weniger als 7), Infektionen und Exposition gegenüber ionisierender Strahlung oder kanzerogenen Chemikalien (2). Testosteron begünstigt das Tumorwachstum, Östrogen hingegen scheint karzinomprotektiv zu wirken (20).

Die **gesunde Prostata** ist eine etwa kastaniengroße Drüse unterhalb der Harnblase, wird von der Urethra durchzogen und kann als prallelastische Wölbung rektal getastet werden. Sie ist aus 30-50 verzweigten Einzeldrüsen aufgebaut, die mit 15-30 Ausführungsgängen in die Urethra münden. Um diese Drüsen herum befindet sich ein bindegewebiges Stroma mit vielen glatten Muskelzellen, die sich kontrahieren können, um das Prostatasekret in die Urethra abzugeben. Neben der exokrinen Sekretion kann die Prostata auch endokrin Serotonin sezernieren, wobei noch unklar ist, welche Bedeutung dies hat. Das Prostatasekret ist dünnflüssig, schwach sauer (pH 6,4) und bildet etwa 30% des Ejakulationsvolumens. Es enthält außerdem verschiedene Enzyme, die unter anderem wichtig für die Verflüssigung des Ejakulats und die Spermienmotilität sind (21).

Der Entstehung eines PCa geht als **Vorläuferläsion** häufig eine high-grade prostatiche intraepitheliale Neoplasie (HGPIN) voraus. Sie wird als echte Präkanzerose bezeichnet, das heißt, wenn eine vorliegende HGPIN unbehandelt bleibt, entwickelt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein PCa (20, 22). Histologisch kann die HGPIN durch Zellstruktur- und Zellarchitekturstörungen erkannt werden. Geringgradige Veränderungen können auch als low-grade prostatiche intraepitheliale Neoplasie bezeichnet werden. Allerdings wird aufgrund der geringen diagnostischen Reproduzierbarkeit und kaum vorhandenen klinischen Relevanz (also nicht nachweisbar erhöhtem Karzinomrisiko), mittlerweile von der Diagnose der low-grade prostatichen intraepithelialen Neoplasien abgesehen. Das alleinige

Vorliegen von HGPIN führt weder zu einem veränderten Tastbefund in der digital rektalen Untersuchung, noch bewirkt es einen Anstieg des Serum PSA-Spiegels, kann allerdings bei größerer Ausdehnung ähnlich wie ein PCa im Ultraschall als hypoechogenes Areal detektiert werden. Wird eine HGPIN in einer Biopsie gefunden ist die Wahrscheinlichkeit in einer Rebiopsie ein manifestes PCa zu finden stark erhöht und regelmäßige Kontrollbiopsien werden empfohlen (22).

Die mit Abstand häufigste Form des PCa ist das azinäre PCa. Azinäre PCa entstehen in 85% der Fälle in der peripheren, androgenabhängigen Zone der Prostata und zu etwa 15% weiter innen in der Transitionszone. Von dort aus breiten sich die Karzinome meist zunächst innerhalb der Kapsel aus, durchbrechen im Anschluss die Kapsel und infiltrieren das umliegende Bindegewebe, die anliegenden Samenblasen, die Harnblase und das Rektum. Eine Metastasierung erfolgt primär lymphatisch in die Beckenlymphknoten und hämatogen über den prävertebralen Venenplexus in Wirbelsäule, Femur und Beckenknochen. Es gibt weitere seltene Formen des PCa wie das duktales Karzinom und das Übergangszellkarzinom, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird. Histologisch werden PCa nach Gleason eingeteilt, wobei mit steigendem Score die Differenzierung abnimmt, was sehr wichtig für Prognose und Therapieplanung ist. Wie oben bereits erwähnt, wird das Tumorstadium von Testosteron begünstigt und die Anzahl der Testosteronrezeptoren ist in PCa deutlich höher als in normalem Prostatagewebe oder in gutartig hyperplastischem Prostatagewebe (20).

Entsprechend finden sich in den entarteten Tumorzellen gehäuft Mutationen am Androgen-Rezeptor-Pathway und an am Testosteronmetabolismus beteiligten Genen (23, 24).

Auch diese Veränderungen sind von großer Bedeutung für die Therapieplanung. Es werden je nach Vorhandensein bzw. Fehlen der Mutationen Androgen-sensitive (hormone sensitive PCa – HSPC) und Androgen-insensitive (castration resistant PCa – CRPC) PCa unterschieden (23).

## 1.7. Prostataspezifisches Membranantigen und seine Bedeutung als Target in der Nuklearmedizin

Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA) oder auch Glutamatcarboxypeptidase II ist ein Transmembranprotein, das in Geweben wie der Prostata, Niere, Speicheldrüsen, Dünndarm, ZNS und PNS vorkommt und je nach Gewebe verschieden benannt wird (25).

Auch die Funktion von PSMA ist abhängig von der Lokalisation in der es exprimiert wird. Im Gehirn ist PSMA an der Glutamatsynthese beteiligt und im Dünndarm unterstützt es die Folsäureabsorption indem es mehrfach-glutamierte Folsäure in besser absorbierbare einfach-glutamierte Folsäure spaltet (26). Die genaue Rolle des PSMA in der gesunden Prostata ist noch nicht abschließend geklärt. PSMA kann Liganden am extrazellulären Kompartiment in Endosomen internalisieren und könnte dementsprechend auch direkt an der Folsäureaufnahme in die Zelle beteiligt sein. In in-vitro Studien konnte gezeigt werden, dass das von polyglutamierten Folsäuremolekülen abgespaltene Glutamat an den metabotropen Glutamatrezeptor 1 signalisiert, somit den Phospholipase C Pathway aktiviert und unter anderem die Zellteilung stimuliert (27).

Die vermehrte Expression in PCa's bewirkt eine gesteigerte Folsäureaufnahme und ermöglicht damit ein vermehrtes Wachstum der Karzinomzellen (28). Sie korreliert mit einer Verkürzung der Zeit im G2/M Stadium des Zellzyklus und damit einem erhöhten Potential für Aneuploidie und Karzinogenese (27).

PSMA findet sich auch in anderen malignen Tumorentitäten wie Brust-, Nieren- und Lungenkarzinom und wird bei diesen vor allem in den neugebildeten Gefäßen exprimiert. Das ist interessant, weil sich im Gegensatz dazu in normalen Gefäßstrukturen keine PSMA-Expression zeigt (29).

PSMA eignet sich besonders gut als Target für diagnostische und therapeutische Arzneimittel, weil ein Großteil des Proteins extrazellulär liegt und somit eine gute Angriffsfläche bietet. Außerdem ist die Expressionsrate in der Prostata deutlich höher als in anderen Geweben und in PCa und deren Metastasen noch einmal etwa tausendfach höher als in gesundem Prostatagewebe. Die Überexpression korreliert außerdem mit Grad der Entartung, Metastasierung und einer schlechteren Prognose von PCa (27, 28).

Eine PSMA-gezielte Prostatakarzinomtherapie kann und wird aktuell bei weit fortgeschrittener, metastasierter Erkrankung eingesetzt werden und schädigt deutlich stärker das entartete Gewebe als andere Zelltypen, sodass eine gute Wirkung bei verhältnismäßig geringem Nebenwirkungsprofil erreichbar ist (28).

### 1.8. Ausgewählte theranostisch relevante PSMA-Liganden

Die Liganden PSMA-11, PSMA I&T, PSMA-617 sind Substanzen, die als Träger von verschiedenen Radiometallen theranostisch eingesetzt werden können. Sie alle besitzen das gleiche Bindungsmotiv (Vektor) Glu-Urea-Lys, welches mit hoher Affinität an PSMA bindet, unterscheiden sich jedoch anhand ihrer Linker und Chelatoren (Abb. 2) (30). Untersuchungen im Rahmen der Entwicklung dieser Tracer haben gezeigt, dass Pharmakodynamik, -kinetik und Biodistribution wesentlich durch die Modifikation der Linker in der direkten Umgebung des PSMA-Bindemotivs bestimmt werden (31).

**PSMA-11** (Gozetotid oder PSMA-HBED-CC) nutzt den Chelator HBED-CC, der mit einer hohen Affinität Gallium-68 binden kann, jedoch keine Affinität zu therapeutischen Radionukliden wie Lutetium-177 oder Actinium-225 besitzt (32). PSMA-11 kann an nuklearmedizinischen Institutionen GMP-konform unter der Verwendung eines automatischen Synthesemoduls mit Gallium-68 markiert werden. Das Radionuklid für die Markierung wird aus  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren gewonnen (33). Seit Dezember 2022 ist unter dem Handelsnamen Locametz ein von der EMA zugelassenes Kit zur Präparation erhältlich (34).

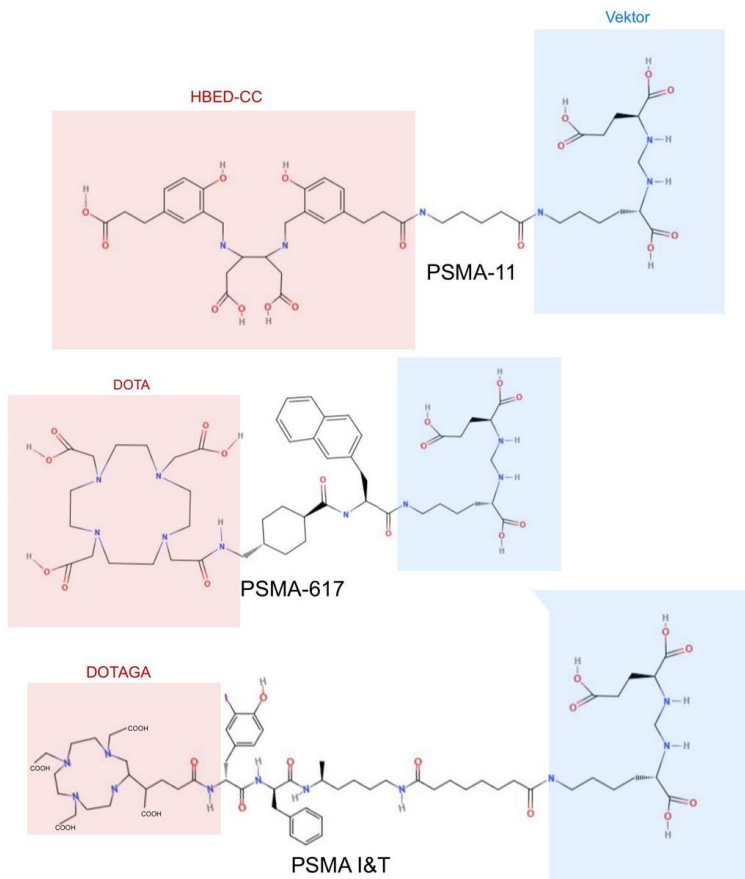


Abbildung 2: Aufbau der PSMA-Liganden - eigene Graphik nach Wester & Schottelius (30)

**PSMA-617** wurde durch Ersatz der HBED-CC Gruppe durch DOTA und Modifikation des Linkers aus PSMA-11 entwickelt. Es verfügt über gute pharmakokinetische Eigenschaften, eine hohe Bindungsaffinität und Internalisierung. Die lange Retentionszeit in den Tumorzellen ermöglicht in der PET/CT ein gutes Signal-to-Noise Ratio (Tumor-zu-Hintergrund) und eignet sich für eine theranostische Anwendung (32). Seit Dezember 2022 ist mit Pluvicto ( $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  oder  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-Vipivotid-Tetraxetan}$ ) ein Präparat für die Therapie des PSMA-positiven metastasierten PCa in der EU zugelassen (35).

**PSMA I&T** ist ein weiterer theranostischer PSMA-Ligand. Der Vektor ist hierbei der gleiche wie bei den beiden anderen Substanzen, es wurde allerdings durch Veränderungen am Linker und die Verwendung des Chelators DOTAGA die Interaktion mit der PSMA-Bindungsstasche im Vergleich zu PSMA-617 (mit dem Chelator DOTA) und anderen Substanzen mit DOTAGA verbessert (32). Hieraus ergibt sich eine erhöhte Affinität zum PSMA und *in vitro* eine zweifach erhöhte spezifische Internalisierung (36), die den erhöhten initialen Tumortakeup von

[<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T *in vivo* bedingen könnte (37). Es gibt kein zugelassenes Präparat mit dem Wirkstoff [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T. Allerdings kann und darf dieses RP in radiopharmazeutischen Laboren an nuklearmedizinischen Abteilungen unter Berücksichtigung der Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs in kleinem Maßstab zur unmittelbaren Anwendung am Patienten hergestellt werden (38).

Im Vergleich unterscheidet sich die Verteilung dieser drei Tracer, sprich der mit Gallium-68 markierten Vorläufersubstanzen, kaum und sie sind bei schlechter Verfügbarkeit gut austauschbar. Es können aber immer wieder signifikante (wenn auch kleine) Unterschiede in der Biodistribution gezeigt werden, die je nach Verdachtsdiagnose zu Vorteilen der einzelnen Substanzen führen (39). Die höchste Konzentration außerhalb von Prostatazellen findet sich in Nieren und Harnblase sowie Speichel- und Tränendrüsen (40).

PSMA-11 findet sich nach Verabreichung in deutlich höherer Menge als die anderen Substanzen in Leber, Darm, Speichel- und Tränendrüsen. Dafür allerdings in geringerer Menge in Blut und Knochen. Bei Verdacht auf Knochenmetastasen oder Metastasen im Bereich der großen Gefäße, ist es also theoretisch besser geeignet als die anderen Substanzen, da in diesen Regionen das Signal-to-Noise Ratio besonders gut ist. Ungeeigneter wäre es zur Detektion von z.B. Lebermetastasen, die bei PCa allerdings ohnehin selten sind (37, 40).

