

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2019.5.2.129>

## Copper chelation chemistry with various chelators for radiopharmaceuticals

Chul Hee Kim and Dong Wook Kim\*

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Inha University, 100 Inha-ro, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea.

### ABSTRACT

Over a few decades, copper radioisotopes and their chelation chemistry for radiopharmaceuticals have played crucial role in the radiopharmaceutical science area. A variety of chelators have been required for their stable targeting ability in physiological conditions. For radiolabeling with copper-64 into biomolecules, thermodynamic stability, kinetic inertness, pH stability, and redox stability should be considered. In this regard, many researchers have attempted to develop the chelators that can bind with copper more tightly, rapidly and stably for copper radiolabeling. This review discusses the chemistry of copper, its suitable chelators and characteristics, while elucidating the evaluations of each chelator for radiolabeling.

**Key Word:** Copper, Chelators, Radiolabeling, Molecular imaging probes, Radiopharmaceuticals, Positron emission tomography.

### Introduction

구리(Copper) 방사성 동위원소의 핵의학적 이용은 구리가 가지는 여러 우수한 이화학적 특성에 기반한 다양한 범주의 킬레이터(Chelator)의 개발이 함께함에 따라 가능하였다. 구리는 다른 금속 방사성 동위원소와 비교하였을 때, 킬레이터에 대한 높은 친화도를 보여 양전자 방출 단층촬영(Positron emission tomography, PET)과 같은 분자영상의 프로브를 구성함에 있어 주된 방사성 동위원소 핵종으로 자리매김 해 왔다. 또한  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 12.7$  h,  $E_{\beta^+} = 0.655$  MeV (17.8%),  $E_{\beta^-} = 0.573$  MeV (38.4%), EC (43.8%))(1)의 경우, 비교적 긴 반감기를 지녀 양질의 PET영상 이미지를 얻기 위한 종양 내 섭취와 체내 분포가 이루어 질 수 있는 충분한 시간을 만족할 수 있다. 따라서 방사성 동위원소 핵종으로 구리와 적절한 킬레이터를 항체, 단백질, 펩타

이드 그리고 저분자 등에 접목한 다양한 연구들이 현재에도 활발히 계속되고 있다(2).

하지만 구리 방사성 동위원소를 사용함에 있어 생체 조건에서는 조금 더 엄격한 킬레이터의 기준이 필요하다. 구리는 진핵생물에 있어 필수적인 금속 이온의 한 종류로 전자 전달,  $\text{O}_2$  결합 그리고 많은 유기 분자의 산화 환원 반응과 관련된 효소의 활성을 위해 필요하다(3). 따라서 구리에 대한 체내 항상성은 일정하게 조절되고 있으며, 이로 인해 체내에는 구리가 결합할 수 있는 다양한 생체 분자들이 세포 내 (transporters, chaperones, metallothioneins, superoxide dismutase, cytochrome c oxidase, etc.)와 세포 외(serum albumin, ceruloplasmin, transcuprin, etc.)에 분포하고 있다(4). 이러한 생체 분자들에 의해 구리 방사성 동위원소의 transchelation이 나타날 수 있고 이는 PET영상에서의 왜곡된 이미지

Received: December 12, 2019 / Revised: December 26, 2019 / Accepted: December 28, 2019

**Corresponding Author :** Prof. Dong Wook Kim, Department of Chemistry, Inha University, 100 Inha-ro, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea. Telephone: +82-32-860-7679, FAX: +82-32-867-5604, e-mail: kimdw@inha.ac.kr

Copyright©2019 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

를 형성할 수 있다. 따라서 이러한 현상을 방지하고자 열역학적 안정성이 높고 속도론적 비활성이 큰 착물을 형성할 수 있는 적절한 킬레이터를 도입하는 것이 중요하다. 또한 구리는 체내에서 Cu(I)와 Cu(II) 이온의 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로 Cu(II)의 형태가 더 안정하고 킬레이터에 대한 친화성이 높아 Cu(II)를 표지하여 도입하는데(1), 체내 환원적 조건에 의해 Cu(I)으로 환원된다면 기존의 킬레이터와 매우 큰 안정성 차이가 나타나기 때문에 문제가 될 수 있다. 그렇기 때문에 이러한 환원적 조건에서도 큰 저항성을 지니는 킬레이터가 요구된다.

