

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Vorgelegt von
Dipl.-Chem. Anika Sander
aus Stutensee

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 02. 2015

Entwicklung und Untersuchung U-230
markierter Antikörper

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Fanghänel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Petra Panak

Das Auge glaubt sich selbst, das Ohr anderen...

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
1. Einleitung	7
1.1. Prinzip der Radionuklidtherapie	7
1.2. Die gezielte Alpha-Therapie (TAT)	8
1.2.1. Vergleich kurzlebiger und langlebiger Alphastrahler am Beispiel ^{213}Bi und ^{225}Ac	10
1.2.2. Effektivität von ^{213}Bi -DOTATOC	11
2. Zielsetzung	13
3. Kenntnisstand der Literatur	15
3.1. Arten ionisierender Strahlung	15
3.2. Chemie des Urans	18
3.2.1. Speziation von Uran im Blutserum	19
3.2.2. Eigenschaften von ^{230}U	23
3.2.3. Herstellung von ^{230}U	24
3.3. Eigenschaften von ^{225}Ac	26
3.4. Der Chelatligand DCP	27
3.4.1. Komplexierung von U(VI) mit DCP	27
3.4.2. Das Derivat DCP-NCS	28
3.4.3. Das Derivat BCPDA	29
3.5. Der Chelatligand DOTA	31
3.5.1. Das Derivat DOTA-NCS	32
3.6. Monoklonale Antikörper	32
4. Materialien	35
4.1. Radionuklide	35
4.1.1. Das Radionuklid ^{230}U	35
4.1.2. Das Radionuklid ^{237}U	36
4.1.3. Das Radionuklid ^{225}Ac	40
4.2. Chelatoren	42
4.3. Der Antikörper MabThera®	43
4.4. Die Zelllinie K422	44

5. Methoden	45
5.1. UV-Spektroskopie	45
5.2. Extraktionschromatographie	45
5.2.1. TEVA	45
5.2.2. UTEVA	47
5.3. Dünnschichtchromatographie (ITLC)	48
5.4. Autoradiographie	49
5.5. AG MP-50	49
5.6. PhreeqC	51
5.7. Scatchard Analyse	51
6. Experimente	53
6.1. Chelatierung der Antikörper	53
6.2. Charakterisierung verschiedener U(VI)-DCP Derivate	54
6.2.1. Charakterisierung der Komplexe	54
6.2.2. Herstellung der Komplexe	55
6.3. Säurekonstanten von BCPDA	57
6.4. Stabilitätskonstante $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$	58
6.5. UV-Spektroskopie	58
6.6. Stabilitätsuntersuchungen	59
6.7. Zellbindungsexperimente	59
6.7.1. Isolierung von ^{225}Ac aus ^{225}Ra	59
6.7.2. Herstellung des Konjugats DOTA-MabThera®	59
6.7.3. Radiomarkierung des Konjugats DOTA-MabThera® mit ^{225}Ac	60
6.7.4. Untersuchung der Bindungsaffinität	60
7. Ergebnisse und Diskussion	61
7.1. Herstellung ^{230}U	61
7.2. Isolierung von ^{237}U	63
7.3. Uranylkomplexe von DCP-Derivaten	65
7.3.1. Liganden	65
7.3.2. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Uranyl-DCP Komplexe	67
7.3.3. Synthese und Charakterisierung der Komplexe	68
7.3.4. Vergleich der strukturellen Eigenschaften	81
7.4. Protonierungskonstanten BCPDA	82
7.5. Stabilitätskonstante $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$	84
7.5.1. Kinetik bei der Bildung des $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ Komplexes	86
7.6. $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ und dessen ternäre Hydroxo- und Carbonatkomplexe	87
7.6.1. $\text{UO}_2\text{-BCPDA-OH}^-$	87
7.6.2. $\text{UO}_2\text{-BCPDA-CO}_3^{2-}$	89
7.7. Chelatierung des Antikörpers MabThera®	92
7.7.1. Chelatierung vom Antikörper MabThera® mit DCP-NCS	92
7.7.2. Chelatierung vom Antikörper MabThera® mit BCPDA	93

7.8. Radiomarkierung der chelatierten Antikörper MabThera®	95
7.9. Stabilität UO_2 -BCPDA im Blutserum	96
7.10. Stabilität UO_2 -DCP-MabThera®/ UO_2 -BCPDA-MabThera®	99
7.10.1. UO_2 -BCPDA-MabThera® in HEPES mit physiologischer Car- bonatkonzentration	100
7.10.2. UO_2 -BCPDA-MabThera® in HEPES mit physiologischer HSA Konzentration	101
7.10.3. UO_2 -BCPDA-MabThera® in HEPES mit physiologischer Phos- phatkonzentration	103
7.10.4. UO_2 -BCPDA-MabThera® bzw. UO_2 -DCP-MabThera® Blut- serum	104
7.11. Serumstabilität Ac-DOTA-MabThera®	107
7.12. Bindungsstudie Ac-DOTA-MabThera®	108
8. Zusammenfassung und Ausblick	111
8.1. Zusammenfassung	111
8.1.1. Thermodynamische Untersuchungen von BCPDA bzw. UO_2 - BCPDA	112
8.1.2. Charakterisierung von Uranyl-Komplexen mit DCP-Derivate .	112
8.1.3. Biochemische Untersuchungen	114
8.1.4. Stabilitätsuntersuchung	114
8.1.5. Zellbindungsexperimente von Ac-DOTA-MabThera® an K422 Zellen	115
8.2. Schlussfolgerung und Ausblick	115
Acknowledgments	117
A. Anhang	119
A.1. Stabilitätskonstanten	119
A.2. Protonierungskonstanten	120
A.3. Erklärung wichtiger Begriffe	120
A.4. Ionenstärkekorrektur	120
A.5. Rohdaten	123
A.5.1. Charakterisierung verschiedener U(VI)-DCP-Derivate	123
A.5.2. Protonierungskonstanten	137
A.5.3. Stabilitätskonstante	138
A.5.4. Stabilitätsstudien	139
Literaturverzeichnis	147

Zusammenfassung

Die vielversprechenden Ergebnisse von Alphastrahlern in der gezielten Alphatherapie (TAT) zur Behandlung von Krebs bereiten ein enormes Interesse für Fortschritte in der Forschung der Radionuklid-Produktion und in der Herstellung und Untersuchung von Radioimmunokonjugaten. Zum einen soll der hohe Bedarf therapiegeeigneter Radionuklide gedeckt sein, zum anderen ist es unabdingbar die Eigenschaften der Radioimmunokonjugate zu kennen, um ihr Verhalten *in vivo* einschätzen zu können.

Ziel der vorgelegten Doktorarbeit war die Untersuchung von 2,9-Dicarboxy-1,10-phenanthrolin (DCP) bzw. seiner Derivate 4,7-Bisphenyl-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthrolin (DPDCP) und 4,7-Bis(chlorosulfophenyl)-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthrolin (BCPDA) hinsichtlich ihrer Komplexbildungseigenschaften mit dem Uranyl-Kation.²³⁰U ist aufgrund seiner optimalen Zerfallseigenschaften im Blickpunkt des Interesses. Mit einer Halbwertszeit von 20.2 Tagen zerfällt es in einer Kaskade und generiert dabei fünf Alpha-Teilchen, die mit einer kumulativen Energie von 34.2 MeV eine hohe zytotoxische Wirkung verursachen können. Der Komplex UO₂-DCP bzw. UO₂-BCPDA sollte bezüglich seiner Eignung für den Einsatz in der TAT untersucht werden. Blickpunkt waren zunächst die thermodynamischen Eigenschaften des Komplexes, sowie seine analytische Charakterisierung und anschließend die Entwicklung eines effizienten und reproduzierbaren Protokolls für die Kopplung des monoklonalen Antikörpers MabThera® mit dem Liganden DCP, bzw. seiner Derivate BCPDA und 5-Isothiocyanato-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthrolin (DCP-NCS) mit anschließender Evaluierung der Uran markierten Konjugate *in vitro*. Dabei wurde vor allem die zeitabhängige Stabilität unter dem Einfluss verschiedener potenzieller konkurrierender Liganden und im Blutserum untersucht. Außerdem wurde die Bindungsaffinität des schon etablierteren Komplexsystems ²²⁵Ac-DOTA-MabThera® an Zellen untersucht.

Zunächst wurden die Protonierungskonstanten des Liganden BCPDA mittels der pH-abhängigen Änderung der Absorption mit der UV-Spektroskopie bestimmt. Die ermittelten pK_s-Werte von 4.71 und 2.68 in 0.1 M NaClO₄ stimmen mit den literaturbekannten Werten des unsubstituierten Liganden DCP überein, welche von Dean et al. untersucht worden waren.[1] Dieses Ergebnis zeigt, dass die Derivatisierung des DCP mit Chlorosulfophenylgruppen keinen Einfluss auf die komplexierenden Eigenschaften der Carboxylgruppen ausübt. Um eine quantitative Aussage über die Stabilität des Liganden mit dem Uranyl-Kation machen zu können, ist die Kenntnis der Stabilitätskonstante eine wichtige Voraussetzung. Diese wurde durch Verwendung der beiden Urantracer ²³⁰U und ²³⁷U und den unterschiedlichen ana-

lytischen Methoden Instant Thin Layer Chromatography (ITLC) und dem Kationenaustauscherharz AG MP-50 auf $\log K 7.4 \pm 0.2$ in 0.1 M NaClO₄ bestimmt. Eine Ionenstärkekorrektur mit der Davies-Gleichung ergab $\log K 8.2 \pm 0.2$ bei der Ionenstärke 0. Um die thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften des Komplexes beurteilen zu können, wurde der Komplex unter dem Einfluss verschiedener potenzieller konkurrierender Liganden untersucht. Hierfür wurde die Bildung der ternären Komplexe UO₂-BCPDA-OH⁻ und UO₂-BCPDA-CO₃²⁻ in Abhängigkeit vom pH Wert mit UV-Spektroskopie untersucht. Für die Bildung des ternären Komplexes UO₂-BCPDA-OH⁻ konnte in Abhängigkeit vom pH-Wert eine Änderung der Absorption beobachtet werden. Durch Auswertung mit Hilfe einer Steigungsanalyse wurde mit steigendem pH Wert die Anlagerung einer Hydroxogruppe an den binären UO₂-BCPDA Komplex beobachtet. Es konnte unter Vorbehalt eine Bruttokomplexbildungskonstante von $\log \beta = 13.2 \pm 0.2$ in 0.1 M NaClO₄ geschätzt werden. Die Bildung des ternären Carbonatkomplexes wurde mit einem erhöhten Partialdruck von CO₂ und der damit verbundenen Gleichgewichtskonzentration in Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Hier kam es zunächst zur Bildung des ternären Komplexes. Bei höheren pH-Werten wurde die Dissoziation des UO₂-BCPDA Komplexes zugunsten der Bildung des UO₂(CO₃)⁴⁻-Komplexes beobachtet.

Zum besseren Verständnis der Komplexierungseigenschaften von UO₂-DCP und UO₂-DPDCP wurden unterschiedliche Addukte synthetisiert und mit Kristallstrukturanalyse, NMR, IR- und UV-Spektroskopie charakterisiert. Zunächst ist es gelungen das Polymer [UO₂-DCP]_n mit Hilfe einer einfachen Extraktion zu synthetisieren. Auf analoge Weise wurde mit dem Liganden DPDCP das Tetramer [UO₂-DPDCP]₄ hergestellt. Die Herstellung und Charakterisierung dieser und weiterer ternärer Kristalle gab ein tieferes Verständnis für das Verhalten des Komplexes unter dem Einfluss verschiedener Liganden, auch in Lösung, und dessen bemerkenswerte kinetische Stabilität. Die Komplexe UO₂-DCP, UO₂-DPDCP, UO₂-BCPDA und die entsprechenden Konjugate UO₂-DCP-MabThera® und UO₂-BCPDA-MabThera® wurden *in vitro* untersucht. UO₂-DCP und UO₂-DPDCP zeigen im Blutserum keine Dissoziation. Eine suggerierte Dissoziation von UO₂-BCPDA, UO₂-DCP-MabThera® und UO₂-BCPDA-MabThera® kann mit Schwierigkeiten der analytischen Methode und der dichten Matrix des Blutserums erklärt werden.

Das durchgeführte Zellbindungsexperiment von ²²⁵Ac-DOTA-MabThera® an den Lymphomzellen K422 zeigte eine Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich an die Zellen. Dieses Radioimmunokonjugat mit dem Antikörper MabThera®, welcher auch für das neue System UO₂-DCP untersucht wird, hat somit eine starke Affinität zu den Zellen.

Die Untersuchungen und durchgeführten Experimente zeigen, dass das untersuchte System UO₂-DCP durchaus Potenzial für den Einsatz in der TAT besitzt, da der Komplex sich durch eine bemerkenswerte kinetische Stabilität auszeichnet. Es sollten jedoch noch weitere Experimente durchgeführt werden, um die Stabilität der Radioimmunokonjugate im Blutserum zu untermauern. Letztendlich muss auch die Immunoreaktivität der hergestellten Radioimmunokonjugate, die Affinität an

Zellen, sowie die Zytotoxizität von $^{230}\text{UO}_2$ -DCP-MabThera® bzw. $^{230}\text{UO}_2$ -BCPDA-MabThera® untersucht werden.

Abstract

The promising results of alpha emitters in Targeted Alpha Therapy (TAT) caused a rising interest in production of radionuclides and synthesis of radioimmunoconjugates to cover the high demand of medical applicable radionuclides. In addition it is important to understand the complexing properties of the conjugate. This enables the evaluation of the characteristics *in vivo*.

Aim of this present work was the investigation of 1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (DCP) and two of its derivatives 4,7-bisphenyl-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (DPDCP) and 4,7-bis(chlorosulfofenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (BCPDA) with respect to their complexing properties with ^{230}U . Main focus was the investigation whether the UO_2 -DCP complex is applicable in TAT. Relating to this aspect the investigation of the thermodynamical properties of the complex, the analytical characterization and the evaluation of an efficient and reproducible labelling protocol of the monoclonal antibody MabThera® with the two derivatives BCPDA and 5-isothiocyanato-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthroline (DCP-NCS) and their evaluation *in vitro* prioritized the work. To investigate the stability the complex was exposed with potential competing ligands and in blood serum. In addition a binding study with the already better established system ^{225}Ac -DOTA-MabThera® was made to assess the binding affinity of the radioconjugate on cells.

First step was the determination of the protonation constants of the ligand BCPDA by investigating the change of the absorption spectra in dependency of the pH. The pK_a values found with 4.71 and 2.68 in 0.1 M NaClO_4 are equal to the already literature known values of DCP, found by Dean et al.[1] This indicates that the derivatization of DCP with chloro sulfonicphenyl groups has no influence on the complexing properties of the ligand. Furthermore the knowledge of the stability constant is essential to get information of its thermodynamical behaviour. The two radionuclides ^{230}U and ^{237}U were used to make tracer experiments with Instant Thin Layer Chromatography (ITLC) and the cation exchanger AG MP-50 and a stability constant of $\log K 7.4 \pm 0.2$ in 0.1 M NaClO_4 was found. A correction with the Davies equation to the ionic strength zero resulted in $\log K 8.2 \pm 0.2$. To understand the thermodynamic and kinetic properties of the complex the influence of different competing ligands was investigated by following the pH dependent formation of the ternary complexes UO_2 -BCPDA- OH^- and UO_2 -BCPDA- CO_3^{2-} . The pH titration of UO_2 -BCPDA performed under exclusion of Carbonate showed with the formation of the ternary hydroxo complex a small change in its absorption. The formation of UO_2 -BCPDA- CO_3^{2-} was assessed with an increased partial pressure of CO_2 and its

concentration in solution at equilibrium. With increasing pH the formation of the ternary specie was observed. At higher pH the dissociation of $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ indicated the formation of $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$.

For a deeper understanding of the complexing properties of $\text{UO}_2\text{-DCP}$ and $\text{UO}_2\text{-DPDCP}$ different adducts were synthesized and characterized with crystal analyses, NMR, IR- and UV-spectroscopy. The polymer $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ was successfully synthesized. In analog manner the tetramer $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$ was produced. Production and characterization of these and further adducts led to a better understanding of the impact of competing ligands, even in solution and the experiments gave evidence of the high kinetic stability. The behaviour and stability of $\text{UO}_2\text{-DCP}$, $\text{UO}_2\text{-DPDCP}$, $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ and the radioimmunoconjugates $\text{UO}_2\text{-DCP-MabThera}^\circledast$ and $\text{UO}_2\text{-BCPDA-MabThera}^\circledast$ was assessed *in vitro*. $\text{UO}_2\text{-DCP}$ and $\text{UO}_2\text{-DPDCP}$ showed no dissociation in bloodserum. An expected dissociation of $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$, $\text{UO}_2\text{-DCP-MabThera}^\circledast$ and $\text{UO}_2\text{-BCPDA-MabThera}^\circledast$ may be explained with difficulties of the analytical method ITLC with the dense matrix of blood serum. A cell binding experiment of $^{225}\text{Ac-DOTA-MabThera}^\circledast$ showed a high affinity of the cells in the nanomolar range.

The experiments show, that the investigated system $\text{UO}_2\text{-DCP}$ and accordingly $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ have potential for application in TAT, as the complex has a remarkable kinetic stability. Further experiments need to be done to confirm the stability in blood serum. Finally the immunoreactivity of the prepared radioimmunoconjugates, the binding affinity as well as the cytotoxicity of $^{230}\text{UO}_2\text{-DCP-MabThera}^\circledast$ as well as of $^{230}\text{UO}_2\text{-BCPDA-MabThera}^\circledast$ have to be investigated.

1. Einleitung

1.1. Prinzip der Radionuklidtherapie

Bei der Behandlung von Krebs rückt die zielgerichtete Radionuklidtherapie immer weiter in den Blickpunkt des Interesses. Sie ist vor allem dann von Bedeutung, wenn es sich um Tumore handelt, die nicht mehr durch Operationen, Strahlen- oder Chemotherapie behandelt werden können. Dies ist bei inoperablen Tumoren, bei Metastasen, bei Einzelzellerkrankungen wie Leukämie oder Lymphknotenkrebs der Fall und bei Tumoren, welche Resistenzen bei der Behandlung mit Chemotherapeutika zeigten.

Bei der RIT soll ein Radionuklid, spezifisch lokalisiert werden, um die Krebszellen zu zerstören, indem es eine zytotoxische Strahlendosis an krebsbefallenes Gewebe abgibt und gesundes Gewebe dabei verschont. Radionuklide selbst besitzen in der Regel keine Eigenschaften, die zu einer tumorspezifischen Bindung führen. Deshalb sind Trägermoleküle wie Peptide oder monoklonale Antikörper gefordert, die diese Eigenschaften besitzen. In Abbildung 1.1 ist das allgemeine Prinzip der zielgerichteten Alpha-therapie mit dem Alphastrahler ^{213}Bi dargestellt.

Als Radionuklide eignen sich Auger-Elektronen-, Beta-Teilchen oder Alpha-Teilchen-Emitter.

Auger-Elektronen haben eine sehr kurze Reichweite und sind hochtoxisch, wenn sie in der Zelle, besonders in der Nähe des Zellkern gebildet werden.[3] Damit ein Auger-Elektronen-Emitter zytotoxisch wirkt, muss das Trägermolekül diesen in den Zellkern einschleusen. Besser geeignet für die RIT sind Betastrahler, welche Elektronen mit einer Energie von 0.3-2.3 MeV und einer Reichweite von 0.5-12 mm in Gewebe emittieren. Auf diese Weise ist die zelluläre Internalisierung nicht notwendig und es reicht aus, die Zellmembran zu erreichen. Die lange Reichweite gemessen am Zelldurchmesser erlaubt es Beta-Teilchen mehrere (10-1000) Zellen zu durchqueren ("Crossfire Effect"). Monoklonale Antikörper, die mit Beta-Strahlern radiomarkiert sind, haben in der Behandlung von einigen Krebsarten vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Krebserkrankungen wie Leukämie, Mikrometastasen oder gestreute Tumore können allerdings mit Beta-Strahlern nicht geheilt werden, denn um eine einzige Zelle mit einer Wahrscheinlichkeit von 99.99% zu erreichen wären tausende von Beta-Zerfällen benötigt und aufgrund der großen Reichweite würde eine hohe Dosis auf das umliegende Gewebe abgegeben werden. Mit Alpha-Strahlern sind aufgrund der kurzen Reichweite solche Krankheiten behandelbar.[4] Ein Vergleich der

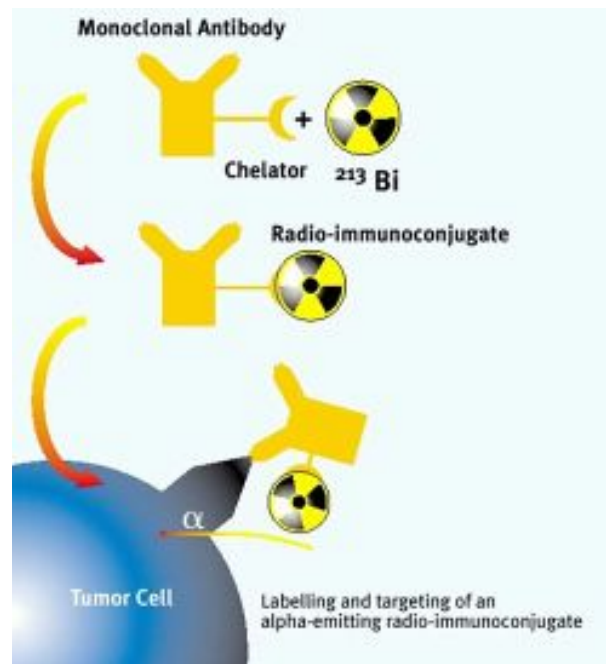


Abbildung 1.1.: Prinzip der RIT [2]

unterschiedlichen Reichweiten von Alpha- und Beta-Strahlern ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

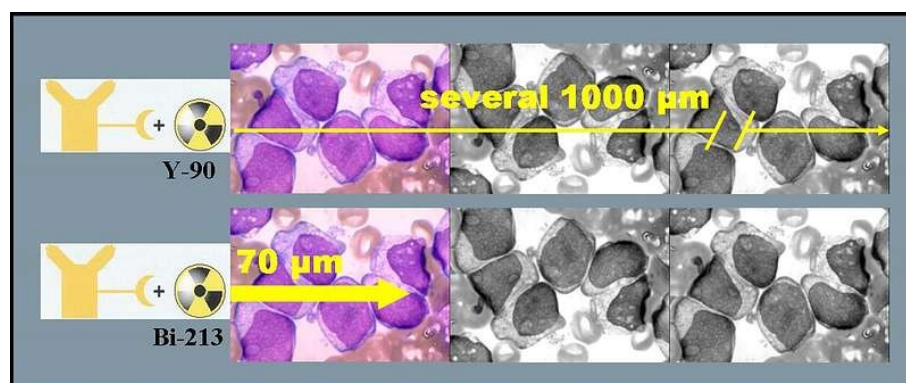


Abbildung 1.2.: Vergleich der Reichweiten: krankes Gewebe (lila), gesundes Gewebe (grau); ^{213}Bi mit $E_{\alpha}=5.98$ MeV und ^{90}Y mit $E_{\beta\text{max}}=2.28$ MeV [2]

1.2. Die gezielte Alpha-Therapie (TAT)

Das Prinzip TAT ("Targeted Alpha Therapy") basiert auf einer stabilen Bindung eines Alpha-Strahlers über einen bifunktionellen Chelatliganden zu einem Trägermolekül, wie einem Antikörper oder Peptid, welches selektiv an Tumore bindet. Es

gibt auch Ausnahmen, wie z.B. das ^{223}Ra , das in Form von $^{223}\text{RaCl}_2$ als Therapeutikum eingesetzt wird, um Knochenmetastasen von Brust- oder Prostatakrebs zu behandeln. Dies ist möglich, da Radium eine Ähnlichkeit zum Calcium aufweist und sich deshalb bevorzugt an Knochen anreichert.

Durch Anwendung von monoklonalen Antikörpern ist es möglich, die Radionuklide über einen bifunktionellen Chelatliganden an oder in die Tumorzelle zu transportieren. Antikörper sind mikroskopische "Y"-förmige Proteine, die vom Immunsystem als Antwort auf fremde Substanzen gebildet werden und in der Lage sind, Substanzen, wie z.B. Viren, die gesundes Gewebe bedrohen, zu binden und unschädlich zu machen. Substanzen, die eine solche Immunantwort hervorrufen, werden Antigene genannt. Zum Einsatz in der TAT werden Antikörper durch die Addition von Chelatmolekülen modifiziert, um eine starke Anbindung des Radionuklids an den Antikörper zu ermöglichen.

Aufgrund der kurzen Reichweite von $<100\ \mu\text{m}$ und einem hohen linearen Energietransfer (LET) der Alpha-Strahlung von $\sim 100\ \text{keV}/\mu\text{m}$ im menschlichen Gewebe kann selektiv eine hohe zytotoxische Strahlendosis auf bestimmte Zellen einwirken und dabei das umliegende Gewebe schonen. Der "Crossfire Effekt" ist bei Alpha-Strahlern begrenzt. Diese physikalischen Eigenschaften scheinen insgesamt sehr geeignet dafür, auf isolierte Zellen von hämatologischen Malignomen wie Leukämie zu zielen oder zur Behandlung von gestreuten Tumoren, wenn die Tumolvolumina eine Größe haben, die der Reichweite von Alpha-Strahlen entsprechen. Dieses hohe radiotoxische Potential von Alpha-Teilchen bietet für die RIT neue Möglichkeiten, um auf Antigene zu zielen, die bisher für Beta-Strahler nicht zugänglich waren. Für eine sichere Anwendung der TAT ist es notwendig, dass der bifunktionelle Chelatligand das Radionuklid in einer stabilen Weise bindet, damit das freie Radionuklid im Körper nicht toxisch auf Organe wirkt. Da manche Radionuklide komplexe Zerfallsschemata haben, in denen auch die Tochternuklide Alpha-Strahlen emittieren, muss auch deren Toxizität überprüft werden. Die physikalischen Eigenschaften legen das therapeutische Feld der Anwendung fest, denn im Gegensatz zur äußeren Bestrahlung, bei der es eine Grundvoraussetzung ist, die zu bestrahlenden Bereiche genau zu definieren, macht es die TAT möglich, auf gestreute Tumore zu zielen, die nicht durch genaue Visualisierung lokalisiert werden können.

Es gibt eine Vielzahl an Alpha-Strahlern, aber nur wenige können in der Medizin angewendet werden. Dabei sind folgende Kriterien zu beachten:

- Verfügbarkeit: Die geeigneten Alpha-Strahler können durch Bestrahlung von Targets im Kernreaktor oder Zyklotron gewonnen werden. Oder sie können von einem langlebigen Mutternuklid in regelmäßigen Zeitabständen isoliert werden.
- Tochternuklide: Durch das Auftreten von Tochternukliden muss die Stabilität des Komplexes mit den entsprechenden Tochternukliden und deren Toxizität geklärt werden, da sich die chemischen Eigenschaften der Tochternuklide von denen des Mutternuklids unterscheiden und es so im Körper zu unterschied-

lichem Verhalten kommen kann. Es muss ebenfalls berücksichtigt werden, ob die Tochternuklide hoch- oder niederenergetische Gamma-Quanten emittieren. Hochenergetische Gamma-Strahlen sollen aufgrund ihrer weitreichenden Toxizität auf Gewebe vermieden werden. Niederenergetische Gamma-Strahlen sind jedoch zur Diagnose und Bildgebung sehr günstig, da diese detektiert werden können.

- Synthese des Radioimmunokonjugats: Isolierung, Aufreinigung des Radionuklids und die Bindung an den Antikörper muss schnell erfolgen um eine möglichst hohe spezifische Aktivität und trotzdem angemessene Reinheit und radiochemische Syntheseausbeute zu erhalten.

In der Tabelle sind die Alpha-Strahler, mit denen bereits klinische Erfahrungen bestehen, zusammengefasst.

Radionuklid	Krebsart
^{211}At	Glioblastom multiforme Ovarialkarzinom
^{213}Bi	myeloische Leukämie Glioblastome Non-Hodgkins-Lymphom Melanome Neuroendokrine Tumore Blasenkarzinome
^{223}Ra	Brust- und Prostatakrebs mit Knochenmetastasen
^{225}Ac	myeloische Leukämie Neuroendokrine Tumore Glioblastome

1.2.1. Vergleich kurzlebiger und langlebiger Alphastrahler am Beispiel ^{213}Bi und ^{225}Ac

^{225}Ac weist im Vergleich zu seinem Tochternuklid ^{213}Bi eine sehr viel höhere Zytotoxizität auf. Beim Zerfall von ^{225}Ac werden vier Alphateilchen und zwei Betateilchen mit einer kumulativen Energie von 27.7 MeV emittiert. Beim Zerfall von ^{213}Bi kommt es lediglich zu einer Freisetzung von einem Alphateilchen mit einer Energie von 8.4 MeV. Aufgrund der Anzahl der freigesetzten Alphateilchen und der längeren Halbwertszeit des ^{225}Ac werden bei gleicher Aktivität beim ^{225}Ac ca. 1200 mehr Alphateilchen freigesetzt als beim ^{213}Bi . Zusätzlich ermöglicht die lange Halbwertszeit von ^{225}Ac eine einfachere logistische Handhabung für die klinische Anwendung für die Produktion des Medikaments und dessen Verabreichung. Zusätzlich ermöglicht die längere Halbwertszeit des ^{225}Ac auch eine Behandlung von Krebsarten, die nicht schnell und leicht zugänglich sind.[4] Es wurde gezeigt, dass beim Zerfall von 1 μCi ^{225}Ac eine solche Energie frei wird, die ausreicht um den Zelltod von 99.99% bei

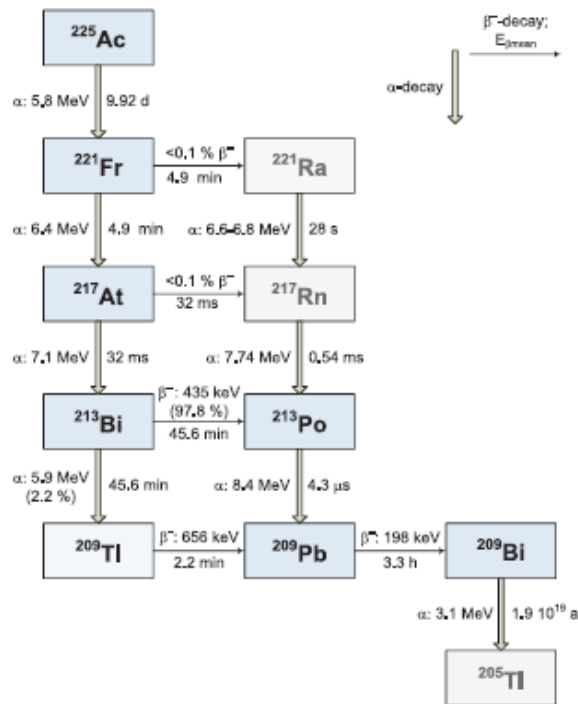


Abbildung 1.3.: Zerfallskette von ^{225}Ac mit Angabe der Zerfallsart, Zerfallsenergie und Halbwertszeit [5]

vier Gramm Tumorzellen hervorzurufen.[6] Um die unspezifische Distribution des ^{225}Ac im Körper jedoch zu limitieren muss ein geeigneter bifunktioneller Ligand das Actinium sehr stabil an das Trägermolekül binden. Die zwei Tochternuklide ^{221}Fr ($T_{\frac{1}{2}} = 4.8$ min) und ^{217}At ($T_{\frac{1}{2}} = 3.2$ ms) könnten kurzlebig genug sein, sodass ihre Dislokation weg von der adressierten Tumorzelle begrenzt ist. Die Halbwertszeit des ^{213}Bi ist mit 46 min jedoch lang genug, dass eine Anreicherung in den Nieren nicht auszuschließen wäre.

Es hat sich gezeigt, dass mit DOTA-NCS ein geeigneter bifunktioneller Chelatligand gefunden wurde, das Actinium in stabiler Weise zu komplexieren und gleichzeitig an einen Antikörper zu binden. [7]

1.2.2. Effektivität von ^{213}Bi -DOTATOC

Das Bild des Jahres 2012 der Amerikanischen Gesellschaft für Nukleare Medizin (SNM) illustriert die Effektivität von ^{213}Bi -DOTATOC für die gezielte Alphatherapie von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren, die gegen Beta-therapie resistent waren. ^{213}Bi -DOTATOC war mittels eines mikrowellenbasierten Markierungsprotokolls synthetisiert worden. 21 Patienten, die zuvor eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit ^{90}Y - und ^{177}Lu -DOTATOC gezeigt hatten wurden mit ansteigenden Dosen von 1-10 GBq bis zu 21 GBq behandelt. Mittels

^{68}Ga -DOTATOC PET/CT, Sonographie, Magnetresonanztomographie, Angiographie und Bestimmung der Tumormarker konnte das Ansprechen der Tumore untersucht werden. Die Patienten tolerierten die ansteigenden Dosen und zeigten keine akute Toxizität. Es wurde eine Verkleinerung der Primärtumore und der Metastasen in Leber und Knochen beobachtet.[8] Das Bild zeigt eine 40-jährige Frau mit pulmonalem Karzinoid und hepatischer Metastasierung. Sie wurde bereits mit Carboplatin/Vepesid und "kaltem" Octreotid behandelt. Auch nach einer RIT mit ^{90}Y -DOTATOC war das Wachstum der Tumore progressiv. Nach einer Behandlung mit 11 GBq ^{213}Bi -DOTATOC kam es zu einer partiellen Remission der Leberläsionen und der Knochenmetastasen, die auch nach 15 Monaten anhielt. Außerdem zeigte die Patientin keine Hämatoxizität.

Der Preis wurde mit der Aussage begründet, dass diese Studie eine neue Tür für solche Patienten öffnet, deren Tumore nicht auf herkömmliche Behandlungsmethoden ansprechen.

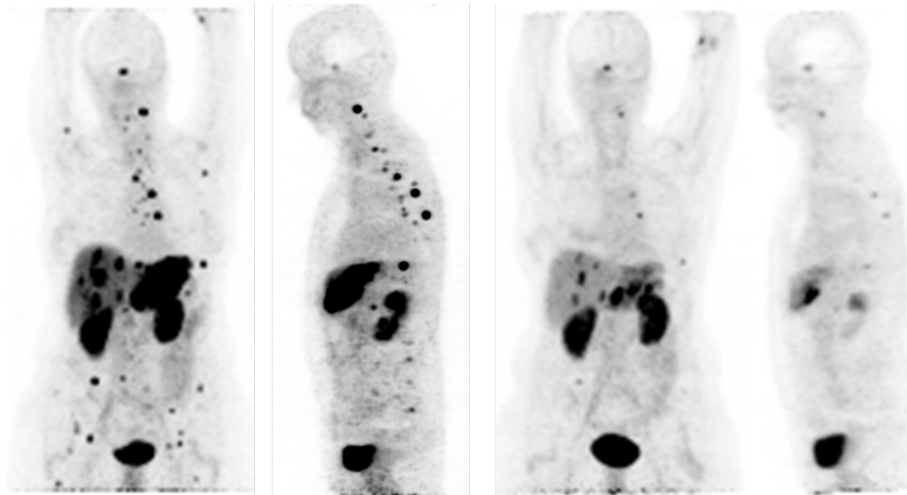


Abbildung 1.4.: Bild des Jahres 2012 ausgezeichnet von der Amerikanischen Gesellschaft für Nukleare Medizin

2. Zielsetzung

Die TAT gewinnt wachsende Bedeutung in der Behandlung von Krebs. Die klinischen Erfolge, die bisher mit Alpha-Strahlern erzielt wurden, sind äußerst vielversprechend. Besonders die neuen klinischen Studien mit ^{225}Ac und ^{213}Bi haben bereits einen immensen Erfolg hervorgerufen, sodass die Forschung der Radiomarkierung monoklonaler Antikörper von größtem Interesse ist, um das Potential und die Vielfältigkeit dieser Therapiemethode zu vergrößern.

Die Verfügbarkeit an ^{225}Ac ist weltweit jedoch nicht unbegrenzt. Es gibt zur Zeit eine jährliche Produktion von ~ 1.5 Ci. Dieser Aktivitätslevel erlaubt zwar die Durchführung vorklinischer und einiger klinischer Studien, jedoch sind die verfügbaren Mengen für eine weltweite klinische Anwendung nicht ausreichend. Aufgrund dieser Limitation ist es von Interesse weitere Therapienuklide zu finden, die ein analoges Potential wie ^{225}Ac besitzen. ^{230}U erscheint wegen seiner Halbwertszeit ($T_{1/2} = 20.2$ Tage) und der günstigen Eigenschaften seiner Zerfallskette als geeigneter Kandidat. Ob dieses Nuklid jedoch tatsächlich für den Einsatz in der TAT geeignet ist, hängt zunächst davon ab, ob ein geeigneter bifunktionaler Ligand existiert, welcher das Uranyl-Kation in stabiler Weise komplexiert und mit dessen Hilfe, es an ein Trägermolekül wie einen monoklonalen Antikörper gebunden werden kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit umfasste insbesondere diese Themen:

- Die Untersuchung der thermodynamischen Eigenschaften des Liganden BCPDA bzw. des Komplexes $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$. Dabei sollten vor allem die folgenden Fragen diskutiert werden:
 - Verhalten sich DCP und sein funktionalisiertes Derivat BCPDA gleich bzw. sind die komplexierenden Eigenschaften analog? Einen wichtigen Hinweis für die Antwort auf diese Frage gibt die Untersuchung der Protonierungskonstanten. Übt die Funktionalisierung des BCPDA mit den Chlorosulfophenylgruppen keinen Einfluss auf die Säureeigenschaften der Carboxyleinheiten aus, so kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die komplexierenden Eigenschaften unter Einführung der Funktionalität nicht wesentlich ändert.
- Charakterisierung einiger $\text{UO}_2\text{-DCP}$ bzw. $\text{UO}_2\text{-DPDCP}$ Komplexe in verschiedenen Lösungsmitteln:
 - Die Charakterisierung mittels Kristallstrukturanalyse, NMR, IR- und UV-Spektroskopie ist zum besseren Verständnis der Komplexe unter Einfluss konkurrierender Liganden wichtig.

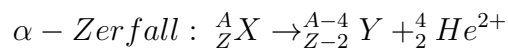
- Zum Vergleich die Untersuchung des biochemischen Systems. Dabei war das Augenmerk auf die folgenden Themen gesetzt:
 - Kann der Antikörper MabThera® mit den Liganden BCPDA bzw. DCP-NCS chelatiert werden?
 - Kann ein zuverlässiges Protokoll aufgestellt werden, mit dem die Chelatierung in reproduzierbarer und effizienter Weise durchgeführt werden kann?
 - Kann ein zuverlässiges Protokoll zur Synthese ^{230}U markierter Radioimmunokonjugate aufgestellt werden?
 - Gibt es eine Abhängigkeit zwischen eingesetzter Stoffmenge an Konjugat und Markierungseffizienz?
 - Wie ist die Stabilität des Komplexes und des Radioimmunokonjugats im Blutserum? Gibt es einen Hinweis auf besonders starke konkurrierende Liganden?

- Untersuchung des schon etablierten Systems Ac-DOTA-MabThera®:
 - Wie ist die Stabilität des Radioimmunokonjugats im Blutserum?
 - Bindungsstudie des Konjugats an K422 Zellen nach einem neuartigem mikrowellenbasiertem Markierungsprotokoll

3. Kenntnisstand der Literatur

3.1. Arten ionisierender Strahlung

Alpha-Zerfall



Beim Alpha-Zerfall werden ${}^4_2\text{He}$ -Kerne (oder auch α -Teilchen) emittiert. Dabei nimmt die Nukleonenzahl um 4 und die Kernladungszahl um 2 ab. Er führt zu einer chemischen Elementumwandlung. Bei leichteren g,g-Nukliden erfolgt der Alpha-Zerfall direkt zum Grundzustand, sodass hier eine einzige diskrete Energie emittiert wird. Es kann aber auch nach Aussendung eines Alpha-Teilchens zum Übergang in angeregte Zustände führen, wobei hier mehrere diskrete α -Energien und daneben auch Gamma-Quanten beobachtet werden können. Aufgrund des Impulserhaltungssatzes lässt sich die Rückstoßenergie des Tochterkerns folgendermaßen berechnen:

$$E_R = E_\alpha \cdot \frac{m_\alpha}{m_R}$$

Die Rückstoßenergie des Tochterkerns liegt bei $E_R \approx 0.1 \text{ MeV}$, was einer Reichweite von wenigen Millimetern in Luft entspricht. Alpha-Teilchen haben eine hohe Energie (4 - 9 MeV), aber nur eine kurze Reichweite ($< 100 \mu\text{m}$) im menschlichen Gewebe.

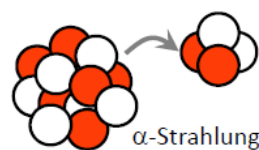
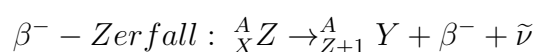
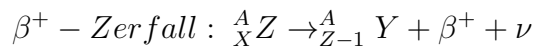


Abbildung 3.1.: α -Zerfall: Emission eines ${}^4_2\text{He}$ -Kerns

Beta-Zerfall





Der Beta-Zerfall beschreibt die radioaktive Umwandlung unter Emission eines Beta-Teilchens. Beim Betazerfall ist die Massenzahl des Ausgangsnuklids und des neu entstandenen Nuklids gleich und die Ordnungszahl ändert sich um eine Einheit. Beim β^- -Zerfall wandelt sich im Kern ein Neutron in ein Proton um, während beim β^+ -Zerfall und beim Elektroneneinfang ein Proton in ein Neutron übergeht. Die emittierten Beta-Teilchen besitzen ein Energiespektrum. Beim Durchgang durch Materie verlieren die Beta-Teilchen kinetische Energie bis sie vollständig abgebremst werden.

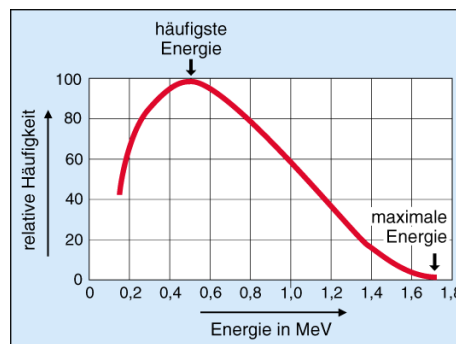


Abbildung 3.2.: Energieverteilung beim β^- -Zerfall

β^+ -Strahler können zur Diagnostik mittels Positronen-Emissions-Tomographie angewendet werden. Beim Aufeinandertreffen eines Positrons und eines Elektrons kommt es zur Annihilation. Die Masse beider Teilchen wird in Energie umgewandelt und es werden in einem Winkel von 180° zwei Gamma-Quanten mit einer Energie von 0.511 MeV ausgesendet, die zur Diagnostik herangezogen werden können.

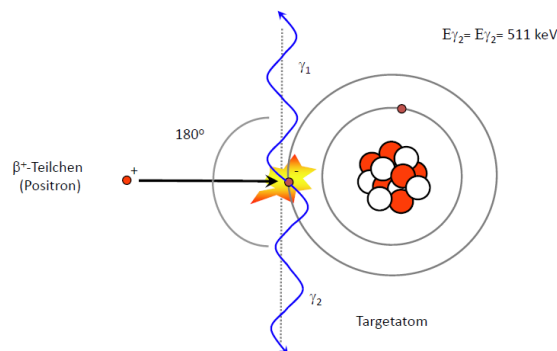


Abbildung 3.3.: Beim Aufeinandertreffen eines Positrons und eines Elektrons kommt es zur Annihilation

Auger-Elektronen Wird die Energiedifferenz $\Delta E = E_2 - E_1 = E_\gamma$ zweier Kernzustände nicht als Gamma-Quant emittiert, so kann die Energie auch als kinetische Energie auf ein Hüllelektron übertragen werden, welches den Kern anschließend mit einer diskreten Energie $E_{e^-} = \Delta E - E_B - E_R$ verlässt, wobei E_R die Rückstoßenergie des Tochterkerns und E_B die Bindungsenergie des Elektrons in der betreffenden Schale ist. Die bei diesem Vorgang emittierten monoenergetischen Elektronen nennt man Konversionselektronen. Die Wechselwirkung findet dabei primär mit Elektronen der K-Schale statt, da der Abstand Atomkern-Elektronenschale für Elektronen der K-Schale geringer ist und ihre Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Kern größer ist als für Elektronen anderer Schalen. Alle Elektronen besitzen die gleiche Energie. Nach Abspaltung der Konversionselektronen entsteht wie beim Elektroneneinfang in der betreffenden Schale ein Loch, das durch weiter außen liegende Elektronen wieder aufgefüllt wird. Die dabei emittierte charakteristische Röntgenstrahlung kann ebenfalls konvertiert werden, d.h., dass anstelle der Röntgenstrahlung Elektronen der äußeren Schalen abgespalten werden. Die dabei emittierten monoenergetischen Elektronen werden Auger-Elektronen genannt.

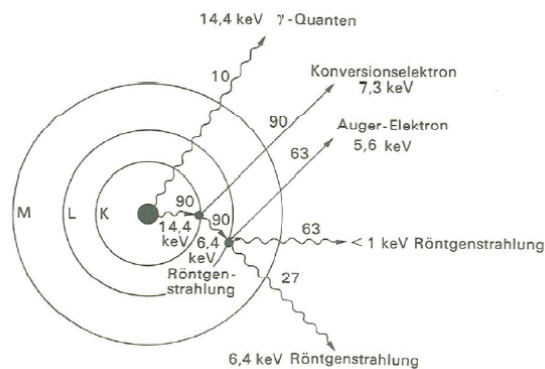


Abbildung 3.4.: Bildung von Augerelektronen

Gamma-Zerfall Beim Gamma-Zerfall findet keine Kernumwandlung statt, sondern es handelt sich um den Übergang von angeregten bzw. isomeren Kernzuständen in energetisch tiefer liegende Zustände des Kerns. Meist ist der Gamma-Zerfall eine Folge vorangegangener anderer Zerfälle, die zunächst in angeregten Zuständen der Tochternuklide enden. Angeregte Zustände sind meist sehr kurzlebig mit einer Halbwertszeit $< 10^{-14} s$. Kernisomere können jedoch deutlich langlebiger sein und sind für die Nuklearmedizin von wichtiger Bedeutung, denn sie können zur Diagnostik als Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) verwendet werden (z.B. ^{99m}Tc).

3.2. Chemie des Urans

Die Elektronenkonfiguration des Urans lautet $5f^36d^17s^2$. Die Abbildung 3.5 zeigt die bevorzugten Oxidationszustände der Actiniden.[9]

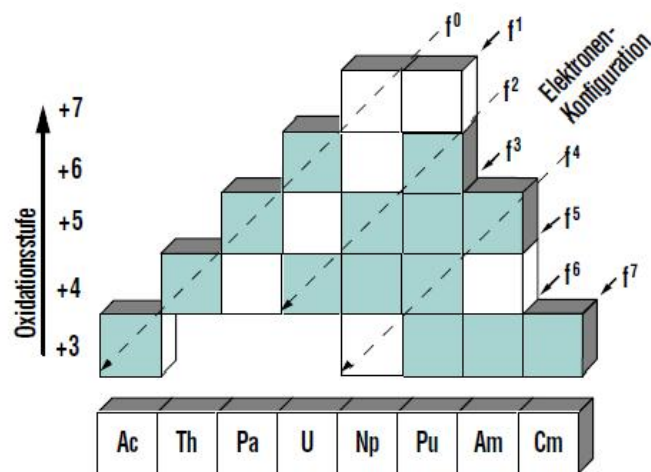


Abbildung 3.5.: Oxidationszustände der Actiniden [9]

Demnach bevorzugt Uran die Oxidationszustände +IV und +VI. In sauerstoffhaltigen Lösungen liegt Uran hexavalent vor. Es wird das hexavalente Dioxo-Kation mit linearer Struktur $[O=U=O]^{2+}$ gebildet, das sogenannte Uranyl-Kation. Wässrige Lösungen, die U(IV) enthalten sind stabil bei Abwesenheit von Oxidationsmitteln. Wässrige Lösungen, die U(III) enthalten, werden schnell unter Entwicklung von H_2 oxidiert. Die relative Stabilität der verschiedenen Oxidationszustände ist stark abhängig vom pH Wert, vom Redoxpotential und von der Anwesenheit komplexierender Liganden.[10]

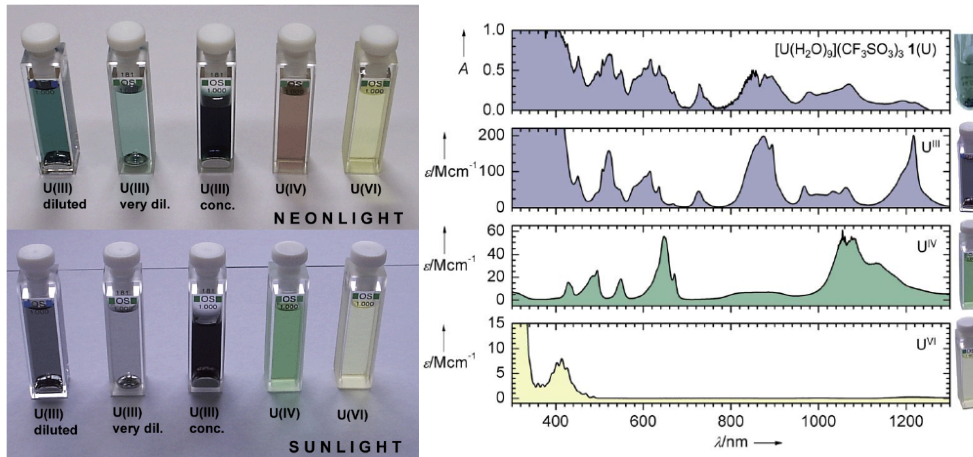


Abbildung 3.6.: Wässrige Lösung von U(III), U(IV) und U(VI) Triflaten bei Tages- und Neonlicht (links); UV/Vis/NIR Absorptionsspektren von 64 mM U(III), U(IV) und U(VI) Lösungen (rechts) [11]

3.2.1. Speziation von Uran im Blutserum

Spezies	Konzentration
Na ⁺	9.0 · 10 ⁻² mol/L
Ca ²⁺	2.5 · 10 ⁻³ mol/L
K ⁺	4.9 · 10 ⁻⁴ mol/L
Mg ²⁺	5.6 · 10 ⁻⁴ mol/L
Fe ²⁺	3.0 · 10 ⁻⁵ mol/L
Cl ⁻	9.0 · 10 ⁻² mol/L
CO ₃ ²⁻	2.5 · 10 ⁻² mol/L
PO ₄ ³⁻	1.1 · 10 ⁻³ mol/L
Citrat	1.6 · 10 ⁻⁴ mol/L
HSA	6.3 · 10 ⁻⁴ mol/L
HSTF	3.7 · 10 ⁻⁵ mol/L

Tabelle 3.1.: Konzentrationsangaben einiger Spezies im Blutserum [12]

In Tabelle 3.1 sind Konzentrationsangaben einiger wichtiger Spezies im Blutserum aufgeführt. Die Speziesverteilung von U(VI) im Blutserum bei einem pH von 7.4 wurde in der Literatur bereits untersucht und diskutiert. [13] Die Komplexierung mit Carbonationen und Serumproteinen dominiert. 65% des U(VI) wird mit zwei (1%) bzw. drei (64%) CO₃²⁻-Liganden komplexiert. Das restliche U(VI) wird durch die Serumproteine Human Serum Albumin (HSA) (28%) und Human Serum Transferrin (HSTF) (7%) gebunden. Die Berechnungen zeigen, dass die Bindung von U(VI) zum HSA dominant gegenüber der Bindung von U(VI) zum HSTF ist, obwohl beide

Proteine eine ähnliche Bindungsstärke aufweisen, die Konzentration von HSA jedoch um eine Größenordnung höher ist. Calcium spielt bei der Speziation von U(VI) im Blutserum eine wichtige Rolle, da die Bildung des Di-calcium-tri-carbonato-uranyl-Komplexes mit einer Stabilitätskonstante von $\log K = 30.55$ stark dominiert. Bei Abwesenheit von Calcium würde zu 70% eine Komplexierung des U(VI) durch die Serumproteine erfolgen.[14]

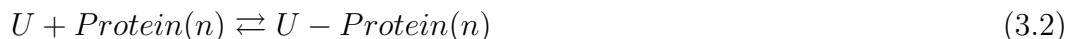
Anhand der vorhandenen Daten kann die Stabilität von potentiellen U(VI)-Chelat-Komplexen unter den Bedingungen des Blutserums vorhergesagt werden. Damit lassen sich erfolgversprechende Liganden auswählen, die eine ausreichend hohe Stabilität *in vivo* und *in vitro* aufweisen. Unter der vereinfachten Annahme, dass 1 mg eines mit ^{230}U markierten Antikörpers injiziert wird und ein Chelatligand pro Antikörper gebunden ist, resultiert eine Konzentration des Chelatliganden im Blut in einer Größenordnung von 10^{-9} M. Unter Berücksichtigung der Stabilitätskonstanten und der Konzentration der konkurrierenden Liganden Carbonat, HSA und HSTF zeigen Modellberechnungen, dass ein geeigneter Chelatligand eine Stabilitätskonstante von 10^{19} M^{-1} beim physiologischen pH-Wert aufweisen müsste, damit >90% des U(VI) bei eingestelltem Gleichgewicht chelatgebunden verbleibt. Es könnten jedoch auch Chelatliganden mit einer niedrigeren Stabilitätskonstante nützlich sein, wenn sie zusätzlich über eine ausreichende kinetische Stabilität verfügen und somit eine Dissoziation des Liganden vom U(VI) langsam genug relativ zur Halbwertszeit des Radionuklids erfolgt. Idealerweise sollte also der geeignete Chelatligand mit dem U(VI) einen Komplex von höherer Stabilität bilden als mit konkurrierenden Liganden, die unter physiologischen Bedingungen vorliegen, wie Carbonat, Phosphat oder Proteine.[13] Um das Potential der Liganden einzuschätzen, ist es notwendig eine komplette thermodynamische Beschreibung der Wechselwirkungen von U(VI) mit konkurrierenden Liganden unter den physiologischen Bedingungen durchzuführen. Eine quantitative Speziation von U(VI) unter physiologischen Bedingungen ist von unabdingbarer Relevanz, um toxische Effekte von U(VI) zu verstehen und geeignete Reagenzien zur Dekorporierung zu entwickeln.