McCarthy et al. fanden in einer Studie mit 19 Proband\*Innen bei [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11 eine höhere diagnostische Genauigkeit im Vergleich mit [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T. Bei Patient\*Innen mit wenig fortgeschrittener Erkrankung könnte dieser Unterschied die Therapiewahl beeinflussen. Dementsprechend sollte PSMA I&T eher bei Patient\*Innen mit fortgeschrittener Erkrankung verwendet werden, wo es auch in seiner vollen theranostischen Kapazität eingesetzt werden kann (40). Aufgrund der geringen Zahl an Teilnehmenden in dieser Studie, braucht es allerdings weitere Evidenz, um eine klare Empfehlung zu ermöglichen.

Im Falle des **therapeutischen Ansatzes** finden sich auch wieder kleine, aber signifikante Unterschiede zwischen den therapeutisch relevanten Substanzen [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T und [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617.

Die effektive HWZ von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T (35h) ist kürzer als die von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 (42h) und auch die durchschnittliche Ganzkörperdosis ist geringer. Es

lässt sich bei [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T in allen Geweben eine schnellere Aufnahme aber auch eine schnellere Eliminierung beobachten. Daraus ergibt sich eine etwas höhere absorbierte Strahlendosis in der Niere, in den anderen Geweben aber eine vergleichbare (Parotiden, PCa) oder geringere (Tränendrüsen) absorbierte Strahlendosis als bei [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 (37).

Beide RP sind mit ähnlichem Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil verwendbar, wobei ein genauer Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Studienlage erschwert bleibt (31).

## 1.9. Molekulare Bildgebung mittels PSMA PET/CT und SPECT

Die **Positronen-Emissions-Tomographie** (PET) ist eine funktionelle Untersuchungsmethode der Nuklearmedizin, die ermöglicht die Verteilung eines radioaktiven Tracers oder RP im Körper als statisches oder dynamisches 3D-Bild darzustellen. Mit Hilfe von **PET/CT**-Geräten kann parallel zur PET eine **Computer-Tomographie** (CT) durchgeführt und mit der PET virtuell überlagert werden. Dadurch kann u.a. die Tracerverteilung anatomisch besser zugeordnet werden (11) und auf den anatomischen Daten kann eine Schwächungskorrektur erfolgen. Die PET kann auch mit einer MRT kombiniert werden (5).

Für die Untersuchung wird den Patient\*Innen eine kleine Menge eines Tracers mit einem  $\beta^+$ -strahlenden Radionuklid (z.B. [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T) injiziert. Durch den Zusammenstoß des emittierten Positrons mit einem Elektron werden als Vernichtungsstrahlung zwei Photonen im 180°-Winkel zueinander emittiert (41). Diese Photonen treffen auf die Szintillationskristalle der PET-Kamera die die Strahlung absorbieren und dann als Lichtsignal (also Photon sichtbaren Lichts) wieder abgeben. Die Lichtsignale werden mithilfe von Photomultipliern verstärkt und in einen elektronischen Impuls umgewandelt, der als Signal ausgelesen wird (11). Nachdem immer zwei Photonen ausgesendet werden, werden zwei gegenüberliegende Kristalle fast gleichzeitig (innerhalb von 5-12 ns) stimuliert und es kann somit die Linie bestimmt werden, auf der die Annihilation stattgefunden hat. Somit kann ohne Kollimator die Flugrichtung ermittelt werden und man spricht von elektrischer Kollimation. Die verschiedenen Geraden können überlagert werden und es kann dargestellt werden, wie der Tracer im Körper verteilt ist (42).

Der Tracer [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T markiert spezifisch Zellen, die PSMA an ihrer Oberfläche tragen. Somit kann nach [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T Gabe mit einer PET/CT die Verteilung dieser PSMA-positiven Zellen beurteilt werden. Wenn neben Geweben, die physiologisch PSMA exprimieren (Prostata, Niere, Speicheldrüsen, etc.) oder an der Ausscheidung des RP beteiligt sind (bei PSMA I&T v.a. Niere, ableitende Harnwege und Blase) auch andere Gewebe markiert werden, spricht das für eine Entartung im betroffenen Gewebe. In der Regel entspricht so eine Markierung einer PCa-Metastase oder der Neovaskularisation einer anderen Tumorentität (29).

Zur PET/CT Diagnostik des PCa werden Gallium-68 und Fluor-18 markierte Tracer eingesetzt. Am weitesten verbreitet und am besten erforscht sind [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11, [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T, [<sup>18</sup>F]F-DCFPyL, [<sup>18</sup>F]F-PSMA-1007 und [<sup>18</sup>F]F-rhPSMA-7.3..

Die Indikationen für eine PSMA-Liganden PET/CT sind:

- Initiales Staging bei ungünstigem intermediate- bis high-risk PCa (aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung)
- Tumorlokalisation bei biochemischer Rekurrenz oder PSA-Persistenz nach Therapie
- Tumorlokalisation und Metastasensuche bei CRPC ohne Metastasen in der konventionellen Bildgebung
- Staging bei mPCa
- Staging vor einer PSMA-gezielten RLT
- Orientierungshilfe zur Biopsie bei negativen Vorbiopsien und hohem klinischen Verdacht auf PCa
- Verlaufskontrolle während der <sup>177</sup>Lu-PSMA RLT

Bei diesen Indikationen konnte wiederholt eine Überlegenheit gegenüber Verfahren der konventionellen Bildgebung gezeigt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass bei mPCa eine nuklearmedizinische Therapie mit z.B. [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T nur dann in Betracht kommt, wenn mittels PSMA-Liganden PET/CT die PSMA-Expression der Metastasen bewiesen werden kann (6).

Die **Single Photon Emission Computed Tomography** (SPECT) ist eine Untersuchung, bei der die Verteilung von  $\gamma$ -strahlenden RP dargestellt werden kann.

Auch hierbei wandeln Szintillationskristalle die Strahlung aus dem RP in ein Lichtsignal um, das vom Photomultiplier (PM) verstärkt und in einen elektrischen Impuls umgewandelt wird. Nachdem bei der  $\gamma$ -Strahlung nur ein Photon abgegeben wird, muss ein Kollimator eingesetzt werden, damit die Richtung bekannt wird, aus der auf den Detektor treffende  $\gamma$ -Quanten kommen. Ein Kollimator ist eine Platte mit Bohrungen, deren Wand ausreichend dick ist, um die Gamma-Kamera vor nicht gerade auftretenden  $\gamma$ -Quanten abzuschirmen. Somit ist die Gerade auf der die Strahlenquelle liegt bekannt und durch die Überlagerung von Aufnahmen aus mehreren Richtungen und der Überlagerung mit einer CT kann ein 3D-Bild der RP-Verteilung erstellt und anatomisch zugeordnet werden (11).

Wird eine Therapie mit [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T durchgeführt, kann man sich die Eigenschaft von Lutetium-177 zunutze machen, dass es in etwa 20% der Fälle ein Elektron mit submaximaler Energie aussendet und in einen metastabilen Zustand übergeht, dessen Energie als  $\gamma$ -Quant abgegeben wird (15). Diese  $\gamma$ -Quanten können durch das SPECT/CT quantitative Auskunft über die Verteilung des RP geben, sodass die Strahlendosis am Zielgewebe ermittelt werden kann (11, 43).

Eine weitere SPECT-Anwendung für die PCa-Diagnostik ist die Knochenszintigraphie mit Technetium-99m markierten Tracern. Die PSMA-Liganden PET/CT ist zur Darstellung von Knochenmetastasen allerdings überlegen (6).

## 1.10. Radioliganden- Therapie des Prostatakarzinoms

Nuklearmedizinische Therapieverfahren zur Behandlung des PCa sollen bei Patient\*Innen mit fortgeschrittener Erkrankung in gutem Allgemeinzustand nach ausschöpfen der anderen Therapieoptionen angeboten werden (6).

Die bedeutendste nuklearmedizinische Behandlung des PCa ist die **PSMA-Radioligandentherapie (PSMA-RLT)**. Die wichtigsten RP, die hierfür zum Einsatz kommen sind [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 sowie neuerdings auch [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PSMA-617 und [ $^{225}\text{Ac}$ ]Ac-PSMA I&T (44). Die PSMA-RLT ist bei Patient\*Innen mit mCRPC (metastatic castration resistant prostate cancer) indiziert, die zuvor bereits mit Androgenrezeptorantagonisten und taxanbasierter Chemotherapie behandelt wurden. Bereits in ersten Therapieversuchen mit [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 konnte eine ausgezeichnete

Selektivität und Therapiewirkung gezeigt werden. Bei dem bislang am umfassendsten untersuchten [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 zeigte sich bei etwa 75 % der Behandelten eine Reduktion des PSA-Wertes und bei etwa 55 % der Behandelten sogar eine Reduktion um mehr als 50 %. Es gibt aktuell noch keine zugelassenen Medikamente zur PSMA-RLT mit Actinium-225. Die Verfügbarkeit des Nuklids ist zurzeit noch schlecht und die Studienlage zu Lutetium-177 markierten PSMA-Liganden ist wesentlich besser (31, 45). Bei Nichtansprechen der PSMA-RLT mit Lutetium-177, kann - je nach Verfügbarkeit - eine Therapie mit Actinium-225 markierten PSMA-Liganden erwogen werden. Aufgrund des höheren LET können  $\alpha$ -Strahler zu DNA-Doppelstrangbrüchen, damit zu irreperablen DNA-Schäden und somit zur Tumoreradikation führen. Bei der RLT mit  $\beta$ -Strahlern kommt es meist nur zu Einzelstrangbrüchen (31).

In einer Studie von Zhang et al. (2019) wurde auch eine Kombinationstherapie mit beiden Strahlenarten – eine „tandem-Therapie“ mit initial vielversprechenden Erfolgen durchgeführt. Es werden dabei synergistische Effekte durch die Kombination beider Strahlenarten bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen als unter einer reinen  $\alpha$ -RLT erhofft (46). Für diese Therapieform gibt es allerdings bislang wenig Evidenz (47).

Die PSMA-RLT wird von den Patient\*Innen meist gut toleriert. Relevante Nebenwirkungen sind vor allem die Myelosuppression, Nephrotoxizität, Fatigue, Xerostomie und Übelkeit. Die Myelosuppression ist häufig und kann alle Zellreihen betreffen, hat aber meist kein klinisches Korrelat (37, 48). In der Zulassungsstudie von Pluvicto kam es allerdings bei 0,96 % der Patient\*innen zum Tod aufgrund einer hämatologischen Nebenwirkung. Renale Nebenwirkungen sind deutlich seltener und in nur 0,2 % der Fälle so ausgeprägt, dass Dosisanpassungen oder ein Therapieabbruch erforderlich werden (35). Die am häufigsten dosislimitierende Nebenwirkung ist die Mundtrockenheit aufgrund der spezifischen und unspezifischen Aufnahme des RP in die Speicheldrüsen (31, 35). Fatigue, Xerostomie und Übelkeit sind deutlich häufiger als bei der nicht-RLT, treten allerdings meist nur vorübergehend auf (37, 48). Bei der RLT mit Actinium-225 werden ähnliche Nebenwirkungen beobachtet, aufgrund des höheren LET sind allerdings die Nebenwirkungen häufig ausgeprägter und dadurch therapielimitierend (31). Aufgrund der ionisierenden Strahlung kann es außerdem

zu sekundären primären Neoplasien kommen, die allerdings auch bei der konventionellen Therapie auftreten und bislang kaum gehäuft beobachtet werden konnten (48).

### 1.11. In-house Markierung und Qualitätskontrolle theranostisch relevanter PSMA-Liganden

Auf der klinischen Abteilung für Nuklearmedizin werden für die Synthese von RP in kleinem Maßstab kassettenbasierte automatische Synthesemodule verwendet. Die Kassetten, Reagenzien, Precursor, Radionuklidgeneratoren beziehungsweise Radionuklide zur Markierungszwecken werden von qualifizierten Herstellern zugekauft. Um die Sicherheit und Wirksamkeit des Radiopharmakons zu gewährleisten ist die Qualitätssicherung in der Radiopharmazie von großer Bedeutung (38).

In Österreich stellt das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) das wichtigste Regelwerk zur Qualitätssicherung radiopharmazeutischer Zubereitungen dar. Die Einhaltung der Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs ist durch das Arzneibuchgesetz gesetzlich vorgeschrieben (49).

Im Europäischen Arzneibuch sind allgemeine Monographien und Einzelmonographien zu finden, die Anforderungen an Spezifikation, Prüfung und Freigabe radiopharmazeutischer Zubereitungen festlegen. Für die Herstellung und Qualitätskontrolle von Radiopharmaka sind insbesondere die allgemeinen Monographien „Radiopharmaceutical Preparations“ (Monographie 0125) und „Extemporaneous Preparation of Radiopharmaceuticals“ (Monographie 5.19.) von Relevanz. Letzteres liefert die Grundlagen zur Präparation von Radiopharmaka im kleinen Maßstab zur unmittelbaren Anwendung an Patient\*innen (50).

Weiters verweist das Europäische Arzneibuch in der Monographie 5.19 noch auf andere Richtlinien, die für die Herstellung von Radiopharmaka im klinischen Setting anwendbar sind. Erwähnenswert sind hier besonders die Leitlinie der EANM über „Current Good Radiopharmacy Practice“, die „EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use“ und die ICH Guidelines des „International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use“.

Die Qualitätskontrolle spielt eine entscheidende Rolle in der Eigenherstellung von Radiopharmaka in nuklearmedizinischen Abteilungen und wird unmittelbar nach der Herstellung durchgeführt. Dazu gehört laut Arzneibuchmonographie 0125 die Prüfung des pH-Werts, der partikulären Kontaminationen, der Radionuklidreinheit, der radiochemischen Reinheit und der chemischen Reinheit. Auch die Sterilität und Pyrogenfreiheit ist bei Radiopharmaka zu überprüfen, kann aber aufgrund der kurzen Halbwertszeit erst nach der Anwendung an Patient\*innen erfolgen (50).