위와 같은 여러 기준을 만족할 수 있는 구리를 위한 다양한 킬레이터들이 현재에도 끊임없이 보고되고 있다. 이러한 킬레이터들은 구리 방사성 동위원소를 사용한 목적에 따라 다양화되고, 단순히 킬레이터에 대한 안정성 측면뿐만이 아닌 표지 조건, 분자의 친수성 조절 등 여러 기준이 고려되고 있다. 본 글에서는 이러한 기준들을 고려하여 구리 방사성 동위원소를 활용하기 위한 여러 킬레이터들의 개발현황과 각 킬레이터의 특징을 구리의 화학적 특성과 함께 소개한다.

## 구리 방사성 동위원소

구리의 동위원소로는 현재까지 29종이 알려져 있으며 그 중 방사성 동위원소 4종( $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$  and  $^{64}\text{Cu}$ )이 분자영상 분야에, 2종( $^{64}\text{Cu}$  and  $^{67}\text{Cu}$ )이 방사선치료 분야에 활용될 수 있다(2). 특히  $^{64}\text{Cu}$ 는 낮은 에너지의 사이클로트론으로도 생산 가능하며, 12.7 h라는 상대적으로 긴 반감기를 가지고 있어 지난 대부분의 구리 방사성 동위원소를 활용한 연구들이  $^{64}\text{Cu}$ 를 방사성 동위원소 핵종으로 사용하였다.  $^{64}\text{Cu}$ 는 대개  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  반응을 통하여 생산되며 12 MeV 양성자 빔을 조사하여 100 MBq (3 mCi)/ $\mu\text{Ah}$  까지 생산 가능하다 보고되었다(5).  $^{64}\text{Cu}$ 는 전자포획(44%),  $\beta^+$  방출(18%),  $\beta^-$  방출(38%)의 붕괴 과정을 보이며 PET을 통한 영상화뿐만 아닌 치료용 동위원소로 활용이 가능하기 때문에 theranostic 분야에서 그 가능성을 보여주고 있다(6).

## 구리의 화학적 특성

생체 내에 존재하는 구리는 Cu(I)과 Cu(II)의 형태로 존재할 수 있다. 두 산화상태에 따라 선호하는 리간드 공여체와 배위 기하 구조가 서로 다르기 때문에 킬레이터에 의해 원하는 구리 방사성 동위원소를 표지할 때에 이 점을 분명히 구분해야 한다. Cu(I)은 반자성의  $d^{10}$  배열을 가지고 결정장 안정화 에너지 없이 리간드와 착물을 이룬다(7). Cu(I)은 hard soft acid base theory (HSAB)에 의하면 thiol, thioethers, phosphines, nitriles, isonitriles, iodide, cyanide, thiolates 그리고 imidazole과 같은 soft polarizable 리간드 공여체와 tetrahedral geometry를 선호한다(3, 7). 따라서 체내에서 Cu(I)은 구리 운송 단백질의 한 종류인 ATOX1과 같은 histidine이 많은 tetrahedral binding sites에 존재한다(3). 반면 Cu(II)의 경우  $d^9$  배열을 가지고 borderline softness를 보이며 amine, imine, bipyridine, carboxylate와 같은 borderline hard 리간드 공여체와 square pyramidal, distorted square planar, trigonal pyramidal, square pyramidal, distorted octahedral geometry 등을 선호한다(7). 또한 Cu(II)의 육배위 화합물의 경우(octahedral geometries) axial elongation 과 tetragonal compression의 큰 Jahn-Teller distortions을 보이는데 이로 인하여 비교적 빠른 리간드 교환이 나타난다. 하지만 Cu(II)는 Cu(I)에 비해 어느 정도의 결정장 안정화 에너지를 가지기 때문에 일반적으로 Cu(I)보다는 높은 킬레이터와의 안정성을 보이며  $^{64}\text{Cu}$  방사성 동위원소의 경우  $^{64}\text{Cu}^{2+}$ 가 대부분 활용된다. 따라서 Cu(II)가 요구하는 착물의 높은 열적 안정성과 속도론적 비활성을 만족하는 킬레이터를 사용해야 한다면 위와 같은 Cu(II)를 안정화시키는 화학적 조건들을 고려하여야 한다.