Modelle für die Bindung zwischen U(VI) und Proteinen Es gibt mehrere Modelle um die Wechselwirkung zwischen U(VI) und den Proteinen zu beschreiben. Das einfachste Modell beschreibt die Wechselwirkung zwischen Metall und Protein als globale Reaktion, ohne die Möglichkeit, dass es zu Wechselwirkungen verschiedener Bindungsstellen unterschiedlicher Affinitäten kommen kann. Auch werden bei diesem einfachen Modell die Speziation von U(VI) in wässrigen Lösungen und somit die Konkurrenzreaktion mit niedermolekularen Liganden nicht berücksichtigt. Gleichgewichtskonstanten, die nach einem solch vereinfachten Modell berechnet wurden, können nur auf solche Systeme angewendet werden, in denen die gleichen experimentellen Bedingungen herrschen. Ein solches Modell nutzten Scapolan et al um die Bindung von U(VI) mit HSTF zu beschreiben [15]:



Die hieraus erhaltene Bindungskonstante kann nicht auf die Bedingungen, welche im Blutserum herrschen angewendet werden, da in den experimentellen Bedingungen eine niedrigere Carbonatkonzentration verwendet wurde als *in vivo* vorliegend. Chevari und Likhner benutzten ein solch vereinfachtes Modell zur Beschreibung einer 1:1 Bindungsbildung bei pH 6 zwischen U(VI) und HSA.[16] Auch die hier erhaltene Bindungskonstante kann nicht auf das System im Blutserum angewendet werden.

Ein komplexeres Modell berücksichtigt zusätzlich die Metallspeziation und die Möglichkeit mehrerer Bindungsstellen (n) am Protein.

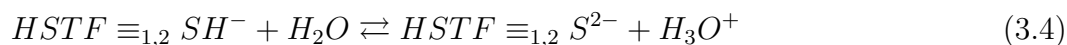
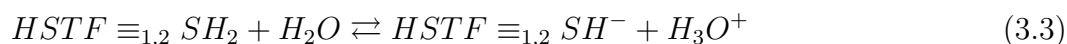


Auch hier bleibt die Beschreibung des Systems jedoch noch unvollständig, da die beteiligten funktionellen Gruppen nicht differenziert werden. Unter der Annahme, dass der pH Wert und die Ionenstärke konstant gehalten werden, kann anhand dieses Modells das Verhalten von einem Metall in verschiedenen Medien vorhergesagt werden.

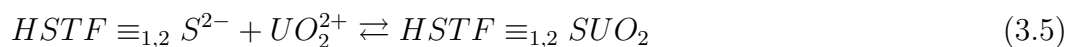
Erst wenn ein Modell verwendet wird, bei dem Reaktionen auf molekularer Ebene nach dem Prinzip des Massenwirkungsgesetzes betrachtet werden, können thermodynamische Informationen erhalten werden.

Beschreibung der Wechselwirkung von U(VI) mit HSTF HSTF ist ein eisenbindendes einstrangiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 79570 Da. Die Konzentration im Blut liegt bei 2.5 g/L, davon sind 30 % mit Eisen abgesättigt.

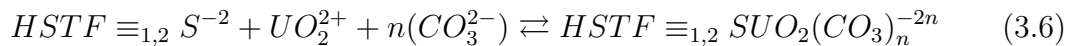
HSTF besitzt zwei leicht unterschiedliche Bindungsstellen ($HSTF \equiv_1 S$ und $HSTF \equiv_2 S$), wobei beide Bindungsstellen jeweils mit einer Tyrosingruppe mit U(VI) in Wechselwirkung treten können. Diese Bindungsstellen reagieren in Wasser sauer:



Der pK_s -Wert für den Tyr188-Rest beträgt 7.2 für die Ionenstärke 0. Für die andere Bindungsstelle, den Tyrosinrest Tyr95, ist kein pK_s -Wert bekannt und ein "normaler" Wert für Tyrosin (10.2 für die Ionenstärke 0) wird für diese Gruppe angenommen. Unter der Annahme, dass in einem carbonatfreien Medium die reaktive Spezies UO_2^{2+} ist, d.h. dass sich keine ternären Komplexe mit OH^- , Cl^- oder NO_3^- bilden, kann die Reaktion folgendermaßen beschrieben werden:



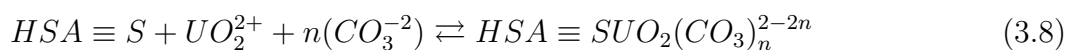
In der Gegenwart von Carbonat wird die Bildung eines ternären Komplexes angenommen:



Metallbindungen mit HSA sind kompliziert und werden von multiplen Bindungsstellen charakterisiert, deren Affinität und Bindungskapazität variieren. Aus diesem Grund kann ein mikroskopisches Modell nicht angewendet werden. Um die Wechselwirkung von U(VI) mit HSA zu beschreiben, nahmen Chevari und Likhner einen Austauschprozess zwischen Ca(II) und U(VI) vor. 70% des im Blutserum vorhandenen Ca(II) wird von Liganden mit niedrigem Molekulargewicht komplexiert. Die restlichen 30% sind an Proteine gebunden. Es kann angenommen werden, dass der Hauptteil des proteingebundenen Ca(II) an HSA gebunden ist. Die Wechselwirkung von Ca(II) mit HSTF kann vernachlässigt werden.

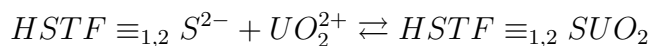
Beschreibung der Wechselwirkung von U(VI) mit HSA HSA hat im Blutserum mit 30-50 g/L von allen Proteinen die größte Konzentration und macht somit die Hälfte aller Serumproteine aus. Die Wechselwirkung von HSA mit U(VI) wurde schon 1948 von Guzman Barron et al. mittels Ultrafiltration untersucht. Die Autoren berichteten von der Reversibilität der U(VI)-Protein Bindung und dem Einfluss von Carbonat und Citrat als konkurrierende Liganden.[17]

Ein Modell zur Beschreibung der Wechselwirkung zwischen U(VI) und Ca(II) um HSA geht nur von einer starken Bindungsstelle für beide Metalle aus.



Die Bildung des ternären Komplexes von U(VI) mit HSA und Carbonat muss unter physiologischen Bedingungen in Betracht gezogen werden.

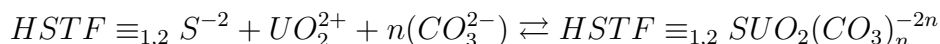
TRFLS Experimente, welche in Abwesenheit von Carbonat durchgeführt worden waren, zeigten, dass bei einem vierfachen Überschuss von HSTF gegenüber U(VI) 76% des U(VI) an das HSTF gebunden sind. Die so ermittelten Stabilitätskonstanten für Gleichung



betragen $\log K = 12.4$ und $\log K = 11.4$ für die Bindungsstellen mit der hohen Affinität und mit der niedrigen Affinität bei einer Ionenstärke von Null.

Die experimentellen Daten, welche in Anwesenheit von Carbonat erhalten wurden, zeigten, dass der Anteil an U(VI), welcher an HSTF gebunden ist, mit steigender

Carbonatkonzentration zunimmt, was auf die Bildung eines ternären Komplexes hinweist, wobei Carbonat, wie in der Gleichung



die Rolle eines synergistischen Anions übernimmt. Bei höheren Carbonatkonzentrationen nimmt der an HSTF gebundene Anteil an U(VI) jedoch wieder ab, was mit der Konkurrenz von Carbonat und HSTF um U(VI) erklärt werden kann. Die experimentell erhaltenen Daten können gut mit den Stabilitätskonstanten von $\log K = 20.8$ und $\log K = 19.8$ bei der Ionenstärke Null an der Bindungsstelle mit der hohen und der niedrigen Affinität für den ternären Komplex beschrieben werden. Im Blutserum ist der ternäre Komplex die dominierende Spezies, der binäre U(VI)-HSTF Komplex wird nicht gebildet.

3.2.2. Eigenschaften von ^{230}U

Radionuklid	Halbwertszeit	Zerfallskette	E in MeV	E in keV (EW)
^{230}U	20.2 d	α (1)	5.8	72 (0.6)
^{226}Th	30.7 min	α (1)	6.3	111 (3.3)
^{222}Ra	33.6 s	α (1)	6.6	324 (2.8)
^{218}Rn	33.75 ms	α (1)	7.1	609
^{214}Po	164.2 μs	α (1)	7.7	800

Tabelle 3.2.: Eigenschaften der Zerfallskette: ^{226}Th hat mit 3.3% eine höhere Emissionswahrscheinlichkeit (EW) für Gammastrahlung und wird deshalb zur Messung der Aktivität verwendet.[18]

Der Alphastrahler ^{230}U ($T_{1/2} = 20.2$ Tage) ist ein vielversprechendes Therapienuklid für die Anwendung in der TAT. Es zerfällt in einer Kaskade und emittiert dabei fünf Alphateilchen, die mit einer Gesamtenergie von 34.2 MeV eine hohe zytotoxische Wirkung haben. Man kann ^{230}U direkt als TAT Nuklid applizieren, oder auch das kürzerlebige ^{226}Th ($T_{1/2} = 31$ min) nach Abtrennung von seinem Mutternuklid mit Hilfe eines Radionuklidgenerators. Alle weiteren Alphateilchen emittierenden Tochternuklide sind sehr kurzlebig. Die ganze Zerfallsreihe emittiert keine hochenergetischen Gammastrahlen, die eine besondere Abschirmung erfordern, dagegen emittieren sie jedoch niederenergetische Gammastrahlen, die zur Diagnostik und zur Visualisierung der Bioverteilung des Radionuklids im Körper verwendet werden können. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeiten der Tochternuklide von ^{226}Th ist die Wahrscheinlichkeit ihrer Dislokation von den adressierten Zellen minimiert. Somit wird auch die Toxizität der unspezifischen Strahlung auf gesundes Gewebe begrenzt.[19]

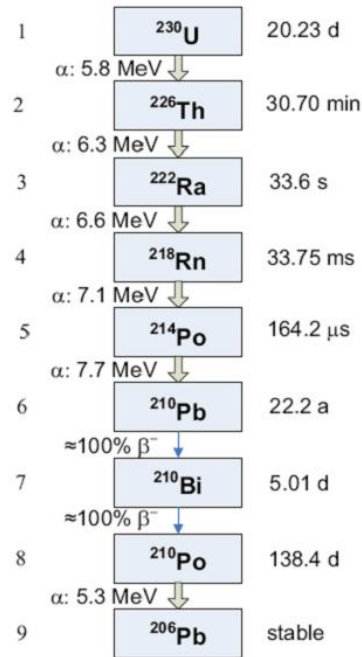
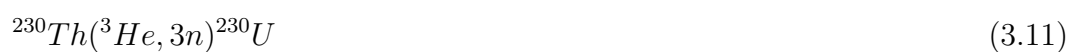


Abbildung 3.7.: Zefallskette von ^{230}U [18]

1948 wurde die Halbwertszeit von Studier et al mit einer Zählkammer über einen Zeitraum von 140 Tagen gemessen und auf 20.8 Tage bestimmt. Die Zerfallskonstante wurde anhand eines einzigen Experimentes bestimmt und es wurde keine Unsicherheit angegeben. Pommé et al veröffentlichten 2012 eine korrigierte Halbwertszeit von 20.2 Tagen.[20]

3.2.3. Herstellung von ^{230}U

Zur Herstellung von ^{230}U können verschiedene Methoden angewendet werden. Die vier folgenden Kernreaktionen sind mit einem Zyklotron umsetzbar.





Die beiden Prozesse in Gleichung 3.9 und Gleichung 3.10, die auf der Bestrahlung von ${}^{231}\text{Pa}$ basieren, erlauben eine direkte Herstellung von ${}^{230}\text{U}$. Von Morgenstern et al. wurden die Anregungsfunktionen für diese Kernreaktionen bestimmt. Dabei wird der Wirkungsquerschnitt in Abhängigkeit von der eingestrahlt Energie aufgetragen. Im Falle der Kernreaktion, welche in Gleichung 3.9 dargestellt ist, besitzt diese ein Maximum von 27.8 ± 3.4 mb bei einer Deuteronenenergie von 17.9 ± 0.2 MeV.[21] Dieses Maximum ist etwas kleiner als das Maximum der Anregungsfunktion, welche für die Kernreaktion der Gleichung 3.10 gefunden wurde und einen maximalen Wirkungsquerschnitt von 33.2 ± 5.3 mb bei einer Protonenenergie von 14.6 ± 0.2 MeV aufweist.[22] Eine weitere direkte Produktionsroute ist die Bestrahlung von ${}^{230}\text{Th}$, welches aus der Zerfallsreihe von natürlichem Uran isoliert werden kann, mit ${}^3\text{He}$ -Kernen.[23] Der maximale Wirkungsquerschnitt der Anregungsfunktion für diese Kernreaktion (Gleichung 3.11) liegt bei 3.45 ± 0.56 mb bei einer Energie von 26.5 ± 0.2 MeV.

Den größten Wirkungsquerschnitt weist die Route, welche auf der Protonenbestrahlung von natürlichem Thorium beruht, auf, mit 353 ± 14.5 mb bei einer Protonenenergie von 19.9 ± 0.3 MeV.[19] Durch Anwendung dieser Route wird ${}^{230}\text{U}$ über das Intermediat ${}^{230}\text{Pa}$ indirekt hergestellt. ${}^{230}\text{U}$ kann anschließend als Tochternuklid als Folge eines Betazerfalls (Zerfallswahrscheinlichkeit: 8.4 %) aus dem bestrahlten Target nach Ende der Bestrahlungszeit trägerfrei isoliert werden. Die maximale Aktivität an ${}^{230}\text{U}$ kann 28 Tage nach Bestrahlungsende trägerfrei isoliert werden und entspricht 2.82 % der ursprünglich produzierten Aktivität des ${}^{230}\text{Pa}$. Der Prozess, der auf der Protonenbestrahlung von natürlichem ${}^{232}\text{Th}$ basiert, erscheint wegen der hohen Produktionsausbeuten und der einfachen Handhabung des natürlichen ${}^{232}\text{Th}$ als Targetmaterial am günstigsten.

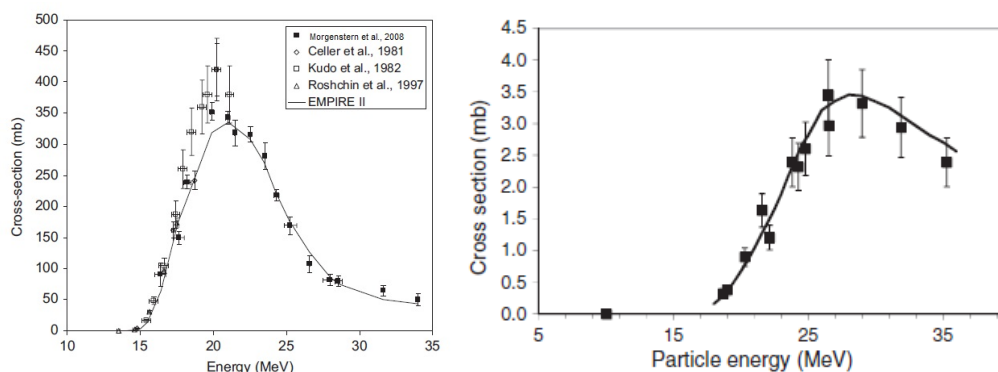


Abbildung 3.8.: Anregungsfunktionen für die Reaktionen ${}^{232}\text{Th}(p,3n){}^{230}\text{Pa}$ (links) und ${}^{230}\text{Th}({}^3\text{He},3n){}^{230}\text{U}$ (rechts)[19]

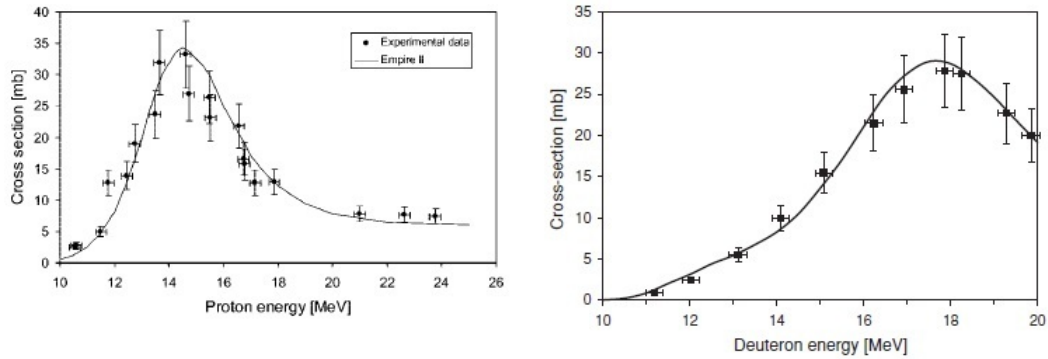


Abbildung 3.9.: Anregungsfunktionen für die Kernreaktionen $^{231}\text{Pa}(p,2n)^{230}\text{U}$ (links), $^{231}\text{Pa}(d,3n)^{230}\text{U}$ (rechts)[22]

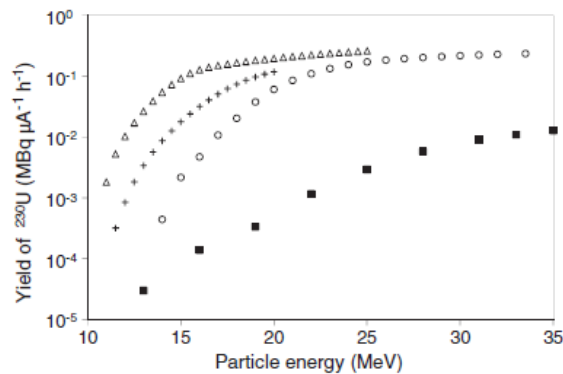


Abbildung 3.10.: Vergleich der Ausbeuten der dicken Targets der unterschiedlichen Kernreaktionen: $^{232}\text{Th}(p,3n)^{230}\text{Pa} \xrightarrow{\beta^-} ^{230}\text{U}$ (Kreise) und $^{230}\text{Th}(^3\text{He},3n)^{230}\text{U}$ (Quadrate) $^{231}\text{Pa}(p,2n)^{230}\text{U}$ (Dreiecke), $^{231}\text{Pa}(d,3n)^{230}\text{U}$ (Kreuze)

Die Produktion via der Kernreaktionen 3.10 und 3.12 zeigen vergleichbare Ausbeuten. Ein großer Vorteil der Kernreaktion $^{232}\text{Th}(p,3n)^{230}\text{Pa}$ ist jedoch die einfachere Herstellung und Handhabung des Target aus natürlichem Thorium.

3.3. Eigenschaften von ^{225}Ac

Die Elektronenkonfiguration des Actinium lautet $6d^17s^2$. Die chemischen Eigenschaften sind ähnlich mit den Eigenschaften der seltenen Erden und des Lanthans.

^{225}Ac ist ein reiner Alphastrahler und zerfällt mit einer Halbwertszeit von 9.9 Tagen. In seiner Zerfallskette produziert es drei weitere Alphateilchen emittierende Tochternuklide. Kumulativ wird eine Energie von 27.7 MeV frei.

Radionuklid	Halbwertszeit	Zerfallskette	E in MeV	E_γ in keV (EW)
^{225}Ac	9.92 d	$\alpha(1)$	5.8	99.8 (1.7)
^{221}Fr	4.806 min	$\alpha(1)$	6.4	218 (11.6)
^{217}At	32.8 ms	$\alpha(1)$	7.1	261
^{213}Bi	45.62 min	$\beta^-(0.98)$	1.43	440 (26.1)
^{213}Po	3.708 μs	$\alpha(1)$	8.4	779
^{209}Pb	3.323 h	$\beta^-(1)$	0.64	-

Tabelle 3.3.: Eigenschaften der Zerfallskette von ^{225}Ac [5]

3.4. Der Chelatligand DCP

2,9-Dicarboxy-1,10-phenanthrolin (DCP) besitzt ein auf Phenanthrolin basierendes aromatisches Grundgerüst mit zwei Carboxylgruppen an den Positionen 2 und 9. Mit $\text{p}K_{s1} = 4.75$ und $\text{p}K_{s2} = 2.53$ können die beiden Carboxyleinheiten leicht zu den entsprechenden Carboxylaten deprotoniert werden. DCP hat wegen der Starrheit des aromatischen Grundgerüsts einen hohen Grad der Präorganisation, was zu bemerkenswert hohen Komplexbildungskonstanten führt. DCP hat eine hohe Affinität für Metall-Ionen mit einem Ionenradius von ca 1.0 Å. Dies kann anhand der starren Lücke von DCP erklärt werden, die fünfgliedrige Chelatringe bildet, welche große Metall-Ionen bevorzugen.[1]

3.4.1. Komplexierung von U(VI) mit DCP

Die Herstellung eines UO_2 -DCP Komplexes wurde von Dean et al. mittels eines Hydrothermalverfahrens versucht, was zur Bildung eines Polymers führte.[1] Die Struktur des Polymers ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Die Herstellung eines UO_2 -DCP Monomers ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Der DCP-Ligand ist planar und U(VI) liegt in der Ebene des Liganden. Die Struktur des Polymers besteht aus einem zentralen U(VI)-Atom, welches an zwei symmetrieäquivalente Sauerstoffatome (O1, O1') gebunden ist. Der Uran-Sauerstoff-Abstand beträgt im Kristall 1.767 Å und der eingeschlossene Winkel beträgt 176.4°. Ein DCP-Anion bindet das Uranyl-Kation in einer vierzähligen Form, einerseits durch die beiden Stickstoff-Atome (N1, N2) mit einer Bindungslänge von 2.558 Å und andererseits durch die beiden Sauerstoff-Atome der Carboxylatreste (O2, O4) mit einer Bindungslänge von 2.351 Å. Ein zusätzliches Sauerstoff-Atom (O3') eines weiteren DCP-Anions ist an das Uranyl-Kation mit einer Bindungslänge von 2.345 Å gebunden und vervollständigt so die pentagonale Bipyramide. Diese verbrückenden Carboxylatgruppen führen in der Struktur zu einem eindimensionalen Strang.

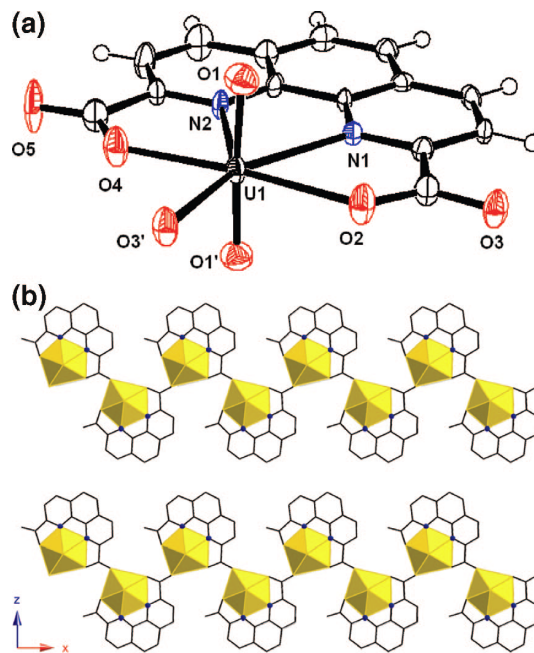


Abbildung 3.11.: Struktur des U(VI)-DCP-Polymers, (a) Das O3' Atom ist ein verbrückendes Carboxylatsauerstoffatom eines weiteren benachbarten UO₂-DCP-Komplexes, (b) die Polyeder stellen die pentagonalen Bipyramiden, die schwarzen Linien die DCP-Liganden dar[1]

3.4.2. Das Derivat DCP-NCS

Ein sehr wichtiges Derivat des DCP ist das 5-Isothiocyanato-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthrolin. Die NCS-Gruppe am Liganden reagiert mit einer Aminogruppe am Antikörper unter Bildung eines Thioharnstoffs. Isothiocyanate sind mäßig reaktiv, aber ziemlich stabil in Wasser und in den meisten Lösungsmitteln.[24]

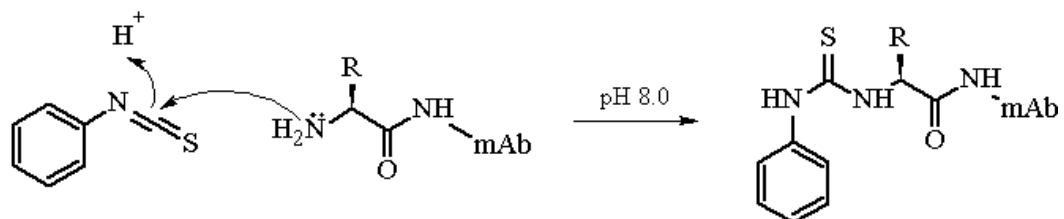


Abbildung 3.12.: Bindungsbildung einer NCS-Gruppe mit einer Aminogruppe unter Ausbildung einer Thioharnstoffgruppe

Die Herstellung von DCP-NCS wurde von Blake et al. beschrieben.[25] Das unfunktionalierte 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolin (Bathocuproin) wird mit Hilfe von HNO₃/H₂SO₄ nitriert und es kommt zu einer Einführung einer Nitrogruppe am mittleren Phenylring. Die allylischen Methylgruppen des 5-Nitro-2,9-dimethyl-1,10-

phenanthrolins können anschließend mit Selendioxid zum Aldehyd oxidiert werden (Riley-Oxidation). Der Dialdehyd kann anschließend mit 80% HNO₃ zur Dicarbonsäure oxidiert werden. Zur Umfunktionalisierung der Nitrogruppe zur Isothiocyanatgruppe wird diese zunächst mit Wasserstoff und Pd/C zur Aminogruppe reduziert und anschließend mit Thiophosgen umgesetzt.

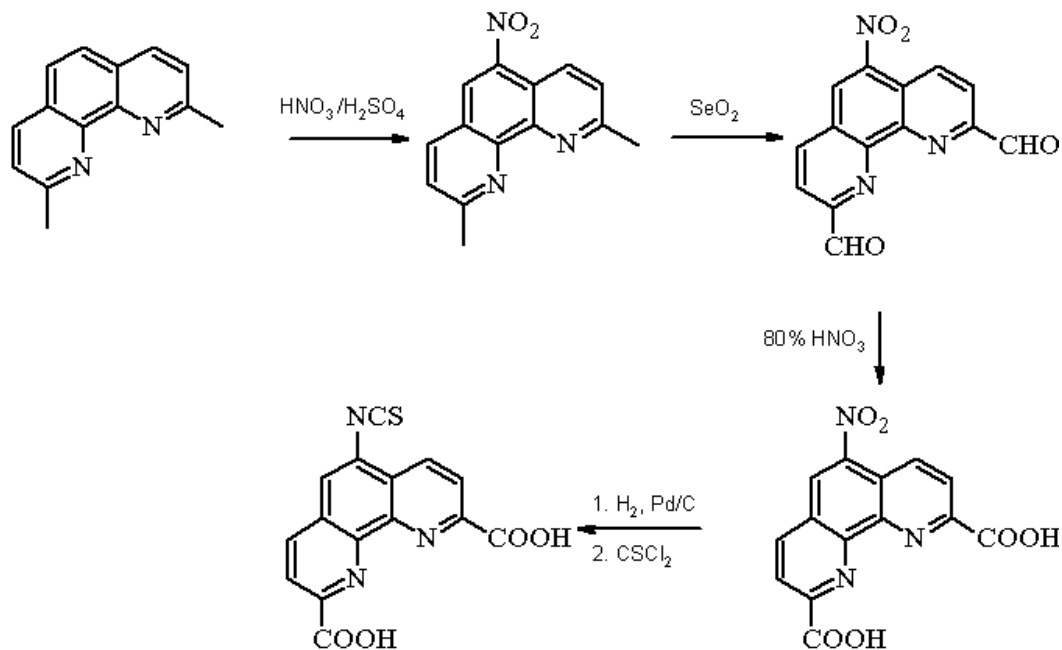


Abbildung 3.13.: Funktionalisierung des DCP mit einer NCS-Gruppe [25]

3.4.3. Das Derivat BCPDA

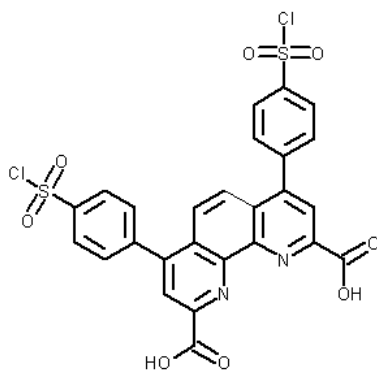


Abbildung 3.14.: Strukturformel von BCPDA

4,7-Bis(chlorosulfonyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (BCPDA) wurde ursprünglich als fluoreszierender Chelat für Europium entwickelt um Proteine zu

markieren und diese mit zeitaufgelöster Fluorometrie zu untersuchen.[26] Europium-Komplexe erwiesen sich als geeignete Marker in Immunoassays. Drei Eigenschaften machten sie besonders interessant:

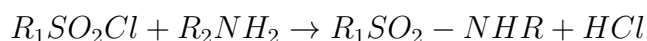
- Sie haben eine starke Stoke-Shift Verschiebung.
- Die Emissionsspektren bestehen aus sehr engen Linien, welche für die Emission von Metallionen sehr charakteristisch sind
- Ihre Fluoreszenz ist sehr langlebig. Dies resultiert daraus, da die Anregungsstrahlung vom Liganden absorbiert wird und diese durch Energietransferprozesse zum Europium transferiert wird, sodass es zu einer Europiumemission kommt.

Diese Charakteristika können zur Konstruktion analytischer Systeme wegen ihrer hohen Sensitivität herangezogen werden. Europium wurde bezüglich seiner Fähigkeit Biomoleküle, insbesondere Antikörper für Immunoassays, zu markieren, untersucht. Hierfür war es notwendig einen geeigneten Chelaten zu finden, welcher die folgenden Eigenschaften erfüllt:

- Der Chelat sollte einen stabilen Komplex mit Europium bilden.
- Der Chelat sollte einen hohen Extinktionskoeffizienten an der Anregungswellenlänge aufweisen, sodass der Komplex stark fluoresziert.
- Der Chelat sollte eine Struktur aufweisen, sodass er gut durch eine kovalente Bindung an ein Protein gebunden werden kann.

Aufgrund der funktionalisierten Phenylringe besitzt BCPDA für die vorliegende Arbeit grundlegende Eigenschaften.

- Der Ligand besitzt aufgrund der Sulfonsäurechloride eine stark verbesserte Löslichkeit im Vergleich zum nicht funktionalisierten Liganden DCP.
- Die Sulfonsäurechloride können mit Aminen (von z.B. Antikörpern) unter Ausbildung von Sulfonsäureamid Bindungen bilden. Somit kann er als bifunktioneller Chelatligand fungieren, indem er zum einen U(VI) in stabiler Weise komplexiert und zum anderen an ein geeignetes Trägermolekül wie z.B einen Antikörper geknüpft werden kann.



Sulfonsäurechloride sind hochreaktiv, aber auch recht instabil in Wasser, insbesondere bei höheren pH-Werten, welche für die Reaktion mit Aminen notwendig sind. Deshalb werden die Konjugationen am Besten bei niedrigen Temperaturen durchgeführt. Hat die Konjugation stattgefunden, dann sind die gebildeten Sulfonamide sehr stabil.

Herstellung von DPDCP/BCPDA Ein Gemisch aus Bathocuproin, N-Succinimid, Benzoylperoxid in Tetrachlormethan wird 6 h unter Rückfluss erhitzt. Das abgekühlte Gemisch wird filtriert um das Succinimid zu entfernen. Unter Vakuum wird das

Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in Chloroform gelöst. Die organische Phase wird mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Produkt wird mit konzentrierter H_2SO_4 für 2h im Ölbad auf $80\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Das Gemisch wird anschließend im Eisbad heruntergekühlt und Wasser wird hinzu gegeben. Es wird eine weitere Stunde auf $80\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend vorsichtig auf Eiswasser gegeben, daraufhin fällt das Produkt aus. Gelbes Pulver wird nach Vakuumfiltration isoliert. Das Dinatriumsalz wird hergestellt indem der Diemthylether in 1 M NaOH und MeOH bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ für 3h gerührt wird. Der unlösliche weiße Feststoff (DPDCP) wird mittels Vakuumfiltration isoliert. Die reine Säure wird aus dem Salz hergestellt, indem dieses für 3d in 2 M HCl gerührt wird. Schließlich wird portionsweise Chlorosulfonylsäure hinzugegeben und 4h bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und anschließend vorsichtig in Eiswasser gegeben.[26]

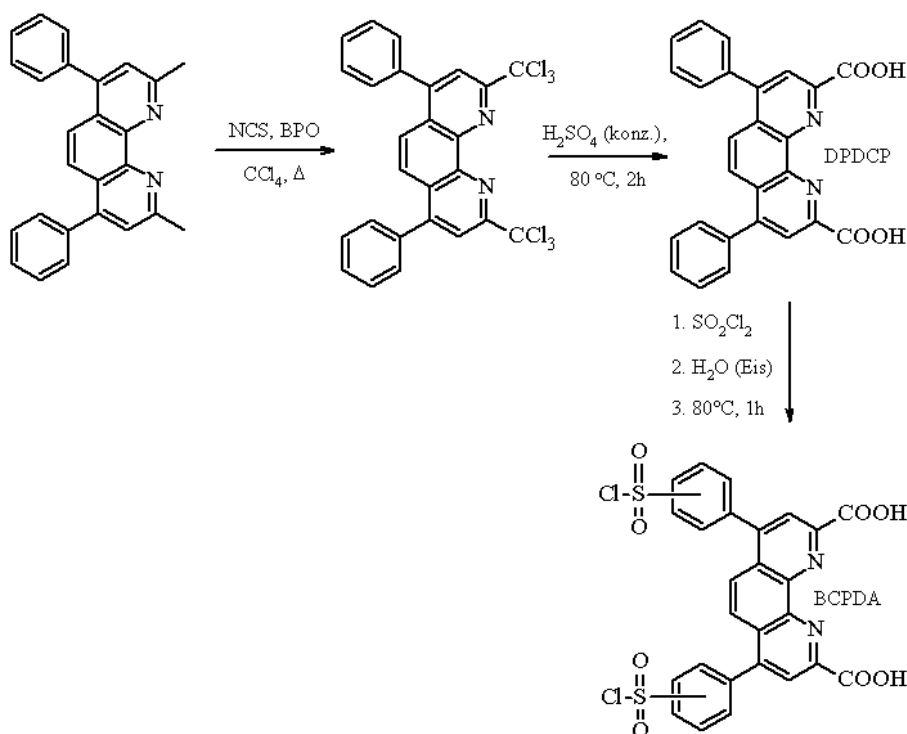


Abbildung 3.15.: Herstellung von BCPDA ausgehend von Bathocuproin [26]

3.5. Der Chelatligand DOTA

1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) ist ein zyklischer achtzähliger Chelatkomplex mit 4 Carboxylsäureeinheiten. Diese Carboxylgruppen sind harte Donoren, die Metallionen in hohen Oxidationsstufen nach dem HSAB-Prinzip binden. DOTA ist somit ein geeigneter Komplexbildner für zwei- oder dreiwertige Metallionen. Es hat eine starre, präorganisierte und zyklische Struktur und

weist somit eine stärkere Selektivität gegenüber Metallionen geeigneter Größe auf als sein azyklisches Analogon.

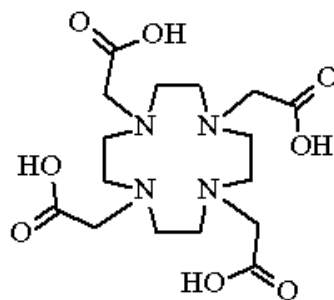


Abbildung 3.16.: Strukturformel von DOTA

3.5.1. Das Derivat DOTA-NCS

2-(p-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA-NCS) ist ein bifunktionalisiertes Derivat von DOTA, welches mit Hilfe der NCS-Gruppe unter Erhaltung aller vier Carboxyleinheiten zur Metallkomplexierung an einen Antikörper gebunden werden kann. Die Bindungsbildung der NCS-Gruppe des Chelaten und einer Aminogruppe am Antikörper unter Ausbildung einer Thioharnstoffgruppe verläuft analog zur Knüpfung von DCP-NCS an einen Antikörper (siehe Kapitel 3.4.2).

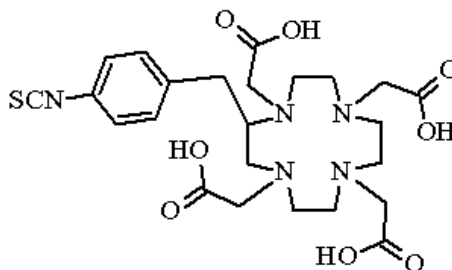


Abbildung 3.17.: Strukturformel von DOTA-NCS

3.6. Monoklonale Antikörper

Radiomarkierte monoklonale Antikörper (mAb) werden für die Behandlung von Krebs in vielen klinischen Laboratorien entwickelt. Die Entwicklung eines solchen radiomarkierten Antikörpers beinhaltet zunächst die Konjugation eines bifunktionellen Liganden an einen Antikörper und anschließend die Radiomarkierung, also die Markierung des Konjugats mit einem Radiometall. Um ein optimales und reproduzierbares Verhalten der radiomarkierten monoklonalen Antikörper für die klinischen Studien zu

erhalten, ist es notwendig den Zusammenhang zwischen “Zieleffizienz” und Anzahl der Liganden pro Antikörper zu verstehen.

Sowohl die Radiomarkierung als auch die Immunreaktivität eines Antikörpers kann aufgrund seiner Modifikation negativ beeinflusst werden. Da es durch Konjugation mit Liganden zu drastischen negativen Auswirkungen kommen kann, ist es notwendig die Bedingungen so geschickt zu wählen, dass die Effizienz des Antikörpers erhalten bleibt.

Die Konjugation mit nur wenigen Liganden mit einem geringen Molekulargewicht im Vergleich zum Antikörper erfordert eine einfache, aber akkurate und reproduzierbare Methode zur Untersuchung des Verhältnisses von Ligand zu Antikörper.

4. Materialien

4.1. Radionuklide

4.1.1. Das Radionuklid ^{230}U

^{230}U wurde mittels Protonenbestrahlung von natürlichem ^{232}Th via der Gleichung $^{232}\text{Th}(p, 3n)^{230}\text{Pa}$ hergestellt. Die Bestrahlung wurde am Zyklotron des Instituts für Gesundheit und Verbraucherschutz (IHCP) in Ispra (Italien) durchgeführt.



Abbildung 4.1.: Target und Targethalter vor der Bestrahlung (links) und nach der Bestrahlung (mitte und rechts)

Das bestrahlte ^{232}Th -Target wurde in konz. HCl gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Das leicht flüchtige Iod, welches als Spaltprodukt ebenfalls im Target vorlag, konnte auf diese Weise abgetrennt werden. Schwerlösliche Oxide, wie z.B. ThO_2 blieben als Partikel in Lösung und wurden mit Hilfe von konz. HNO_3 und wenig HF in Lösung gebracht. Da Nitrate und Fluoride den weiteren Trennungsgang stören, wurden diese durch Eindampfen wieder entfernt. Der Rückstand wurde mit 6 M HCl aufgenommen. Diese Lösung konnte zur weiteren Trennung verwendet werden. Die eigentliche Trennung des im Target vorhandenen Urans von Thorium, Protactinium und Spaltprodukten basierte auf einem mehrstufigen Trennverfahren. Die Trennung erfolgte durch anschließende

- Adsorption an Silica-Gel und
- Extraktionschromatographie

Das Verfahren ist in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt.

Es wurde eine Kaskade aus zwei nacheinander zu durchlaufenden Säulen aufgebaut. Die erste Säule war gefüllt mit Silica-Gel (63-200 μm). Aus 6 M HCl wurde das

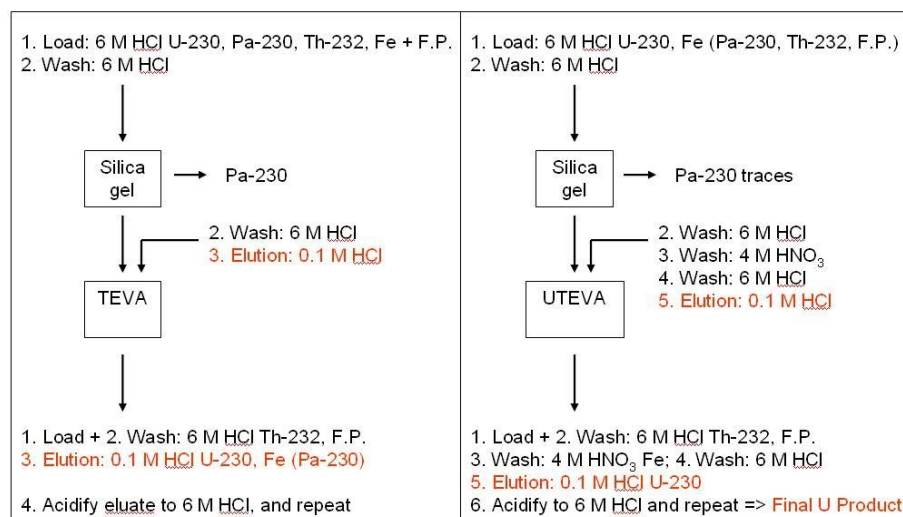


Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung der Isolierung von ^{230}U von ^{230}Pa , ^{232}Th und Spaltprodukten (F.P.)

PaO^{3+} hier adsorbiert. Die zweite Säule, mit TEVA (100-150 μm) gefüllt, diente zur selektiven Zurückhaltung des Urans. Dieses konnte anschließend aus dieser Säule mit 0.1 M HCl eluiert werden (linke Seite der Abbildung 4.2). Dieser Reinigungsschritt über die Kaskade wurde wegen Durchbruch des Protactiniums wiederholt. Zur Feinreinigung und um noch Restspuren von noch vorhandenem Protactinium und weiter störenden Metallen wie z. B. Eisen zu entfernen, wurde eine weitere Kaskade, bestehend aus einer Säule Silica-Gel und einer Säule UTEVA genutzt (rechte Seite der Abbildung 4.2). Das Eluat musste zunächst wieder auf 6 M HCl konditioniert werden (Schritt 1). Anschließend wurde die Kaskade beladen und mit 6 M HCl gewaschen (Schritt 2). Die Silica-Säule wurde abgekoppelt und das Eisen auf der UTEVA-Säule wurde mit 4 M HNO₃ eluiert (Schritt 3). Nach Waschen der UTEVA-Säule mit 6 M HCl (Schritt 5) konnte anschließend ^{230}U mit 0.1 M HCl eluiert werden (Schritt 6). Um letztendlich Uran in hoher Reinheit zu erhalten, wurde die Kaskade nochmals wiederholt und das Eluat letztendlich mit Spartan-Filtern (13/0.2 RC Filtereinheit Whatman) der Firma *Schleicher & Schuell* filtriert.

4.1.2. Das Radionuklid ^{237}U

Schwerpunkt der Arbeit ist die Untersuchung von ^{230}U hinsichtlich seiner Eignung zur Anwendung in der gezielten Alphatherapie. Dieses Nuklid muss im Zyklotron folgend der Kernreaktion $^{232}\text{Th}(p, 3n)^{230}\text{Pa} \rightarrow ^{230}\text{U}$ (siehe Kapitel 3.2.3) hergestellt werden. Aufgrund logistischer Probleme, stand ^{230}U nicht den gesamten Zeitraum der Arbeit zur Verfügung. Es wurde nach einem alternativen Urannuklid gesucht, welches geeignet ist, ^{230}U für manche Experimente zu ersetzen, wenn dieses gerade nicht zur Verfügung stand.

Das gesuchte Nuklid sollte gewisse Anforderungen erfüllen:

- Es sollte im Labor leicht verfügbar sein, indem es z. B. als Tochternuklid von einem Radionuklidgenerator reproduzierbar isoliert werden kann.
- Es sollte eine geeignete Halbwertszeit haben. Die Halbwertszeiten sollten nicht zu kurz sein ($< d$) um nicht logistische Probleme aufgrund des schnellen Zerfalls zu bekommen.
- Es sollte geeignete Gammaemissionlinien besitzen, die zur Analytik herangezogen werden können.

Der Blick auf die Nuklidkarte zeigte, dass ^{237}U diese Anforderungen erfüllen könnte. ^{237}U ist ein reiner Betaemitter mit einer Halbwertszeit von 6.75 Tagen.

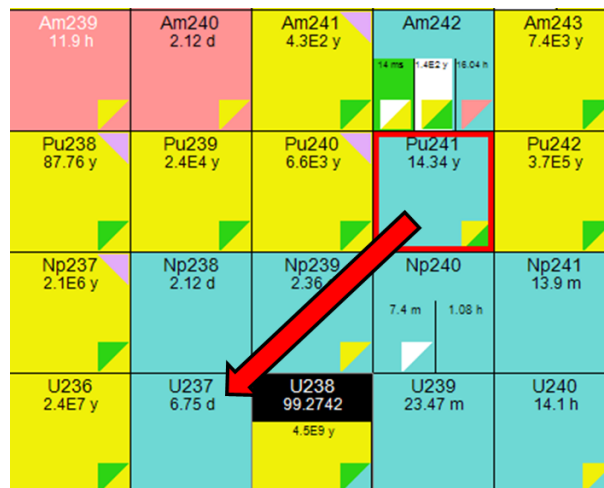


Abbildung 4.3.: Ausschnitt aus der Nuklidkarte: Bildung von ^{237}U aus ^{241}Pu mit einer Zerfallswahrscheinlichkeit von $2.46 \cdot 10^{-3}\%$

^{237}U ist ein Tochternuklid des ^{241}Pu , welches in unserem Institut als Standard für die ICP-MS verwendet wird. In Abbildung 4.4 ist eine Prozedur dargestellt, die entwickelt wurde um ^{237}U zu isolieren. ^{237}U besitzt mehrere Gammaemissionlinien, von denen die Linie bei 59.5 keV eine Emissionswahrscheinlichkeit von 34.5% und die Linie bei 208 keV eine Emissionswahrscheinlichkeit von 21% hat. Die Analytik kann also mittels hochauflösender Gammaskopie erfolgen. (siehe Tabelle 4.2)

Pu Isotope	Wt % IDMS	Wt % MGA/Gamma
238	1.278	1.31
239	60.572	60.717
240	27.150	27.304
241	5.715	5.755
242	5.286	4.914
Am-241	-	2.335

Tabelle 4.1.: Isotopenzusammensetzung des Pu-Standards

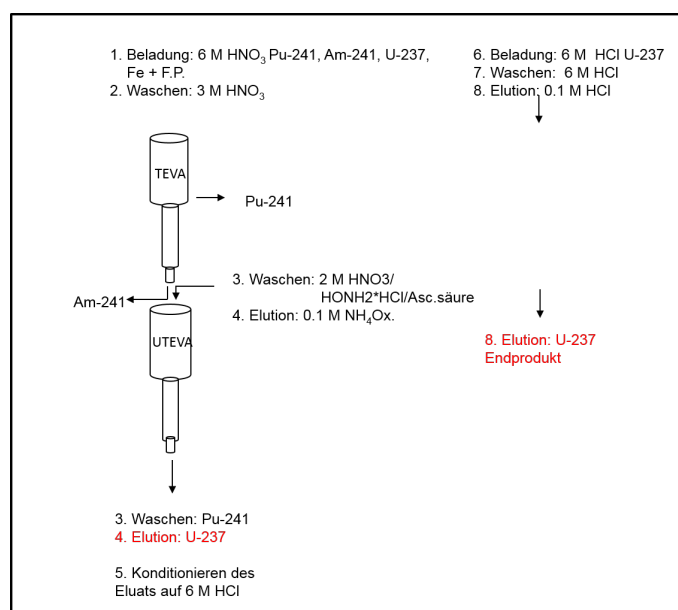


Abbildung 4.4.: Schematische Darstellung der Isolierung von ^{237}U von ^{241}Pu , ^{241}Am

- Die Isolierung von ^{237}U aus dem Zerfall von ^{241}Pu besteht aus einem Prozess basierend auf Extraktionschromatographie (siehe Kapitel 5.2). Zunächst wurde 1 ml der ^{241}Pu Lösung mit 1 ml 6 M HNO_3 und 10 μl H_2O_2 (konz.) und anschließend mit $\sim 1\text{g}$ NaNO_2 versetzt. Nach Erhitzen färbte sich die blaue Lösung braun, d.h. Pu(III) wurde zu Pu(IV) oxidiert, da das dreiwertige Pu nicht am Extraktionschromatographie-Harz TEVA fixiert werden würde. Eine Kaskade, bestehend aus einer TEVA-Kolonne (2 ml Bettvolumen) und einer UTEVA-Kolonne (1 ml Bettvolumen), wurde mit 6 M HNO_3 konditioniert und nach Beladung mit der Probenlösung mit 3 M HNO_3 gewaschen, da unter diesen Bedingungen der größte Verteilungskoeffizient vorlag. Die Kaskade wurde zunächst mit dreimal 5 ml 3 M HNO_3 gewaschen, um das ^{241}Am zu eluieren. Da mit einem Durchbruch von ^{241}Pu zu rechnen war, welches sich auf der UTEVA Kolonne fixierte, wurde diese nach Entkopplung, reduktiv mit

Radionuklid	Halbwertszeit	Zerfall	E_α in MeV	E_γ in keV (EW)	X-Rays in keV
Pu-238	87.7 y	$\alpha(1)$	5.50 (0.71)	43.50 (3.95·10 ⁻⁴)	14.09 (0.1)
			5.46 (0.29)		4.46 (2.0·10 ⁻²)
			5.36 (1.02·10 ⁻³)		
Pu-239	24.1·10 ³ y	$\alpha(1)$	5.16 (0.71)	12.96 (3.41·10 ⁻⁴)	14.09 (4.0·10 ⁻²)
			5.14 (0.17)		4.46 (2.0·10 ⁻²)
			5.11 (0.12)		
Pu-240	6.46·10 ³ y	$\alpha(1)$	5.17 (0.729)	45.242 (4.47·10 ⁻⁴)	14.09 (8.9·10 ⁻²)
			5.12 (0.27)		4.46 (1.86·10 ⁻²)
			5.02 (8.9·10 ⁻⁴)		
Pu-241	14.3 y	$\beta(1)$		148.6 (1.86·10 ⁻⁶)	14.09 (14.09·10 ⁻⁵)
Pu-242	373.5·10 ³ y	$\alpha(1)$	4.9 (0.76)	44.92 (3.73·10 ⁻⁴)	14.09 (8.2·10 ⁻²)
			4.86 (0.23)		4.46 (1.62·10 ⁻²)
			4.75 (3.07·10 ⁻⁴)		
Am-241	432.8 y	$\alpha(1)$	5.49 (0.84)	59.54 (0.36)	14.44 (0.33)
			5.44 (0.13)	26.34 (0.0243)	4.608 (0.07)
			5.39 (1.65·10 ⁻²)	27.04 (6.3·10 ⁻³)	
			5.54 (3.6·10 ⁻³)	33.20 (1.22·10 ⁻³)	
			5.51 (2.2·10 ⁻³)	43.42 (6.6·10 ⁻³)	
			5.32 (1.4·10 ⁻⁴)	42.72 (3.9·10 ⁻³)	
				98.97 (2.23·10 ⁻³)	
				102.96 (2.09·10 ⁻³)	
U-237	6.75 d	$\beta(1)$		55.55 (1.8·10 ⁻³)	
				59.54 (0.345)	14.44 (0.58)
				208 (0.216)	101.07 (0.27)
				26.34 (0.022)	97.08 (0.17)
				164.58 (0.019)	4.6 (0.14)
				64.83 (0.013)	114.24 (5.9·10 ⁻²)
				332.35 (0.012)	117.5 (3.3·10 ⁻²)
				267.54 (7.3·10 ⁻³)	113.31 (3.1·10 ⁻²)

Tabelle 4.2.: Eigenschaften der Radionuklide des Pu-Standards

2 M HNO₃/0.2 M Ascorbinsäure/ 0.2 M Hydroxylammoniumchlorid gewaschen.

²³⁷U konnte anschließend, nach Einweichen mit einem halben Bettvolumen (hier: 0.5 ml), mit zwei Bettvolumen (hier 2 ml) 0.2 M Ammoniumoxalat eluiert werden.