Chromatographische Methoden wie die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) gehören zu den wichtigsten Techniken, um die chemische und radiochemische Reinheit eines Radiopharmakons nachzuweisen (12).

### 1.12. Radio-HPLC und chromatographisches Trennprinzip

Die Radio-Hochleistungsflüssigchromatographie (radio-high-performance liquid chromatography, Radio-HPLC) ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem kleine Mengen sehr ähnlicher Moleküle in einer Probe aufgrund von charakteristischen Laufzeiten im Analysensystem aufgetrennt, unterschieden und quantifiziert werden können (51-53).

Das chromatographische Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung der Komponenten einer Probe zwischen zwei Phasen: der stationären Phase, die aus einem unlöslichen Material besteht, das in eine Säule gepackt ist und der mobilen Phase, einem flüssigen Lösungsmittelgemisch, das kontinuierlich durch die Säule fließt (51). In der Radiopharmazie ist die HPLC ein wichtiges Werkzeug zur Bestimmung der chemischen und radiochemischen Reinheit von Radiopharmaka (12).

Die HPLC besteht aus folgenden Bestandteilen:

- Einer Pumpe, zur kontinuierlichen Förderung des Lösungsmittels
- Einem Injektor, mit dem die Probe in den Lösungsmittelfluss eingebracht wird
- Einer HPLC- Säule, die mit der stationären Phase gefüllt ist und in der die Trennung der Probenbestandteile erfolgt
- Ein oder mehreren Detektoren, mit dem die Probenkomponenten erfasst werden (z.B. UV-VIS, Massenspektrometer, Radiodetektoren u.v.m.)
- Einem System zur Datenerfassung und Auswertung (51, 52)

Die Wahl der stationären und der mobilen Phase, sowie der Detektionsmethode hängt von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der jeweiligen Analyten ab. Über Elutionsprogramme lässt sich einstellen, ob die Zusammensetzung des Lösungsmittels über die Zeit des Analysenlaufs konstant bleibt (isokratische Elution) oder sich verändert (Gradientenelution) (51).

In dieser Diplomarbeit wird für die Analytik von PSMA I&T das Prinzip der Umkehrphasenchromatographie (Reversed-phase HPLC) angewendet. Bei dieser Art der Chromatographie wird als die stationäre Phase eine Säule verwendet, die mit feinen Partikeln gefüllt ist die aus Kieselsäure bestehen. Die Oberfläche der Kieselsäurepartikel wurde mit Kohlenstoffketten aus 18 Kohlenstoffatomen (C-18) modifiziert. Dadurch ist die stationäre Phase unpolar (hydrophob) (52).

Als mobile Phase wird ein polares Lösungsmittelgemisch bestehend aus Acetonitril (ACN) und Wasser verwendet (52). Ein kleiner Anteil an Trifluoressigsäure (TFA) sorgt durch den sauren pH-Wert für eine einheitliche Protonierung der Carboxylgruppen der Analyten und der Silanolgruppen in der stationären Phase, sodass die Trennung hauptsächlich über die Affinität zu den C-18 Ketten erfolgt. Ionische Wechselwirkungen werden so weitgehend reduziert und eine höhere Peakschärfe wird erreicht (12, 54).

Durch Verwendung einer der wässrigen (polaren) Lösung, kann nach Lipophilie getrennt werden – stark lipophile Stoffe haften stark an der stationären Phase, können nur schwer bzw. zeitverzögert herausgelöst (eluiert) werden. Stark hydrophile Stoffe werden währenddessen schnell eluiert und verlassen schnell die Säule, da sie nicht oder nur kaum mit der stationären Phase wechselwirken. Wenn durch Erhöhung des ACN-Anteils während der Gradientenelution die Lipophilie der mobilen Phase während des Analysenlaufs verändert wird, kann die Trennung beschleunigt werden und es können auch lipophile Moleküle von der Säule gelöst werden (52).

Nach der Auftrennung in der Säule erreichen die Probenkomponenten zu unterschiedlichen Zeiten die Detektoren und die Verweilzeit in der Säule (Retentionszeit) kann bestimmt werden (52). Wird der Messwert der Detektoren gegen die Zeit in ein Koordinatensystem eingetragen, erhält man ein Chromatogramm. Hier werden die Einzelkomponenten als Peaks angezeigt, über

deren Höhe und Breite die Peakfläche bestimmt werden kann. Diese kann für die Quantifizierung der Einzelkomponenten in einer Probe herangezogen werden (53).

## 2. Problemstellung

### 2.1. Ausgangssituation

Auf der Klinischen Abteilung für Nuklearmedizin sollen zukünftig sowohl [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T als auch [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T im Radiopharmazielabor für die klinische Anwendung hergestellt werden. Eine geeignete Methode für die Qualitätskontrolle dieser Radiopharmaka ist dafür essenziell. Um die Durchführung der Qualitätskontrollen im Radiopharmazielabor zu vereinfachen, wird eine Qualitätskontrollmethode angestrebt, die für die Bestimmung der Identität, radiochemischen und chemischen Reinheit von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T und [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T geeignet ist. Idealerweise ist mit dieser Methode auch eine Unterscheidung der mit unterschiedlichen Radiometallen markierten Radiopharmaka möglich.

Es gibt für die Qualitätskontrolle von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T bereits eine Ph.Eur. Einzelmonographie die nach ABG auch in Österreich gültig ist. In dieser Monographie ist eine HPLC-Methode beschrieben mit der Identität, radiochemische und chemische Reinheit von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T bestimmt werden können (55). Allerdings zeigte diese Methode zur Bestimmung und Unterscheidung der 3 Analyten [ $^{\text{nat}}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T, [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T und PSMA I&T eine unzureichende Performance (s. Abb. 3).

In Abb. 3 ist ein Analysenlauf des SST-Standards dargestellt, bestehend aus [ $^{\text{nat}}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T, PSMA I&T und [ $^{\text{nat}}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T (jeweils 5  $\mu\text{g/ml}$ ), durchgeführt gemäß der im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Methode, mit einer reduzierten Flussrate von 0,42 ml/min anstelle von 1 ml/min. Durch eine vorangegangene Injektion der Einzelsubstanzen kann eine eindeutige Identifikation und Zuordnung der detektierten Peaks erfolgen.

Dabei fallen zwei Beobachtungen besonders auf: Erstens erscheint das für die Quantifizierung relevante PSMA I&T nicht als einzelner Peak, sondern in Form von vier separaten Peaks. Diese sind zum Teil vor und zum Teil nach den Peaks der

PSMA I&T-Metallkomplexe zu finden. Im Gegensatz dazu zeigt das in der Knowledge Database der Monographie 3170 des Europäischen Arzneibuchs veröffentlichte Chromatogramm für Lu-PSMA I&T und PSMA I&T jeweils nur einen einzelnen, scharfen Peak. Die in Abb. 3 ersichtliche längere Retentionszeit der Substanzen, verglichen mit dem Chromatogramm der Knowledge Database, lässt sich durch die im vorliegenden Analysenlauf verwendete reduzierte Flussrate (s.o.) erklären.

Zweitens weist das in Abb. 3 gezeigte Chromatogramm zwischen ca. 15 und 20 Minuten eine deutlich gestörte Basislinie auf. Dies verhindert die eindeutige Identifikation und Quantifizierung potenzieller unspezifischer Verunreinigungen, die in diesem Zeitraum von der Säule eluieren. Ein direkter Vergleich mit dem Chromatogramm der Knowledge Database des Europäischen Arzneibuchs ist nicht möglich, da dort die Methode bei Minute 14 stoppt. Kurz vor diesem Stopp ist allerdings ebenfalls ein Anstieg der Basislinie erkennbar.

Die unzureichende Performance der Methode des Europäischen Arzneibuchs ist somit durch die eingeschränkte Quantifizierbarkeit sowohl von PSMA I&T, als auch von unspezifischen chemischen Verunreinigungen begründet.

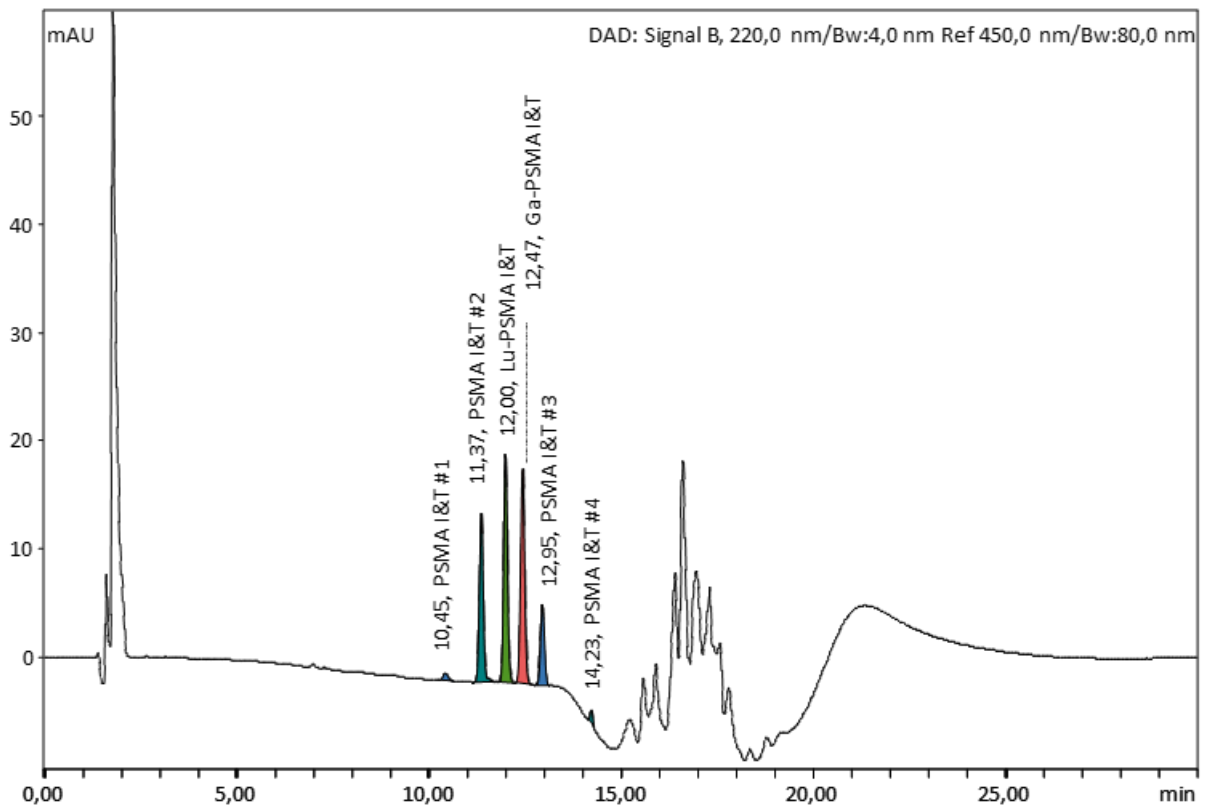


Abbildung 3: Arzneibuch-HPLC-Methode für  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA I\&T}$ , Messung 250630.002

Als mobile Phasen werden in der Monographie 3170 Natriumdihydrogenphosphat-Pufferlösung und Acetonitril (ACN) verwendet. Die Verwendung einer Pufferlösung in der HPLC-Analytik erfordert längere Spülzeiten der HPLC. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass das Natriumdihydrogenphosphat bei ungeeigneter Mischung der mobilen Phasen im System ausfallen und schlimmstenfalls die Säule verstopfen könnte. Praktikabler ist ein Lösungsmittelgradient aus Wasser und Acetonitril mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA). Da diese Lösungsmittelzusammensetzung bereits routinemäßig für Gallium-68 markierte Radiopharmaka, wie  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$  oder  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NOC}$  angewendet wird, macht das die Umstellung des HPLC-Systems weniger zeitaufwendig und die Analysenzeiten lassen sich besser planen. Daher wäre es zielführend, wenn die Qualitätskontrolle auch mit einer validierten Methode ohne Natriumdihydrogenphosphat-Pufferlösung, und stattdessen mit ACN (+0,1% TFA) und Wasser (+0,1% TFA) gelingt.

## 2.2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist, eine geeignete Radio-HPLC-Methode zur Qualitätskontrolle des theranostischen Paares [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T/[<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T zu entwickeln. Die neue Methode soll eine zuverlässige Trennung der verschiedenen PSMA I&T-Komplexe voneinander, sowie von der unkomplexierten Vorläufersubstanz erlauben. Die Verwendung von Wasser mit 0,1 % TFA anstatt einer Natriumphosphatpufferlösung soll einen einfachen und zeiteffizienten routinemäßigen Einsatz ermöglichen.

Die Verwendung von zur vorhandenen Einzelmonographie abweichenden Methoden ist nur erlaubt, wenn die zu verwendende Methode nachweislich zumindest gleich gut (oder besser) für den Verwendungszweck geeignet ist (38). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Validierung der neu entwickelten Analysenmethode, gemäß international gültigen Regelwerken.