## 선형 킬레이터(Acyclic chelator)

구리 방사성 동위원소의 표지를 위한 선형 킬레이터는 주로 tetragonally distorted octahedron geometry

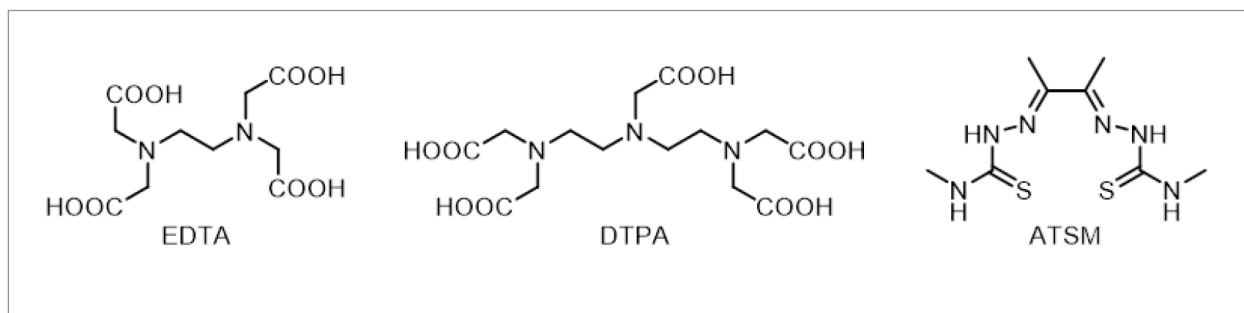


Figure 1. Various acyclic chelators for Cu radioisotopes labeling.

를 가지는 육배위 킬레이터와 distorted square-planar geometry를 가지는 사배위 킬레이터로 구분할 수 있다(Figure 1). 초기 킬레이터는 육배위의 2,2,2,2'-[Ethane-1,2-diyl(dinitrilo)tetraacetic acid (EDTA), 2-[Bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]amino]acetic acid (DTPA)와 같은 acyclic polyamine carboxylate 리간드와 그 유도체들을 사용하였다(8-10). EDTA와 DTPA는 구리에 대한 높은 열적 안정성( $\log K_{\text{Cu-EDTA}} = 18.7$ ,  $\log K_{\text{Cu-DTPA}} = 21.4$ )을 보이며 빠른 착물을 이루었지만 생리적인 조건에서의 안정성이 크게 떨어진다는 보고가 있다(11). 이 연구에서는  $^{67}\text{Cu}$ -(p-NO<sub>2</sub>-(benzyl)-EDTA)와  $^{67}\text{Cu}$ -DTPA-N-butylamide의 혈청 안정성에 대해 3일간 조사한 결과, 초기 도입된 구리 방사성 동위원소에 비해 약 18%와 35%만이 각각 표지를 유지하였다고 보고되었다. 사배위체를 가지는 대표적인 킬레이터로는 schiff base계열과 Bis(thiosemicarbazone) 리간드의 유도체들이 있다. 특히 N',N'''-(2E,3E)-2,3-Butanediylidenebis(N-methylcarbamohydrazoneothioic acid) (ATSM)의 경우가 이러한 킬레이터의 잘 알려진 예로, 체내 종양과 같이 산소가 부족한 세포 내 환경에서  $^{64}\text{Cu}^{2+}$ 가  $^{64}\text{Cu}^+$ 로 환원되어 ATSM으로부터 분리되고, cytosol에 비가역적으로 갇히게 되어 hypoxia 영상을 위해 사용된다(12). 선형 킬레이터는 일반적으로 macrocyclic 킬레이터에 비해 체내 안정성과 산화-환원 저항성이 높지 못하다는 평가가 주를 이룬다.  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM 과 같이 체내 특정 조건에서 구리가 분리되는 목적을 지니지 않는 경우, 구리의 방사성 동위원소가 목적으로 하는 특정 분자에 결합되어 있는 상태의 유지를 선호하는 것이 일반적이기 때문이다.

## 고리형 킬레이터(Cyclic chelator)

구리 방사성 동위원소와 킬레이터 착물의 열역학적 안정성, 속도론적 비활성을 높이기 위하여 다양한 polyaza macrocycle 기반의 킬레이터들이 개발되어왔다(Figure 2). 대부분의 개발된 킬레이터는 구리에 대한 친화성이 좋은 tetraazamacrocyclic 계열을 토대로 pendant carboxylate arms이 있는 구조를 취한다(1). 이러한 킬레이터는 일반적으로 육배위의 distorted octahedron의 geometry를 가진다고 알려져 있다(4). 대표적인 macrocyclic 킬레이터인 cyclen기반의 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)와 cyclam기반의 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid (TETA)는 구리와 착물을 형성할 때에 높은 열적 안정성( $\log K_{\text{Cu-DOTA}} = 22.2$ ,  $\log K_{\text{Cu-}}$