Das Eluat wurde anschließend mit 3 ml HCl (konz.) versetzt um eine 6 M Lösung zu erhalten. Mit dieser Lösung wurde eine TEVA-Kolonnen (0.5 ml, mit 6 M HCl konditioniert) beladen. Die Kolonne wurde mit 5 ml 6 M HCl gewaschen und nach Einweichen mit 250 µl 0.1 M HCl, konnte das ²³⁷U in zwei Fraktionen à 500 µl eluiert werden.

Die TEVA Kolonne, die anfangs mit der ²⁴¹Pu Lösung beladen wurde, wurde als Radionuklidgenerator aufgehoben um nach Bedarf alle zwei Wochen ²³⁷U zu eluieren.

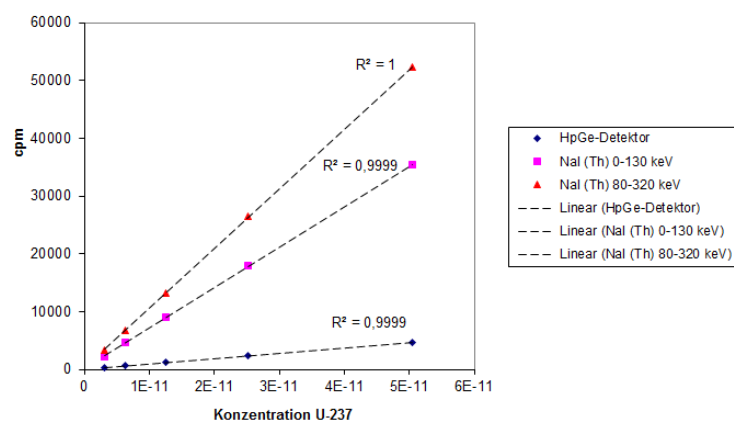


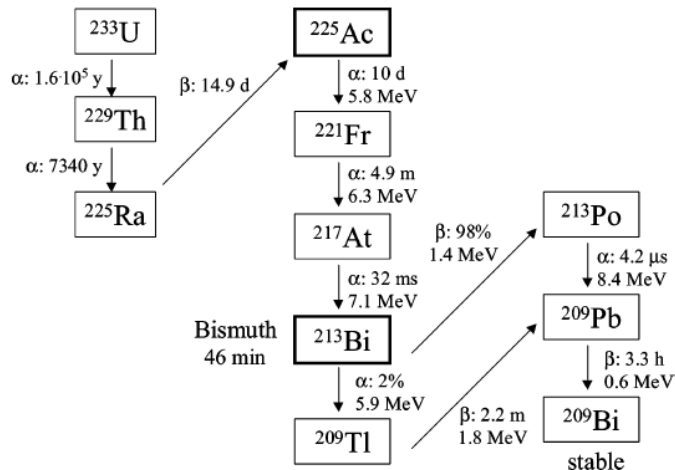
Abbildung 4.5.: Verdünnungsreihe Gammaspektrometrie von ²³⁷U

4.1.3. Das Radionuklid ²²⁵Ac

²²⁵Ac kann aus der Zerfallsreihe des ²³³U isoliert werden (Abbildung 4.6) oder mittels sukzessiver (n,γ) Kernreaktionen ausgehend von ²²⁶Ra, aus dem mittels Neutronenbestrahlung ²²⁹Th hergestellt werden kann. Es gibt drei Quellen an ²²⁵Ac, welche für klinische Zwecke genutzt werden:

- Institut für Transurane (ITU)
- Oak Ridge National Laboratory (ORNL)
- Staatlich Wissenschaftliches Zentrum der Russischen Föderation - Physikalisch-energetisches Institut A. I. Leipunsky (IPPE)

Bei den beiden erstgenannten Quellen handelt es sich um ²²⁹Th, welches aus in U.S. Kernreaktorprogrammen anfallendem ²³³U isoliert wurde. Hieraus kann ²²⁵Ac trägerfrei isoliert werden.

Abbildung 4.6.: Zerfallsreihe von ^{233}U [27]

^{225}Ac kann durch Extraktionsprozesse aus ^{229}Th ($T_{\frac{1}{2}} = 7340$ Jahre) isoliert werden. Die ^{229}Th Quelle, welche am ITU verfügbar ist, enthält 45.6 mCi. Hieraus können alle neun Wochen 43.2 mCi ^{225}Ra ($T_{\frac{1}{2}} = 14.8$ Tage) und 39.4 mCi ^{225}Ac ($T_{\frac{1}{2}} = 9.9$ Tage) isoliert werden.[27] Zur Abtrennung von $^{225}\text{Ra}/^{225}\text{Ac}$ wurde eine Ionen-austauschprozedur angewendet. Die Thorium-Quelle, die aus 500 mL des Dowex 1×8 Anionenaustauschers besteht, welcher mit 8 M HNO_3 konditioniert ist, wurde 5-6 mal mit 100 ml 8 M HNO_3 gewaschen. Die vereinigten Waschlösungen, die ^{225}Ra , ^{225}Ac und 3-5% von $^{229}\text{Th}/^{232}\text{Th}$ enthalten, wurden fast bis zur Trockene eingengt, mit 20 ml 8 M HNO_3 wieder aufgenommen und filtriert um organische Rückstände zu entfernen. Ein Anionenaustauscher (Dowex 1 8, 80 mL) wurde mit dem Filtrat beladen und $^{225}\text{Ra}/^{225}\text{Ac}$ konnten durch Waschen des Austauschers mit 250-300 ml 8 M HNO_3 eluiert werden. Das Eluat wurde fast bis zur Trockene eingengt und mit ~ 10 ml 4 M HNO_3 für die anschließende Radium/Actinium-Trennung wieder aufgenommen. Das Thorium auf dem Anionenaustauscher konnte nach Elution mit 500 ml 0.05 M HNO_3 eluiert werden und wurde nach Einengung und Wiederaufnehmen mit 8 M HNO_3 der Thoriumquelle wieder zugeführt.[27, 28]

Die Trennung von ^{225}Ac von ^{225}Ra erfolgte mittels Extraktionschromatographie. Es basiert auf der Anwendung des UTEVA Extraktionschromatographieharzes um Restspuren von Thorium zu entfernen, kombiniert mit der Anwendung von DGA. Hierfür wurde je eine BioRad Kolonne mit UTEVA (0.9 ml, trocken befüllt, mit Glaswolle bedeckt) und mit DGA (0.6 ml, bereits vorkonditioniert, mit einer Fritte bedeckt) gepackt und mit 4 M HNO_3 konditioniert. Die Kaskade wurde mit der Ra/Ac Lösung beladen und mit 4 M HNO_3 gewaschen. Das Ac blieb somit an der DGA Kolonne adsorbiert, das Ra wurde eluiert. Nach Entkopplung wurde die DGA Kolonne nochmals mit 4 M HNO_3 bis zur Farblosigkeit des Eluats gewaschen. Zur Elution des ^{225}Ac wurde die DGA-Kolonne zunächst mit dem halben Bettvolumen (300 μl) 0.1 M HCl für 15 Minuten eingeweicht, bevor ^{225}Ac in zwei Fraktionen à 500

μl 0.1 M HCl eluiert werden konnte. Die beiden Fraktionen wurden vereinigt und bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 20 μl 0.1 M HCl aufgenommen.

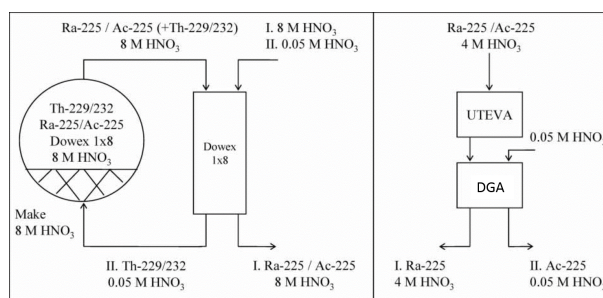


Abbildung 4.7.: Anionenaustauschprozedur zur Abtrennung von ^{225}Ra und ^{225}Ac von ^{229}Th (links) Extraktionschromatographie zur Abtrennung von ^{225}Ac von ^{225}Ra und Feinreinigung von ^{225}Ac (rechts)[28]

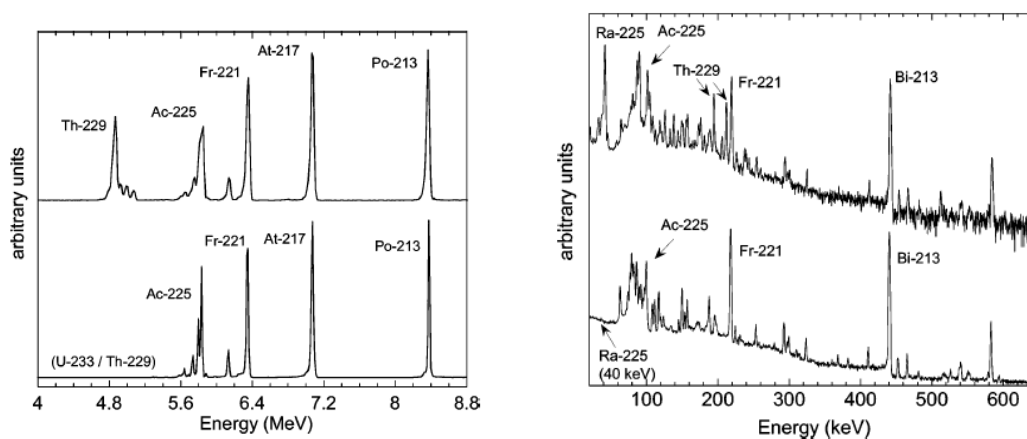


Abbildung 4.8.: linke Seite: α -Spektrum der ^{229}Th Quelle (oben) und des isolierten ^{225}Ac (unten); rechte Seite: γ -Spektrum der ^{229}Th Quelle (oben) und des isolierten ^{225}Ac (unten) [27]

4.2. Chelatoren

DCP

DCP wurde als 1,10-Phenanthrolin-2,9-dicarboxylsäure Monohydrat, 98% von der Firma *Alfa Aesar* erhalten.

DCP-NCS

DCP-NCS (5-Isothiocyanato-1,10-phenanthrolin-2,9-dicarboxylsäure) wurde nach Abbildung 3.13 von Vidaud et al. hergestellt. Der Extinktionskoeffizient wurde in

10 mM HEPES-Puffer mit 5% DMF bei pH 7.4 bestimmt. Hierzu wurde nach Einwaage von 0.3 mg DCP-NCS eine Verdünnungsreihe bestehend aus 6 verschiedenen Proben angesetzt.

BCPDA

BCPDA (4,7-Bis(chlorosulfophenyl)-1,10-phenanthrolin-2,9-dicarboxylsäure) wurde nach der Synthese aus Abbildung 3.15 im eigenen Arbeitskreis hergestellt.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei pH 7.4 wurden 0.18 mg der Substanz in DMF gelöst. Es wurden Verdünnungen in 10 mM HEPES-Puffer bei pH 7.4 mit einem jeweiligen Volumenanteil von 5 % DMF angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.36 dargestellt.

DOTA-NCS

DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) wurde von *Fluka/Sigma-Aldrich* bezogen und sein bifunktionalisiertes Derivat DOTA-NCS (2-(p-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) wurde von *Macrocycles* erhalten.

4.3. Der Antikörper MabThera®

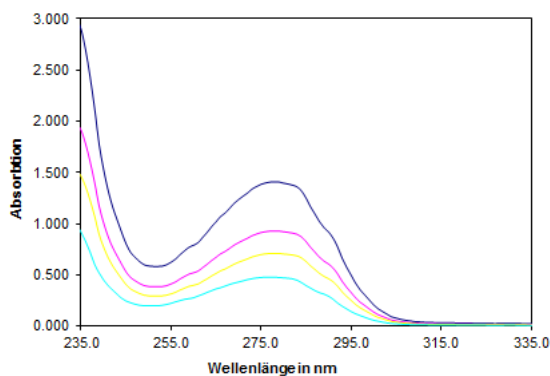


Abbildung 4.9.: Extinktionskoeffizient von MabThera®

Der Antikörper MabThera® wurde von der Firma *Roche* erhalten. MabThera® bindet als therapeutischer Antikörper gezielt an das Molekül CD20 auf der Oberfläche von B-Zellen. Sein Extinktionskoeffizient wurde anhand einer Verdünnungsreihe auf $\epsilon(280 \text{ nm}) 1.4 \frac{\text{ml}}{\text{mg}\cdot\text{cm}}$ bestimmt.

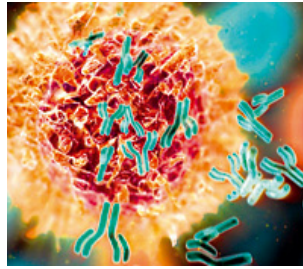


Abbildung 4.10.: Der Antikörper MabThera® [29]

4.4. Die Zelllinie K422

Die Zelllinie K422 wurden in Kultur vom *DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* erhalten. Die K422 Zelllinie wurde in einem Zellmedium (RPMI-1640 mit 20 % FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin) in Suspension kultiviert. Alle zwei Tage wurden die Zellen so verdünnt, dass ihre Konzentration 10^6 Zellen/ml nicht überstieg. Die Konzentration und die Viabilität konnte mit dem Vi-Cell Counter der Firma *Beckmann, Coulter Inc.* gemessen werden.

5. Methoden

5.1. UV-Spektroskopie

Die UV-Spektroskopie diente in der Arbeit als wichtiges Analyseinstrument.

- Mit ihrer Hilfe konnte das Verhältnis von Ligand zu Antikörper (L/mAb) nach erfolgreicher Chelatierung von MabThera® mit DCP-NCS bzw. BCPDA bestimmt werden. Hierzu wurden von den einzelnen Komponenten zunächst die Extinktionskoeffizienten ermittelt. Diese sind bei den jeweiligen Reaktanden aufgeführt.
- Die Protonierungskonstanten von BCPDA wurden anhand der Absorptionsänderung bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht.

Die Spektren wurden mit dem Gerät *Ultrospec 2100 pro* der Firma *GE Healthcare* aufgenommen. Die verwendete Software war *Wavescan* und *Swift II*.

5.2. Extraktionschromatographie

5.2.1. TEVA

Die aktive Komponente des TEVA (TetraValents Actinides) Harzes ist ein quarternäres Ammoniumsalz. Es besitzt ähnliche Eigenschaften wie ein stark basischer Anionenaustauscher. Da die funktionellen Gruppen jedoch in flüssiger Form vorliegen, besitzen sie eine große Flexibilität um Anionen zu fixieren. In Abbildung 5.2 ist die Retention von TEVA in Abhängigkeit der Säurekonzentration dargestellt.

Tetravalentes Plutonium, Neptunium und Thorium zeigen ein Maximum der Retention in 2-4 M HNO₃. In diesem Konzentrationsbereich werden hexavalentes Uran und trivalentes Americium nicht fixiert. Der Unterschied im Verteilungskoeffizient in den Medien HNO₃ und HCl kann zur Abtrennung des Thorium von

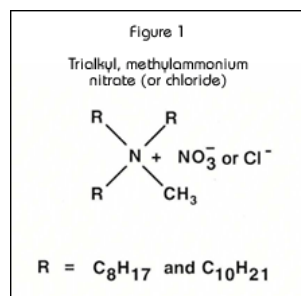


Abbildung 5.1.: Struktur von TEVA[30]

anderen Actiniden verwendet werden. Wird die Probenlösung in 4 M HNO_3 auf die TEVA Säule gegeben, so werden Pu(IV), Th(IV) und Np(IV) zurückgehalten. Th kann mit 6 M HCl eluiert werden, während Pu(IV) und Np(IV) unter diesen Bedingungen auf der Säule fixiert bleiben. Nachdem Pu(IV) zu Pu(III) reduziert worden ist, kann dieses mit 4 M HNO_3 oder 8 M HCl eluiert werden. Somit ist TEVA geeignet, tetravalente Actiniden von anderen zu trennen.[30]

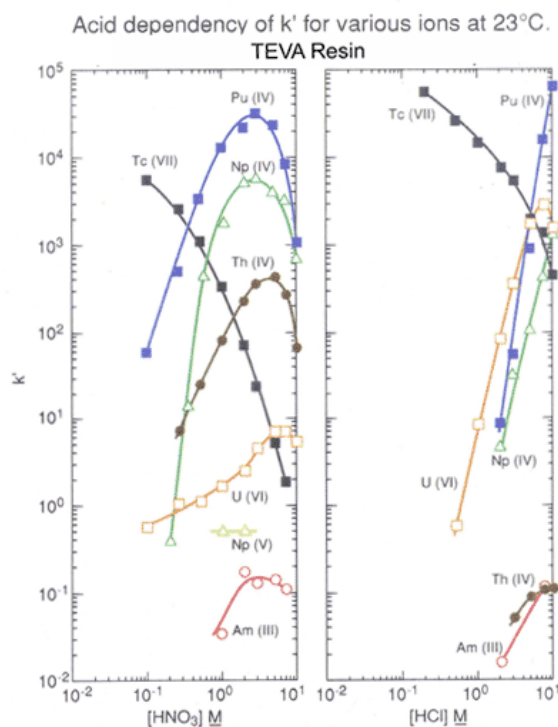


Abbildung 5.2.: Kapazitätsfaktor k' von TEVA verschiedener Actinide in Abhängigkeit von der Salpeter- und Salzsäurekonzentration

5.2.2. UTEVA

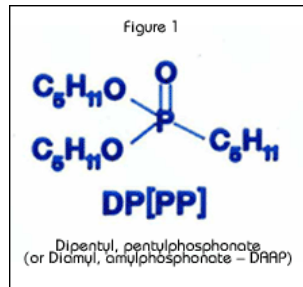


Abbildung 5.3.: Struktur von UTEVA [31]

Das Extraktionsmittel in UTEVA (Uranium und TetraValents Actinides) ist DPPP (Dipentyl Pentylphosphonate), welches mit Actiniden Nitratokomplexe bildet. Die Bildung dieser Nitratokomplexe ist abhängig von der Nitratkonzentration in der Probenlösung. Je höher die Nitratkonzentration, desto besser die Extraktion der Actiniden. Abbildung 5.4 zeigt diese Retention in Abhängigkeit der Säurekonzentration. Der Abbildung kann entnommen werden, dass die Retention für die tetravalenten Actiniden und für hexavalentes Uran sehr ähnlich sind. Sie weisen alle oberhalb 5 M HNO_3 hohe Kapazitätsfaktoren auf ($k' > 100$). Americium hingegen wird in salpetersaurem Medium nicht fixiert. Diese Tatsache ist für die Entwicklung von analytischen Trennmethode von hoher Bedeutsamkeit. Plutonium kann z.B. zu Pu(III) reduziert werden, verhält sich somit ähnlich wie Am(III) und kann so leicht von tetravalenten Actiniden und hexavalentem Uran abgetrennt werden, da dieses sich nicht an UTEVA fixiert.

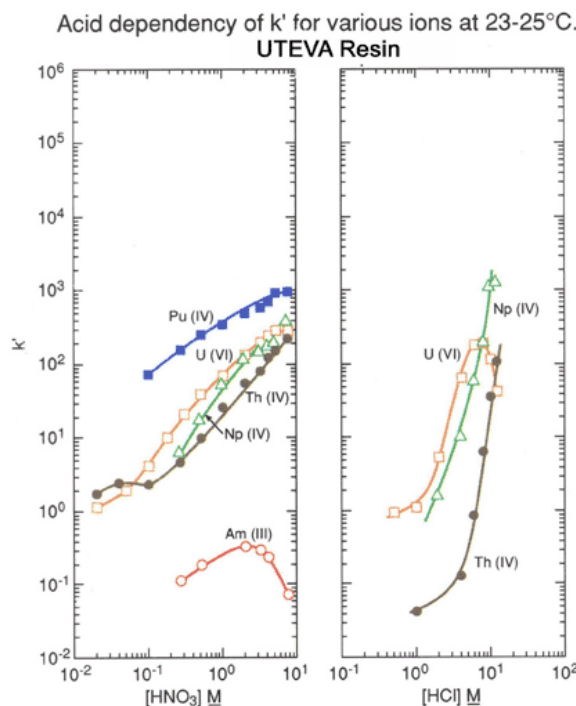


Abbildung 5.4.: Kapazitätsfaktor k' von UTEVA verschiedener Aktinide in Abhängigkeit von der Salpeter- und Salzsäurekonzentration[31]

5.3. Dünnschichtchromatographie (ITLC)

Die ITLC (Instant Thin Layer Chromatography) ist eine Trennmethode, bei der es zu einer Auftrennung der in der Probe aufgetragenen Komponenten kommt. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Adsorption der Komponenten zur festen Phase (ITLC Streifen) und deren unterschiedlichen Löslichkeit in der mobilen Phase (Laufmittel). [32] Angewendet wurde ITLC-SG Papier (Glass microfiber chromatography paper impregnated with silicic acid) der Firma *Varian*. Zur Trennung wurde eine geringe Menge der zu untersuchenden Probenlösung 1 cm über dem unteren Rand auf einen ITLC-Streifen (1.5 cm·8 cm) aufgetragen. Anschließend wurde der Streifen in einer Entwicklungskammer mit einem geeigneten Laufmittel entwickelt. Aufgrund der Kapillarkräfte wandert die mobile Phase langsam den ITLC-Streifen aufwärts. Sobald die mobile Phase den Punkt der aufgetragenen Probenlösung erreicht, stellt sich für jede in der Probe enthaltene Komponente ein Gleichgewicht zwischen den adsorbierten Molekülen der festen Phase und den Molekülen in Lösung ein. Die unterschiedlichen Komponenten variieren in ihrer Löslichkeit und der Stärke der Adsorption zum ITLC-Streifen, so dass die Komponenten unterschiedlich

mit der mobilen Phase mitwandern. Hat die mobile Phase das obere Ende des Streifens erreicht, so wird der Streifen aus der Entwicklungskammer entfernt und an einer markierten Stelle mit der Schere zerschnitten. Beide Stücke wurden mittels Gammaskopmetrie im Gamma Counter *Wizard 2480* gemessen.

Diese Methode wurde für folgende Systeme angewendet:

Komponente	R _f -Wert in 0.9% NaCl : MeOH	R _f -Wert in 0.05 M Na-Citrat
U(VI)	0	0.9
U(VI)-BCPDA	0.7	0
U(VI)-DCP	0.7	0
U(VI)-DPDCP	0.7	0
U(VI)-DCP-mAb	0	0
U(VI)-BCPDA-mAb	0	0
Ac(III)	-	0.9
Ac-DOTA-mAb	-	0

5.4. Autoradiographie

Von jedem Medium wurde zur Feststellung des R_f-Wertes eine Autoradiographie durchgeführt. Dazu wurden die bereits entwickelten ITLC-Streifen nicht zerteilt, sondern nach Trocknung ~12 Stunden auf einer Phosphorplatte entwickelt. Die Visualisierung erfolgte mit dem *Personal FX* Scanner und der Software *Quantity One* (*BioRad*).

5.5. AG MP-50

AG MP-50 ist ein makroporöses sehr saures Kationenaustauscherharz. Eine Kolonne von BioRad wurde mit 0.5 ml des Kationenaustauschers befüllt (konditioniert in 0.1 M NaClO₄, pH 4). Die Kolonne wurde mit der Probenlösung beladen und anschließend dreimal mit 0.5 ml 0.1 M NaClO₄ gewaschen um das U(VI), welches am Ligand BCPDA gebunden ist und somit nicht vom Austauscher adsorbiert wird, zu eluieren. Anschließend wurde die Kolonne dreimal mit je 0.5 ml 6 M HCl gewaschen um das U(VI), welches vom AG MP-50 adsorbiert wurde zu eluieren, indem es mit den Protonen ausgetauscht wurde. Die Abbildungen zeigen die Aktivitätsverteilung in den unterschiedlichen Fraktionen. Die Methode eignete sich um den "freien" Anteil an U(VI) und den Anteil des U(VI), welcher an den Liganden BCPDA gebunden ist, zu untersuchen.

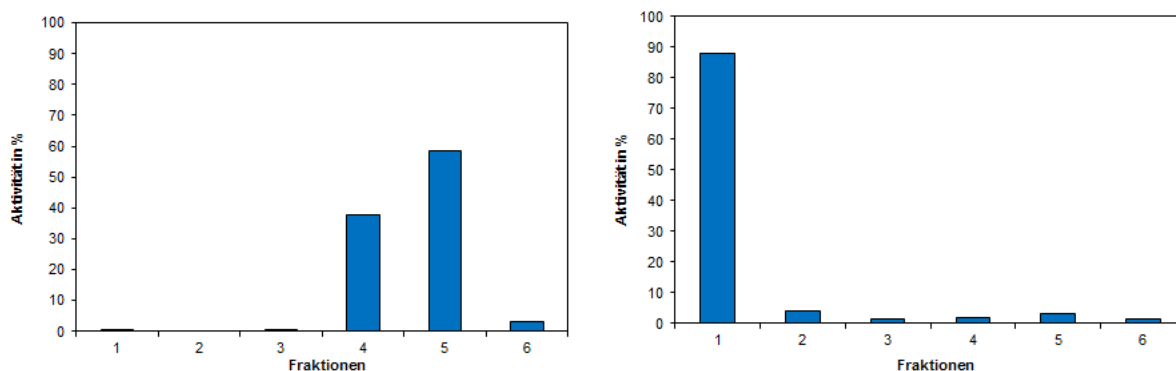


Abbildung 5.5.: Aktivitätsverteilung von AG MP-50

Größenausschlusschromatographie PD-10 Die fertig gepackten PD-10 Säulen der Firma *Amersham Biosciences* sind zur schnellen Probenreinigung von Proteinen und anderen großen Biomolekülen wie z. B. monoklonalen Antikörper geeignet. Sie können zur Entsalzung, zur Umpufferung oder zur Entfernung von Unreinheiten mit niedrigem Molekulargewicht genutzt werden. Die Technik basiert auf einer Gelfiltration. Das Medium Sephadex-25 ermöglicht die rasche Trennung von Komponenten mit hohem Molekulargewicht (> 5000 g/mol) von Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht, wie z. B. Salze oder dem ungebundenen Radionuklid.[33] Zunächst wurde die Säule mit Phosphate Buffered Saline (PBS-Puffer) konditioniert. Nach Beladung mit der zu reinigenden Probe, wird die Kolonne bis zum Erreichen des "Totvolumens" von 2.9 ml mit PBS gewaschen. Dabei werden Moleküle, die größer als die Poren des Sephadex sind, zuerst eluiert und Moleküle, die kleiner als die Poren sind, dringen in die Matrix ein und werden dementsprechend langsamer eluiert. Der radiomarkierte Antikörper konnte im darauffolgenden ml PBS nach dem Totvolumen eluiert werden.

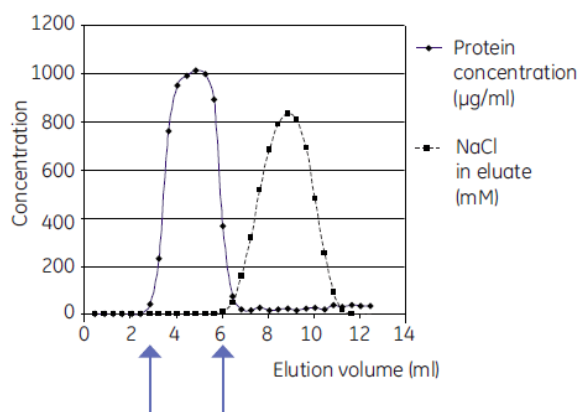


Abbildung 5.6.: Elutionsprofil für die Aufreinigung einer proteinhaltigen Probe[33]

5.6. PhreeqC

PhreeqC ist ein Computerprogramm um chemische Reaktionen und Transportprozesse in wässrigen Lösungen zu berechnen. Das Programm basiert auf chemischen Gleichgewichtsreaktionen in wässrigen Lösungen, welche mit Mineralien, Gasen, Austauschern und Sorptionsoberflächen in Wechselwirkung treten. Außerdem kann es kinetische Reaktionen mit Hilfe benutzerspezifischer Ratenkonstanten modellieren. Eine erweiterbare chemische Datenbank erlaubt die Modellierung von fast jeder chemischen Reaktion, welche bekannt ist um die Qualität des Regen- und des Grundwassers zu beeinflussen. PhreeqC kann genutzt werden um die Speziesverteilung wässriger Lösungen zu berechnen.

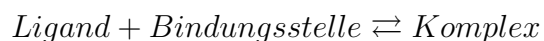
5.7. Scatchard Analyse

Der Scatchard Plot ist eine Linearisierung der experimentellen Ergebnisse der Zellbindungsstudie. Dabei wird das Verhältnis von gebundenem über freiem ²²⁵Ac-MabThera® auf der Y-Achse gegen die Konzentration des gebundenen Antikörpers auf der x-Achse aufgetragen. Am x-Achsenabschnitt kann die maximale Anzahl an Bindungsstellen B_{max} abgelesen werden. Hieraus kann die Anzahl der bindenden Antigene (Ag) pro Zelle abgeleitet werden. Aus der Steigung der Scatchard-Analyse kann die Bindungsaffinität K_a bzw. die Dissoziationskonstante K_d erhalten werden. K_d gibt einen Hinweis auf die Stärke der Bindung vom Antikörper zum Antigen. Je weniger Antikörper erforderlich ist, um den Antikörper-Antigen-Komplex zu bilden, umso stärker ist die Bindungsaffinität und umso kleiner ist K_d .

Die Scatchard Analyse ist eine Methode um Daten aus einer Sättigungsbindungsstudie zu linearisieren, mit dem Ziel Bindungskonstanten zu untersuchen. Dabei werden folgende Annahmen gemacht. [34]

- Alle Rezeptoren sind äquivalent und somit gleichermaßen zur Bindung verfügbar.
- Es gibt keine partielle Bindung, d.h. alle Rezeptoren oder Bindungsstellen sind entweder gebunden oder frei.
- Die Bindung ist reversibel.

Grundlegend hierbei ist zunächst das folgende chemische Gleichgewicht:



Hieraus können die Assoziationskonstante K_a bzw. die Dissoziationskonstante K_d abgeleitet werden:

$$K_a = \frac{1}{K_d} \frac{[\text{Komplex}]}{[\text{Ligand}(\text{frei})] \cdot [\text{Bindungsstelle}(\text{frei})]} = \frac{[B]}{[L] \cdot (B_{max} - [B])}$$

dabei gilt:

Komplex [B]: Antikörper-Antigen-Komplex

Freier Ligand [L]: Radiomarkierter Antikörper

B_{max} : Gesamtzahl an Bindungsstellen (Rezeptor, Antigen auf der Zelloberfläche)

Freie Bindungsstelle: $[B_{max}-B]$

Für die Scatchard-Analyse wird mittels Bindungsstudie der Anteil an [B] (zellgebundener Ligand) und [L] (freier Ligand) gemessen.

Durch Umformung von

$$K_a = \frac{[B]}{[L] \cdot (B_{max} - [B])}$$

ergibt sich

$$\frac{[B]}{[L]} = K_a([B_{max}] - [B])$$

und somit

$$\frac{[B]}{[L]} = K_a[B_{max}] - K_a[B].$$

Durch Auftragung von $\frac{[Komplex]}{[Ligand(frei)]}$ vs. $[Komplex]$ kann anhand der Steigung K_a bzw. $\frac{1}{K_d}$ abgelesen werden.

6. Experimente

6.1. Chelatierung der Antikörper

Blindversuch: Freies U(VI) und der Antikörper MabThera® Um sicher zu stellen, dass sich freies ^{237}U nicht an funktionelle Gruppen des monoklonalen Antikörpers MabThera® anlagert wurde folgender Blindversuch durchgeführt: 150 μg MabThera® wurde mit konditionierter ^{237}U Lösung (pH 8) versetzt und mittels ITLC-SG in 0.05 M Na-Citrat-Lösung (pH 5.5) über einen Zeitraum von 24 h analysiert.

DCP-NCS mit MabThera® Die Bildung des Konjugates geschieht durch Bildung einer Thioharnstoffgruppe durch Reaktion der Isothiocynatgruppe am DCP-NCS mit einer Aminogruppe am monoklonalen Antikörper. Zur Chelatierung wurde eine Lösung MabThera® in Na_2CO_3 bei pH 9 angesetzt. Die Konzentration der Lösung wurde mit Hilfe seines Extinktionskoeffizienten auf $1.28 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ bestimmt. Desweiteren wurden für eine Ligandenlösung 0.24 mg DCP-NCS eingewogen und zunächst in 100 μl DMF ($c = 7.38 \cdot 10^{-3}$ M) gelöst. Um einen achtfachen Überschuss von Chelat zu Antikörper (L/mAb) zu erhalten, wurden von der Ligandenlösung 9.2 μl entnommen und in 900 μl Na_2CO_3 -Puffer (pH 9) gegeben. Diese wurde langsam zur MabThera®-Lösung zugegeben und das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung mittels Amicon Ultra-4 Zentrifugeneinheiten mit 30 kDa der Firma *Millipore* in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) umgepuffert. Die Bestimmung der Konzentration und die Anzahl an Ligand pro Antikörper wurde mittels UV-Spektroskopie untersucht und ist in Abbildung 7.35 dargestellt. Der chelatierte Antikörper wurde bei 4 °C gelagert.

BCPDA mit MabThera® Für die Chelatierung des Antikörpers MabThera® mit BCPDA wurde eine Lösung MabThera® in Na_2CO_3 bei pH 9 mit einer Konzentration von $2.6 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ hergestellt. Für die BCPDA-Lösung wurden 0.33 mg des Liganden eingewogen und in 100 μl DMF ($c = 4.84 \cdot 10^{-3}$ M) gelöst. Für einen zehnfachen Überschuss von Chelat zu Antikörper, wurden 35.7 μl der BCPDA-Lösung in 200 μl Na_2CO_3 -Puffer (pH 9) gegeben. Diese Pufferlösung wurde langsam unter Rühren zur MabThera®-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und am nächsten Tag mittels Amicon Ultra-4 Zentrifugationseinheiten mit 30 kDa

in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7.4) umgepuffert. Um die Anzahl an Ligand pro Antikörper zu bestimmen, wurde das Produkt mit UV-Spektroskopie (Abbildung 7.37) untersucht.

DOTA-NCS mit MabThera® Die Chelatierung des monoklonalen Antikörpers MabThera® basiert auf der chemischen Bindung des bifunktionalisierten Chelators an den Antikörper. Im Falle des DOTA-NCS bildet sich zwischen der Thiocyanatgruppe und einer Aminogruppe am Antikörper unter Bildung einer Thioharnstoffgruppe eine stabile Bindung aus (siehe Kapitel 3.4.2). Um 3-6 Chelatoren an den Antikörper zu binden, wurde folgendes Protokoll verwendet:

Zur Aufkonzentrierung und Umpufferung wurden Amicon Ultra-4 Zentrifugeneinheiten verwendet. 1 ml MabThera® (10 mg/ml) wurde mit 3 ml 0.05 M NaHCO₃ / 0.15 M NaCl Lösung versetzt und solange zentrifugiert, dass 1 ml im Filter verblieb. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Antikörper mit einem 15-fachen Überschuss an DOTA-NCS, gelöst in 0.05 M NaHCO₃ / 0.15 M NaCl, versetzt und die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde der chelatierte Antikörper mit Hilfe der Amicon Ultra-4 Zentrifugeneinheiten in 0.05 M NaOAc/0.15 M NaCl umgepuffert, indem 4 Mal mit 3 mL des Puffers gewaschen wurde. Zum Schluss wurde der chelatierte Antikörper in einem Totalvolumen von 1000 µl 0.05 M NaOAc/0.15 M NaCl aufgenommen und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die Konzentration des Antikörpers konnte nach erfolgreicher Chelatierung mit Hilfe von UV-Spektroskopie oder des kolorimetrischen Bio-Rad Protein Assays ermittelt werden.

6.2. Charakterisierung verschiedener U(VI)-DCP Derivate

6.2.1. Charakterisierung der Komplexe

Röntgenstrukturanalyse

Ausgewählte Einkristalle wurden in Kapillaren eingeschlossen und auf einem *Siemens SMART CCD 1000* Diffraktometer justiert. Eine komplette Ewaldsphäre Daten wurde mit Omega-Scan-Technik ($\Delta\omega = 0.45^\circ$) gesammelt bei Bestrahlungszeiten zwischen 10 und 40 s pro Frame und einem maximalen 2θ -Bereich von etwa 56.5° . Integration erfolgte mit SAINT.[35] Die Daten sind Lorentz- und Polarisationskorrigiert. Eine experimentelle Absorptionskorrektur mit SADABS wurde durchgeführt.[36] Die Strukturlösung erfolgte mit direkten Methoden, die Verfeinerung via kleinste Fehlerquadratsumme mit dem Programmpaket SHELX-97 und SHELX-2013.

Die ^1H und ^{13}C -NMR Spektren wurden jeweils bei 399.91 MHz Protonenfrequenz mit einem *Varian Inova Unity 400* Spektrometer und der Software *VNMRJ*, 3.2) oder mit einem *Bruker Avance 250* Spektrometer und der Software *Topspin* aufgenommen. Die Spektren wurden gegen das Lösungsmittel als internen Standard referenziert (Restprotonensignal im deuterierten Lösungsmittel bzw. die ^{13}C -Resonanz des Lösungsmittels).

IR

Die IR-Spektren wurden mit einem *2000 FT-IR* Spektrophotometer von *Perkin und Elmer* aufgenommen. Die Proben wurden in KBr (für MIR-Messungen) oder Polyethylen (für FIR-Messungen) verpresst und als Pressling gemessen.

UV-Vis

Ein *Perkin und Elmer Lambda 9 UV/Vis/NIR* Spektrophotometer wurde genutzt, um die Absorptionsspektren aufzunehmen. Flüssigkeiten wurden in Quartzküvetten mit 1 cm optischer Weglänge gemessen. Feststoffe wurden mit Teflon vermengt und als Pressling gemessen.

6.2.2. Herstellung der Komplexe

UO₂-DCP·DMSO $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7.2 mg, $1.7 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.0 eq) wurde in 1 ml DMSO gelöst und mit 0.5 ml einer Lösung mit DCP (4.55 mg, $1.7 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.0 eq) versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde durch Erhitzen in Lösung gebracht und die Lösung wurde zur Auskristallisierung des Komplexes anschließend langsam in einem Dewar abgekühlt. Es bildeten sich Kristalle in Form von Prismen. Im überstehenden Lösungsmittel konnte durch Zugabe von H_2O eine Nachfällung erreicht werden. Die Gesamtausbeute der Kristalle war quantitativ.

Eine weitere Möglichkeit der Herstellung war die Verwendung von $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (30.6 mg, $6.09 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.0 eq), gelöst in 0.5 ml DMSO und DCP (16.06 mg, $6.00 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.0 eq), gelöst in 1 ml DMSO. Die beiden Lösungen wurden zusammengegeben und es bildete sich sofort ein Niederschlag des Adduktes UO₂-DCP·DMSO. Der Niederschlag wurde durch Erhitzen in Lösung gebracht und anschließend langsam in einem Dewar abgekühlt. Es bildeten sich quantitativ Kristalle, die nach Isolierung mit Röntgenstrukturanalyse, UV-Vis-Spektroskopie, NMR und IR-Spektroskopie analysiert wurden. Die Ergebnisse werden in Kapitel 7.3.3.1 besprochen.

[UO₂-DCP]_n Zur Herstellung des Polymers [UO₂-DCP]_n wurden in einem Extraktionsverfahren, wie in Abbildung 6.1 gezeigt, $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100.45 mg, $2.3 \cdot 10^{-4}$ mol, 1.0 eq) in 25 ml MeOH vorgelegt und erhitzt. Auf die Fritte wurde

der Ligand DCP (61.7 mg, $2.3 \cdot 10^{-4}$ mol, 1.0 eq) gegeben. Das DCP wurde langsam vom MeOH gelöst und tropfte zum Uranylion hinzu. Es bildeten sich die Kristalle des Polymers im Vorlagekolben.

Die Kristalle wurden isoliert und mittels Kristallstrukturanalyse charakterisiert. Die Ergebnisse werden in Kapitel 7.3.3.2 besprochen.

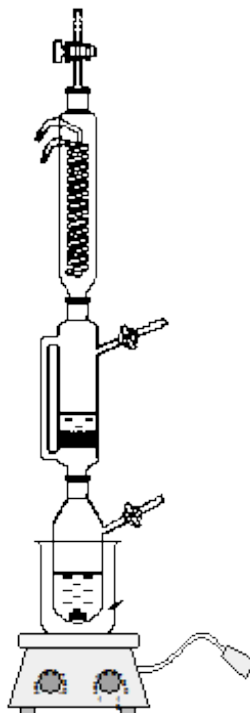


Abbildung 6.1.: Extraktionsapparatur zur Herstellung des Polymers und des Trimers

UO₂-DCP·NaOAc Zur Herstellung des anionischen Adduktes UO₂-DCP·NaOAc wurde UO₂-DCP·DMSO (22.8 mg, $3.69 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.0 eq) in DMSO gelöst und eine Lösung von NaOAc (5.78 mg, $4.23 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.1 eq) in DMSO zugefügt. Das Gesamtvolumen betrug 1.2 ml. Es bildete sich das anionische Addukt UO₂-DCP·NaOAc. Um Kristalle zu erhalten, wurde der Niederschlag zunächst erhitzt und schließlich wieder langsam abgekühlt. Die Ausbeute war quantitativ. Spektroskopische und strukturelle Eigenschaften sind in Kapitel 7.3.3.3 dargestellt.

UO₂-DCP·Guanidinium Acetat Zur Herstellung dieses anionischen Adduktes wurde [UO₂-DCP]_n (21.16 mg, $3.9 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.0 eq) in 0.5 ml DMSO gelöst, eine Lösung von Guanidin Acetat (4.70 mg, $3.9 \cdot 10^{-5}$ mol, 1.0 eq), gelöst in 1 ml DMSO, gemischt. Nach Erhitzen des gebildeten Niederschlags wurde das anionische Addukt UO₂-

DCP·Guanidinium Acetat quantitativ gebildet. Die Charakterisierung mit Röntgenstrukturanalyse und NMR ist in Kapitel 7.3.3.4 wiedergegeben.

UO₂-DPDCP·DMSO Zur Herstellung des Adduktes UO₂-DPDCP·DMSO wurde UO₂(NO₃)₂ · 6H₂O (23.43 mg, 4.7·10⁻⁵mol, 1.0 eq) in 1 ml DMSO gelöst und mit DPDCP (19.43 mg, 4.6·10⁻⁵mol, 1.0 eq), gelöst in 0.5 ml DMSO, versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde durch Erhitzen wieder in Lösung gebracht, um durch langsames Abkühlen in einem Dewar Kristalle in quantitativer Ausbeute zu erhalten. Diese wurden nach Isolierung analysiert und charakterisiert.

[UO₂-DPDCP]₄ Analog zur Synthese des Polymers [UO₂-DCP]_n wurde mit Hilfe einer Extraktionsapparatur das Tetramer [UO₂-DPDCP]₄ hergestellt. UO₂(NO₃)₂ · 6H₂O (98.78 mg, 1.97·10⁻⁴mol, 1.0 eq) wurde in 20 ml MeOH in einer Extraktionsapparatur mit Fritte in einem Kolben vorgelegt und die Lösung wurde unter Rückfluss erhitzt. Durch das Methanol wurde auf der Fritte platziertes DPDCP (83.21 mg, 1.97·10⁻⁴mol, 1.0 eq) gelöst und langsam in den Vorlagekolben getropft. Auf diese Weise bildeten sich quantitativ die Kristalle des Tetramers [UO₂-DPDCP]₄. Nach Isolierung wurden die Kristalle mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR analysiert und charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Kapitel 7.3.3.6 erläutert.

UO₂-DPDCP·DMAA [UO₂(CH₃COO)₂ · 2H₂O (18.34 mg, 4.3·10⁻⁵mol, 1.0 eq) und DPDCP (18.42 mg, 4.4·10⁻⁵mol, 1.0 eq) wurden jeweils in 0.5 ml DMAA gelöst und anschließend vereinigt. Nachdem der gebildete Niederschlag durch Erhitzen wieder in Lösung gebracht wurde, konnten Kristalle mit obiger Zusammensetzung nach langsamem Abkühlen zur Charakterisierung isoliert werden. Spektroskopische und strukturelle Eigenschaften siehe Kapitel 7.3.3.5.

UO₂-DPDCP·DMAA (Ethanol) Die Synthese erfolgte analog zu UO₂-DPDCP·DMAA. Jedoch wurde nach Erhitzen der Lösung 50 µl EtOH hinzugefügt um eine bessere Kristallisation des Adduktes zu erreichen. Die Charakterisierung der isolierten Kristalle erfolgte mittels Kristallstrukturanalyse und NMR. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

6.3. Säurekonstanten von BCPDA

Anhand der Variation des pH-Wertes und der damit verbundenen Veränderung der Absorption wurden die pKs-Werte von BCPDA bestimmt. Die UV-Spektren wurden mit dem UV-Spektrometer *Ultrospec 2100 pro* der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* und der Software *Wavescan* aufgenommen. Für die pH Messungen wurde

eine pH Elektrode *Lab 850* der Firma *Schott Instruments* verwendet. Die pH Elektrode wurde vor der Titration durch Verwendung von Puffern pH 4.00 und pH 7.00 kalibriert.

Eine Küvette mit 2 ml ($2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) BCPDA-Lösung wurde vorbereitet. Der pH Wert wurde im Bereich von 1.6 - 7.1 durch Zugabe von kleinen Mengen HClO_4 variiert. Nach jeder Zugabe wurde das System für 5 Minuten äquilibriert, bevor das UV-Spektrum aufgenommen wurde.

Die beiden Säurekonstanten von BCPDA wurden anhand der Variation der Absorption als Funktion des pH Wertes untersucht. Eine Peakentfaltung wurde mit dem Solver Module von Excel durchgeführt.

6.4. Stabilitätskonstante UO_2 -BCPDA

Die Stabilitätskonstante des Komplexes wurde mittels Tracerexperimenten untersucht. Es wurden die beiden verschiedenen Urantracer ^{237}U und ^{230}U verwendet. Gammamessungen wurden mit dem Gamma Counter *Wizard 2480* von *Perkin and Elmer* durchgeführt. Die Experimente wurden in kleinen Glasgefäßen bei den verschiedenen pH Werten 4.0 und 3.2 bei einer Ionenstärke von 0.1 M NaClO_4 durchgeführt. Um den Anteil an komplexierten U(VI) zu untersuchen wurden die beiden analytischen Methoden Instant Thin Layer Chromatography (ITLC) der Firma *Agilent Technologies* und der Kationenaustauscher AG MP-50 von *Bio Rad* verwendet.

Unterschiedliche Stoffmengen an Ligandenlösungen wurden zu den Tracern in den Glasgefäßen gegeben. Nach einer Stunde Gleichgewichtseinstellung wurde der Anteil an komplexiertem U(VI) mittels ITLC und AG MP-50 ermittelt.

6.5. UV-Spektroskopie

Das Verhältnis von Ligand zu Antikörper (L/mAb) kann anhand der Konzentrationen bestimmt werden, die anhand der Absorption der UV-Spektren ermittelt werden können. Der molare Extinktionskoeffizient von hydrolisiertem BCPDA hat bei einer Wellenlänge von 280 nm einen Wert von $24800 \pm 250 \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{cm}}$ und bei 320 nm einen Wert von $12500 \pm 350 \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{cm}}$.

Der molare Extinktionskoeffizient von DCP-NCS wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm auf $14000 \pm 400 \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{cm}}$ und bei 325 nm auf $7400 \pm 300 \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{cm}}$ bestimmt.

Die Anwesenheit von monoklonalem Antikörper, welcher bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweist, stört bei der Konzentrationsbestimmungen der Liganden bei den Wellenlängen 320 nm und 325 nm nicht.

Der Extinktionskoeffizient des monoklonalen Antikörpers MabThera® wurde auf $1.4 \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{cm}}$ bestimmt.

6.6. Stabilitätsuntersuchungen

Herstellung des Blutserums Das Blutserum wurde aus frisch entnommenem Blut hergestellt, welchem Heparin (5000 I.E. pro 9 mL Blut) zur Vermeidung der Blutgerinnung hinzugefügt wurde. Die Trennung des Serums von den zellulären Bestandteilen, den weißen und den roten Blutkörperchen, sowie den Blutplättchen erfolgte mittels Zentrifugation, bis sich ein Bodensatz gebildet hat und das überstehende Serum dekantiert werden konnte. Das Serum wurde vor der weiteren Verwendung mit *Millex GV* Filtern (0.22 µm) filtriert.

6.7. Zellbindungsexperimente

6.7.1. Isolierung von ^{225}Ac aus ^{225}Ra

Zur Isolierung von ^{225}Ac aus ^{225}Ra wurde eine Kaskade, bestehend aus einer Kolonne UTEVA über einer Kolonne DGA, verwendet.

Hierfür wurde eine BioRad Säule mit 0.9 ml UTEVA (siehe Kapitel 5.2) befüllt und nach Abdecken mit Glaswolle wurde die Säule mit 4 M HNO_3 konditioniert. Eine zweite Säule wurde mit 600 ml vorkonditioniertem DGA befüllt und mit einer Fritte abgedeckt. Die UTEVA-Säule wurde über der DGA-Säule platziert und die Kaskade wurde mit 4 M HNO_3 gewaschen. Nach Beladung der Kaskade mit der ^{225}Ra -Lösung wurde sie mit 4 M HNO_3 gewaschen. Bei dieser Prozedur wurde das ^{225}Ac an der DGA-Säule fixiert. Sobald die Aktivität auf der UTEVA-Kolonne vernachlässigbar war, wurde diese entfernt. Die DGA-Kolonne wurde anschließend solange mit 4 M HNO_3 gewaschen, bis das Eluat farblos war. Um ^{225}Ac zu eluieren, wurde die DGA-Kolonne zunächst mit 300 µl 0.1 M HCl für 30 min inkubiert. Anschließend konnte ^{225}Ac in Fraktionen à 500 µl eluiert werden. Die Fraktionen, welche das Produkt enthielten wurden bis zur Trockene eingedampft und anschließend wurde der Rückstand in 20 µl 0.1 M HCl aufgenommen.

6.7.2. Herstellung des Konjugats DOTA-MabThera®

Die Herstellung des mit DOTA chelatierten Antikörpers MabThera® basiert auf der Bindung zwischen der Thiocyanatgruppe des funktionalisierten DOTA-Chelaten mit einer Aminogruppe des Antikörpers um eine stabile Thioharnstoffbindung zu bilden.