Die relevanten Validierungsparameter und gewählten Akzeptanzkriterien sind in Kapitel 4 beschrieben.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Verwendete Materialien für die Radio-HPLC

Die Methodenentwicklung und Validierung wird mit einem Agilent 1260 series Radio HPLC-System mit Autosampler, Gradientenpumpe und DAD UV-Detektor (Sr. Nr.: DEAA304500, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und einem GABI Star gamma-Durchflussmonitor (Sr. Nr. 1014, Raytest, Straubenhardt, Deutschland) durchgeführt. Zur Trennung wird die HPLC-Säule ACE 3 C18 (150 x 3 mm, Katalognummer: ACE-111-1503, Avantor®, ACE®, VWR International Ltd, Theale, Reading) bei Raumtemperatur verwendet. Die Probe wird per Autoinjektor mit einem Probevolumen von 20 µl aus den Rotilabo® Gewindefläschchen ND10, 1,5 ml mit den dazugehörigen Schraubkappen mit Bohrung, PP, ND10 (beide Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in das HPLC-System injiziert. Als mobile Phasen werden (A) Wasser (HPLC-grade, Produktnummer: 270733, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und (B) Acetonitril (LiChrosolv® Reag. Ph Eur Acetonitril (gradient grade for liquid chromatography), Produktnummer: 100030,

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet, die jeweils mit 0,1 % Trifluoressigsäure (Uvasol® Trifluoroacetic acid for spectroscopy, Trifluoressigsäure (TFA), Produktnummer: 108262, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt sind.

Die Gradientenelution der validierten Methode startet mit einer Lösungsmittelkonzentration von 80 % (A) und 20 % (B) und wird nach dem Schema (siehe Tabelle 1) schrittweise verändert, bis eine Lösungsmittelkonzentration von 20 % (A) und 80 % (B) erreicht wird. Anschließend werden die Ausgangskonzentrationen wieder hergestellt. Die Flussrate der mobilen Phasen beträgt 0,42 ml/min und die Laufzeit der Methode beträgt 36 Minuten. Die von der Säule eluierten Analyten werden mittels UV-Detektor (eingestellte Wellenlänge 220 nm) und Radioaktivitätsdetektor erfasst.

<b>Zeit [min]</b>	<b>Mobile Phase A [%]</b>	<b>Mobile Phase B [%]</b>
<b>0 bis 2</b>	80	20
<b>2 → 14</b>	80 → 70	20 → 30
<b>14 → 18</b>	70 → 20	30 → 80
<b>18 bis 20</b>	20	80
<b>20 → 23</b>	20 → 80	80 → 20
<b>23 bis 36</b>	80	20

*Tabelle 1: Zusammensetzung der mobilen Phasen während der Messung*

### 3.2. Referenzsubstanzen und Chemikalien

**Alle Referenzlösungen** werden mit den Pipetten Eppendorf Reference, 100-1 000 µl und Eppendorf Reference, 10-100 µl (beide Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Dafür werden die jeweils dazugehörigen Pipettenspitzen epT.I.P.S.® Standard 50-1 000 µl (Produktnummer: 0030000.919) und epT.I.P.S.® Standard 2-200 µl (Produktnummer: 0030000.870) (beide Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) eingesetzt. Alle Standards werden nach der Herstellung und zwischen den Analysen bei -10 °C bis -18 °C tiefgekühlt gelagert.

Zur Herstellung der **Stammlösungen** wird zunächst die Matrix für Kalibrier- und SST-Standards hergestellt. Hierfür wird 24 ml Mobile Phase A (0,1% TFA in Wasser) zu 6 ml Mobiler Phase B (0,1% TFA in ACN) gegeben und mit dem Vortexer vermischt.

Für die Stammlösung von PSMA I&T werden anschließend 2000 µg PSMA I&T Acetat (PSMA I&T acetate, precursor for radiometal-labelled PSMA I&T, ABX

advanced biochemical compounds, Biomedizinische Forschungsreagenzien GmbH, Produktnummer: 99382, Radeberg, Deutschland) in 961,5 µl Matrix für Kalibrier- und SST-Standards gelöst ( $c(\text{PSMA I\&T}) = 2000 \mu\text{g/ml}$ ). Wichtig ist hierbei zu beachten, dass der relevante Analyt nicht PSMA I&T Acetat, sondern PSMA I&T ist.

Die anderen Stammlösungen [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T (reference standard for [ $^{68}\text{Ga}$ ]-PSMA I&T, Produktnummer: 99385, ABX, Radeberg, Deutschland) und [ $^{nat}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T (reference standard for [ $^{177}\text{Lu}$ ]-PSMA I&T, Produktnummer: 99384, ABX, Radeberg, Deutschland) werden jeweils durch Lösen von 1 000 µg [ $^{nat}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T, und analog dazu [ $^{nat}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T, in 1 ml Matrix für Kalibrier- und SST-Standards ( $c = 1\,000 \mu\text{g/ml}$ ) hergestellt. Für die weitere Herstellung wird eine 50 µg/ml Zwischenverdünnung von PSMA I&T benötigt. Dafür werden 75 µl der PSMA I&T Stammlösung ( $c = 2000 \mu\text{g/ml}$ ) mit 2 925 µl Matrix für Kalibrier- und SST-Standards verdünnt und am Vortexer vermischt.

Die **Kalibrierstandards** werden aus der 50 µg/ml PSMA I&T Zwischenverdünnung hergestellt. Die Zwischenverdünnung wird im Vortexer vermischt. Anschließend werden mit Pipetten Aliquote entnommen, mit Matrix für Kalibrier- und SST-Standards verdünnt und wieder im Vortexer gemischt. Alle Kalibrierstandards haben ein Volumen von 1 000 µl. Es werden Kalibrierstandards mit den Konzentrationen 0,0 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10,0 µg/ml, 12,5 µg/ml, 15 µg/ml, 17,5 µg/ml, 20,0 µg/ml und 40,0 µg/ml wie in Tabelle 2 ersichtlich hergestellt.

Standard Nr.	Konzentration PSMA I&T [µg/ml]	Menge PSMA I&T Zwischenverdünnung mit 50 µg/ml [µl]	Menge Matrix für Kalibrierstandards [µl]
1	0	0	1000
2	1	20	980
3	2,5	50	950
4	5	100	900
5	7,5	150	850
6	10	200	800
7	12,5	250	750
8	15	300	700
9	17,5	350	650
10	20	400	600
11	40	800	200

Tabelle 2: Herstellung der Kalibrierstandards

Als SST-Standard wird eine Lösung mit 5 µg/ml PSMA I&T, 5 µg/ml [<sup>nat</sup>Ga]Ga-PSMA I&T und 5 µg/ml [<sup>nat</sup>Lu]Lu-PSMA I&T verwendet.

Zur Herstellung des SST-Standards werden zunächst Zwischenverdünnungen hergestellt. Die Zwischenverdünnungen sollen eine Konzentration von 25 µg/ml haben. Das erfolgt durch Vermengen von 100 µl Aliquot aus der Stammlösung von [<sup>nat</sup>Ga]Ga-PSMA I&T mit 3 900 µl Matrix für Kalibrier- und SST-Standards. [<sup>nat</sup>Lu]Lu-PSMA I&T wird auf die gleiche Weise verdünnt. Nachdem die PSMA I&T Stammlösung eine höhere Konzentration hat (c = 2 000 µg/ml) werden 100 µl dieser Lösung in 7900 µl gelöst um eine Zwischenverdünnung mit einer Konzentration von 25 µg/ml PSMA I&T zu erhalten.

Anschließend werden aus den drei Zwischenverdünnungen (25 µg/ml) jeweils 200 µl entnommen, zu 400 µl Matrix für Kalibrier- und SST-Standards gegeben und vermengt, sodass der gewünschte SST-Standard PSMA I&T 5 µg/ml – [<sup>nat</sup>Ga]-PSMA I&T 5 µg/ml – [<sup>nat</sup>Lu]Lu-PSMA I&T 5 µg/ml entsteht. Da die Zusammensetzung der **Spezifitätsprobe** möglichst der Zusammensetzung der Produktlösung entsprechen soll, wird die Produktmatrix in einer „kalten“ Testsynthese (ohne Zusatz von Precursor und Radionuklid) im Synthesemodul Scintomics® GRP 4V (SCINTOMICS Molecular Applied Theranostics Technologies GmbH, Fürstfeldbruck, Deutschland) hergestellt. Dafür werden das Reagenzienkit: Reagent Kit for synthesis of <sup>177</sup>Lu peptides (Produktnummer: SC-05, ABX, Radeberg, Deutschland) und die Kassette: Cassette for synthesis of <sup>177</sup>Lu peptides (Produktnummer: SC-05-H, ABX, Radeberg, Deutschland) eingesetzt. Die

Produktmatrix besteht aus Natrium-L-ascorbat, Natriumacetat, Essigsäure, Natriumchlorid, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und Gentisinsäure wässriger Lösung. Nach der Herstellung der Produktmatrix werden 10 µl der PSMA I&T-Stammlösung ( $c = 2\,000\ \mu\text{g/ml}$ ) mit 1990 µl Produktmatrix im Vortexer gemischt, sodass eine Konzentration von 10 µg/ml PSMA I&T in Produktmatrix entsteht. 1 000 µl dieser Lösung werden als Spezifitätsprobe verwendet.

Ein **Gentisinsäure-Standard** mit einer Konzentration von 250 µg/ml wird benötigt, um eine zweifelsfreie Identifikation der sichtbaren Peaks für die Spezifitätsprobe zu ermöglichen. Dafür werden 0,1 g Gentisinsäure (2,5-Hydroxybenzoesäure, for synthesis, Produktnummer: 841745, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf der Sartorius MC-1 Serie Analysenwaage AC210P (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) eingewogen und in 100 ml Wasser Ultrapur gelöst und gemischt. Von dieser Stammlösung werden 250 µl entnommen und mit 750 µl Wasser Ultrapur verdünnt. Die entstehende Lösung wird mit dem Vortexer vermischt und in ein HPLC-Gewindefläschchen gefüllt.

Zum Vergleich mit der Arzneibuchmethode haben wir außerdem einen **Natriumdihydrogenphosphatpuffer** (3,12 g/l) hergestellt. Hierfür wurden nach Arzneibuchmethode der Monographie 3170 (55) 3,122 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, Produktnummer 2370.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf unserer Waage (FX3000i, Produktnummer CTK5.1 Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingewogen und in 1000 ml Wasser (Wasser, suitable for HPLC, Produktnummer: 270733, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit 16,5 ml Phosphorsäure 90 g/l (aus eigener Herstellung) auf 2,55 eingestellt (entspricht  $2,5 \pm 0,1$ ). Zur Herstellung der Phosphorsäure 90 g/l wurden 2 ml 85 % Phosphorsäure (Orthophosphoric acid  $\geq 85\%$ , EMPROVE® Essential, Produktnummer: 1.00563.5000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 36 ml Wasser (Wasser, suitable for HPLC, Produktnummer: 270733, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verdünnt. Zur pH-Wert Einstellung wurde ein ORION STAR SERIES pH-Meter von Thermo Scientific (SN: B28172, Waltham, Massachusetts, USA) in Kombination mit einer Avantor pH-Elektrode (SN:2427538, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) verwendet.

### 3.3. Materialien für die Testsynthese von [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T

Für die Testsynthese von [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T wurde ein Scintomics GRP 4 V Synthesemodul verwendet. Das Synthesemodul wird mit speziell designten Einmalkassetten (Cassettes for <sup>68</sup>Ga-labelled peptides, Produktnummer SC-01-H, ABX advanced biochemical compounds GmbH, Radeberg, Deutschland) und den zugehörigen Reagenzien (Reagent Kit for <sup>68</sup>Ga-labelled peptides, Produktnummer SC-01, ABX GmbH, Radeberg Deutschland) bestückt. Als Primärpackmittel für das Endprodukt dienen 25 ml Vakuumvials (Produktnummer: 8580.0025W, ABX, Radeberg, Deutschland). Gallium-68 wurde aus zwei GalliaPharm 1,85 GBq Generatoren (Eckert & Ziegler, Berlin, Deutschland) gewonnen. Für die Entnahme des Endprodukts zur Qualitätskontrolle wurden zweiteilige Einmal-Feindosierungsspritzen (Injekt®-F 1 ml, Artikelnummer 9166017V, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) verwendet. Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Aktivimeter der Firma NUZIA Instruments GmbH (Dresden Deutschland) durchgeführt.

## 4. Validierungsparameter und Durchführung

Als Leitfaden für die Methodvalidierung dient die international gültige ICH Q2 (R2) Richtlinie „Guideline on the validation of analytical procedures“. Ergänzend hierzu ist die Richtlinie der EANM „Guideline on Validation of analytical methods for radiopharmaceuticals“ zu beachten, welche speziell auf die Anforderungen von radioaktiven Arzneimitteln eingeht. Unter Einhaltung der festgelegten Akzeptanzkriterien kann garantiert werden, dass die entwickelte HPLC-Methode für den geplanten Einsatzzweck geeignet ist und verlässliche, reproduzierbare, sowie genaue Ergebnisse liefert (38, 56).

### 4.1. Richtigkeit (Accuracy)

Die Richtigkeit gibt an, wie nah der gemessene Wert der Probe am tatsächlichen Wert liegt. Um die Richtigkeit zu prüfen, wird die Standardreihe an drei verschiedenen Tagen injiziert und mit der zu untersuchenden Methode analysiert. Die Flächenintegrale der einzelnen Standards an den drei Messtagen werden gemittelt und in Abhängigkeit der jeweiligen Standardkonzentration in ein Koordinatensystem eingetragen. Zu diesen Koordinaten wird eine

Regressionsgerade erstellt. Das Verhältnis der gemessenen und laut Regressionsgerade errechneten Konzentration zu der wahren Konzentration entspricht der Richtigkeit in % (56).

$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{\text{Standardkonzentration (errechnet)}}{\text{Standardkonzentration (wahr)}} * 100 \quad (\text{Gl. 9})$$

#### 4.2. Präzision (Precision)

Als Präzision wird die Nähe der Messwerte (beziehungsweise das Maß der Streuung) von verschiedenen Proben derselben Substanz unter gleichbleibenden Messbedingungen aufgefasst. Die Präzision kann als Wiederholbarkeit, intermediäre Präzision und Reproduzierbarkeit betrachtet werden (56).

Als **Wiederholbarkeit** oder auch intra-analytische Präzision wird die Streuung unter denselben Bedingungen in einem kurzen Zeitintervall z.B. am selben Tag angegeben (56).