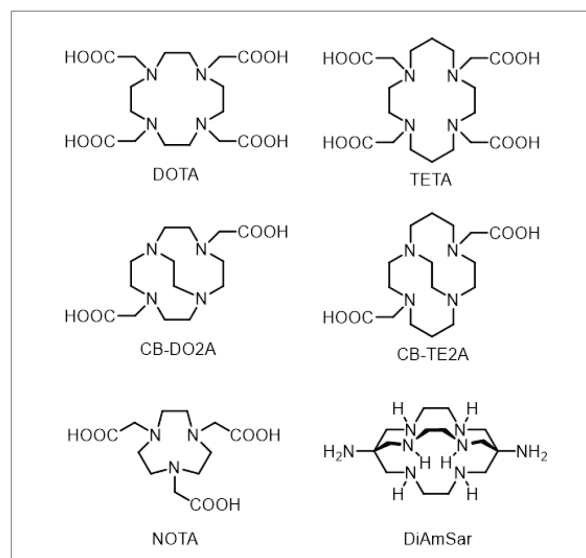


Figure 2. Various cyclic chelators for Cu radioisotopes labeling.

TETA =21.1)을 보인다 보고되었다(4). 한편 Cu<sup>2+</sup>의 경우 더 큰 크기의 cavities를 선호하여 오원자고리를 형성하는 DOTA보다 육원자고리를 형성하는 TETA의 경우가 ring strain 측면에서 더 안정하여 착물의 안정성이 더 크다는 보고가 있다(13-16). <sup>64</sup>Cu-DOTA-Trastuzumab(16), <sup>64</sup>Cu-DOTA-Alendronate(17), <sup>64</sup>Cu-TETA-Octreotide(18) 등 DOTA와 TETA 기반의 킬레이터를 활용한 PET 영상에서 생리적인 조건에서도 안정적인 표지를 유지한다는 보고가 있으나, <sup>64</sup>Cu-TETA-Octreotide의 sprague-dawley rat에 대한 실험에선 간의 superoxide dismutase(SOD)에 의해 20시간동안 약 70% 정도가 transchelation된다는 보고도 있다(19). 킬레이터의 구조적 rigidity의 향상을 통한 착물의 안정성 증가를 위하여 기존의 킬레이터에 대한 cross-bridged 킬레이터들이 여럿 보고되었다. 대표적으로 4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecane (CB-DO2A)와 4,11-bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane (CB-TE2A)가 있다. 이러한 cross-bridged 킬레이터들은 transchelation에 대해 기존의 킬레이터보다 상대적으로 높은 안정성을 보이고 특히 산성 조건에서도 다른 킬레이터에 비해 긴 탈착물화 반감기를 보인다는 보고가 있다. 5 M HCl, 90°C 조건에서 표지의 안정성을 측정한 결과, Cu-TETA의 탈착물화 반감기는 약 5분 정도였으나 Cu-CB-TE2A의 경우 약 154 시간으로 크게 증가되었다(19). 반면에 이러한 cross-bridged 킬레이터의 방사선표지를 위해 반응 온도를 증가시켜야 된다는 문제가 있다. 일부 항체와 단백질에서는 이러한 반응 온도의 증가로 인한 구조적 변화와 불활성을 야기시킬 수 있기 때문에 킬레이터를 사용하기에 있어 큰 부담이 될 수 있다. 이를 해결하기 위하여 cross-bridged cyclam-appended monopicolates(21), pyridyl-cross-bridged cyclam pycup derivatives(22), propylene cross-bridged TE2A(23) 등의 다양한 킬레이터들이 낮은 온도에서도 표지가 가능하다고 보고된 바 있다. 한편 최근의 구리 방사성 동위원소의 표지에 관한 연구에서는 3,6,10,13,16,19-Hexazabicyclo[6.6.6]icosane (sarcophagine, Sar)과 1,4,7-triazacyclononane-