1 ml ($c = 10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) der MabThera®-Lösung wurde mit 3 ml einem 0.05 M NaHCO_3 /0.15 M NaCl -Puffer (pH 9) versetzt. Diese Mischung wurde mit *Amicon Ultra*-Zentrifugeneinheiten (30 kDa) zentrifugiert bis 1 ml im Filter zurück blieb. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Der Chelator DOTA-NCS wurde in einem 15-fachen Überschuss im Verhältnis zum eingesetzten Antikörper in

1 ml 0.05 M NaHCO₃/0.15 M NaCl gelöst und anschließend zur Lösung des Antikörpers hinzugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Am darauffolgenden Tag wurde das Konjugat zunächst mit Hilfe der Zentrifugeneinheiten drei Mal mit 3 ml 0.05 M NaHCO₃ gewaschen und anschließend durch viermaliges Waschen mit 0.05 M NaOAc/0.15 M NaCl (pH 7.4) umgepuffert.[37] Aus vorangegangenen Untersuchungen kann entnommen werden, dass mit diesem Protokoll im Durchschnitt 3-6 Chelatoren pro Antikörper gebunden werden. Um die Konzentration des Antikörpers nach der Chelatierung zu bestimmen wurde ein kolorimetrischer Protein-Assay durchgeführt.

6.7.3. Radiomarkierung des Konjugats DOTA-MabThera® mit ²²⁵Ac

Um einen Ansatz mit 100 µg mAb auf 100 µCi ²²⁵Ac zu erhalten, wurden 11.36 µl der DOTA-MabThera®-Lösung (8.8 $\frac{mg}{ml}$ mAb) in 500 µl TRIS-Puffer (pH 9) mit 1.75 µl ²²⁵Ac in einem mikrowelleneigneten Glasröhrchen versetzt und anschließend fest verschlossen. Das Röhrchen wurde in einer Mikrowellen Synthesizer der Firma *Biotope* für 5 Minuten auf 40° C erhitzt. Die anschließende Qualitätskontrolle mittels ITLC-SG in 0.05 M Na₃-Citratlösung (pH 5.5) zeigte eine Umsetzung von 79%. Das Konjugat wurde nochmals mit Hilfe einer PD-10 Kolonne (siehe Kapitel 5.5) aufgereinigt und es wurde das Produkt mit einer radiochemischen Reinheit von 96 % erhalten. Dieses Produkt wurde für die Zellbindungsversuche weiterverwendet.

6.7.4. Untersuchung der Bindungsaffinität

Die Zellbindungsaffinität des radiomarkierten Antikörpers ²²⁵Ac-DOTA-MabThera® wurde in einer Bindungsstudie untersucht. Hierfür wurden neun Proben mit jeweils 1 · 10⁶ Zellen im entsprechenden Zellmedium mit einer ansteigenden Menge des radiomarkierten Antikörpers MabThera®, mit einer spezifischen Aktivität von 1 µCi pro µg Antikörper, versetzt und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert, dass sich ein Zellpellet bildete. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Für jede Probe wurde auch der Anteil der unspezifischen Bindung des Antikörpers an das Zellpellet untersucht, indem in einer zweiten analogen Probenreihe der hundertfache Überschuss an MabThera® zu den Zellen gegeben wurde um die Rezeptoren zu blockieren. Der Überstand, die Waschlösungen und das Pellet wurden anschließend im Gamma Counter *Wizard 2480* gemessen.

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1. Herstellung ^{230}U

^{230}U wurde aus einem Target aus ^{232}Th isoliert, welches in Ispra im Zuge der Kernreaktion



bestrahlt wurde. ^{230}U wurde aus dem ^{230}Pa nach einem Trennungsverfahren, basierend auf Adsorption an Silica-Gel und Extraktionschromatographie (siehe Abbildung 4.2) isoliert. ^{230}Pa hat eine Halbwertszeit von 17.4 Tagen und über einen β^- -Zerfall bildet sich ^{230}U mit einer Zerfallswahrscheinlichkeit von 8.4%.

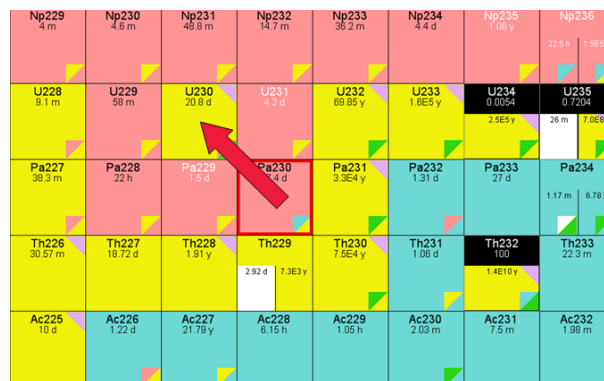


Abbildung 7.1.: Ausschnitt aus der Nuklidkarte: Bildung von ^{230}U aus ^{230}Pa mit einer Zerfallswahrscheinlichkeit von 8.4 %

Nach Isolation stellte sich innerhalb weniger Stunden in der ^{230}U -Lösung ein säkulares Gleichgewicht zwischen ^{230}U und dem Tochternuklid ^{226}Th ein.

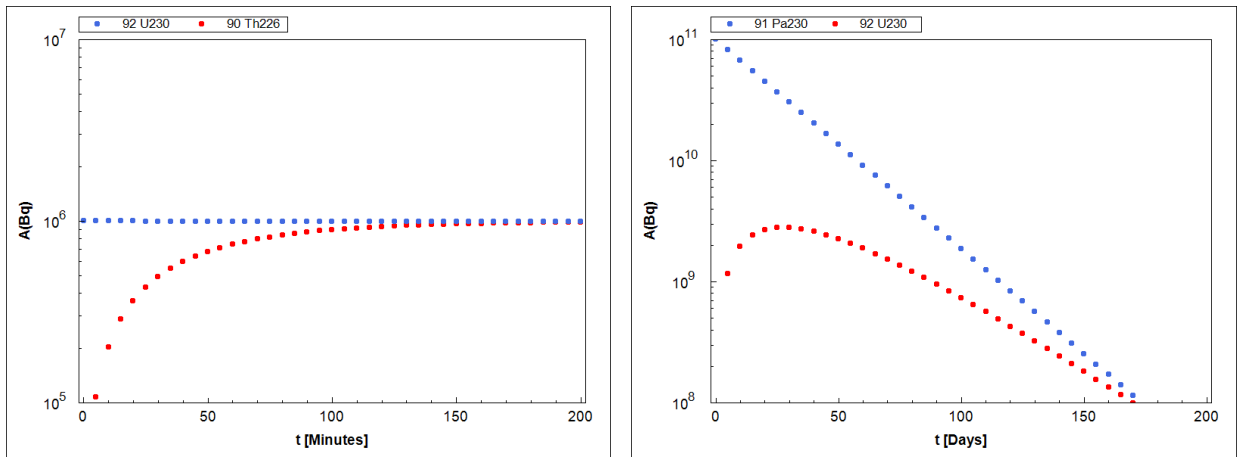


Abbildung 7.2.: Gleichgewichtseinstellung $^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$ und Bildung von ^{230}U aus ^{230}Pa

Das ^{230}Pa auf den Silica-Gel Säulen konnte als Generator zur Gewinnung von trägerfreiem ^{230}U dienen. ^{230}U bildet sich über einen Betazerfall mit einer Zerfallswahrscheinlichkeit von 8.4 % und die maximale Aktivität an ^{230}U konnte somit 28 Tage nach Bestrahlungsende isoliert werden und entsprach 2.82 % der ursprünglich produzierten Aktivität des ^{230}Pa . Die Abbildung 7.2 zeigt das Aktivitätsverhältnis der beiden Nuklide in Abhängigkeit von der Zeit. Da das Mutternuklid ^{230}Pa kurzlebiger ist als das Tochternuklid ^{230}U , stellt sich kein Gleichgewicht ein. In Abbildung 7.3 ist jeweils ein Alpha- und ein Gammaspektrum des isolierten trägerfreien ^{230}U abgebildet. ^{226}Th hat mit 3.3 % eine höhere Emissionswahrscheinlichkeit als ^{230}U mit 0.6 %. Somit wurde zur Auswertung der Experimente die Gammaemissionslinie von ^{226}Th verwendet.

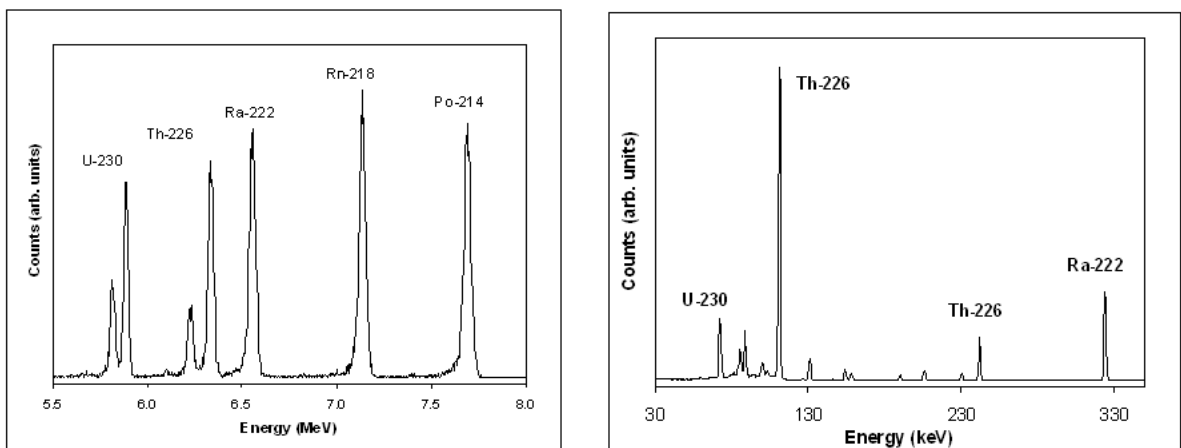


Abbildung 7.3.: Alpha- (links) und Gammaspektrum (rechts)

7.2. Isolierung von ^{237}U

Mit der in Abbildung 4.4 gezeigten Trennungs- und Reinigungsprozedur war es möglich in regelmäßigen Abständen ^{237}U trägerfrei zu isolieren. Das isolierte ^{237}U konnte als Radionuklid für Tracerexperimente verwendet werden, wenn ^{230}U nicht zur Verfügung stand. Mit Hilfe von H_2O_2 und NaNO_2 wurde das ^{241}Pu quantitativ in die vierwertige Oxidationsstufe gebracht und konnte somit auf der TEVA-Kolonne fixiert werden. Diese TEVA-Kolonne fungierte somit als Radionuklidgenerator. Abbildung 7.4 kann entnommen werden, dass ^{237}U alle 2-3 Wochen isoliert werden kann, da es sich aufgrund des radiochemischen Gleichgewichtes mit einer Halbwertszeit von 6.75 Tagen nach drei Wochen schon zu 90 % gebildet hat und somit eluiert werden kann. Der erste Schritt des Isolationsprozesses ist das Waschen der Kolonne mit 3 M HNO_3 um das gebildete ^{241}Am zu entfernen. In Abbildung 7.5 ist jeweils ein α - und ein γ -Spektrum der Waschlösung gezeigt. Sowohl das α -Spektrum zeigt bei 5.49 MeV eine intensive Bande als auch das γ -Spektrum bei 60 keV, die für ^{241}Am charakteristisch sind.

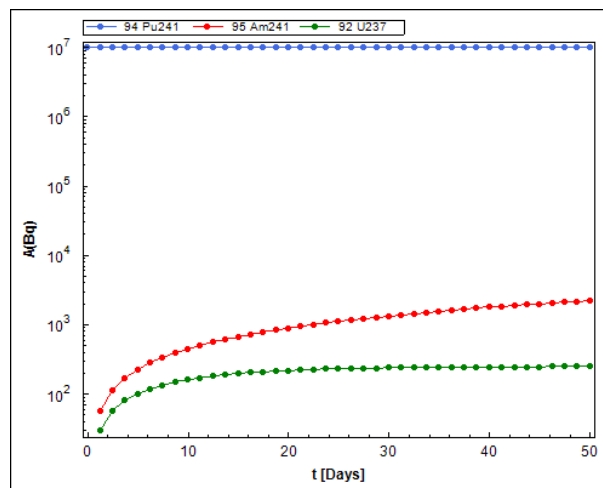


Abbildung 7.4.: Bildung von ^{237}U und ^{241}Am aus ^{241}Pu

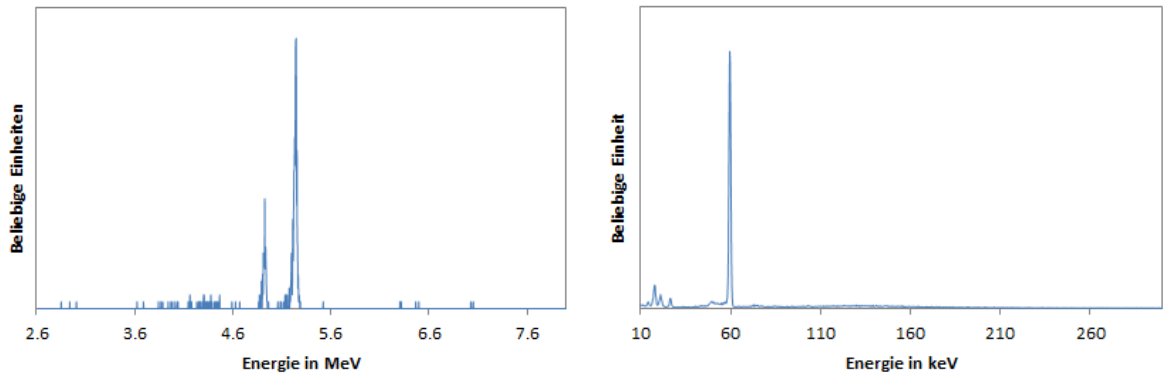


Abbildung 7.5.: α - (links) und γ -Spektrum (rechts) von ^{241}Am

Nach Entfernung des ^{241}Am wurde durch eine reduktive Waschprozedur das auf der UTEVA fixierte Plutonium entfernt. Abbildung 7.6 zeigt α - und γ -Spektren vor und nach diesem Reinigungsschritt. Aufgrund des Verhältnisses an Radioaktivität vor und nach der Aufreinigung lässt sich ein Dekontaminationsfaktor von $7.6 \cdot 10^6$ angeben.

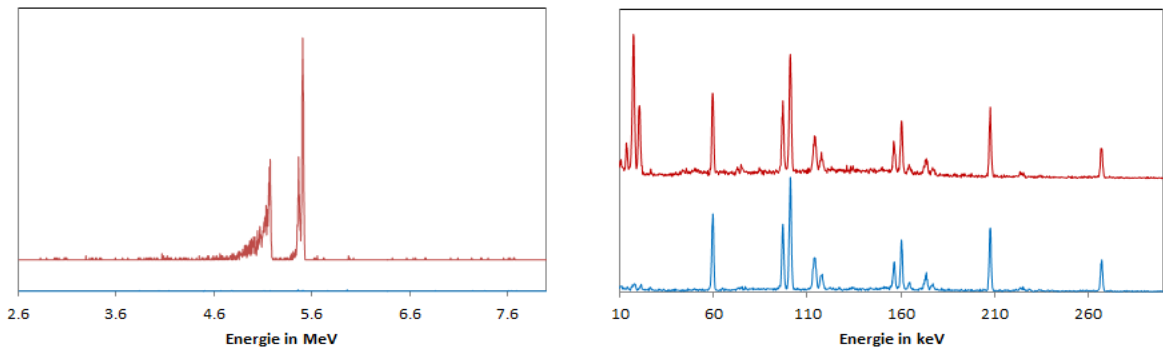


Abbildung 7.6.: linke Seite: α -Spektrum des Produktes nach der 1. UTEVA (rot) und der 2. UTEVA (blau); rechte Seite: γ -Spektrum des Produktes nach der 1. UTEVA (rot) und der 2. UTEVA (blau)

Übersicht der Ausbeute für alle Isolierungen Abbildung 7.7 zeigt den zeitabhängigen Verlauf der Ausbeuten. Es ist zu sehen, dass im 1. Jahr die Ausbeuten konstant bleiben und anschließend abnehmen. Dieser Sachverhalt ist mit Durchbruch des Plutoniums zu erklären. Dieser Durchbruch musste mit weiteren TEVA-Kolonnen abgefangen werden.

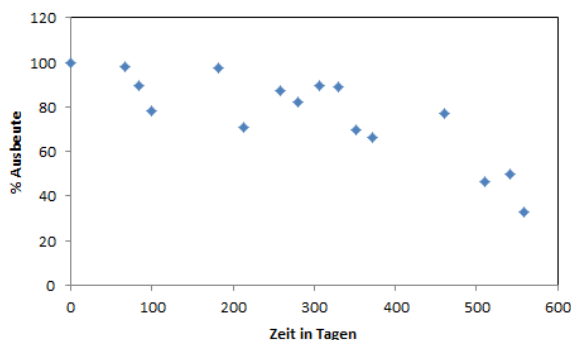


Abbildung 7.7.: Ausbeute aller ^{237}U -Isolierungen

Diskussion ^{237}U erwies sich als geeigneter Tracerersatz, wenn ^{230}U aufgrund seiner aufwändigeren Produktion in einem Zyklotron nicht zur Verfügung stand. Es ist gelungen einen Radionuklidgenerator zu entwickeln, bei dem innerhalb eines Jahres in zeitlichen Abständen von etwa 14 Tagen ^{237}U zuverlässig, reproduzierbar und in angemessener Reinheit isoliert werden konnte. Die Isolierung konnte innerhalb eines Tages durchgeführt werden, und war somit schnell verfügbar. Aufgrund seiner Gammaemissionslinien bei 60 keV und 208 keV, konnten die Experimente mittels Gammaskopie ausgewertet werden und somit war dieser Tracer für die durchzuführenden Experimente praktikabel. Das Radionuklid zeigte somit alle geforderten Eigenschaften um ^{230}U in Untersuchungen bezüglich seiner Bindungseigenschaften an DCP und dessen Derivate zu ersetzen.

7.3. Uranylkomplexe von DCP-Derivaten

7.3.1. Liganden

Es wurden die Uranylkomplexe mit DCP und DPDCP charakterisiert.

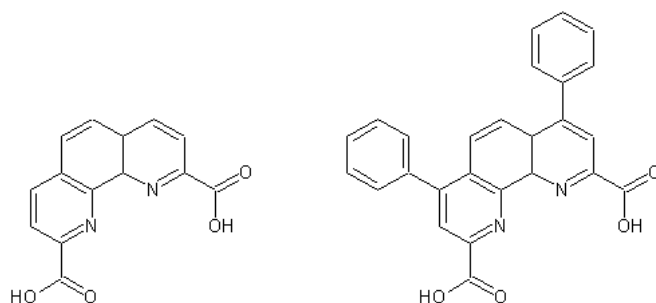


Abbildung 7.8.: DCP (links) und DPDCP (rechts)

In Abbildung 7.9 ist das ^1H -Spektrum des käuflich erworbenen DCP abgebildet. Wie erwartet erscheint im ^1H -NMR-Spektrum für die Resonanz der beiden benachbarten Protonen des Pyridinringes jeweils ein Dublett und für die des Protons des mittleren Ringes erscheint im Spektrum ein Singulett. DPDCP, ein Derivat mit zwei zusätzlichen Phenylgruppen, wurde nach einem Verfahren, wie in Abbildung 3.15 dargestellt, im eigenen Arbeitskreis hergestellt. In Abbildung 7.10 ist das ein ^1H -NMR-Spektrum des Derivats dargestellt. Für das Proton in ortho-Stellung zur Carboxylgruppe und das Proton am mittleren Ring erscheinen im ^1H -NMR-Spektrum jeweils als Singulett, wohingegen die Protonen des Phenylringes ein Multiplett als Signal verursachen.

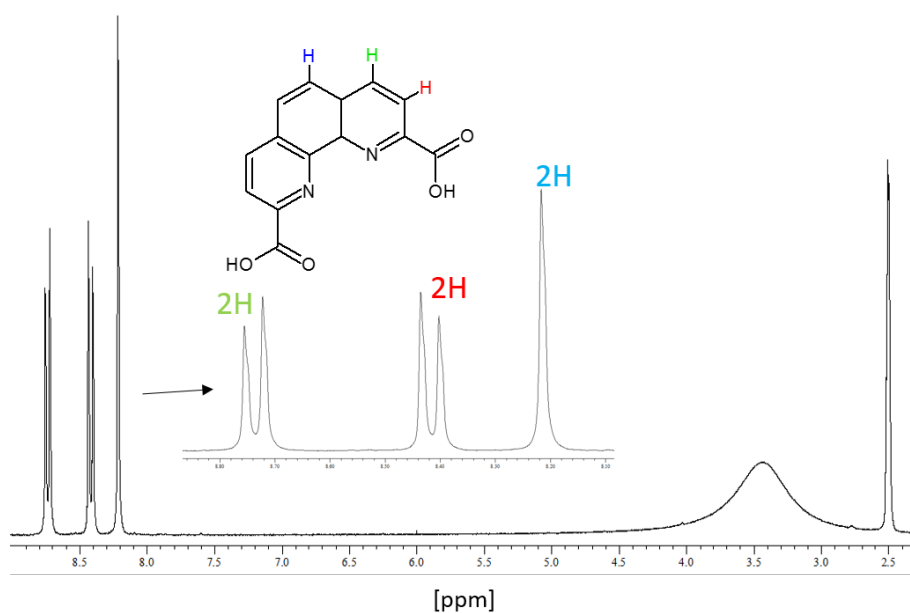
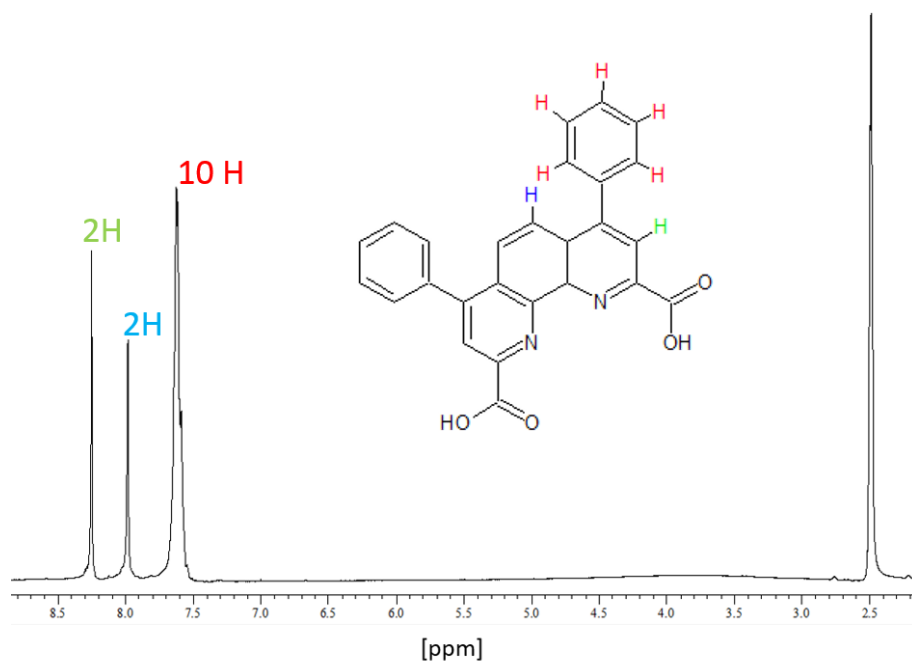


Abbildung 7.9.: ^1H -NMR-Spektrum von DCP

Abbildung 7.10.: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von DPDCP

7.3.2. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der Uranyl-DCP Komplexe

Wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben wurde für die Herstellung der Uranyl-DCP bzw. Uranyl-DPDCP Komplexe jeweils ein Äquivalent Uranylnitrat oder Uranylacetat in ca. 1 ml DMSO oder einem entsprechenden Lösungsmittel gelöst und mit einem Äquivalent DCP bzw. DPDCP, welches ebenfalls in ca. 1 ml DMSO gelöst war, gemischt. Der gebildete Niederschlag wurde mit Wärme in Lösung gebracht, um durch langsames Abkühlen der Lösung Kristalle zu erhalten. Die Komplexe wurden zur Charakterisierung mit Kristallstrukturanalyse, NMR, UV-Vis-Spektroskopie und IR-Spektroskopie untersucht.

7.3.3. Synthese und Charakterisierung der Komplexe

7.3.3.1. $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$

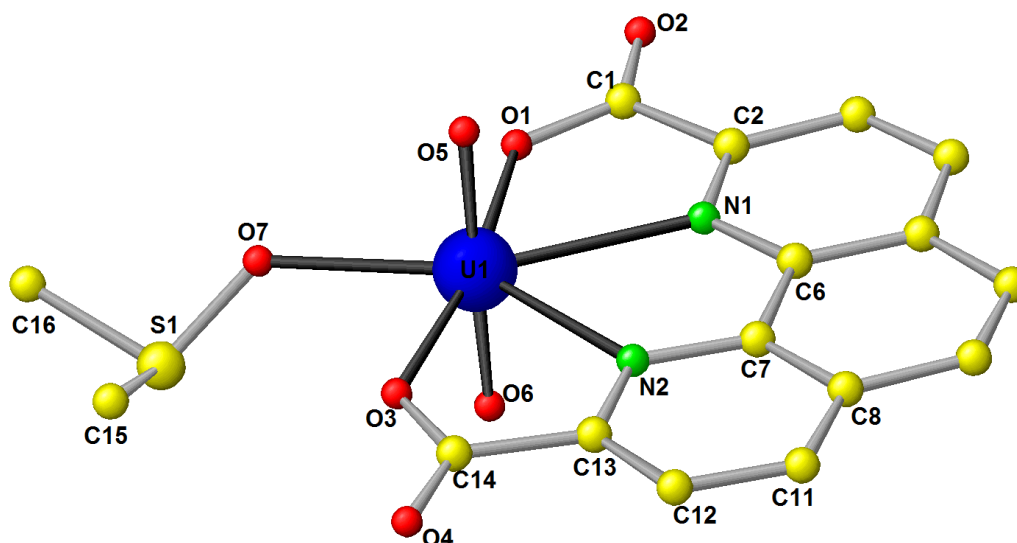


Abbildung 7.11.: Kristallstruktur $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$

$\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ wird aus der Reaktion von Uranylacetat mit DCP in quantitativer Ausbeute in Form gelber, nadelförmiger Kristalle erhalten, welche röntgen-diffraktometrisch untersucht wurden (Details siehe Anhang). $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ kristallisiert monoklin in der Raumgruppe $P2_1/c$. Die Molekülstruktur von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ im Kristall zeigt eine typische Uranyleinheit mit zwei kurzen U-O-Doppelbindungen von etwa 1.774 Å und einem Bindungswinkel O(5)-U(1)-O(6) von 178.5(3)°. Die planare $\eta^4\text{-O,N,N,O}$ -Koordination des DCP-Liganden erfolgt dabei über die beiden N-Atome der Phenanthrolineinheit, sowie über je ein O-Atom der in 2,6-Position befindlichen Carboxylatgruppen (O1, O3, Abbildung 7.11). Die maximalen Abweichungen aus der Ebene, gebildet aus der Dicarboxy-Phenanthrolineinheit und dem U-Atom, werden für die O-Atome beobachtet. Sie betragen: -3.7 pm (O(3)), 6.6 pm (O(4)), 3.0 pm (O(1)) und -3.3 pm (O(2)). Der DCP-Ligand belegt dabei in der äquatorialen Ebene praktisch eine komplette Hälfte (Winkel O(1)-U(1)-O(3) 169.6(2)°), was Platz für die Koordination eines DMSO-Solventmoleküls lässt. Der entsprechende U-O-Bindungsabstand ist mit 2.367(7) Å (U(1)-O(7)) gegenüber den U-O-Bindungsabständen zu den O-Atomen der Carboxylateinheiten (U(1)-O(1): 2.339(6) Å und U(1)-O(3): 2.321(6) Å leicht verlängert, aber immer noch signifikant kürzer als die beobachteten U-N-Bindungsabstände von 2.530(7) Å und 2.542(7) Å. Der insgesamt erhaltene Koordinationspolyeder für $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ ist eine pentagonale Bipyramide mit dem U-Atom im Zentrum und den Uranyl-O-Atomen in den apikalen Positionen.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

Bindung	Abstand in Å
U(1)-O(1)	2.339(6)
U(1)-O(3)	2.321(6)
U(1)-O(5)	1.774(7)
U(1)-O(6)	1.773(7)
U(1)-O(7)	2.367(7)
U(1)-N(1)	2.542(7)
U(1)-N(2)	2.530(7)

Bindung	Winkel in °
O(3)-U(1)-O(1)	169.6(2)
O(6)-U(1)-O(5)	178.5(3);

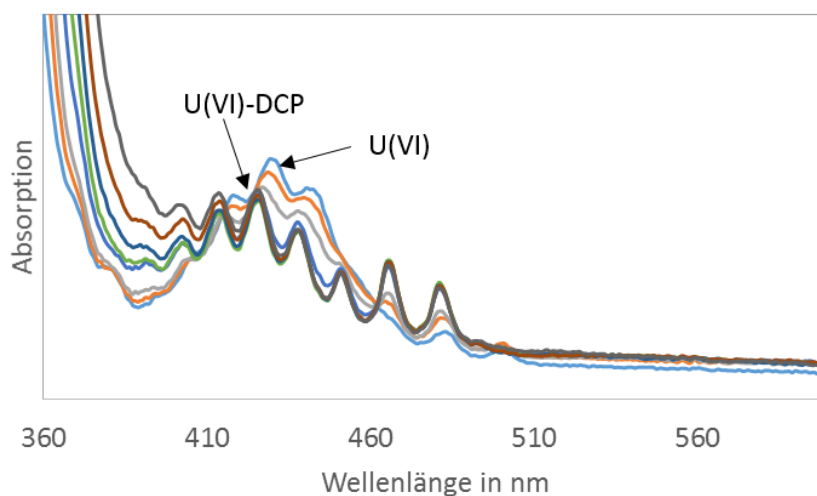


Abbildung 7.12.: UV-Spektren von der Bildung des Komplexes: Titration des freien U(VI) (hellblau) bis zu einem fünffachen Überschuss des Liganden DCP (violett)

Die Titration zeigt eine Verschiebung der Banden vom freien Uranylнитrat zum gebundenen Uranyl-DCP Komplex zu kleineren Wellenlängen hin. Die Titration wurde bis zu einem Überschuss von fünf Äquivalenten DCP gegenüber der Uranylkonzentration durchgeführt. Es kommt zu einer Verschiebung von ca. 5 nm. Da die Verschiebung der Banden nach Zugabe von einem Äquivalent abgeschlossen ist, bildet sich ein Addukt mit einem Molekül DMSO pro Einheit. Diese Aussage wird von der Kristallstrukturanalyse bestätigt. In Abbildung 7.13 ist ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren vom freien DCP-Liganden in DMSO und dem Komplex $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ gezeigt. Der Komplex $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ ist im Vergleich zum ungebundenen DCP ins Tieffeld verschoben.

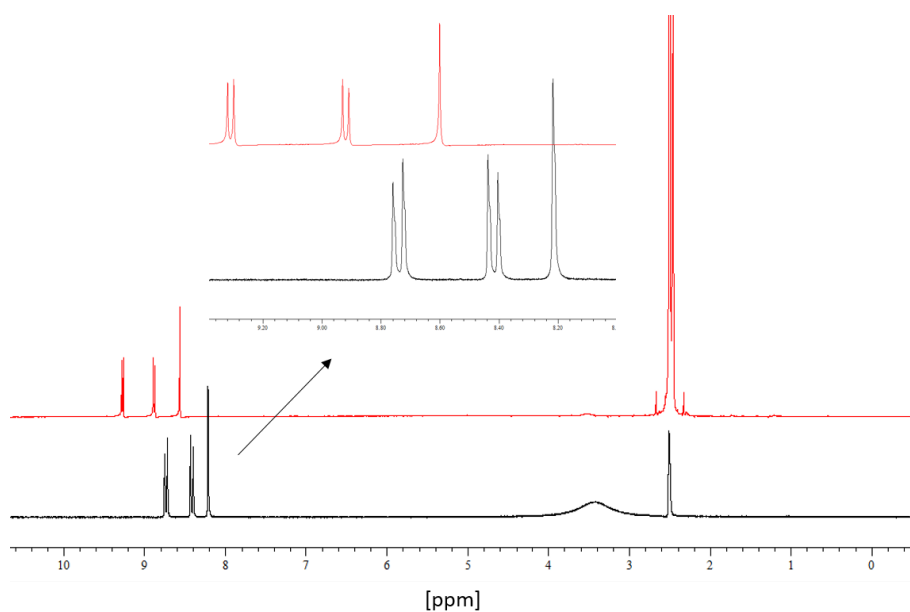


Abbildung 7.13.: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren: $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ (rot) und der freie Ligand DCP (schwarz)

In Abbildung 7.14 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ Komplexes nochmals zur Erläuterung gezeigt. Da der Komplex eine Spiegelachse aufweist, sind im Spektrum 3 Signale der 6 Protonen des aromatischen Systems zu sehen. Bei den beiden benachbarten Protonen des Pyridinringes kommt es zu einer Aufspaltung zum Duplett. Das Proton am mittleren Ring erscheint aufgrund fehlender Protonen in Nachbarpositionen als Singulett.

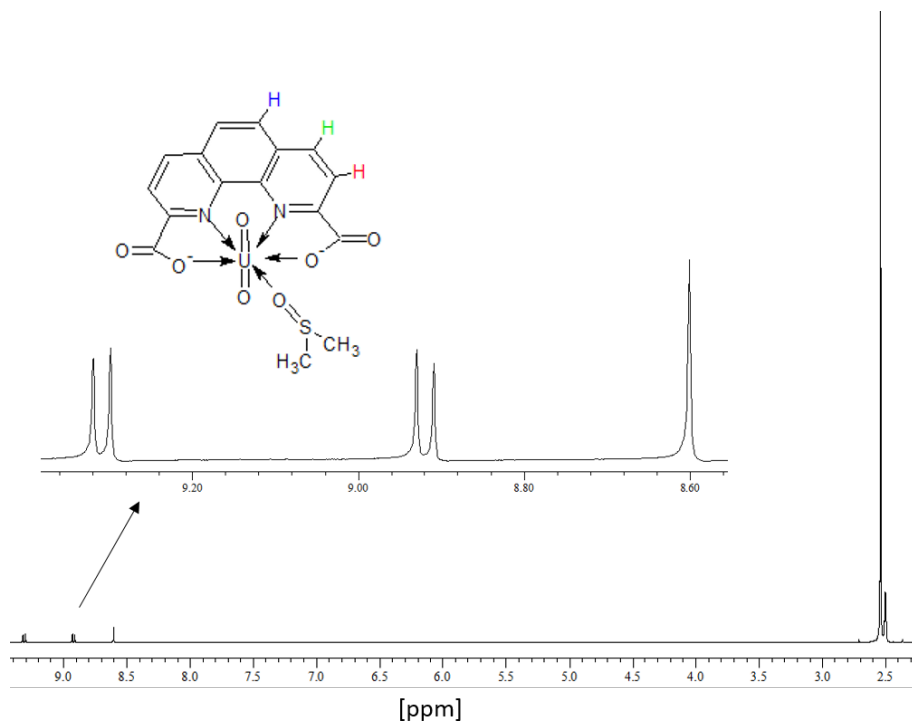


Abbildung 7.14.: ^1H -NMR-Spektrum von $\text{U(VI)-DCP}\cdot\text{DMSO}$

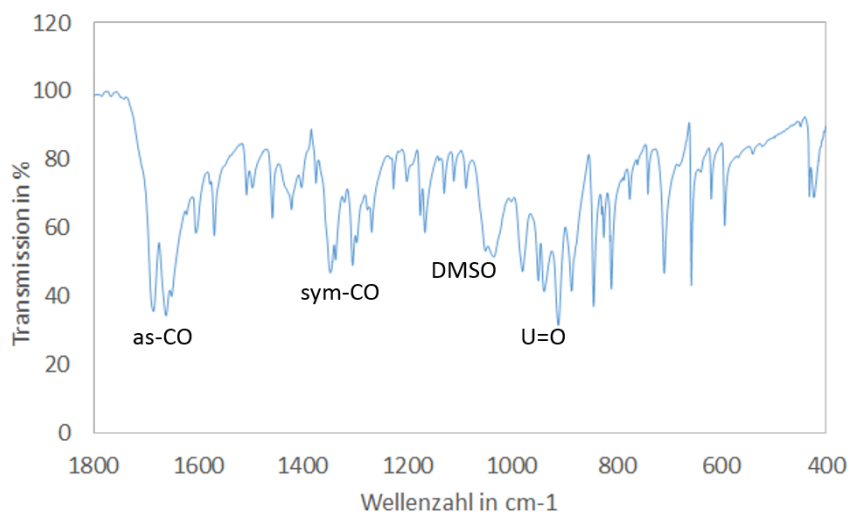


Abbildung 7.15.: IR-Spektrum von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$

In Abbildung 7.15 ist das IR-Spektrum von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ dargestellt. Im Bereich $1660\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ kann die asymmetrische CO-Valenzschwingung beobachtet werden. Im Bereich $1300\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ ist die symmetrische CO-Valenzschwingung zu

sehen. Bei 910 cm^{-1} ist eine sehr starke und scharfe Bande der U=O-Bindung zu sehen.

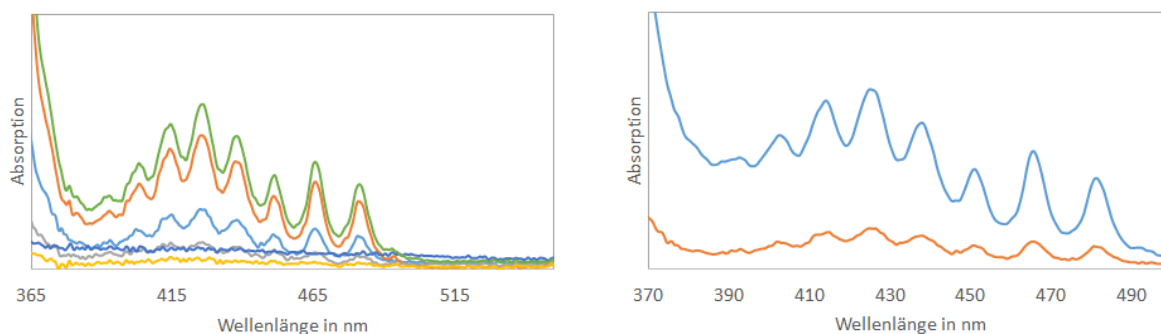


Abbildung 7.16.: UV-Vis-Spektren von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$: (links) konzentrationsabhängigen Titration (links); (rechts) zwei Spektren aufgenommen in Teflon (blau) und DMSO (rot)

In den UV-Vis-Spektren der Abbildung 7.16 sind die π -f-Übergänge des Komplexes gezeigt. Man erkennt eine Serie von Absorptionen bei 405, 415, 428, 440, 453, 468 und 483 nm. Anhand der konzentrationsabhängigen Titration konnte der Extinktionskoeffizient des Adduktes untersucht werden. Er wurde bei der stärksten Bande bei 425 nm auf $25.4 \pm 1.5 \frac{\text{l}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$ bestimmt. Das Spektrum, welches in fester Phase aufgenommen wurde (rechter Teil der Abbildung), hat die gleichen Banden, wie das Spektrum aus flüssiger Phase in DMSO. Aus der Kristallstrukturanalyse ist die Struktur des Adduktes im Kristall bekannt. Das Uranyl-Kation wird vom DCP in vierzähligerweise koordiniert und an der frei bleibenden Koordinationsstelle addiert sich ein DMSO-Molekül, sodass die Struktur einer pentagonalen Bipyramide entsteht. Die hohe Übereinstimmung der UV-Vis-spektroskopischen Befunde in flüssiger als auch in fester Phase sind Zeichen, dass die Festkörperstruktur auch in flüssiger Phase erhalten bleibt und das Uranyl-Kation in Form einer pentagonalen Bipyramide komplexiert wird.

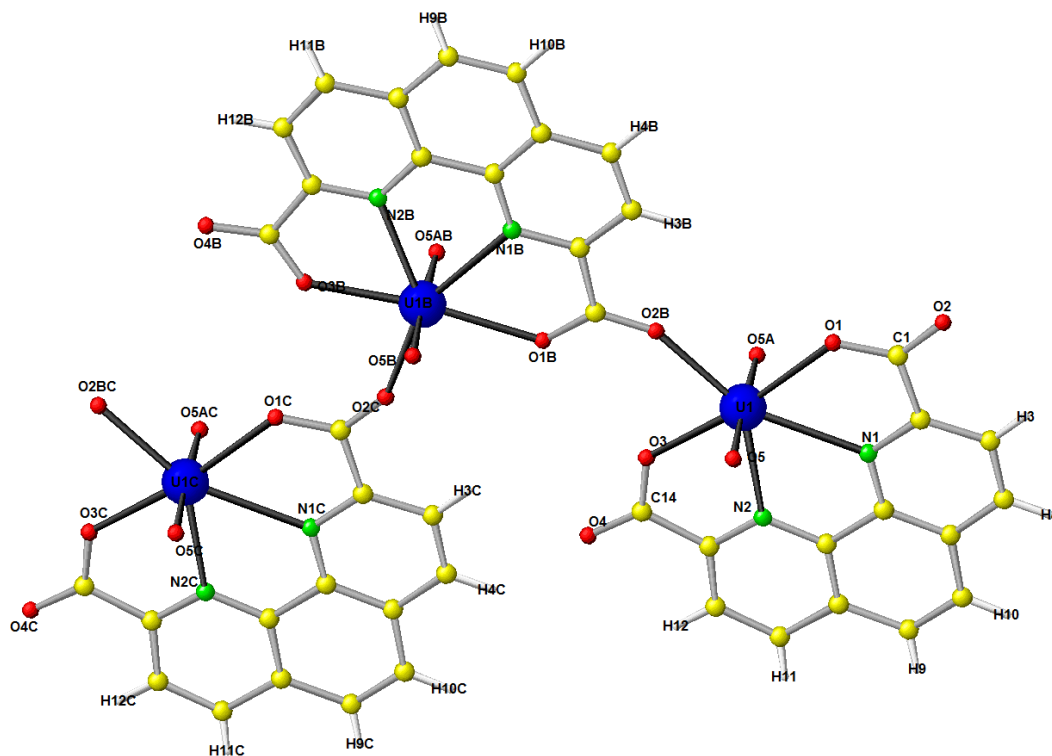
7.3.3.2. $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ 

Abbildung 7.17.: Kristallstruktur vom Polymer $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ aus MeOH

Der Komplex $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ wird mit Hilfe eines Extraktionsverfahrens, wie in Unterabschnitt 6.2.2 beschrieben, in quantitativer Ausbeute erhalten. Da bei seiner Herstellung keine koordinierenden Lösungsmittel verwendet wurden, wird nicht, wie im vorangegangenen Komplex, die freie Koordinationsstelle durch ein Lösungsmittel, sondern durch ein O-Atom der Carboxylatgruppe eines benachbarten Moleküls eingenommen und es resultiert ein Polymer. Das Polymer kristallisiert orthorombisch in der Raumgruppe $Pnma$. In Abbildung 7.17 ist die Kristallstruktur des Polymers $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ dargestellt. Die Struktur besteht aus einem zentralen U(VI)-Atom, welches zu zwei symmetrieäquivalenten O-Atomen (O5) mit einer Bindungslänge von 1.759(9) Å und über einen Winkel von 176.9(7)° gebunden ist. Diese Einheit bildet das Uranyl-Kation. Ein DCP-Ligand koordiniert das Uranyl-Kation vierfach in äquatorialer Ebene durch die beiden N-Atome bei einer Bindungslänge von 2.572(15) Å (N(1)) und 2.558(15) Å (N(2)) und durch zwei O-Atome der Carboxyleinheiten mit einer Bindungslänge von 2.296(15) Å (O(3)) und 2.418(14) Å (O(1)). Um die pentagonale Bipyramide zu vervollständigen, deren Zentrum das U(VI)-Atom darstellt, koordiniert ein weiteres O-Atom (O(2)) eines weiteren DCP-Liganden das U(VI)-Atom an seiner freien Koordinationsstelle mit einer Bindungslänge von 2.349(13) Å.

Es resultiert somit ein eindimensionaler Strang.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

Bindung	Abstand in Å
U(1)-O(1)	2.418(14)
U(1)-O(2)	2.349(13)
U(1)-O(3)	2.296(15)
U(1)-O(5)	1.759(9)
U(1)-N(1)	2.572(15)
U(1)-N(2)	2.558(15)

Bindung	Winkel in °
O(3)-U(1)-O(5)	172.0(5)
O(5)-U(1)-O(5)	176.9(7)

Diskussion Das Polymer $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ wurde mit Hilfe einer Extraktionsapparatur hergestellt. Die Synthese des Polymers mit Hilfe von Extraktion ist sehr viel einfacher als die von Dean et al. beschriebene Synthese mit einem Hydrothermalverfahren.[1] Es sind keine besonders hohen Temperaturen oder Drücke notwendig um die Kristalle des Polymers zu erhalten. Das Polymer $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ ist eine reine Festkörperverbindung. In DMSO gelöst stimmen seine spektroskopischen Eigenschaften komplett mit denen des vorangegangenen Komplexes $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ überein, was daran liegt, dass die polymere Struktur in Lösung aufgebrochen wird.

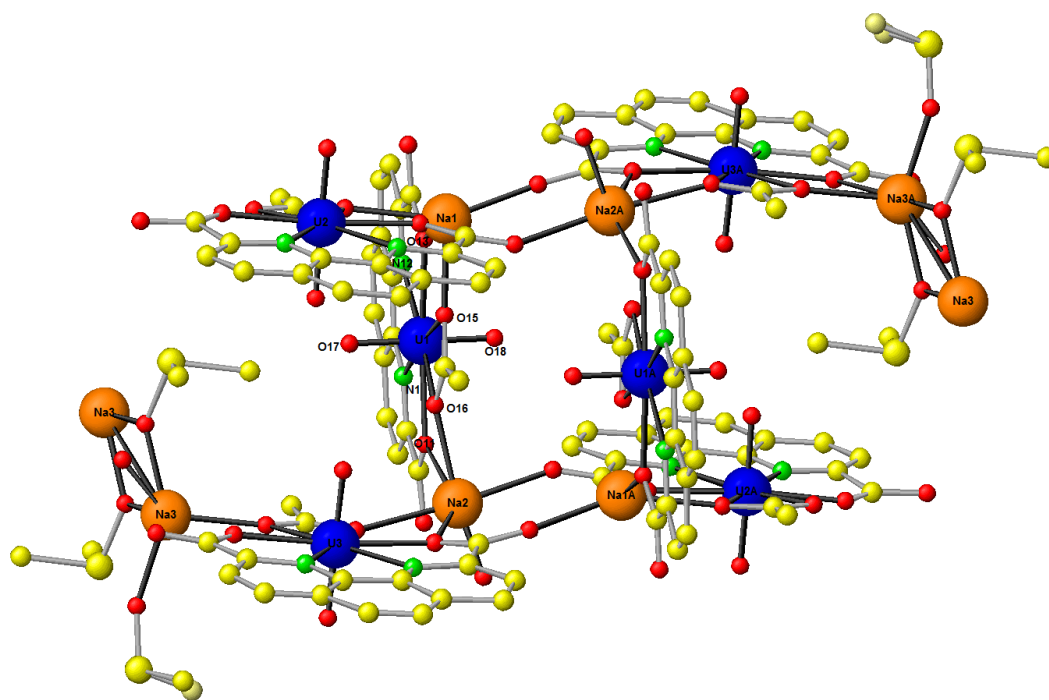
7.3.3.3. $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{NaOAc}$

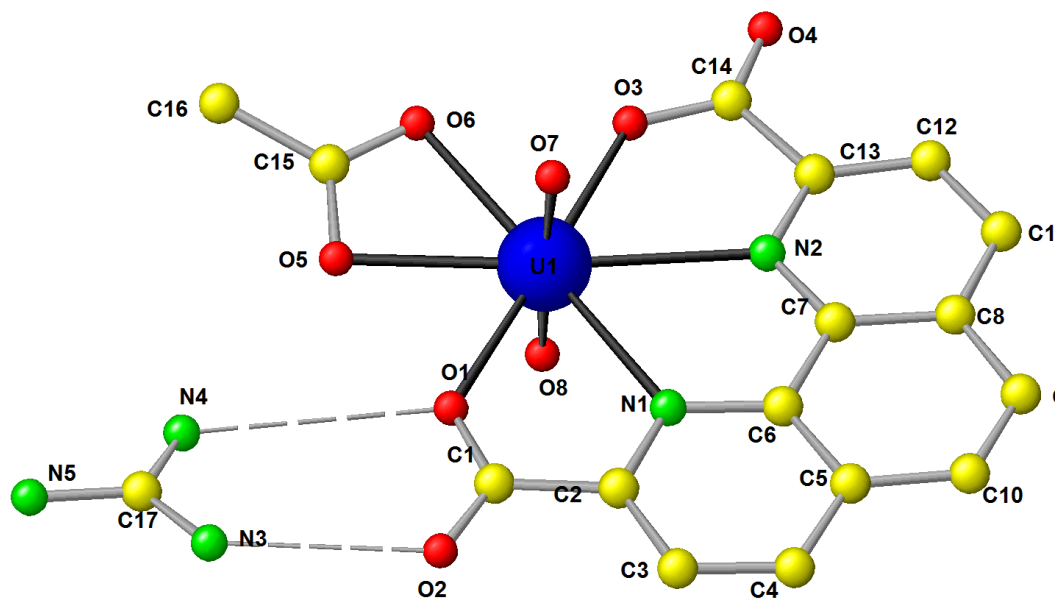
$\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{NaOAc}$ ist in trikliner Form in der Raumgruppe P-1 kristallisiert. Die Kristallstruktur des Adduktes $[\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{OAc}]^-[\text{Na}]^+$ ist kompliziert. Das Na-Ion ist relativ groß und seine freien Koordinationsstellen werden unterschiedlich abgesättigt. Das Uranyl-Kation wird vom Liganden DCP in der horizontalen Ebene vierfach koordiniert. Der Bindungswinkel zwischen den Carboxylateinheiten des Liganden, die das Uranyl-Kation koordinieren, beträgt $176.8(3)^\circ$. Die Polymer-Strangstruktur wird dann durch die Na-Ionen aufgebaut, die sich koordinativ durch Bindungen an die Carboxylatgruppen der verschiedenen DCP-Einheiten absättigen.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

Bindung	Abstand in Å
U(1)-O(11)	2.424(11)
U(1)-O(13)	2.397(11)
U(1)-O(15)	2.469(10)
U(1)-O(16)	2.448(11)
U(1)-O(17)	1.684(9)
U(1)-O(18)	1.682(10)
U(1)-N(11)	2.650(14)
U(1)-N(12)	2.620(13)
U(1)-Na(1)	4.028(6)

Bindung	Winkel in °
O(13)-U(1)-O(11)	176.8(3)
O(18)-U(1)-O(17)	177.8(5)
N(12)-U(1)-N(11)	60.6(4)

Abbildung 7.18.: Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{NaOAc}$

7.3.3.4. $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$ Abbildung 7.19.: Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$

Der Komplex $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$ wurde nach der Prozedur in Unterabschnitt 6.2.2 hergestellt und in quantitativer Ausbeute erhalten. Der Komplex $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$ kristallisiert in monokliner Form in der Raumgruppe $P2_1/c$. Die Struktur des Kristalls $[\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{OAc}]^- [\text{Gdm}]^+$ basiert auf einem zentralen U(VI)-Atom, welches an zwei O-Atome des Liganden mit einer Distanz von 2.405(6) Å (O(1)) und 2.392(6) Å (O(3)) und mit einem Winkel von O(1)-U(1)-O(3) 176.4(2)° gebunden ist. Es bleibt genügend Platz zur Koordination eines weiteren Liganden. Das Acetat fungiert als bidentater Ligand, sodass das U(VI)-Atom in äquatorialer Ebene sechsfach koordiniert wird. Es resultiert eine hexagonale Bipyramide.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

Bindung	Abstand in Å
U(1)-O(1)	2.405(6)
U(1)-O(3)	2.392(6)
U(1)-O(5)	2.463(6)
U(1)-O(6)	2.455(7)
U(1)-O(7)	1.754(6)
U(1)-O(8)	1.749(7)
U(1)-N(1)	2.608(7)
U(1)-N(2)	2.642(7)

Bindung	Winkel in °
O(3)-U(1)-O(1)	176.4(2)
O(6)-U(1)-O(5)	176.9(3)

Diskussion Beim $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{NaOAc}$ wird das Na-Kation unterschiedlich koordiniert und es resultiert eine komplizierte Kristallstruktur. Im Falle des $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$ kommt es zur Ausbildung von H-Brückenbindungen zwischen dem Guanidinium-Ion und den Carboxylatgruppen des DCP und wird somit regelmäßig koordiniert.