Die Wiederholbarkeit wird ermittelt, indem Proben mit einer Konzentration von 7,5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml am selben Tag dreimal analysiert wird und die relativen Standardabweichungen der Flächenintegrale ermittelt werden.

Unter der **intermediären Präzision** versteht man die Streuung im selben Labor aufgrund von Faktoren wie verschiedenen Tagen, variablen Umgebungsbedingungen, anderen Labormitarbeitenden oder anderen Geräten (56).

Die intermediäre Präzision wird ermittelt, indem der SST-Standard an drei Tagen jeweils sechsmal analysiert wird und indem die relative Standardabweichung der Flächenintegrale bestimmt wird.

#### 4.3. Spezifität (Specificity)

Die Spezifität beschreibt den Grad der Beeinflussung durch andere, in der Analysenmatrix vorhandene Substanzen auf die eindeutige Bestimmung des gesuchten Analyten. Eine hohe Spezifität zeichnet sich dadurch aus, dass das Signal möglichst nur vom Analyten stammt (56).

Die Spezifität wird überprüft, indem eine kalte Synthese ohne Lutetium-177 und ohne PSMA I&T mit dem Herstellungskit für Lutetium-177-markierte Peptide durchgeführt wird. Das Syntheseprodukt soll alle Hilfsstoffe enthalten, die auch im fertigen Arzneimittel zu finden sind. Nach der Synthese wird aus dem Produktvial 1990 µl Produktmatrix entnommen, und damit ein 10 µl-Aliquot der Stammlösung von PSMA I&T ( $c = 2000 \mu\text{g/ml}$ ) verdünnt, um eine Konzentration von 10 µg/ml zu erhalten. Davon werden 1000 µl in ein HPLC-Vial überführt, um die Spezifitätsprobe zu erhalten. Es werden sechs Messungen durchgeführt und aus den Peakintegralen die Konzentration errechnet.

#### 4.4. Linearität (Linearity)

Als Linearität wird der direkt proportionale Zusammenhang zwischen dem Messwert und der Konzentration des Analyten in der Probe in einem bestimmten Konzentrationsbereich bezeichnet. Bei Auftragen der gemittelten Messwerte aus drei Standardreihen in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentrationen in ein Diagramm kann eine Regressionsgerade ermittelt werden. Wenn die Regressionsgerade mit einem hohen Bestimmtheitsmaß die Messwerte widerspiegelt, ist eine ausreichende Linearität gegeben (56).

#### 4.5. Bestimmungsgrenze (Limit of Detection (LOD) und Limit of Quantification (LOQ))

Als Limit of Detection (LOD) wird die geringste Probenmenge beziehungsweise Konzentration des Analyten angegeben, die detektiert und von der Basislinie unterschieden werden kann, wobei eine Quantifizierung mit ausreichender Präzision und Richtigkeit nicht möglich ist (56).

In dieser Arbeit wird auf eine Bestimmung des LOD verzichtet, weil das Ziel unserer Analyse eine quantitative Bestimmung von PSMA-I&T in [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA I&T und [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA I&T Radiopharmakalösungen ist. Die quantitative Bestimmung ist im Rahmen der Qualitätskontrolle notwendig, um zu berechnen wie viel der Substanz den Patient\*innen appliziert wird und um zu überprüfen, ob der geforderte Grenzwert eingehalten wird.

Im Unterschied dazu drückt das **Limit of Quantification (LOQ)** die geringste Probenmenge aus, die mit ausreichender Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann (56).

Das LOQ wird zunächst aus den Kalibrierstandardreihen abgeschätzt und entspricht der geringsten Konzentration, die eine ausreichende Richtigkeit aufweist. Anschließend wird die ermittelte Konzentration sechsmal analysiert und Richtigkeit und relative Standardabweichung werden geprüft.

#### 4.6. Arbeitsbereich (Range)

Der Arbeitsbereich ist der Bereich zwischen der höchsten und der niedrigsten Probenkonzentration, bei der Messergebnisse mit ausreichender Richtigkeit, und Präzision erhalten werden können (56).

Der Arbeitsbereich wird bestimmt, indem die Kalibrierstandardreihe dreimal analysiert wird und erstreckt sich vom LOQ bis zur höchsten passenden Konzentration. Die Obergrenze des Arbeitsbereiches muss nur ermittelt werden, wenn die zu erwartenden Konzentrationen auch dementsprechend hoch sein können. Nachdem in der Praxis mit durch unsere Synthese lediglich Konzentrationen von < 10 µg/ml synthetisiert werden können (s. Tabelle 4), ist der höchste Kalibrierstandard mit 40 µg/ml mehr als ausreichend.

Produkt	[ <sup>68</sup> Ga] Ga-PSMA I&T	[ <sup>177</sup> Lu] Lu-PSMA I&T
Masse Precursor [µg]	20-40	130
Volumen Produkt [ml]	18	15
Maximale Konzentration [µg/ml]	1,1-2,2	8,7

Tabelle 3: Maximale Probenkonzentrationen

#### 4.7. Robustheit (Robustness)

Die **Robustheit** drückt die Fähigkeit der analytischen Methode aus, unter in der Praxis vorkommenden Schwankungen von Methodenparametern, verlässliche Ergebnisse zu liefern. Sie wird bestimmt, indem absichtlich Methodenparameter geringfügig verändert werden. Somit kann sie Aufschluss über die Verwendbarkeit der Methode im Laboralltag geben (56).

Die Robustheit wird durch Veränderungen der Lösungsmittelzusammensetzung, der TFA-Konzentration und der Flussgeschwindigkeit untersucht. Hierfür werden 3 Messungen des SST-Standards mit der normalen Methode

(=Vergleichsmessungen) und jeweils 3 Messungen unter den veränderten Bedingungen durchgeführt (s. Tabelle 10).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Methodenentwicklung

Um einen Ausgangspunkt für die HPLC-Methodenentwicklung zu finden wurden existierende Methoden zur Analyse von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T und [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA I&T von Schmitl et al. (2023), Aalbersberg et al. (2022), Fouillet et al. (2024), Vyas et al. (2022) und Hoojmann et al. (2021) verglichen (57-61). Nachdem die Substanzen sich primär bei Konzentrationen der mobilen Phase B zwischen 20 und 30% zu trennen scheinen, wurde ein relativ großer Teil des Analysenlaufs für diesen Gradientenbereich eingeräumt. Die Vergleichsmethoden erreichen eine maximale Konzentration der mobilen Phase B von 35 % (58) bis 100 % (60). Es wurde entschieden eine hohe Maximalkonzentration zu verwenden, um eine möglichst vollständige Wiederfindung der Analyten aus der Säule zu erreichen. Als Ausgangspunkt für die weitere Methodenentwicklung wurden die in Tabelle 4 gezeigten Konzentrationsverläufe der mobilen Phasen eingestellt. Zur Methodenentwicklung wurde der SST-Standard eingesetzt, da sich mit ihm die Trennleistung anhand der geforderten Auftrennung des Substanzgemisches in die drei Einzelsubstanzen bewerten ließ.

<b>Zeit in Minuten</b>	<b>Mobile Phase A [%]</b>	<b>Mobile Phase B [%]</b>
<b>0 bis 1</b>	95	5
<b>1 → 5</b>	95 → 80	5 → 20
<b>5 → 10</b>	80 → 75	20 → 25
<b>10 → 17</b>	75 → 70	25 → 30
<b>17 → 20</b>	70 → 60	30 → 40
<b>20 → 22</b>	60 → 15	40 → 85
<b>22 → 25</b>	15 → 95	85 → 5
<b>25 bis 30</b>	95	5

*Tabelle 4: Erste HPLC-Methode als Ausgangspunkt für die weitere Methodenentwicklung*

*Anmerkung: Von 25 bis 30 Minuten werden die Ausgangskonditionen eingestellt, um eine Wiederherstellung des Säulenequilibriums zu erreichen, und die Säule für den nächsten Analysenlauf vorzubereiten.*

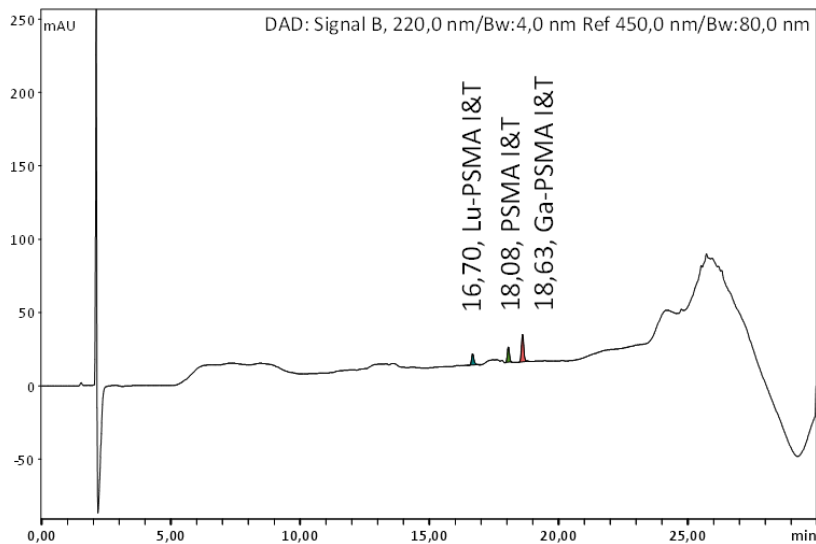


Abbildung 4: Chromatogramm des SST-Standards unter Verwendung der ersten HPLC-Methode, Messung: 250514.002

Wie in Abb. 4 erkennbar, zeigt sich mit dieser Methode bereits eine Auftrennung des Substanzgemisches in einzelne, gut Basislinien-getrennte Peaks.

Die Absorptionswellenlängen wurden initial bei 200 nm, 204 nm und 220 nm nach Vorbild der Arzneibuchmethode (55) und der oben genannten Autor\*Innen untersucht. Im Verlauf der Methodenentwicklung zeigte sich, dass sich bei 220 nm trotz der vergleichsweise geringen Absorption die Peaks im Chromatogramm am besten und einheitlichsten integrieren und von der Basislinie abgrenzen ließen, sodass für die nachfolgende Validierung nur noch diese Wellenlänge untersucht wurde.

Es zeigte sich nach wenigen Tagen - und somit mehreren Gefrier-Tau-Zyklen des SST-Standards - ein größenprogredienter zweiter Peak bei unkomplexiertem PSMA I&T. In der Diskussion werden verschiedene Theorien zu dessen Identität eruiert.

Ein erster Optimierungsversuch wurde unternommen bei dem bereits mit einer höheren Konzentration der mobilen Phase B begonnen wurde und Zeitintervalle der Methode, in denen keine Elution von Substanzen aus der Säule zu erwarten ist, verkürzt wurden.

<b>Zeit in Minuten</b>	<b>Mobile Phase A [%]</b>	<b>Mobile Phase B [%]</b>
<b>0 → 10</b>	80 → 70	20 → 30
<b>10 → 14</b>	70 → 40	30 → 60
<b>14 bis 17</b>	40	60
<b>17 → 20</b>	40 → 80	60 → 20

Tabelle 5: Zweite Methode, Messung 250514.008

Anmerkung: Die Regenerationsphase am Ende der Methode zur Wiederherstellung des Säulenequilibriums vor dem nächsten Analysenlauf wurde als eigene Methode programmiert und ist (im Gegensatz zu in 5 beschriebener Methode) nicht Teil der Methode.

Während diese Methode immer noch drei gut unterscheidbare Peaks zeigte, ließ sich kein lineares Verhältnis zwischen Peakfläche und Konzentration der Analyten feststellen. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in einer unvollständigen Elution der Substanzen aus der HPLC-Säule. Um ein lineares Verhalten zu erreichen, wurde die maximale Konzentration der mobilen Phase B in weiterer Folge auf 80% erhöht und die Regenerationszeit der Säule deutlich verlängert.

Über diese Entwicklungsschritte wurde endgültig die in Kapitel 3.1. beschriebene Methode entwickelt. Eine Analyse der Einzelsubstanzen ermöglichte die Identifikation der Peaks anhand der Peakgestalt und der übereinstimmenden Retentionszeiten.

## 5.2. Validierungsergebnisse

Vor Beginn der HPLC-Methodenvalidierung wurde in einem Validierungsplan festgelegt, welche Validierungsparameter im Rahmen der Validierung zu prüfen sind, und der entsprechende Akzeptanzbereich wurde festgelegt.

Als Akzeptanzkriterium für die **Richtigkeit** wurde festgelegt, dass das errechnete Konzentrationsniveau für jede Konzentration zwischen 90 % und 110% des wahren Konzentrationsniveaus liegen muss. Am LOQ muss die Richtigkeit zwischen 80% und 120% liegen.

Die Richtigkeit wurde wie oben beschrieben geprüft. Die gemittelten Peakflächen sowie RSD und Richtigkeit sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Konzentration [µg/ml]	Fläche [mAU*min] gemittelt	RSD [%]	Richtigkeit [%]
0,00	0,00	n. a.	n. a.
0,50	10,26	37,69	224,45
1,00	12,63	2,77	119,76
2,50	51,18	11,36	96,93
5,00	123,08	0,84	94,19
7,50	194,73	4,89	93,17
10,00	268,19	1,57	93,23
12,50	351,70	2,50	95,83
15,00	445,52	1,30	99,75
17,50	519,03	1,20	98,85
20,00	607,22	0,80	100,52
40,00	1247,90	0,37	101,18

Tabelle 6 : Peakintegrale der PSMA I&T Standardreihe, rot: < LOQ, hellgrün: LOQ, grün: restlicher Arbeitsbereich

Die Konzentrationen werden anhand der umgeformten Kalibriergeradengleichung berechnet:

$$y = 31,451x - 25,386$$

Dabei wird auf x umgeformt, wobei y das gemessene Flächenintegral darstellt. Das Verhältnis aus errechneter Konzentration zu tatsächlicher Konzentration ergibt die Richtigkeit ausgedrückt als Prozente.