N,N',N''-triacetic acid (NOTA) 계열의 킬레이터가 자주 활용된다. Sar과 NOTA는 낮은 온도에서도 표지가 가능하고 안정적으로 유지된다는 보고가 있다. Sarcophagine 계열의 가장 대표적인 킬레이터로는 DiAmSar이 있다. <sup>64</sup>Cu 표지 실험에선 sarcophagine 계열의 일종인 SarAr 킬레이터가 상온의 다양한 pH 범위에서도 수 분만에 완전한 complexation을 이루고, human plasma 혈청 안정성 실험에선 7일 후에도 98%의 높은 안정성을 유지한다 보고되었다(24). NOTA 또한 유도체의 표지 실험에서 상온에서도 빠른 complexation을 이루고 혈청 안정성 실험 결과 48 시간 이후에도 90% 이상의 안정성을 보인다는 보고가 있다(25). 고리형 킬레이터에 속하는 다양한 킬레이터들이 현재에도 많은 연구가 진행되고 있다. pH 안정성, 산화환원 안전성, transmetalation 안정성 등을 비롯하여 많은 외부적 조건에 대한 저항성과 표지 조건 등 다양한 요인들에 대해 고려되어야 한다.

## Conclusion

구리 방사성 동위원소가 가지는 다양한 이점과 킬레이터에 대한 높은 친화도는 핵의학 분야에서 활용되기에 충분히 큰 매력을 가진다. 하지만 구리와 킬레이터가 체내 다양한 금속 이온 혹은 결합성 단백질들과 경쟁하면서 생리적 조건에서의 안정성을 유지한다는 것에 매우 큰 어려움이 있다. 킬레이터의 구조적 변화를 통하여 이러한 안정성을 확보하는 것이 현재까지의 킬레이터 개발의 주된 관심사였다. 본문에서는 이러한 조건을 만족시킬 수 있는 다양한 선형 킬레이터와 고리형 킬레이터에 대하여 소개하였다. 더불어 pH안정성, 산화환원 안전성, 표지 조건 그리고 킬레이터에 의한 분자의 이화학적 변화 등 킬레이터를 사용함에 있어 여러 주안점에 대해서도 소개하였다. 일반적으로 구리 방사성 동위원소를 표지함에 있어서 생체 분자의 표지를 위하여 낮은 온도에서 빠르게 착물을 형성하며 다른 금속이온과 경쟁에서 선택성이 높고 다양한 pH 범주와 환원적 조건에서 안정한 것이 이상적이다. 따라서 이러한 조건

에 충족되는 킬레이터를 개발하는 것이 앞으로의 주된 과제라고 할 수 있다. 물론 킬레이터들이 이를 모두 만족 하기는 어려울 수 있다. 따라서 현재까지 개발된 킬레이터 중 무엇이 가장 우수하고 이상적인지에 관해서는 물음 자체에 오류가 있다. 구리 방사성 동위원소를 이용하여 궁극적으로 무엇을 목적으로 하는 것인가와 어떤 조건들이 요구되는 지에 따라 사용할 수 있는 킬레이터가 천차만별이기 때문이다. 현재에도 종래의 문제점을 해결하기 위한 다양한 킬레이터들이 끊임없이 개발되고 있다. 구리 방사성 동위원소의 표지에 있어서도 왕도란 없는 것이다.

## Acknowledgments

This work was supported by the Basic Science Research Program (grant code: NRF-2017R1A2A2A10001451) and by the MOTIE(Ministry of Trade, Industry & Energy (project number: 10080450) and KSRC (Korea Semiconductor Research Consortium) support program for the development of the future semiconductor device.