7.3.3.5. $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$

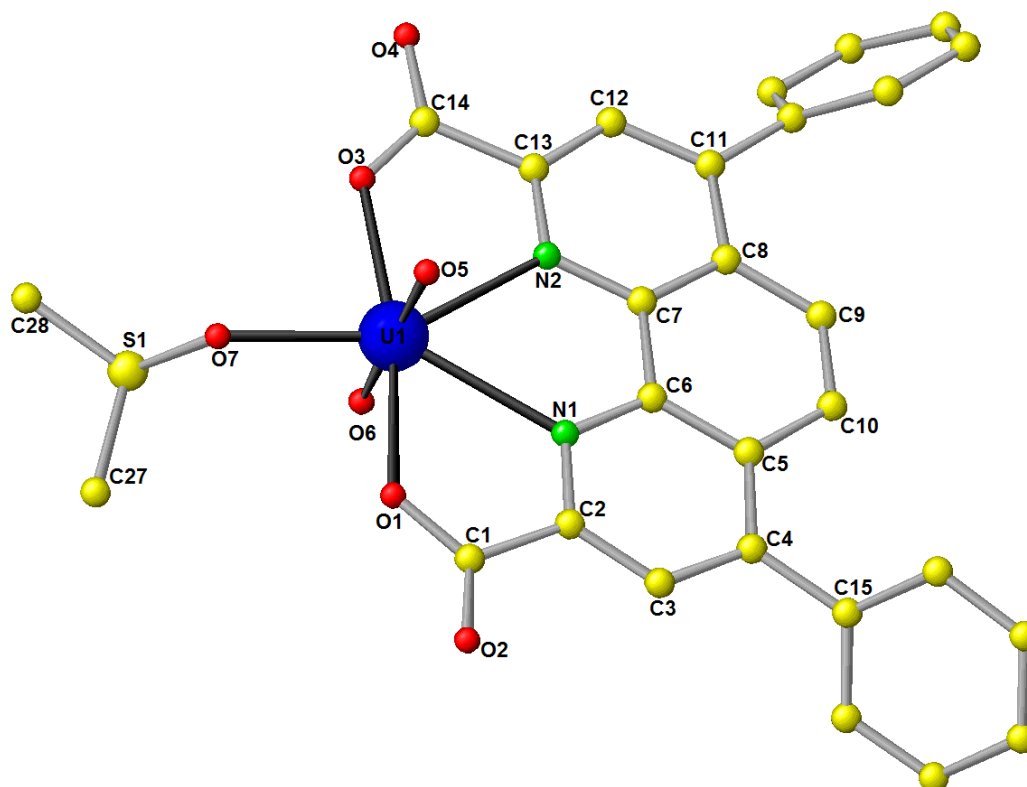


Abbildung 7.20.: Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$

Der Komplex $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ wurde nach der experimentellen Prozedur in Unterabschnitt 6.2.2 hergestellt und in quantitativer Ausbeute erhalten.

$\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ kristallisiert monoklin in der Raumgruppe $P2_1/n$. Die Molekülstruktur von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ zeigt wie im Falle des $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ eine typische Uranyleinheit mit zwei kurzen U-O-Doppelbindungen mit 1.731(5) Å für U(1)-O(5) und 1.740(5) Å für U(1)-O(6). In der Kristallstruktur des $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ ist das U(VI)-Atom in der äquatorialen Ebene fünffach koordiniert. DPDCP fungiert als tetradentater Ligand. Die U(1)-N(1/2) Bindungen betragen jeweils 2.535(6) Å bzw. 2.536(6). Der Winkel O(1)-U(1)-O(3), welcher das U(VI)-Atom und die beiden O-Atome der Carboxylatgruppen des Liganden umfasst, beträgt 169.5(18)°. Somit bleibt eine freie Bindungsstelle, an der DMSO in der Kristallstruktur koordiniert

wird.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

Bindung	Abstand in Å
U(1)-O(1)	2.364(5)
U(1)-O(3)	2.310(5)
U(1)-O(5)	1.731(5)
U(1)-O(6)	1.740(5)
U(1)-O(7)	2.318(5)
U(1)-N(1)	2.535(6)
U(1)-N(2)	2.536(5)

Bindung	Winkel in °
O(3)-U(1)-O(1)	169.5(18)
O(6)-U(1)-O(5)	179.3(2)

Diskussion Betrachtet man die beiden Kristallstrukturen von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ und $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ im Vergleich, so sind die beiden Strukturen analog. Der Bindungswinkel, welcher das zentrale U(VI)-Atom mit den O-Atomen der Carboxylgruppen einschließt beträgt im Falle des DCP-Komplexes $169.6(2)^\circ$ und im Falle des DPDCP-Komplexes $169.5(18)^\circ$. In beiden Fällen wird das U(VI)-Atom in äquatorialer Ebene vom jeweiligen Liganden in vierzähliger Weise so koordiniert, dass DMSO als einzähliger Ligand die freie Koordinationsstelle besetzen kann. Das U(VI)-Atom wird also in äquatorialer Ebene fünffach koordiniert, sodass mit den O-Atomen der Uranyl-Kation-Einheit eine pentagonale Bipyramide resultiert.

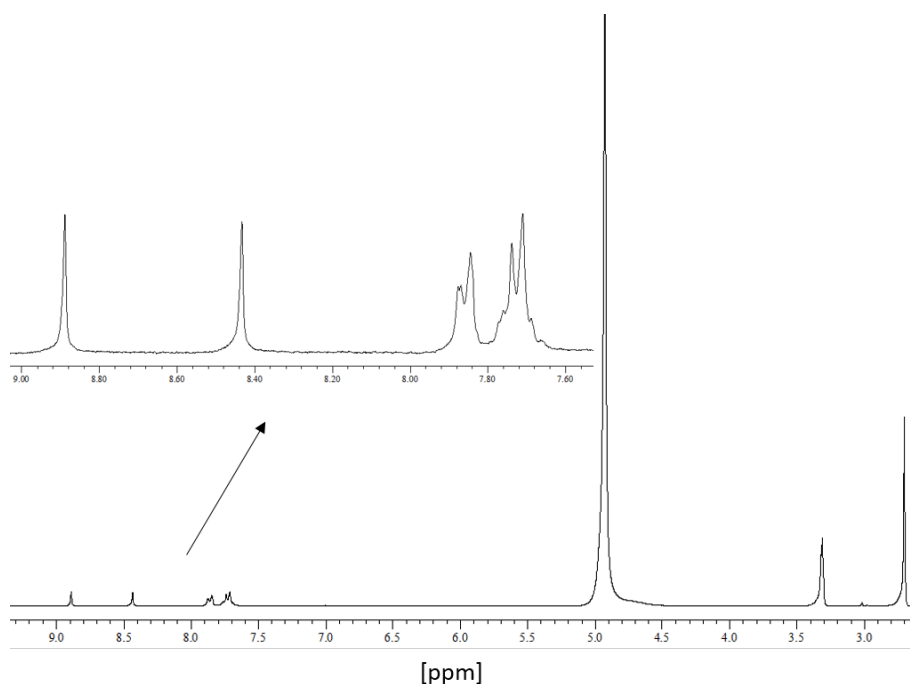


Abbildung 7.21.: ^1H -NMR-Spektrum von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$

In Abbildung 7.21 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ gezeigt. Genauso wie beim $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ Komplexes, weist der hier diskutierte eine Spiegelachse auf. Somit sind im Spektrum drei Signale der 14 Protonen auszumachen. Die beiden Protonen am Phenanthrolingrundgerüst ergeben aufgrund fehlender benachbarter Protonen jeweils ein Singulett, die Protonen an den Phenylresten erscheinen im Spektrum als Multiplett.

7.3.3.6. $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$

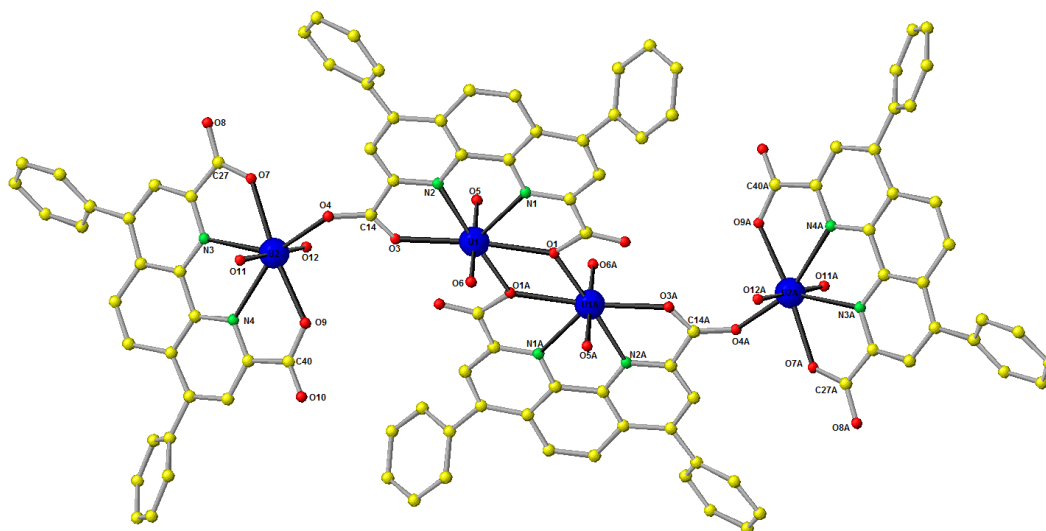


Abbildung 7.22.: Kristallstruktur des Tetramers $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$

Der Komplex $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$ wurde mit Hilfe eines Extraktionsverfahrens, wie in Unterabschnitt 6.2.2 beschrieben, in quantitativer Ausbeute erhalten. Der Komplex kristallisiert in monokliner Form in der Raumgruppe $P2_1/c$. Das U(VI)-Atom wird vom DPDCP in vierzähliger Weise komplexiert. Für $\text{O}(3)\text{-U}(1)\text{-O}(1)$ resultiert ein Winkel von $173.41(16)^\circ$. Da bei der Synthese kein koordinierendes Lösungsmittel verwendet wurde, addiert sich an die freie Koordinationsstelle ein Sauerstoffatom ($\text{O}(1\text{A})$) einer Carboxylateinheit des nächsten $\text{UO}_2\text{-DPDCP}$ Komplexes. Aufgrund des sterischen Platzanspruchs der Phenylgruppen am DCP-Grundgerüst bildet sich hier kein eindimensionaler Strang wie im Falle des Polymeren $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$, sondern ein Tetramer. Ein direkter Vergleich der beiden Kristalle ist in Abbildung 8.1 dargestellt.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in $^\circ$:

Bindung	Abstand in Å
U(1)-O(1)	2.404(5)
U(1)-O(1A)	2.426(5)
U(1)-O(3)	2.361(5)
U(1)-O(5)	1.750(5)
U(1)-O(6)	1.746(5)
U(1)-N(1)	2.609(5)
U(1)-N(2)	2.562(5)

Bindung	Winkel in °
O(3)-U(1)-O(1)	173.41(16)
O(6)-U(1)-O(5)	178.1(2)

Diskussion Wie beim Polymer $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ handelt es sich bei dem Tetramer $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$ um eine reine Festkörperverbindung. In DMSO gelöst stimmen die spektroskopischen Eigenschaften des Tetramers komplett mit denen des $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ überein.

7.3.3.7. $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMAA}$

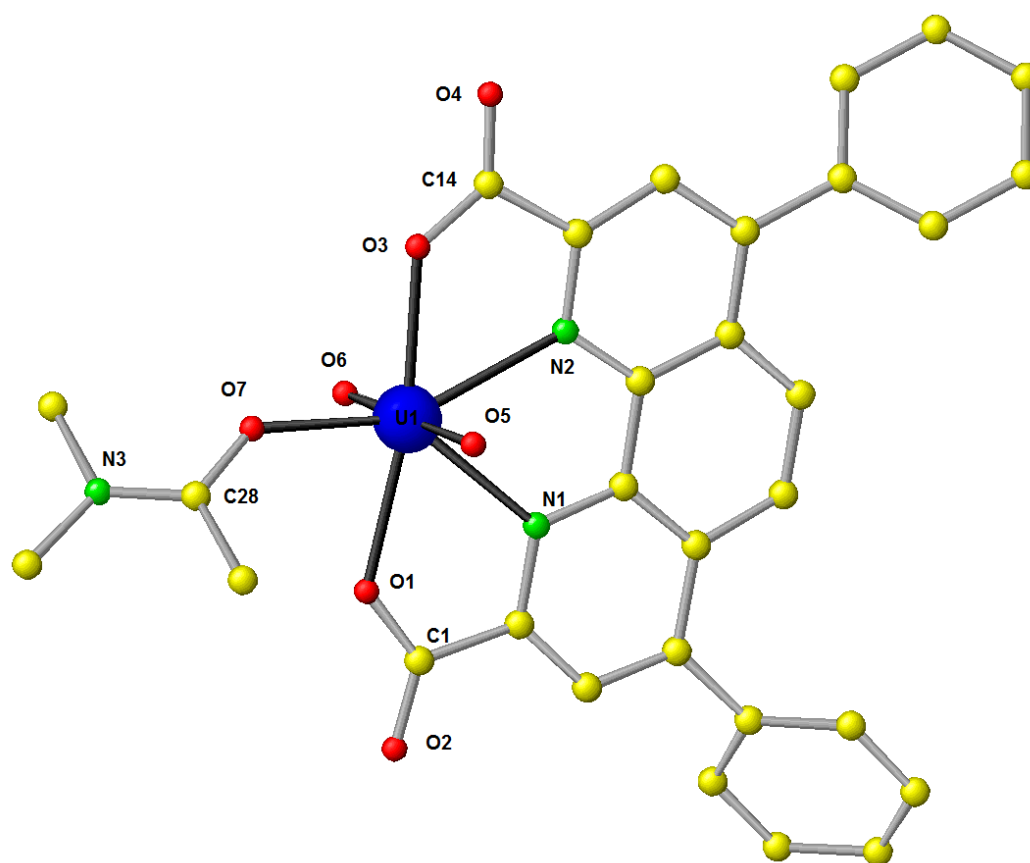


Abbildung 7.23.: Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMAA}$

Der Komplex $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMAA}$ ist in monokliner Form in der Raumgruppe $\text{P2}_1/\text{c}$ kristallisiert. $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMAA}$ kristallisiert analog der Kristallstruktur des $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$. Das U(VI)-Atom wird in der äquatorialen Ebene durch den Liganden DPDCP vierfach koordiniert und es resultiert ein Bindungswinkel zwischen den Sauerstoffatomen der Carboxylgruppen und dem zentralen U(VI)-Atom von $170.1(3)^\circ$. Ein Sauerstoffatom des DMAA-Moleküls vervollständigt die Struktur der pentagonalen Bipyramide mit einer Bindungslänge zwischen U(1) und O(7) von $2.316(9) \text{ \AA}$.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in $^\circ$:

Bindung	Abstand in Å
U(1)-O(1)	2.307(8)
U(1)-O(3)	2.269(9)
U(1)-O(5)	1.761(7)
U(1)-O(6)	1.758(7)
U(1)-O(7)	2.316(9)
U(1)-N(1)	2.532(9)
U(1)-N(2)	2.545(9)

Bindung	Winkel in $^\circ$
O(3)-U(1)-O(1)	170.1(3)
O(6)-U(1)-O(5)	177.2(3)

7.3.4. Vergleich der strukturellen Eigenschaften

Komplex	U-O in Å	U=O in Å	Winkel in $^\circ$ *	Winkel in $^\circ$ **
$\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$	2.321-2.339	1.773-1.774	169.6(2)	178.5(3)
$[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$	2.296-2.418	1.759	172.0(5)	176.9(7)
$\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{NaOAc}$	2.448-2.469	1.682-1.84	177.8(5)	176.8(3)
$\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{Gdm}$	2.392-2.405	1.774-1.754	176.4(2)	176.9(3)
$\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$	2.310-2.364	1.731-1.740	169.5(18)	179.3(2)
$[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$	2.361-2.404	1.746-1.750	173.41(16)	178.1(2)
$\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMAA}$	2.269-2.307	1.758-1.761	170.1(3)	177.2(3)

Tabelle 7.1.: Vergleich der untersuchten Komplexe. * bezeichnet den Winkel welcher das zentrale U(VI) mit den Carboxylatgruppen einschließt, ** bezeichnet den Winkel des Uranyl-Kations

In der Tabelle ist eine Zusammenstellung der Bindungsabstände und der Bindungswinkel um das U(VI)-Atom der einzelnen Komplexe dargestellt. Die Bindungsabstände vom U(VI)-Atom zu den O-Atomen der Carboxylatgruppen der Liganden sind ähnlich und betragen im Durchschnitt 2.36 Å und schließen das U(VI)-Atom mit einem Winkel von ca. 173° ein. Die kürzeren U-O-Doppelbindungen des Uranyl-Kations sind durchschnittlich 1.76 Å lang und bilden mit dem U(VI)-Atom einen Winkel von ca. 178° . Somit wird in jedem untersuchten Komplex ca. eine Hälfte des

Uranyl-Kations vom Liganden besetzt und lässt somit Platz zur Koordination eines Lösungsmittelmoleküls. Das Acetat kann sogar als bidentater Ligand fungieren. Bei Verwendung von nicht koordinierenden Lösungsmitteln, wird die freie Hälfte des Uranyl-Kations mit einer Carboxylateinheit des nächsten Liganden abgesättigt. Im Falle des $\text{UO}_2\text{-DCP}$ entsteht ein Polymer, im Falle des $\text{UO}_2\text{-DPDCP}$ bildet sich aufgrund des sterischen Platzanspruchs der Phenylgruppen ein Tetramer.

7.4. Protonierungskonstanten BCPDA

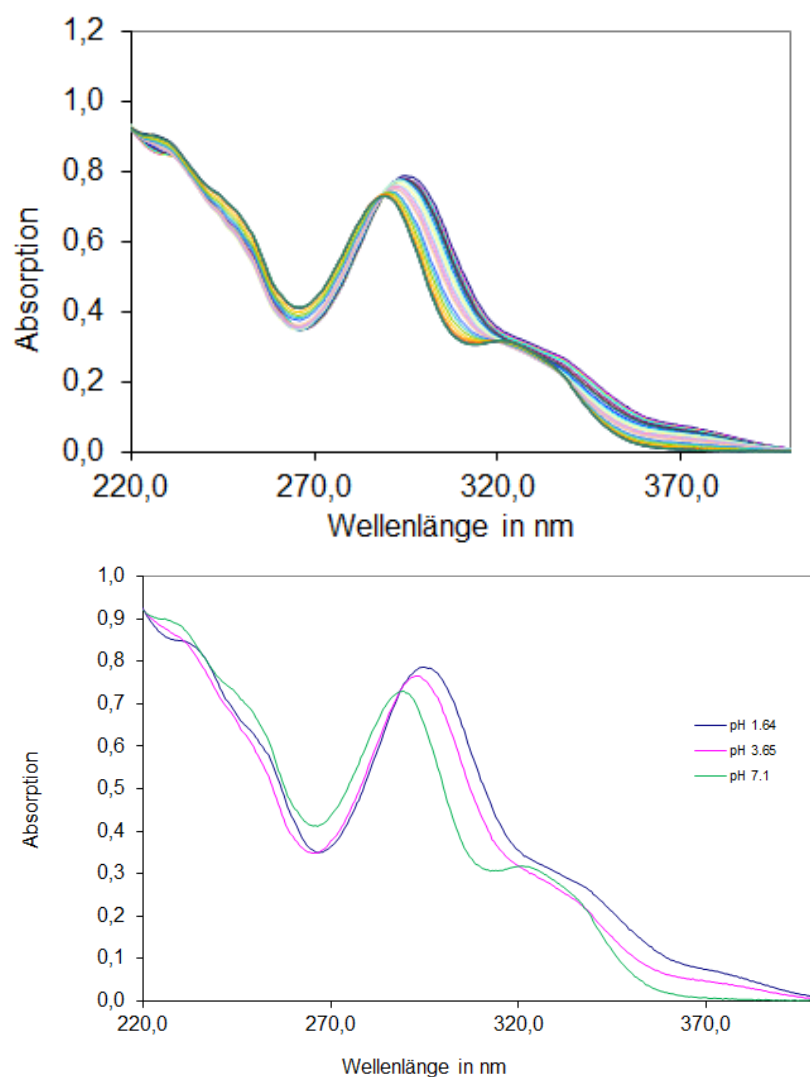
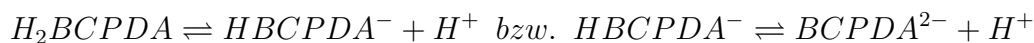


Abbildung 7.24.: UV-Spektren zur Untersuchung der Säurekonstanten von BCPDA

Zur Untersuchung der thermodynamischen Eigenschaften des Komplexes $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ ist es notwendig die Protonierungskonstanten der Säuren zu kennen.



Die Protonierungskonstanten von DCP wurden von Melton et al. bereits untersucht und auf $\text{pK}_1 = 4.75$ und $\text{pK}_2 = 2.53$ in 0.1 M NaClO_4 bestimmt.[38] Die Protonierungskonstanten von BCPDA sollten den Werten vom DCP ähnlich sein, da die Funktionalisierung mit den Chrosulfophenylgruppen keinen signifikanten Einfluss auf die Protonen der Carboxyleinheiten haben sollte. Die Konstanten wurden ermittelt, indem die UV-Spektren des Liganden in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht wurden. In Abbildung 7.24 sind die gemessenen UV-Spektren dargestellt. Im sauren pH-Bereich liegt das Maximum der Bande bei 295 nm. Im alkalischen Bereich verschiebt sich das Maximum zu 289 nm. Außerdem bildet sich ab pH 3.6 eine Bande zwischen 320 und 340 nm. Anhand dieser Variation der UV-Spektren in Abhängigkeit vom pH Wert wurde eine Peakentfaltung mit dem Excel Solver durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.25 dargestellt.

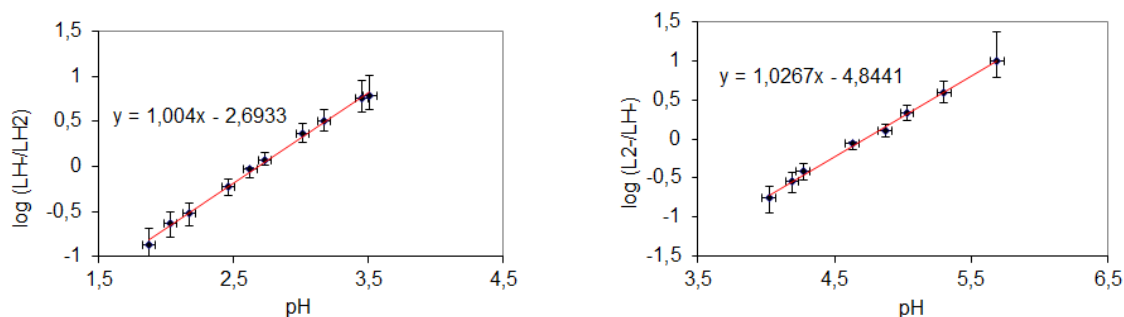


Abbildung 7.25.: Steigungsanalysen der einzelnen Deprotonierungsschritte

In Abbildung 7.25 sind die Steigungsanalysen der Deprotonierung dargestellt. Hierfür wurde der Logarithmus von deprotonierter zu protonierter Spezies in Abhängigkeit vom pH Wert aufgetragen. Das linke Schaubild zeigt den ersten Deprotonierungsschritt und das rechte Schaubild den zweiten. Die Steigung ist in beiden Fällen 1 und somit kann abgelesen werden, dass es sich jeweils um den Übergang eines Protons handelt.

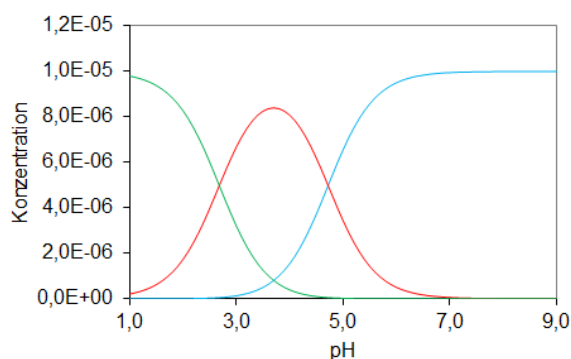


Abbildung 7.26.: pH abhängige Speziesverteilung von BCPDA

Anhand der ermittelten Protonierungskonstanten kann eine Speziation berechnet werden, wie die jeweiligen Anteile an zweifach- bzw. einfachprotoniertem und deprotoniertem Ligand bei den verschiedenen pH-Werten vorliegen. Abbildung 7.26 zeigt diese Speziationsverteilung von BCPDA in Abhängigkeit vom pH Wert.

Diskussion: Die ermittelten Protonierungskonstanten von BCPDA mit den Werten von $pK_1 = 4.71 \pm 0.03$ und $pK_2 = 2.68 \pm 0.03$ stimmen mit den literaturbekannten Werten (von Melton et al. [38]) von DCP überein. Dies ist zu erwarten, denn die Funktionalisierung mit den Chlorosulfonylgruppen sollte keinen signifikanten Einfluss auf die Carboxyleinheiten ausüben. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass sich beide Liganden thermodynamisch gleich verhalten und die Funktionalisierung keinen Einfluss auf die komplexierenden Eigenschaften des DCP ausübt.

7.5. Stabilitätskonstante UO_2 -BCPDA

Abbildung 7.27 zeigt die UV-Spektren der Komplexbildung von BCPDA mit U(VI) bei pH 4. Der freie Ligand hat ein Absorptionsmaximum bei 293 nm. Nach stufenweiser Zugabe an U(VI) verschob sich das Maximum der Bande um ca. 7 nm auf 300 nm. Beim rechten Schaubild gibt r das Verhältnis zwischen Gesamtkonzentration an U(VI) und BCPDA an. Das Schaubild gibt den Anteil des gebildeten U(VI)-BCPDA Komplexes wieder, der sich aus der Peakentfaltung mit Hilfe des Excel Solvers ermitteln ließ.

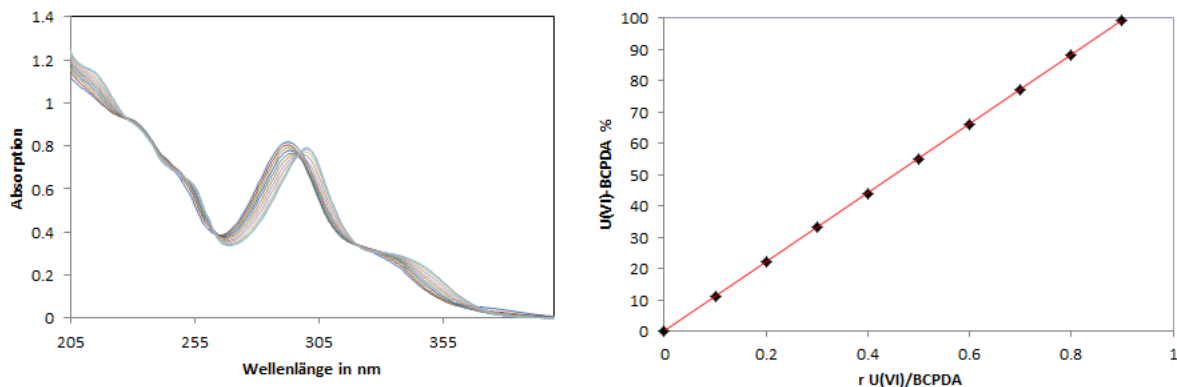


Abbildung 7.27.: UV-Spektren der Komplexbildung vom freien BCPDA zum U(VI)-BCPDA (links); Anteil des gebildeten U(VI)-BCPDA, ermittelt durch Peakentfaltung (rechts)

Die Stabilitätskonstante des U(VI)-BCPDA Komplexes ist von größter Bedeutung, wenn die thermodynamischen Eigenschaften des Komplexes untersucht und diskutiert werden sollen. Die Stabilitätskonstante wurde mittels zweier, voneinander unabhängiger Methoden untersucht. Zur Unterscheidung von freiem bzw. komplexiertem U(VI) wurde ITLC bzw. Ionenaustausch mit AG MP-50 eingesetzt. Die Untersuchungen wurden bei pH 3.2 bzw. 4.0 durchgeführt. Als Urantracer wurden sowohl ^{230}U als auch ^{237}U verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 7.28 dargestellt. Im Mittel ließ sich eine Stabilitätskonstante von $\log K 7.4 \pm 0.2$ bei einer Ionenstärke von 0.1 M NaClO_4 bestimmen. Korrigiert man diese Stabilitätskonstante mit der Davies Gleichung (siehe Anhang) so ergibt sich eine Stabilitätskonstante von $\log K 8.2$ bei der Ionenstärke Null. Für die Fehlerbalken wurde ein maximaler Fehler von 5% für die Analysen eingeräumt.

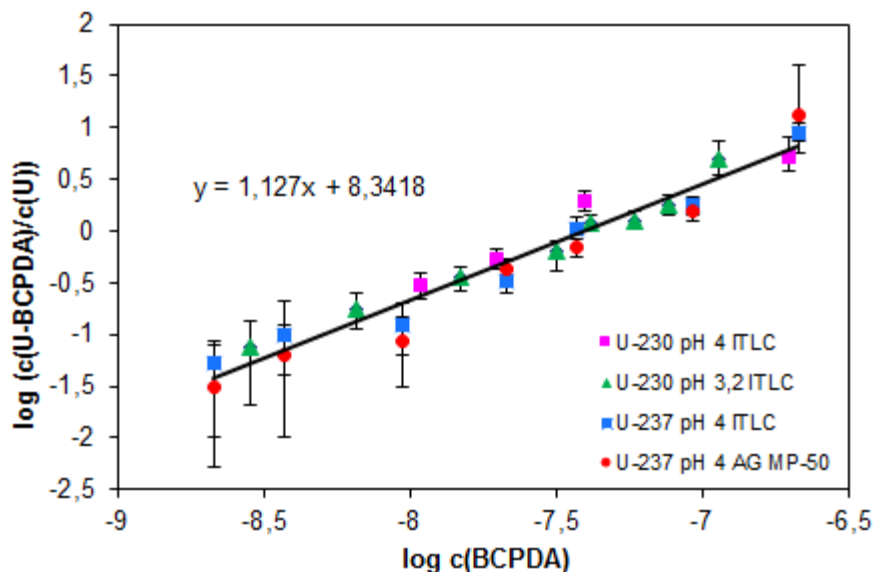


Abbildung 7.28.: Tracerexperimente zur Bestimmung der Stabilitätskonstante von U-BCPDA in 0.1 M NaClO₄

Diskussion Die Untersuchungen der Stabilitätskonstanten von UO₂-BCPDA mit zwei unterschiedlichen Urantracern, bei verschiedenen pH-Werten mit zwei unterschiedlichen Analytikmethoden ergeben konsistente Ergebnisse. Die Anwendung dieser unterschiedlichen Methoden soll die Zuverlässigkeit des Ergebnisses unterstreichen, da es die Grundlage für die thermodynamischen Berechnungen bietet. Außerdem wird davon ausgegangen, dass die hier ermittelte Stabilitätskonstante für UO₂-BCPDA auch der Stabilitätskonstante von UO₂-DCP entspricht. Die Untersuchung dieses Systems ist jedoch wegen der geringen Löslichkeit des Liganden und des Komplexes schwierig. Da jedoch, wie bereits in Abschnitt 7.4 gezeigt, die Protonierungskonstanten des BCPDA mit den literaturbekannten des DCP übereinstimmen, wird davon ausgegangen, dass sich auch bei der Bildung von Uranylkomplexen DCP und sein Derivat BCPDA nicht wesentlich unterscheiden und die Chlorosulfophenylgruppen keinen signifikanten Einfluss auf die thermodynamischen und komplexierenden Eigenschaften des Liganden ausüben.

7.5.1. Kinetik bei der Bildung des UO₂-BCPDA Komplexes

Die Bildung des UO₂-BCPDA Komplexes ist schnell und die Aktivität in Lösung zeigt keine signifikante Änderung. Es gibt dementsprechend keine Anzeichen für Sorptions- oder Fällungseffekte.

Analysen, welche nach 20 Minuten und nach 24 h durchgeführt wurden, zeigen die gleichen Ergebnisse. Dies zeigt, dass die Bildung des Komplexes nach 20 Minuten ab-

geschlossen ist. Auf diesem Ergebnis beruhend wurden die Proben zur Untersuchung der Stabilitätskonstanten nach 1 Stunde analysiert.

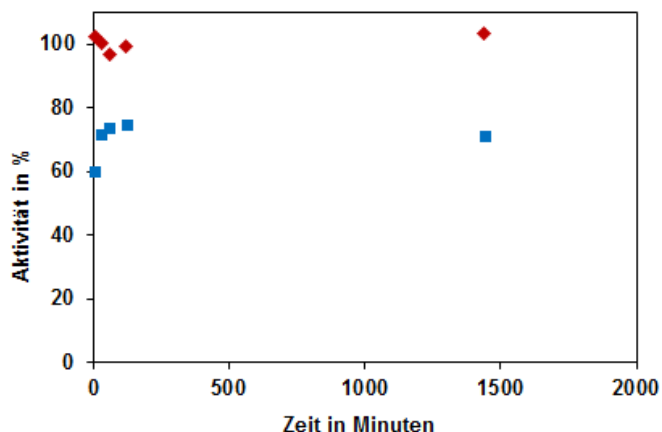


Abbildung 7.29.: Kinetik der Bildung des U(VI)-BCPDA Komplexes (blau) und Aktivität in Lösung (rot) bei pH 4 in 0.1 M NaClO_4

7.6. UO_2 -BCPDA und dessen ternäre Hydroxo- und Carbonatokomplexe

7.6.1. UO_2 -BCPDA- OH^-

Wie in Abschnitt 7.3 bereits diskutiert ist die Struktur des binären Komplexes so beschaffen, dass das Uranyl-Kation von DCP bzw. seiner Derivate in vierzähligerweise so koordiniert wird, dass eine Koordinationsstelle frei bleibt und diese leicht zur Bildung von ternären Addukten besetzt werden kann. Intention des Experimentes war die Untersuchung der Bildung des ternären Hydroxokomplexes UO_2 -BCPDA- OH^- . Das zu Grunde liegende Experiment geschah unter Ausschluss von Carbonat in einem mit Stickstoff gefüllten Handschuhkasten. Mit UV-Spektroskopie wurde die pH-abhängige Bildung des ternären Hydroxokomplexes untersucht. Es wurden neun unterschiedliche Proben mit gleichen Konzentrationen an UO_2 -BCPDA auf pH Werte zwischen 3.27 und 8.46 konditioniert und nach Erreichen des Gleichgewichtes wurden die Proben mittels UV-Spektroskopie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.30 dargestellt.

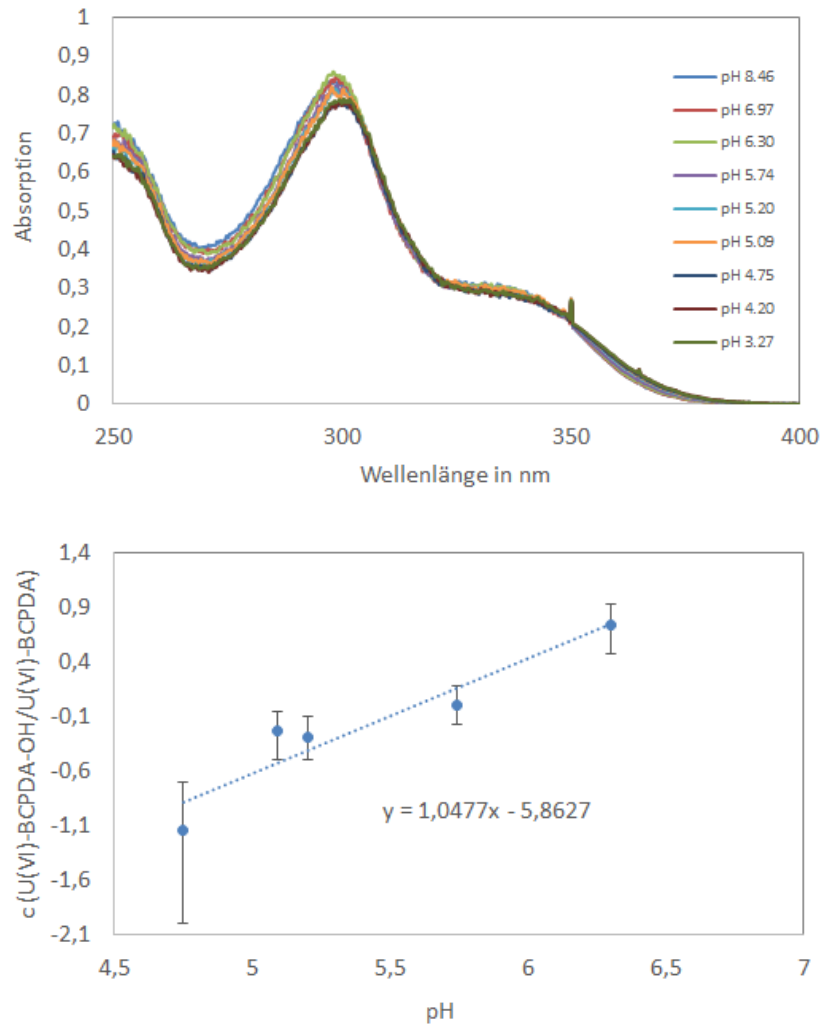


Abbildung 7.30.: UV-Spektren der pH-abhängigen Bildung des U(VI)-BCPDA-OH⁻-Komplexes (oben) und die Steigungsanalyse (unten)

Diskussion Mit der pH-Veränderung kommt es zu einer leichten Änderung in der Absorption der UV-Spektren. Die Maxima der Banden verschieben sich mit Erhöhung des pH-Wertes um etwa 3 nm zu kleineren Wellenlängen. Diese Änderung in der Absorption kann mit der Bildung des ternären Hydroxokomplexes erklärt werden.

Die UV-Spektren wurden mit Hilfe des Excel Solvers analysiert. Die Peakentfaltung wurde mit dem Spektrum, welches bei pH 4.20 aufgenommen wurde, als unteres Referenzspektrum, und dem Spektrum von pH 8.46 als oberes Referenzspektrum durchgeführt. Es kann davon ausgegangen werden, dass es bei den niedrigen pH Werten von 3.27 und 4.20 noch zu keiner Bildung des ternären Komplexes gekommen ist. Zur Peakentfaltung wurde das Spektrum bei pH 4.2 gewählt, da dieses

aufgrund eines geringeren Rauschens eine größere Sicherheit in den Ergebnissen erzielte. Das Ergebnis ist in Abbildung 7.30 auf der rechten Seite abgebildet. Es ergab sich eine Steigung von 1.05. Die Fehlerbalken gewährleisten einen Fehler von 5%, der bei der Auswertung mittels Peakentfaltung eingeräumt wurde. Die Steigung kann mit dem Übergang eines Protons erklärt werden, also dem Übergang eines Aquo-Adduktes zum Hydroxokomplex. Die erhaltenen Daten konnten hinsichtlich der Bruttokomplexbildungskonstante des ternären Komplexes ausgewertet werden und somit konnte sie auf $\log \beta = 13.2 \pm 0.2$ in 0.1 M NaClO_4 bestimmt werden.



Und folglich gibt sich für die stufenweise Komplexbildungskonstante für die Anlagerung eines Hydroxoions an den binären Komplex:



Dieses Ergebnis steht jedoch unter dem Vorbehalt, dass die Änderung der UV-Spektren in Abhängigkeit vom pH Wert nur sehr geringfügig ist und die einzelnen Spektren mit einem Rauschen behaftet sind. Um die Belastbarkeit der hier gefundenen Stabilitätskonstante zu festigen, sind weitere Experimente durchzuführen.

7.6.2. UO_2 -BCPDA- CO_3^{2-}

Die Kenntnis über die Rolle des Carbonat hinsichtlich seiner konkurrierenden Eigenschaften um das Uranyl-Kation ist für das thermodynamische Verständnis des UO_2 -BCPDA Komplexes von außerordentlicher Wichtigkeit. Es wurde eine Untersuchung der UV-Spektren mit einem CO_2 -Partialdruck von 5% in der Atmosphäre, entsprechend $p_{\text{CO}_2} = 1.4$ durchgeführt. Abbildung 7.31 zeigt die pH abhängigen UV-Spektren. Sie wurden in dem pH Bereich von 3.79 bis 8.88 aufgenommen.

Abbildung 7.32 zeigt auf der linken Seite die Modellierung des UV-Spektrums des reinen ternären Komplexes UO_2 -BCPDA- CO_3^{2-} . Hierfür wurde das Spektrum bei pH 3.79 vom Spektrum bei pH 4.81 subtrahiert. Genauso wurde mit den Spektren bei pH 8.88 und pH 8.43 verfahren. Die Reste wurden anschließend wieder bezüglich ihrer Konzentration normiert. Da sich beide berechneten und normierten Spektren ähneln, kann davon ausgegangen, dass es sich hier um die Spektren der ternären Spezies handelt. Für eine Peakentfaltung wurde ein Mischspektrum dieser beiden Spektren verwendet. Auf der rechten Seite in Abbildung 7.32 ist ein Vergleich des Spektrums bei pH 8.88 und des freien Liganden dargestellt. Bei hohen pH-Werten kommt es also zur vollständigen Dekomplexierung des UO_2 -BCPDA- CO_3^{2-} -Komplexes zugunsten der Bildung des $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$.

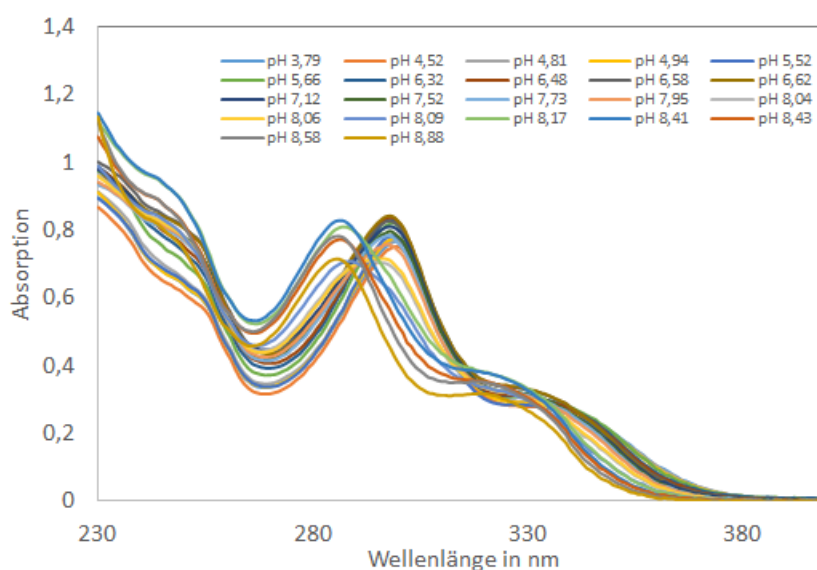


Abbildung 7.31.: UV-Spektren der pH-abhängigen Bildung des $\text{UO}_2\text{-BCPDA-CO}_3^{2-}$ -Komplexes in einer Atmosphäre mit 5% CO_2 -Partialdruck

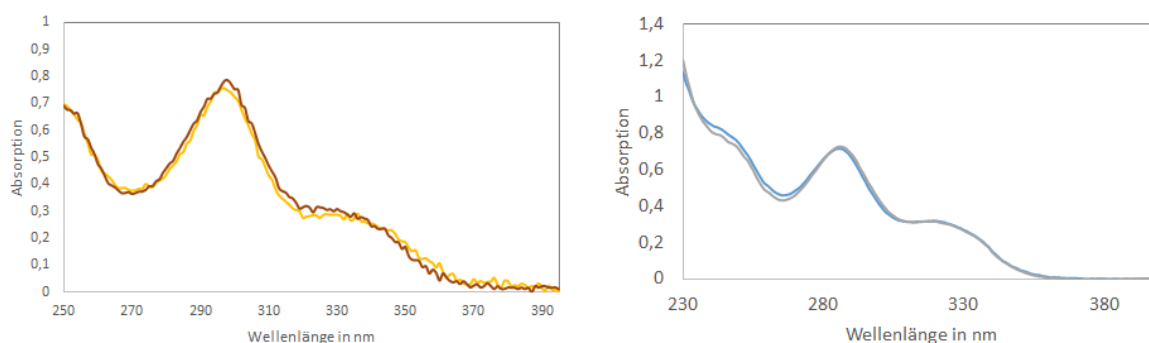


Abbildung 7.32.: Modellierung des Spektrums des ternären Komplexes (links), Vergleich des Spektrums bei pH 8.88 und dem freien Liganden BCPDA (rechts)

Abbildung 7.33 zeigt auf der linken Seite die Referenzspektren, die für eine Peakentfaltung herangezogen wurden. Als Referenzspektrum für den ternären Komplex wurde das Mischspektrum verwendet, welches sich aus den beiden modellierten Spektren aus Abbildung 7.32 ergab. Aufgrund der zu geringfügigen Änderung und einem Rauschen im Referenzspektrum des $\text{UO}_2\text{-BCPDA-CO}_3^{2-}$ -Komplexes konnte die Bildung des Komplexes mit Hilfe der Peakentfaltung nicht untersucht werden. Es konnte jedoch die Dissoziation des $\text{UO}_2\text{-BCPDA-CO}_3^{2-}$ -Komplexes zugunsten der Bildung des $\text{U(VI)-(CO}_3)_4^{4-}$ -Komplexes verfolgt werden. Das Ergebnis ist auf der rechten Seite dargestellt.

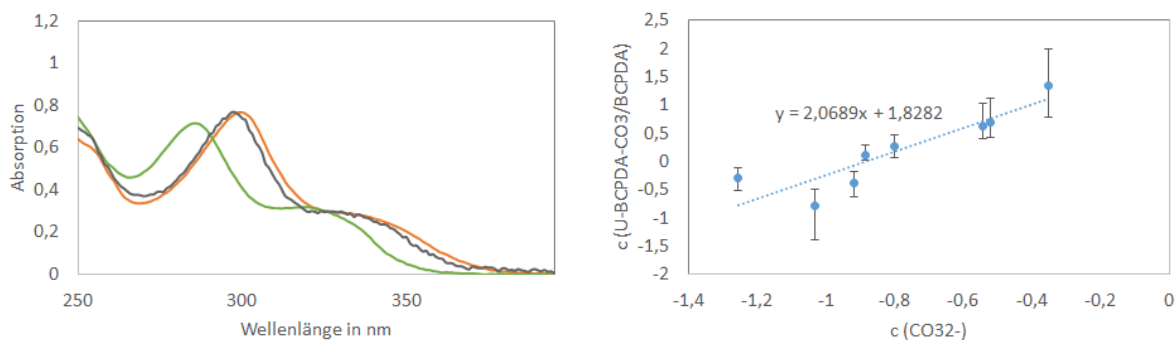


Abbildung 7.33.: Referenzspektren für UO_2 -BCPDA (rot), UO_2 -BCPDA- CO_3^{2-} (schwarz) und freies BCPDA (grün) (links); Steigungsanalyse der Dissoziation des $\text{U(VI)-BCPDA-CO}_3^{2-}$ zugunsten des $\text{U(VI)-(CO}_3)_4^{4-}$ Komplexes (links)

Diskussion Die pH-abhängige Untersuchung der UV-Spektren gibt einen Einblick auf das Verhalten des UO_2 -BCPDA Komplexes unter Einfluss von Carbonat als möglicher Konkurrent. Im Zuge der pH-Erhöhung kommt es zu einer steigenden Gleichgewichtskonzentration des Carbonats in Lösung. Abbildung 7.33 zeigt auf der linken Seite die Referenzspektren für die vorliegenden Spezies. Bei pH 3.79 (orange) liegt ausschließlich der binäre UO_2 -BCPDA Komplex vor. Mit steigendem pH-Wert kommt es zur Bildung des UO_2 -BCPDA- CO_3^{2-} -Komplexes (schwarz). Wird der pH-Wert weiterhin erhöht, kommt es zu einer starken Steigerung der Gleichgewichtskonzentration an Carbonat in Lösung. Der Tricarbonatkomplex $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ ist bei diesen Konzentrationen mit einer Bruttokomplexbildungskonstante von $\log \beta$ 21.6 stärker als der UO_2 -BCPDA Komplex und es kommt folglich zur Dissoziation des Komplexes. Im UV-Spektrum konnte die Bildung des freien Liganden (grün) visuell verfolgt werden. Da das Spektrum, welches bei pH 8.8 aufgenommen wurde, dem Spektrum des freien Liganden analog ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem pH-Wert die Dissoziation des U(VI)-BCPDA Komplexes abgeschlossen ist und sich der Tricarbonatkomplex quantitativ gebildet hat. Diese Aussage wird durch die Steigungsanalyse untermauert, denn die Peakentfaltung der Spektren ergibt in dem Bereich von 7 bis 8.8 eine Steigung von 2, was einen Hinweis auf den Austausch des BCPDA-Liganden mit zwei Carbonatmolekülen gibt. Der Peakentfaltung wurde ein Fehler von 10% eingeräumt. Diese Annahme reicht jedoch nicht aus, die Geradengleichung innerhalb der Fehlertoleranz verlaufen zu lassen. Aus diesem Grund sind weitere Experimente zur Untermauerung der gefundenen Hinweise notwendig. Da die Referenzspektren für den binären und ternären Komplex sehr ähnlich sind, war es nicht möglich eine Peakentfaltung durchzuführen und eine Stabilitätskonstante für die Bildung des ternären $\text{U(VI)-BCPDA-CO}_3^{2-}$ Komplexes zu bestimmen.

7.7. Chelatierung des Antikörpers MabThera®

Zur Untersuchung, ob der Ligand DCP bzw. seine funktionalisierten Derivate DCP-NCS und BCPDA für den Einsatz in der TAT geeignet sind, muss geklärt werden, ob diese an einen monoklonalem Antikörper gebunden werden können. Es muss ein Protokoll entwickelt werden, welches es ermöglicht, die Liganden in effizienter und reproduzierbarer Weise an den Antikörper zu binden. Zur Analyse dieser Konjugierungsexperimente wurde die UV-Spektroskopie gewählt, da auf diese Weise quantitative Aussagen bezüglich der Konzentrationen, sowohl des Liganden, als auch des Antikörpers, gemacht werden können.

7.7.1. Chelatierung vom Antikörper MabThera® mit DCP-NCS

Extinktionskoeffizient von DCP-NCS Abbildung 7.34 zeigt die UV-Spektren verschiedener Konzentrationen von DCP-NCS. Bei 280 nm ergab sich ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon = 14000 \pm 400 \frac{L}{mol \cdot cm}$ und bei 325 nm wurde der Extinktionskoeffizient auf $\varepsilon = 7400 \pm 300 \frac{L}{mol \cdot cm}$ bestimmt.