Als Akzeptanzkriterium für die **Linearität** wurde ein Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für die Regressionsgrade zu den gemessenen Peakflächen von > 0,99 festgelegt. Dieses Bestimmtheitsmaß wird erreicht.

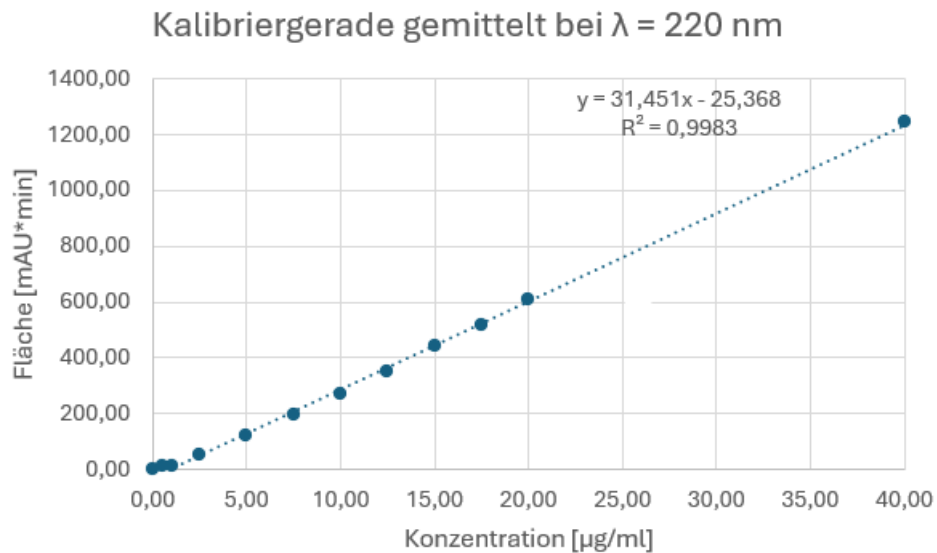


Abbildung 5: Kalibriergerade aus den gemittelten Flächen

Es ergibt sich ein **Arbeitsbereich** vom LOQ mit  $1 \mu\text{g/ml}$  bis zum höchsten Kalibrierstandard mit  $40 \mu\text{g/ml}$ .

Als Akzeptanzkriterium für die **Wiederholbarkeit** wurde eine RSD von  $< 10 \%$  festgelegt.

Konzentration tatsächlich [ $\mu\text{g/ml}$ ]	7,5	10	15
Mittelwert [mAU*min]	218,47	297,84	459,20
Standardabweichung	11,87	10,75	5,83
RSD [%]	5,43	3,61	1,27
Konzentration errechnet [ $\mu\text{g/ml}$ ]	7,75	10,29	15,41
Richtigkeit [%]	103,37	102,86	102,71

Tabelle 7: Validierungsparameter Wiederholbarkeit

Nachdem die RSD durchwegs  $< 10 \%$  beträgt, ist auch dieses Akzeptanzkriterium erfüllt.

Als Akzeptanzkriterium für die **intermediäre Präzision** wurde zwischen allen Flächenintegralen der Einzelsubstanzen des SST-Standards eine RSD von  $\leq 10 \%$  gewählt.

	<b>Lu-PSMA I&amp;T</b> [mAU*min]	<b>PSMA I&amp;T</b> [mAU*min]	<b>Ga-PSMA I&amp;T</b> [mAU*min]
<b>Tag 1</b>	78,90	113,94	126,95
	82,08	127,37	128,34
	84,04	133,21	126,71
	78,34	132,05	136,10
	85,13	129,98	133,74
	86,68	136,31	133,78
<b>Tag 2</b>	86,83	127,32	126,57
	87,05	131,45	131,83
	85,34	133,65	133,06
	84,47	131,88	130,68
	86,39	135,85	132,99
	90,49	130,28	129,88
<b>Tag 3</b>	73,24	140,68	132,30
	77,20	153,05	137,06
	98,92	144,71	131,57
	96,24	142,07	133,99
	94,04	142,12	130,30
	90,86	143,53	134,41
<b>Mittelwert</b>	<b>85,90</b>	<b>134,97</b>	<b>131,68</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>6,47</b>	<b>8,41</b>	<b>3,02</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>7,54</b>	<b>6,23</b>	<b>2,30</b>

Tabelle 8: Validierungsergebnisse der intermediären Präzision

Es zeigt sich für alle drei Substanzen eine ausreichend geringe RSD, um den Akzeptanzkriterien zu entsprechen.

Als Akzeptanzkriterium für die **Spezifität** wurde festgelegt, dass die gefundene Konzentration der Spezifitätsprobe mit einer Richtigkeit von 90-110 % bestimmbar bleibt.

<b>Fläche</b> [mAU*min]	<b>Konzentration errechnet</b> [µg/ml]	<b>Richtigkeit</b> [%]
297,19	10,26	102,56
299,94	10,34	103,43
300,39	10,36	103,58
296,93	10,25	102,48
303,82	10,47	104,67
299,77	10,34	103,38
<b>Mittelwert der Richtigkeit (%):</b>		<b>103,35</b>

Tabelle 9: Validierungsergebnisse der Spezifität

Die Ergebnisse zeigen, dass die HPLC-Methode auch bei Anwesenheit von Matrixbestandteilen eine hinreichend genaue Bestimmung der PSMA I&T-Konzentration in Produktlösungen erlaubt. Eine Störung der Messmethode durch

weitere Bestandteile der Produktlösung wird somit ausgeschlossen und das Akzeptanzkriterium ist demnach erfüllt.

Im Chromatogramm der Spezifitätsprobe zeigt sich bei 4,33 Minuten ein unbekannter Peak. Nachdem im Vergleich zu PSMA I&T im Verlauf der Synthese eine große Menge Gentisinsäure (als Antioxidans und Radikalfänger) hinzugefügt wird und diese Substanz eine UV-Absorption zeigt, liegt der Verdacht nahe, dass es sich bei der gefundenen Substanz um Gentisinsäure handelt.

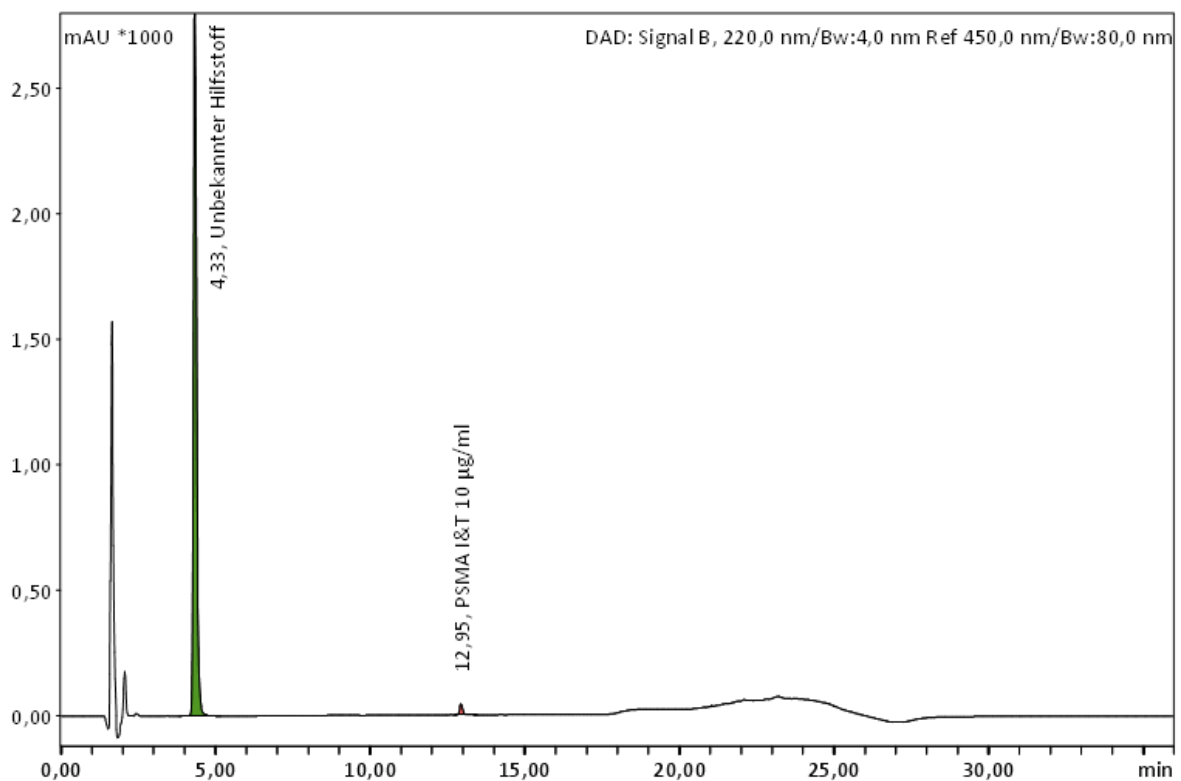


Abbildung 6: Spezifitätsstandard (PSMA I&T 10 µg/ml in Produktmatrix, 250617.010)

Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurde eine Gentisinsäure-Referenzprobe mit einer Konzentration von 250 µg/ml hergestellt und mit derselben Messmethode analysiert. Bei der Analyse dieser Probe zeigt sich ein gleichartiger Peak mit beinahe identischer Retentionszeit (Vergleich Abb. 6 mit Abb. 7), wodurch bewiesen ist, dass es sich bei diesem Peak um Gentisinsäure handelt.

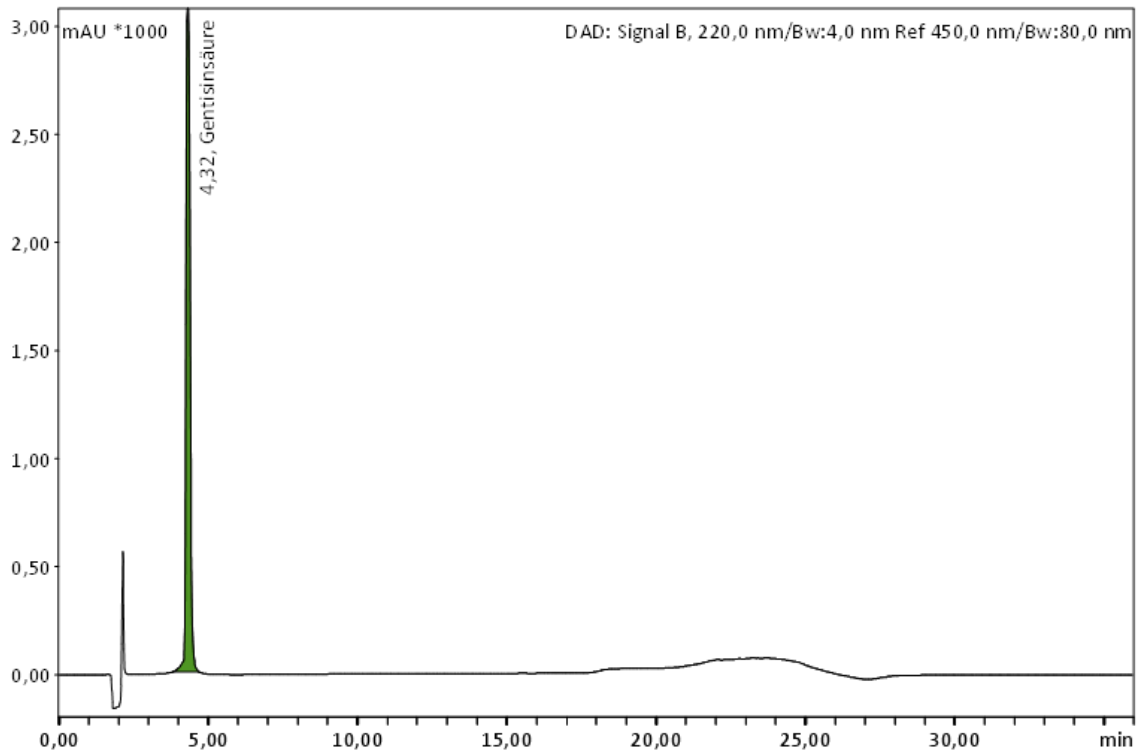


Abbildung 7: Gentisinsäure-Standard (c = 250 µg/ml)

Für die **Robustheit** wurden keine Akzeptanzkriterien festgelegt, weil davon ausgegangen werden kann, dass wesentliche Veränderungen in Methodenparametern anhand von veränderter Retentionszeit, veränderter Peakgestalt und veränderter Peakfläche erkennbar sind. Tabelle 10 liefert eine Übersicht über die zur Untersuchung der Robustheit bewusst veränderten Methodenparametern und deren Auswirkungen auf Retentionszeit, Peakgestalt und Peakfläche.

Veränderung	Retentionszeit	Peakgestalt	Peakfläche
Veränderte mobile Phasen A: +1 %, B: -1%	↑	=	=
Veränderte mobile Phasen A: -1 %, B: +1%	↓	=	=
Veränderte c(TFA) in A & B 0,08 % TFA	=	Nur ein einziger scharfer Peak	=
Veränderte c(TFA) in A & B 0,12 % TFA	=	Stärkerer Doppelpeak mit Basislinientrennung	=
Veränderte Flussrate 0,38 ml/min	↑	=	↑
Veränderte Flussrate 0,46 ml/min	↓	=	↓

Tabella 10: Versuche zur Robustheit

Wie vermutet lassen sich bereits geringe Veränderungen von Lösungsmittelzusammensetzung, TFA-Konzentration und Flussgeschwindigkeit eindeutig am Chromatogramm erkennen.