## References

1. Anderson CJ, Ferdani R. Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:379-393.
2. Zhou Y, Li J, Xu X, Zhao M, Zhang B, Deng S, Wu Y. <sup>64</sup>Cu-based radiopharmaceuticals in molecular imaging. *Technol Cancer Res Treat* 2019;18:1-10.
3. Boros E, Packard AB. Radioactive transition metals for imaging and therapy. *Chem Rev* 2018;119:870-901.
4. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating radiometals of copper, gallium, Indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev* 2010;110:2858-2902.
5. McCarthy DW, Shefer RE, Klinkowstein RE, Bass LA, Margeneau WH, Cutler CS, Anderson CJ, Welch MJ. Efficient production of high specific activity <sup>64</sup>Cu using a biomedical cyclotron. *Nucl Med Bio* 1997;24:35-43.
6. Gutfilen B, Souza S, Valentini G. Copper-64: a real theranostic agent. *Drug Des. Dev. Ther* 2018; 12:3235-3245.
7. Wadas T, Wong E, Weisman G, Anderson C. Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des* 2007;13:3-16.
8. Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL, Lanteigne D, Davis MA, Griffin TW, Doherty PW. Radioactive labeling of antibody: a simple and efficient method. *Science* 1983;220:613-615.
9. Parker D. Tumour targeting with radiolabelled macrocycle-antibody conjugates. *Chem Soc Rev* 1990;19:271-291.
10. Kukis DL, Li M, Meares CF. Selectivity of antibody-chelate conjugates for binding copper in the presence of competing metals. *Inorg Chem* 1993;32:3981-3982.
11. Moi MK, Meares CF, McCall MJ, Cole WC, DeNardo SJ. Copper chelates as probes of biological systems: stable copper complexes with a macrocyclic bifunctional chelating agent. *Anal Biochem* 1985;148:249-253.
12. Vāvere AL, Lewis JS. Cu-ATSM: a radiopharmaceutical for the PET imaging of hypoxia. *Dalton Trans* 2007;43:4893-4902.
13. Hancock RD, Martell AE. Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution. *Chem Rev* 1989;89:1875-1914.
14. Anderson CJ, Connett JM, Schwarz SW, Rocque PA, Guo LW, Philpott GW, Zinn KR, Meares CF, Welch MJ. Copper-64-labeled antibodies for PET imaging. *J Nucl Med* 1992; 33:1685-1691.
15. Kukis DL, Li M, Meares CF. Selectivity of antibody-chelate conjugates for binding copper in the presence of competing metals. *Inorg Chem* 1993;32:3981-3982.
16. Tamura K, Kurihara H, Yonemori K, Tsuda H, Suzuki J,

- Kono Y, Honda N, Kodaira M, Yamamoto H, Yunokawa M, Shimizu C, Hasegawa K, Kanayama Y, Nozaki S, Kinoshita T, Wada Y, Tazawa S, Takahashi K, Watanabe Y, Fujiwara Y.  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *J Nucl Med* 2013;54:1869-1875.
17. Ahrens BJ, Li L, Ciminera AK, Chea J, Poku E, Bading JR, Weist MR, Miller MM, Colcher DM, Shively JE. Diagnostic PET imaging of mammary microcalcifications using  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-alendronate in a rat model of breast cancer. *J Nucl Med* 2017;58:1373-1379.
18. Anderson CJ, Dehdashti F, Cutler PD, Schwarz SW, Laforest R, Bass LA, Lewis JS, McCarthy DW.  $^{64}\text{Cu}$ -TETA-octreotide as a PET imaging agent for patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2001; 42: 213-221.
19. Bass LA, Wang M, Welch MJ, Anderson CJ. In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver. *Bioconjug Chem* 2000;11:527-532.
20. Woodin KS, Heroux KJ, Boswell CA, Wong EH, Weisman GR, Niu W, Tomellini SA, Anderson CJ, Zakharov LN, Rheingold AL. Kinetic inertness and electrochemical behavior of copper(II) tetraazamacrocyclic complexes: possible implications for in vivo stability. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005;2005:4829-4833.
21. Lima LMP, Esteban-Gómez D, Delgado R, Platas-Iglesias C, Tripier R. Monopicolinate cyclen and cyclam derivatives for stable copper(II) complexation. *Inorg Chem* 2012;51:6916-6927.
22. Boros E, Rybak-Akimova E, Holland JP, Rietz T, Rotile N, Blasi F, Day H, Latifi R, Caravan P. Pycup—A bifunctional, cage-like ligand for  $^{64}\text{Cu}$  radiolabeling. *Mol Pharm* 2013;11:617-629.
23. Bhatt N, Soni N, Ha YS, Lee W, Pandya DN, Sarkar S, Kim JY, Lee H, Kim SH, An GI, Yoo J. Phosphonate pendant armed propylene cross-bridged cyclam: synthesis and evaluation as a chelator for Cu-64. *ACS Med. Chem. Lett.* 2015;6:1162-1166.
24. Di Bartolo NM, Sargeson AM, Donlevy TM, Smith SV. Synthesis of a new cage ligand, SarAr, and its complexation with selected transition metal ions for potential use in radioimaging. *Dalton Trans* 2001;15:2303-2309.
25. De Silva RA, Jain S, Lears KA, Chong HS, Kang CS, Sun X, Roger BE. Copper-64 radiolabeling and biological evaluation of bifunctional chelators for radiopharmaceutical development. *Nucl. Med. Biol* 2012;39:1099-1104.