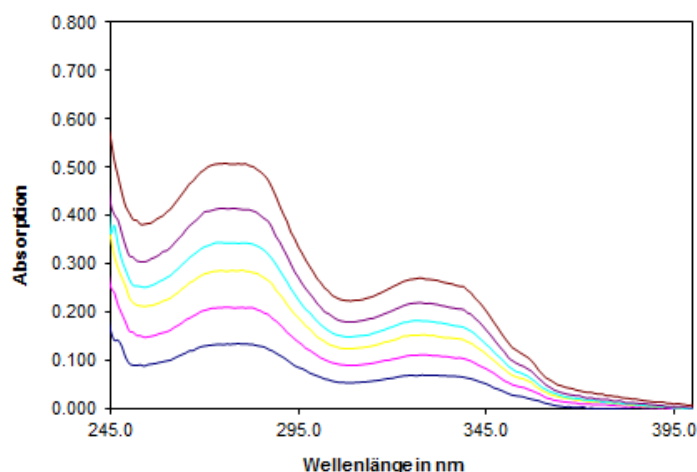


Abbildung 7.34.: Extinktionskoeffizient von DCP-NCS bei pH 7.4

Ergebnis Die Bildung des Konjugates geschieht, wie in Unterabschnitt 3.4.2 beschrieben, durch Bildung einer Thioharnstoffgruppe durch Reaktion der Isothiocyanatgruppe am DCP-NCS mit einer freien Aminogruppe am monoklonalen Antikörper. Hierfür wurde der Antikörper MabThera® in Na_2CO_3 -Puffer bei pH 9 mit einem achtfachen Überschuss an Ligand DCP-NCS über Nacht bei RT gerührt und schließlich in HEPES-Puffer bei pH 7.4 umgepuffert. Um Ausfällungen zu vermeiden wurde dem Reaktionsgemisch 10% DMF hinzugefügt. Da DCP-NCS bei 325 nm eine Bande besitzt, kann mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten des Antikörpers MabThera® bei

280 nm und des Liganden DCP-NCS bei 280 nm und 325 nm eine Aussage über die Konzentrationen und somit über das Verhältnis von Ligand zu Antikörper gemacht werden. Da der Antikörper selbst bei 325 nm keine Absorption aufzeigt, entspricht also die Absorption bei 325 nm der Konzentration des DCP-NCS und diese beträgt $\sim 2.1 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Diese entspricht bei 280 nm einer Absorption von 0.29. Somit hat der Antikörper eine Konzentration von $1.3 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ und das Verhältnis von Ligand zu Antikörper beträgt 3.3. Es sind also bei Umsetzung eines achtfachen Überschusses von Ligand zu Antikörper drei Liganden pro Antikörper gebunden.

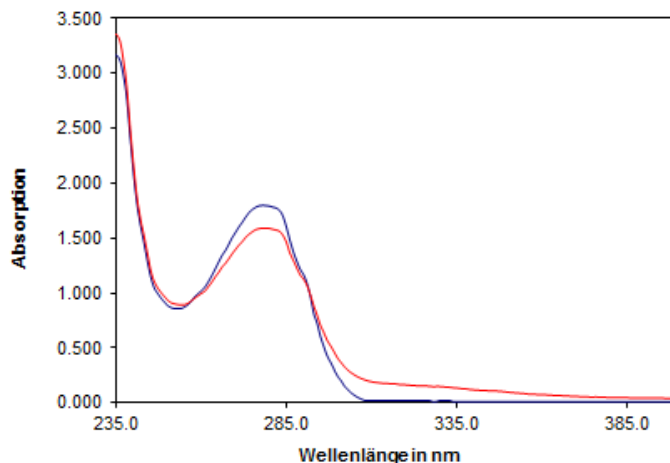


Abbildung 7.35.: UV-Spektrum des freien (blau) und des mit DCP-NCS chelatierten (rot) Antikörpers MabThera®

Dikussion Die Prozedur ist eine geeignete Methode um den Antikörper MabThera® mit DCP-NCS zu chelatieren. Mittels UV-Spektroskopie kann das Verhältnis von Ligand zu Antikörper gut bestimmt werden. Das Ergebnis zeigt, dass ca. drei Liganden pro Antikörper gebunden sind. Da ein Verhältnis von 1-5 Liganden pro Antikörper sinnvoll sind, ist dies ein gutes Ergebnis. Ein größerer Überschuss an Ligand pro Antikörper wäre nicht sinnvoll, da infolgedessen die Immunoreaktivität des Antikörpers herabgesetzt werden könnte. Der produzierte chelatierte Antikörper konnte erfolgreich mit ^{237}U radiomarkiert werden. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abschnitt 7.8 beschrieben.

7.7.2. Chelatierung vom Antikörper MabThera® mit BCPDA

Extinktionskoeffizient bei pH 7.4 In Abbildung 7.36 sind die UV-Spektren der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von BCPDA bei pH 7.4 dargestellt. Die Extinktionskoeffizienten der unterschiedlichen Wellenlängen sind der Tabelle zu entnehmen.

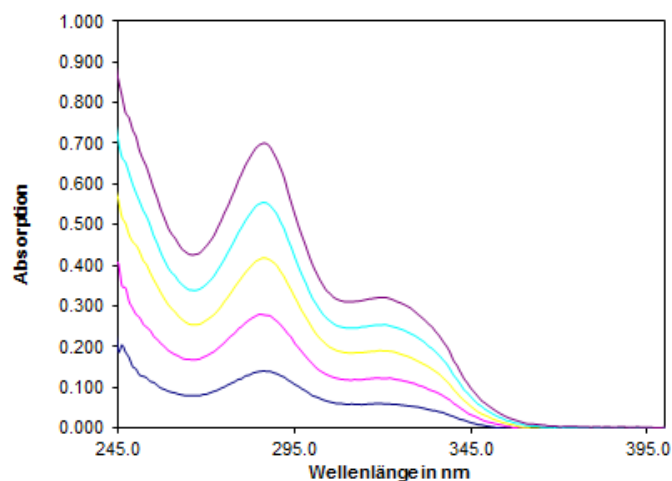


Abbildung 7.36.: Extinktionskoeffizient von BCPDA bei pH 7.4

Wellenlänge in nm	ε in $\frac{L}{mol \cdot cm}$
280	24800 ± 250
286	28000 ± 150
320	12500 ± 350

Ergebnis Die Bildung des Konjugates geschieht durch Bildung einer Sulfonamidbindung durch Reaktion der Chlorosulfonylgruppen am BCPDA mit einer Aminogruppe am monoklonalen Antikörper, wie in Unterabschnitt 3.4.3 beschrieben. Hierfür wurde der Antikörper MabThera® in Na_2CO_3 -Puffer bei pH 9 mit einem zehnfachen Überschuss an Ligand BCPDA über Nacht bei RT gerührt und schließlich in HEPES-Puffer bei pH 7.4 umgepuffert. Da BCPDA bei 320 nm eine Bande besitzt, kann mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten des Antikörpers MabThera® bei 280 nm und des Liganden BCPDA bei 280 nm und 320 nm eine Aussage über die Konzentrationen und somit über das Verhältnis von Ligand zu Antikörper getroffen werden. Da der Antikörper selbst bei 320 nm keine Absorption aufzeigt, entspricht also die Absorption bei 325 nm der Konzentration des DCP-NCS und diese beträgt $\sim 1.1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Diese entspricht bei 280 nm einer Absorption von 0.27. Somit hat der Antikörper eine Konzentration von $1.4 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ und das Verhältnis von Ligand zu Antikörper beträgt 1.2. Es ist also nach einem zehnfachen Überschuss von Ligand zu Antikörper ein Ligand pro Antikörper gebunden.

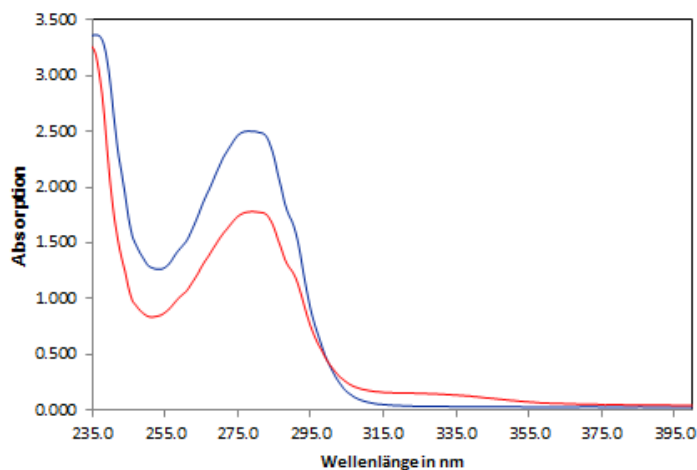


Abbildung 7.37.: UV-Spektrum des freien (blau) und des mit BCPDA chelatierten (rot) Antikörpers MabThera®

Diskussion Mit diesem Experiment hat sich gezeigt, dass der Ligand BCPDA an MabThera® gebunden werden kann. Es konnte ein Protokoll aufgestellt werden, welches ermöglichte den Liganden an den Antikörper zu binden. Mit einem zehnfachen Überschuss von Ligand zu Antikörper konnte ein Ligand BCPDA pro Antikörper gebunden werden. Dieses Verhältnis ist ideal, da auf diese Weise die Immunreaktivität des Antikörpers erhalten bleiben sollte.

7.8. Radiomarkierung der chelatierten Antikörper MabThera®

Mit den Experimenten des vorangegangenen Abschnitt 7.7 konnte gezeigt werden, dass der Ligand DCP bzw. seine funktionalisierten Derivate DCP-NCS und BCPDA an den Antikörper MabThera® gebunden werden können. Der nächste Schritt zur Untersuchung, ob das System für den Einsatz in der TAT geeignet ist, ist die Untersuchung, ob die chelatierten Antikörper DCP-MabThera® bzw. BCPDA-MabThera® mit U(VI) markiert werden können. Diese Markierungsexperimente wurden bei pH 8 mit dem Tracer ^{237}U und dem Einsatz steigender Stoffmengen des Antikörpers MabThera® durchgeführt. Um eine Markierung des Antikörpers MabThera® durch freies U(VI) auszuschließen wurde ein Blindversuch durchgeführt. Hierfür wurden bei pH 8 150 μg des Antikörpers mit dem Tracer ^{237}U versetzt und der Anteil an freiem bzw. gebundenem U(VI) wurde zeitabhängig mittels ITLC analysiert.

Ergebnis Das Ergebnis ist in Abbildung 7.38 dargestellt. Freies ^{237}U lagert sich über den beobachteten Zeitraum an keine funktionellen Gruppen des Antikörpers

MabThera® an. Aufgrund diesen Versuches ist es gewährleistet, dass es bei der Markierung des Antikörpers MabThera® nicht zu einer unspezifischen Anlagerung von U(VI) an funktionelle Gruppen des Antikörpers MabThera® kommt. Die Markierung soll ausschließlich über die Bindungsbildung eines bifunktionellen Chelatliganden mit dem Antikörper MabThera® erfolgen.

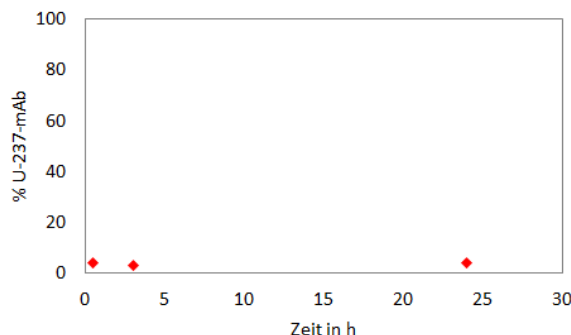


Abbildung 7.38.: Blindversuch: Freies ^{237}U , 150 μg MabThera bei pH 8

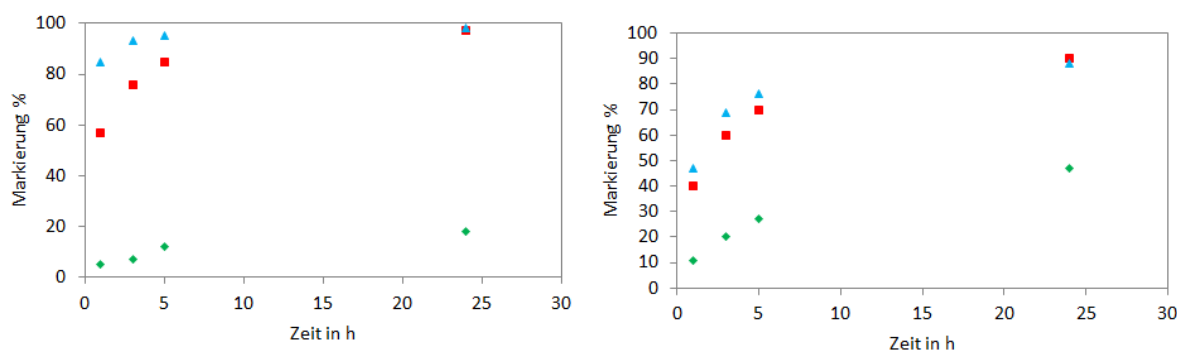


Abbildung 7.39.: Markierungseffizienz der mit BCPDA (links) bzw. mit DCP-NCS (rechts) chelatierten Antikörper in Abhängigkeit der eingesetzten Stoffmenge mit 100 μg (grün), 150 μg (rot) und 200 μg (blau) MabThera®

Diskussion Bei diesem Experiment ist eine stoffmengenabhängige Markierungseffizienz zu beobachten. Beim Einsatz von 100 μg ist die Markierung nach 24 h unvollständig. Ab einer Verwendung von 150 μg MabThera® ist die Markierung des Antikörpers rascher und nach 24 h abgeschlossen.

7.9. Stabilität UO_2 -BCPDA im Blutserum

Wie in der Zielsetzung beschrieben, war die Untersuchung der Stabilität des Komplexes UO_2 -BCPDA bzw. später seines Radioimmunkonjugates im Blutserum von

Interesse. Denn erst eine Untersuchung *in vitro* kann zeigen, ob der Komplex den physiologischen Bedingungen tatsächlich stand hält und seine Stabilität stark genug ist, dass konkurrierende Liganden keine Dissoziation hervorrufen.

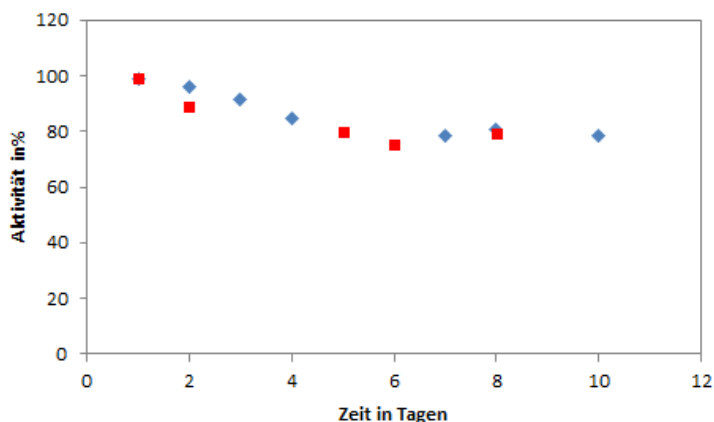


Abbildung 7.40.: Serumstabilität von UO_2 -BCPDA unter physiologischen Bedingungen bei 37°C inkubiert

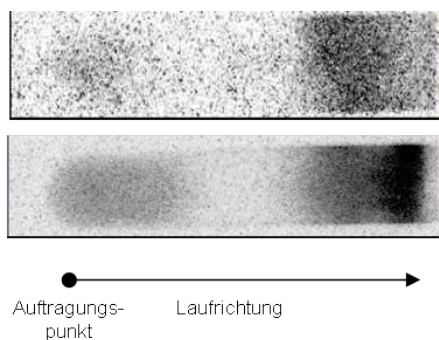


Abbildung 7.41.: Autoradiographien, Entwicklung der ITLC-Streifen in MeOH/NaCl (1:1) Tag 1 (oben) und Tag 6 (unten)

Ergebnis In diesem Experiment wurde das Verhalten des Komplexes ^{237}U -BCPDA im Blutserum mittels ITLC über einen Zeitraum von 10 Tagen untersucht. Die Untersuchung zeigt eine Dissoziation im Blutserum. Nach 10 Tagen sind nur noch ca. 80% des ^{237}U an den Liganden gebunden. Die Autoradiographie zeigt, dass nach Entwicklung das freie U(VI) am Auftragungspunkt zurück bleibt und der Komplex mit der mobilen Phase wandert. Es kommt im Laufe der Zeit zu einer Verschmierung, wie auf dem ITLC-Streifen am 6. Tag festgestellt werden kann.

Diskussion Bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit wurde der Komplex U(VI) -DCP auf seine Stabilität im Blutserum hin untersucht. Es konnte keine Dissoziation

festgestellt werden. Da die Funktionalisierung mit den Sulfohenylgruppen keinen Einfluss auf die komplexierenden Eigenschaften des tetradentaten Liganden haben sollte, war es überraschend eine Dissoziation des U-BCPDA Komplexes auf 80% nach 10 Tagen zu beobachten. Das Ergebnis der Diplomarbeit wurde nochmals reproduziert und ist in Abbildung 7.42 dargestellt. Es ergab sich die Vermutung, dass es zu einer Täuschung durch die analytische Methode kommt. Die Sulfonylgruppen können mit z. B. Aminogruppen an Serumproteinen Wechselwirkungen eingehen, sogar binden und somit würde das Konjugat sich auf dem ITLC-Streifen nicht mehr wie freier Komplex verhalten und mit der mobilen Phase wandern, sondern am Auftragungsort adsorbiert bleiben, und sich somit wie proteingebundenes Konjugat, aber auch wie freies U(VI) verhalten. Somit würde eine Dissoziation vorge-täuscht werden. Um diese Vermutung zu beweisen wurde das gleiche Experiment mit 4,7-Bisphenyl-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthrolin (DPDCP) durchgeführt. Also ein ebenfalls mit Phenylgruppen funktionalisiertes DCP, aber ohne polare Sulfonylgruppen, welche Wechselwirkungen mit Serumproteinen eingehen können. Das Ergebnis dieser Stabilitätsuntersuchung ist in Abbildung 7.43 dargestellt. Es konnte in zwei verschiedenen Experimenten keine Dissoziation festgestellt werden. Hieraus lässt sich schließen, dass auch U-BCPDA im Blutserum stabil sein muss.

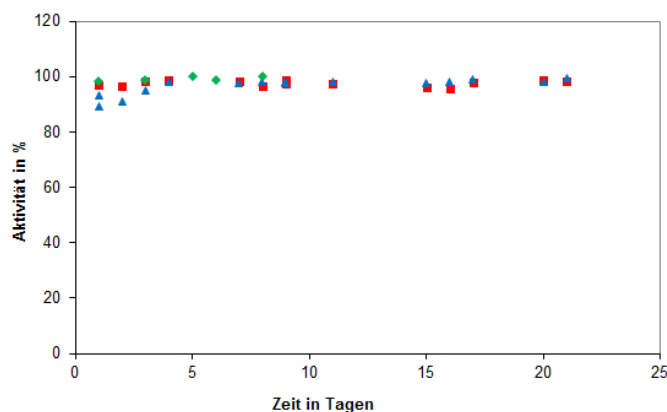


Abbildung 7.42.: Serumstabilität UO_2 -DCP, Chelex (blau), ITLC (rot) und U-237 mit ITLC neu (grün) unter physiologischen Bedingungen bei 37°C inkubiert

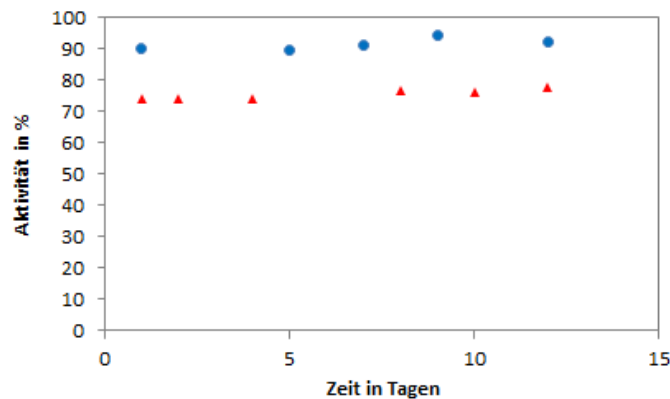


Abbildung 7.43.: Serumstabilität von UO₂-DPDCP unter physiologischen Bedingungen bei 37°C inkubiert

7.10. Stabilität UO₂-DCP-MabThera®/ UO₂-BCPDA-MabThera®

Zur Klärung, ob der Komplex bzw. die Radiokonjugate für den Einsatz in der gezielten Alphatherapie geeignet sind muss die Frage der Stabilität unter physiologischen Bedingungen bzw. im Blutserum überprüft werden. Hierfür wurden die Radioimmunokonjugate in unterschiedlichen Medien überprüft, um evtl. die starken um das Uranyl-Kation konkurrierenden Liganden im Blutserum ausmachen zu können.

Das Augenmerk wurde dabei auf die folgenden möglichen Konkurrenten gelegt:

- physiologische Carbonatkonzentration
- physiologische HSA-Konzentration
- physiologische HSTF-Konzentration
- physiologische Phosphatkonzentration

Zur Untersuchung der Stabilität der Radiokonjugate unter Einfluss möglicher Konkurrenten wurden Tracerexperimente durchgeführt. Außerdem wurde die thermodynamische Stabilität mit Hilfe von PhreeqC berechnet.

7.10.1. UO_2 -BCPDA-MabThera® in HEPES mit physiologischer Carbonatkonzentration

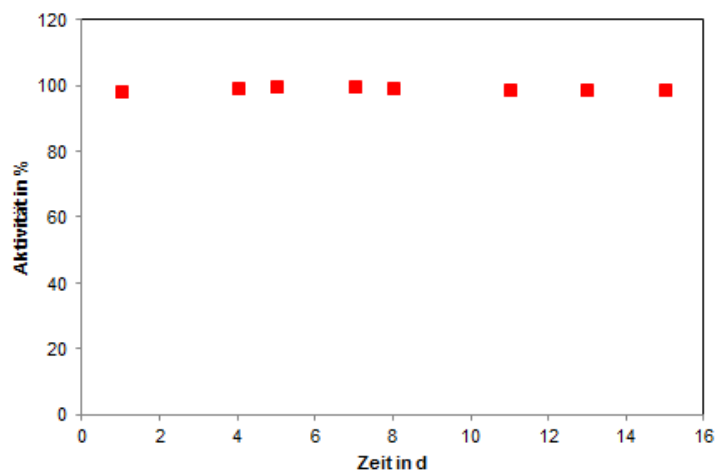


Abbildung 7.44.: Stabilität von $\text{U-BCPDA-MabThera}^{\circledR}$ in 2 mM HEPES-Puffer mit physiologischer Carbonatkonzentration bei pH 7.4 bei 37°C inkubiert

In Abbildung 7.44 sind die Ergebnisse der Stabilität des Radioimmunokongjugats $^{237}\text{U-BCPDA-MabThera}^{\circledR}$ in 2 mM HEPES-Pufferlösung mit physiologischer Carbonatkonzentration dargestellt. Über den gesamten beobachteten Zeitraum ist das Radioimmunokongjugat in diesem Medium stabil. Physiologische Konzentrationen an Carbonat haben keinen Einfluss auf die Stabilität. Dieses Ergebnis deutet auf eine kinetische Stabilität des Komplexes hin, denn thermodynamisch wäre der Komplex nicht stabil genug, um bei diesem pH-Wert und bei solch hohen Konzentrationen an Carbonat nicht zu dissoziieren.

In Abbildung 7.45 ist die Speziesverteilung des Komplexes U-BCPDA dargestellt. Aufgrund der hohen Konzentration an Carbonat, die unter physiologischen Bedingungen vorliegt, würde der Komplex dissoziieren.

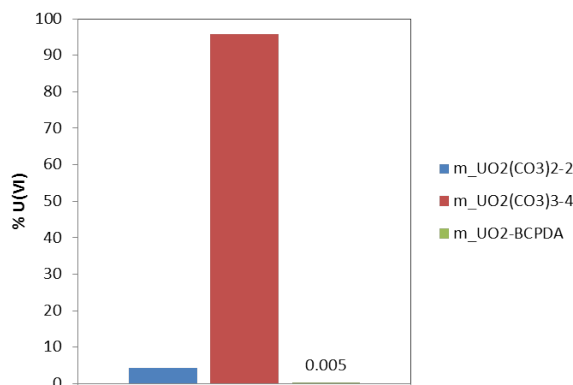


Abbildung 7.45.: Berechnete Speziesverteilung von UO₂-BCPDA bei pH 7.4, I=0.1 in Anwesenheit von 2 mM HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1 \cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1 \cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{CO}_3^{2-})=2.5 \cdot 10^{-2}$ M

7.10.2. UO₂-BCPDA-MabThera® in HEPES mit physiologischer HSA Konzentration

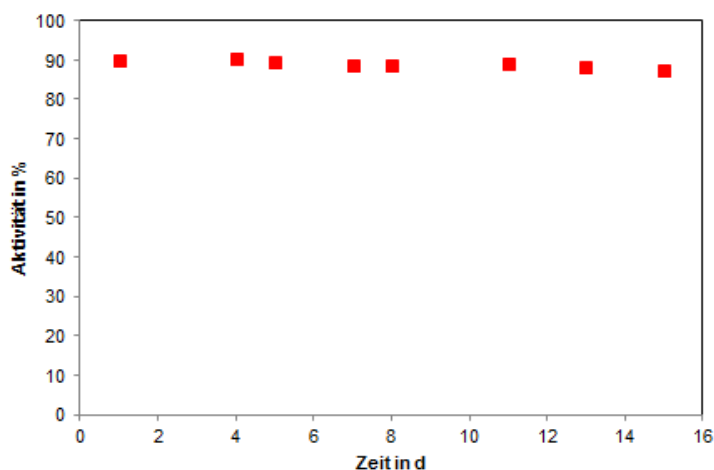


Abbildung 7.46.: Stabilität von UO₂-BCPDA-MabThera® in 2 mM HEPES mit physiologischer HSA Konzentration bei pH 7.4 bei 37°C inkubiert

Abbildung 7.46 zeigt die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von UO₂-BCPDA-MabThera® in 2 mM HEPES-Pufferlösung mit der physiologischen HSA-Konzentration $6.3 \cdot 10^{-4}$ M. Die experimentellen Punkte, die mittels ITLC-SG in Na-Citratlösung erhalten wurden, sind über den Zeitraum von über zwei Halbwertszeiten konstant und keine Dissoziation war zu beobachten. Das thermodynamische Verhalten dieses Systems ist in Abbildung 7.47 dargestellt. Unter Einbeziehung der Konzentrationen

und der Stabilitätskonstanten ist der Komplex unter diesen Bedingungen thermodynamisch betrachtet nicht stabil. Es muss also eine kinetische Stabilität vorliegen.

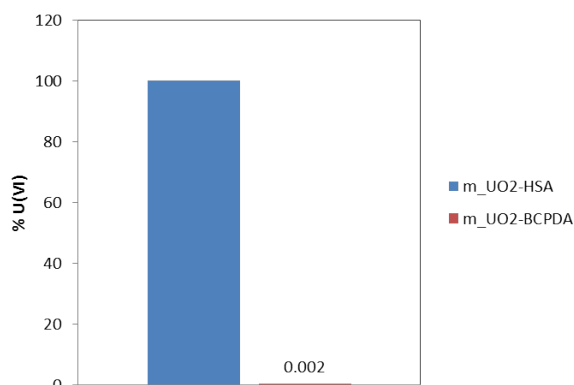


Abbildung 7.47.: Berechnete Speziesverteilung von $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1 \cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1 \cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{HSA})=6.3 \cdot 10^{-4}$ M

Die thermodynamische Berechnung für HSTF verläuft analog. Die Stabilitätskonstanten von U(VI)-HSA und U(VI)-HSTF sind nach einem vereinfachten Modell gleich. Die Konzentration von HSA im Blutserum liegt um eine Größenordnung über der von HSTF.

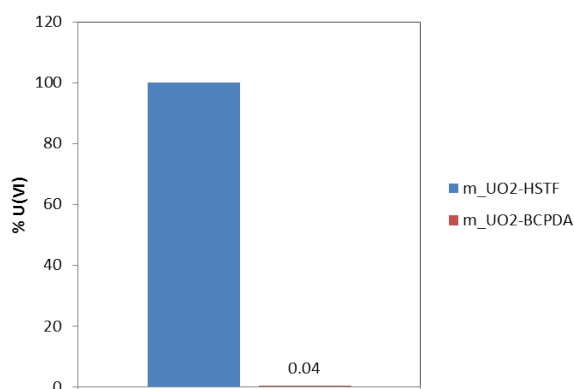


Abbildung 7.48.: Berechnete Speziesverteilung von $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1 \cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1 \cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{HSTF})=3.7 \cdot 10^{-5}$ M

7.10.3. UO₂-BCPDA-MabThera® in HEPES mit physiologischer Phosphatkonzentration

Ein weiterer potenzieller Konkurrent im Blutserum ist Phosphat mit einer Konzentration von $1.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Um zu überprüfen, ob Phosphat einen Einfluss auf die Stabilität des Radiokonjugats besitzt, wurde ein System mit der physiologischen Phosphatkonzentration von $1.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ bei pH 7.4 in 2 mM HEPES-Pufferlösung angesetzt und das Radioimmunokonjugat zeitabhängig mittels ITLC untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.49 dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass Phosphat keinen Einfluss auf die Stabilität des Radiokonjugats ausübt, denn es wurde keine Dissoziation über den untersuchten Zeitraum beobachtet.

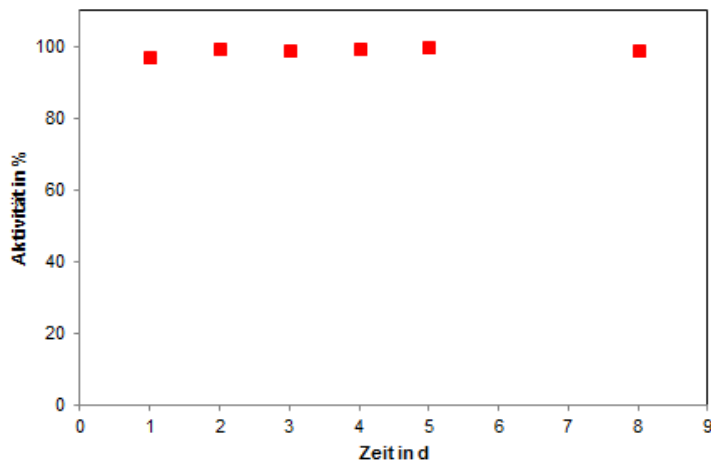


Abbildung 7.49.: Stabilität von UO₂-BCPDA-MabThera® in 2 mM HEPES mit physiologischer Phosphatkonzentration bei pH 7.4 bei 37°C inkubiert

In Abbildung 7.50 ist die berechnete Speziesverteilung dargestellt. Dabei wurde angenommen, dass das gesamte Phosphat frei vorliegt. Aufgrund der hohen Konzentration ($1.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) und einer Komplexbildungskonstante von $\log K 13.25$ ($I=0$) würde der Komplex UO₂-BCPDA dissoziieren.

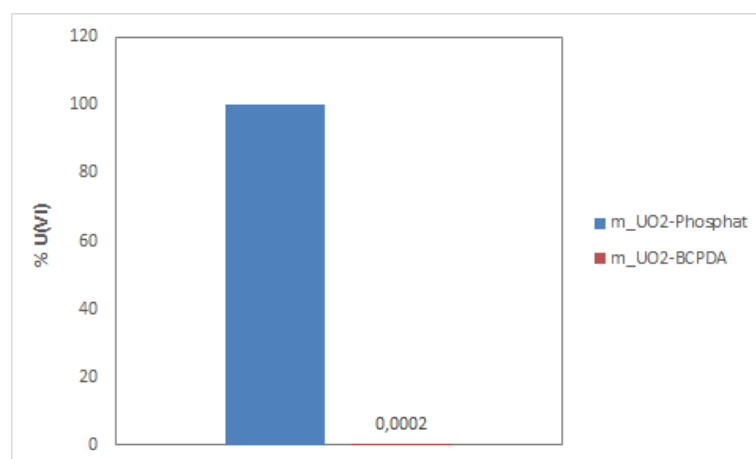


Abbildung 7.50.: Berechnete Speziesverteilung von $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1 \cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1 \cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{Phosphat})=1.1 \cdot 10^{-3}$ M

7.10.4. $\text{UO}_2\text{-BCPDA-MabThera}^\circledast$ bzw. $\text{UO}_2\text{-DCP-MabThera}^\circledast$ Blutserum

Untersuchung in 20%-igem Blutserum Die vorangegangenen Stabilitätsuntersuchungen deuten auf eine starke kinetische Stabilität hin, denn kein untersuchter Ligand war in physiologischer Konzentration stark genug, um mit dem BCPDA um das Uranyl-Kation in Konkurrenz treten zu können. Folglich muss zur Vervollständigung der experimentellen Untersuchungen das Radioimmunkonjugat auch noch im Blutserum untersucht werden. Da 100%-iges Blutserum eine sehr dichte Matrix besitzt, wurde die Stabilitätsuntersuchung zusätzlich in 20%-igem Blutserum untersucht. Abbildung 7.51 zeigt die Stabilität der Konjugate $\text{UO}_2\text{-BCPDA-MabThera}^\circledast$ und $\text{UO}_2\text{-DCP-MabThera}^\circledast$ in 20%-igem Blutserum.

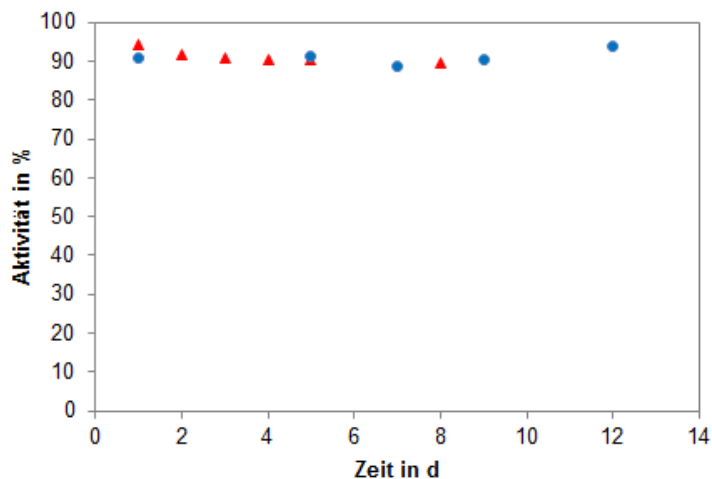


Abbildung 7.51.: Stabilität von UO₂-BCPDA-MabThera® (rot) bzw. UO₂-DCP-MabThera® (blau) in 20%-igem Blutserum in saliner Lösung bei 37°C inkubiert

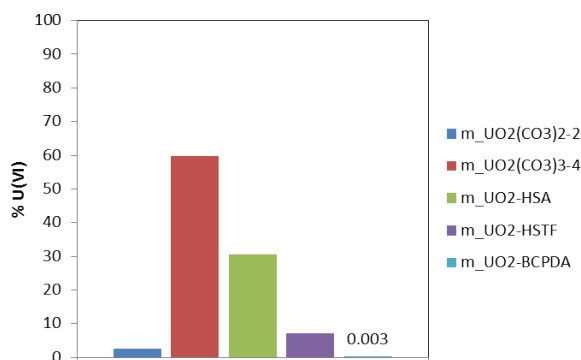


Abbildung 7.52.: Berechnete Speziesverteilung von UO₂-BCPDA bei pH 7.4, I=0.1 in Anwesenheit von $2 \cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1 \cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1 \cdot 10^{-3}$ M, $c(\text{CO}_3^{2-})=2.5 \cdot 10^{-2}$ M, $c(\text{HSA})=6.3 \cdot 10^{-4}$ M, $c(\text{HSTF})=3.7 \cdot 10^{-5}$ M und $c(\text{Ca})=2.5 \cdot 10^{-3}$ M

Diskussion Das Experiment zur Untersuchung von UO₂-BCPDA-MabThera® bzw. UO₂-DCP-MabThera® zeigt, dass beide Radiokonjugate in 20%-igem Blutserum über einen Zeitraum von über 10 Tagen stabil sind.

Untersuchung in 100%-igem Blutserum In Abbildung 7.53 und Abbildung 7.54 sind die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung im unverdünnten Blutserum dargestellt.

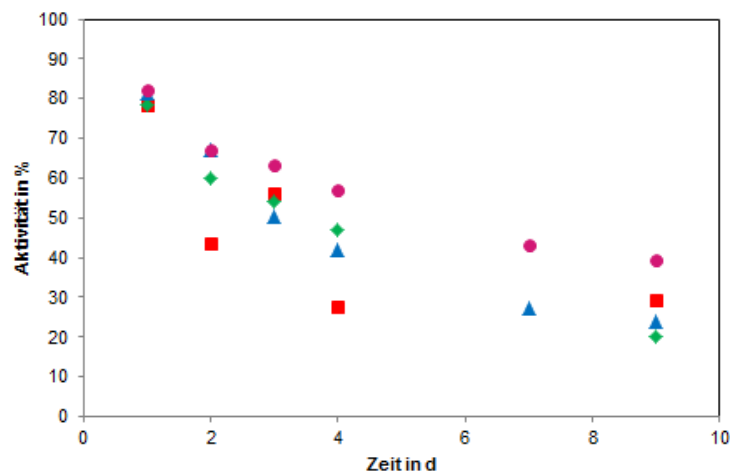


Abbildung 7.53.: Stabilität von UO₂-BCPDA-MabThera® und UO₂-DCP-MabThera® in Blutserum bei 37°C inkubiert

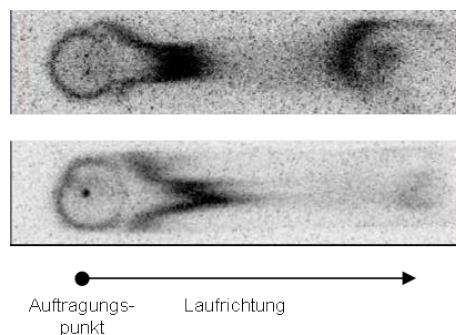


Abbildung 7.54.: Autoradiographien der ITLC-Streifen nach Tag 2 (oben) und Tag 6 (unten), nach Entwicklung in 0.05 M Na₃-Citrat Lösung

Diskussion Das Ergebnis dieses Experiment suggeriert eine Dissoziation der Radioimmunokonjugate UO₂-BCPDA-MabThera® und UO₂-DCP-MabThera® im Blutserum. Aufgrund der vorangegangenen Stabilitätsuntersuchung in 20%-igem Blutserum und dem daraus resultierenden Ergebnis, dass die Konjugate nicht dissoziieren, gibt es die Vermutung, dass die verwendete Analytikmethode nicht geeignet ist, um dieses System in 100%-igem Blutserum zu untersuchen, da es zu Wechselwirkungen sowohl zwischen dem Antikörper als auch mit U(VI) und den Serumproteinen kommen kann. In Unterabschnitt 3.2.1 wurde bereits diskutiert, dass U(VI) mit den Serumproteinen HSA und HSTF starke Wechselwirkungen eingeht. Aus den Ergebnissen der Charakterisierung in Unterabschnitt 7.3.3 geht hervor, dass der U(VI)-DCP Komplex sowohl in fester, als auch in flüssiger Phase so vorliegt, dass eine Koordinationsstelle zur Koordinierung weiterer Liganden frei ist, aufgrund deren es

zur Anlagerung von Serumproteinen und folglich zu Verschmierungen während der Entwicklung auf dem ITLC-Streifen kommen kann. Aufgrund dessen, wird vermutet, dass die Konjugate tatsächlich im Blutserum stabil sind, so wie in Abbildung 7.51 gezeigt. Es sollte jedoch noch eine Analytikmethode gefunden werden, mit welcher diese Vermutung bewiesen werden kann. Der zeitliche Rahmen, dieser Arbeit hat dies jedoch nicht mehr zugelassen.

7.11. Serumstabilität Ac-DOTA-MabThera®

Im Vergleich zum $\text{UO}_2\text{-BCPDA-MabThera}^\circledast$ bzw. $\text{UO}_2\text{-DCP-MabThera}^\circledast$ ist es interessant dieses mit einem schon etablierteren System zu vergleichen. $^{225}\text{Ac-DOTA-CD20 MabThera}^\circledast$ ist ein schon untersuchtes System, das bereits in klinischen Studien verwendet wird.

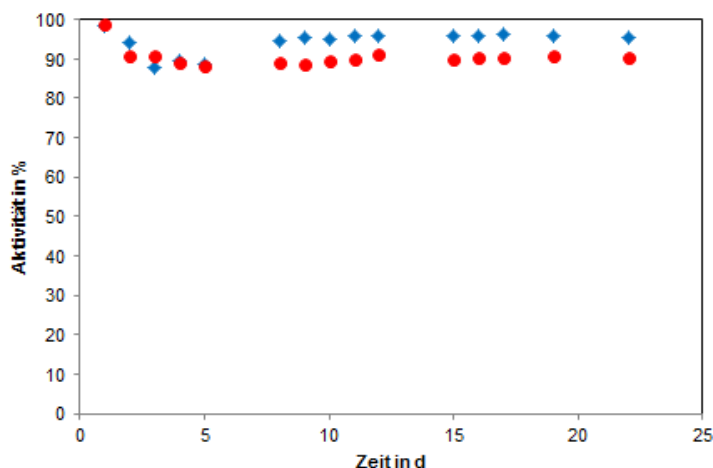


Abbildung 7.55.: Stabilität von Ac-DOTA-MabThera® im Blutserum bei 37°C inkubiert

Diskussion In Abbildung 7.55 sind die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung im Blutserum dargestellt. Das Radioimmunkonjugat ist über den betrachteten Zeitraum stabil. In diesem System ist der Effekt der dichten Matrix nicht von Bedeutung, da der Chelatligand DOTA das Ac(III) vollständig einschließt und somit keine Koordinationsstellen frei bleiben, an denen konkurrierende Liganden koordinieren können.

7.12. Bindungsstudie Ac-DOTA-MabThera®

Um einen Antikörper an sein entsprechendes Antigen zu binden ist es unabdingbar, dass die chemische Integrität des radiomarkierten Antikörpers garantiert ist. Aufgrund eines z.B. zu hohen Verhältnisses von Ligand zu Antikörper könnte eine Veränderung der Molekülstruktur verbunden sein wie die Inaktivierung einer Bindungsstelle des Antigens. Somit würde die Affinität des Antikörpers zum Antikörper beeinflusst und geschwächt werden.

Somit müssen die Bedingungen der Markierung und der Reinigung so gewählt werden, dass die Intaktheit der Bindungsstellen des Antikörpers gewährleistet ist. Um zu untersuchen, ob die Radiomarkierung eines Antikörpers keinen Einfluss auf seine Bindungsaffinität zum Antikörper hat, können *in vitro* Zellbindungsstudien durchgeführt werden.

Es wurde wie in Unterabschnitt 6.7.4 beschrieben eine Bindungsstudie mit ^{225}Ac -MabThera® an K422 Zellen mit anschließender Scatchard Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.56 und in Abbildung 7.57 dargestellt.

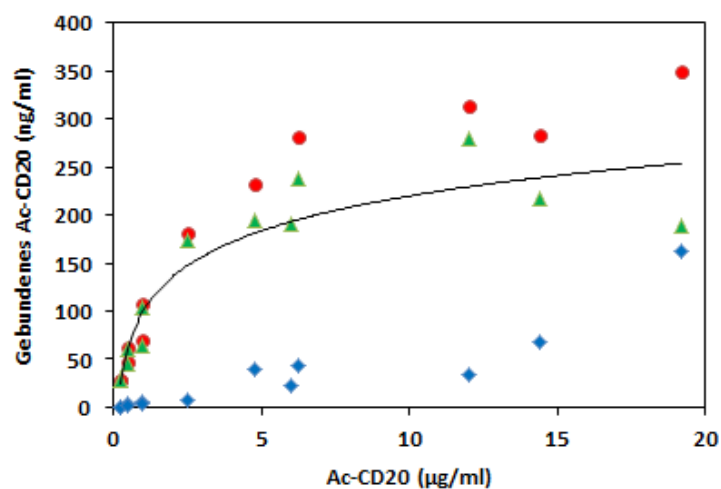


Abbildung 7.56.: Bindungsstudie ^{225}Ac -DOTA-MabThera® an K422 Zellen, totale Bindung (rot), unspezifische Bindung (blau), resultierende spezifische Bindung (grün). Der Anteil an ^{225}Ac -DOTA-MabThera®, welcher an die Zellen bindet ist aufgetragen gegen die ansteigende Menge an hinzugefügtem ^{225}Ac -MabThera®. Die nichtspezifische Bindung wurde mit einem hundertfachen Überschuss an unmarkiertem Antikörper ermittelt.

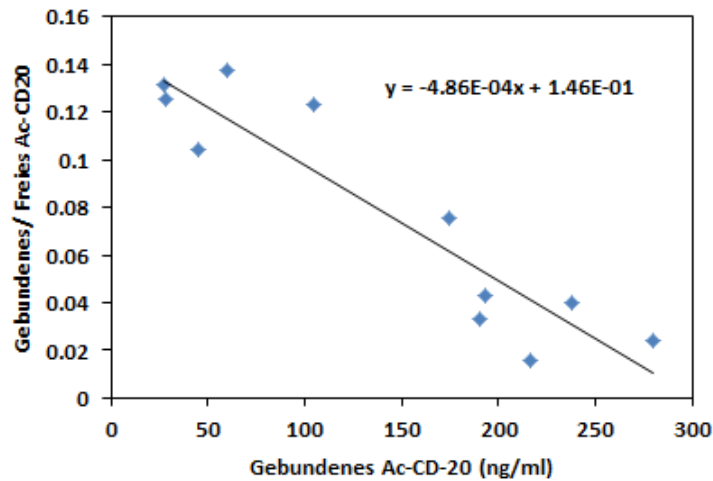


Abbildung 7.57.: Bindungsaffinität dargestellt mit Hilfe eines Scatchard Plots

Diskussion Die hier dargestellte Bindungsstudie von ^{225}Ac -MabThera® an K422 Zellen war erfolgreich. Bei ca. $2.4 \cdot 10^5$ Antigenen pro Zelle, können genauso viele Konjugate bei Sättigung an die Zellen gebunden werden. Mit einem Wert von 13.7 nM war die Bindungsaffinität niedrig und gibt Hinweis auf eine starke Bindung des Konjugats ^{225}Ac -MabThera® an die K422 Zellen.

Es ist gelungen mit dem Radiokonjugat ^{225}Ac -DOTA-MabThera® eine Bindungsstudie an K422 durchzuführen. Das Radioimmunkonjugat bindet im nanomolaren Bereich an die Zellen und weist somit eine starke Affinität auf.

8. Zusammenfassung und Ausblick

8.1. Zusammenfassung

Um zu untersuchen, ob ^{230}U ein geeigneter Alpha-Strahler für den Einsatz in der TAT ist, muss ein geeigneter bifunktionaler Chelatligand gefunden werden, und dieser Ligand muss das Uranyl-Kation in solch stabiler Weise komplexieren, dass es auch unter den Bedingungen *in vivo* stabil ist, also auch nach Injektion in den menschlichen Körper nicht dissoziiert und dieser Chelatligand muss in effizienter und reproduzierbarer Weise an einen Antikörper gebunden werden können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die experimentelle Untersuchung und Charakterisierung von 2,9-Dicarboxy-1,10-phenanthrolin (DCP) bzw. seiner Derivate 4,7-Bisphenyl-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthrolin (DPDCP) und 4,7-Bis(chlorosulfofenyl)-2,9-dicarboxy-1,10-phenanthrolin (BCPDA) hinsichtlich ihrer Eignung das Uranyl-Kation in stabiler Weise zu komplexieren und desweiteren, ob es als bifunktionaler Ligand zur Bildung stabiler mit ^{230}U markierter Radioimmunokonjugate angewendet werden kann. Es ist wichtig ein umfassendes Verständnis für die thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften des Liganden und seines Komplexes mit dem Uranyl-Kation zu erhalten, um dessen Verhalten *in vivo* einschätzen zu können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist in folgenden Punkten nochmals zusammengefasst:

- Untersuchung der Säurekonstanten von BCPDA und der Stabilitätskonstanten von UO_2 -BCPDA
- Eine detaillierte Charakterisierung mittels Kristallstrukturanalyse, NMR, IR- und UV-Spektroskopie um ein Verständnis des Komplexes, besonders unter dem Einfluss konkurrierender Liganden zu erhalten.
- Aufstellung eines Protokolls zur Synthese der Radioimmunokonjugate UO_2 -DCP-MabThera® und UO_2 -BCPDA-MabThera®.
- Stabilitätsuntersuchungen der Radioimmunokonjugate unter dem Einfluss konkurrierender Liganden und im Blutserum.
- Bindungsstudie des schon etablierten Radioimmunokonjugates ^{225}Ac -DOTA-MabThera®.

8.1.1. Thermodynamische Untersuchungen von BCPDA bzw. UO₂-BCPDA

Die Kenntnis der Säurekonstanten des Liganden BCPDA ist die Grundlage zum thermodynamischen Verständnis für den Liganden. Die Säurekonstanten für den Liganden DCP sind bereits literaturbekannt. Es wurde erwartet, dass sich die Protonierungskonstanten des BCPDA vom nicht funktionalisierten DCP nicht unterscheiden. Die Säurekonstanten wurden ermittelt, indem die pH abhängige Absorptionsänderung des Liganden mittels UV-Spektroskopie verfolgt wurde. Auf diese Weise konnten für



die pK_s Werte 2.68 ± 0.03 und 4.71 ± 0.03 in 0.1 M NaClO₄ bestimmt werden. Erwartungsgemäß stimmen diese Säurekonstanten mit den von Dean et al. gefundenen Konstanten für DCP mit 2.53 und 4.75 überein.[38] Eine wichtige Aussage, die anhand dieses Ergebnisses gemacht werden kann, ist, dass die Funktionalisierung des Liganden mit den Chlorosulfofenylgruppen keinen signifikanten Einfluss auf die Carboxylgruppen ausübt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Funktionalisierung auch auf die komplexierenden Eigenschaften des BCPDA keinen Einfluss hat.

Ein weiteres grundlegendes Ergebnis war die Untersuchung der Stabilitätskonstante UO₂-BCPDA. Diese konnte mit Hilfe unterschiedlicher Tracerexperimente auf

$$\log K = 7.4 \pm 0.2 \text{ in } 0.1 \text{ M NaClO}_4$$

bestimmt werden. Dieses Ergebnis bietet die Grundlage für alle thermodynamischen Berechnungen und Einschätzungen bezüglich der Komplexstabilität unter dem Einfluss konkurrierender Liganden.

8.1.2. Charakterisierung von Uranyl-Komplexen mit DCP-Derivate

Zur Synthese der Uranyl-Komplexe mit DCP bzw. DPDCP wurde jeweils ein Äquivalent Uranylнитrat bzw. Uranylacetat und ein Äquivalent DCP bzw. DPDCP in ca. 1 ml DMSO oder einem entsprechenden Lösungsmittel gelöst und anschließend vereinigt. Dabei fiel sofort das jeweilige Addukt als Pulver aus, welches durch nochmaliges Erhitzen und anschließendem langsamem Abkühlen in einem Dewar Kristalle in quantitativer Ausbeute bildete. Die Tabelle zeigt einen Vergleich der Bindungswinkel, der die Sauerstoffatome der Carboxylgruppen des Liganden mit dem zentralen Uran-Atom einschließt.

	Winkel O-U-O
$UO_2 - DCP \cdot DMSO$	169.6
$UO_2 - DPDCP \cdot DMSO$	169.5
$UO_2 - DCP \cdot NaOAc$	173.5
$UO_2 - DCP \cdot GdmAc$	176.4
$UO_2 - DPDCP \cdot DMAA$	170.1

In allen gebildeten Kristallen ist die Struktur ähnlich. Sie basiert auf einem zentralen Uran-Atom, welches an zwei symmetrieäquivalente Sauerstoffatom-Atome gebunden ist, mit denen es als Einheit das Uranyl-Kation bildet. Der Ligand koordiniert das Uranyl-Kation vierfach in äquatorialer Ebene durch die beiden Stickstoff-Atome des Phenanthrolins und die beiden Sauerstoffatome der Carboxylgruppen. Der eingeschlossene Winkel zwischen den Sauerstoffatomen und dem Uran-Atom lässt genug Platz, dass ein dritter Ligand die Struktur einer pentagonalen oder hexagonalen Bipyramide vervollständigen kann.

In Abbildung 8.1 sind die Kristallstrukturen von UO_2 -DCP bzw. UO_2 -DPDCP dargestellt. Beide Kristalle konnten mittels eines Extraktionsverfahrens synthetisiert werden. Die Kristallstrukturen zeigen einen eindeutigen Unterschied auf: Im Falle des UO_2 -DCP bildet sich in Form eines eindimensionalen Strangs ein Polymer. Im Falle des UO_2 -DPDCP bildet sich ein Tetramer. Dies ist anhand des sterischen Anspruchs der Phenylgruppen am Phenanthrolingrundgerüst zu begründen.