Eine veränderte Zusammensetzung der mobilen Phasen führt zu einer Verlängerung der Retentionszeit bei verringerter ACN-Konzentration und Verkürzung der Retentionszeit bei erhöhter ACN-Konzentration. Auf Peakgestalt und Peakfläche hat diese Veränderung keinen Einfluss.

Wird die TFA-Konzentration verändert, so ändert sich die Peakgestalt deutlich. Bei einer geringeren TFA-Konzentration findet sich nur noch ein einzelner scharfer Peak und bei höherer TFA-Konzentration ist der Doppelpeak noch ausgeprägter und es kommt beinahe zu einer Basislinientrennung. Retentionszeit und Peakfläche bleiben gleich.

Eine verringerte Flussrate führt zu einer erhöhten Retentionszeit und vergrößerten Peakfläche. Bei erhöhter Flussrate kommt es zu einer verringerten Retentionszeit und Peakfläche. Die Peakgestalt ist unverändert.

Nachdem in der Laborroutine vor der Analytik des zubereiteten Radiopharmakons täglich ein SST-Standard und eine Referenzprobe des Analyten mit gleicher Methode, gleichen mobilen Phasen und gleicher Säule voruntersucht werden,

würden Veränderungen dieser Parameter sofort auffallen und es würde nicht zu einer fehlerhaften Qualitätskontrolle des RP kommen.

### 5.3. Validierungsergebnisse Radioaktivitätsdetektor

Aufgrund der Verfügbarkeit von Gallium-68 aus den Generatoren vor Ort wurde im Rahmen der Laborversuche auch eine **[<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T Testsynthese** durchgeführt.

Aus dem Produktvial wurden 0,5 ml in ein HPLC-Vial überführt und mit der neu entwickelten Radio-HPLC-Methode analysiert. Der während des Analysenlaufs anfallende HPLC-Abfall wurde in einem Tricarb-Vial aufgefangen. Unmittelbar nach dem abgeschlossenen Analysenlauf wurde sowohl die Aktivität im HPLC-Vial als auch im Tricarb-Vial („Abfall“) mit dem Aktivimeter gemessen. Es ergab sich für das HPLC-Vial eine Aktivität von 14,69 MBq in 0,5 ml, somit eine Aktivitätskonzentration von 29,38 MBq/ml, und für den HPLC-Waste eine Aktivität von 0,69 MBq. Durch die zeitgleiche Messung unmittelbar nach dem Analysenlauf entfällt die Notwendigkeit einer Zerfallskorrektur des Ausgangswertes. Aus der Aktivitätskonzentration (29,38 MBq/ml) und dem Injektionsvolumen (20 µl) wird die injizierte Aktivität (zum Zeitpunkt des beendeten Analysenlaufs) berechnet. Die Berechnung ergibt eine injizierte Aktivität von 0,59 MBq. Mit Hilfe der injizierten Aktivität und der tatsächlich im Abfall gefundenen Aktivität wird die Säulen-Recovery berechnet. Die Recovery beträgt 116,84% und liegt innerhalb des vorab definierten Spezifikationsbereich von 80-120%.

Im Anschluss wurde die Probe wiederholt über einen Zeitraum von 189 Minuten in weiteren Analysenläufen untersucht, um die Linearität des Radioaktivitätsdetektors zu bestimmen. Die Injizierten Aktivitäten und gemessenen Counts sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) liegt bei 0,9999 (Abb. 8) und erfüllt die vorab definierte Bedingung von  $R^2 > 0,99$ . Abb. 9 zeigt ein UV- und Radioaktivitätschromatogramm der mittels Testsynthese zubereiteten [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-I&T Produktlösung.

Zeit seit t <sub>0</sub> [min]	Injizierte Aktivität [kBq]	Counts
0	590,00	509996,70
40	391,60	335190,70
77	268,03	227283,00
115	181,58	155002,00
152	124,28	105277,00
189	85,07	72165,67

Tabelle 11: Injizierte Aktivitäten und gemessene Counts über 189 Minuten

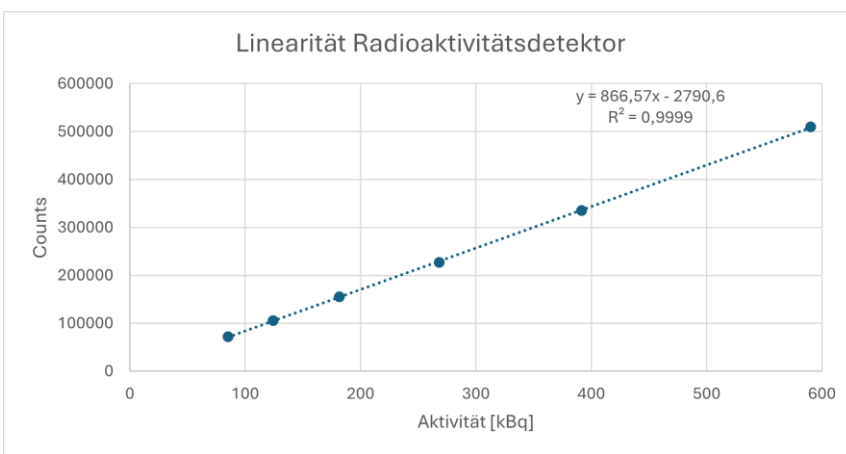


Abbildung 8: Linearitätsbestimmung des Radioaktivitätsdetektors durch wiederholte Injektionen über 189 Minuten

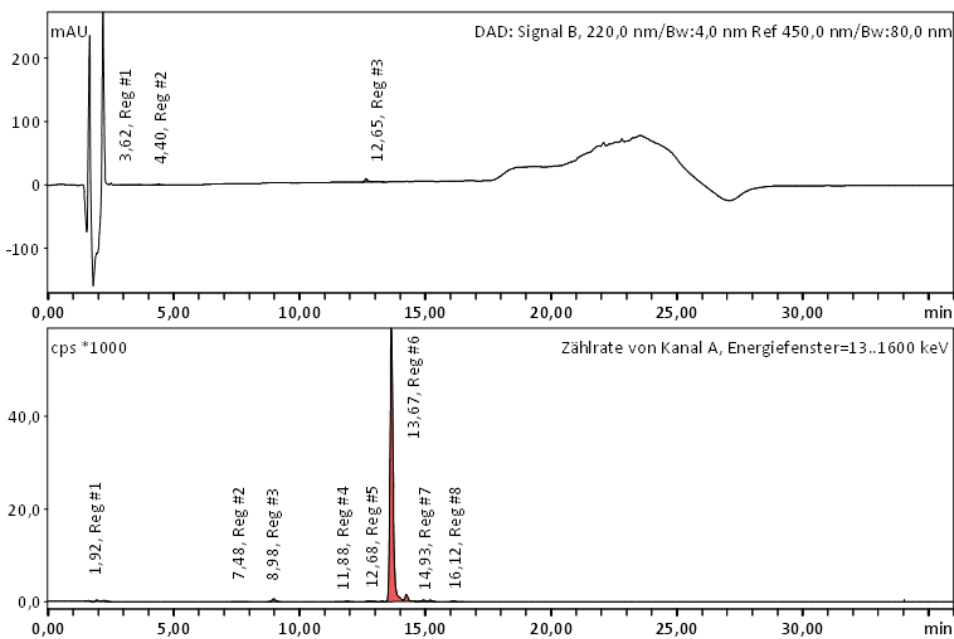


Abbildung 9: UV- (oben) und Radioaktivitätschromatogramm (unten) von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA I\&T}$  (Injektion zum Zeitpunkt t<sub>0</sub>)

## 6. Diskussion

Der theranostische Einsatz von PSMA-Liganden gewinnt in der Nuklearmedizin immer mehr an Bedeutung. Zur Behandlung des fortgeschrittenen PCa mittels RLT unter Verwendung von Lutetium-177 stehen momentan besonders zwei Radiopharmaka im Fokus: zum einen das zugelassene und kommerziell verfügbare Präparat Pluvicto mit dem Wirkstoff [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 und zum anderen [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T, das auf nuklearmedizinischen Institutionen zur unmittelbaren Anwendung am Patienten hergestellt wird und sich in Phase III klinischer Studien befindet (62).

Die wissenschaftliche Datenlage ist zu [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 im Vergleich zu [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T derzeit umfangreicher (31). Die bisherige Studienlage deutet allerdings auf eine therapeutische Gleichwertigkeit von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 und [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T hin (63, 64). Zur in-house Präparation in der Radiopharmazie ist der Precursor PSMA I&T in GMP-Qualität von qualifizierten Herstellern (z.B. ABX) erhältlich. Unter diesen Voraussetzungen kann im radiochemischen Labor sowohl das Gallium-68- als auch das Lutetium-177-markierte RP als in-house Synthese hergestellt werden (62).

Die Qualitätskontrolle des Radiopharmakons ist vor der Verabreichung notwendig, um die Sicherheit und Wirksamkeit des Radiopharmakons zu gewährleisten. Im Rahmen der Diplomarbeit konnte erfolgreich eine Methode zur Qualitätskontrolle sowohl von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T als auch von [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T entwickelt werden. In Übereinstimmung mit der ICH Q2(R2)-Richtlinie wurde vor Durchführung der Methodvalidierung ein Validierungsplan erstellt, der die relevanten Akzeptanzkriterien festlegt und eine detaillierte Beschreibung der Versuchsplanung enthält. Durch die Methodvalidierung nach ICH Q2(R2) bzw. durch die Erfüllung der im Validierungsplan geforderten Akzeptanzkriterien konnte eine Eignung der Analysenmethode zur Qualitätskontrolle beider untersuchter Radiopharmaka bestätigt werden.

Anders als bei der im Arzneibuch beschriebenen Methode für die Qualitätskontrolle von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T wurden als mobile Phasen zur Analyse Acetonitril und Wasser mit jeweils 0,1 % TFA verwendet. In der Literatur wurde unter Verwendung dieser mobilen Phasen bei der Analyse von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T ausgeprägtes

Peaktailing beobachtet. Dieser Effekt konnte im eigenen UV-Chromatogramm bei der Analyse von [<sup>nat</sup>Lu]Lu-PSMA I&T nicht beobachtet werden. Aalbersberg et al. berichten außerdem von einer unvollständigen Elution von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T aus der Säule sowie über variable Peakhöhen im Radioaktivitätschromatogramm (58). Ein Analysenlauf mit radioaktivem [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht durchgeführt und somit liegen keine Daten dazu unter Verwendung der entwickelten Methode vor. Stattdessen wurde ein Analysenlauf mit dem Gallium-68 markierten Radiopharmakon [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T durchgeführt. Über die Messung des HPLC-Abfalls ergab sich eine Wiederfindung von 116,8 % der injizierten Aktivität. Der Wert über 100% ist auf instrumentelle Messunsicherheiten des Aktivimeters aufgrund der unterschiedlichen Messgeometrie und auf die begrenzte Präzision im niedrigen Dosisbereich zurückzuführen. Zusätzlich können auch volumetrische Abweichungen bei der manuellen Überführung der Probelösung in das HPLC-Vial zu dieser Abweichung beigetragen haben. Insgesamt kann über den ermittelten Wert die vollständige Rückgewinnung aus dem HPLC-System bestätigt werden und damit eine Retention von Aktivität in der Säule ausgeschlossen werden.

Im Zuge der Validierung wurde ein Arbeitsbereich von der Bestimmungsgrenze (LOQ) bis zum höchsten Kalibrierstandard (1 – 40 µg/ml) festgelegt. Zur Therapie liegt die zu erwartende Konzentration an PSMA I&T in der Endpräparation bei 8,7 µg/ml, was durch den festgelegten Arbeitsbereich gut abgedeckt ist. Der LOQ der neu validierten Methode liegt bei 1,0 µg/ml, wodurch auch geringere Konzentrationen bis zu diesem Wert zuverlässig quantifiziert werden können. Die Quantifizierung ist so auch bei geringeren Einsatzmengen des PSMA I&T Precursors - wie zum Beispiel zur Produktion von [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA I&T - möglich, sowie bei der Analyse von verdünnten Radiopharmakalösungen.