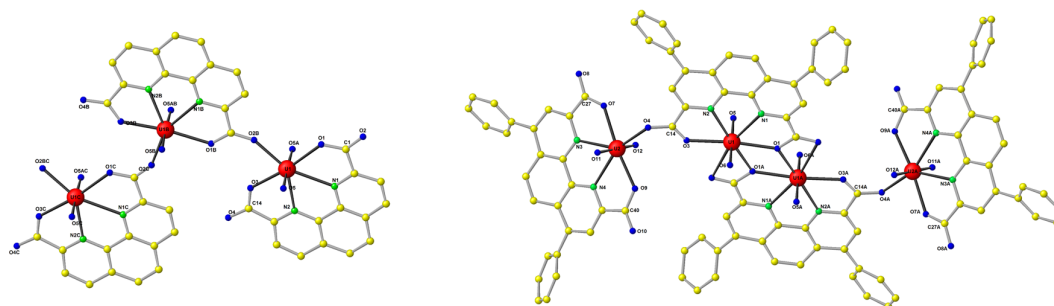


Abbildung 8.1.: Vergleich der Kristallstrukturen von $[UO_2-DCP]_n$ und $[UO_2-DPDCP]_4$

Experimente zeigen, dass UV-Spektren, welche in flüssiger Phase aufgenommen wurden, die gleichen Banden zeigen, wie UV-Spektren, welche in fester Phase aufgenommen wurden. Aufgrund der bekannten Kristallstruktur kann also eine Aussage über die Struktur in flüssiger Phase getroffen werden. Die Struktur des Komplexes in flüssiger Phase ist also analog der Struktur im Kristall.

Die pH-abhängige Bildung des ternären Komplexes UO_2 -BCPDA- OH^- wurde mittels UV-Spektroskopie untersucht. Die Änderung der Absorption kann mit dem Übergang eines Protons erklärt werden. Eine Bruttokomplexbildungskonstante von

$\log \beta = 13.2 \pm 0.2$ in 0.1 M NaClO₄ wurde ermittelt, die jedoch aufgrund eines Rauschens der ausgewerteten UV-Spektren unter Vorbehalt steht.

Die pH-abhängige Bildung des UO₂-BCPDA-CO₃²⁻ wurde unter einem erhöhten Partialdruck an CO₂ untersucht. Es konnte bei pH Werten > 7 eine Dissoziation des UO₂-BCPDA-CO₃²⁻ zugunsten des Komplexes UO₂(CO₃)⁴⁻ beobachtet werden. Eine Aussage über die thermodynamische Bildungskonstante des ternären Komplexes ist aufgrund der zu geringfügigen Änderung der Absorption beim Übergang vom binären zum ternären Komplex nicht möglich.

8.1.3. Biochemische Untersuchungen

Sowohl für DCP-NCS als auch BCPDA ist es gelungen ein Protokoll zur Chelatierung des Antikörpers MabThera® aufzustellen. Die Bedingungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Die hergestellten Immunkonjugate konnten anschließend mit ²³⁷U radiomarkiert werden.

	BCPDA-MabThera®	DCP-MabThera®
Art der Bindung	Sulfonamid	Thioharnstoff
pH	9.0	9.0
Puffer	0.05 M Na ₂ CO ₃	0.05 M Na ₂ CO ₃
Anteil DMF	~10%	~10 %
L/mAb (Start)	10	8
Dauer	18 h	18 h
Temperatur	RT	RT
L/mAb (Produkt)	1	3

8.1.4. Stabilitätsuntersuchung

Stabilitätsuntersuchungen von UO₂-DCP, UO₂-BCPDA und UO₂-DPDCP wurden unter dem Einfluss verschiedener Liganden in physiologischen Konzentrationen und im Blutserum mit Hilfe der Instant Thin Layer Chromatography untersucht. UO₂-BCPDA suggerierte eine Dissoziation, sodass nach 10 Tagen nur noch 80% Komplex vorlagen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu vorangegangenen Stabilitätsuntersuchungen von UO₂-DCP, welches keine Dissoziation im Blutserum zeigte. Dieser Sachverhalt ließ vermuten, dass die Chlorosulfophenylgruppen des BCPDA Wechselwirkungen und Bindungen mit den Serumproteinen eingehen. Eine Stabilitätsuntersuchung mit dem Komplex UO₂-DPDCP bestätigte diese Vermutung, da dieser Komplex über den beobachteten Zeitraum stabil war und keine Dissoziation zeigte.

Die Radioimmunkonjugate UO₂-DCP-MabThera® und UO₂-BCPDA-MabThera® wurden ebenfalls unter dem Einfluss potenzieller konkurrierender Liganden und im Blutserum untersucht. HSA, HSTF, Carbonat und Phosphat in physiologischen

Konzentrationen und 20%-iges Blutserum waren nicht stark genug, um eine Dissoziation der Radioimmunokonjugate hervorzurufen. Dieses Verhalten zeigt eine enorme kinetische Stabilität der Komplexe, da thermodynamisch betrachtet, der Komplex unter solchen Bedingungen nicht stabil wäre. Die Untersuchungen in unverdünntem Blutserum zeigten jedoch eine rasche Dissoziation der Radioimmunokonjugate. Die Schlussfolgerung für diesen Sachverhalt ist, dass die Matrix des Blutserums für dieses System zu dicht ist. Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen den Serumproteinen und dem Antikörper MabThera® und zur Anlagerung der Serumproteine an die freie Koordinationsstelle des $\text{UO}_2\text{-DCP}$ bzw. $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$. Es sollten jedoch weitere Experimente durchgeführt werden, um diesen Sachverhalt zu beweisen und zu zeigen, dass die Radioimmunokonjugate *in vitro* tatsächlich stabil sind.

8.1.5. Zellbindungsexperimente von Ac-DOTA-MabThera® an K422 Zellen

Im Vergleich zu dem neuen System $\text{UO}_2\text{-DCP}$ wurde auch das schon etabliertere und bereits klinisch angewendete System Ac-DOTA untersucht. Das Radioimmunokonjugat Ac-DOTA-MabThera® wurde bezüglich seiner Bindungsaffinität an den Lymphomzellen K422 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Radioimmunokonjugat im nanomolaren Bereich an die Zellen bindet und somit eine starke Affinität aufweist.

8.2. Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen ein Verständnis der thermodynamischen Eigenschaften und des kinetischen Verhaltens vom $\text{UO}_2\text{-DCP}$ Komplex zu erhalten. Der Ligand DCP komplexiert das Uranyl-Kation in stabiler Weise und der Komplex ist von einer außerordentlichen kinetischen Stabilität bestimmt. Desweiteren kann der Komplex mittels eines einfachen reproduzierbaren Protokolls an den monoklonalen Antikörper MabThera® gebunden werden. Um die Untersuchungen für die Tauglichkeit des Komplexes bezüglich seines Einsatzes in der TAT abzuschließen, fehlen noch die Untersuchungen an Zellen. Zum einen sollte getestet werden, ob die Immunoreaktivität des monoklonalen Antikörpers MabThera® nach Bindung zum $\text{UO}_2\text{-DCP}$ Komplex erhalten bleibt. Hierfür ist eine Bindungsstudie, analog zu der in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudie mit $^{225}\text{Ac-DOTA-MabThera}^\circledast$ durchzuführen. Desweiteren ist die Zytotoxizität des ^{230}U zu untersuchen. Die Zerfallsreihe generiert in einer Kaskade 5 Alphateilchen und setzt eine Energie von 34.2 MeV frei. Somit sollte ^{230}U eine hohe Zytotoxizität aufweisen, die jedoch experimentell noch nachgewiesen werden muss.

Die ermittelte thermodynamische Stabilitätskonstante ist mit einem Wert von $\log K$ 8.2 bei Ionenstärke 0 im Vergleich zu anderen Komplexen, welche für Therapie Zwecke geeignet sind, relativ klein. Ideal wäre es, einen Liganden zu finden,

welcher das Uranylion in solcher Weise komplexiert, dass alle Koordinationstellen des Metallatom bereits durch den Liganden abgesättigt sind. Auf diese Weise wäre der Angriff von konkurrierenden Liganden erschwert. Ein vielversprechender Ligand ist Terpyridindicarbonsäure (TPDCA).

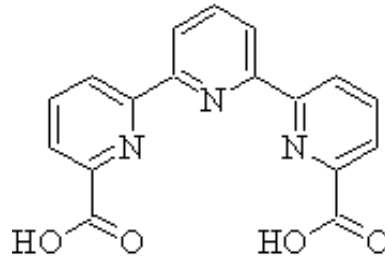


Abbildung 8.2.: TPDCA: ein weiterer potentieller Ligand für den Einsatz in der TAT?

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Fanghänel am Institut für Transurane, Europäische Kommission, durchgeführt. Mein Dank geht an:

- Prof. Dr. Thomas Fanghänel, da er mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit am ITU anzufertigen und für seine wissenschaftliche Betreuung in dieser Zeit.
- Dr. Alfred Morgenstern für die interessante Themenstellung, die umfassende Betreuung und Geduld.
- Dr. Christos Apostolidis und Dr. Frank Bruchertseifer für die Zusammenarbeit, die wertvollen Diskussionen und Geschichten.
- Dr. Gilles Montavon für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und die Möglichkeit bei ihm in Nantes Experimente durchzuführen.
- Dr. Olaf Walter für seine Hilfe, Anregungen und Zusammenarbeit.
- Mirjam Weis für die gute und herzliche Zusammenarbeit.
- Prof. Dr. Horst Geckeis für seine Vorlesung in der Radiochemie, ohne die ich diese Arbeit nicht geschrieben hätte.
- Meiner Familie und ganz besonders meiner Mutter, deren Unterstützung nicht in Worte fassbar ist.

A. Anhang

A.1. Stabilitätskonstanten

Stabilitätskonstanten einiger Uranyl-Komplexe bei Ionenstärke $I = 0$ und 25 °C . [10]

Chemische Reaktion	$\log \beta$
$UO_2^{2+} + CO_3^{2-} \rightleftharpoons UO_2CO_3$	9.68
$UO_2^{2+} + 2CO_3^{2-} \rightleftharpoons UO_2(CO_3)_2$	16.9
$UO_2^{2+} + 3CO_3^{2-} \rightleftharpoons UO_2(CO_3)_3$	21.6
$UO_2^{2+} + PO_4^{3-} \rightleftharpoons UO_2PO_4$	13.25
$UO_2^{2+} + HPO_4^{2-} \rightleftharpoons UO_2HPO_4$	7.2
$UO_2^{2+} + H_2PO_4^{3-} \rightleftharpoons UO_2H_2PO_4$	1.12
$UO_2^{2+} + H_2O \rightleftharpoons UO_2OH^+ + H^+$	-5.25
$UO_2^{2+} + 2H_2O \rightleftharpoons UO_2(OH)_2 + 2H^+$	-12.15
$UO_2^{2+} + 3H_2O \rightleftharpoons UO_2(OH)_3 + 3H^+$	-20.25
$UO_2^{2+} + 4H_2O \rightleftharpoons UO_2(OH)_4 + 4H^+$	-32.40
$2UO_2^{2+} + CO_3^{2-} + 3H_2O \rightleftharpoons (UO_2)_2CO_3(OH)_3^-$	-0.885
$2Ca^{2+} + UO_2^{2+} + 3CO_3^{2-} \rightleftharpoons Ca_2UO_2(CO_3)_3$	30.55
$UO_2^{2+} + HSA \rightleftharpoons UO_2 - HSA$	10.8
$UO_2^{2+} + HSA + CO_3^{2-} \rightleftharpoons UO_2 - HSA - CO_3$	17.7

A.2. Protonierungskonstanten

Chemische Reaktionen	pK _s -Wert	Kommentar
$H_2DCP \rightleftharpoons HDCP^- + H^+$	2.54	I = 0.1 M NaClO ₄ [38]
$HDCP^- \rightleftharpoons DCP^{2-} + H^+$	4.75	

A.3. Erklärung wichtiger Begriffe

A.4. Ionenstärkekorrektur

Thermodynamische Berechnungen beziehen sich immer auf einen bestimmten Standardzustand. Diese Definition ist von der IUPAC festgelegt. Für den Standardzustand eines gelösten Stoffes B gilt beim Standarddruck $m_B = m^\circ = 1 \frac{\text{mol}}{\text{kg}}$ und der Aktivitätskoeffizient ist $\gamma_B = 1$. In verdünnten Lösungen sind die notwendigen Extrapolationen zum Standardzustand einfach. Allerdings können für viele Reaktionen die Messungen nicht in verdünnten Lösungen durchgeführt werden. Präzise thermodynamische Informationen können zum Beispiel für Reaktionen, die Ionen mit einer hohen Ladung enthalten, nur in Gegenwart eines inerten Elektrolyten erhalten werden, dessen Konzentration hoch genug ist, dass sicher gestellt ist, dass die Aktivitätskoeffizienten während der gesamten Messdauer konstant sind. Es gibt verschiedene Methoden um zur Ionenstärke I=0 zu extrapolieren.[39]

Specific ion interaction model (SIT) Der Debye-Hückel Term, welcher in Ausdrücken für Aktivitätskoeffizienten in verdünnten Lösungen dominant ist, bezieht sich auf elektrostatische, nicht-spezifische weitreichende Wechselwirkungen. Bei höheren Konzentrationen müssen auch nicht-elektrostatische Wechselwirkungen im Nahbereich in Betracht gezogen werden. Hierfür werden meist ionenstärkeabhängige Terme in den Debye-Hückel Ausdruck hinzugefügt.

Es gibt zwei Hauptannahmen:

1. Annahme:

Der Aktivitätskoeffizient von einem Ion j der Ladung z in einer Lösung mit der Ionenstärke I_m kann beschrieben werden als:

$$\log_{10}\gamma_j = -z_j^2 D + \sum_k \varepsilon(j, k, I_m) m_k$$

D beschreibt den Debye-Hückel Term

$$D = \frac{A\sqrt{I_m}}{1 + Ba_j\sqrt{I_m}}$$

A und B sind temperaturabhängige Konstanten und a_j ist der effektive Durchmesser des hydratisierten Ions j. Die Summe in der Gleichung geht über alle Ionen k in der Lösung. Ihre Molalität wird als m_k bezeichnet. Oft ist die Ionenkonzentration sehr viel größer als die Konzentrationen der reagierenden Spezies. So macht das ionische Medium den Hauptteil für den Wert $\log_{10}\gamma_j$ aus. Diese Tatsache macht es oft möglich, die Summe zu vereinfachen, sodass nur die Wechselwirkungen zwischen Reaktanden/Produkten der chemischen Reaktion und den Ionen des ionischen Mediums betrachtet werden

2. Annahme:

Die Wechselwirkungskoeffizienten ε sind für Ionen der gleichen Ladung und für ungeladene Ionen gleich null. Die Begründung hierfür liegt darin, dass ε , welches die spezifischen und kurzreichenden Wechselwirkungen beschreibt, für Ionen der gleichen Ladung klein sein müssen, da sie sich gewöhnlich nicht in nächster Nähe aufhalten, sondern aufgrund der elektrostatischen Abstoßung weit entfernt sind. Die gleiche Erklärung wird auch für die ungeladenen Spezies verwendet.

Pitzer-Gleichungen Das Pitzer-Modell beschreibt die Thermodynamik von Elektrolytgemischen, in denen die Wechselwirkung der Ionen schwach ist. Im Gegensatz zu einfacheren Modellen betrachtet das Pitzer-Modell die Wechselwirkungen der gelösten Spezies in einem stärkeren Umfang. Für die Lösung eines einzelnen Elektrolyten MX können die Aktivitätskoeffizienten durch folgende Gleichung dargestellt werden.

$$\ln\gamma_{MX} = |z_M z_X| f^\gamma + m \frac{(2\nu_M\nu_X)}{\nu} B_{MX}^\gamma + m^2 \left(\frac{2(\nu_M\nu_X)^{\frac{3}{2}}}{\nu} \right) C_{MX}^\gamma$$

Hier beschreiben $\nu = \nu_M + \nu_X$ die Anzahl von M und X Ionen und z_M und z_X ihre Ladung. Die Molalität wird durch m beschrieben.

In wässrigen Lösungen bei 25 °C und einem Druck von 10^5 Pascal gelten die folgenden Beziehungen:

$$f^\gamma = -0.329 \left(\frac{\sqrt{I_m}}{1 + 1.2\sqrt{I_m}} + 1.667 \ln(1 + 1.2\sqrt{I_m}) \right)$$

$$B_{MX}^\gamma = 2\beta_{MX}^{(0)} + \frac{\beta_{MX}^{(1)}}{2I_m} (1 - (1 + 2\sqrt{I_m} - 2I_m)e^{-2\sqrt{I_m}})$$

$$C_{MX}^\gamma = \frac{3}{2} C_{MX}^\phi$$

f^γ beschreibt den Debye-Hückel Term, der zusätzlich den osmotischen Effekt berücksichtigt. Die Parameter $\beta_{MX}^{(0)}$ und $\beta_{MX}^{(1)}$ definieren den zweiten und C_{MX}^ϕ den dritten Virialkoeffizienten.

$I_m = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$ ist der Ausdruck für die Ionenstärke in molalen Einheiten.

Die Davies-Gleichung Die Davies-Gleichung kann genutzt werden um Aktivitätskoeffizienten von Elektrolyten bei niedrigen Ionenstärken zu berechnen. Die Davies-Gleichung für den Aktivitätskoeffizienten eines Ions i der Ladung z_i ist bei 25°C gegeben durch:

$$\log_{10}\gamma_i = -0.5102z_i^2\left(\frac{\sqrt{I_m}}{1+\sqrt{I_m}} - 0.3I_m\right)$$

Die Gleichung hat keine theoretische Bedeutung aber sie funktioniert gut bei Ionenstärken bis zu $0.1 \frac{\text{mol}}{\text{kg}}$ und sollte nicht bei höheren Ionenstärken angewendet werden.

A.5. Rohdaten

A.5.1. Charakterisierung verschiedener U(VI)-DCP-Derivate

DCP

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{d}^6\text{-dmsO}$), $\delta = 8.74$ (d, $^3J_{\text{HH}}=8.3$ Hz), 8.42 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.2$ Hz), 8.2 (s).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{d}^6\text{-dmsO}$), $\delta = 166.2$ (s), 148.2 (s), 144.7 (s), 138.1 (s), 130.4 (s), 128.3 (s), 123.3 (s).

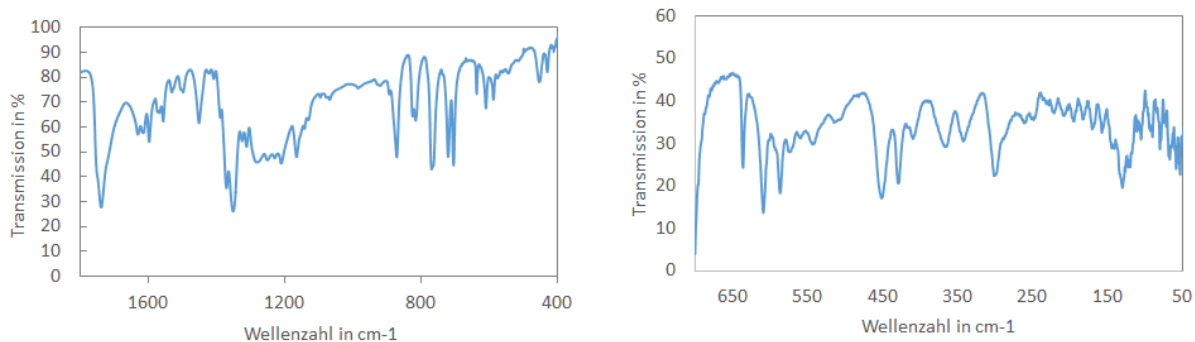


Abbildung A.1.: IR-Spektren von DCP in KBr (links) und PE (rechts)

IR [KBr], cm^{-1} : 1738 (vs), 1451 (m), 1350 (vs), 1165 (m), 871(s), 816 (s), 769 (s), 720 (s), 704 (s).

IR [PE], cm^{-1} : 636 (vs), 609 (vs), 587 (s), 452 (vs), 428 (s), 366 (m), 342 (m), 300 (vs).

	<i>UO₂DCP · DMSO</i>
Empirische Formel	<i>C₁₈H₁₈N₂O₈S₂U</i>
Molekulargewicht	692.49
Temperatur	293(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P2 ₁ /c
Einheitszelle	a = 6.6661(12) Å; $\alpha = 90^\circ$ b = 27.862(5) Å; $\beta = 95.216(2)^\circ$ c = 11.218(2) Å; $\gamma = 90^\circ$
Volumen	2074.8(6) Å ³
Z	4
Dichte (berechnet)	2.217 mg/mm ³
Absorptionskoeffizient	8.074 mm ⁻¹
F(000)	1312
Theta Bereich für Daten	1.462 - 28.319°
Index Bereich	$-8 \leq h \leq 8$ $-37 \leq k \leq 36$ $-14 \leq l \leq 14$
Gesammelte Reflexionen	24329
Unabhängige Reflexionen	5062[R(int)=0.994]
Vollständigkeit zu Theta	25.242° 99.9%
Verfeinerungsmethode	kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	5062 / 6 / 287
Anpassungstest	1.124
Finale R Indize [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0545, wR2 = 0.1336
R Indize (alle Daten)	R1 = 0.0658, wR2 = 0.1383
Extinktionskoeffizient	n/a
Größte Differenz Peak/Tal	3.479 und -3.201 e.Å ⁻³

Nach 10 s Messung pro Bildfläche und einem Winkel von $\delta = 0.45$ Grad wurden 4260 Reflexionen gemessen.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(5) 1.774(7); U(1)-O(6) 1.773(7); U(1)-O(3) 2.321(6); U(1)-O(1) 2.339(6);
U(1)-O(7) 2.367(7); U(1)-N(1) 2.542(7); U(1)-N(2) 2.530(7)

O(6)-U(1)-O(5) 178.5(3); O(3)-U(1)-O(1) 169.6(2)

¹H-NMR (d⁶-dmsO), $\delta = 9.27$ (d, ³J_{HH}=8.5 Hz), 8.80 (d, ³J_{HH}=8.2 Hz), 8.56 (s).

¹³C-NMR (d⁶-dmsO), $\delta = 170.9$ (s), 157.2 (s), 141.8 (s), 131.3 (s), 128.5 (s), 125.0 (s).

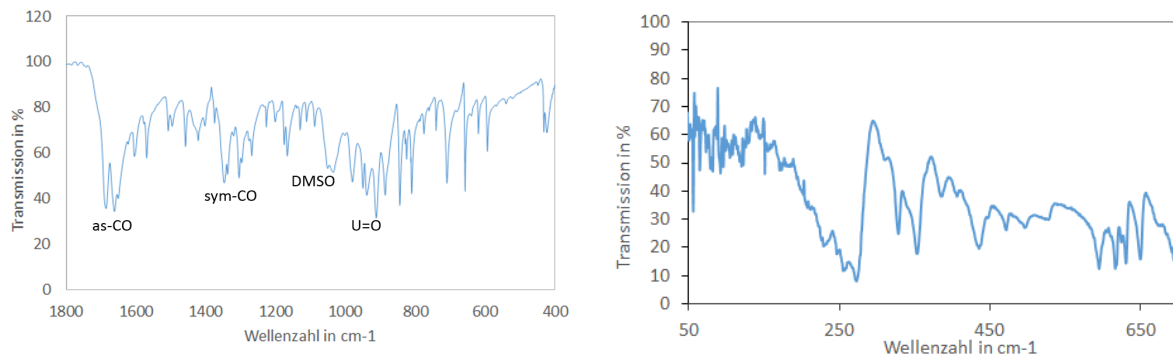


Abbildung A.2.: IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{DMSO}$ in KBr (links) und PE (rechts)

IR [KBr] cm^{-1} : 3400 (s), 3058 (m), 3000 (m), 2915 (m), 1687 (vs), 1570 (s), 1508 (m), 1458 (s), 1345 (vs), 1304 (vs), 1165 (s), 1036 (s), 910 (vs), 844 (vs), 810 (vs), 709 (vs), 657 (vs), 592 (s), 425(s).

IR [PE] cm^{-1} : 650 (m), 630 (m), 616 (m), 595 (m), 435 (s), 354 (vs), 328 (s).

UV-Vis (KBr), nm: 405, 415, 428, 440, 453, 468, 483.

	<i>UO₂DCP · NaOAc</i>
Empirische Formel	<i>C₅₆H₅₆N₆Na₃O_{30.5}S₄₃U₃</i>
Molekulargewicht	3462.70
Temperatur	200(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Triklin
Raumgruppe	P1
Einheitszelle	a=14.7091(18) Å; α =109.373(2)° b=15.4183(19) Å; β =91.597(2)° c=17.761(2) Å; γ =111.331(2)°
Volumen	3488.7(8) Å ³
Z	2
Dichte (berechnet)	3.296 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	8.365 mm ⁻¹
F(000)	3350
Theta Bereich für Daten	1.508 bis 28.383°
Index Bereich	-18 ≤ <i>h</i> ≤ 15 -20 ≤ <i>k</i> ≤ 17 -23 ≤ <i>l</i> ≤ 23
Gesammelte Reflexionen	21769
Unabhängige Reflexionen	15119 [R(int) = 0.0983]
Vollständigkeit zu Theta	93.1 %
Verfeinerungsmethode	kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	15119 / 133 / 946
Anpassungstest	0.748
Finales R Indize [<i>I</i> >2sigma(<i>I</i>)]	R1 = 0.0641, wR2 = 0.1035
R Indize (alle Daten)	R1 = 0.2334, wR2 = 0,1353
Extinktionskoeffizient	n/a
Größte Differenz Peak/Tal	1.264 und -1.040 e.Å ⁻³

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(18) 1.682(10); U(1)-O(17) 1.684(9); U(1)-O(13) 2.397(11); U(1)-O(11) 2.424(11);
U(1)-O(16) 2.448(11); U(1)-O(15) 2.469(10); U(1)-O(16) 2.448(11); U(1)-N(12) 2.620(13);
U(1)-N(11) 2.650(14); U(1)-C(15) 2.902(17); U(1)-Na(1) 4.028(6)

O(18)-U(1)-O(17) 177.8(5) ; O(18)-U(1)-O(13) 89.8(4); O(17)-U(1)-O(13) 90.9(4);
O(18)-U(1)-O(11) 88.1(4); O(17)-U(1)-O(11) 91.2(4); O(13)-U(1)-O(11) 176.8(3);
O(18)-U(1)-O(16) 94.0(4); O(17)-U(1)-O(16) 87.6(4); O(13)-U(1)-O(16) 113.5(4);
O(11)-U(1)-O(16) 64.2(4); O(18)-U(1)-O(15) 89.2(4); O(17)-U(1)-O(15) 93.0(4); O(13)-
U(1)-O(15) 63.0(4); O(11)-U(1)-O(15) 114.4(4); O(16)-U(1)-O(15) 50.7(4); O(18)-
U(1)-N(12) 90.1(4); O(17)-U(1)-N(12) 88.4(4); O(13)-U(1)-N(12) 60.9(4); O(11)-
U(1)-N(12) 121.6(4); O(16)-U(1)-N(12) 173.1(4); O(15)-U(1)-N(12) 123.9(4); O(18)-
U(1)-N(11) 88.5(4); O(17)-U(1)-N(11) 89.3(4); O(13)-U(1)-N(11) 121.5(4); O(11)-

U(1)-N(11) 60.9(4); O(16)-U(1)-N(11) 125.0(4); O(15)-U(1)-N(11) 174.9(4); N(12)-U(1)-N(11) 60.6(4); O(18)-U(1)-C(15) 88.8(5); O(13)-U(1)-C(15) 88.8(5); O(16)-U(1)-C(15) 24.8(4); O(15)-U(1)-C(15) 25.9(4); N(12)-U(1)-C(15) 149.6(5); N(11)-U(1)-C(15) 149.7(5)

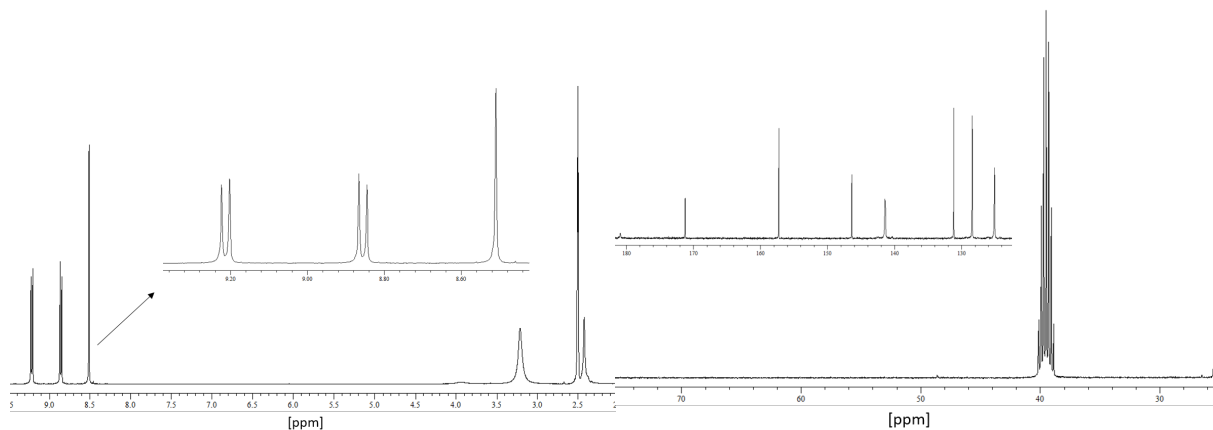


Abbildung A.3.: ^1H - und ^{13}C -NMR von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{NaOAc}$

^1H -NMR (d^6 -dms o), $\delta=9.21$ (d, $^3J_{\text{HH}}=8.2$ Hz), 8.82 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.2$ Hz), 8.51 (s).

^{13}C -NMR (d^6 -dms o), $\delta=171.2$ (s), 157.3 (s), 146.4 (s), 141.2 (s), 131.2 (s), 128.3 (s), 125.1 (s).

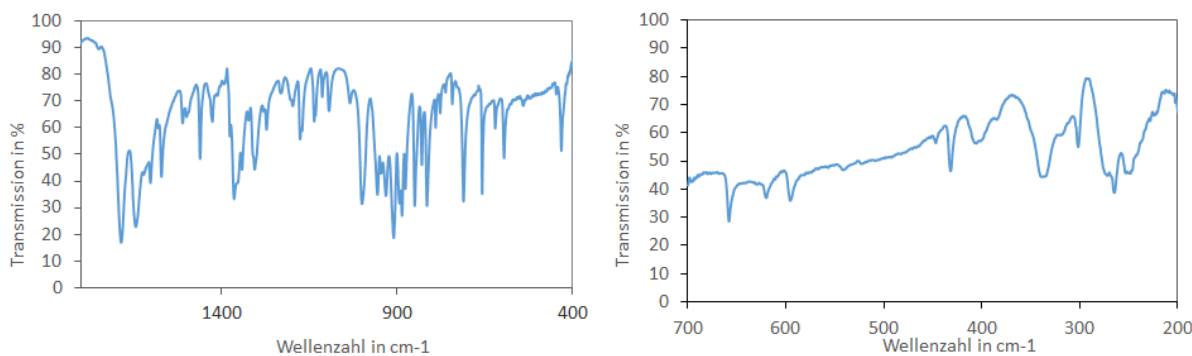


Abbildung A.4.: IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{NaOAc}$ in KBr (links) und PE (rechts)

	<i>UO₂DCP · Guanidinium-Acetat</i>
Empirische Formel	$C_{22.20}H_{30.60}N_5O_{10.60}S_{2.60}U$
Molekulargewicht	858.50
Temperatur	293(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P 2 ₁ /n
Einheitszelle	a = 7.595(2) Å; $\alpha=90^\circ$ b = 22.595(7) Å; $\beta=98.141(4)^\circ$ c = 18.375(5) Å; $\gamma=90^\circ$
Volumen	3121.4(16) Å ³
Z	4
Dichte (berechnet)	1.827 m/mm ⁻³
Absorptionskoeffizient	5.433 mm ⁻¹
F(000)	1669
Theta Bereich für Daten	1.437 - 28.396°
Index Bereich	$-10 \leq h \leq 9$ $-30 \leq k \leq 30$ $-24 \leq l \leq 24$
Gesammelte Reflexionen	37252
Unabhängige Reflexionen	7727 [R(int)=0.0833]
Vollständigkeit zu Theta	100%
Verfeinerungsmethode	Kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	7727/86/398
Anpassungstest	1.076
Finale R Indize [I>2sigma(I)]	R1=0.0523, wR2=0.1289
R Indize (alle Daten)	R1=0.0917, wR2=0.1421
Extinktionskoeffizient	n/a
Größte Differenz Peak/Tal	2.543 und -1.067 e.Å ⁻³

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(5) 2.463(6); U(1)-O(6) 2.455(7); U(1)-O(3) 2.392(6); U(1)-O(1) 2.405(6);
U(1)-O(7) 2.367(7); U(1)-O(8) 1.749(7); U(1)-N(1) 2.608(7); U(1)-N(2) 2.642(7)

O(6)-U(1)-O(5) 176.9(3); O(3)-U(1)-O(1) 176.4(2)

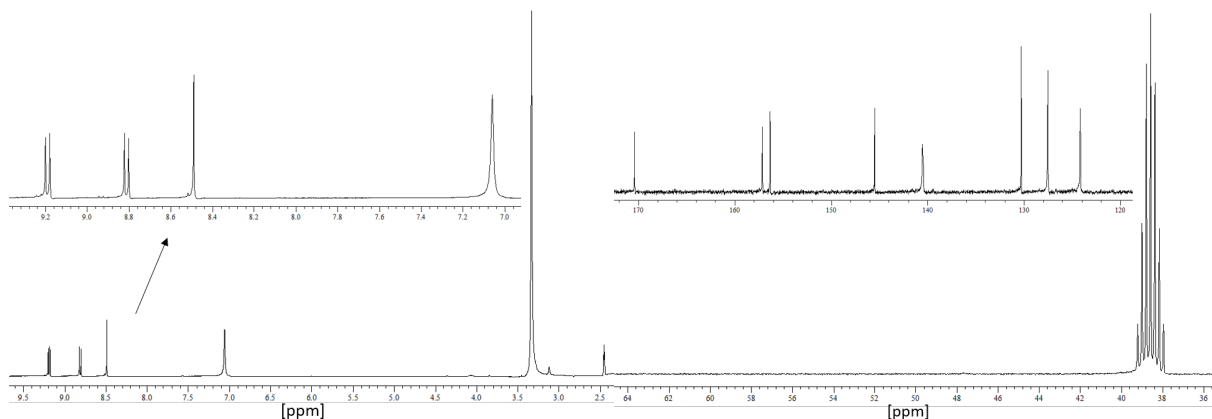


Abbildung A.5.: ^1H - und ^{13}C -NMR von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$

^1H -NMR (d^6 - dmsO), $\delta=9.23$ (d, $^3J_{\text{HH}}=8.2$ Hz), 8.86 (d, $^3J_{\text{HH}}=8.2$ Hz), 8.54 (s).

^{13}C -NMR (d^6 - dmsO), $\delta=170.4$ (s), 157.1 (s), 153.3 (s), 145.5 (s), 140.5 (s), 130.3 (s), 127.5 (s), 124.2 (s).

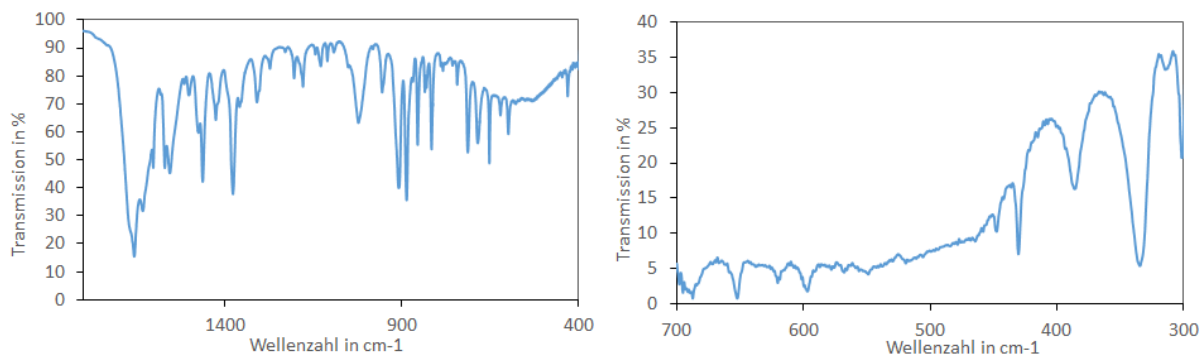


Abbildung A.6.: IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$ in KBr (links) und PE (rechts)

IR [KBr] cm^{-1} : 1685 (vs), 1645 (vs), 1572 (s), 1461 (s), 1365 (vs), 1306 (s), 1177 (m), 1136 (m), 1094 (m), 1000 (vs), 910 (vs), 850 (vs), 815 (vs), 710 (vs), 658 (vs), 595 (s).

IR [PE] cm^{-1} : 658 (s), 619 (m), 595 (m), 431 (s), 403 (m), 337 (s), 301 (m), 264 (s), 248 (s).

	<i>UO₂DPDCP · DMSO</i>
Empirische Formel	<i>C₃₀H₂₈N₂O₉S₂U</i>
Molekulargewicht	862.69
Temperatur	293(2)K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P 2 ₁ /n
Einheitszelle	a = 15.871(4) Å; α=90°
	b = 8.306(2) Å; β=90.577(4)°
	c = 23.145(13) Å; γ= 90°
Volumen	3051.0(13)Å ³
Z	4
Dichte (berechnet)	1.878 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	5.514 mm ⁻¹
F(000)	1672
Theta Bereich für Daten	1.548 - 28.396°
Index Bereich	-15 ≤ h ≤ 21
	-11 ≤ k ≤ 10
	-30 ≤ l ≤ 30
Gesammelte Reflexionen	25126
Unabhängige Reflexionen	7439 [R(int)=0.1005]
Vollständigkeit zu Theta	100%
Verfeinerungsmethode	Kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	7439/0/411
Anpassungstest	0.851
Finale R Indize [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0516, wR2 = 0.0882
R Indize (alle Daten)	R1 = 0.1348, wR2 = 0.1033
Extinktionskoeffizient	n/a
Größte Differenz Peak/Tal	1.388 und -0.830 e.Å ⁻³

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(5) 1.731(5); U(1)-O(6) 1.740(5); U(1)-O(3) 2.310(5); U(1)-O(1) 2.364(5);
U(1)-O(7) 2.318(5); U(1)-N(1) 2.535(6); U(1)-N(2) 2.536(5)

O(6)-U(1)-O(5) 179.3(2); O(3)-U(1)-O(1) 169.5(18)

¹H-NMR (d⁶-dmsO), δ=8.89 (s), 8.43 (s), 7.89-7.80 (m), 7.70-7.66 (m).

¹³C-NMR (d⁶-dmsO), δ= 171.6 (s), 157.2 (s), 153.9 (s), 135.8 (s), 130.3 (s), 129.6 (s), 127.3 (s), 125.6 (s).

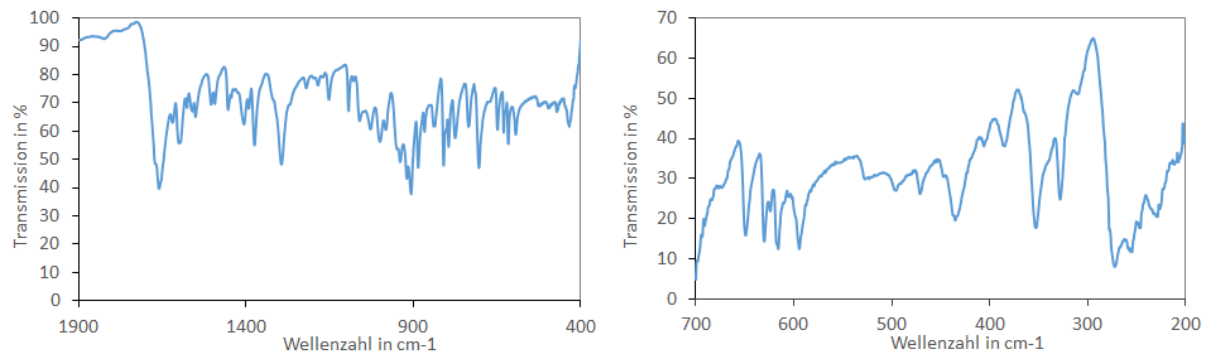


Abbildung A.7.: IR-Spektren von UO₂DPDCP·DMSO in KBr (links) und PE (rechts)

IR [KBr] cm⁻¹: 1657 (vs), 1595 (m), 1550 (m), 1505 (m), 1493 (m), 1453 (m), 1406 (m), 1375 (s), 1294 (vs), 1152 (m), 1093 (s), 999 (m), 906 (vs), 809 (vs), 704 (vs).

IR [PE] cm⁻¹: 648 (s), 630 (s), 616 (s), 594 (s), 523 (m), 494 (m), 470 (m), 435 (s), 384 (m), 352 (vs), 328 (s).

	<i>UO₂DPDCP · DMAA</i>
Empirische Formel	<i>C₃₄H₃₂N₄O₈U</i>
Molekulargewicht	862.66
Temperatur	293(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P 2 ₁ /c
Einheitszelle	a = 8.232(3) Å; α=90° b = 29.946(10) Å; β=99.783(6)° c = 12.939(5) Å; γ=90°
Volumen	3143.2(19) Å ³
Z	4
Dichte (berechnet)	1.823 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	5.224 mm ⁻¹
F(000)	1680
Theta Bereich für Daten	1.360 - 28.507°
Index Bereich	-10 ≤ h ≤ 10 -39 ≤ k ≤ 40 -17 ≤ l ≤ 17
Gesammelte Reflexionen	38353
Unabhängige Reflexionen	7830 [R(int) = 0.2451]
Vollständigkeit zu Theta	100.0%
Verfeinerungsmethode	Kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	7830/18/424
Anpassungstest	0.792
Finale R Indize [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0577, wR2 = 0.1080
R Indize (alle Daten)	R1 = 0.2227, wR2 = 0.1374
Extinktionskoeffizient	n/a
Größte Differenz Peak/Tal	1.809 und -1.332 e.Å ⁻³

UO₂-DPDCP·DMAA wurde 20 s pro Bildfläche mit einem Winkel delta omega 0.45 ° gemessen.

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(5) 1.761(7); U(1)-O(6) 1.758(7); U(1)-O(3) 2.269(9); U(1)-O(1) 2.307(8);
U(1)-O(7) 2.316(9); U(1)-N(1) 2.532(9); U(1)-N(2) 2.545(9)

O(6)-U(1)-O(5) 177.2(3); O(3)-U(1)-O(1) 170.1(3)

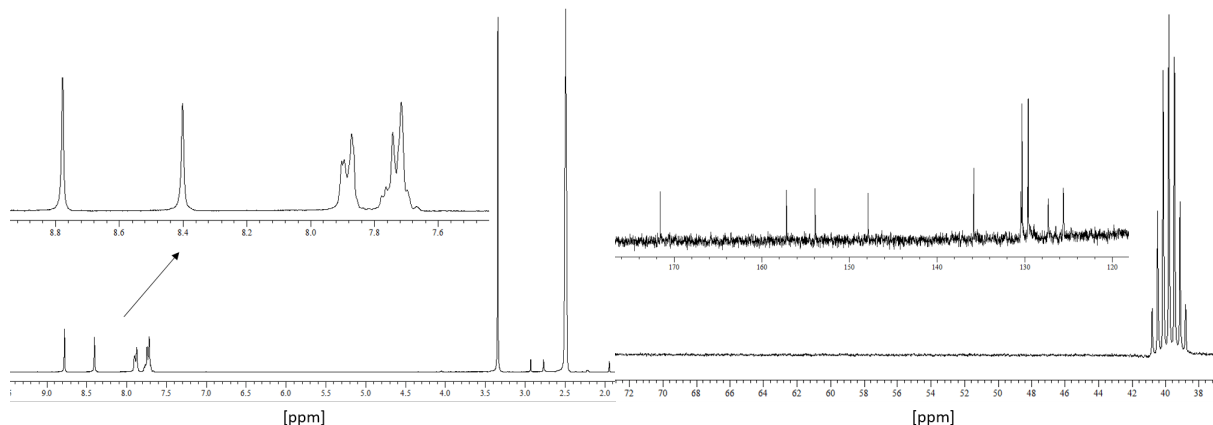


Abbildung A.8.: ^1H - und ^{13}C -NMR von $\text{UO}_2\text{DPDCP}\cdot\text{DMAA}$

^1H -NMR (d^6 - dmsO), $\delta = 8.78$ (s), 8.40 (s), 7.93 - 7.84 (m), 7.78 - 7.64 (m).

^{13}C -NMR (d^6 - dmsO), $\delta = 171.6$ (s), 157.1 (s), 153.9 (s), 147.8 (s), 135.8 (s), 130.6 - 130.2 (m), 129.8 - 129.5 (m), 127.3 (s), 125.6 (s).

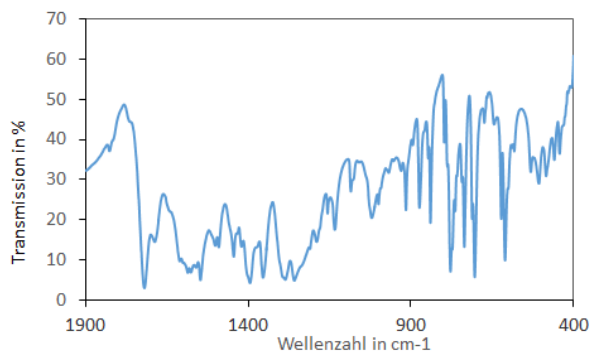


Abbildung A.9.: IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DPDCP}\cdot\text{DMAA}$ in KBr (links)

IR [KBr] cm^{-1} : 1718 (vs), 1545 (s), 1392 (s), 1353 (s), 1283 (s), 1255 (s), 1133 (s), 1017 (s), 915 (s), 873 (s), 840 (s), 778 (vs), 735 (vs), 704 (vs), 611 (vs).

	<i>UO₂DPDCP · DMAA (EtOH)</i>
Empirische Formel	<i>C₃₂H₂₉N₃O₈U</i>
Molekulargewicht	821.61
Temperatur	293(2) K
Wellenlänge	0.71073
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P 2 ₁ /c
Einheitszelle	a = 8.937(4) Å; α=90° b = 26.924(12) Å; β=100.307(7)° c = 12.127(5) Å; γ=90°
Volumen	2871(2) Å ³
Z	4
Dichte (berechnet)	1.901 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	5.713 mm ⁻¹
F(000)	1592
Theta Bereich für Daten	1.867 - 28.370°
Index Bereich	-11 ≤ h ≤ 11 -35 ≤ k ≤ 35 -16 ≤ l ≤ 15
Gesammelte Reflexionen	38056
Unabhängige Reflexionen	7019 [R(int) = 0.0567]
Vollständigkeit zu Theta	99.9%
Verfeinerungsmethode	Kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	7019/0/406
Anpassungstest	1.073
Finale R Indize [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0404, wR2 = 0.0978
R Indize (alle Daten)	R1 = 0.0591, wR2 = 0.1022
Extinktionskoeffizient	n/a
Größte Differenz Peak/Tal	1.764 und -2.646 e.Å ⁻³

UO₂-DPDCP·DMAA aus Ethanol wurde 10 s pro Bildfläche gemessen, (bei einem Winkel delta omega 0.45 °)

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(5) 1.770(5); U(1)-O(6) 1.766(5); U(1)-O(3) 2.301(4); U(1)-O(1) 2.348(4);
U(1)-O(7) 2.341(4); U(1)-N(1) 2.525(5); U(1)-N(2) 2.524(5)

O(6)-U(1)-O(5) 178.01(19); O(3)-U(1)-O(1) 169.72(15).

	$[UO_2DCP \cdot MeOH]_n$
Empirische Formel	$C_7H_3NO_3U_{0.50}$
Molekulargewicht	268.12
Temperatur	293(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Orthorrhombisch
Raumgruppe	P n m a
Einheitszelle	a = 11.138(2) Å; $\alpha = 90^\circ$ b = 6.6271(14) Å; $\beta = 90^\circ$ c = 17.224(4) Å; $\gamma = 90^\circ$
Volumen	1271.3(5) Å ³
Z	8
Dichte (berechnet)	2.802 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	12.805 mm ⁻¹
F(000)	976
Theta Bereich für Daten	2.177-28.355°
Index Bereich	$-14 \leq h \leq 14$ $-8 \leq k \leq 8$ $-23 \leq l \leq 22$
Gesammelte Reflexionen	14664
Unabhängige Reflexionen	1712 [R(int) = 0.0832]
Vollständigkeit zu Theta	99.9%
Verfeinerungsmethode	Kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	1712/30/137
Anpassungstest	1.224
Finale R Indize [I > 2sigma(I)]	R1 = 0.0690, wR2 = 0.1408
R Indize (alle Daten)	R1 = 0.0828, wR2 = 0.1461
Extinktionskoeffizient	n/a
Größte Differenz Peak/Tal	4.048 und -8.356 e.Å ⁻³

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(5) 1.759(9); U(1)-O(3) 2.296(15); U(1)-O(1) 2.418(14); U(1)-N(1) 2.572(15);
U(1)-N(2) 2.558(15)

O(5)-U(1)-O(5) 176.9(7); O(3)-U(1)-O(5) 172.0(5)

IR [KBr] cm⁻¹: 1680 (vs), 1652 (vs), 1605 (m), 1571 (s), 1461 (s), 1346 (vs), 1302 (s), 1174 (s), 1008 (vs), 915 (vs), 846 (vs), 810 (vs), 710 (vs), 657 (vs).

IR [PE] cm⁻¹: 658 (vs), 621 (s), (595 (s), 432 (s), 335 (vs), 266 (vs).

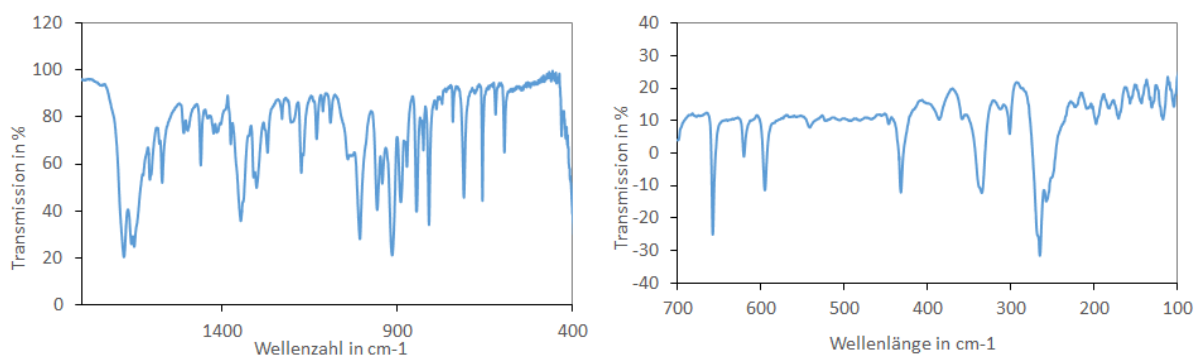


Abbildung A.10.: IR-Spektren von $[UO_2DCP]_n$ in KBr (links) und PE (rechts)

	$[UO_2DPDCP]_4$
Empirische Formel	$C_{53.65}H_{36.60}N_4O_{14.65}U_2$
Molekulargewicht	1447.73
Temperatur	173(2) K
Wellenlänge	0.71073 Å
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P 2 ₁ /c
Einheitszelle	a = 26.469(3) Å; $\alpha = 90^\circ$ b = 8.3002(8) Å; $\beta = 108.35(10)^\circ$ c = 24.090(2) Å; $\gamma = 90^\circ$
Volumen	5023.4(9) Å ³
Z	4
Dichte (berechnet)	1.914 mg/m ³
Absorptionskoeffizient	6.513 mm ⁻¹
F(000)	2751
Kristallgröße	0.090·0.040·0.030 mm ³
Theta Bereich für Daten	1.621 - 28.937°
Index Bereich	$-33 \leq h \leq 34$ $-10 \leq k \leq 11$ $-31 \leq l \leq 31$
Gesammelte Reflexionen	86803
Unabhängige Reflexionen	11879 [R(int) = 0.0605]
Vollständigkeit zu Theta	99.9%
Verfeinerungsmethode	kleinste Fehlerquadrate
Daten/Einschränkungen/Parameter	11879/0/709
Anpassungstest	1.121
Finales R Indize [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0477, wR2 = 0.0994
R Indize (alle Daten)	R1 = 0.05757, wR2 = 0.1113
Extinktionskoeffizient	n/a
Größe Differenz Peak/Tal	1.981 und -1.607 e.Å ⁻³

Auswahl einiger Bindungslängen in Å und Bindungswinkel in °:

U(1)-O(6) 1.746(5); U(1)-O(5) 1.750(5); U(1)-O(3) 2.361(5); U(1)-O(1) 2.404(5);
U(1)-N(2) 2.562(5); U(1)-N(1) 2.609(5)

O(6)-U(1)-O(5) 178.1(2) ; O(3)-U(1)-O(1) 173.41(16)

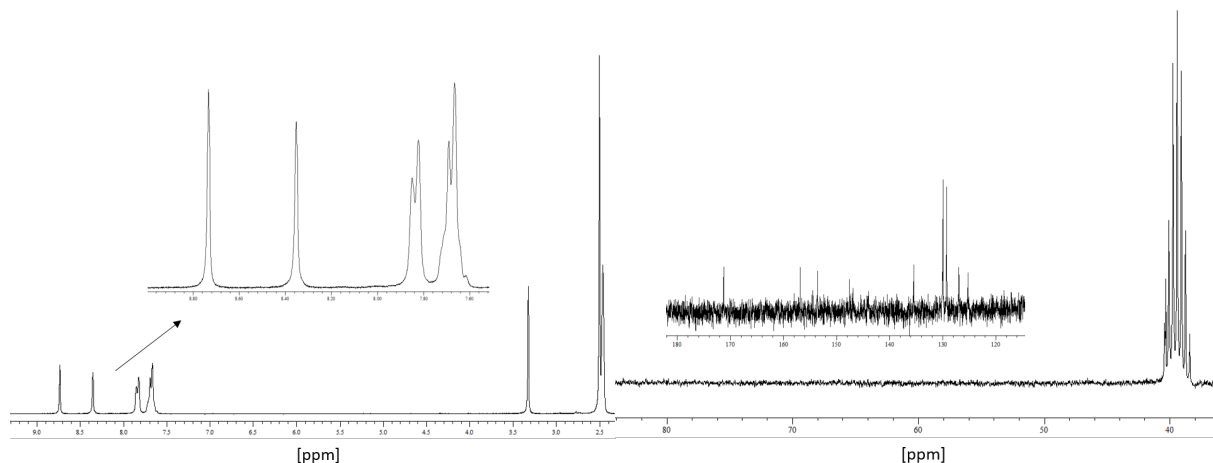


Abbildung A.11.: ^1H - und ^{13}C -NMR von $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$

^1H -NMR (d^6 -dmso), $\delta=8.74$ (s), 8.35 (s), 7.85-7.82 (m), 7.69-7.66 (m).