Im Zuge der Validierung zeigte sich nach einigen Gefrier-Auftauzyklen ein größenprogredienter zweiter Peak bei unkomplexiertem PSMA I&T. Die addierte Fläche beider Peaks blieb jedoch konstant, sodass trotzdem eine verlässliche Quantifizierung von PSMA I&T erfolgen konnte. Auch eine Differenzierung von PSMA I&T, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-PSMA I&T und [<sup>nat</sup>Lu]LuPSMA I&T im SST-Standard war weiterhin uneingeschränkt möglich. Grund für die Zersetzung des PSMA I&T-Standards könnte die in der Literatur beschriebene thermisch medierte

Kondensation des Bindungsmotivs sein (65, 66). Während dies auf die erfolgreiche Durchführung der Validierung keinen großen Einfluss hatte, ist die Evaluierung zusätzlicher Peaks bei der Präparation für die Anwendung an Patienten von großer Bedeutung. In *in-vitro* Untersuchungen konnte nämlich gezeigt werden, dass der kondensierte Tracer eine stark reduzierte Affinität zu PSMA aufweist (65). Da für die erfolgreiche Markierung des DOTAGA-konjugierten Präkursors PSMA I&T mit Gallium-68 und Lutetium-177 das Reaktionsgemisch erhitzt werden muss, könnte es zur Bildung solcher Kondensationsprodukte kommen. Um dem gegebenenfalls entgegenzuwirken, kann eine Anpassung der Reaktionsbedingungen im Markierungsprozess (z.B. Reduktion der Temperatur, Verkürzung der Markierungszeit oder Anpassung des pH-Werts) notwendig sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der entwickelten und validierten HPLC-Methode eine zuverlässige Unterscheidung und Identifizierung von [<sup>nat</sup>Lu]Lu-PSMA I&T, [<sup>nat</sup>Ga]Ga-PSMA I&T und PSMA I&T möglich ist. Zudem ist im festgelegten Arbeitsbereich eine zuverlässige Quantifizierung von PSMA I&T möglich. Die Methode stellt einen wichtigen Beitrag zur Qualitätssicherung im Rahmen der Herstellung dar, und schafft die analytische Grundlage für die klinische Anwendung des theranostischen Liganden PSMA I&T auf der klinischen Abteilung für Nuklearmedizin.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Österreichische Krebshilfe. Österreichische Krebshilfe. [Internet].; 2025 [zitiert 2025 Aug 22]. Verfügbar unter: <https://www.krebshilfe.net/information/krebs-in-oesterreich/krebserkrankungen-in-oesterreich>.
- 2 Rawala P. Epidemiology of Prostate Cancer. World journal of oncology. 2019; 10(2): 63-89.
- 3 Gasser T, Eberli D, Thomas C. Basiswissen Urologie. 8., Aufl. Berlin: Springer-Verlag GmbH, DE; 2023.
- 4 Statistik Austria. Bundesanstalt Statistik Österreich. [Internet].; 2024 [zitiert 2025 Jun 04]. Verfügbar unter: <https://www.statistik.at/fileadmin/announcement/2024/01/20240125Krebsstatistik2022.pdf>.
- 5 Leitlinienprogramm Onkologie DDK. S3-Leitlinie Prostatakarzinom. [Internet].: AWMF; 2024 [zitiert 2025 Jun 17]. Verfügbar unter: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>.
- 6 Fendler WP, Eiber M, Beheshti M, al. e. PSMA PET/CT: joint EANM procedure guideline/SNMMI procedure standard for prostate cancer imaging 2.0. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2023; 50: 1466-1486.
- 7 Bostel F. Pschyrembel Online. [Internet].; 2024 [zitiert 2025 Jul 15]. Verfügbar unter: <https://www.pschyrembel.de/theranostik/Z04HP/doc/>.
- 8 Brown T. National Geographic. [Internet].; 2023 [zitiert 2025 Mai 02]. Verfügbar unter: <https://education.nationalgeographic.org/resource/matter/>.
- 9 Kamke D, Walcher W. Physik für Mediziner. 2. Aufl. Stuttgart: B.G. Teubner; 1994.
- 10 Mortimer CE, Müller U. Chemie - Das Basiswissen der Chemie. 9. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007.
- 11 Dietlein M, Kopka K, Matthias S. Nuklearmedizin. 9. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2024.
- 12 Theobald T. Sampsons´ s Textbook of Radiopharmacy. 4. Aufl. Noida: Pharmaceutical Press; 2021.

- 13 Sauer R. Strahlentherapie und Onkologie. 5. Aufl. München: Elsevier GmbH; 2012.
- 14 Herrmann T, Baumann M, Dörr W. Klinische Strahlenbiologie. 4. Aufl. München: Elsevier GmbH; 2006.
- 15 Dash A, Pillai MR, Knapp FFJ. Production of (177)Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. Nuclear medicine and molecular imaging. 2015; 49(2): 85-107.
- 16 Lewis JS, Windhorst AD, Zeglis BM. Radiopharmaceutical Chemistry. 1. Aufl. Cham: Springer Nature Switzerland AG; 2019.
- 17 Filosofov DV, Garland M, John KD, KFFJ, Kuznetsov R, Mausner L, et al.. Production of long lived parent Radionuclides for Generators Wien: IAEA; 2010.
- 18 Haji-Saeid M, Pillai MRA, Ruth TJ, Schlyer DJ, Van Den Winkel P, Vora MM. Cyclotron Produced Radionuclids: Principles and Practise Wien: IAEA; 2008.
- 19 Zhang T, Lei H, Chen X, Dou Z, Yu B, Su W, et al. Carrier systems of radiopharmaceuticals and the application in cancer therapy. Cell death discovery. 2024; 10(1): 16.
- 20 Höfler G. Pathologie das Lehrbuch. 7. Aufl. München: Elsevier; 2024.
- 21 Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 7. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2024.
- 22 Ming Z. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate. Modern Pathology. 2018; 31(1): 71-79.
- 23 Bluemn EG, Nelson PS. The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. Current Opinion in Oncology. 2012; 24(3): 251-257.
- 24 Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, Gumenku L, Adegoke A, Mashele S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. Molecules. 2022; 27(17): 5730.
- 25 Evans CJ, Malhotra M, Cryan JF, O'Driscoll CM. The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. British Journal of Pharmacology. 2016; 173: 3041-3079.

- 26 Peters DE. Targeting glutamate carboxypeptidase II in IBD. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.). 2024; 101: 265-285.
- 27 O'Keefe DS, Bacich DJ, Huang SS, Heston WDW. A Perspective on the Evolving Story of PSMA Biology, PSMA-Based Imaging, and Endoradiotherapeutic Strategie. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2018; 59(7): 1007-1013.
- 28 Sallam M, Nguyen NT, Sainsbury F, Kimizuka N, Muyldermans S, Benešová-Schäfer M. PSMA-targeted radiotheranostics in modern nuclear medicine: then, now, and what of the future? *Theranostics*. 2024; 14(8): 3043-3079.
- 29 Mhawech-Fauceglia P, Zhang S, Terracciano L, Sauter G, Chadhuri A, Herrmann FR, et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology*. 2007; 50(4): 472-483.
- 30 Wester HJ, Schottelius M. PSMA-Targeted Radiopharmaceuticals for Imaging and Therapy. *Seminars in nuclear medicine*. 2019; 49(4): 302-312.
- 31 El Fakiri M, Geis NM, Ayada N, Eder M, Eder AC. PSMA-Targeting Radiopharmaceuticals for Prostate Cancer Therapy: Recent Developments and Future Perspectives. *Cancers*. 2021; 13: 3967.
- 32 Di Iorio V, Boschi S, Cuni C, Monti M, Severi S, Paganelli G, et al. Production and Quality Control of [177Lu]Lu-PSMA-I&T: Development of an Investigational Medicinal Product Dossier for Clinical Trials. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2022; 27(13): 4134.
- 33 Hennrich U, Eder M. [68Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved 68Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland). 2021; 14(8): 713.
- 34 EMA. European Medicines Agency. [Internet].; Locametz - 2025 [zitiert 2025 Jul 15]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/locametz>.
- 35 EMA. European Medicines Agency. [Internet].; Pluvicto - 2025 [zitiert 2025 Jul 18]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/pluvicto>.

- 36 Weineisen M, Simecek J, Schottelius M, al. e. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2014; 4(63).
- 37 Schuchardt C, Zhang J, Kulkarni HR, Chen X, Müller D, Baum RP. Prostate-Specific Membrane Antigen Radioligand Therapy Using <sup>177</sup>Lu-PSMA I&T and <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Comparison of Safety, Biodistribution, and Dosimetry. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2022; 63(8): 1199-1207.
- 38 Gillings N, Hjelstuen O, Ballinger J, Behe M, Decristoforo C, Elsinga P, et al. Guideline on current good radiopharmacy practice (cGRPP) for the small-scale preparation of radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med Mol Imaging radiopharmacy and chemistry*. 2021; 6(1): 8.
- 39 Gühne F, Radke S, Winkens T, Kühnel C, Greiser J, Seifert P, et al. Differences in Distribution and Detection Rate of the <sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA Ligands PSMA-617,-I&T and-11—Inter-Individual Comparison in Patients with Biochemical Relapse of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals*. 2021; 15(9).
- 40 McCarthy M, Langton T, Kumar D, Campbell A. Comparison of PSMA-HBED and PSMA-I&Tas diagnostic agents in prostate carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017; 44: 1455-1462.
- 41 Hussain S, Mubeen I, Ullah N, Shah SSUD, Khan BA, Zahoor M, et al. Modern Diagnostic Imaging Technique Applications and Risk Factors in the Medical Field: A Review. *BioMed research international*. 2022.
- 42 Kauffmann GW. *Radiologie bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz*. 4. Aufl. München: Urban & Fischer; 2011.
- 43 Delker A, Schleske M, Liubchenko GBI, Zacherl MJ, Brendel M, et al. Biodistribution and dosimetry for combined [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-I&T/[<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-I&T therapy using multi-isotope quantitative SPECT imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2023; 50(5): 1280-1290.

- 44 Sethekge MM, Lawal IO, Bal B, Bruchertseifer F, Ballal S, Cardaci G, et al. Actinium-225-PSMA radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer (WARMTH Act): a multicentre, retrospective study. *The Lancet Oncology*. 2024; 25(2): 175-183. (14)
- 45 Ling SW, de Blois E, Hooijman E, van der Veldt A, Brabander T. Advances in <sup>177</sup>Lu-PSMA and <sup>225</sup>Ac-PSMA Radionuclide Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Pharmaceutics*. 2022; 14(10).
- 46 Zhang J, Singh A, Kulkarni HR, Schuchardt C, Müller D, Wester HJ, et al. From Bench to Bedside-The Bad Berka Experience With First-in-Human Studies. *Seminars in nuclear medicine*. 2019; 49(5): 422-437.
- 47 Garo M L, Ovčariček PP, Fanti S, Giovannella L. [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical investigation*. 2025; 55(5): e14358.
- 48 Sartor O, de Bono J, Chi KN, Fizazi K, Herrmann K, Rahbar K, et al. Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2021; 385(12): 1091-1103.
- 49 Bundesministerium für Gesundheit. Arzneibuchgesetz 2012. Konsolidierte Fassung vom 3. November 2025 [Internet]. Wien: Bundeskanzleramt; 2012. [zitiert 2025 Okt 30]. Verfügbar unter: <https://www.ris.bka.gv.at>.
- 50 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia. 11th ed. Strasbourg: Council of Europe. 2022 Apr 01..
- 51 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Liquid Chromatography, monograph 20229. In: European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.1. Strasbourg (France): Council of Europe. 2023..
- 52 Arnold E. Lösungsfabrik Thode und Partner. [Internet].; 2017 [zitiert 2025 Okt 14]. Verfügbar unter: <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/high-performance-liquid-chromatography/hplc-system-simply-explained>.
- 53 Kadjo KF, Dasgupta PK, Su J, Liu S, Kraiczek KG. Width Based Quantitation of Chromatographic Peaks: Principles and Principal Characteristics. *American Chemical Society*. 2017; 89(7): 3884-3892.
- 54 Dube M, Muraco C, Weibel D. Difluoroacetic Acid as an Effective Mobile Phase Modifier for the LC-UV/MS Analysis of Proteins. *Analytix Reporter*. 2022;(12).

- 55 European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). Lutetium (177Lu) Zadavotide Guraxetan Injection, monograph 3170. In: European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.7. Strasbourg (France): Council of Europe. 2025..
- 56 EMA. ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical. [Internet].: European Medicines Agency; 2023 [zitiert 2025 Jun 11]. Verfügbar unter: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf).
- 57 Schmitl S, Raitanen J, Witoszynskij S, Patronas E, Nics L, Ozenil M, Weissenböck V, et al. Quality Assurance Investigations and Impurity Characterization during Upscaling of [177Lu]Lu-PSMA-I&T. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2023; 28(23): 7696.
- 58 Aalbersberg EA, Cao TT, Geluk-Jonker MM, Hendriks JJMA, Quality control of [177Lu]Lu-PSMA preparations using HPLC: effect of sample composition and ligand on recovery. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*. 2022; 7(1): 24.
- 59 Fouillet J, Donzé C, Deshayes E, Santoro L, Rubira L, Fersing C. "One Method to Label Them All": A Single Fully Automated Protocol for GMP-Compliant 68Ga Radiolabeling of PSMA-11, Transposable to PSMA-I&T and PSMA-617. *Current radiopharmaceuticals*. 2024; 17(3): 285-301.
- 60 Vyas M, Lim R, Fagan J, Chandrashekar R. Stability Matters: Radiochemical Stability of Therapeutic Radiopharmaceutical 177Lu-PSMA I&T. *Journal of nuclear medicine technology*. 2022; 50(3): 244-247.
- 61 Hooijman EL, Chalashkan Y, Ling SW, Kahyargil FF, Segbers M, Bruchertseifer F, et al. Development of [225Ac]Ac-PSMA-I&T for Targeted Alpha Therapy According to GMP Guidelines for Treatment of mCRPC. *Pharmaceutics*. 2021; 13(5): 715.
- 62 Kratochwil C, Fendler WP, Eiber M, Hofman MS, Emmett LM, Calais J, Osborne JR, et al. Joint EANM/SNMMI procedure guideline for the use of 177Lu-labeled PSMA-targeted radioligand-therapy (177Lu-PSMA-RLT). 2023; 50(9): 2830-2845.
- 63 Sadaghiani MS, Sheikhabaei S, Werner RA, Pienta KJ, Pomper MG, Solnes LB, et al. A Systematic Review and Meta-analysis of the Effectiveness and Toxicities of Lutetium-177-labeled Prostate-specific Membrane Antigen-targeted Radioligand Therapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *European urology*. 2021; 80(1): 82-94.

- 64 Hartrampf PE, Weinzierl FX, Buck AK, Rowe SP, Higuchi T, Seitz AK, et al. Matched-pair analysis of [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA I&T and [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2022; 49(9): 3269-3276.
- 65 Martin S, Tönnemann R, Hierlmeier I, Maus S, Rosar F, Ruf J, et al. Identification, Characterization, and Suppression of Side Products Formed during the Synthesis of [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617. *Journal of medicinal chemistry*. 2021; 64(8): 4960-4971.
- 66 Larenkov A, Mitrofanov I, Rakhimov M. Improvement of End-of-Synthesis Radiochemical Purity of <sup>177</sup>Lu-DOTA-PSMA-Ligands with Alternative Synthesis Approaches: Conversion Upswing and Side-Products Minimization. *Pharmaceutics*. 2024; 16(12): 1535.