^{13}C -NMR (d^6 -dmso), $\delta=171.2$ (s), 156.8 (s), 153.5 (s), 147.5 (s), 135.3 (s), 129.9 (s), 129.2 (s), 126.9 (s), 125.2 (s).

A.5.2. Protonierungskonstanten

pH	% LH_2	LH^-
1.87	88	12
2.03	81	19
2.17	77	23
2.36	63	37
2.62	52	48
2.73	46	54
3.01	30	70
3.17	24	76
3.45	15	85
3.51	14	86

Tabelle A.1.: Tabelle: Ermittlung des $\text{pK}_1(\text{BCPDA})$ 2.68

pH	% LH ⁻	% L ²⁻
3.86	91	9
4.02	85	15
4.19	78	22
4.27	72	28
4.63	53	47
4.87	44	56
5.03	32	68
5.3	21	79
5.69	9	91
5.91	5	95

Tabelle A.2.: Tabelle: Ermittlung des $pK_2(\text{BCPDA})$ 4.71

A.5.3. Stabilitätskonstante

[UO ₂ ²⁺]	[L ⁻²]	% [UO ₂ L]
$2.10 \cdot 10^{-10}$	$7.3 \cdot 10^{-8}$	23
$1.92 \cdot 10^{-10}$	$1.3 \cdot 10^{-7}$	35
$1.53 \cdot 10^{-10}$	$2.7 \cdot 10^{-7}$	66
$1.90 \cdot 10^{-10}$	$1.3 \cdot 10^{-6}$	84

Tabelle A.3.: Untersuchung $\log K$ (UO₂-BCPDA) mit ²³⁰U bei pH 4.0 via ITLC

[UO ₂ ²⁺]	[L ⁻²]	% [UO ₂ L]
$1.50 \cdot 10^{-10}$	$1.25 \cdot 10^{-7}$	7
$1.40 \cdot 10^{-10}$	$2.86 \cdot 10^{-7}$	15
$1.30 \cdot 10^{-10}$	$1.38 \cdot 10^{-6}$	39
$1.20 \cdot 10^{-10}$	$2.58 \cdot 10^{-6}$	56
$7.1 \cdot 10^{-11}$	$6.45 \cdot 10^{-7}$	26
$6.7 \cdot 10^{-11}$	$1.82 \cdot 10^{-6}$	54
$6.1 \cdot 10^{-11}$	$3.33 \cdot 10^{-6}$	64
$5.5 \cdot 10^{-11}$	$5.0 \cdot 10^{-6}$	83

Tabelle A.4.: Untersuchung $\log K$ (UO₂-BCPDA) mit ²³⁰U bei pH 3.2 via ITLC

$[\text{UO}_2^{2+}]$	$[\text{L}^{-2}]$	% $[\text{UO}_2\text{L}]$
$4.63 \cdot 10^{-12}$	$1.48 \cdot 10^{-8}$	5
$4.05 \cdot 10^{-12}$	$2.50 \cdot 10^{-8}$	9
$5.06 \cdot 10^{-12}$	$6.25 \cdot 10^{-8}$	11
$4.63 \cdot 10^{-12}$	$1.43 \cdot 10^{-7}$	25
$4.05 \cdot 10^{-12}$	$2.50 \cdot 10^{-7}$	51
$5.06 \cdot 10^{-12}$	$6.25 \cdot 10^{-7}$	64
$4.63 \cdot 10^{-12}$	$1.43 \cdot 10^{-6}$	90

Tabelle A.5.: Untersuchung log K ($\text{UO}_2\text{-BCPDA}$) mit ^{237}U bei pH 4.0 via ITLC

$[\text{UO}_2^{2+}]$	$[\text{L}^{-2}]$	% $[\text{UO}_2\text{L}]$
$4.63 \cdot 10^{-12}$	$1.48 \cdot 10^{-8}$	3
$4.05 \cdot 10^{-12}$	$2.50 \cdot 10^{-8}$	6
$5.06 \cdot 10^{-12}$	$6.25 \cdot 10^{-8}$	8
$4.63 \cdot 10^{-12}$	$1.43 \cdot 10^{-7}$	30
$4.05 \cdot 10^{-12}$	$2.50 \cdot 10^{-7}$	41
$5.06 \cdot 10^{-12}$	$6.25 \cdot 10^{-7}$	61
$4.63 \cdot 10^{-12}$	$1.43 \cdot 10^{-6}$	83

Tabelle A.6.: Untersuchung log K ($\text{UO}_2\text{-BCPDA}$) mit ^{237}U bei pH 4.0 via AG MP-50

A.5.4. Stabilitätsstudien

Zeit [d]	c(U(VI)) [%]
1	10.2
2	13.5
3	12.8
6	12.0
8	18.5
10	12.5
13	17.2

Tabelle A.7.: ^{237}U im Heparinserum

Zeit [d]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]	Zeit [d]	[%]	Zeit [d]	Exp. 1 [%]	Exp. 2 [%]
1	99.0	99.1	1	98.1	1	74.0	90.0
2	96.3	88.9	3	98.8	2	73.8	
3	91.5		5	100	4	74.0	
4	84.8		6	98.8	5		89.5
5		80.1	8		7		91.1
6		75.5			8	76.9	
7	78.3				9		94.3
8	80.7	79.1			10	75.9	
10	78.6				12	77.7	92.0
12		56.8					

Tabelle A.8.: Stabilitäten von ^{237}U -BCPDA (links) und ^{237}U -DCP (mitte) und ^{237}U -DPDCP im Heparinserum

Zeit [d]	CO_3^{2-} [%]	HSA [%]	PO_4^{3-} [%]	20% Serum [%]
1	98.2	89.9	97.2	94.3
2			99.3	91.9
3			99.1	90.8
4	99.1	90.2	99.4	90.4
5	99.8	89.5	100	90.6
7	100.0	88.7		
8	99.0	88.8	98.8	89.7
11	99.0	89.1		
13	98.8	88.3		
15	98.6	87.4		

Tabelle A.9.: Stabilitäten von ^{237}U -BCPDA-MabThera® in HEPES-Puffer bei pH 7.4 und Zusatz der jeweiligen Liganden in physiologischen Konzentrationen

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Prinzip der RIT [2]	8
1.2.	Vergleich der Reichweiten: krankes Gewebe (lila), gesundes Gewebe (grau); ^{213}Bi mit $E_\alpha=5.98$ MeV und ^{90}Y mit $E_{\beta_{\max}}=2.28$ MeV [2] . .	8
1.3.	Zerfallskette von ^{225}Ac mit Angabe der Zerfallsart, Zerfallsenergie und Halbwertszeit [5]	11
1.4.	Bild des Jahres 2012 ausgezeichnet von der Amerikanischen Gesellschaft für Nukleare Medizin	12
3.1.	α -Zerfall: Emission eines ^4_2He -Kerns	15
3.2.	Energieverteilung beim β^- -Zerfall	16
3.3.	Beim Aufeinandertreffen eines Positrons und eines Elektrons kommt es zur Annihilation	16
3.4.	Bildung von Augerelektronen	17
3.5.	Oxidationszustände der Actiniden [9]	18
3.6.	Wässrige Lösung von U(III), U(IV) und U(VI) Triflatsen bei Tages- und Neonlicht (links); UV/Vis/NIR Absorptionsspektren von 64 mM U(III), U(IV) und U(VI) Lösungen (rechts) [11]	19
3.7.	Zerfallskette von ^{230}U [18]	24
3.8.	Anregungsfunktionen für die Reaktionen $^{232}\text{Th}(p,3n)^{230}\text{Pa}$ (links) und $^{230}\text{Th}(^3\text{He},3n)^{230}\text{U}$ (rechts)[19]	25
3.9.	Anregungsfunktionen für die Kernreaktionen $^{231}\text{Pa}(p,2n)^{230}\text{U}$ (links), $^{231}\text{Pa}(d,3n)^{230}\text{U}$ (rechts)[22]	26
3.10.	Vergleich der Ausbeuten der dicken Targets der unterschiedlichen Kernreaktionen: $^{232}\text{Th}(p,3n)^{230}\text{Pa} \xrightarrow{\beta^-} ^{230}\text{U}$ (Kreise) und $^{230}\text{Th}(^3\text{He},3n)^{230}\text{U}$ (Quadrate) $^{231}\text{Pa}(p,2n)^{230}\text{U}$ (Dreiecke), $^{231}\text{Pa}(d,3n)^{230}\text{U}$ (Kreuze) . .	26
3.11.	Struktur des U(VI)-DCP-Polymers, (a) Das O3' Atom ist ein verbrückendes Carboxylatsauerstoffatom eines weiteren benachbarten UO ₂ -DCP-Komplexes, (b) die Polyeder stellen die pentagonalen Bipyramiden, die schwarzen Linien die DCP-Liganden dar[1]	28
3.12.	Bindungsbildung einer NCS-Gruppe mit einer Amingruppe unter Ausbildung einer Thioharnstoffgruppe	28
3.13.	Funktionalisierung des DCP mit einer NCS-Gruppe [25]	29
3.14.	Strukturformel von BCPDA	29
3.15.	Herstellung von BCPDA ausgehend von Bathocuproin [26]	31
3.16.	Strukturformel von DOTA	32
3.17.	Strukturformel von DOTA-NCS	32

4.1. Target und Targethalter vor der Bestrahlung (links) und nach der Bestrahlung (mitte und rechts)	35
4.2. Schematische Darstellung der Isolierung von ^{230}U von ^{230}Pa , ^{232}Th und Spaltprodukten (F.P.)	36
4.3. Ausschnitt aus der Nuklidkarte: Bildung von ^{237}U aus ^{241}Pu mit einer Zerfallswahrscheinlichkeit von $2.46 \cdot 10^{-3}\%$	37
4.4. Schematische Darstellung der Isolierung von ^{237}U von ^{241}Pu , ^{241}Am .	38
4.5. Verdünnungsreihe Gammaskopmetrie von ^{237}U	40
4.6. Zerfallsreihe von ^{233}U [27]	41
4.7. Anionenaustauschprozedur zur Abtrennung von ^{225}Ra und ^{225}Ac von ^{229}Th (links) Extraktionschromatographie zur Abtrennung von ^{225}Ac von ^{225}Ra und Feinreinigung von ^{225}Ac (rechts)[28]	42
4.8. linke Seite: α -Spektrum der ^{229}Th Quelle (oben) und des isolierten ^{225}Ac (unten); rechte Seite: γ -Spektrum der ^{229}Th Quelle (oben) und des isolierten ^{225}Ac (unten) [27]	42
4.9. Extinktionskoeffizient von MabThera®	43
4.10. Der Antikörper MabThera® [29]	44
5.1. Struktur von TEVA[30]	45
5.2. Kapazitätsfaktor k' von TEVA verschiedener Actinide in Abhängigkeit von der Salpeter- und Salzsäurekonzentration	46
5.3. Struktur von UTEVA [31]	47
5.4. Kapazitätsfaktor k' von UTEVA verschiedener Aktinide in Abhängigkeit von der Salpeter- und Salzsäurekonzentration[31]	48
5.5. Aktivitätsverteilung von AG MP-50	50
5.6. Elutionsprofil für die Aufreinigung einer proteinhaltigen Probe[33] . .	50
6.1. Extraktionsapparatur zur Herstellung des Polymers und des Trimers .	56
7.1. Ausschnitt aus der Nuklidkarte: Bildung von ^{230}U aus ^{230}Pa mit einer Zerfallswahrscheinlichkeit von 8.4 %	61
7.2. Gleichgewichtseinstellung $^{230}\text{U}/^{226}\text{Th}$ und Bildung von ^{230}U aus ^{230}Pa	62
7.3. Alpha- (links) und Gammaskopmetrie (rechts)	62
7.4. Bildung von ^{237}U und ^{241}Am aus ^{241}Pu	63
7.5. α - (links) und γ -Spektrum (rechts) von ^{241}Am	64
7.6. linke Seite: α -Spektrum des Produktes nach der 1. UTEVA (rot) und der 2. UTEVA (blau); rechte Seite: γ -Spektrum des Produktes nach der 1. UTEVA (rot) und der 2. UTEVA (blau)	64
7.7. Ausbeute aller ^{237}U -Isolierungen	65
7.8. DCP (links) und DPDCP (rechts)	65
7.9. ^1H -NMR-Spektrum von DCP	66
7.10. ^1H -NMR-Spektrum von DPDCP	67
7.11. Kristallstruktur $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$	68

7.12. UV-Spektren von der Bildung des Komplexes: Titration des freien U(VI) (hellblau) bis zu einem fünffachen Überschuss des Liganden DCP (violett)	69
7.13. Vergleich der ^1H -NMR-Spektren: $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$ (rot) und der freie Ligand DCP (schwarz)	70
7.14. ^1H -NMR-Spektrum von $\text{U(VI)-DCP}\cdot\text{DMSO}$	71
7.15. IR-Spektrum von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$	71
7.16. UV-Vis-Spektren von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{DMSO}$: (links) konzentrationsabhängigen Titration (links); (rechts) zwei Spektren aufgenommen in Teflon (blau) und DMSO (rot)	72
7.17. Kristallstruktur vom Polymer $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ aus MeOH	73
7.18. Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{NaOAc}$	75
7.19. Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$	76
7.20. Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$	77
7.21. ^1H -NMR-Spektrum von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMSO}$	78
7.22. Kristallstruktur des Tetramers $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$	79
7.23. Kristallstruktur von $\text{UO}_2\text{-DPDCP}\cdot\text{DMAA}$	80
7.24. UV-Spektren zur Untersuchung der Säurekonstanten von BCPDA	82
7.25. Steigungsanalysen der einzelnen Deprotonierungsschritte	83
7.26. pH abhängige Speziesverteilung von BCPDA	84
7.27. UV-Spektren der Komplexbildung vom freien BCPDA zum U(VI)-BCPDA (links); Anteil des gebildeten U(VI)-BCPDA, ermittelt durch Peakentfaltung (rechts)	85
7.28. Tracerexperimente zur Bestimmung der Stabilitätskonstante von U-BCPDA in 0.1 M NaClO_4	86
7.29. Kinetik der Bildung des U(VI)-BCPDA Komplexes (blau) und Aktivität in Lösung (rot) bei pH 4 in 0.1 M NaClO_4	87
7.30. UV-Spektren der pH-abhängigen Bildung des U(VI)-BCPDA- OH^- -Komplexes (oben) und die Steigungsanalyse (unten)	88
7.31. UV-Spektren der pH-abhängigen Bildung des $\text{UO}_2\text{-BCPDA-CO}_3^{2-}$ -Komplexes in einer Atmosphäre mit 5% CO_2 -Partialdruck	90
7.32. Modellierung des Spektrums des ternären Komplexes (links), Vergleich des Spektrums bei pH 8.88 und dem freien Liganden BCPDA (rechts)	90
7.33. Referenzspektren für $\text{UO}_2\text{-BCPDA}$ (rot), $\text{UO}_2\text{-BCPDA-CO}_3^{2-}$ (schwarz) und freies BCPDA (grün) (links); Steigungsanalyse der Dissoziation des U(VI)-BCPDA- CO_3^{2-} zugunsten des U(VI)- $(\text{CO}_3)^{4-}$ -Komplexes (links)	91
7.34. Extinktionskoeffizient von DCP-NCS bei pH 7.4	92
7.35. UV-Spektrum des freien (blau) und des mit DCP-NCS chelatierten (rot) Antikörpers MabThera®	93
7.36. Extinktionskoeffizient von BCPDA bei pH 7.4	94
7.37. UV-Spektrum des freien (blau) und des mit BCPDA chelatierten (rot) Antikörpers MabThera®	95

7.38. Blindversuch: Freies ^{237}U , 150 μg MabThera bei pH 8	96
7.39. Markierungseffizienz der mit BCPDA (links) bzw. mit DCP-NCS (rechts) chelatierten Antikörper in Abhängigkeit der eingesetzten Stoffmenge mit 100 μg (grün), 150 μg (rot) und 200 μg (blau) MabThera®	96
7.40. Serumstabilität von UO_2 -BCPDA unter physiologischen Bedingungen bei 37°C inkubiert	97
7.41. Autoradiographien, Entwicklung der ITLC-Streifen in MeOH/NaCl (1:1) Tag 1 (oben) und Tag 6 (unten)	97
7.42. Serumstabilität UO_2 -DCP, Chelex (blau), ITLC (rot) und U-237 mit ITLC neu (grün) unter physiologischen Bedingungen bei 37°C inkubiert	98
7.43. Serumstabilität von UO_2 -DPDCP unter physiologischen Bedingungen bei 37°C inkubiert	99
7.44. Stabilität von U-BCPDA-MabThera® in 2 mM HEPES-Puffer mit physiologischer Carbonatkonzentration bei pH 7.4 bei 37°C inkubiert	100
7.45. Berechnete Speziesverteilung von UO_2 -BCPDA bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von 2 mM HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1\cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1\cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{CO}_3^{2-})=2.5\cdot 10^{-2}$ M	101
7.46. Stabilität von UO_2 -BCPDA-MabThera® in 2 mM HEPES mit physiologischer HSA Konzentration bei pH 7.4 bei 37°C inkubiert	101
7.47. Berechnete Speziesverteilung von UO_2 -BCPDA bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von $2\cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1\cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1\cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{HSA})=6.3\cdot 10^{-4}$ M	102
7.48. Berechnete Speziesverteilung von UO_2 -BCPDA bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von $2\cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1\cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1\cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{HSTF})=3.7\cdot 10^{-5}$ M	102
7.49. Stabilität von UO_2 -BCPDA-MabThera® in 2 mM HEPES mit physiologischer Phosphatkonzentration bei pH 7.4 bei 37°C inkubiert	103
7.50. Berechnete Speziesverteilung von UO_2 -BCPDA bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von $2\cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1\cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1\cdot 10^{-3}$ M und $c(\text{Phosphat})=1.1\cdot 10^{-3}$ M	104
7.51. Stabilität von UO_2 -BCPDA-MabThera® (rot) bzw. UO_2 -DCP-MabThera® (blau) in 20%-igem Blutserum in saliner Lösung bei 37°C inkubiert	105
7.52. Berechnete Speziesverteilung von UO_2 -BCPDA bei pH 7.4, $I=0.1$ in Anwesenheit von $2\cdot 10^{-3}$ M HEPES-Puffer, $c(\text{U(VI)})=1\cdot 10^{-9}$ M, $c(\text{BCPDA})=1\cdot 10^{-3}$ M, $c(\text{CO}_3^{2-})=2.5\cdot 10^{-2}$ M, $c(\text{HSA})=6.3\cdot 10^{-4}$ M, $c(\text{HSTF})=3.7\cdot 10^{-5}$ M und $c(\text{Ca})=2.5\cdot 10^{-3}$ M	105
7.53. Stabilität von UO_2 -BCPDA-MabThera® und UO_2 -DCP-MabThera® in Blutserum bei 37°C inkubiert	106
7.54. Autoradiographien der ITLC-Streifen nach Tag 2 (oben) und Tag 6 (unten), nach Entwicklung in 0.05 M Na_3 -Citrat Lösung	106
7.55. Stabilität von Ac-DOTA-MabThera® im Blutserum bei 37°C inkubiert	107

7.56. Bindungsstudie ^{225}Ac -DOTA-MabThera® an K422 Zellen, totale Bindung (rot), unspezifische Bindung (blau), resultierende spezifische Bindung (grün). Der Anteil an ^{225}Ac -DOTA-MabThera®, welcher an die Zellen bindet ist aufgetragen gegen die ansteigende Menge an hinzugefügtem ^{225}Ac -MabThera®. Die nichtspezifische Bindung wurde mit einem hundertfachen Überschuss an unmarkiertem Antikörper ermittelt.	108
7.57. Bindungsaffinität dargestellt mit Hilfe eines Scatchard Plots	109
8.1. Vergleich der Kristallstrukturen von $[\text{UO}_2\text{-DCP}]_n$ und $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$	113
8.2. TPDCa: ein weiterer potentieller Ligand für den Einsatz in der TAT? 116	
A.1. IR-Spektren von DCP in KBr (links) und PE (rechts)	123
A.2. IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{DMSO}$ in KBr (links) und PE (rechts) . .	125
A.3. ^1H - und ^{13}C -NMR von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{NaOAc}$	127
A.4. IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{NaOAc}$ in KBr (links) und PE (rechts) . .	127
A.5. ^1H - und ^{13}C -NMR von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$	129
A.6. IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DCP}\cdot\text{Guanidinium Acetat}$ in KBr (links) und PE (rechts)	129
A.7. IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DPDCP}\cdot\text{DMSO}$ in KBr (links) und PE (rechts) 131	
A.8. ^1H - und ^{13}C -NMR von $\text{UO}_2\text{DPDCP}\cdot\text{DMAA}$	133
A.9. IR-Spektren von $\text{UO}_2\text{DPDCP}\cdot\text{DMAA}$ in KBr (links)	133
A.10. IR-Spektren von $[\text{UO}_2\text{DCP}]_n$ in KBr (links) und PE (rechts)	136
A.11. ^1H - und ^{13}C -NMR von $[\text{UO}_2\text{-DPDCP}]_4$	137

Literaturverzeichnis

- [1] N.E. Dean, R.D. Hancock, C.L. Cahill, and M. Frisch. Affinity of the Highly Preorganized Ligand PDA (1,10-Phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid) for Large Metal Ions of Higher Charge. A Crystallographic and Thermodynamic Study of PDA Complexes of Thorium(IV) and the Uranyl(IV) Ion. *Inorganic Chemistry*, 47:2000–2010, 2008.
- [2] <http://itu.jrc.ec.europa.eu/index.php?id=451>.
- [3] J.L.J. Dearling and R.B. Pedley. Technological Advances in Radioimmunotherapy. *Clinical Oncology*, 19:457–469, 2007.
- [4] S. Hassfjell and M.W. Brechbiel. The development of the Alpha-Particle Emitting Radionuclides Bi-212 and Bi-213, and Their Decay Chain Related Radionuclides, for Therapeutic Applications. *Chemical Reviews*, 101:2019–2036, 2001.
- [5] S. Pommé, M. Marouli, G. Suliman, H. Dikmen, R. Van Ammel, V. Jobbágy, A. Dirican, H. Stroh, J. Paepen, F. Bruchertseifer, and A. Morgenstern. Measurement of the Ac-225 half-life. *Applied Radiation and Isotopes*, 70:2608–2614, 2012.
- [6] M.W. Geerlings, F.M. Kaspersen, C. Apostolidis, and R. Van der Hout. The Feasibility of Ac-225 as a source of Alpha-particles in Radioimmunotherapy. *Nuclear Medicine Communications*, 14:121, 1993.
- [7] McDevitt M. R., D. Ma, J. Simon, R. K. Frank, and D. Scheinberg. Design and Synthesis of 225-Ac radioimmunopharmaceuticals. *Applied Radiation and Isotopes*, 57:841–847, 2002.
- [8] A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, C. Apostolidis, F. Giesel, W. Mier, U. Haberkorn, and C. Kratochwil. Synthesis of 213-Bi-DOTATOC for peptide receptor alpha-therapy of GEP-NET patients refractory to beta therapy. *SNM's 59th Annual Meeting*, 2012.
- [9] R. Klenze, Th. Rabung, T. Fanghänel, and V. Neck. Aquatische Chemie und Thermodynamik von Actiniden. *NACHRICHTEN - Forschungszentrum Karlsruhe*, 36 (2):116–121, 2004.
- [10] L.R. Morss, N.M. Edelstein, and J. Fuger. *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements*. Springer Verlag, 2006.

- [11] C. Apostolidis, B. Schimmelpfennig, N. Magnani, P. Lindqvist-Reis, O. Walter, R. Sykora, A. Morgenstern, E. Colineau, R. Caciuffo, R. Klenze, Haire, J. Rebizant, F. Bruchertseifer, and T. Fanghänel. $[\text{An}(\text{H}_2\text{O})_9](\text{CF}_3\text{SO}_3)_3$ (An=U-Cm,Cf): Exploring Their Stability, Structural Chemistry and Magnetic Behavior by Experiment and Theory. *Angewandte Chemie, International Edition*, 49:6343–6347, 2010.
- [12] E. Ansborlo, O. Prat, P. Moisy, C. Den Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercouter, C. Moulin, and Val. Moulin. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie*, 88:1605–1618, 2006.
- [13] Gilles Montavon, Christos Apostolidis, Frank Bruchertseifer, Urska Repinc, and Alfred Morgenstern. Spectroscopic study of the interactions of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103:1609–1616, 2009.
- [14] G. Bernhard, G. Geipel, T. Reich, V. Brendler, S. Amayri, and H. Nitsche. Uranyl(VI) carbonate complex formation: Validation of the $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ species. *Radiochimica Acta*, 89(9):511–518, 2001.
- [15] S. Scapolan, E. Ansborlo, C. Moulin, and C. Madic. Uranium(VI)-Transferrin System Studied by Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence. *Radiation Prot Dosimetry*, 79:505–508, 1998.
- [16] S. Chevari and D. Likhner. A study of the Interaction between uranium and certain biocomplexons. *Meditainskaia radiologija*, 14(7):28–34, 1969.
- [17] E. Guzman Barron, J. Muntz, and B. Gasvoda. Regulatory Mechanisms of Cell Respiration. *The Journal of General Physiology*, 32(2):163–178, 1948.
- [18] <http://www.nucleonica.net>.
- [19] A. Morgenstern, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, R. Capote, T. Gouder, F. Simonelli, M. Sin, and K. Abbas. Cross-sections of the reaction $\text{Th-232}(p,3n)\text{Pa-230}$ for production of U-230 for targeted alpha therapy. *Applied Radiation and Isotopes*, 66:1275–1280, 2008.
- [20] S. Pommé, T. Altitzoglou, R. Van Ammel, G. Suliman, M. Marouli, V. Jobbágy, J. Paepen, H. Stroh, C. Apostolidis, K Abbas, and A. Morgenstern. Measurement of the U-230 half-life. *Applied Radiation and Isotopes*, 70:1900–1906, 2012.
- [21] Alfred Morgenstern, O. Lebeda, J. Stursa, R. Capote, F. Bruchertseifer, B. Zielinska, and C. Apostolidis. Cross section of the reaction $\text{P-231}(d,3n)\text{U-230}$ for the production of U-230/Th-226 for targeted alpha therapy. *Physical Review*, 80:054612, 2009.
- [22] A. Morgenstern, O. Lebeda, J. Stursa, F. Bruchertseifer, R. Capote, J. McGinley, G. Rasmussen, M. Sin, B. Zielinska, and C. Apostolidis. Production of

- U-230/Th-226 for Targeted Alpha Therapy via Proton Irradiation of Pa-231. *Analytical Chemistry*, 80:8763–8770, 2008.
- [23] A. Morgenstern, K. Abbas, F. Simonelli, R. Capote, M. Sin, B. Zielinska, F. Bruchertseifer, and C. Apostolidis. Measurement and Modeling of the cross section for the reaction $U-230(He-3,3n)U-230$. *Physical Review*, 87:064602, 2013.
- [24] <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Fluorophores-and-Their-Amine-Reactive-Derivatives/Introduction-to-Amine-Modification.html#head5>.
- [25] Robert C. Blake, Andrey R. Pavlov, Mehraban Khosraviani, Harry E. Ensley, Garry E. Kiefer, Haini Yu, Xia Li, and Diane A. Blake. Novel Monoclonal Antibodies with Specificity for Chelated Uranium(VI): Isolation and Binding Properties. *Bioconjugate Chemistry*, 15:1125–1136, 2004.
- [26] Ramon A. Evangelista, Alfred Pollak, Brian Allore, Eva F. Templeton, Robert C. Morton, and Eleftherios P. Diamands. A New Europium Chelate For Protein Labelling and Time-Resolved Fluorometric Applications. *Clinical Biochemistry*, 21:173–178, 1988.
- [27] C. Apostolidis, R. Molinet, G. Rasmussen, and A. Morgenstern. Production of Ac-225 from Th-229 for Targeted Alpha-Therapy. *Analytical Chemistry*, 77:6288–6291, 2005.
- [28] B. Zielinska, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, and A. Morgenstern. An Improved Method for the Production of Ac-225/Bi-213 from Th-229 for Targeted Alpha Therapy. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 25:339–349, 2007.
- [29] <http://www.roche.com>.
- [30] Philip E. Horwitz, P. E.itz, Mark L. Dietz, Renato Chiarizia, Herbert Diamond, Sherrod L. Maxwell, and Matthew R. Nelson. Separation and preconcentration of actinides by extraction chromatography using a supported liquid anion exchanger: application to the characterization of high-level nuclear waste solutions. *Analytica Chimica Acta*, 310:63–78, 1995.
- [31] Philip E. Horwitz, Mark L. Dietz, Renato Chiarizia, and Herbert Diamond. Separation and preconcentration of uranium from acidic media by extraction chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 266:25–37, 1992.
- [32] A. Sander. Stabilität des Uranyl-DCP-Komplexes in vitro. Master’s thesis, KIT, 2011.
- [33] *PD-10 Desalting Column*.
- [34] Radionuklide in der Medizin - Vorlesung von Dr. A. Morgenstern.
- [35] *SMART, SAINT and SADABAS*. Bruker AXS Inc. Madison, Wisconsin, USA.

- [36] G.M. Sheldrick. *Acta. Cryst.*, A64:112–122, 2008.
- [37] Mirjam Weis. Chelatierung der Antikörper. Technical report, ITU.
- [38] D.L. Melton, D. G. VanDerveer, and R.D. Hancock. Complexes Of Greatly Enhanced Thermodynamic Stability and Metal Ion Size-Based Selectivity, Formed by the Highly Preorganized Non-Macrocyclic Ligand 1,10-Phenanthroline-2,9-dicarboxylic Acid. A Thermodynamic and Crystallographic Study. *Inorganic Chemistry*, 45:9306–9314, 2006.
- [39] I. Grenthe and H. Wanner. *Guidelines for the Extrapolation to zero ionic strength*. OECD Nuclear Energy Agency, 2000.
- [40] J.P. Adloff. The centenary of a controversial discovery: Actinium. *Radiochimica Acta*, 88(3-4):123–127, 2000.
- [41] C. Basset, O. Averseng, P.-J. Ferron, N. Richaud, A. Hagège, O. Pible, and C. Vidaud. Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target? *Chemical Research in Toxicology*, 26:645–653, 2013.
- [42] Diane A. Blake, Andrey R. Pavlov, Haini Yu, Mehraban Kohsraviyani, Harry E. Ensley, and Robert C. Blake. Antibodies and antibody-based assays for hexavalent uranium. *Analytica Chimica Acta*, 444:2–11, 2001.
- [43] A.S Bonavia, McDevitt M. R., M. J. Curcio, and D. Scheinberg. Immunoreactivity assay for alpha-particle emitting monoclonal antibody constructs. *Applied Radiation and Isotopes*, 64:470–474, 2006.
- [44] M. Borkowski, S. Lis, and G. R. Choppin. Complexation Study of NpO_2^+ and UO_2^{2+} Ions with Several Organic Ligands in Aqueous Solutions of High Ionic Strength. *Radiochimica Acta*, 74:117–121, 1996.
- [45] E.D. Brady, H. Chong, D. Milenic, and M. Brechbiel. Development of a spectroscopic assay for bifunctional ligand-protein conjugates based on copper. *Nuclear Medicine and Biology*, 31:795–802, 2004.
- [46] M. Brechbiel, G. Pippin, T. McMurry, D. Milenic, M. Roselli, D. Colcher, and O. Gansow. An Effective Chelating Agent for Labelling of Monoclonal Antibody with Bi-213 for Alpha-Particle Mediated Radioimmunotherapy. *Journal of the Chemical Society*, page 1169, 1991.
- [47] L. Chappell, K.A. Deal, E. Dadachova, and M. Brechbiel. Synthesis, Conjugation and Radiolabelling of a Novel Bifunctional Chelating Agent for Ac-225 Radioimmunotherapy Applications. *Bioconjugate Chemistry*, 11:510–519, 2000.
- [48] M. Chérel, F. Davodeau, F. Kraeber-Bodéré, and J.F. Chatal. Current Status and perspectives in alpha radioimmunotherapy. *The Quarterly Journal Of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 50:322–329, 2006.
- [49] W.C. Cole, S.J. DeNardo, C.F. Meares, M.J. McCall, G.L. DeNardo, A.L. Epstein, H.A. O'Brien, and M.K. Moi. Comparative Serum Stability of Ra-

- diocelates for Antibody Radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, 28:83–90, 1987.
- [50] Ekaterina Dadachova, Ruth A. Bryan, Christos Apostolidis, Alfred Morgenstern, Tong Zhang, Tiffany Moadel, Marcela Torres, Xianchung Huang, Ekaterina Revskaya, and Arturo Casadevall. Interaction of Radiolabeled Antibodies with Fungal Cells and Compounds of the Immun System In Vitro and during Radioimmunotherapy for Experimental Fungal Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 193:1427–1436, 2006.
- [51] Ekaterina Dadachova and Arturo Casadevall. Antibodies as delivery vehicles for radioimmunotherapy of infectious diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2(6):1075–1084, 2005.
- [52] E. Dadachova, L.L. Chappell, and M.W. Brechbiel. Spectrophotometric Method for Determination of Bifunctional Macrocyclic Ligands in Macrocyclic Ligand-Protein Conjugates. *Nuclear Medicine & Biology*, 26:977–982, 1999.
- [53] Ekaterina Dadachova, Mahesh C. Patel, Sima Toussi, Christos Apostolidis, Alfred Morgenstern, Martin W. Brechbiel, Mirosław K. Gorny, Susan Zolla-Pazner, Arturo Casadevall, and Harris Goldstein. Targeted Killing of Virally Infected Cells by Radiolabeled Antibodies to Viral Proteins. *Plos Medicine*, 3:427, 2006.
- [54] Mario De Decker, Klaus Bacher, Hubert Thierens, Guido Slegers, Rudi A. Dierckx, and Filip De Vos. In vitro and in vivo evaluation of direct Rhenium-188-labeled anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab for radioimmunotherapy of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Nuclear Medicine and Biology*, 35:599–604, 2008.
- [55] L.M. De León-Rodríguez and Z. Kovacs. The Synthesis and Chelation Chemistry of DOTA-Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 19:391–402, 2008.
- [56] E. P. Diamandis and R. C. Morton. Time-Resolved fluorescence using a europium chelate of 4,7-bis-(chlorosulfohenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (BCPDA). *Journal of Immunological Methods*, 112:43–52, 1988.
- [57] C.R. Dias, S. Jeger, J. A. Osso Jr, C. Müller, C. De Pasquale, A. Hohn, R. Waibel, and R. Schibli. Radiolabeling of Rituximab with Re-188 and Tc-99m using the tricarbonyl technology. *Nuclear Medicine and Biology*, 38:19–28, 2011.
- [58] Lin-Lin Fan, Cui-Jin Li, Zhao-Sha Meng, and Ming-Liang Tong. Metal-Mediated One-Step In Situ Oxidation of 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthroline and Formation of Transition-Metal and Lanthanoid Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*, pages 3905–3909, 2008.
- [59] T. Fanghänel, V. Neck, and J.I. Kim. The ion Product of H₂O, Dissociation Constants of H₂CO₃ and Pitzer Parameters in the System Na⁺/H⁺/HCO₃⁻/ClO₄⁻/H₂O at 25°C. *Journal of Solution Chemistry*, 25:327–343, 1996.

- [60] J.J.R. Frausto da Silva and M. Lourdes Sadler Simoes. Studies on Uranyl Complexes-III. *Talanta*, 15:609–622, 1968.
- [61] C. Friesen, G. Glatting, B. Koop, K. Schwarz, A. Morgenstern, C. Apostolidis, K.-M. Debatin, and S.N. Reske. Breaking Chemoresistance and Radioresistance with Bi-213-anti-CD45 Antibodies in Leukemia Cells. *Cancer Research*, 67:1950–1958, 2007.
- [62] R.T. Gephart, N. J. Williams, J.H. Reibenspies, and R.D. de Sousa, A.S. Hancock. Metal Ion Complexing Properties of the Highly Preorganized Ligand 2,9-bis(Hydroxymethyl)-1,10-phenanthroline: A Crystallographic and Thermodynamic Study. *Inorganic Chemistry*, 47:10342–10348, 2008.
- [63] F. Gharib, M. Jabbari, and A. Farajtabar. Interaction of dioxouranium(VI) ion with EDTA at different ionic strength. *Journal of Molecular Liquids*, 144:5–8, 2009.
- [64] Ingmar Grenthe, Jean Fuger, Rudy Konings, Robert Lemire, Anthony Muller, Chinh Nguyen-Trung, and Hans Wanner. *Chemical Thermodynamics Of Uranium*. Amsterdam: North Holland, 1992.
- [65] W.R. Harris, R.J. Motekaitis, and A.E. Martell. New Multidentate Ligands. XVII. Chelating Tendencies of N-(o-Hydrobenzyl)iminodiacetic Acid. *Inorganic Chemistry*, 14:974–978, 1975.
- [66] A. Heppeler, S. Froidevaux, A.N. Eberle, and H.R. Maecke. Receptor Targeting for Tumor Localisation and Therapy with Radiopeptides. *Current Medicinal Chemistry*, 7:971–994, 2000.
- [67] E. Hosten and E. Rohwer. Complexation reactions of uranyl with arsenazo III. *Analytica Chimica Acta*, 355:95–100, 1997.
- [68] R. Huber, C. Seidl, E. Schmid, S. Seidenschwang, K.F. Becker, C. Schumacher, C. Apostolidis, T. Nikula, E. Kremmer, M. Schwaiger, and R. Senekowitsch-Schmidtke. Locoregional alpha-Radioimmunotherapy of Intraperitoneal Tumor Cell Dissemination Using A Tumor-specific Monoclonal Antibody. *Clinical Cancer Research*, 9:3922–3928, 2003.
- [69] D. Hudry, C. Apostolidis, O. Walter, T. Gouder, E. Courtois, C. Kübel, and D. Meyer. Controlled Synthesis of Thorium and Uranium Oxide Nanocrystals. *Chemistry A European Journal*, 19:5297–5305, 2013.
- [70] J.G. Jurcic, S. Larson, G. Sgouros, McDevitt M. R., R. D. Finn, C.R. Divgi, A.M. Ballangrud, K.A. Hamacher, D. Ma, J.L. Humm, M. Brechbiel, R. Molinet, and D. Scheinberg. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Clinical Observations, Interventions, and Therapeutical Trials*, 100(4):1233–1239., 2002.
- [71] A. Kassis and S.J. Adelstein. Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 46:4S–12S, 2005.

- [72] V.A. Khalkin, V.V. Tsupko-Sitnov, and N.G. Zaitseva. Radionuclides for radiotherapy. Properties, preparation and application of Actinium-225. *Radiochemistry*, 39(6):483–492, 1997.
- [73] D.V. Kolechko, F.A. Kolokov, A.I. Ofidi, A.A. Pikula, V.T. Panyushkin, I.E. Mikhailov, and G.A. Dushenko. Novel Luminescent Lanthanides Complexes with 1,10-Phenanthroline-2,9-Dicarboxylic Acid. *Doklady Chemistry*, 441:374–378, 2011.
- [74] Alicia Le Du, Andrea Sabatié-Gogova, Alfred Morgenstern, and Gilles Montavon. Is DTPA a good competing chelating agent for Th(IV) in human serum and suitable in targeted alpha therapy? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 109:82–89, 2012.
- [75] A. Leydier, Lececlé D., S. Pellet-Rostaing, A. Favre-Reguillon, and F. A. Taran, F. abTaran. Sequestering agent for uranyl chelation: a new family of CAMS ligands. *Tetrahedron*, 64:6662–6669, 2008.
- [76] M. Marouli, S. Pommé, J. Paepen, R. Van Ammel, V. Jobbágy, A. Dirican, G. Suliman, H. Stroh, C. ApoC. Apostolidis, K. Abbas, and A. Morgenstern. High-Resolution alpha-particle spectrometry of the U-230 decay series. *Applied Radiation and Isotopes*, 70:2270–2274, 2012.
- [77] M. Marouli, S. Pommé, J. Paepen, R. Van Ammel, V. Jobbàgy, A. Dirican, G. Suliman, H. Stroh, C. Apostolidis, K. Abbas, and A. Morgenstern. High-Resolution alpha-particle spectrometry of the U-230 decay series. *Applied Radiation and Isotopes*, 70:2270–2274, 2012.
- [78] Michael R. McDevitt, Ronald D. Finn, George Sgouros, Dangshe Ma, and David A. Scheinberg. An Ac-225/Bi-213 generator system for therapeutic clinical applications: constructions and operations. *Applied Radiation and Isotopes*, 50:895–904, 1999.
- [79] Michael R. McDevitt, Dangshe Ma, Lawrence T. Lai, Jim Simon, Paul Borchardt, R. Keith Frank, Karen Wu, Virginia Pellegrini, Michael J. Curcio, Matthias Miederer, Neil H. Bander, and David. ScScheinberg. Tumor Therapy with Targeted Atomic Nanogenerators. *Science*, 294:1537–1540, 2001.
- [80] G. Meinrath. Uranium(VI) speciation by spectroscopy. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 224:119–126, 1997.
- [81] Matthias Miederer, David Scheinberg, and McDevitt Michael. Realizing the potential of the Ac-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60:1371–1382, 2008.
- [82] Gilles Montavon, Urska Repinc, Christos Apostolidis, Frank Bruchertseifer, Kamel Abbas, and Alfred Morgenstern. Investigation of para-sulfonatocalix[n]arenes[n=6, 8] as potential chelates for U-230. *Dalton Transactions*, 39:1366–1374, 2010.

- [83] A. Morgenstern, F. Bruchertseifer, and C. Apostolidis. Bismuth-213 and Actinium-225 - Generator Performance and Evolving Therapeutic Applications of Two Generator-Derived Alpha-Emitting Radioisotopes. *Current Radiopharmaceuticals*, 5:221–227, 2012.
- [84] Deborah A. Mulford, David. Scheinberg, and Joseph G. Jurcuc. The Promise of Targeted Alpha-Particle Therapy. *The Journal of Nuclear Medicine*, 46:199–204, 2005.
- [85] L. Mullen, K. Gong, and K. Czerwinski. Complexation of Uranium(VI) with siderophore desferrioxamine B. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 273:683–688, 2007.
- [86] Mark D. Ogden, Serguei I. Sinkov, Mikael Nilson, J. Lumetta Gregg, and Robert D. Kenneth L. Hancock, Hancock. Complexation of Am(III) and Nd(III) by 1,10-Phenanthroline-2,9-Dicarboxylic Acid. *Journal of Solution Chemistry*, 42:211–225, 2013.
- [87] E. Ordonez-Regil, R. Drot, E. Simoni, and E. Ehrhardt. Sorption of Uranium onto Lanthanum Phosphate Surfaces. *Langmuir*, 18:7977–7984, 2002.
- [88] D.F. Peppard, G.W. Mason, J.L. Maier, and Driscoll W.J. Fractional Extraction Of The Lanthanides As Their Di-Alkyl Orthophosphates. *Journal of Inorganic Nuclear Chemistry*, 4:334–343, 1957.
- [89] J.A Pérez-Bustamante. Ion-Exchange Investigation of the Arsenazo III-Uranyl System. *Talanta*, 22:447–452, 1975.
- [90] O.S. Pokrovsky, M.G. Bronikowski, R.C. Moore, and G. R. Choppin. Interaction of Neptunyl(V) and Uranyl(VI) with EDTA in NaCl Media: Experimental Study and Pitzer Modeling. *Radiochimica Acta*, 80:23–29, 1998.
- [91] S. Pommé, G. Suliman, M Marouli, R. Van Ammel, V. Jobbágy, J. Paepen, H. Stroh, C.Apostolidis, K.Abbas, and A.Morgenstern. Measurement of the Th-226 and Ra-222 half-lives. *Applied Radiation and Isotopes*, 70:1913–1918, 2012.
- [92] McDevitt M. R., R. D. Finn, Dangshe M., S.M Larson, and D. Scheinberg. Preparation of alpha-Emitting 213Bi-Labeled Antibody Constructs for Clinical Use. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 10:1722–1727, 1999.
- [93] K.S. Rajan and A. Martell. Equilibrium Studies of Uranyl Complexes. III. Interaction of Uranyl Ion with Citric Acid. *Inorganic Chemistry*, 4(4):462–469, 1964.
- [94] H. Reddmann, C. Apostolidis, O. Walter, and H-D. Amberger. Zur Elektronenstruktur hochsymmetrischer Verbindungen der f-Elemente. *Zeitschrift fuer Anorganische und Allgemeine Chemie*, 632:1405–1408, 2006.
- [95] Marcin Sawicki, Jean-Michel Siaugue, Christophe Jacophin, Christophe Moulin, Théodorine Bailly, Ramon Burgada, Stephané Meunier, Paul Baret, Jean-Louis Pierre, and Frédéric Taran. Discovery of Powerful Uranyl Ligands from

- Efficient Synthesis and Screening. *Chemistry - A European Journal*, 11:3689–3697, 2005.
- [96] S. Scapolan, E. Ansborlo, C. Moulin, and C. Madic. Investigation by time-resolved laser-induced fluorescence and capillary electrophoresis of the uranyl-phosphate species: application to blood serum. *Journal of Alloys and Compounds*, 271-273:106–111, 1998.
- [97] G. Schwarzenbach and Elsi Freitag. Komplexe XIX. Die Bildungskonstante von Schwermetallkomplexen der Nitrilo-essigsäure. *Helvetica Chimica Acta*, 180:1492–1502, 1951.
- [98] J.L. Sessler, P.J. Melfi, and G. Pantos, Dan Pantos. Uranium complexes of multidentate N-donor ligands. *Coordination Chemistry Reviews*, 250:816–843, 2006.
- [99] G. Sgouros, J. Roeske, and M. McDevitt. Radiobiology and Dosimetry of Alpha-Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 51(2):311–328, 2010.
- [100] M. Sonoda, K. Hayashi, M. D. Nishida, MNishida, and I. Yoshida. Another Uranophile Sodium Hydroxycalix[8]arene-p-sulfonate: Its Acid Dissociation and Divalent Metal Ion Binding Properties. *Analytical Sciences*, 14:493–499, 1998.
- [101] M. Sonoda, M. Nishida, and I. Yoshida. Super Uranophile, Water-Soluble Calixarenes: Their Metal Complexes, Stability Constants and Selectivity Reactivity to Uranyl Ion. *Analytical Sciences*, 15:1207–1213, 1999.
- [102] J. Starrý and J. Pràslová. Extraction and Ion Exchange Investigation Of Uranyl(VI) Chelates. *Journal of Inorganic Nuclear Chemistry*, 17:361–365, 1961.
- [103] G. Tian and L. Rao. Effect of Temperature on the Protonation of the TAL-SPEAK Ligands: Lactic and Diethylenetrinitropentaacetic Acids. *Separation Science and Technology*, 45:1718–1724, 2010.
- [104] Sascha Trumm. *Untersuchung zur Komplexierung von Cm(III) und Eu(III) mit partitioning-relevanten Liganden*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2009.
- [105] J. David Van Horn and Huan Huang. Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coordination Chemistry Reviews*, 250:765–775, 2006.
- [106] C. Vidaud, S. Gourion-Arsiquaud, F. Rollin-Genetet, C. Torne-Celer, S. Plan-tevin, O. Pible, C. Berthomieu, and E. Quéméneur. Structural Consequences of Binding of UO₂²⁺ to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells? *Biochemistry*, 46:2215–2226, 2007.
- [107] Neil J. Williams, Nolan E. Dean, Donald G. VanDerveer, Luckay Robert C., and Robert D. Hancock. Strong Metal Ion Size Based Selectivity of the Higly

- Preorganized Ligand PDA (1,10-Phenanthroline-2,9-dicarboxylic Acid) with Trivalent Metal Ions. A Crystallographic, Fluorometric, and Thermodynamic Study. *Inorganic Chemistry*, 48:7853–7863, 2009.
- [108] Yuan-Xian Xia, Jian-Feng Chen, and Gregory R. Choppin. Solubility, dissociation and complexation with Nd(III) and Th(IV) of oxine, thenoyltrifluoroacetone and 1,10-phenanthroline in 5.0 m NaCl. *Talanta*, 43:2073–2081, 1996.
- [109] C. Xu, G. Tian, S.J. Teat, and L. Rao. Complexation of U(VI) with Dipicolinic Acid: Thermodynamics and Coordination Modes. *Inorganic Chemistry*, 52:2750–2756, 2013.
- [110] <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>.

α	Alpha
A	Absorption
b	barn
Bq	Bequerel
BCPDA	4,7-Bis-(chlorosulfofenyl)-1,10-phenanthrolin-2,9-dicarboxylsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
d	Tag
Da	Dalton
DCP	1,10-Phenanthrolin-2,9-diacarboxysäure
DCP-NCS	5-Isothiocyanato-1,10-phenanthrolin-2,9-dicarboxylsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTPDA	Diethylendiamintetraessigsäure
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
EW	Emissionswahrscheinlichkeit
γ	Gamma
g	Gramm
Gdm	Guanidinium
h	Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxymethyl]piperazin-N'-[2-ethanosulfonsäure]
HSA	Human Serum Albumin
HSTF	Human Serum Transferrin
IHCP	Institut für Gesundheit und Verbraucherschutz
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
ITU	Institut für Transurane
keV	Kiloelektronenvolt
L	Ligand
LET	Linearer Energietransfer
M	Molarität
MG	Molekulargewicht
NCS	Thiocyanat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Positronen-Emissions Tomographie
Rf	Retentionsfaktor
RIT	Radio-Immuntherapie
RT	Raumtemperatur
SA	Spezifische Aktivität
SG	Silica Gel
SPECT	Single-Photon Emmissions Computer Tomographie
T	Temperatur
TAT	Gezielte Alpha-Therapie
TEVA	Trialkyl-, methylammoniumnitrat
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
$^{158}\text{U(VI)}$	Uranyl
UTEVA	Dipentyl-, pentyolphosphonat
UV	Ultraviolett

**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Universität Heidelberg**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Entwicklung und Untersuchung U-230 markierter Antikörper

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich wie folgt/bislang nicht¹⁾ an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Titel der Arbeit: _____

Hochschule und Jahr: _____

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung: _____

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

¹⁾ Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung.