

# **Inaugural-Dissertation**

zur

## **Erlangung der Doktorwürde**

der

Gesamtfakultät

für Mathematik, Ingenieur- und Naturwissenschaften

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

**M. Sc. Helen Maraike Damerow**

geb. Ludwigshafen am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_



**Vergleichende Untersuchung von  $^{89}\text{Zr}$ -  
Chelatoren im Hinblick auf ihre Eignung in der  
Immuno-PET und Evaluierung eines neuen  
bifunktionellen *cross-bridged*-Chelators für  $^{68}\text{Ga}$**

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker

Prof. Dr. Carmen Wängler



## Eigene Veröffentlichungen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

1. H. Damerow, R. Hübner, B. Judmann, R. Schirmmacher, B. Wängler, G. Fricker, C. Wängler, *Cancers* **2021**, 13, DOI 10.3390/cancers13246349.
2. H. Damerow, X. Cheng, V. von Kiedrowski, R. Schirmmacher, B. Wängler, G. Fricker, C. Wängler, *Pharmaceutics* **2022**, 14, DOI 10.3390/pharmaceutics14102114.
3. H. Damerow, B. Wängler, R. Schirmmacher, G. Fricker, C. Wängler, *ChemMedChem* **2022**, DOI 10.1002/cmdc.202200495.



## Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Entwicklung und Evaluierung von bifunktionellen Chelatoren und untergliedert sich in zwei verschiedene Projekte.

$^{89}\text{Zr}$ , das in der Immuno-PET von großer Bedeutung ist, wird in klinischen Studien über Desferrioxamin B (DFO) komplexiert. Jedoch weist  $^{89}\text{Zr}$ Zr-DFO-Komplex eine geringe kinetische Inertheit auf, sodass eine Reihe neuer  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatoren entwickelt wurde. Ziel des Hauptprojektes war der direkte Vergleich von sechs potenziellen Chelatoren DFO, DFO\*, CTH36, 3,4,3-(LI-1,2-HOPO), DOTA-GA und NOTA-GA hinsichtlich der kinetischen Inertheit der gebildeten  $^{89}\text{Zr}$ Zr-Komplexe sowie ihrer *in vivo*-Pharmakokinetik. Um die effiziente Konjugation mit einem gewünschten Biomolekül mittels iEDDA unter milden Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Chelatoren mit einem Tetrazin funktionalisiert. Die Bestimmung der Radiomarkierungseigenschaften der Chelatoren und kinetischen Inertheit der gebildeten  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexe erfolgte zunächst unter Verwendung des Peptids, c(RGDfK) (**13**), das als Modellbiomolekül diente. Während DFO-, DFO\*-, CTH36- und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-c(RGDfK) bei milden Reaktionsbedingungen radiomarkiert werden konnten, wurde keine  $^{89}\text{Zr}$ Zr-Inkorporation für das DOTA-GA- und NODA-GA-Derivat erzielt. In den EDTA-Challenge-Versuchen demonstrierten  $^{89}\text{Zr}$ Zr-DFO\* und  $^{89}\text{Zr}$ Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO) eine hohe kinetische Inertheit und stellten damit geeignete Kandidaten für die *in vivo*-Evaluierung dar. DFO, DFO\* und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) wurden mittels iEDDA an den Antikörper Cetuximab gebunden, radiomarkiert und in einem HT-29-tumortragenden Mausmodell mittels Kleintier-PET/CT untersucht. Hierbei wurde die hohe kinetische Inertheit der Komplexe  $^{89}\text{Zr}$ Zr-DFO\* und  $^{89}\text{Zr}$ Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO) im Vergleich zu  $^{89}\text{Zr}$ Zr-DFO, resultierend in einer geringeren Knochenanreicherung und einem höherem Tumor-zu-Hintergrundverhältnis, bestätigt.  $^{89}\text{Zr}$ Zr-DFO\* wies gegenüber  $^{89}\text{Zr}$ Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO) ein vorteilhaftes pharmakokinetisches Profil mit einer geringeren Anreicherung in Leber und Milz auf. DFO\* ist daher der vielversprechendste Kandidat für den Einsatz in der humanen Immuno-PET.

Ziel des Nebenprojektes dieser Arbeit war die Synthese und Evaluierung des bifunktionellen Chelators CB-DO2A-GA, welcher eine Alternative zu den etablierten Chelatoren für  $^{68}\text{Ga}$  darstellt. Nach der erfolgreichen Synthese des Chelators wurde dieser hinsichtlich seiner Radiomarkierungseigenschaften, kinetischen Inertheit des gebildeten Komplexes und Serumstabilität mit den Chelatoren DOTA, NODA-GA und DOTA-GA verglichen. Hierfür wurden die Chelatoren mit dem Peptid TATE biofunktionalisiert. Im Gegensatz zu den

etablierten Chelatoren war die Radiomarkierung von CB-DO2A-GA-TATE nur wenig effektiv, jedoch wies der [<sup>68</sup>Ga]Ga-CB-DO2A-GA-Komplex eine hohe Serumstabilität und kinetische Inertheit gegenüber DTPA auf. Folglich stellt CB-DO2A-GA einen geeigneten Chelator zur Bildung von positiv geladenen <sup>68</sup>Ga-Komplexen dar.



## Abstract

The present dissertation deals with the development and evaluation of bifunctional chelators and is divided into two different projects.

$^{89}\text{Zr}$ , considered a radionuclide of great importance for Immuno-PET, is clinically complexed via deferoxamine B. However, as  $^{89}\text{Zr}$ -DFO reveals a low kinetic inertness, a number of new chelators have been developed. The aim of the main project was the direct comparison of six potential  $^{89}\text{Zr}$  chelators DFO, DFO\*, CTH36, 3,4,3-(LI-1,2-HOPO), DOTA-GA and NOTA-GA regarding the kinetic inertness of the formed complexes and their *in vivo*-pharmacokinetics. For efficient conjugation with a desired biomolecule using iEDDA under mild conditions, the chelators were functionalized with a tetrazine group. The determination of radiolabeling properties of the chelators and the kinetic inertness of the formed  $^{89}\text{Zr}$ -complexes were first performed using the peptide c(RGDfK) as model biomolecule. While DFO-, DFO\*-, CTH36- and 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-c(RGDfK) were radiolabeled under mild reaction conditions, no  $^{89}\text{Zr}$  incorporation was observed for the DOTA-GA and NODA-GA derivative. In EDTA challenges, only  $^{89}\text{Zr}$ -DFO\* and  $^{89}\text{Zr}$ -3,4,3-(LI-1,2-HOPO) demonstrated a high kinetic inertness, making them suitable for the *in vivo* investigations. Hence, DFO\*, 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) as well as the reference DFO were introduced into the antibody cetuximab, radiolabeled and examined in a HT-29-tumor-bearing mouse model using small animal PET/CT. The higher kinetic inertness of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO\* and  $^{89}\text{Zr}$ -3,4,3-(LI-1,2-HOPO) compared to  $^{89}\text{Zr}$ -DFO, resulting in a lower bone accumulation and higher tumor-to-background ratio, was confirmed.  $^{89}\text{Zr}$ -DFO\* showed a favorable pharmacokinetic profile over  $^{89}\text{Zr}$ -3,4,3-(LI-1,2-HOPO) with less accumulation in liver and spleen. All in all DFO\* represents the most suitable chelator for  $^{89}\text{Zr}$ -labeling in human Immuno-PET.

The aim of the side project was the synthesis and investigation of the bifunctional chelator CB-DO2A-GA, a promising alternative to the established chelators of  $^{68}\text{Ga}$ . After the synthesis of the chelator, its radiolabeling properties, kinetic inertness of the complex and serum stability were compared to those of DOTA, NODA-GA and DOTA-GA. For this purpose, the chelators were introduced into the peptide TATE. In contrast to the established chelators, the radiolabeling of CB-DO2A-GA-TATE was less efficient. In terms of the kinetic inertness in the DTPA challenge and serum stability the  $^{68}\text{Ga}$ -CB-DO2A-GA-complex,

proved favorable, making CB-DO2A-GA a suitable  $^{68}\text{Ga}$ -chelator, forming positive charged  $^{68}\text{Ga}$ -complexes.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Positronen-Emissions-Tomographie .....	1
1.1.1. Funktionsweise der PET.....	1
1.1.2. Radionuklide und zugelassene Radiopharmaka für die PET .....	2
1.2. Immuno-PET .....	4
1.2.1. Immunoglobuline in Therapie und Diagnostik .....	5
1.2.2. Geeignete Radionuklide für die Immuno-PET.....	7
1.2.2.1. Zirconium-89.....	8
1.2.3. Biokonjugation mittels bifunktioneller Chelatoren.....	9
1.3. Chelatoren .....	12
1.3.1. Chelatoren für Zirconium-89 .....	12
1.3.1.1. DFO ein geeigneter Chelator für Zirconium-89?.....	13
1.3.1.2. <sup>89</sup> Zr-Chelatoren basierend auf DFO .....	14
1.3.1.3. Makrocyclische Chelatoren.....	16
1.3.1.4. <sup>89</sup> Zr-Chelatoren mit Hydroxypyridinonen und Terephthalamidgruppen .....	18
1.3.2. Chelatoren für Gallium-68 .....	19
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>23</b>
2.1. Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für <sup>89</sup> Zr im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET .....	23
2.2. Synthese eines neuen bifunktionellen <i>cross-bridged</i> -Chelators und Vergleich der <sup>68</sup> Ga-Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren.....	25
<b>3. Kapitel 1: Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für <sup>89</sup>Zr im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET</b> .....	<b>27</b>
3.1. Synthese der Tetrazin-Derivate für die Konjugation .....	27
3.1.1. DFO-Tetrazin .....	28
3.1.2. DFO*-Tetrazin .....	28
3.1.3. Synthese eines 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazinderivats.....	30
3.1.4. Synthese von DOTA-GA-Tetrazin.....	35

3.2.	Bestimmung der Radiomarkierungseigenschaften der Chelatoren sowie der relativen kinetischen Inertheit der resultierenden $^{89}\text{Zr}$ -Chelator-Komplexe.....	35
3.2.1.	Peptidsynthese und Konjugation.....	36
3.2.2.	$^{89}\text{Zr}$ -Radiomarkierung der Chelator-c(RGDfK)-Konjugate <b>71 – 76</b> .....	39
3.2.3.	Bestimmung der Lipophilie.....	42
3.2.4.	EDTA Challenge-Versuche.....	43
3.3.	Biokonjugation und vergleichende Untersuchung der <i>in vivo</i> - Pharmakokinetik der [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO-, [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO*-, [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Cetuximab-Konjugate ...	45
3.3.1.	Biokonjugation.....	46
3.3.2.	$^{89}\text{Zr}$ -Radiomarkierung der Biokonjugate .....	50
3.3.3.	Immunoreaktivität .....	52
3.3.4.	<i>In vivo</i> -Bildgebung und <i>ex vivo</i> -Biodistribution .....	54
<b>4.</b>	<b>Kapitel 2: Synthese eines neuen bifunktionellen CB-Chelators und Vergleich der <math>^{68}\text{Ga}</math>-Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren.....</b>	<b>61</b>
4.1.	Synthese .....	61
4.1.1.	CB-DO2A-GA( <i>t</i> Bu) <sub>2</sub> .....	61
4.1.2.	Chelator-TATE-Derivate .....	62
4.2.	$^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierungsversuche, Untersuchung der <i>in vitro</i> -Stabilität und DTPA-Challenge.....	64
4.2.1.	$^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierung .....	64
4.2.2.	Lipophilie .....	66
4.2.3.	Serumstabilität.....	67
4.2.4.	DTPA-Challenge.....	69
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
5.1.	Kapitel 1: Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für $^{89}\text{Zr}$ im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET .....	71
5.2.	Kapitel 2: Synthese eines neuen bifunktionellen CB-Chelators und Vergleich der $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren.....	75
<b>6.</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>77</b>
6.1.	Verwendete Geräte.....	77
6.1.1.	Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR, $^{13}\text{C}$ -NMR) .....	77

6.1.2. Massenspektrometrie.....	77
6.1.3. Spektrometrie .....	78
6.1.4. Aktivitätsbestimmung .....	78
6.1.5. Chromatographische Methoden .....	79
6.1.6. Zentrifugation.....	80
6.1.7. Lyophilisation.....	80
6.1.8. Zellkultivierung.....	80
6.1.9. Anästhesiegerät .....	81
6.1.10. Kleintier-PET/CT .....	81
6.2. Verwendete Chemikalien und Materialien.....	82
6.3. Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für <sup>89</sup> Zr im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET .....	84
6.3.1. Synthese der Tetrazin-Derivate .....	84
6.3.1.1. 4-((4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-4-oxobutansäure ( <b>37</b> ).....	84
6.3.1.2. DFO-Tetrazin ( <b>24</b> ).....	85
6.3.1.3. <i>t</i> Bu- <i>N</i> -(benzyloxy)carbammat ( <b>41</b> ) .....	86
6.3.1.4. 2-(5-Chlorpentyl)isoindolin-1,3-dion ( <b>42</b> ).....	87
6.3.1.5. <i>tert</i> -Butyl(benzyloxy)(5-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)pentyl)carbammat ( <b>43</b> )...	87
6.3.1.6. <i>tert</i> -Butyl(benzyloxy)(5-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)pentyl)carbammat ( <b>39</b> )...	88
6.3.1.7. <i>O</i> -Benzyl- <i>N</i> -(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)pentyl)hydroxylaminhydro- chlorid ( <b>44</b> ).....	90
6.3.1.8. 4-((Benzyloxy)(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)pentyl)amino)-4-oxobutan- säure ( <b>45</b> ).....	91
6.3.1.9. Bn-DFO*-Cbz ( <b>46</b> ) .....	92
6.3.1.10. DFO* ( <b>5</b> ) .....	93
6.3.1.11. DFO*-Tetrazin ( <b>27</b> ).....	94
6.3.1.12. Tri-Boc-Spermin-trifluoracetamid ( <b>48</b> ).....	95
6.3.1.13. Tri-Boc-Spermin ( <b>49</b> ).....	96
6.3.1.14. Benzyl-3-brompropanoat ( <b>51</b> ).....	96
6.3.1.15. 1-Hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridin-2-carbonsäure ( <b>61</b> ) .....	97
6.3.1.16. 1-(Benzyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridin-2-carbonsäure ( <b>58</b> ).....	98
6.3.1.17. <i>tert</i> -Butyl(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbammat ( <b>63</b> ).....	99
6.3.1.18. 4-(( <i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino)phenethyl-4-methylbenzensulfonat ( <b>59</b> ) ...	99

6.3.1.19. <i>tert</i> -Butyl(4-(2-((3-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)propyl)-amino)ethyl)phenyl)carbamate ( <b>64</b> ).....	100
6.3.1.20. 3,4,3-(LI-1,2-HOPOBn)-NH-Boc ( <b>65</b> ) .....	101
6.3.1.21. 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-NH <sub>3</sub> Cl ( <b>66</b> ).....	103
6.3.1.22. 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin ( <b>28</b> ) .....	104
6.3.1.23. DOTA-GA-Tetrazin ( <b>26</b> ) .....	105
6.3.2. Peptidsynthese und Synthese der Chelator-c(RGDfK)-Konjugate .....	106
6.3.2.1. c(RGDfK) ( <b>13</b> ) .....	106
6.3.2.2. c(RGDfK)-TCO ( <b>70</b> ).....	107
6.3.2.3. iEDDA-Reaktion von TCO-c(RGDfK) ( <b>70</b> ) mit den Tetrazinen <b>24 - 29</b> ..	108
6.3.3. Radiomarkierung der Chelator-cRGDfK-Konjugate .....	115
6.3.3.1. Herstellung von [ <sup>89</sup> Zr]ZrCl <sub>4</sub> .....	116
6.3.4. Bestimmung der Lipophilie log <sub>D(7.4)</sub> .....	116
6.3.5. EDTA-Challenge-Versuche .....	116
6.3.6. Antikörper-Biokonjugation .....	117
6.3.6.1. Bradford-Assay .....	117
6.3.6.2. Herstellung des TCO-Cetuximab ( <b>77</b> ) .....	117
6.3.6.3. Bestimmung des TCO/Cetuximab-Verhältnisses.....	117
6.3.6.4. Synthese der Chelator-Cetuximab-Biokonjugate <b>78 – 80</b> .....	118
6.3.7. Radiomarkierung der Chelator-Cetuximab-Biokonjugate .....	118
6.3.8. Zellkultivierung von A431- und HT-29-Zellen .....	119
6.3.9. Bestimmung der Immunoreaktivität.....	119
6.3.10. Tierversuche .....	120
6.3.10.1. Tumorinokulation.....	120
6.3.10.2. <i>In vivo</i> -Bildgebung mittels Kleintier-PET/CT und <i>ex vivo</i> -Biodistribution ...	121
6.4. Synthese eines neuen bifunktionellen CB-Chelators und Vergleich der <sup>68</sup> Ga-Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren .....	122
6.4.1. Synthese von CB-DO2A-GA( <i>t</i> Bu) <sub>2</sub> .....	122
6.4.1.1. 5-(Benzyloxy)-2-brom-5-oxopentansäure ( <b>83</b> ) .....	122
6.4.1.2. 5-Benzyl-1- <i>tert</i> -butyl-2-brompentandioat ( <b>81</b> ) .....	123
6.4.1.3. 5-Benzyl-1- <i>tert</i> -butyl-2-(1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecan-4-yl)pentandioat ( <b>84</b> ) .....	124
6.4.1.4. Bn-CB-DO2A-GA( <i>t</i> Bu) <sub>2</sub> ( <b>85</b> ) .....	125

6.4.1.5.	CB-DO2A-GA( <i>t</i> Bu) <sub>2</sub> ( <b>34</b> ) .....	126
6.4.2.	TATE Derivate <b>86 – 89</b> .....	127
6.4.2.1.	DOTA-TATE ( <b>86</b> ) .....	128
6.4.2.2.	DOTA-GA-TATE ( <b>87</b> ) .....	128
6.4.2.3.	NODA-GA-TATE ( <b>88</b> ) .....	129
6.4.2.4.	CB-DO2A-GA-TATE ( <b>89</b> ) .....	130
6.4.3.	Radiomarkierung der Chelator-TATE-Konjugate.....	130
6.4.4.	Bestimmung der Lipophilie log <sub>D(7.4)</sub> .....	131
6.4.5.	Bestimmung der Serumstabilität .....	131
6.4.6.	DTPA-Challenge-Versuche.....	132
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>137</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>139</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>





# 1. Einleitung

## 1.1. Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives Bildgebungsverfahren, bei der radiomarkierte Substanzen genutzt werden, um physiologische und biochemische Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene darzustellen. Nuklearmedizinische Untersuchungsmethoden werden insbesondere in der Onkologie, aber auch in der Neurologie und Kardiologie zur Diagnose und Therapiekontrolle verwendet. Sie basieren auf dem von George de Hevesy entwickeltem *Tracer*-Prinzip bei dem kleinste pico- bis nanomolare Mengen des Radiopharmakons für die Untersuchung von *in vivo*-Prozessen ausreichen.<sup>[1][2]</sup> Die Entwicklung von Hybrid-Systemen durch die Kombination der PET oder *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) mit anderen bildgebenden Verfahren wie der Computertomographie (CT) und der Magnetresonanztomographie (MRT) erlaubt die Zuordnung der Stoffwechselfvorgänge zu den morphologischen Daten und somit die exakte Bestimmung der Lage pathologischer Anomalien.<sup>[3]</sup>

### 1.1.1. Funktionsweise der PET

Für die PET-Untersuchung wird, meist intravenös, ein positronenemittierendes Radiopharmakon, auch Radiotracer genannt, appliziert. Positronenstrahler sind instabile Nuklide mit einem Protonenüberschuss oder Neutronendefizit im Kern. Beim  $\beta^+$ -Zerfall wird daher im Atomkern ein Proton unter Emission eines Positrons und eines Elektron-Neutrinos in ein Neutron umgewandelt. Das Positron legt unter Verlust seiner kinetischer Energie noch eine Weglänge von wenigen Millimetern zurück, bevor es mit einem Elektron der umgebenden Materie interagiert. Die Weglänge ist dabei abhängig von der initialen Energie des Positrons und somit von dem eingesetzten Isotop. Bei der Kollision eines Elektrons mit seinem Antiteilchen, dem Positron, kommt es schließlich zur Annihilation, bei der die gesamte Ruheenergie beider Teilchen nach der Relativitätstheorie ( $E = m_e \cdot c^2$ ) in elektromagnetische Strahlung umgewandelt wird. Daraus resultieren zwei  $\gamma$ -Photonen mit einer charakteristischen Energie von jeweils 511 keV, die gemäß des Impulserhaltungssatzes in nahezu entgegengesetzte Richtungen (180°-Winkel) emittiert werden.<sup>[4]</sup> Das Messprinzip der PET basiert auf der Koinzidenzmessung (gleichzeitigen Messung) dieser beiden  $\gamma$ -Photonen. Der nicht-exakte 180°-Winkel und die Bewegung des Positrons durch die Materie limitieren zusammen mit der Größe der Detektoren die Ortsauflösung der PET, die derzeit bei

## Einleitung

klinisch-genutzten Geräten 5 – 7 mm (präklinisch 1 – 2 mm)<sup>[5]</sup> beträgt. Zur Erkennung der emittierten Photonen sind mehrere Detektoren, meist Szintillationskristalle, ringförmig um das Gesichtsfeld, dem *field of view* (FOV), angeordnet. Treffen zwei Photonen in einem Koinzidenzintervall von 6 – 12 ns auf einander gegenüberliegende Detektoren, wird im PET ein Koinzidenzereignis aufgezeichnet (Abbildung 1). Die gerade Linie zwischen den beiden Detektoren wird *line-of-response* (LOR) genannt. Durch die computergestützte Rekonstruktion kann anhand der Schnittpunkte der LORs die Lage der Annihilationsprozesse bestimmt werden und durch Verwendung von Korrekturfaktoren für zufällige Koinzidenzen (*Randoms*) und Streuereignisse (*Scatters*) die Quantifizierung der Aktivität des Positronenstrahlers erfolgen.<sup>[2]</sup>

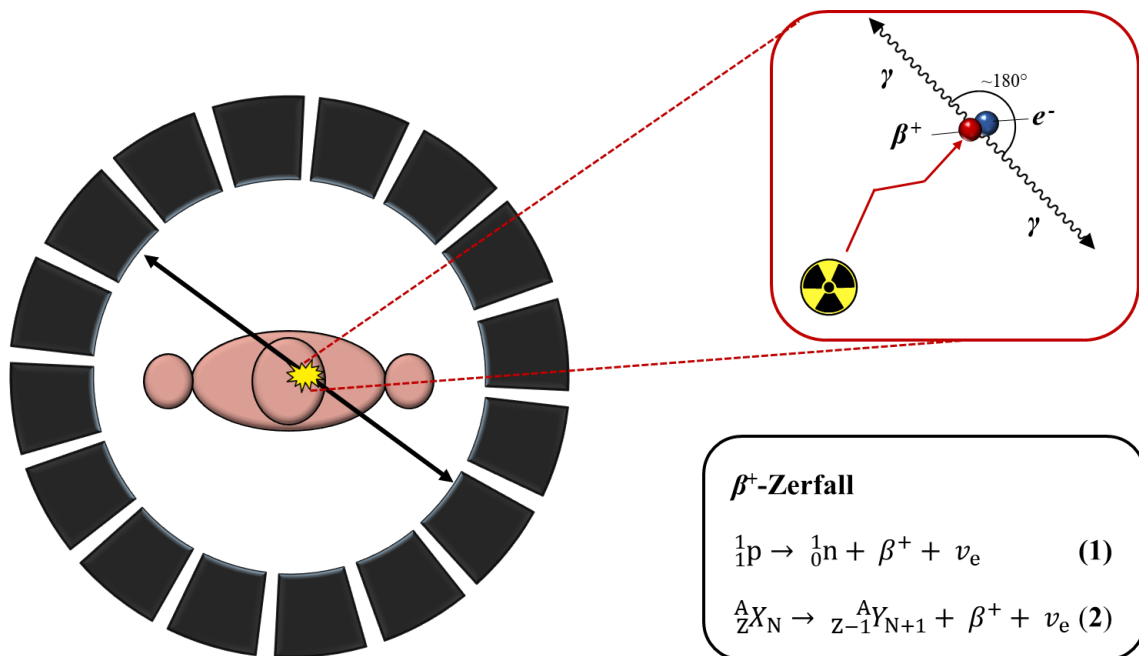
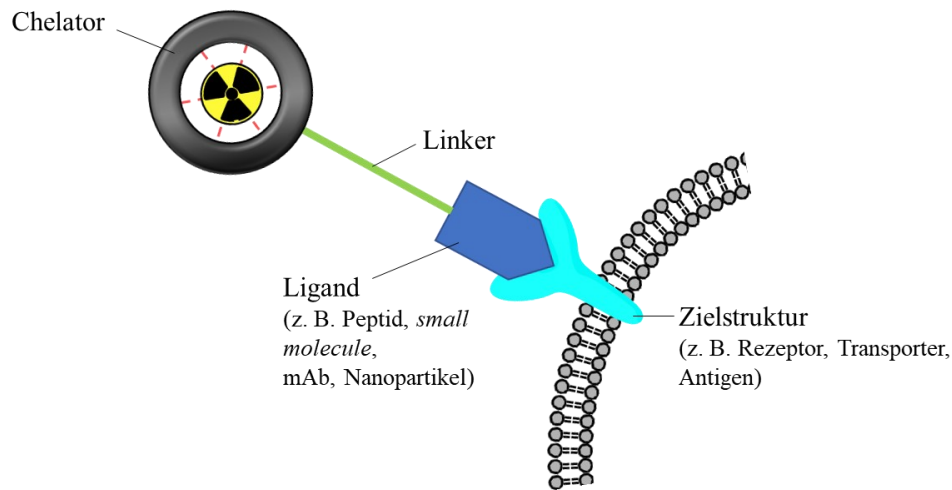


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Funktionsweise der Positronen-Emissions-Tomographie.

### 1.1.2. Radionuklide und zugelassene Radiopharmaka für die PET

Radiopharmaka können allein aus einem Radionuklid bestehen, jedoch sind sie meistens aus einem Liganden und radioaktiven Nuklid aufgebaut. Der Ligand bindet mit einer hohen Affinität und Spezifität an verschiedenen Zielstrukturen wie Rezeptoren, Enzyme und Transporter oder nimmt selbst an Stoffwechselfvorgängen teil. Hierdurch wird eine spezifische Anreicherung der Aktivität in dem Zielgewebe, wie dem Tumor, erreicht. Als Liganden werden zum Beispiel niedermolekulare Verbindungen, Peptide, Nanopartikel oder Antikörper verwendet. Das Radionuklid ist dabei entweder direkt über eine kovalente Bindung oder

mittels Komplexbildner bzw. Chelator, über einen *Linker* mit dem Liganden stabil verbunden (Abbildung 2).<sup>[6]</sup>



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung eines Radiopharmakons.

Diagnostisch verwendete Radionuklide sind entweder Photonenemitter oder Positronenemitter. Die Anreicherung der  $\beta^+$ -Strahlern lässt sich anhand der Koinzidenzmessung über die PET effizienter bestimmen als über die Messung der einzelnen Photonen mittels SPECT.<sup>[7]</sup> Die Wahl des Nuklids wird maßgeblich von der Verfügbarkeit, den radiochemischen Eigenschaften und der Bindung des Nuklids an den Liganden beeinflusst.

Die positronenemittierenden Isotope  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$  und  $^{15}\text{O}$  ermöglichen die Markierung von Biomolekülen ohne Änderung ihrer chemischen Eigenschaften. Mittels der „Bio“-Isotope können chemisch-identische „Isotopentracer“ hergestellt werden, welche die direkte Beobachtung von Stoffwechselprozessen erlauben und daher häufig in Metabolisierungsstudien verwendet werden. Der klinische Einsatz der Nuklide ist jedoch aufgrund der geringen Halbwertszeiten begrenzt im Hinblick auf: die Synthese des Radiopharmakons, die Untersuchungszeiten und Transportzeiten.<sup>[6]</sup>

Das am häufigsten verwendete Radionuklid  $^{18}\text{F}$ , das ebenfalls kovalent an den Liganden gebunden werden kann, besitzt eine deutlich höhere Halbwertszeit von 110 min. Die Herstellung des Nuklids erfolgt analog zu  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ , und  $^{15}\text{O}$  mittels Zyklotron. Jedoch erlaubt die vergleichsweise lange Halbwertszeit den Transport und somit den kommerziellen Vertrieb der Radiopharmaka. Einer der bekanntesten PET-Tracer ist das D-Glukose-Mimetikum 2- $^{18}\text{F}$ Fluor-2-desoxy-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ FDG), welches sich in Geweben und Organen mit hohem Glukoseverbrauch, wie z. B. in gesundem Gehirngewebe und in Tumoren, anreichert.<sup>[8]</sup>

## Einleitung

Neben  $^{18}\text{F}$  werden insbesondere  $^{68}\text{Ga}$ -Radiopharmaka als PET-Tracer in der klinischen Routine eingesetzt.  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$  kann über die Elution eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators gewonnen werden. Dies erlaubt die direkte Gewinnung von  $^{68}\text{Ga}$  in der Klinik und somit die Unabhängigkeit von einem Zyklotron. Anders als bei Halogenen und den „Bio“-Isotopen ist bei der Verwendung von Radiometallen die Komplexierung des Metalls über einen Chelator für die Bindung an den Liganden notwendig. Auch wenn  $^{68}\text{Ga}$  gegenüber  $^{18}\text{F}$  auf Grund der höheren Energie der Positronen eine geringfügig niedrigere Ortsauflösung besitzt, erlaubt die Verwendung von Chelatoren die Therapie mit dem gleichen Liganden.<sup>[9]</sup> Theranostische Paare sind beispielsweise  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$  und  $^{68}\text{Ga}/^{90}\text{Y}$ .<sup>[10]</sup> Zwei zugelassene  $^{68}\text{Ga}$ -Tracer sind  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-TOC und  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-TATE. Sie bestehen aus einem Peptid TOC bzw. TATE, die mit hoher Affinität an den Somatostatin-Rezeptor binden, und dem Chelator 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) (**1**), der  $^{68}\text{Ga}$  komplexiert.<sup>[11]</sup>

**Tabelle 1.** Übersicht über die wichtigsten Radionuklide in der PET.<sup>[12]</sup>

Nuklid	$t_{1/2}$	$\beta^+$ -Energie $E_{\text{max}}$ [MeV]	$\beta^+$ -Zerfall [%]
$^{11}\text{C}$	20.4 min	0.960	99.8
$^{13}\text{N}$	9.97 min	1.199	99.8
$^{15}\text{O}$	2.04 min	1.732	99.9
$^{18}\text{F}$	109.77 min	0.634	96.7
$^{64}\text{Cu}$	12.7 h	0.653	17.6
$^{68}\text{Ga}$	67.7 min	1.889	87.7
$^{89}\text{Zr}$	78.4 h	0.902	22.7
$^{124}\text{I}$	4.18 d	1.535; 2.138	11.7; 10.7

Die PET-Isotope  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  besitzen eine kurze Halbwertszeit, sodass diese lediglich für biologische Prozesse mit schneller Pharmakokinetik genutzt werden können. In der derzeitigen Entwicklung der Immuno-PET, in der Antikörper oder Antikörperfragmente als Liganden verwendet werden, sind langlebige Nuklide wie  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{124}\text{I}$  und  $^{89}\text{Zr}$  daher von enormer Bedeutung.<sup>[13]</sup>

## 1.2. Immuno-PET

In der Immuno-PET werden monoklonale Antikörper (mAbs) oder Fragmente mit PET-Radionukliden radiomarkiert, um die hohe Selektivität und Affinität der mAbs mit der hohen Sensitivität der PET zu kombinieren. Neben neuer hochspezifischer und sensitiver PET-tracer, sind radiomarkierte Antikörper insbesondere in der Entwicklung Antikörper-

basierender Therapien von großem Nutzen. Ihre Verwendung erlaubt die nicht-invasive Detektion der Biodistribution und Pharmakokinetik des mAbs, sowie der Expression des Zielrezeptors, sodass eine Vorhersage über den Therapieverlauf möglich ist.<sup>[14,15]</sup>

Bei der Immuno-PET müssen mehrere Aspekte beachtet werden.

- (1) Der mAb muss mit hoher Affinität und Spezifität an das Zielgewebe binden.
- (2) Die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) des Radionuklids muss zu der Pharmakokinetik des Antikörpers bzw. des Antikörper-Fragments passen.
- (3) Zusätzlich wird eine geeignete Biokonjugationsmethode benötigt, die weder die Integrität des mAbs, die Immunoreaktivität noch die Bioverteilung des Antikörpers beeinflusst.
- (4) Das Radioimmunokonjugat muss über mehrere Tage eine hohe Stabilität *in vivo* aufweisen, um so die vorzeitige Ausscheidung des Radionuklids oder aber die Anreicherung des Radionuklids in bestimmten Geweben zu vermeiden. Dies erfordert die stabile Bindung des Radionuklids mit dem mAb.<sup>[16]</sup>

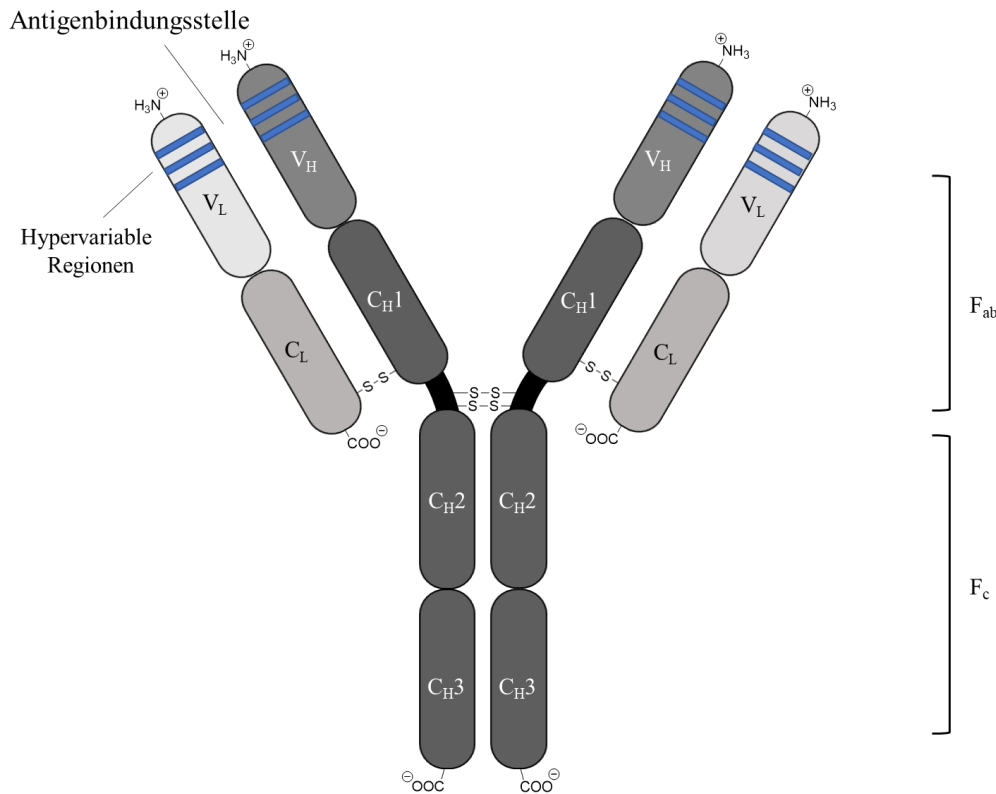
### 1.2.1. Immunoglobuline in Therapie und Diagnostik

Seit der Entwicklung der Hybridomtechnik zur Herstellung von mAbs durch Georg Köhler und Cesar Milstein 1975 sind diese als Liganden für Diagnose, Therapie und zur Kontrolle des Therapieverlaufs von großem Interesse.<sup>[17]</sup> 1986 wurde der erste mAb Muromonab-CD3 zur Behandlung von Transplantatabstoßungen und 1997 der erste mAb zur Behandlung von Krebs, Rituximab (B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen), von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Seitdem steigt die Zahl an zugelassenen mAbs weiter an. 2015 waren es 50 und im Juli 2021 bereits 100 zugelassene mAbs.<sup>[18]</sup> Zur Steigerung der Effektivität und Reduzierung der Toxizität werden mAbs mit Zytostatika, Zytokinen, Toxinen und Radionukliden konjugiert.<sup>[19]</sup>

Immunoglobuline der Subklasse IgG<sub>1</sub> sind die am häufigsten eingesetzten mAbs. Sie bestehen aus zwei schweren (H) Polypeptidketten und zwei leichten (L) Ketten, die über Disulfidbrücken Y-förmig miteinander verbunden sind. Die H-Kette besteht aus drei konstanten (C<sub>H</sub>) und einer variablen Domäne (V<sub>H</sub>) und die L-Kette aus einer konstanten (C<sub>L</sub>) und einer variablen Domäne (V<sub>L</sub>). Die zwei C-terminalen Domänen der H-Kette stellen die F<sub>c</sub>-Region (kristallisierbares Fragment) dar. Der obere Bereich, bestehend aus verbundener H- und L-Kette, wird als F<sub>ab</sub>-Region (Antigen-bindendes Fragment) bezeichnet. Die

## Einleitung

hochspezifische Antigenbindung erfolgt über die variablen Domänen  $F_v$  der H- und L-Kette der  $F_{ab}$ -Region.<sup>[20,15]</sup> Die Struktur eines  $IgG_1$ -Antikörpers ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 3).



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung eines  $IgG_1$ -Antikörpers.

Aufgrund der Größe von vollständigen IgGs mit etwa 150 kDa werden diese nicht durch glomeruläre Filtration ausgeschieden und besitzen daher eine nur langsame Clearance. Weiterhin besitzen die Antikörper eine langsame Pharmakokinetik, sodass im Hinblick auf die Immuno-PET ein optimales Tumor-zu-Hintergrundverhältnis erst in einem Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen erreicht wird. Neben vollständigen Antikörpern werden auch Antikörper-Fragmente genutzt, die zwar eine geringere Akkumulation im Zielgewebe aufweisen, jedoch auch eine schnellere Pharmakokinetik (1 – 12 h bis zu optimalem Tumor-zu-Hintergrundverhältnis).<sup>[15,21]</sup>

mAbs werden insbesondere in der Onkologie zur Adressierung von im Tumor überexprimierten Zielstrukturen wie den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (HER1 bzw. EGFR und HER2), des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptors (VEGFR), des B-Lymphozytenantigens CD20 oder des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) verwendet.<sup>[22]</sup> In Tabelle 2 sind für die Therapie zugelassene

Antikörper, die insbesondere in der Entwicklung von Radioimmunokonjugaten genutzt werden, zusammengefasst.

**Tabelle 2.** Therapeutische mAbs in der Entwicklung von Radioimmunokonjugaten.<sup>[23]</sup>

<b>mAb</b>	<b>target</b>	<b>Indikation</b>
<b>Panitumumab</b>	EGFR	Kolorektalkarzinome
<b>Cetuximab</b>	EGFR	Kolorektalkarzinome, metastasierende Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals
<b>Trastuzumab</b>	HER2	Brust- und Speiseröhrenkrebs
<b>Ibritumomab Tiuxetan</b>	CD20	Non-Hodgkin Lymphome
<b>Tositumomab</b>	CD20	Non-Hodgkin Lymphome
<b>Bevacizumab</b>	VEGF	Darm-, metastasierender Brust- und nicht-kleinzelliger Lungenkrebs

In der Therapie werden Radioimmunokonjugate, die als Radionuklide insbesondere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Emitter enthalten, eingesetzt. Die ersten Konjugate [ $^{90}\text{Y}$ ]Y-Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>) und [ $^{131}\text{I}$ ]I-Tositumomab (Bexxar<sup>®</sup>) wurden 2002 bzw. 2003 zur Behandlung von Non-Hodgkin Lymphomen von der FDA zugelassen. Gleichzeitig erlaubt die Verwendung der Nuklide  $^{90}\text{Y}$  und  $^{131}\text{I}$  die Detektion von  $\gamma$ -Photonen mittels SPECT, sodass die Radiopharmaka als Theranostika genutzt werden können.<sup>[24]</sup> Für die SPECT wurde eine Reihe weiterer Immunoglobuline mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  oder  $^{123}\text{I}$  radiomarkiert und untersucht.<sup>[25]</sup> Da die PET eine höhere Sensitivität und bessere Quantifizierbarkeit als die SPECT liefert, ist die Entwicklung von PET-*tracern* für die Immuno-PET von großem Interesse.<sup>[16]</sup>

### 1.2.2. Geeignete Radionuklide für die Immuno-PET

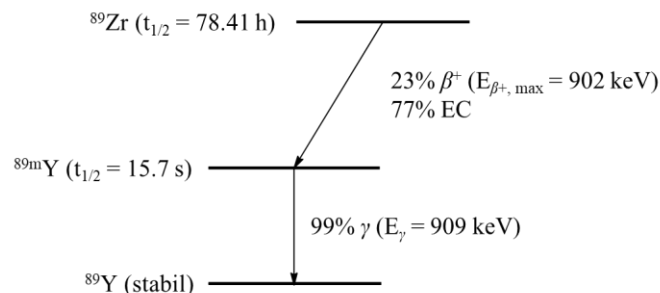
$^{64}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{124}\text{I}$  und  $^{89}\text{Zr}$  wurden aufgrund ihrer radiochemischen Eigenschaften in der Entwicklung von Immuno-PET-Radiopharmaka untersucht.  $^{64}\text{Cu}$  und  $^{86}\text{Y}$  besitzen lediglich eine Halbwertszeit von 12.7 h bzw. 14.7 h, die unzureichend für die langsame Pharmakokinetik eines intakten Immunoglobulins ist. Ihre Verwendung ist somit auf den Einsatz von Biomolekülen mit mittlerer Pharmakokinetik, wie Antikörperfragmente, limitiert. Beim Zerfall von  $^{86}\text{Y}$  (68 % Elektroneneinfang (EC), 32 %  $\beta^+$ -Zerfall) werden zudem mehrere  $\gamma$ -Photonen mit Energien zwischen 200 und 3000 keV emittiert, die die Detektion der Annihilationsphotonen stören und so die Auflösung im PET stark herabsetzen. Die deutlich höheren Halbwertszeiten von  $^{124}\text{I}$  mit 4.18 d und  $^{89}\text{Zr}$  mit 3.27 d eignen sich hingegen optimal

## Einleitung

für den Einsatz in der humanen Immuno-PET. Beim Zerfall von  $^{124}\text{I}$  werden im Gegensatz zu dem Zerfall von  $^{89}\text{Zr}$  hoch-energetische Positronen ( $E_{\text{max}} = 2137.6 \text{ keV}$ ) emittiert, die zu einer geringeren Ortsauflösung führen.<sup>[26–28]</sup> Wesentlich ist auch die Dehalogenierung der  $^{124}\text{I}$ -markierten Antikörper in der Zelle, die zu einer schnellen Freisetzung von  $[\text{}^{124}\text{I}]\text{I}^-$  aus der Zelle und schließlich zu einer Akkumulation der Radioaktivität in der Schilddrüse und im Magen führt.<sup>[29]</sup> Im Gegensatz dazu verbleibt  $^{89}\text{Zr}$  nach der Internalisierung in der Zelle, sodass eine deutlich höhere Tumoranreicherung bzw. Tumor-zu-Hintergrundaktivität erhalten wird.<sup>[30]</sup> Alles in allem wurde daher  $^{89}\text{Zr}$  das führende Nuklid in der Immuno-PET.

### 1.2.2.1. Zirconium-89

$^{89}\text{Zr}$  zerfällt über Positronenemission (23 %) oder EC (77 %) mit einer Halbwertszeit von 78.41 h bzw. 3.27 d zu dem metastabilen  $^{89\text{m}}\text{Y}$ . Dieses zerfällt im Weiteren mit einer Halbwertszeit von 15.7 s über  $\gamma$ -Emission ( $E_\gamma = 909 \text{ keV}$ ) zu dem stabilen  $^{89}\text{Y}$ . Beim  $\beta^+$ -Zerfall werden Positronen mit einer mittleren Energie von 396 keV bzw. einer maximalen Energie von 902 keV emittiert (Abbildung 4). Die niedrige Energie resultiert in einer guten Ortsauflösung in der PET. Zudem erlaubt der Energieunterschied der resultierenden Annihilationsphotonen von 511 keV und  $\gamma$ -Photonen von 909 keV die Unterscheidung der Photonen und stört somit nicht die Detektion der Annihilationsphotonen.<sup>[27]</sup>



**Abbildung 4.** Vereinfachtes Zerfallsschema von  $^{89}\text{Zr}$ . Erstellt in Anlehnung an DERI *et al.*<sup>[27]</sup>

Die Herstellung von  $^{89}\text{Zr}$  erfolgt mittels Zyklotron über eine  $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ - oder  $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$ -Reaktion. Bei beiden Herstellungsmethoden wird ein  $^{89}\text{Y}$ -target, wie Yttriumfolie oder Yttriumoxid-Pulver, die aufgrund des natürlichen Vorkommens von  $^{89}\text{Y}$  kommerziell erhältlich sind, verwendet.<sup>[31,32]</sup> Folglich weist  $^{89}\text{Zr}$  eine hohe Verfügbarkeit auf. Die  $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ -Reaktion ist die am häufigsten verwendete Methode zur Herstellung von  $^{89}\text{Zr}$ . Sie wurde 1986 von LINK *et al.* erstmals veröffentlicht und schließlich im Hinblick auf das target, die Protonenenergie und Aufreinigung optimiert. Bei der Bestrahlung von  $^{89}\text{Y}$  steht insbesondere die Vermeidung von Nebenreaktionen, wie  $^{89}\text{Y}(p,2n)^{88}\text{Zr}$  oder  $^{89}\text{Y}(p,pn)^{88}\text{Y}$ , im



Vordergrund.<sup>[27,13]</sup> Nach der Bestrahlung erfolgt die Isolation und Aufreinigung von  $^{89}\text{Zr}$  durch Lösungsmittel-Extraktion und verschiedene Anionen-Austausch-Chromatographie-Methoden.<sup>[33]</sup> Insbesondere die Aufreinigung unter Verwendung von Hydroxamat-Harzen nach MEIJS *et al.* erweist sich als sehr effizient.<sup>[34]</sup> HOLLAND *et al.* publizierten basierend darauf 2009 eine „standardisierte Methode“ zur Produktion von  $^{89}\text{Zr}$ . Hierbei wird nach der Bestrahlung einer  $^{89}\text{Y}$ -Folie, das *target* in 6 M Salzsäure gelöst. Die Lösung wird schließlich auf das Hydroxamat-Harz aufgebracht. Daraufhin wird mit einer 2 M HCl und Wasser gewaschen und schließlich  $^{89}\text{Zr}$  mittels 1 M Oxalsäure eluiert. [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-Oxalat kann so in einer Reinheit von > 99.99 % mit einer Rückgewinnung der Aktivität von > 99.5 % erhalten werden.<sup>[32]</sup>

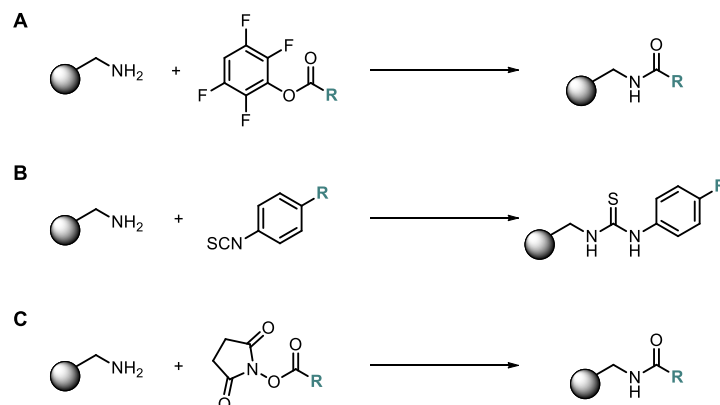
### 1.2.3. Biokonjugation mittels bifunktionaler Chelatoren

Die Einbringung von Radiometallen in ein Biomolekül erfolgt meist über bifunktionelle Chelatoren (BFCs), die aus einem Chelator zur Komplexierung des Radionuklids und einem *Linker* mit einer reaktiven funktionellen Gruppe zur Biokonjugation mit dem mAb bestehen. Um eine hohe Proteinintegrität, Immunreaktivität und gute Bioverteilung der Antikörper zu gewährleisten, müssen mehrere Aspekte bei der Wahl der Konjugationschemie beachtet werden.<sup>[15]</sup> Zum Erhalt der Proteinintegrität müssen die Reaktionen bei milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Hierfür wird meist ein pH zwischen 7 und 9, eine Reaktionstemperatur von < 40 °C und ein wässriges Lösungsmittel gewählt.<sup>[35]</sup> Des Weiteren kann sich die Anzahl der Chelatormoleküle pro Antikörper sowohl auf die Immunreaktivität als auch die Biodistribution auswirken. Mit steigender Zahl an Chelatoren steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Konjugation an oder in der Nähe der Antigenbindungsstelle stattfindet und so die Immunreaktivität herabsetzt. Neben der Zahl an Chelatoren können auch die chemischen Eigenschaften wie Lipophilie und Ladung des Chelators einen Einfluss auf die Biodistribution des mAbs haben.<sup>[36]</sup> Bei der Konjugation spielt daher die Kontrolle der Integrität und biochemischen Eigenschaften des mAbs mittels Bindungsassays und *in vivo*-Experimenten eine tragende Rolle.<sup>[26,37]</sup>

Der bislang am häufigsten verwendete Chelator in  $^{89}\text{Zr}$ -Chelator-Biokonjugaten ist Desferrioxamin B (DFO), siehe Kapitel 1.3.1.1.<sup>[16]</sup> Im Folgenden liegt daher der Fokus auf den Konjugationsmethoden von DFO.

## Einleitung

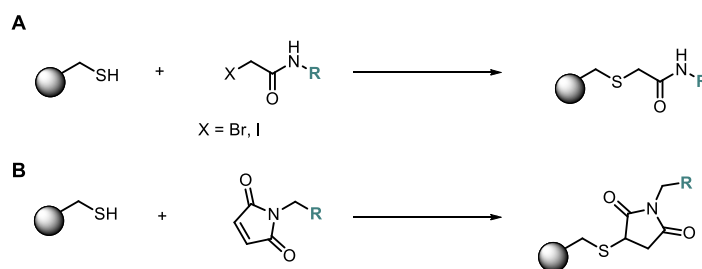
Das erste Verfahren zur Konjugation von DFO wurde von MEIJS *et al.* 1996 publiziert.<sup>[13]</sup> Hierfür wurde zunächst ein *S*-Acetylthioacetat (SATA) mittels *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Aktivester mit dem primären Amin des DFOs umgesetzt. Gleichzeitig erfolgte die unspezifische Modifizierung von Lysin-Resten des mAbs mit Maleimid-Gruppen. Das DFO-Derivat wurde schließlich unter Ausbildung einer Thioether-Bindung mit dem Antikörper umgesetzt.<sup>[38,39]</sup> Die Succinimid (Suc)-Ring-Thioethergruppe erwies sich jedoch bei physiologischem pH-Wert als instabil.<sup>[40,41]</sup> VEREL *et al.* publizierte 1998 eine Methode zur direkten Umsetzung der Lysin-Reste des mAbs unter Verwendung eines aktivierten 2,3,5,6-Tetrafluorphenol (TFP)-DFO-Derivates. Für die Synthese des TFP-Derivates war die Blockade der Hydroxamatgruppen mit  $\text{Fe}^{3+}$  notwendig. Nach der Konjugation von TFP-Suc-DFO mit dem mAb erfolgte schließlich die Entfernung von  $\text{Fe}^{3+}$  mittels EDTA.<sup>[41]</sup> Eine weitere, deutlich einfachere, Methode wurde von PERK *et al.* beschrieben, der *p*-Isothiocyanat (NCS)-Benzyl-DFO zur Konjugation verwendete.<sup>[42]</sup> Die nicht-selektiven Biokonjugationsmethoden sind in folgender Abbildung dargestellt (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Nicht-selektive Biokonjugationsmethoden der Chelatoren R mit den Aminogruppen von Lysinen unter Verwendung eines (A) TFP-, (B) NCS- bzw. (C) NHS-Chelator-Derivates. Die Biomoleküle sind als graue Sphäre dargestellt.

Um die Problematik der Blockierung der Antigenbindestelle zu umgehen, publizierte TINIANOW *et al.* zu der gleichen Zeit drei DFO-Derivate Bromacetyl (Bac)-, Iodacetyl (Iac)- und Maleimidcyclohexyl (Chx-Mal)-DFO zur Positions-spezifischen Konjugation an generierte Thiolgruppen auf der Antikörperoberfläche.<sup>[43]</sup> Diese selektive Konjugation ist insbesondere bei der Verwendung von Antikörperfragmenten von Bedeutung, da diese im Vergleich zu einem intakten Antikörper einen geringeren Anteil an Lysin-Resten außerhalb der Antigenbindungsstelle besitzen. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Biokonjugation zu einem Verlust an Immunoreaktivität führt, bei Antikörperfragmenten

höher.<sup>[26]</sup> In folgender Abbildung sind Konjugationsmethoden von Chelatoren mit Thiolgruppen dargestellt (Abbildung 6)

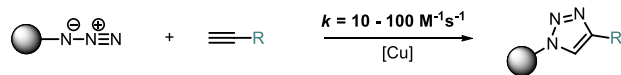


**Abbildung 6.** Selektive Biokonjugationsmethoden von Chelatoren R mit generierten Thiolgruppen unter Verwendung eines (A) Bac- oder Iac-bzw. (B) Maleimid-Chelator-Derivates. Die Biomoleküle sind als graue Sphäre dargestellt.

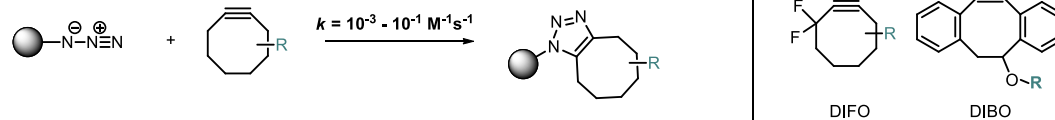
Weiterhin gewinnen „Click“-Reaktionen als Biokonjugationsmethoden zunehmend an Bedeutung. Sie verlaufen bei milden Reaktionsbedingungen mit schneller Reaktionskinetik, nahezu quantitativ, chemoselektiv in wässrigem Medium und lassen sich mit den zuvor vorgestellten nicht-selektiven und selektiven Methoden verbinden. Des Weiteren ermöglicht die Bioorthogonalität der Reaktionen modulare und somit auch theranostische Anwendungen. Zu den zur Biokonjugation genutzten Reaktion gehören die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-[3+2]-Cycloaddition (CuAAC), die ringgespannte (*strain-promoted*) Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC) sowie die *Inverse electron-demand Diels-Alder* (IEDDA)-Reaktion.<sup>[44]</sup> Die iEDDA-Reaktion, die 2008 von BLACKMAN *et al.* publiziert wurde, weist gegenüber den anderen „Click“-Reaktionen viele Vorteile auf. So zählt die iEDDA, bei der 1,2,4,5-Tetrazine mit verschiedenen Dienophilen in einer [4+2]-Cycloaddition umgesetzt werden, zu den katalysatorfreien Click-Reaktionen wie die SPAAC.<sup>[45]</sup> Als Dienophile werden beispielsweise *trans*-Cycloocten (TCO) oder Norbornen verwendet. Zusätzlich besitzt die iEDDA-Reaktion gegenüber der SPAAC und der CuAAC eine deutlich höhere Umsatzrate, die in den letzten Jahren unter Verwendung verschiedener Tetrazine, Dienophile und Lösungsmittel weiter optimiert wurde.<sup>[46,47]</sup> Ein Beispiel für die modulare Anwendung der iEDDA wurde 2011 von ZEGLIS *et al.* publiziert. Hierbei wurde DOTA- und DFO-Tetrazin (**24**) für die <sup>64</sup>Cu- und <sup>89</sup>Zr-Radiomarkierung von Trastuzumab, das zuvor mit Norbornen modifiziert wurde, eingesetzt.<sup>[48]</sup> Die bioorthogonalen Reaktionen sind in nachfolgender Abbildung dargestellt (Abbildung 7).

## Einleitung

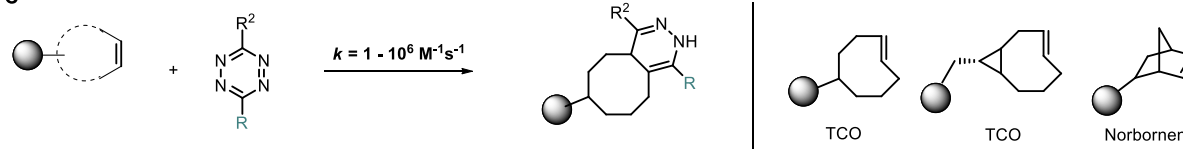
A



B



C



**Abbildung 7.** Bioorthogonale Konjugation von modifizierten Biomolekülen mit bifunktionellen Chelatoren über die (A) CuAAC, (B) SPAAC bzw. (C) iEDDA-Reaktion. Die Biomoleküle werden als graue Sphäre und die bifunktionellen Chelatoren als R dargestellt.

## 1.3. Chelatoren

Chelatoren spielen eine Hauptrolle in der stabilen Anbringung der Radiometalle an den Liganden. Insbesondere die kinetische Inertheit des gebildeten Radiometall-Chelator-Komplexes, aber auch seine chemischen Eigenschaften, Ladung und Lipophilie sind wichtige Parameter, um eine geeignete Biodistribution des Radiopharmakons zu erzielen und *off-target* Anreicherungen des Radionuklids zu vermeiden.<sup>[49]</sup> Im Folgenden wird die Komplexbildungschemie für  $^{89}\text{Zr}$ , das insbesondere in der Immuno-PET genutzt wird, und für  $^{68}\text{Ga}$ , das eines der am häufigsten klinisch verwendeten Radiometalle ist, vorgestellt.

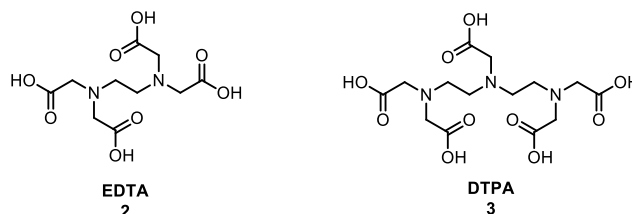
### 1.3.1. Chelatoren für Zirconium-89

Zirconium ist ein Metall der vierten Gruppe in der fünften Periode, dessen vorwiegende Oxidationsstufe im Wässrigen +4 ist.  $\text{Zr}^{4+}$  besitzt eine hohe Ladung und bei einer achtfachen Koordination einen relativ geringen Ionenradius von 84 pm.<sup>[27]</sup> Folglich stellt  $[\text{Zr}^{4+}]$  eine harte Lewis-Säure dar, die harte sauerstoffreiche Donoren, darunter Hydroxamate, Carboxylate, Carbonyle und Hydroxypyridinone (HOPOs) bevorzugt.<sup>[49]</sup>

In Tierstudien wurde gezeigt, dass freies  $[\text{Zr}^{4+}]$ , injiziert als  $[\text{Zr}^{4+}]$ -Oxalat oder  $[\text{Zr}^{4+}]$ -Chlorid, zu einer hohen Akkumulation der Aktivität in den Knochen, davon 33 % in den Epiphysen, führt, während nur eine geringe Anreicherung der Radioaktivität von 0.1 % im

Knochenmark zu finden ist. Grund dafür ist die hohe Affinität des  $^{89}\text{Zr}$  gegenüber Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ .<sup>[50]</sup> Die daraus resultierende hohe Dosisbelastung für die Knochen sowie für das blutbildende Knochenmark hebt die Notwendigkeit einer kinetisch-inerten Komplexierung des  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$  hervor.

Für die Entwicklung von spezifischen  $\text{Zr}^{4+}$ -Chelatoren wurde zunächst die Koordinationschemie von  $\text{Zr}^{4+}$  unter Verwendung von den am meisten verwendeten Chelatoren Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (2) und Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) (3) mittels Kristallstrukturanalyse bestimmt. In beiden Komplexen Zr-EDTA und Zr-DTPA ist die Koordinationszahl acht. EDTA (2) benötigt im Gegenteil zu DTPA (3) zwei weitere Wassermoleküle zur Sättigung der Koordinationssphäre von  $\text{Zr}^{4+}$ .<sup>[51]</sup> Dies resultiert in einer geringeren thermodynamischen Stabilität von Zr-EDTA gegenüber Zr-DTPA.<sup>[27]</sup> Allerdings war bei dem Versuch der Radiomarkierung eines DTPA-mAbs die  $^{89}\text{Zr}$ -Inkorporation  $< 0.1\%$ . Weder EDTA (2) noch DTPA (3) stellen damit einen geeigneten Chelator für  $^{89}\text{Zr}$  dar.<sup>[52]</sup> Als Begründung hierfür wird das harte Säuren und Basen (HSAB)-Prinzip herangezogen. DTPA (3) komplexiert  $^{89}\text{Zr}$  über drei Stickstoff- und fünf Sauerstoffatome. Das harte  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$ -Kation bevorzugt jedoch die Komplexierung über harte Sauerstoffatome wie z.B. in Hydroxamatgruppen.<sup>[53]</sup>



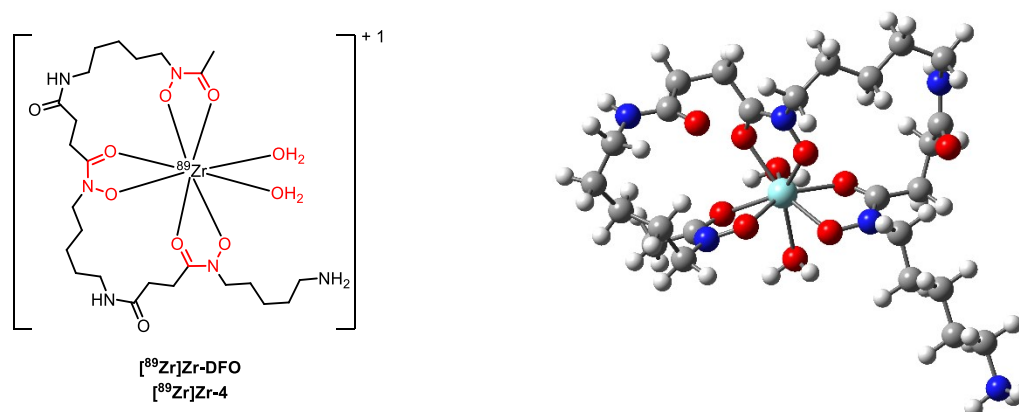
**Abbildung 8.** Struktur der Chelatbildner EDTA (2) und DTPA (3).

### 1.3.1.1. DFO ein geeigneter Chelator für Zirconium-89?

DFO (4), ursprünglich ein bakterielles Siderophor zur Komplexierung von  $\text{Fe}^{3+}$ , ist der am häufigsten verwendete Chelator für  $^{89}\text{Zr}$ .<sup>[16]</sup> Strukturell besteht DFO (4) aus einer Aminogruppe, die zur Biokonjugation genutzt werden kann, und drei Hydroxamatgruppen zur Komplexierung des Radiometalls. Der erste  $[\text{}^{88}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO-Komplex wurde 1992 von MEIJS *et al.* publiziert.<sup>[54]</sup> Neben einer effektiven  $^{89}\text{Zr}$ -Radiomarkierung von DFO (4) bei milden Reaktionsbedingungen (pH 7, Raumtemperatur (RT), 0.5 – 1 h,  $^{89}\text{Zr}$ -Inkorporation  $\geq 95\%$ ), demonstrierte der  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO-Komplex eine hohe Serumstabilität.<sup>[39,41,55]</sup>

## Einleitung

In mehreren präklinischen Studien wurde DFO (**4**) zur Radiomarkierung von Antikörpern genutzt. Abhängig von dem *in vivo*-Verhalten der eingesetzten Antikörper zeigte sich jedoch dabei häufig eine Akkumulation der Radioaktivität in den Knochen von 5 – 10 %ID.<sup>[56a,55,16,56b]</sup> Dies deutet auf eine nicht ausreichende kinetische Inertheit des [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-Komplexes hin, die zur Freisetzung des osteophilen [<sup>89</sup>Zr]Zr<sup>4+</sup> führt.<sup>[16]</sup> DFO (**4**) ist ein sechszähliger Chelator, der die Koordinationssphäre von [<sup>89</sup>Zr]Zr<sup>4+</sup> nicht vollständig sättigen kann. Die von HOLLAND *et al.* durchgeführten DFT-Rechnungen zeigten, dass die Vervollständigung der Koordinationssphäre von Zr<sup>4+</sup> durch zwei Wassermoleküle, resultierend in Zr[DFO(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, thermodynamisch bevorzugt ist (Abbildung 9).<sup>[55]</sup>



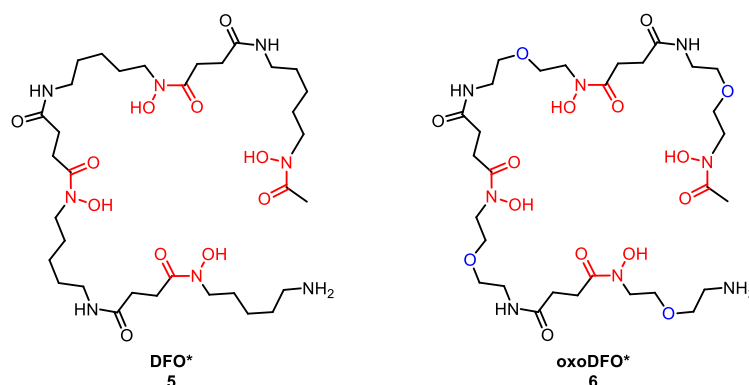
**Abbildung 9.** Komplexstruktur von [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO ([<sup>89</sup>Zr]Zr-4) und DFT-optimierte Struktur des achtfachkoordinierten Komplexes [[<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*cis*-(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Erstellt mit *Gaussian*<sup>®</sup> 09W<sup>[57]</sup> und *Gauss View* 5.0<sup>[58]</sup> mit den xyz-Koordinaten, die von HOLLAND *et al.* publiziert wurden.<sup>[55]</sup>

Die Annahme, dass der Hauptgrund der Labilität des [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-Komplexes in der unvollständigen Koordination von <sup>89</sup>Zr liegt, führte zu der Entwicklung einer Reihe an neuen achtzähligen <sup>89</sup>Zr-Chelatoren, sowie sechszähligen makrocyclischen Chelatoren.<sup>[53]</sup>

### 1.3.1.2. <sup>89</sup>Zr-Chelatoren basierend auf DFO

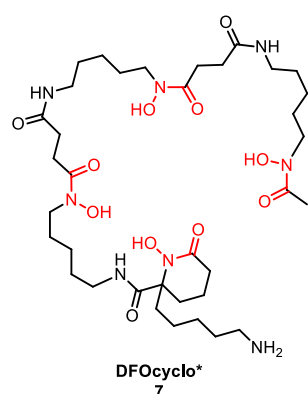
Ein Ansatz zur Entwicklung neuer kinetisch-inerter <sup>89</sup>Zr-Komplexe war die Erweiterung der DFO-Struktur **4** mit einer zusätzlichen Hydroxamatgruppe. PATRA *et al.* veröffentlichten 2014 das DFO-Analogon, DFO\* (**5**) (Abbildung 10). Die Struktur von DFO\* (**5**) wurde in einer DFT-Rechnung optimiert und konnte ausgehend von dem kommerziell erhältlichen DFO-Mesylat synthetisiert werden. Die Radiomarkierung von DFO\* (**5**) verläuft, wie die von DFO (**4**), effizient bei milden Reaktionstemperaturen und resultiert in einem 1:1-Zr-zu-Chelator-Verhältnis.<sup>[59]</sup> Der direkte Vergleich der Biokonjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-NCS-Trastuzumab und [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-NCS-Trastuzumab zeigte die deutlich höhere kinetische Inertheit von [<sup>89</sup>Zr]Zr-

DFO\* gegenüber [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO, welche auch unter Verwendung anderer Konjugationsstrategien bestätigt wurde.<sup>[60,61]</sup> DFO\* (5) besitzt, wie DFO (4), nur eine geringe Wasserlöslichkeit. Im Hinblick darauf wurde DFO\* (5) durch die Einführung von Sauerstoffatomen optimiert. Der direkte Vergleich in Transchelatierungs- und *in vivo*-Experimenten zeigte, dass sich oxoDFO\* (6) (Abbildung 10) gleichermaßen für die  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexierung eignet wie DFO\* (5).<sup>[62]</sup>



**Abbildung 10.**  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatoren DFO\* (5) und oxoDFO\* (6).

Einen weiteren vielversprechenden Chelator ist DFOcyclo\* (7) (Abbildung 11), bei dem ein cyclisches Hydroxamat zur Komplettierung der Koordinationssphäre genutzt wird. DFOcyclo\* (7) zeigte in den Challenge-Versuchen mit EDTA (2) eine ähnlich hohe Stabilität wie DFO\* (5). Das Biokonjugat, bei dem der Chelator über einen NCS-Gruppe in Trastuzumab eingeführt wurde, zeigte *in vivo* sogar eine signifikant geringere Anreicherung als DFO\* (5) in den Knochen.<sup>[63]</sup>



**Abbildung 11.**  $^{89}\text{Zr}$ -Chelator DFOcyclo\* (7).

Weitere vielversprechende Chelatoren für  $^{89}\text{Zr}$  basierend auf der Struktur von DFO (4), sind DFO-HOPO (8) und DFO2 (9) (Abbildung 12). DFO-HOPO (8) ist ein kommerziell erhältlicher Chelator, der ursprünglich als Komplexbildner zur Behandlung von  $\text{Pu}^{4+}$ -Intoxikationen entwickelt wurde,<sup>[64]</sup> und DFO2 (9) ist der neueste Chelator für  $^{89}\text{Zr}$ , bei dem

## Einleitung

zwei DFO-Einheiten über eine p-NO<sub>2</sub>-Ph-Einheit verbunden sind. Beide <sup>89</sup>Zr-Chelator-Komplexe zeigten in den Transchelatierungsexperimenten eine höhere kinetische Inertheit als [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO. Für beide Verbindungen steht die Derivatisierung zur Biokonjugation sowie die anschließende *in vivo*-Evaluierung eines <sup>89</sup>Zr-Chelator-mAb-Konjugates noch aus.<sup>[65]</sup>

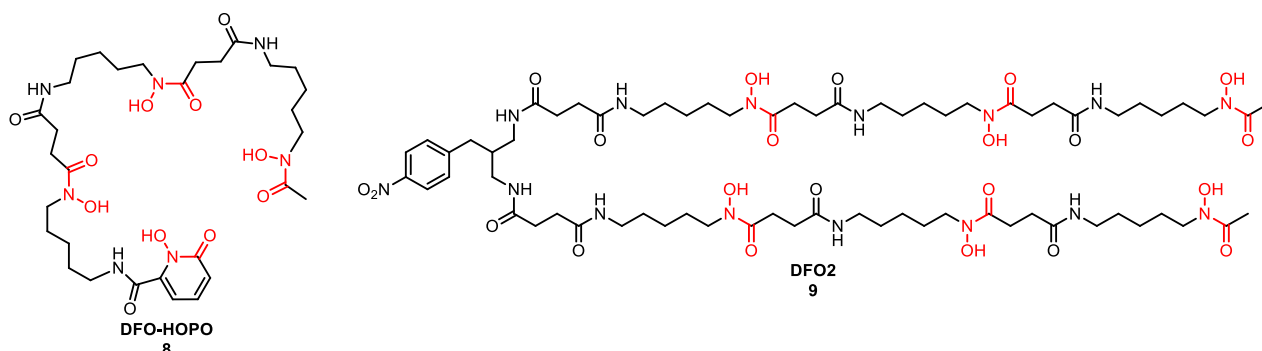


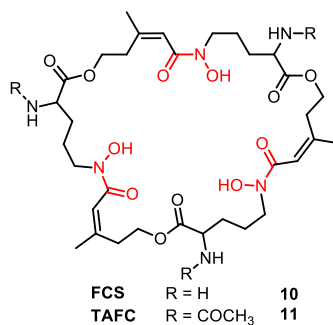
Abbildung 12. <sup>89</sup>Zr-Chelatoren DFO-HOPO (8) und DFO2 (9).

### 1.3.1.3. Makrocyclische Chelatoren

Die Komplexierung mit makrocyclischen Chelatoren führt im Allgemeinen zu einer höheren kinetischen Inertheit gegenüber Komplexen mit acyclischen Chelatoren. Grund dafür ist die rigide vororganisierte Struktur des Makrocyclus, die bei der Metallkoordination zu einem geringeren Entropieverlust als bei acyclischen Chelatoren führt (makrocyclischer Effekt). Jedoch sind für die Komplexierung bzw. Radiomarkierung mit makrocyclischen Chelatoren meist höhere Temperaturen und Reaktionszeiten notwendig.<sup>[49]</sup>

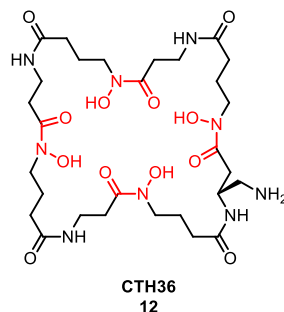
ZHAI *et al.* untersuchten das Siderophor Fusarinin C (FSC) (10) und das Analogon Triacylfusarinin C (TAFC) (11) (Abbildung 13) als Chelatoren für <sup>89</sup>Zr. FCS (10) ist ein makrocyclischer Chelator mit drei Hydroxamatgruppen zur Komplexierung des Radiometalls und drei primären Aminen, welche die Derivatisierung des Chelators mit den Liganden ermöglichen. In den Transchelatierungsexperimenten wiesen sowohl das Konjugat [<sup>89</sup>Zr]Zr-FCS-c(RGDfK) als auch das nicht-konjugierte [<sup>89</sup>Zr]Zr-TAFC eine höhere kinetische Inertheit als DFO auf. Auch *in vivo* wurde über einen Zeitraum von 4 h bzw. 6 h keine signifikante Knochenanreicherung beobachtet.<sup>[66]</sup> In einer weiteren Studie, in der FCS (10) über eine Maleinimid-Funktion in den Antikörper ZEGFR:2377 eingebracht wurde, war jedoch die Knochenanreicherung nach 24 h vergleichbar mit der von [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-ZEGFR:2377.<sup>[67]</sup>





**Abbildung 13.** Makrocyclische <sup>89</sup>Zr-Chelatoren FCS (**10**) und TAFC (**11**).

SEIBOLD *et al.* nutzten computerbasierte Methoden zur Entwicklung eines neuen cyclischen Chelators mit vier Hydroxamatgruppen. Aus den DFT-Rechnungen wurde geschlossen, dass die optimale Kavität zur Komplexierung von [<sup>89</sup>Zr]Zr<sup>4+</sup> durch 36 Atome gebildet wird. Folglich wurde der Chelator CTH36 (**12**) (Abbildung 14) entwickelt. Nach der Synthese von CTH36 (**12**) wurde der Chelator mit einer Tetrazinfunktion derivatisiert und in das Modellpeptid c(RGDfK) (**13**) eingeführt. CTH36-c(RGDfK) (**14**) konnte effizient radiomarkiert werden und der gebildete Komplex wies eine hohe kinetische Inertheit gegenüber EDTA (**2**) im Vergleich zu DFO (**4**) auf. Die *in vivo*-Evaluierung des Komplexes steht jedoch noch aus.<sup>[68]</sup>



**Abbildung 14.** Makrocyclischer <sup>89</sup>Zr-Chelator CTH36 (**12**).

Neben auf Hydroxamatgruppen basierenden Makrocyclen wurden auch die etablierten Chelatoren DOTA (**1**) und 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA) (**15**), die insbesondere bei der Komplexierung von <sup>68</sup>Ga eingesetzt werden, als potenzielle Chelatoren für <sup>89</sup>Zr identifiziert. PANDYA *et al.* führten eine vergleichende Untersuchung verschiedener polyazamakrocyclischer Chelatoren (Abbildung 15) durch und konnte hierbei in Transchelationsexperimenten die hohe kinetische Inertheit von [<sup>89</sup>Zr]Zr-DOTA, [<sup>89</sup>Zr]Zr-NOTA und [<sup>89</sup>Zr]Zr-PCTA gegenüber [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO zeigen. Ein Nachteil von DOTA (**1**) war die Notwendigkeit des Einsatzes von hohen Temperaturen (> 90 °C) sowie die Verwendung von [<sup>89</sup>Zr]Zr-Oxalat anstelle von [<sup>89</sup>Zr]ZrCl<sub>4</sub> bei der Radiomarkierung. NOTA (**15**) und 3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien-3,6,9-triessigsäure (PCTA) (**16**)

## Einleitung

konnten hingegen bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C mit [<sup>89</sup>Zr]ZrCl<sub>4</sub> markiert werden.<sup>[69,70]</sup>

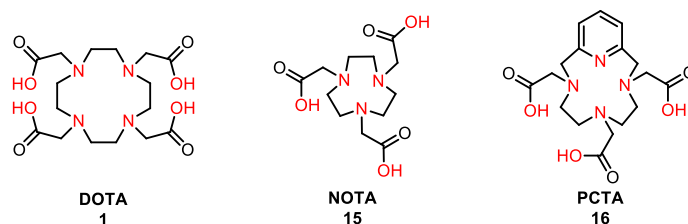


Abbildung 15. Polyazamakrozyliche <sup>89</sup>Zr-Chelatoren DOTA (1), NOTA (15) und PCTA (16).

### 1.3.1.4. <sup>89</sup>Zr-Chelatoren mit Hydroxypyridinonen und Terephthalamidgruppen

DERI *et al.* untersuchten 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) (17) (Abbildung 16), das ursprünglich zur Komplexierung von Pu<sup>4+</sup> entwickelt wurde<sup>[71]</sup>, als potenziellen Chelator für <sup>89</sup>Zr. Dieser komplexierte <sup>89</sup>Zr über vier 1,2-HOPOs bei RT innerhalb einer Stunde quantitativ. In den Transchelatierungsversuchen gegenüber EDTA (2) und biologisch relevanten Metallen blieb [<sup>89</sup>Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO) über sieben Tage nahezu stabil. Weiterhin wurde von DERI *et al.* ein bifunktionelles Derivat des Chelators 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-SCN zur Konjugation mit einem mAb hergestellt. Das resultierende radiomarkierte [<sup>89</sup>Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Trastuzumab zeigte neben einer hohen Serumstabilität eine geringe Knochenanreicherung gegenüber [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-Trastuzumab. Ein Nachteil der Verwendung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-SCN ist die geringe Ausbeute bei der Synthese von nur 1.4 % über neun Stufen.<sup>[72-74]</sup>

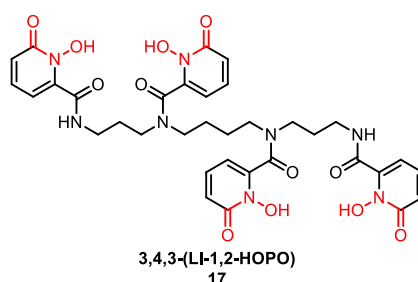


Abbildung 16. <sup>89</sup>Zr-Chelator 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) (17).

Ein weiterer HOPO-basierter Chelator ist der achtzählige Chelator Tris(hydroxypyridinon) (THPN) (18), der für die Komplexierung von [<sup>89</sup>Zr]Zr<sup>4+</sup> vier 3,4-HOPO-Gruppen enthält (Abbildung 17). Nach der effektiven Radiomarkierung wurde der Komplex *in vitro* und *in vivo*, sowie in EDTA-Challenge-Experimenten untersucht. Hier zeigte der Komplex ähnliche Ergebnisse wie [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO, lediglich die kinetische Inertheit bei niedrigem pH-Wert (pH 5)

war deutlich besser. Für eine vollständige Charakterisierung sind die Synthese eines bifunktionellen Chelators und das Einbringen in den Antikörper notwendig.<sup>[75]</sup>

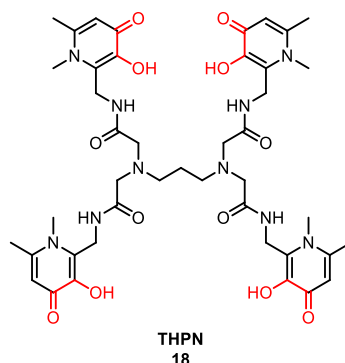


Abbildung 17.  $^{89}\text{Zr}$ -Chelator THPN (18).

Zwei weitere Versuche [ $^{89}\text{Zr}$ ] $\text{Zr}^{4+}$  mit hoher kinetischer Inertheit zu binden sind die Chelatoren TAM-1 (19), welches auf vier Terephthalamidgruppen (TAM) basiert und BPDET-LysH22-2,3-HOPO (20), das zur  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexierung vier 3,2-HOPO-Gruppen besitzt (Abbildung 18). Auch wenn die Radiomarkierung beider Chelatoren mit hoher Effektivität erfolgte, zeigten die entsprechenden [ $^{89}\text{Zr}$ ] $\text{Zr}$ -Komplexe *in vivo* keine verbesserte kinetische Inertheit bzw. geringere Knochenanreicherung im Vergleich mit [ $^{89}\text{Zr}$ ] $\text{Zr}$ -DFO.<sup>[76]</sup>

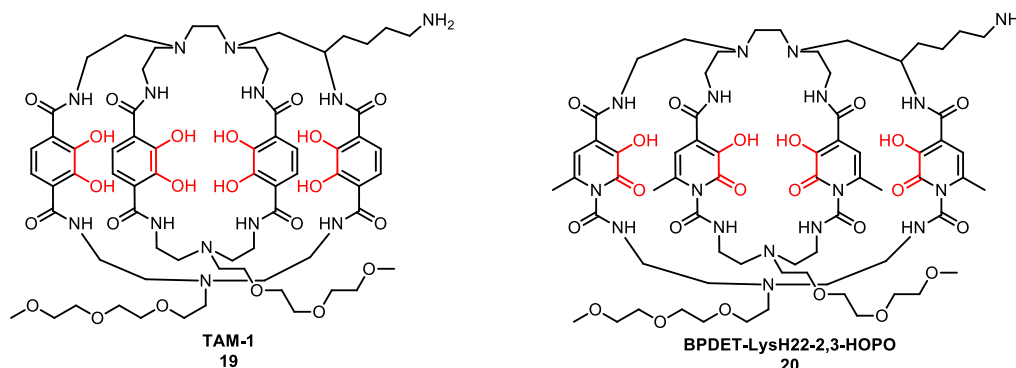


Abbildung 18.  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatoren TAM-1 (19) und BPDET-LysH22-2,3-HOPO (20).

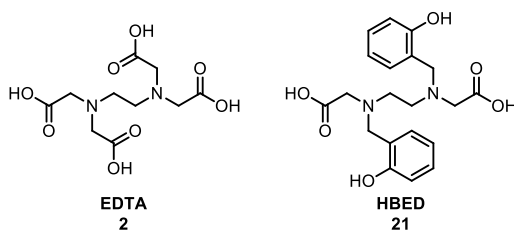
### 1.3.2. Chelatoren für Gallium-68

$^{68}\text{Ga}$  ist auf Grund seiner leichten Verfügbarkeit über einen  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator und der Halbwertszeit von 67.6 min eines der klinisch am häufigsten genutzten Nuklide zur Radiomarkierung von Peptiden. Das Metall steht im Periodensystem in der vierten Periode und 13ten Gruppe und kommt fast ausschließlich in der Oxidationsstufe +3 vor.  $\text{Ga}^{3+}$  ist eine harte Säure, die mit Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatomen vier-, fünf- oder sechsfach-koordinierte Komplexe bildet.<sup>[9,11]</sup> Der Ionenradius von  $\text{Ga}^{3+}$  ist mit 62 pm wie auch die

## Einleitung

Koordinationschemie ähnlich zu der von  $\text{Fe}^{3+}$  (Ionenradius: 65 pm). Dies führt bei einer unzureichenden kinetischen Inertheit des  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Komplexes zur Bindung von  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$  an Blutproteine wie Transferrin und somit zu einer erhöhten Hintergrundaktivität verbunden mit einem herabgesetzten Signal-zu-Rauschen-Verhältnis, was die Darstellung der Zielstrukturen erheblich erschwert.<sup>[77,78]</sup> Bis heute wurde eine Reihe an verschiedenen Chelatoren, die  $^{68}\text{Ga}$  mit hoher kinetischer Inertheit binden, entwickelt. Hierbei sind die am häufigsten verwendeten funktionellen Gruppen für die Komplexbildung Amine, Carboxylate, Hydroxamate und Phenolate.<sup>[9]</sup>

Der erste klinisch eingesetzte Chelator war EDTA (**2**), welches zur Elution der ersten Generation an  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren genutzt wurde. Der *in situ*-erzeugte Komplex wurde insbesondere für die bildgebende Darstellung der Durchblutung im Gehirn genutzt.<sup>[79]</sup> Ein weiterer acyclischer Chelator basierend auf der Struktur von EDTA (**2**) ist *N,N'*-Bis(2-hydroxybenzyl)ethyldiamin-*N,N'*-diessigsäure (HBED) (**21**) (Abbildung 19). HBED (**21**) enthält anstelle von vier Carboxylatgruppen nur zwei Carboxylate und zwei Phenolate zur Komplexbildung. HBED (**21**) konnte effizient bei RT markiert werden und der entstandene Komplex wies in den Studien eine hohe kinetische Inertheit *in vivo* auf. Folglich wurden mehrere bifunktionelle Derivate darunter HBED-CC, HBED-AA und HBED-CI zur Konjugation mit einem gewünschten Peptid entwickelt.  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -HBED-CC-PSMA wird klinisch für die Diagnose von Prostatakrebs eingesetzt.<sup>[80,81]</sup>



**Abbildung 19.** Acyclische  $^{68}\text{Ga}$ -Chelatoren EDTA (**2**) und HBED (**21**).

Einer der am häufigsten verwendeten Chelatoren für verschiedenste Isotope, darunter  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  und  $^{90}\text{Y}$  ist DOTA (**1**). Auch für  $^{68}\text{Ga}$  stellt DOTA (**1**) einen wichtigen Chelator dar. Die Radiomarkierung erfolgt bei 95 °C innerhalb weniger Minuten. DOTA (**1**) kann ohne weitere Funktionalisierung in den Liganden eingeführt werden und koordiniert trotz der Umsetzung einer Carboxylatgruppe  $^{68}\text{Ga}$  vollständig.<sup>[80]</sup> In der Klinik verwendete auf DOTA-basierende  $^{68}\text{Ga}$ -markierte Radiopharmaka sind  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-TOC und  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-TATE.<sup>[11]</sup> Ein weiterer häufig verwendeter Chelator ist NOTA (**15**). Dieser besitzt mit der 1,4,7-Triazacyclononan-Ringstruktur eine geringere Kavitätsgröße als DOTA (**1**) und eignet sich damit besser für die Komplexbildung von  $^{68}\text{Ga}$ .  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NOTA besitzt im Vergleich zu

[ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA eine höhere Stabilitätskonstante. Zudem lässt sich NOTA (**15**) bereits bei RT radiomarkieren.<sup>[82]</sup> Auch die um jeweils eine Carboxylatgruppe erweiterten Strukturen 1,4,7,10-Tetra-azacyclododecan-1-glutarsäure-4,7,10-tetraessigsäure (DOTA-GA) (**22**) und 1,4,7-Triaza-cyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure (NODA-GA) (**23**) werden für die Komplexierung von  $^{68}\text{Ga}$  eingesetzt. Insbesondere die Verwendung von NODA-GA (**23**) anstelle von NOTA (**15**) führt zu einer deutlichen Erhöhung der Stabilität.<sup>[80]</sup> Die Strukturen von DOTA (**1**), NOTA (**15**), DOTA-GA (**22**) und NODA-GA (**23**) sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 20)

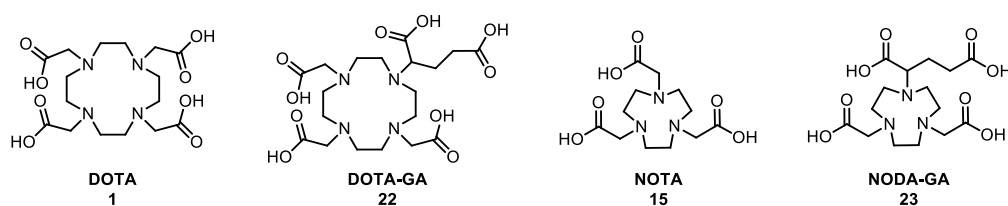


Abbildung 20. Cyclische  $^{68}\text{Ga}$ -Chelatoren DOTA (**1**), DOTA-GA (**22**), NOTA (**15**) und NODA-GA (**23**).



## 2. Zielsetzung

### 2.1. Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für $^{89}\text{Zr}$ im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET

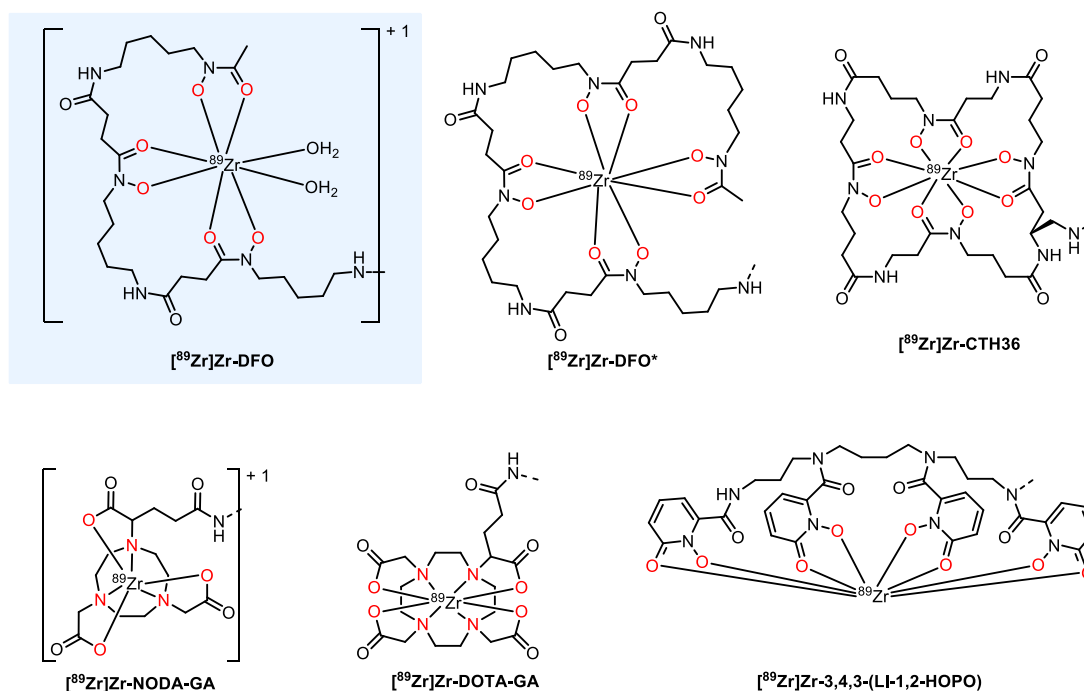
$^{89}\text{Zr}[\text{Zr}^{4+}]$  ist aufgrund seiner radiochemischen Eigenschaften ein geeignetes Radionuklid in der Immuno-PET, die durch die Verwendung von Antikörpern ein hochspezifisches diagnostisches Bildgebungsverfahren darstellt. Die Einführung von  $^{89}\text{Zr}$  in den Radiotracer erfolgt klinisch über den kommerziell erhältlichen Chelator DFO (4). Allerdings weisen die gebildeten  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-Komplexe *in vivo* nur eine geringe kinetische Inertheit auf, was mit der Freisetzung von  $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}^{4+}]$  und somit der Anreicherung der Radioaktivität in Knochen und Gelenken einhergeht. Neben einer geringeren Bildqualität ist dies außerdem im Hinblick auf die erhöhte Dosisbelastung des hämatopoetischen Knochenmarks problematisch. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren eine Reihe neuer Chelatbildner basierend auf der vollständigen Sättigung der Koordinationssphäre von  $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}^{4+}]$  und der Verwendung verschiedener sauerstoffreicher funktioneller Gruppen entwickelt.<sup>[16,22]</sup> Mehrere Chelatoren konnten im Vergleich zu DFO (4) eine verbesserte Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}[\text{Zr}^{4+}]$  sowohl in EDTA-Challenge-Experimenten als auch in *in vivo*-Experimenten aufweisen.<sup>[59,60,68,73,69,70]</sup> Gleichzeitig existieren jedoch nur wenige Vergleichsstudien der entwickelten Chelatoren, sodass die Schlüsselfrage, welcher der Chelatoren am besten für den Einsatz in der humanen Immuno-PET geeignet ist, unbeantwortet bleibt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die vergleichende Untersuchung von sechs potenziellen  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatoren DFO (4), DFO\* (5), CTH36 (12), 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) (17), DOTA (1) und NOTA (15) im Hinblick auf ihre radiochemischen Eigenschaften, die kinetische Inertheit der gebildeten Komplexe sowie deren *in vivo*-Pharmakokinetik. DFO (4), der am häufigsten verwendete Chelator für  $^{89}\text{Zr}$ , diente in der Arbeit als Referenzverbindung. Die  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexe sind in Abbildung 21 dargestellt.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, war zunächst die Synthese von Chelator-Derivaten für eine einheitliche Einbringung in das jeweilige Biomolekül notwendig. Die Biokonjugationsmethode spielt eine tragende Rolle in der Entwicklung von Antikörperkonjugaten, da nicht nur die Methode selbst, sondern auch die Anzahl an Chelatoren pro Antikörpern einen Einfluss auf die Komplexierungseigenschaften und die *in vivo*-Pharmakokinetik haben können.<sup>[83–85,26]</sup> Als Konjugationsmethode wurde die iEDDA-

## Zielsetzung

Reaktion von Tetrazinen mit TCOs gewählt, die neben einer effizienten Modifizierung von Biomolekülen auch die Quantifizierung der Derivatisierungsstellen des mAbs ermöglicht.



**Abbildung 21.** Darstellung der zu vergleichenden  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexe. Die Referenz  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$  sowie die vielversprechenden Chelator-Komplexe  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}^*$ ,  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-CTH36}$ ,  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-NODA-GA}$ ,  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DOTA-GA}$  und  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)}$ .

Die Derivatisierung der Chelatoren sollte ohne Einfluss auf die Koordinationssphäre erfolgen. Aus diesem Grund wurden anstelle der Verwendung von DOTA (1) und NOTA (15) die *backbone*-funktionalisierten Analoga DOTA-GA (22) und NODA-GA (23) verwendet. Während die Tetrazinderivate DFO- (24), CTH36- (25) und DOTA-GA-Tetrazin (26) literaturbekannt sind,<sup>[86,68,48]</sup> mussten geeignete Syntheserouten zur Herstellung von DFO\*-Tetrazin (27) und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin (28) entwickelt werden. NODA-GA-Tetrazin (29) war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Um die Analyse der gebildeten  $^{89}\text{Zr}$ -Chelator-Komplexe zu erleichtern, sollten die Tetrazin-Derivate über die iEDDA-Reaktion zunächst in ein Modellbiomolekül eingebracht werden. Nach der erfolgreichen Radiomarkierung sollte schließlich die relative kinetische Inertheit der  $^{89}\text{Zr}$ -Chelator-Peptidkonjugate in EDTA-Challenge-Experimenten bestimmt werden und die vielversprechendsten Chelatoren *in vivo* in einem tumortragendem Mausmodell evaluiert werden. Um eine ausreichend lange Blutzirkulation zu erreichen, wurden die Chelatoren hierfür in einen geeigneten intakten IgG<sub>1</sub>-Antikörper eingeführt. Der Modellantikörper Cetuximab wurde im ersten Schritt mit TCO modifiziert. Nach der Biokonjugation des TCO-mAbs 30 mit den Chelator-Tetrazinen 24 – 29 sollten die erhaltenen Chelator-Biokonjugate



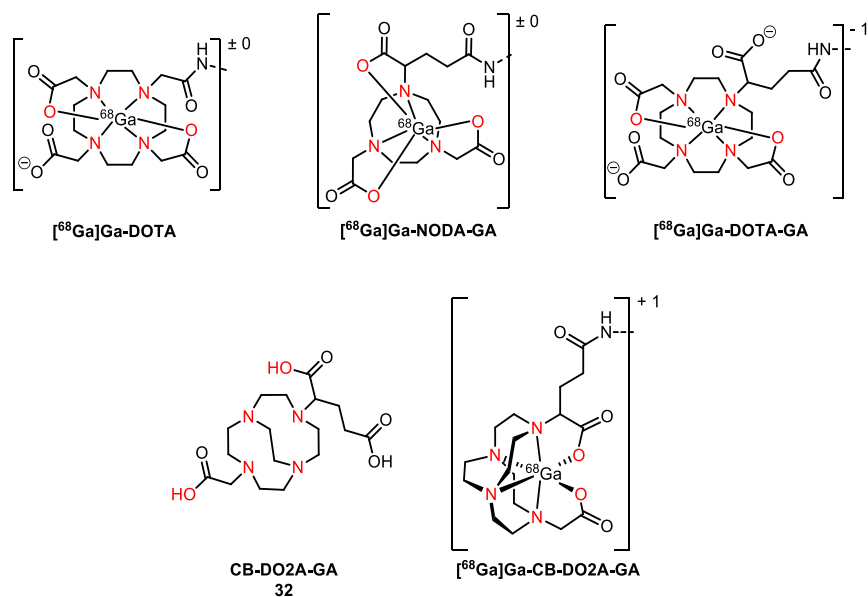
radiomarkiert werden. Bei ausreichender Immunoreaktivität sollte schließlich die Untersuchung der kinetischen Inertheit, Pharmakokinetik und Biodistribution *in vivo* mittels Kleintier-PET/CT-Bildgebungsstudien sowie *ex vivo* in HT-29-tumortragenden Mäusen bestimmt werden.

## 2.2. Synthese eines neuen bifunktionellen *cross-bridged*-Chelators und Vergleich der $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren

In der klinischen Diagnostik von Krebs besitzt  $^{68}\text{Ga}$ , aufgrund seiner hohen Verfügbarkeit und der großen Anzahl an geeigneten BFCs zur stabilen Einführung, eine wachsende Rolle in der Radiomarkierung von Peptiden. Die verschiedenen Chelatoren unterscheiden sich in ihrer Ladung und Zahl an Carboxylaten, die nicht an der Komplexbildung von  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$  beteiligt sind.<sup>[80]</sup> In mehreren vergleichenden Studien wurde der Einfluss dieser Parameter auf die *in vitro*- und *in vivo*-Pharmakokinetik unter Verwendung verschiedener Chelatoren für die  $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierung von Peptiden untersucht. In den Studien unterschieden sich die Ergebnisse für den am besten geeigneten Chelator in Abhängigkeit des jeweiligen Peptids und der daraus resultierenden Zielstruktur. Die Verwendung des negativ geladenen  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-GA}$  anstelle der neutralen Komplexe  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}$  und  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODA-GA}$  führt normalerweise zu einer Senkung der unspezifischen Anreicherung in Leber und Milz, während  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}$  und  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODA-GA}$  sich insbesondere im Hinblick auf die Tumoranreicherung vorteilhaft auswirken.<sup>[87-92]</sup> Auch positiv geladene Komplexe wie  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA}$  demonstrierten in manchen Studien das höchste Tumor-zu-Hintergrundverhältnis.<sup>[93,94]</sup>

Das *cross-bridged* (CB)-DO2A (**31**) stellt eine Alternative zur Bildung positiv geladener Komplexe dar. Es besitzt eine rigide verbrückte Geometrie, die die vollständige Umhüllung des Radionuklids und somit die Bildung von positiv geladenen Komplexen mit hoher kinetischer Inertheit ermöglicht.<sup>[95,36]</sup> Bisher existiert jedoch noch kein bifunktionelles CB-DO2A-Derivat für die Konjugation von CB-DO2A (**31**) mit Biomolekülen. Das Ziel dieses Nebenprojektes war daher die Synthese eines *backbone*-modifizierten CB-DO2A-GAs (**32**), sowie dessen Vergleich mit den bereits etablierten Chelatoren DOTA (**1**), DOTA-GA (**22**) und NODA-GA (**23**). Die resultierenden  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexe sind nachfolgend abgebildet (Abbildung 22).

## Zielsetzung



**Abbildung 22.** Darstellung der etablierten  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexe  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}$ ,  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODA-GA}$ ,  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-GA}$  und der Zielstruktur  $\text{CB-DO2A-GA}$  sowie des resultierenden  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexes.

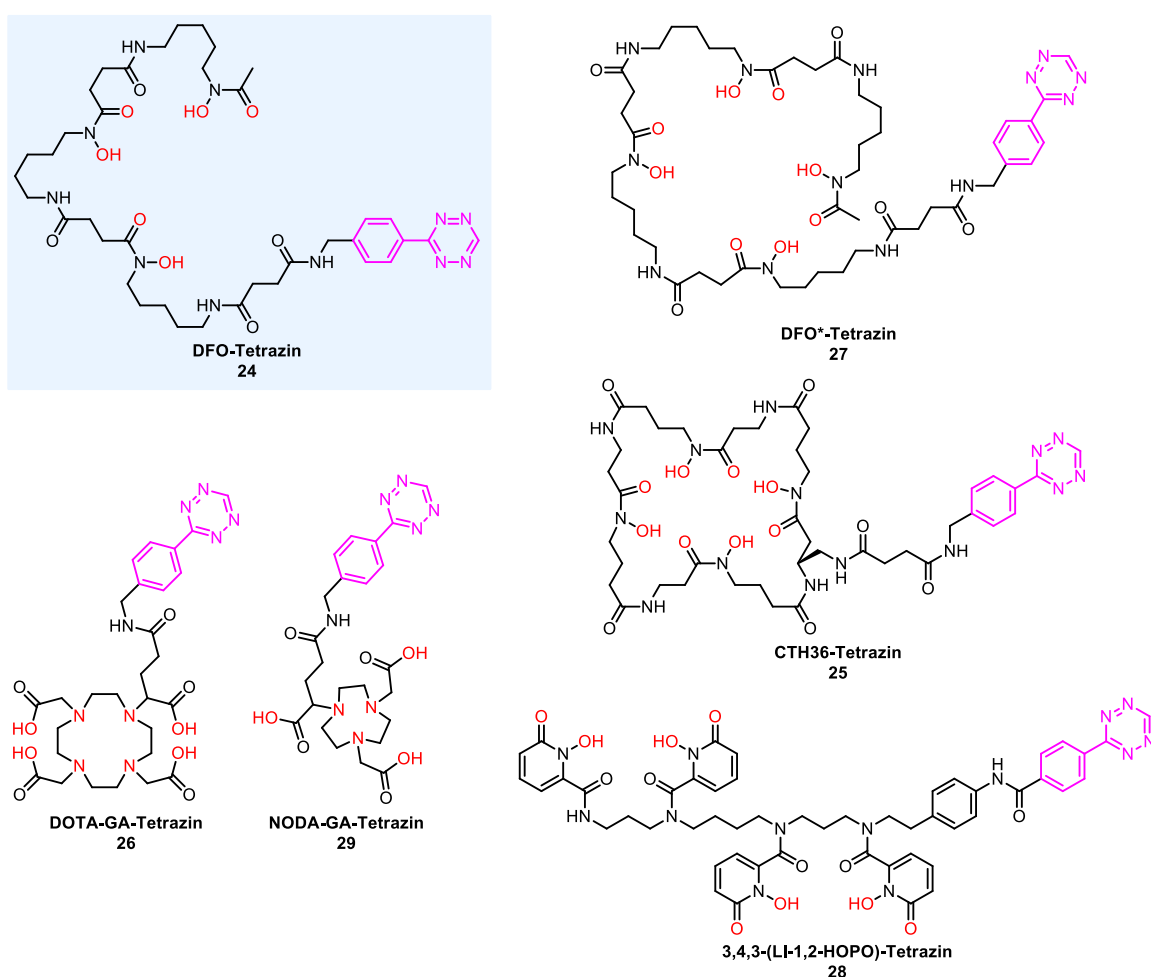
Während die geschützten Chelatoren  $\text{DOTA}(t\text{Bu})_3$ ,  $\text{DOTA-GA}(t\text{Bu})_4$  und  $\text{NODA-GA}(t\text{Bu})_3$  kommerziell erhältlich waren, sollte  $\text{CB-DO2A-GA}(t\text{Bu})_2$  (**34**) ausgehend von  $\text{CB-Cyclen}$  (**35**) hergestellt werden. Viele Arbeiten konzentrieren sich auf die nicht-konjugierten Chelatoren, jedoch sind die daraus erhaltenen Daten unzureichend, da die Funktionalisierung die Komplexstruktur als auch die Ladung des resultierenden Komplexes stark beeinflusst. Aus diesem Grund wurden die Chelatoren zunächst mit dem Peptid TATE umgesetzt, um im Anschluss die Radiomarkierungseigenschaften der Chelator-Peptid-Konjugate zu untersuchen. Hierfür erfolgte sowohl die Evaluierung der optimalen Radiomarkierungsbedingungen als auch die vergleichende Untersuchung der kinetischen Inertheit und Serumstabilität der gebildeten Komplexe. Des Weiteren wurde die Lipophilie der gebildeten Komplexe, die einen großen Einfluss auf die Bioverteilung hat, bestimmt.

### 3. Kapitel 1: Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für $^{89}\text{Zr}$ im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET

Teilergebnisse des vorliegenden Kapitels wurden vorab in *Cancers*<sup>[96]</sup> und *Pharmaceutics*<sup>[97]</sup> publiziert.

#### 3.1. Synthese der Tetrazin-Derivate für die Konjugation

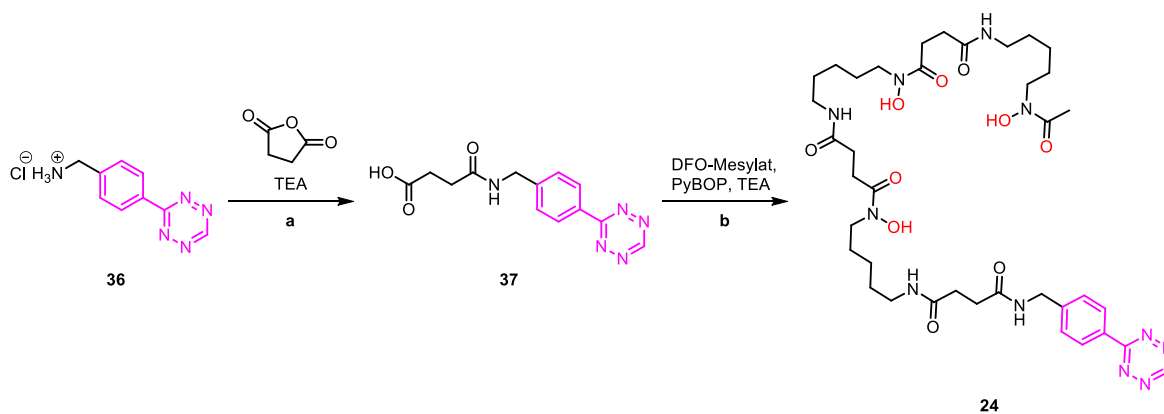
Im folgenden Kapitel wird die Synthese der jeweiligen Tetrazin-modifizierten Chelatoren DFO- (**24**), DFO\*- (**27**), 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)- (**28**) und DOTA-GA-Tetrazin (**26**) vorgestellt. NODA-GA-Tetrazin (**29**) und CTH36-Tetrazin (**25**) waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden (Abbildung 23).<sup>[68]</sup>



**Abbildung 23.** Darstellung der Chelator-Tetrazin-Derivate DFO- (**24**), DFO\*- (**27**), CTH36- (**25**), DOTA-GA- (**26**), NODA-GA- (**29**) und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin (**28**).

### 3.1.1. DFO-Tetrazin

DFO-Tetrazin (**24**) wurde in Anlehnung an die Literatur unter Änderung der Reaktionsreihenfolge hergestellt (Schema 1).<sup>[41,48,98]</sup> Hierfür wurde zunächst (4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl)methylammoniumchlorid (H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl) (**36**) mit Bernsteinsäureanhydrid unter basischen Bedingungen zu der Carbonsäure **37** umgesetzt. Nachdem **37** mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt wurde, erfolgte die Kupplungsreaktion mit DFO-Mesylat unter Verwendung von Benzotriazol-1-yloxytrispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) als Kupplungsreagenz. Im Vergleich zu der Literatur, in der erst DFO-Mesylat in umgekehrter Reihenfolge mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt wurde<sup>[48,98]</sup> und anschließend die Kupplung mit H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**) erfolgte, konnten so höhere Ausbeuten erzielt werden. Des Weiteren führte die initiale Aufreinigung mittels präparativer HPLC aufgrund der geringen Löslichkeit in Wasser und Acetonitril (MeCN) von DFO-Tetrazin (**24**) zu einem deutlichen Verlust an Substanz. Anstelle dessen konnte **24** durch mehrfaches Ausfällen aus DMSO unter Zugabe eines 1:1-Gemisches von MeCN und H<sub>2</sub>O aufgereinigt und somit in einer Gesamtausbeute von 56 % (Lit.: 44 %<sup>[98,48]</sup>) über zwei Stufen erhalten werden.



**Schema 1.** Darstellung der Syntheseroute von DFO-Tetrazin (**24**). Reaktionsbedingungen: (a) 1.2 Äq. Bernsteinsäureanhydrid, 1.0 Äq. Triethylamin in DMF, RT, 4 h, Ausbeute: 86 %; (b) 1.1 Äq. DFO-Mesylat, 2.0 Äq. PyBOP, 3.0 Äq. Triethylamin in DMSO, RT, 3 h, Ausbeute: 65 %.

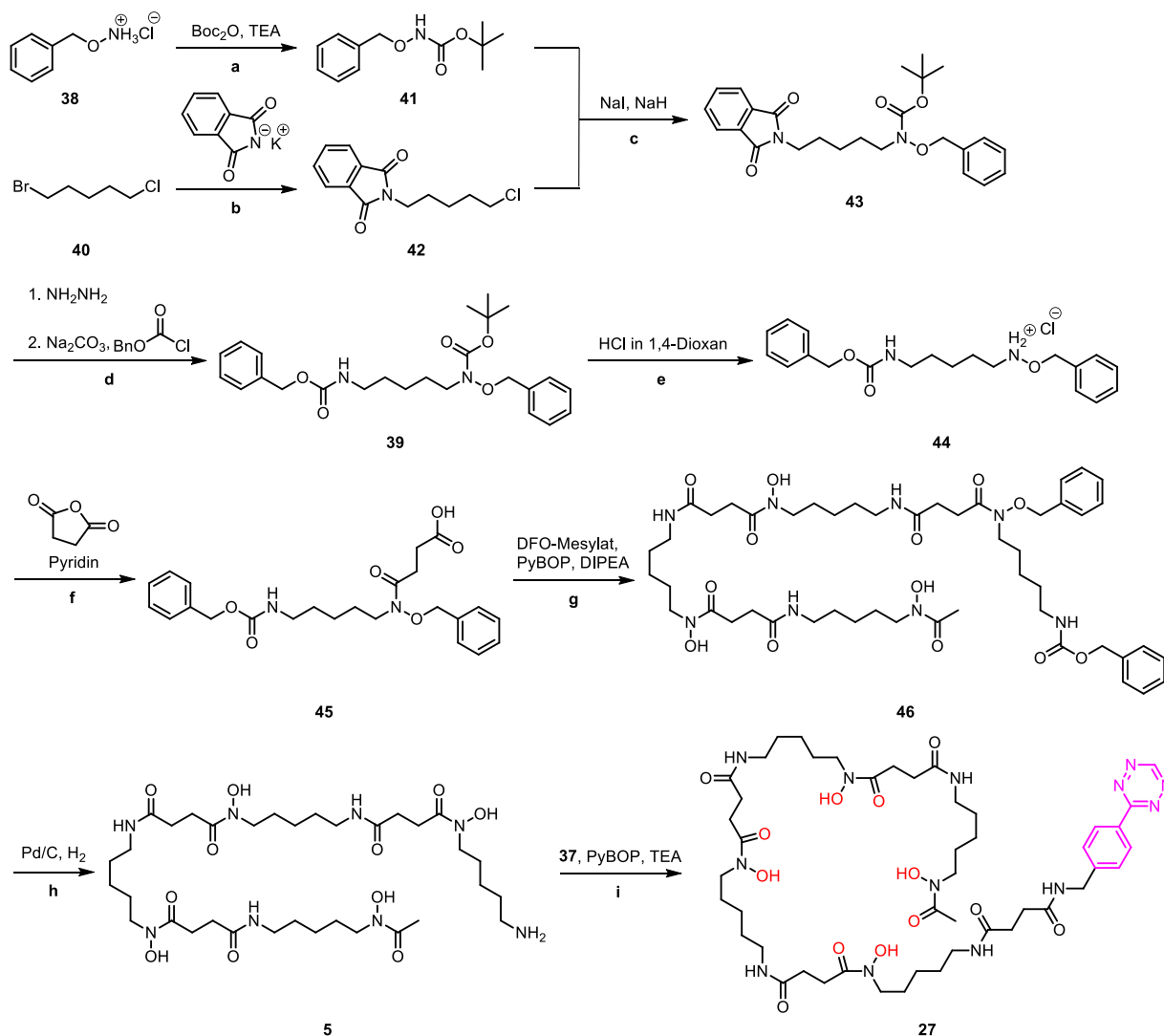
### 3.1.2. DFO\*-Tetrazin

DFO\* wurde basierend auf einer publizierten Syntheseroute mit geringfügigen Änderungen hergestellt (Schema 2).<sup>[99,59]</sup> Zunächst wurde *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid (**38**) unter Verwendung von Di-*tert*-Butyldicarbonat (Boc<sub>2</sub>O) *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschützt.

Zur Herstellung von **39** wurde die Gabriel-Synthese verwendet.<sup>[100]</sup> Hierfür wurde im ersten Schritt 1-Brom-5-chlorpentan (**40**) mit Kaliumphthalimid umgesetzt. Die Nucleophilie der Halogene nimmt in der Reihenfolge  $F^- > Cl^- > Br^- > I^-$  ab, sodass im ersten Schritt, bei der Umsetzung mit 1.0 Äq. Kaliumphthalimid, nur  $Br^-$  durch Kaliumphthalimid substituiert wurde. In einem Zwischenschritt erfolgte schließlich die Austauschreaktion des Chlors durch *t*Bu-*N*-(benzyloxy)carbamat (**41**). Hierbei wurden Natriumhydrid zur Deprotonierung des Amins und Natriumiodid in katalytischen Mengen zur *in situ*-Erzeugung des Alkyljodids von **42**, das eine höhere Reaktivität als das Alkylbromid besitzt, eingesetzt. Schließlich folgte der zweite Schritt der Gabriel-Synthese, in dem durch die Zugabe von Hydrazinhydrat selektiv ein primäres Amin aus dem Phthalimid **43** hergestellt wurde. Das Amin wurde direkt im Anschluss mit Benzylchloroformat umgesetzt, um das Benzyloxycarbonyl (Cbz)-geschützte Amin **39** zu erhalten. Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von **39** mittels einer 4 M HCl in 1,4-Dioxan anstelle von Trifluoressigsäure (TFA)<sup>[99]</sup>, wurde das resultierende Amin **44** mit Bernsteinsäureanhydrid zu **45** umgesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Kupplung von DFO-Mesylat mit **45** in Dimethylformamid (DMF). Die Verwendung von PyBOP anstelle von *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HATU) als Kupplungsreagenz führte zu einer verbesserten Ausbeute von 67 % (Lit.: 34 %<sup>[59]</sup>). Abschließend wurden die Benzyl (Bn)- und Cbz-Schutzgruppe von **46** durch Hydrierung unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle (Pd/C) mit Wasserstoff entfernt und so DFO\* (**5**) erhalten.

Das Tetrazin-Derivat **27** wurde im Anschluss durch die Kupplung von 4-((4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-4-oxobutansäure (**37**) mit DFO\* (**5**) unter Verwendung von PyBOP und Triethylamin in Dimethylsulfoxid (DMSO) erhalten. Die Aufreinigung des Produkts **27** mittels semipräparativer HPLC führte, aufgrund der geringen Löslichkeit in Acetonitril und Wasser, zu einem erheblichen Ausbeuteverlust, sodass lediglich eine moderate Ausbeute von 19 % erhalten wurde.

## Ergebnisse und Diskussion



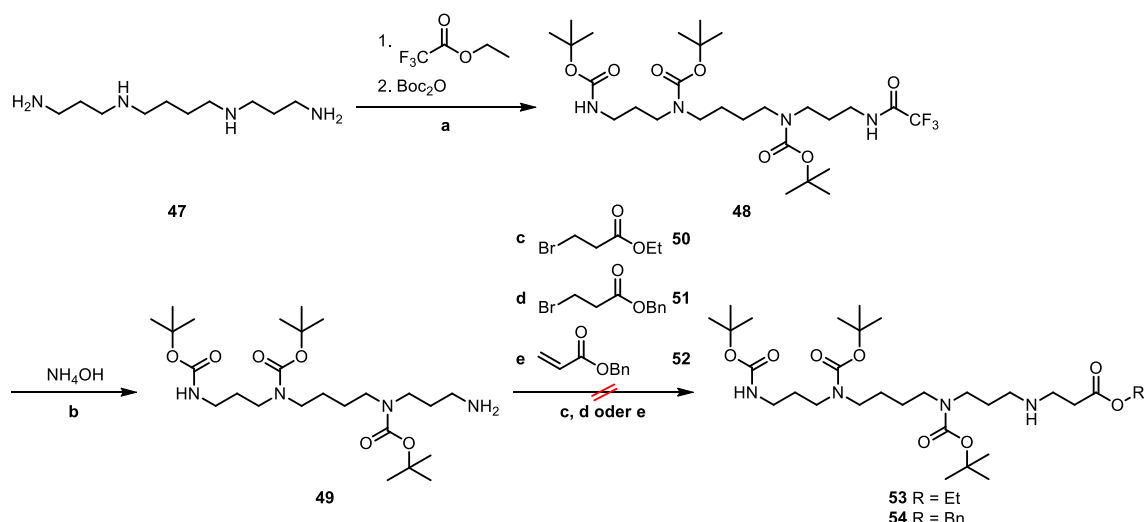
**Schema 2.** Darstellung der Syntheseroute von DFO\*-Tetrazin (**27**). Reaktionsbedingungen: **(a)** 1.0 Äq. Triethylamin, 1.0 Äq. Boc<sub>2</sub>O in THF, RT, 2.5 h, Ausbeute: 97 %; **(b)** 1.0 Äq. Kaliumphthalimid in DMF, RT, 20 h, Ausbeute: 90 %; **(c)** 0.04 Äq. Natriumiodid, 1.35 Äq. Natriumhydrid in DMF, 85 °C, 19 h, Ausbeute: 95 %; **(d)** 4.79 Äq. Hydrazinhydrat, 1.20 Äq. Reflux, 3 h, dann 1.20 Äq. Natriumcarbonat, 1.23 Äq. Benzylchloroformat, RT, 24 h, Ausbeute: 62%; **(e)** 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan, RT, 4 h, Ausbeute: 79 %; **(f)** 1.50 Äq. Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin, erst 100 °C, 2 h, dann RT, 12 h, Ausbeute: 79 %; **(g)** 1.0 Äq. DFO-Mesylat, 1.46 Äq. PyBOP, 3.0 Äq. DIPEA in DMF, RT, 30 h, Ausbeute: 67 %; **(h)** H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C in Methanol, Ausbeute: 70 %; **(i)** 1.0 Äq. **37**, 2.0 Äq. PyBOP, 3.0 Äq. Triethylamin in DMSO, RT, 3 h, Ausbeute: 19 %.

### 3.1.3. Synthese eines 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazinderivats

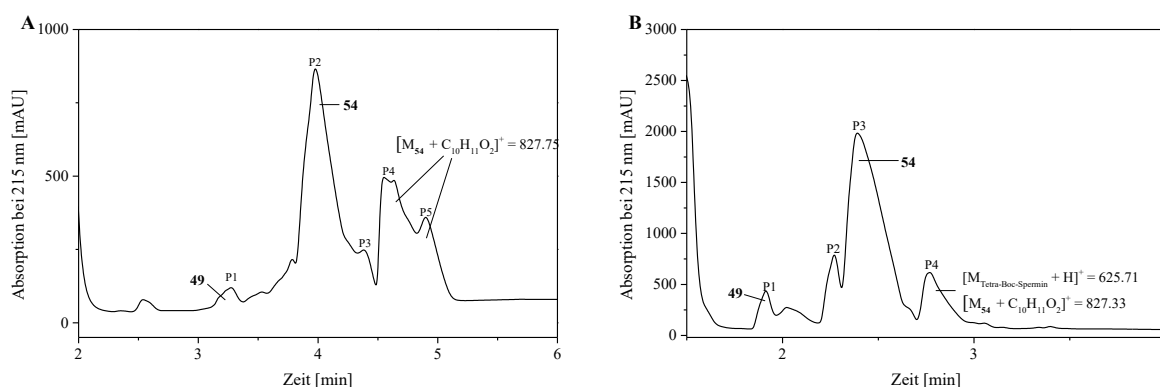
Während die Synthesen der Tetrazin-Derivate **24** und **27** ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden konnten und die Reaktionsbedingungen lediglich zur Erhöhung der Ausbeuten optimiert wurden, war die Entwicklung einer erfolgreichen Syntheseroute zur Herstellung eines 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazinderivats mit erheblichen Herausforderungen verbunden.

Zunächst wurde ausgehend von DERI *et al.* eine Syntheseroute 1 entwickelt (Schema 3).<sup>[73]</sup> Im ersten Schritt wurde versucht, selektiv drei Boc-Schutzgruppen einzuführen. Hierfür wurde zunächst eine primäre Aminogruppe des Spermins (**47**) mit einer Trifluoracetylgruppe geschützt. Um die Reaktion mehrerer Aminogruppen zu verhindern, wurde nur 1 Äq. Ethyltrifluoracetat bei -78 °C zugegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die Einbringung der Boc-Schutzgruppen unter Verwendung von 6 Äq. Boc<sub>2</sub>O bei 0 °C. Im ersten Reaktionsschritt wurden nicht alle Aminofunktionen umgesetzt, sodass neben dem gewünschten dreifach Boc-geschütztem Spermin mit einer Trifluoracetylgruppe an einem Amin **48** auch das vierfach-geschützte Spermin entstand. Das Nebenprodukt konnte nicht mittels Säulenchromatographie vollständig entfernt werden. In der nächsten Stufe wurde daher das Gemisch (54 % Tetra-Boc-Spermin) verwendet. Auch **49** wurde nach DERI *et al.* hergestellt, jedoch musste zur vollständigen Entfernung der Trifluoracetylgruppe das Reaktionsgemisch vier Tage bei pH 11 – 12 anstelle von, wie in der Literatur beschrieben, 16 h gerührt werden.<sup>[73]</sup> Auch **49** wurde als Gemisch des dreifach- und vierfach-Boc-geschützten Spermins in einem Verhältnis von 69:31 erhalten. Da auch dieses Gemisch nicht mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden konnte, wurde das Produkt ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet. Die folgenden Versuche zur Einführung einer geschützten Carbonsäuregruppe stellten sich weiterhin als unzureichend dar. Bei der Reaktion von **49** mit Ethyl-3-brompropionat (**50**), Benzyl-3-brompropionat (**51**) und Benzylacrylat (**52**) entstanden außer den gewünschten Produkt **53** bzw. **54** zahlreiche Nebenprodukte, sodass eine Isolierung über Säulenchromatographie nicht möglich war (Abbildung 24).

## Ergebnisse und Diskussion



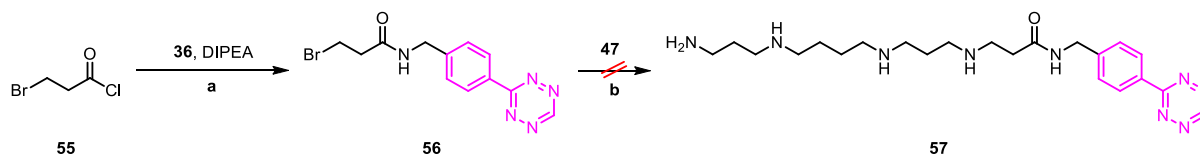
**Schema 3.** Syntheseroute 1: Versuch der Synthese eines 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin-Derivates. Reaktionsbedingungen: **(a)** 1.0 Äq. Ethyltrifluoroacetat in Methanol,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 90 min, dann 6.0 Äq.  $\text{Boc}_2\text{O}$  in Methanol,  $0 - 23\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h; **(b)** 30%ige Ammoniaklösung (aq.) in Methanol,  $\text{pH} = 11 - 12$ , RT, 4 Tage, Ausbeute (über **a** und **b**): quant.; **(c)** R = Et: 1.1 Äq. **50**, 1.0 Äq. Triethylamin in Acetonitril, RT, 24 h; **(d)** R = Bn: 1.1 Äq. **51**, 1.75 Äq.  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in DMF,  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h; **(e)** R = -Ph: 1.0 Äq. **52** in Methanol, RT, 2 h.



**Abbildung 24.** Reaktionskontrolle der Synthese von **54** unter Verwendung von **(A)** Benzylacrylat (**52**) oder **(B)** Benzyl-3-bromopropoat (**53**) mittels analytischer HPLC.

In einem weiteren Versuch wurde die direkte Einführung der Tetrazingruppe in Spermin (**47**) getestet (Schema 4). Hierfür wurde H-Tz-Bn- $\text{NH}_3\text{Cl}$  (**36**) zunächst mit 3-Brompropionylchlorid (**55**) umgesetzt. Der so erhaltene pinke Feststoff wurde per HPLC und *Matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI)-Massenspektrometrie (MS) als das gewünschte Produkt **56** identifiziert. **56** wurde ohne Aufreinigung in der Umsetzung mit Spermin (**47**) verwendet. Direkt nach der Zugabe zu einer Lösung Spermin (**47**) in DMF zersetzte sich **56** jedoch aufgrund der basischen Bedingungen vollständig.





**Schema 4.** Syntheseroute 2: Versuch der direkten Einführung einer Tetrazinfunktion in Spermin (**47**). Reaktionsbedingungen: **(a)** 1.0 Äq. **36**, 1.0 Äq. DIPEA in DCM, RT, 3 h; **(b)** 1.5 Äq. **47** in DMF und DCM, RT.

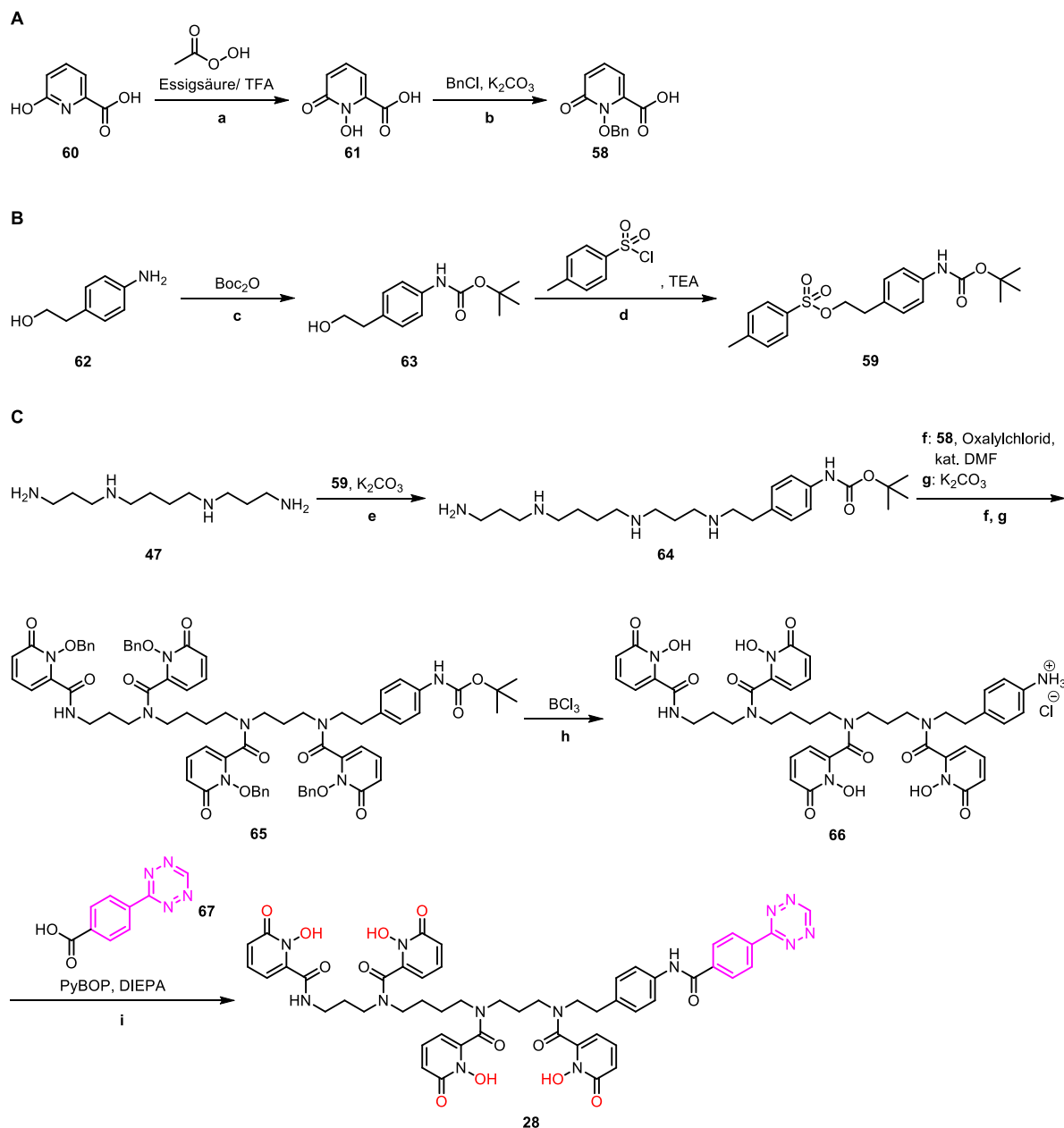
Schließlich wurde ein neuer Ansatz zur Synthese eines Tetrazin-Derivates von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) basierend auf einer aktuellen Publikation von BHUPATHIRAJU *et al.* gewählt, der die Ausbeute der Synthese von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-SCN von 1.4 % auf 14.3 % erhöhen konnte.<sup>[74]</sup> Hierfür erfolgte die Anpassung der Zielstruktur.

Als Ausgangsstoffe für Syntheseroute 3C (Schema 5) wurden zunächst **58** und **59** synthetisiert. **58** wurde in Anlehnung an ZHOU *et al.* in einer zweistufigen Synthese (Schema 5, A) ausgehend von **60** hergestellt.<sup>[101]</sup> Hierfür wurde **60** mit Peressigsäure unter sauren Bedingungen oxidiert und anschließend die Hydroxylgruppe von **61** mittels Benzylchlorid unter basischen Bedingungen geschützt. **59** wurde nach BHUPATHIRAJU *et al.*<sup>[74]</sup> ausgehend von 2-(4-Aminophenyl)ethan-1-ol (**62**) hergestellt (Schema 5, B). Zunächst erfolgte die Schützung der Aminogruppe von **62** unter Verwendung von Boc<sub>2</sub>O. Im Folgenden wurde die Überführung des Alkohols **63** in das Tosylat **59** durchgeführt, sodass dieses im Anschluss in einer nucleophilen Substitution mit Spermin (**47**) umgesetzt werden konnte. Hierbei wurde **59** im Überschuss verwendet um den Anteil an mehrfach-gebundenen Aminogruppen so gering wie möglich zu halten. Die Analyse des Rohproduktes mittels HPLC und MALDI-MS zeigte, dass sich bei der Reaktion jedoch trotzdem zweifach-beladenes Spermin in einem Verhältnis von 1:4 (zweifach-zu-einfach beladenes Spermin) bildete. Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC konnte **64** in einer Ausbeute von 63 % erhalten werden. Im nächsten Schritt wurden die 1,2-HOPO-Gruppen eingeführt. Hierfür wurde zunächst die Carbonsäure **58** mittels Oxalylchlorid in das Säurechlorid überführt, um damit das Spermin (**47**) an den vier ungeschützten Aminogruppen zu acylieren. Die Ausbeute der Reaktion wurde insbesondere durch die Bildung des dreifach-substituierten HOPO-Derivats, aber auch durch die Bildung weiterer Nebenprodukte auf 17 % herabgesetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Entfernung der Boc- und Bn-Schutzgruppen von **65** unter stark sauren Bedingungen mittels BCl<sub>3</sub>.

Das so gebildete Ammoniumchlorid-Salz **66** wurde ohne weitere Aufreinigung direkt im Anschluss unter Verwendung von PyBOP mit 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure (**67**)

## Ergebnisse und Diskussion

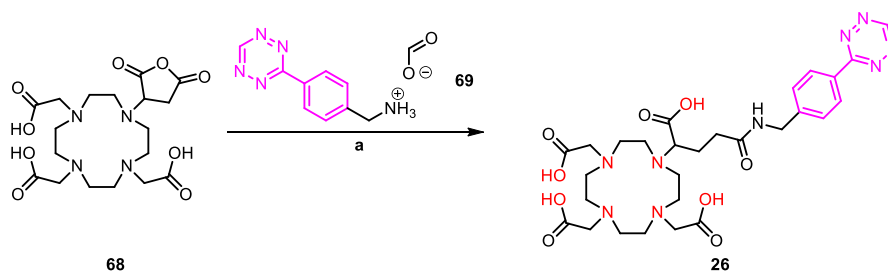
umgesetzt. Als Tetrazin-Derivat wurde 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin (**28**) in einer niedrigen Ausbeute von 16 % und einer Gesamtausbeute von 1.6 % über vier Stufen erhalten.



**Schema 5.** Syntheseroute 3: Optimierter Syntheseweg zur Herstellung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin (**28**).  
**(a)** 2.70 Äq. Peressigsäure in Eisessig/TFA, 23 – 80 °C, 18 h, Ausbeute: 69 %; **(b)** 2.0 Äq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.20 Äq. Benzylchlorid in Methanol, Reflux, 16 h, Ausbeute: 92 %; **(c)** 2.0 Äq. Boc<sub>2</sub>O in DCM, RT, 16 h, Ausbeute: 96 %; **(d)** 1.05 Äq. Toluolsulfonylchlorid, 3.30 Äq. Triethylamin in DCM, RT, 15 h; **(e)** 0.51 Äq. **59**, 2.0 Äq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Acetonitril, 0 – 80 °C, 16 h, Ausbeute: 63 %; **(f)** 5.20 Äq. **58**, 9.40 Äq. Oxalylchlorid, kat. DMF in Benzol dann Zugabe zu **(g)** 40%ige K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in DCM, RT, 48 h; Ausbeute über zwei Stufen: 17 %; **(h)** 1 M BCl<sub>3</sub>-Lösung in *p*-Xylen in DCM, RT, 16 h, Ausbeute: 91 %; **(i)** 1.0 Äq. **67**, 2.0 Äq. PyBOP, 3.0 Äq. DIPEA in DMSO, RT, 4 h, Ausbeute: 16 %.

### 3.1.4. Synthese von DOTA-GA-Tetrazin

Die Synthese von DOTA-GA-Tetrazin (**26**) erfolgte nach einer Vorschrift von LITAU *et al.* (Schema 6).<sup>[86]</sup> DOTA-GA-Anhydrid (**68**) wurde in einer nucleophilen Substitution unter Ringöffnung mit (4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl)methylammoniumformiat (H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>(HCOO)) (**69**) umgesetzt. Die Reaktion verlief innerhalb von 10 min und **26** wurde nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC in einer Ausbeute von 42 % erhalten.



**Schema 6.** Synthese von DOTA-GA-Tetrazin (**26**). 1.0 Äq. **69**, 5.0 Äq. DIPEA, DMF, RT, 10 min, Ausbeute: 42 %.

## 3.2. Bestimmung der Radiomarkierungseigenschaften der Chelatoren sowie der relativen kinetischen Inertheit der resultierenden <sup>89</sup>Zr-Chelator-Komplexe

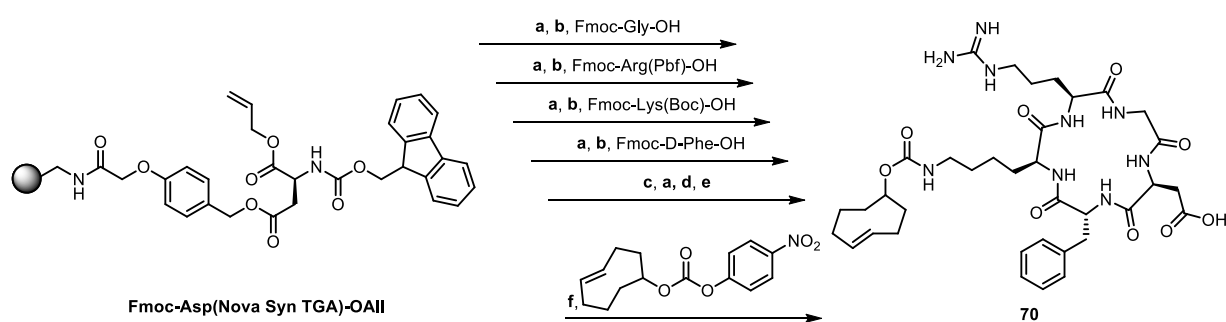
Nach der erfolgreichen Synthese der Tetrazine **24**, **26**, **27** und **28** wurden sowohl diese als auch NODA-GA-Tetrazin (**29**) zur Untersuchung der relativen kinetischen Inertheit über die iEDDA-Reaktion mit einem Modellbiomolekül, dem cyclischen Pentapeptid c(RGDfK) (**13**), verknüpft. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der <sup>89</sup>Zr-Radiomarkierungseigenschaften sowie der Lipophilie der radiomarkierten Konjugate. Zur vergleichenden Untersuchung wurden schließlich Challenge-Experimente mit EDTA durchgeführt.

Der Grund für die Verwendung eines Chelator-Biomolekül-Komplexes anstelle der Tetrazin-Derivate war, dass die kinetische Inertheit des iEDDA-Produktes gegenüber der der Tetrazin-Derivate für die spätere Verwendung in der Immuno-PET ausschlaggebend ist. Das Peptid weist im Vergleich zu einem Antikörper eine deutlich geringere Molekülgröße auf und vereinfacht somit die Analyse der folgenden Konjugationen, <sup>89</sup>Zr-Radiomarkierungen und EDTA-Challenge-Experimente.

### 3.2.1. Peptidsynthese und Konjugation

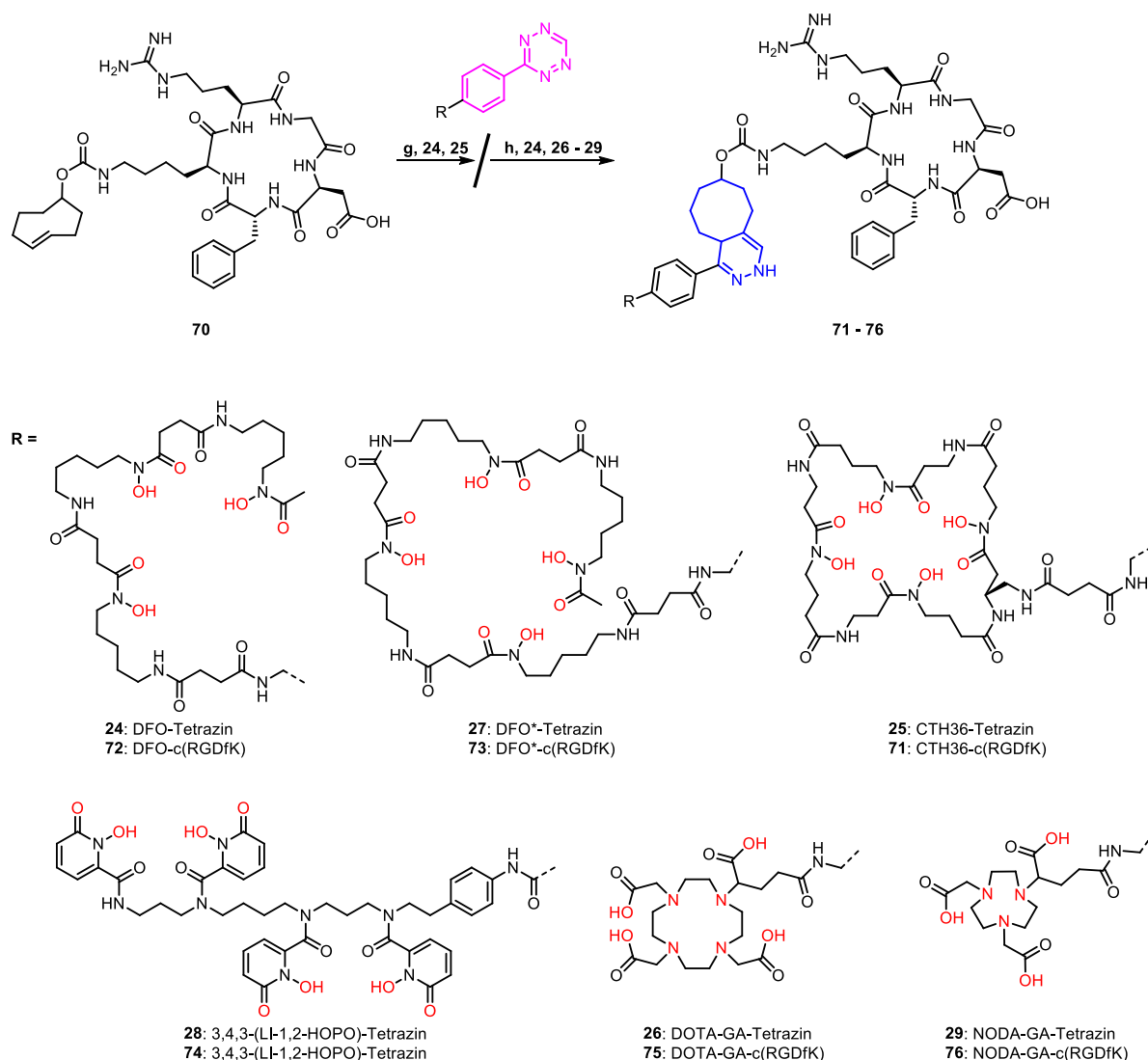
c(RGDfK) (**13**), das als Biomolekül-Modellverbindung gewählt wurde, ist ein selektiver Ligand für das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das in verschiedenen Tumoren wie in Melanomen, Brust- und Eierstockkrebs überexprimiert wird.<sup>[102]</sup>

Die Herstellung erfolgte mittels Festphasenpeptidsynthese nach literaturbekannten Vorschriften unter Verwendung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Strategie (Schema 7).<sup>[103,104]</sup> Die Aminosäurekupplungen wurden unter Verwendung von 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HBTU) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) für 30 min in DMF durchgeführt. Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppen wurde Piperidin in DMF (1:1, *v/v*) verwendet. Nachdem die Peptidsequenz Fmoc-D-Phe-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly-Asp(NovaSyn® TGA)-OAll vollständig aufgebaut war, wurde die Allylschutzgruppe reaktiv mittels Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>) und Phenylsilan in Dichlormethan (DCM) entfernt. Nachdem die Fmoc-Schutzgruppe im Basischen abgespalten wurde, erfolgte über Nacht die Cyclisierung unter Verwendung von HBTU und DIPEA. Die Abspaltung und gleichzeitigen Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen wurde unter Verwendung der Abspatlösung TFA/Triisopropylsilan (TIS)/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5, *v/v/v*) durchgeführt und c(RGDfK) (**13**) wurde in einer Ausbeute von 59 % erhalten. Im nächsten Schritt erfolgte die TCO-Funktionalisierung des c(RGDfK)s (**13**) unter Verwendung des TCO-Aktivesters, (*E*)-Cyclooct-2-en-1-yl-(4-nitrophenyl)carbonat (TCO-NPC).



**Schema 7.** Festphasenpeptidsynthese von c(RGDfK) (**13**) unter Verwendung der Fmoc-Strategie und anschließende TCO-Funktionalisierung. **(a)** Fmoc-Abspaltung: Piperidin in DMF (1:1, *v/v*), RT, 7 min; **(b)** Kupplung: 3.90 Äq. HBTU, 4.0 Äq. DIPEA in DMF, RT, 30 min; **(c)** Allylabspehlung: 0.25 Äq. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 24.0 Äq. Phenylsilan in DCM, RT, 90 min; **(d)** Cyclisierung: 1.0 Äq. HBTU, 1.0 Äq. DIPEA in DMF, RT, 16 h; **(e)** Abspaltung vom Harz: TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5, *v/v/v*), RT, 3 h; Ausbeute über fünf Stufen: 59 %; **(f)** TCO-Modifizierung: 1.0 Äq. TCO-NPC, Ausbeute: 50 %.

TCO-c(RGDfK) (**70**) wurde schließlich mit dem jeweiligen Chelator-Tetrazin **24**, **27**, **28**, **26** und **29** in einer iEDDA-Reaktion umgesetzt (Schema 8). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Tetrazine, wurden die Reaktionen in einem DMSO-Wasser-Gemisch durchgeführt. CTH36-c(RGDfK) (**71**), das bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden war, wurde in reinem DMSO synthetisiert.<sup>[68]</sup> Unter Verwendung des DMSO-Wasser-Gemisches anstelle von reinem DMSO konnte die Ausbeute bei der Umsetzung von DFO-Tetrazin (**24**) mit TCO-c(RGDfK) (**70**) auf 78 % gegenüber 42 %<sup>[68]</sup> gesteigert werden. Alle Reaktionen verliefen mit hoher Geschwindigkeit, sodass sich die pinke Lösung bereits nach wenigen Minuten aufgrund des Abreagierens des Tetrazins entfärbte. Die Chelator-c(RGDfK)-Konjugate **72** – **76** wurden in einer guten Ausbeute von 59 – 84 % erhalten.



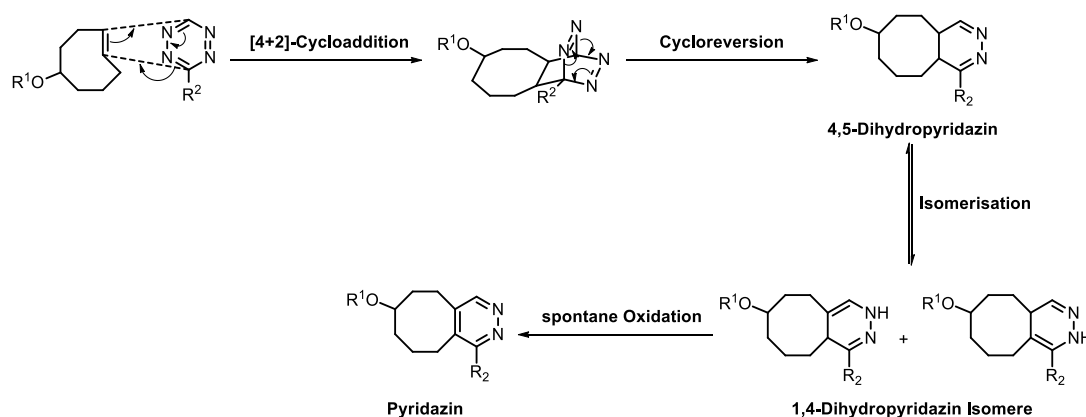
**Schema 8.** Bioorthogonale Konjugation der Chelatoren mit TCO-c(RGDfK) (**70**) mittels iEDDA-Reaktion. (**g**) 1.40 Äq. **24** bzw. **25** in DMSO, RT, 30 min, Literaturausbeute: 65 % (**72**) bzw. 42 % (**71**)<sup>[68]</sup>; (**h**) 1.10 Äq. Chelator-Tetrazin (**24**, **26** – **29**) in DMSO/Wasser (1:1, v/v), Ausbeuten: 78 % (**72**), 59 % (**73**), 84 % (**74**), 70 % (**75**) und 67 % (**76**).

In allen iEDDA-Reaktionen wurde zusätzlich zu dem jeweiligen 4,5-Dihydropyridazin (DHP) jeweils ein Nebenprodukt gebildet. Der Anteil des Nebenprodukts war dabei abhängig von dem verwendeten Chelator-Tetrazin, siehe Tabelle 3. Wenn möglich, wurden die Nebenprodukte isoliert und mittels MALDI-MS und HR-ESI-MS analysiert. Die Massen wiesen auf eine Oxidation der DHPs zu den jeweiligen aromatischen Pyridazinen hin. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, in der eine spontane Oxidation der DHPs beschrieben wird.<sup>[105,106]</sup>

**Tabelle 3.** Anteil an Pyridazin und DHP in % nach der HPLC-Aufreinigung der Rohprodukte **71 – 76**.

c(RGDfK)-Konjugate	DHP [%]	Pyridazin [%]
DFO-c(RGDfK) ( <b>72</b> )	95.5	4.5
DFO*-c(RGDfK) ( <b>73</b> )	61.8	38.4
CTH36-c(RGDfK) ( <b>71</b> )	93.8	6.2
3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-c(RGDfK) ( <b>74</b> )	53.5	46.5
DOTA-GA-c(RGDfK) ( <b>75</b> )	64.3	35.7
NODA-GA-c(RGDfK) ( <b>76</b> )	82.6	17.4

Der Mechanismus der iEDDA-Reaktion (Abbildung 25) verläuft zunächst über eine [4+2]-Cycloaddition des Diens, dem Tetrazin, mit dem Dienophil, z.B. TCO. Anders als bei der normalen *electron-demand* Diels-Alder-Reaktion bei der ein elektronenreiches Dien mit einem elektronenarmen Dienophil reagiert, ist bei der iEDDA-Reaktion das Dien elektronenarm und das Dienophil elektronenreich, sodass zur Bildung der  $\sigma$ -Bindungen das *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (LUMO) des Diens mit dem *Highest Occupied Molecular Orbital* (HOMO) des Dienophils interagiert. Im zweiten Schritt, einer *retro-Diels-Alder*-Reaktion, bei der  $N_2$  freigesetzt wird, entsteht zunächst das 4,5-Dihydropyridazin. Dieses isomerisiert zu den 1,4-Dihydropyridazin-Isomeren, welche weiterhin durch spontane Oxidation Pyridazine bilden.<sup>[105,106,46]</sup>

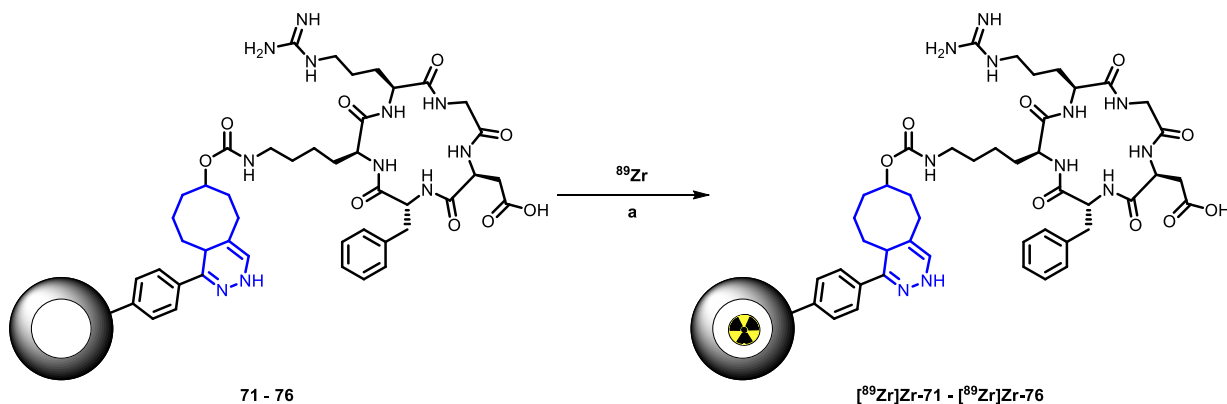


**Abbildung 25.** Darstellung des Mechanismus der iEDDA-Reaktion.

Um die Homogenisierung der Produkte zu erreichen wurde versucht, die Bildung der Pyridazine durch Erniedrigung des pH-Wertes zu erhöhen.<sup>[105,107]</sup> Dies war jedoch nur bei **75** und **76** erfolgreich während bei **71** – **74** die Oxidation langsamer als die Zersetzung der Produkte war. Weiterhin konnte nur die Pyridazinform von **74** mittels HPLC isoliert werden, während **71** – **73** im Folgenden als DHP-Pyridazin-Mischung verwendet wurden.

### 3.2.2. <sup>89</sup>Zr-Radiomarkierung der Chelator-c(RGDfK)-Konjugate **71** – **76**

Im Folgenden wurden die erhaltenen Chelator-c(RGDfK)-Konjugate **71** – **76** mit <sup>89</sup>Zr radiomarkiert (Schema 9). In der Literatur wurden die <sup>89</sup>Zr-Markierungen der DFO-, DFO\*-, CTH36-, 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Derivate unter milden Reaktionsbedingungen bei Temperaturen ≤ 37 °C innerhalb von 1 – 2 h durchgeführt.<sup>[59,68,72]</sup> Die Komplexbildung von <sup>89</sup>Zr mit DOTA und NOTA benötigte hingegen weit höhere Temperaturen > 90 °C.<sup>[69,70]</sup> Zur späteren Verwendung der Chelatoren, insbesondere bei der Radiomarkierung von Antikörpern, sind milde Reaktionsbedingungen von Vorteil. Aus diesem Grund wurden die Radiomarkierungen zunächst bei 37 °C durchgeführt.

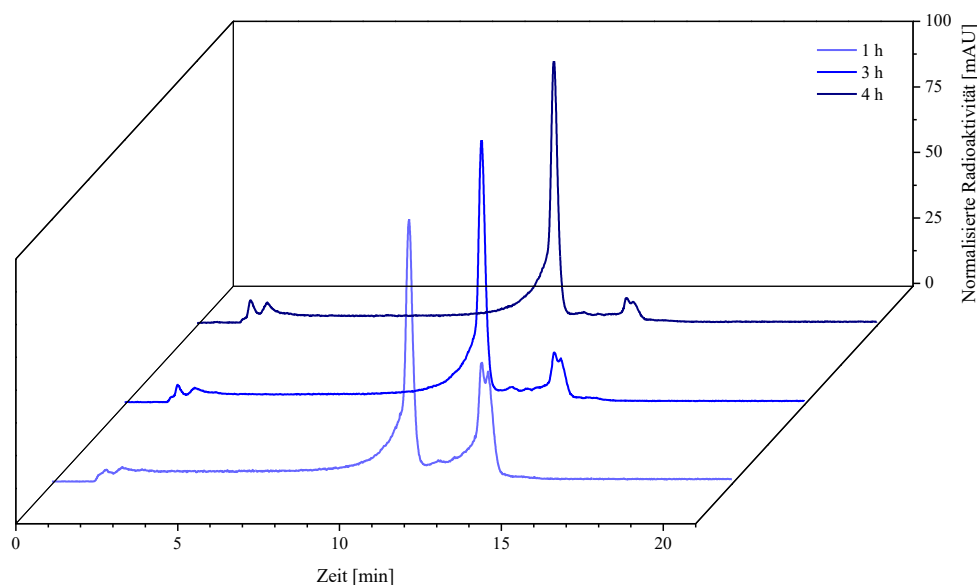


**Schema 9.** <sup>89</sup>Zr-Radiomarkierung der Chelator-c(RGDfK)-Konjugate **71** – **76**. Reaktionsbedingungen: **(a)** 40 – 55 MBq [<sup>89</sup>Zr]Zr-Oxalat auf 20 nmol **71** – **76** in 0.25 M HEPES Puffer, pH = 7 – 7.3, 37 °C, 1 – 5 h, Radiochemische Reinheit ≥ 96 %.

Hierfür wurden 20 nmol des jeweiligen Präkursors **71** – **76** mit 40 – 55 MBq einer [<sup>89</sup>Zr]Zr-Oxalat Lösung in 0.25 M 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer bei pH = 7.0 – 7.3 bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Radio-HPLC.

Die Radiomarkierungen der Konjugate **71** – **73** war bereits nach einer Stunde mit einer <sup>89</sup>Zr-Inkorporation von ≥ 96 % nahezu vollständig. Weiterhin führten die Markierungsbedingungen bei der Verwendung der DHP/Pyridazin-Gemische für **71** – **73** zur Oxidation der DHPs und somit zur vollständigen Umsetzung in die dann einheitlichen Pyridazine. Während **73** bereits

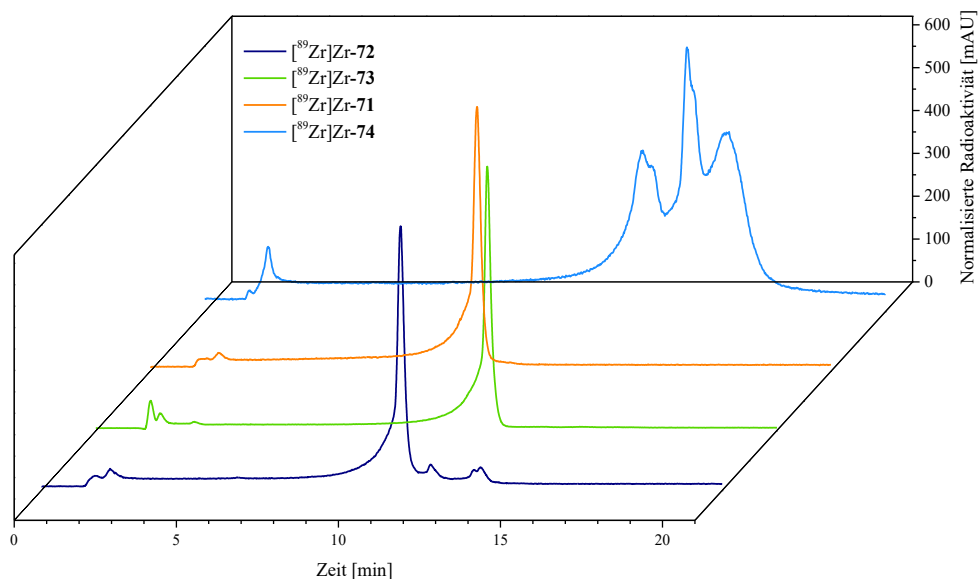
innerhalb einer Stunde vollständig oxidiert vorlag, wurden für **72** drei und für **71** eine weitere Stunde zur vollständigen Oxidation benötigt. Die Pyridazine  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-73}$  konnten so als alleinige Produkte mit einer nicht-optimierten molaren Aktivität von 2.0 – 2.75 GBq/ $\mu\text{mol}$  erhalten werden. In der folgenden Abbildung ist der Oxidationsprozess, exemplarisch für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-72}$  dargestellt (Abbildung 26).



**Abbildung 26.** Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme der Radiomarkierung und des anschließenden Homogenisierungsprozesses des Markierungsproduktes durch Oxidation, exemplarisch für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-72}$ .

Im Gegensatz dazu stellte sich die Radiomarkierung des 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Derivates **74** als deutlich weniger effektiv heraus. Nach einer Stunde konnte lediglich eine  $^{89}\text{Zr}$ -Inkorporation von  $\leq 51\%$  beobachtet werden. Um eine ausreichende radiochemische Reinheit von  $\geq 96\%$  zu erhalten, wurde die Markierungslösung insgesamt fünf Stunden bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Des Weiteren entstanden, trotz der Verwendung des reinen Pyridazins von **74** drei Markierungsprodukte. In der Literatur wurde ein ähnliches Phänomen beobachtet. So wurden bei der  $^{89}\text{Zr}$ -Radiomarkierung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) initial zwei Produkte per Radio-ITLC erhalten. Im Folgenden wurde der Umwandlungsprozess des einen in das andere Isomer ohne Freisetzung von  $^{89}\text{Zr}$  mittels Radio-ITLC aufgezeichnet. Die Autoren schlussfolgerten, dass sich ein kinetisches sowie ein thermodynamisches Produkt in Form von verschiedenen Konformeren bildete.<sup>[72]</sup> In der vorliegenden Arbeit bildeten sich initial drei verschiedene Produkte. Eine mögliche Erklärung kann auch hier die Bildung von verschiedenen Koordinationsstrukturen zur Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}$  sein. Die Radio-HPLC-Chromatogramme sind nachfolgend für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  dargestellt (Abbildung 27).





**Abbildung 27.** Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme der Radiomarkierungsprodukte  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$ .

Auch für DOTA-GA-c(RGDfK) **75** und NODA-GA-c(RGDfK) **76** erfolgte die Radiomarkierung zunächst bei 37 °C. Da jedoch nach einer Stunde keine Inkorporation des  $^{89}\text{Zr}$  beobachtet wurde, wurde die Temperatur auf 99 °C erhöht und eine weitere Stunde inkubiert. Weiterhin wurde die Radiomarkierung für **75** sowohl bei pH = 4 und pH = 5, als auch unter Verwendung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$  durchgeführt. Weder die Temperaturerhöhung noch die Variation des pH-Wertes führten zu einer Inkorporation von  $^{89}\text{Zr}$ .

Die Herstellung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$  aus  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Oxalat}$  erfolgte mit einer *Sep-Pak Accell Plus* Anionenaustauscher-Kartusche unter Verwendung einer 1 M HCl-Lösung als Elutionsmittel.  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$  wurde in einer Effizienz von  $\geq 95\%$  erhalten.

In der Literatur führte die Verwendung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$  zu einer deutlichen Ausbeutensteigerung der  $^{89}\text{Zr}$ -Inkorporation von DOTA und NOTA gegenüber der Markierung mit  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Oxalat}$ .<sup>[69]</sup> Grundsätzlich kann bei der Verwendung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$  und niedriger Chlorid-Konzentration bei hohem pH-Wert die Hydrolyse von  $^{89}\text{Zr}^{4+}$  zur Bildung eines  $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{H}_2\text{O})_{16}]^{8+}$ -Komplexes führen, was wiederum die  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexierung durch den Chelator blockieren kann.<sup>[108]</sup> In den vorliegenden Experimenten wurde jedoch das  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$  durch Elution mit HCl, die eine hohe Chlorid-Konzentration (1 mol/L) aufwies, erhalten und direkt im Anschluss verwendet, sodass die beschriebene Nebenreaktion nicht der Grund für die beobachtete ausbleibende  $^{89}\text{Zr}$ -Inkorporation sein kann.

Bei allen Radiomarkierungsversuchen von **75** und **76** wurde keine Aktivitätsaufnahme beobachtet. Eine Alternative zur Verwendung von DOTA-GA und NODA-GA stellen die nicht-*backbone*-funktionalisierten Chelatoren DOTA und NOTA dar, jedoch müsste hierbei eine Carboxylgruppe als Konjugationsstelle genutzt und zum Säureamid umgesetzt werden. Es ist jedoch zu erwarten, dass dies zu einer Herabsetzung der Komplexstabilität führen kann.

### 3.2.3. Bestimmung der Lipophilie

Die Lipophilie von Stoffen bestimmt maßgeblich ihre Bioverteilung. So führt eine hohe Lipophilie von Radiopharmaka, die für den Einsatz in der Bildgebung genutzt werden, zu einer vermehrten Anreicherung in der Leber und Milz. Daraus folgt eine höhere Hintergrundaktivität verbunden mit einer geringeren Anreicherung im Tumor.<sup>[109]</sup>

Um den Einfluss der Chelatoren auf die Lipophilie der Chelator-Peptid-Konjugate zu beurteilen, folgte daher die Bestimmung der Lipophilie der radiomarkierten Konjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-**71** – [<sup>89</sup>Zr]Zr-**74** über den 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Hierfür wurden zunächst die radiomarkierten Konjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-**71** – [<sup>89</sup>Zr]Zr-**74** in einem 1-Octanol/Phosphatpuffer (pH 7.4)-Gemisch (1:1, v/v) 2 min geschüttelt. Anschließend folgte die Separation der Phasen über Zentrifugation. Jeweils ein Aliquot der wässrigen und eines der organischen Phase wurde in ein Gammazähler-Röhrchen überführt und gemessen.

Die Berechnung des  $\log_{D(7.4)}$  erfolgte schließlich nach der Formel 1:

$$\log_{D(7.4)} = \log\left(\frac{A_{1\text{-Octanol}}}{A_{\text{PBS}}}\right) \quad \mathbf{1}$$

$\log_{D(7.4)}$ : 1-Octanol-Phosphatpuffer-Verteilungskoeffizient

$A_{1\text{-Octanol}}$ : Aktivitätsmenge in der 1-Octanol-Phase in cpm

$A_{\text{PBS}}$ : Aktivitätsmenge in der Phosphatpuffer-Phase in cpm

Die Substanzen [<sup>89</sup>Zr]Zr-**71** – [<sup>89</sup>Zr]Zr-**73**, die zur Komplexbildung des [<sup>89</sup>Zr]Zr<sup>4+</sup> Hydroxamatgruppen enthalten, wiesen mit -2.3 – -2.8 eine ähnliche Lipophilie auf, während das [<sup>89</sup>Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Derivat **74**, das zur Komplexbildung des Metalls HOPO-Gruppen trägt, mit -1.8 eine deutlich höhere Lipophilie besitzt. Die  $\log_{D(7.4)}$ -Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4.** Ermittelte  $\log_{D(7.4)}$ -Werte der Substanzen  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  mit  $n = 6 - 12$  unter Angabe des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung.

Substanz	Chelator	$\log_{D(7.4)}$
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-72}$	DFO	$-2.32 \pm 0.21$
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-73}$	DFO*	$-2.49 \pm 0.03$
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$	CTH36	$-2.78 \pm 0.19$
$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$	3,4,3-(LI-1,2-HOPO)	$-1.76 \pm 0.08$

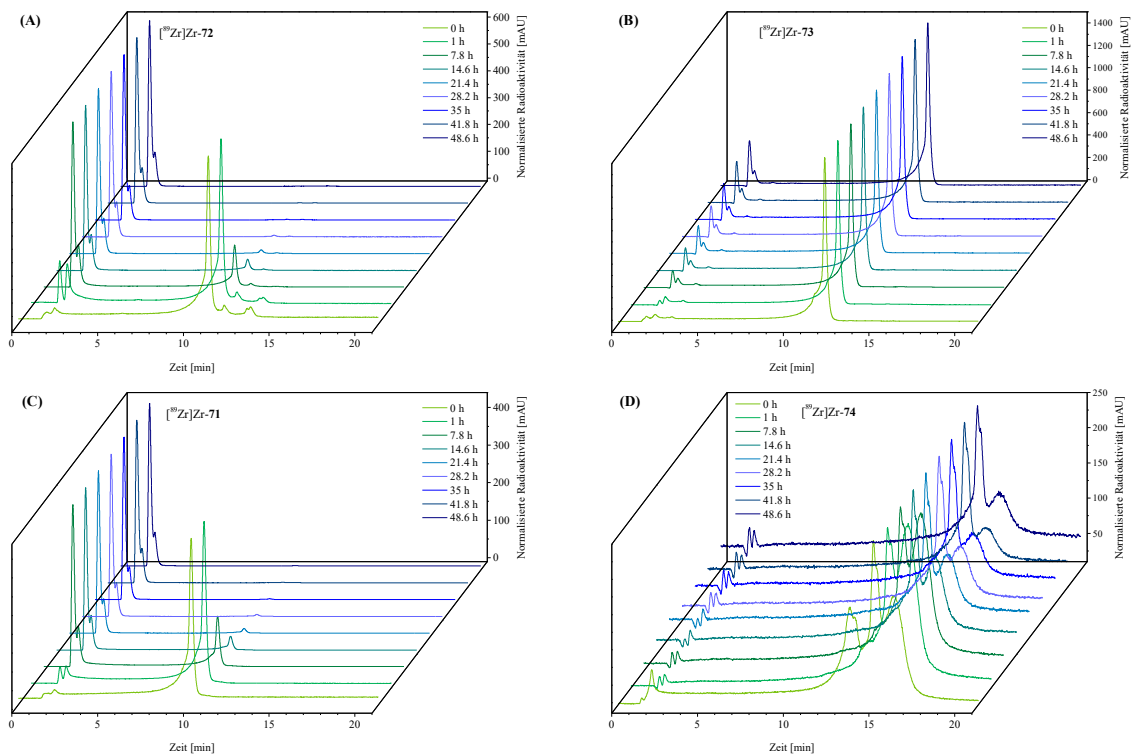
Die Werte der Lipophilie der Peptide haben zwar nur eine geringe Aussagekraft für die Verwendung der Chelatoren in Antikörpern. Dennoch kann die höhere Lipophilie des 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Derivates zu einer erhöhten Akkumulation eines hierauf basierenden Radiopharmakons in der Leber führen.

### 3.2.4. EDTA Challenge-Versuche

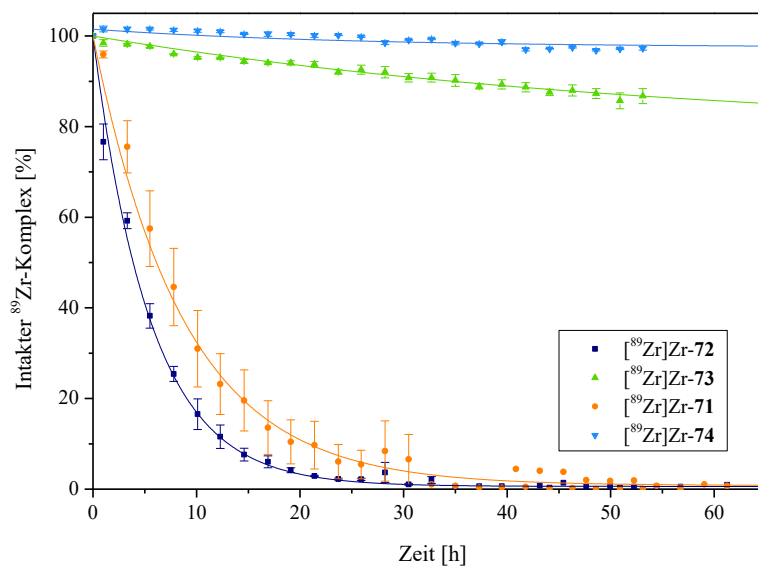
Für den direkten Vergleich der kinetischen Inertheit der gebildeten Komplexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  wurden Challenge-Experimente gegen den sechszähligen Komplexbildner EDTA durchgeführt. Da aufgrund der vorangegangenen Studien eine hohe Inertheit der  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexe erwartet wurde, erfolgten die Transchelatierungsexperimente unter Verwendung eines enormen Überschusses von 10 000 Äq. EDTA.

Zu je einem Aliquot EDTA in HEPES-Puffer mit  $\text{pH} = 7$  wurde die Markierungslösung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  zugegeben. Der Transchelatierungsprozess wurde 54 h mittels analytischer Radio-HPLC aufgezeichnet (Abbildung 28).

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 28.** Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  während der Challenge-Experimente mit 10 000 Äq. EDTA zu den Zeitpunkten 0, 1, 7.8, 14.6, 21.4, 28.2, 35, 41.8 und 48.6 h.



**Abbildung 29.** Zusammenfassung der Ergebnisse der EDTA-Challenge-Experimente. Auftragung des Anteils an intaktem  $^{89}\text{Zr}$ -Komplex in % gegen die Zeit in h. Die radiochemische Reinheit der Konjugate zu Beginn der EDTA-Challenge wurde auf 100 % normalisiert.

Wie erwartet, wies  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-72}$  die geringste kinetische Inertheit auf, sodass bereits nach 5 h  $\geq 50\%$  des  $^{89}\text{Zr}$  als EDTA-Komplex vorlagen. Die kinetische Inertheit von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  war zwar, wie publiziert,<sup>[68]</sup> höher als die von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-72}$ , jedoch nur geringfügig (Abbildung 29).

Die geringste Transchelatierung fand für die Komplexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-73}$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  statt (Abbildung 29). Der Anteil an intaktem Komplex lag für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-73}$  nach 53 h bei  $\geq 86\%$  und für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  sogar bei  $\geq 97\%$ .

Die geringe Inertheit des gebildeten  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  Komplexes zeigte die Notwendigkeit der vergleichenden Untersuchung der Komplexbildner. In der Literatur wurde  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-71}$  lediglich in einem EDTA-Challenge Experiment gegenüber  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-29}$  untersucht. Hier konnte zwar eine höhere Inertheit nachgewiesen werden, jedoch nicht in welchem Maß.<sup>[68]</sup>

Zusätzlich wurde während des EDTA-Challenge-Experimentes von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  beobachtet, dass die Intensität von zwei der drei gebildeten Radiomarkierungsprodukte abnahm, ohne dass dabei eine Freisetzung bzw. Transchelatierung des  $^{89}\text{Zr}$  stattfand. Dies unterstützt die These der Bildung von drei verschiedenen Konformeren. Die Bildung von unterschiedlichen Konformeren des  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  führte dabei zu keiner Destabilisierung des Komplexes, im Gegenteil dazu wies  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-74}$  die höchste kinetische Inertheit auf.

Insgesamt wurde für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}^*$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)}$  die höchste kinetische Inertheit bestimmt, während der Komplex  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-CTH36}$  nur geringfügig stabiler war als der am häufigsten verwendete Komplex  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ . Im Weiteren erfolgte die vergleichenden *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen der vielversprechendsten Komplexbildner DFO\* und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) mit DFO als Referenz.

### **3.3. Biokonjugation und vergleichende Untersuchung der *in vivo*-Pharmakokinetik der $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-}$ , $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}^*$ -, $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)}$ -Cetuximab-Konjugate**

Im Folgenden wurden die *in vivo*- und *in vitro*-Charakterisierungen der Komplexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}^*$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)}$  unter Verwendung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$  als Referenz durchgeführt. Zur Herstellung von Radiotraceren mit langer biologischer Halbwertszeit wurden die Chelator-Tetrazin-Derivate **24**, **27** und **28** mit dem mAb Cetuximab in einer iEDDA-Reaktion umgesetzt. Hierfür erfolgte zuvor die Modifizierung von Cetuximab mit TCO sowie die Bestimmung des TCO/mAb-Verhältnisses. Im nächsten Schritt wurden die erhaltenen

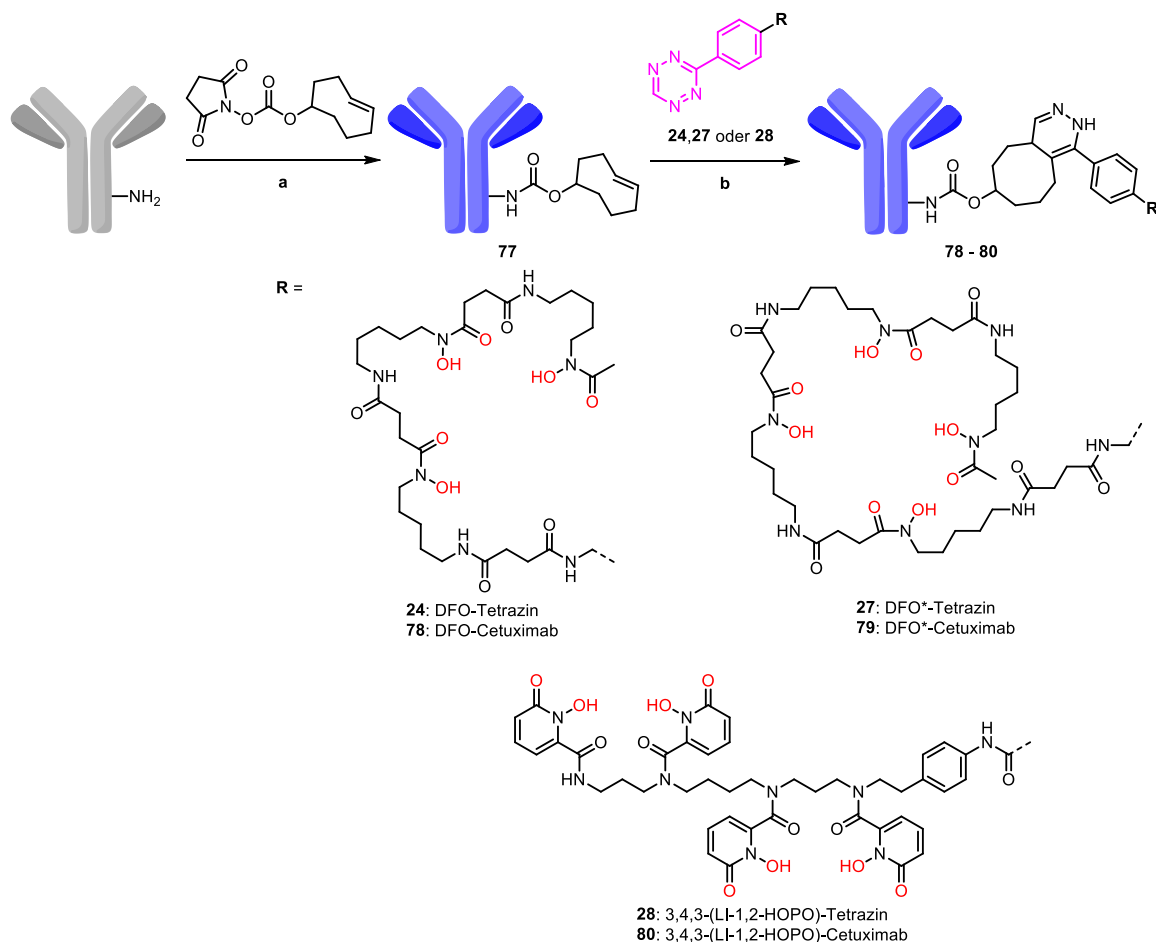
Chelator-Cetuximab-Biokonjugate radiomarkiert. Zur Überprüfung der Immunreaktivität wurde ein Bindungsassay nach LINDMO *et al.* durchgeführt.<sup>[37]</sup> Abschließend folgten die Tierexperimente zur Bestimmung der Pharmakokinetik der hergestellten Antikörper-Konjugate.

### 3.3.1. Biokonjugation

Zur Herstellung der Chelator-mAb-Konjugate wurde Cetuximab als Modellantikörper für IgGs gewählt. Cetuximab bindet und inhibiert mit hoher Affinität und Selektivität den *epidermal growth factor receptor* (EGFR, HER1). Der EGFR-Rezeptor wird auf vielen Tumorentitäten überexprimiert und stellt daher ein geeignetes *target* in der Krebstherapie und -diagnostik dar. Cetuximab ist weiterhin unter dem Handelsnamen Erbitux<sup>®</sup> ein zugelassenes Arzneimittel für die Behandlung metastasierter Kolorektalkarzinome und Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses und zeigte zudem eine hohe Wirksamkeit in der Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinome.<sup>[110]</sup>

Für die vergleichende Untersuchung der *in vivo*-Pharmakokinetik der Chelatoren DFO, DFO\* und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) mussten die Chelatoren über die gleiche Konjugationsmethode in den Antikörper eingebracht werden. Analog zu der Synthese der Chelator-c(RGDfK)-Konjugate **71** – **76** wurde zur Biokonjugation die iEDDA-Reaktion genutzt. Die Cycloaddition der Tetrazine mit TCOs, die bei neutralem pH-Wert, bei RT, in wässriger Lösung, katalysatorfrei und mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit abläuft, besitzt vorteilhafte Reaktionseigenschaften für die Konjugation von Antikörpern.<sup>[105]</sup>

Die Derivatisierung der Antikörper verlief in zwei Schritten (Schema 10). Zunächst erfolgte die TCO-Modifizierung des Antikörpers und im Anschluss die Umsetzung des TCO-Cetuximabs mit dem jeweiligen Chelator-Tetrazin **24**, **27** und **28**.



**Schema 10.** Herstellung der Chelator-Cetuximab-Biokonjugate **77** – **78**. Reaktionsbedingungen: **(a)** 4 – 20 Äq. TCO-NHS oder TCO-NPC in DPBS, pH = 8.6 – 8.8, RT, 2 h, Ausbeute: 80 – 90 %; **(b)** 8 Äq. Chelator-Tetrazin **24**, **27** oder **28**, RT, 5 h, Ausbeute: 80 – 89 %.

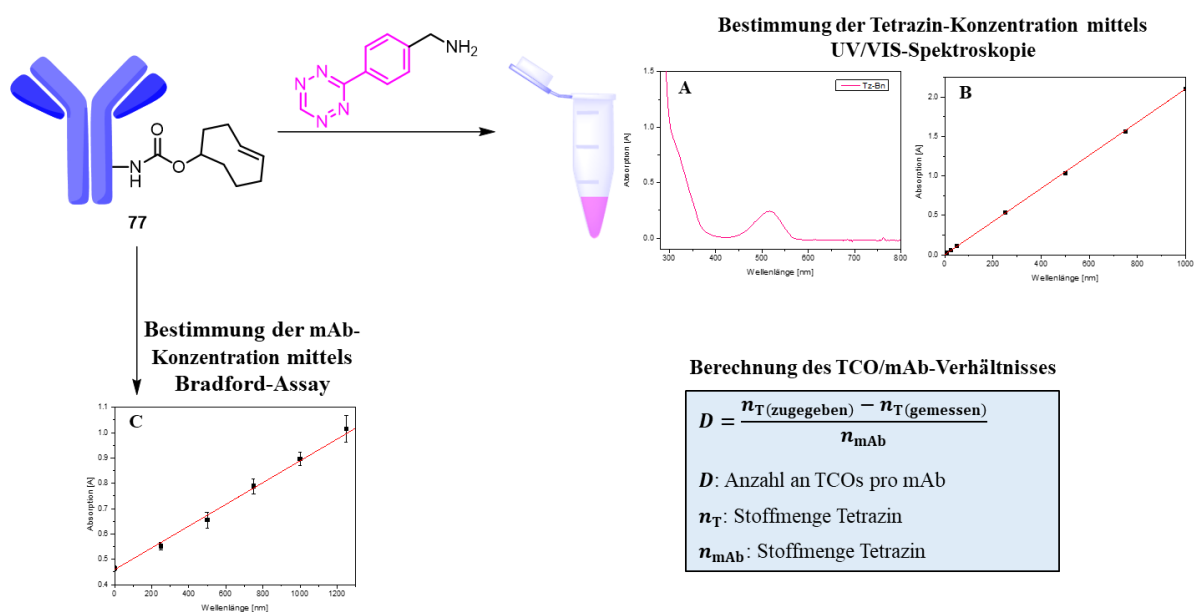
Die Immunreaktivität des Antikörpers kann durch die Konjugation herabgesetzt werden. So wurde in der Literatur die Abnahme der Immunreaktivität mit steigender Anzahl an Derivatisierungsstellen beschrieben.<sup>[83,103,85]</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Zahl der TCO-Einheiten pro mAb mittels Rücktitration mit dem intensiv gefärbten Tetrazin, H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**), erhalten. Um den Einfluss der Antikörper-Modifikationen auf die Immunreaktivität zu limitieren, wurde ein niedriges TCO/mAb-Verhältnis von 1 – 2 angestrebt.

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration erfolgte dabei unter Verwendung des Bradford-Assays. Bei der Zugabe von Proteinen zu dem Bradford-Reagenz bildet der darin enthaltene Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau G-250 einen Komplex, in dem die anionische blaue Form, die Licht bei 595 nm absorbiert, stabilisiert wird. Folglich ist die Absorption ein Maß für die Proteinkonzentration.<sup>[111]</sup> Mittels einer Verdünnungsreihe ausgehend von Erbitux mit einer Cetuximabkonzentration von 5 mg/mL wurde hierfür eine Kalibriergerade erstellt (Abbildung 30).

## Ergebnisse und Diskussion

Auch die Bestimmung der Tetrazinkonzentration zur Quantifizierung des Überschusses bei der Rücktitration erfolgte mittels photometrischer Methode. Die UV/VIS-Spektren von Tetrazinen weisen eine UV/VIS-Bande im Bereich des sichtbaren Lichts bei 595 nm auf. Auch hierfür wurde zur Erstellung einer Kalibriergeraden ausgehend von einer Probe mit bekannter Konzentration an H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**) eine Verdünnungsreihe erstellt (Abbildung 30).

Unter Verwendung der zuvor beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Protein- und Tetrazinkonzentration erfolgte die Quantifizierung der TCO-Einheiten pro Antikörpermolekül. Zu einem Aliquot des aufgereinigten TCO-mAbs **77** wurde ein Überschuss an Tetrazin **36** gegeben. Die Differenz der gemessenen von der eingesetzten Tetrazinmenge entspricht der Menge an TCO-Molekülen. Diese wurde durch die Antikörpermenge dividiert um das TCO/mAb-Verhältnis zu erhalten (Abbildung 30).



**Abbildung 30.** Bestimmung der Anzahl an Derivatisierungsstellen pro Antikörper mittels Rücktitration. (A) UV/VIS-Spektrum von H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**); (B) Standardkalibriergerade des H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**); (C) Kalibriergerade des Bradford-Assays mit Cetuximab.

Zur Herstellung der TCO-modifizierten Antikörper wurde Cetuximab in einer Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) zwei Stunden mit einem Überschuss an (*E*)-Cyclooct-2-en-1-yl-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat (TCO-NHS) bei RT umgesetzt. Nach der Aufreinigung der TCO-mAb-Konjugate mittels *NAP-25*- bzw. *NAP-10*-Säulen unter Verwendung von DPBS (pH = 7.4) wurden die modifizierten Antikörper in einer Ausbeute von 80 – 90 % erhalten. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung des TCO/mAb-Verhältnisses, wie oben beschrieben. In einem ersten Versuch wurde die Reaktion bei einem

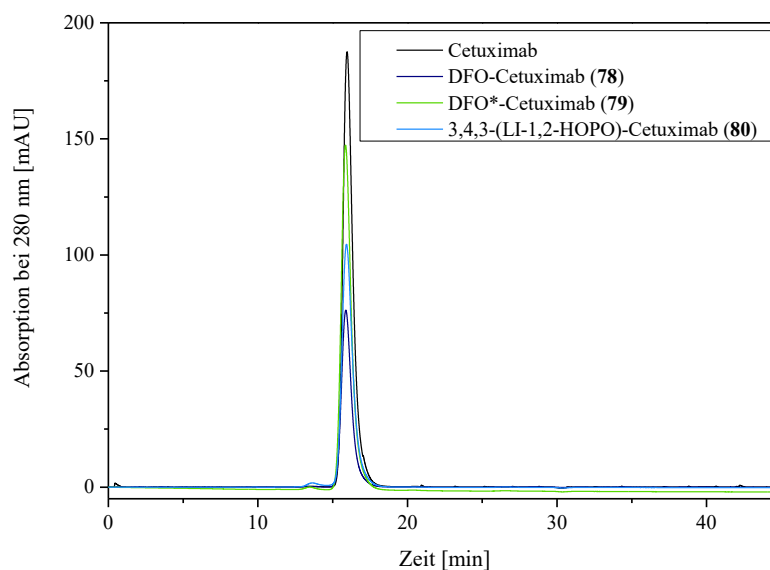


physiologischen pH von 7.4 durchgeführt. Jedoch wurde auch bei der Verwendung eines hohen Überschusses an TCO-NHS (10 Äq.) nur eine geringe Beladung von 0.3 TCOs pro mAb erhalten. Im Folgenden wurde daher der pH-Wert der Reaktionslösung auf 8.6 – 8.8 eingestellt. Weiterhin wurde die Modifizierung unter Verwendung des *p*-Nitrophenyl-Aktivesters (TCO-NPC) durchgeführt. Dieser Ansatz führte jedoch zu einer niedrigeren Konjugationseffizienz und wurde daher nicht weiterverfolgt. Zur Bestimmung der benötigten Menge TCO-NHS, um die oben genannte Beladungsdichte von 1 – 2 TCOs pro mAb zu erhalten, wurde die TCO-Modifizierung unter Verwendung von verschiedenen Mengen des TCO-Aktivesters durchgeführt. Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen, dass bei einem Überschuss von 4 Äq. TCO-NHS die gewünschte Beladung erhalten wurde.

**Tabelle 5.** Zusammenfassung der TCO-Modifizierung von Cetuximab unter Verwendung von unterschiedlichen Mengen des TCO-Aktivesters TCO-NHS bzw. TCO-NPC.

TCO-NHS [Äq.]	TCO-NPC [Äq.]	Resultierendes TCO/mAb-Verhältnis
/	20	2.1 ± 0.5 (n = 2)
/	7	0.6 ± 0.2 (n = 2)
20	/	5.4 ± 0.3 (n = 3)
7	/	2.8 ± 0.5 (n = 3)
4	/	1.4 ± 0.3 (n = 6)
3	/	0.9 ± 0.3 (n = 2)

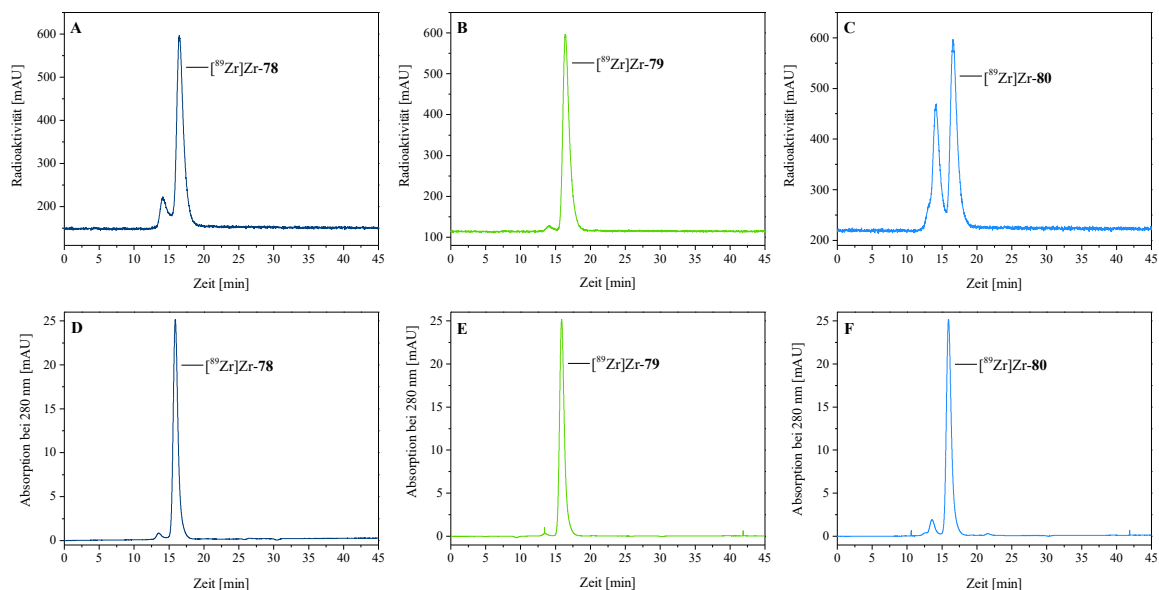
Im zweiten Schritt erfolgte die iEDDA-Reaktion der jeweiligen Chelator-Tetrazine **24**, **27** und **26** mit dem TCO-Cetuximab **77**. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Tetrazin-Derivate in wässrigem Medium wurden diese zunächst in DMSO gelöst und schließlich in einem achtfachen Überschuss zu der frisch hergestellten Lösung des TCO-Cetuximab in DPBS-Puffer gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 h bei physiologischem pH von 7.4 und RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Aufreinigung der Chelator-Cetuximab-Biokonjugate folgte zunächst über Größenausschluss-Chromatographie (SEC) Sephadex *NAP-10*- bzw. *NAP-25*-Säulen unter Verwendung von DPBS (0.1 M, pH 7.4). Ein bis zwei Tage vor dem Einsatz in den *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten erfolgte die Umpufferung der Chelator-Cetuximab-Lösungen auf den Markierungspuffer, einem HEPES-Puffer (pH 7), und die anschließende Konzentrierung unter Verwendung von Zentrifugalkonzentratoren mit einer Molekulargewichtsgrenze (MWCO) von 30 000 g/mol. Die jeweiligen Chelator-Cetuximab-Biokonjugate **78** – **80** wurden in einer Ausbeute von 80 – 89 % als Lösung in HEPES-Puffer in hoher Reinheit (Abbildung 31), die mittels Größenausschluss-HPLC bestimmt wurde, erhalten.



**Abbildung 31.** SEC-HPLC-Chromatogramme von Cetuximab und den Chelator-Cetuximab-Biokonjugaten **78** – **80**.

### 3.3.2. $^{89}\text{Zr}$ -Radiomarkierung der Biokonjugate

Die Radiomarkierung der Chelator-Cetuximab-Biokonjugate **78** – **80** mit  $^{89}\text{Zr}$  wurde erfolgreich unter milden Reaktionsbedingungen bei pH 7 – 7.2 und einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Zu 55 – 70 MBq  $^{89}\text{Zr}$ -Oxalat in HEPES-Puffer erfolgte die Zugabe des jeweiligen Chelator-Cetuximab-Biokonjugates **78** – **80**. Die Markierungen verliefen innerhalb von 30 min nahezu quantitativ. Als analytische Methoden wurden hierbei sowohl die Radio-DC als auch die Radio-HPLC, ausgestattet mit einer Größenausschluss säule, verwendet. Trotz der hohen Inkorporationsraten von  $\geq 99\%$  (Radio-DC) bzw.  $\geq 95\%$  (Radio-HPLC), wurden die radiomarkierten Konjugate vor der Verwendung in den *in vivo*- und *in vitro*-Testungen mittels SEC Sephadex NAP-5-Säulen mit DPBS als Elutionsmittel aufgereinigt. Weiterhin erfolgte für die *in vivo*-Anwendung die Konzentrierung der Lösungen mittels Ultrazentrifugation über einen Zentrifugalfilter mit einer MWCO von 30 000 g/mol.  $^{89}\text{Zr}$ -**78** –  $^{89}\text{Zr}$ -**80** wurden über alle Schritte in einer radiochemischen Ausbeute von 80 % und einer nicht-optimierten spezifischen bzw. molaren Aktivität von 50 MBq/mg bzw. 7.3 GBq/ $\mu\text{mol}$  erhalten. Nachfolgend sind die Radio- und UV-HPLC-Chromatogramme der aufgereinigten Konjugate dargestellt (Abbildung 32).

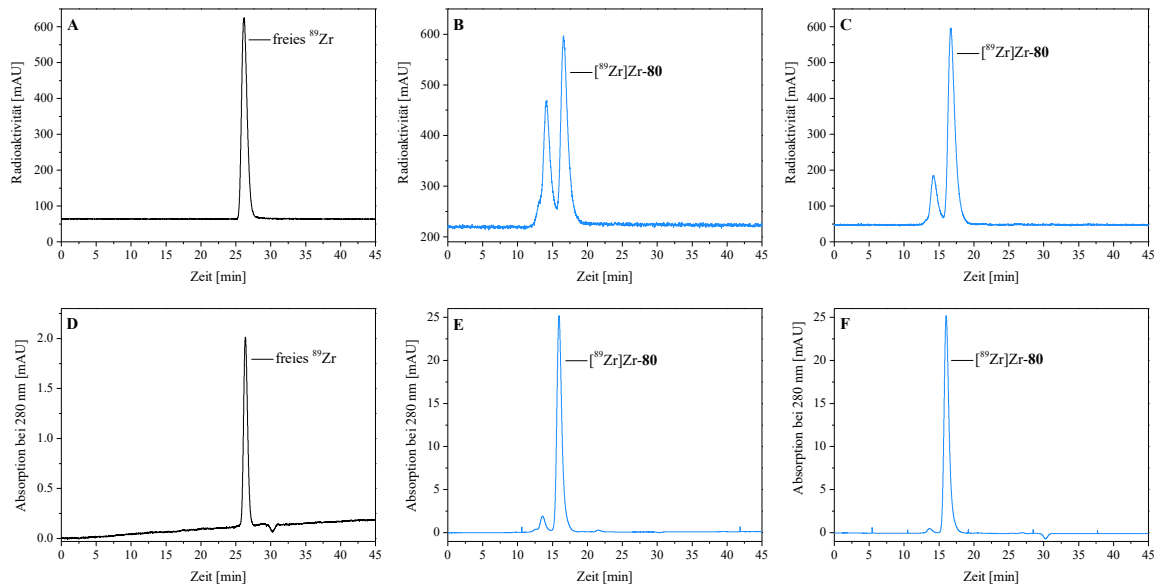


**Abbildung 32.** HPLC-Chromatogramme der Radiomarkierung der Biokonjugate  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  nach der Aufreinigung. Die Radio-Chromatogramme sind in **A – C** und die zugehörigen UV-Chromatogramme in **D – F** dargestellt.

Alle Biokonjugate **78 – 80** konnten mit hoher Effizienz markiert werden, jedoch zeigten die SEC-HPLC-Chromatogramme, dass zusätzlich zu den erwarteten Produkten ( $R_t = 16.5$  min) jeweils ein weiteres Produkt ( $R_t = 14.1$  min) gebildet wurde. Aufgrund der niedrigeren Retentionszeit auf der Größenausschluss säule können die Nebenprodukte einem Antikörperdimer zugeordnet werden. Während die geringste Aggregatbildung bei  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}^*\text{-Cetuximab}$  (**79**) beobachtet wurde und der Effekt auch für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-Cetuximab}$  (**78**) nur geringfügig ausgeprägt war, wurde bei der Verwendung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) als Chelator ein hoher Dimeranteil gebildet. Die Dimerisierung konnte auch in den UV-Chromatogrammen beobachtet werden. Interessanterweise sind darin die Anteile der Dimere deutlich geringer als in den Radio-Chromatogrammen, sodass lediglich bei 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) ein signifikanter Dimeranteil beobachtet wurde. Dies kann durch ein höheres  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$ -Ionen-zu-Aggregat-Verhältnis des Dimers gegenüber dem Monomer erklärt werden. Bei der Reduzierung der eingesetzten  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Oxalat}$  Menge um die Hälfte (25 MBq/mg) wurde auch der Anteil an Dimer stark reduziert (Abbildung 33). Die Bildung des Dimers lässt sich daher nicht über die Dimerisierung durch die Komplexbildung eines  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$ -Ions durch zwei 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Chelatoren erklären, da mit zunehmender  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$ -Konzentration die Anzahl an freien 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Chelatoren, die für die Dimerisierung notwendig sind, abnehmen würde. Die Radiomarkierungen wurden zudem unter Verwendung von Biokonjugaten, die unter den gleichen Bedingungen mit gleicher

## Ergebnisse und Diskussion

Beladungszahl hergestellt wurden, durchgeführt. Insgesamt ergibt sich daraus, dass der Chelator selbst einen Einfluss auf die Bildung des Aggregats besitzt.



**Abbildung 33.** HPLC-Chromatogramme des freien  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$  und der Radiomarkierungslösungen des Biokonjugates  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  mit einer spezifischen Aktivität von 50 MBq/mg (**B** bzw. **E**) und 25 MBq/mg (**C** bzw. **F**). Die Radio-Chromatogramme sind in **A – C** und die UV-Chromatogramme in **D – F** dargestellt.

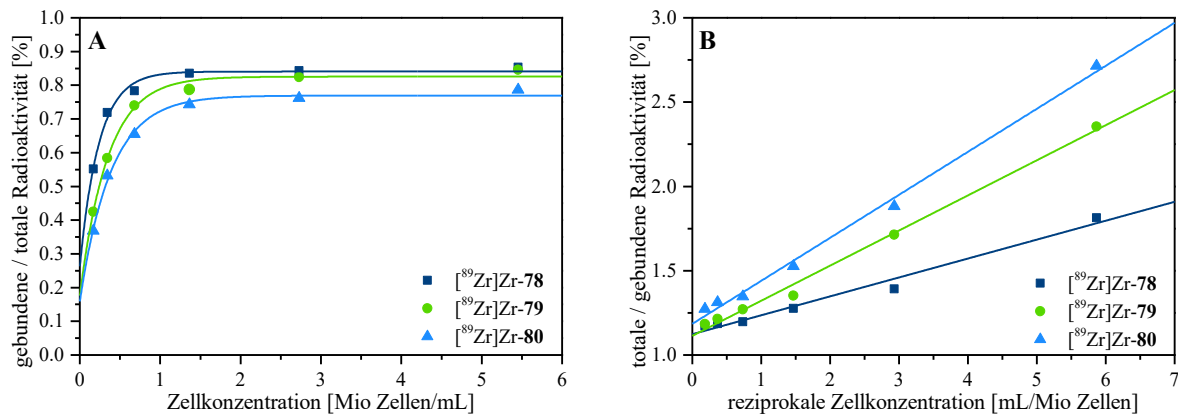
### 3.3.3. Immunoreaktivität

Der Herstellungsprozess der Biokonjugate, die Radiomarkierung, aber auch die konjugierten Chelatoren selbst können einen Einfluss auf die biologische Aktivität des Cetuximabs haben. Auch um einen negativen Einfluss der Aggregation, insbesondere bei der Verwendung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO), auf die Immunoreaktivität auszuschließen, wurde daher im Folgenden die Immunoreaktivität der radiomarkierten Chelator-Cetuximab-Biokonjugate  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  mittels *in vitro*-Bindungsassay nach LINDMO *et al.* bestimmt.<sup>[37]</sup>

Für diesen Zweck wurde die humane Epidermoidkarzinom-Zelllinie A431, die den EGFR in hohem Maß überexprimiert und daher häufig als Modellzelllinie für die Evaluierung von EGFR-spezifischen Radiotracer eingesetzt wird, verwendet.<sup>[112]</sup>

Zunächst wurden vier Aliquote mit je 6 Mio. Zellen/mL in DPBS (versetzt mit 1 % Bovinem Serumalbumin (BSA)) hergestellt. Dabei enthielt eines der Aliquote einen Überschuss an nicht-radiomarkiertem Cetuximab und stellte daher durch die spezifische Blockade der EGFR-Rezeptoren auf der Zelloberfläche die Negativkontrolle dar. Ausgehend von den Aliquoten wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Zu den verschiedenen Zellkonzentrationen

wurde eine definierte Menge von 0.15 kBq (6 ng) des jeweiligen radiomarkierten Immukonjugates [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 – [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-80 gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden erfolgte die Abtrennung der Zellen von der Lösung durch Zentrifugation. Die Zellgebundene Aktivität als auch die eingesetzte Gesamtaktivität wurde schließlich im Gammazähler bestimmt.



**Abbildung 34.** Exemplarische Darstellung der Lindmo-Plots zur Bestimmung der immunreaktiven Fraktion von [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 – [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-80. **A:** Bindungskurven; **B:** doppelt reziproke Auftragung bzw. Lindmo-Plots.

Für alle Experimente wurde in der Negativkontrolle eine unspezifische Bindung von  $< 2\%$  bestätigt. Aus jedem einzelnen Experiment wurde die immunreaktive Fraktion des radiomarkierten Antikörpers mittels Lindmo-Plot bestimmt (Abbildung 34).<sup>[37]</sup> Die immunreaktive Fraktion entspricht dabei dem Kehrwert des Ordinatenabschnitts.

Alle radiomarkierten Biokonjugate [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 – [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-80 wiesen eine vergleichbar hohe Immunreaktivität von 86 – 88 % auf, siehe Tabelle 6.

**Tabelle 6.** Ermittelte Immunreaktivität der radiomarkierten Biokonjugate [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 – [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-80 mit  $n = 3$  unter Angabe des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung.

Substanz	Chelator	Immunreaktivität [%]
[ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78	DFO	$86.5 \pm 3.6$
[ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-79	DFO*	$88.1 \pm 2.7$
[ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-80	3,4,3-(LI-1,2-HOPO)	$87.6 \pm 1.7$

Weder hatte die Verwendung verschiedener Chelatoren, noch die Dimerisierung bei der Verwendung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) als Komplexbildner einen signifikanten Einfluss auf Immunreaktivität. Somit sind alle hergestellten und radiomarkierten Chelator-Cetuximab-Biokonjugate [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 – [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-80, im Hinblick auf die biologische Aktivität,

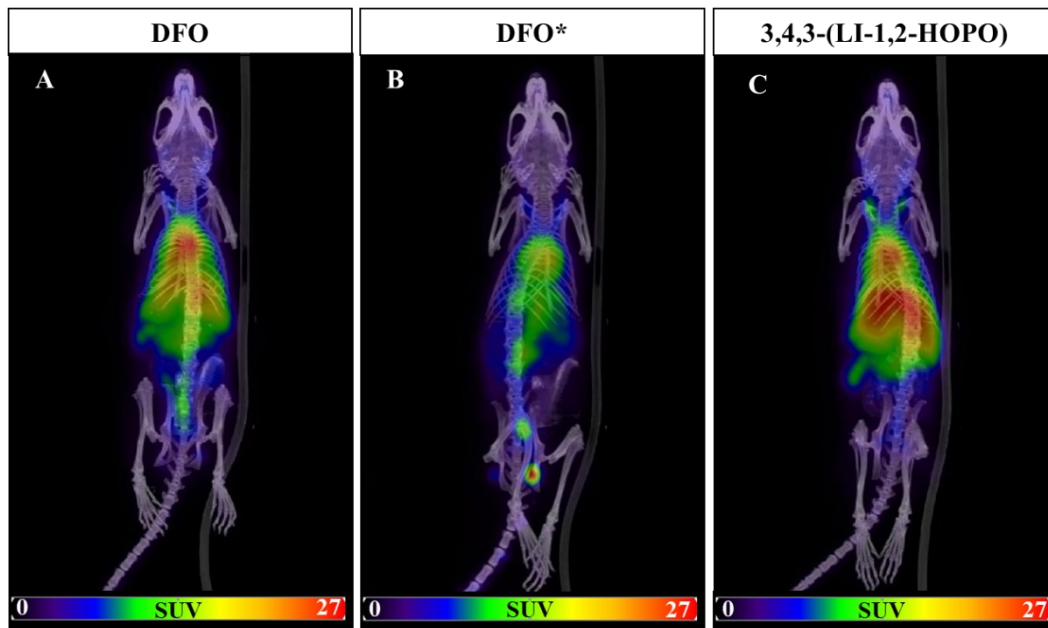
gleichermaßen für den Einsatz in den *in vivo*-PET-Studien zur Bildgebung von EGFR-positiven Tumoren geeignet.

### 3.3.4. *In vivo*-Bildgebung und *ex vivo*-Biodistribution

Zur Klärung der Schlüsselfrage dieser Arbeit, welcher der Chelatoren DFO\* oder 3,4,3-(LI-1,2-HOPO), am besten für den Einsatz in der humanen Immuno-PET geeignet ist, wurde abschließend eine *in vivo*- und *ex vivo*-Tierstudie durchgeführt.

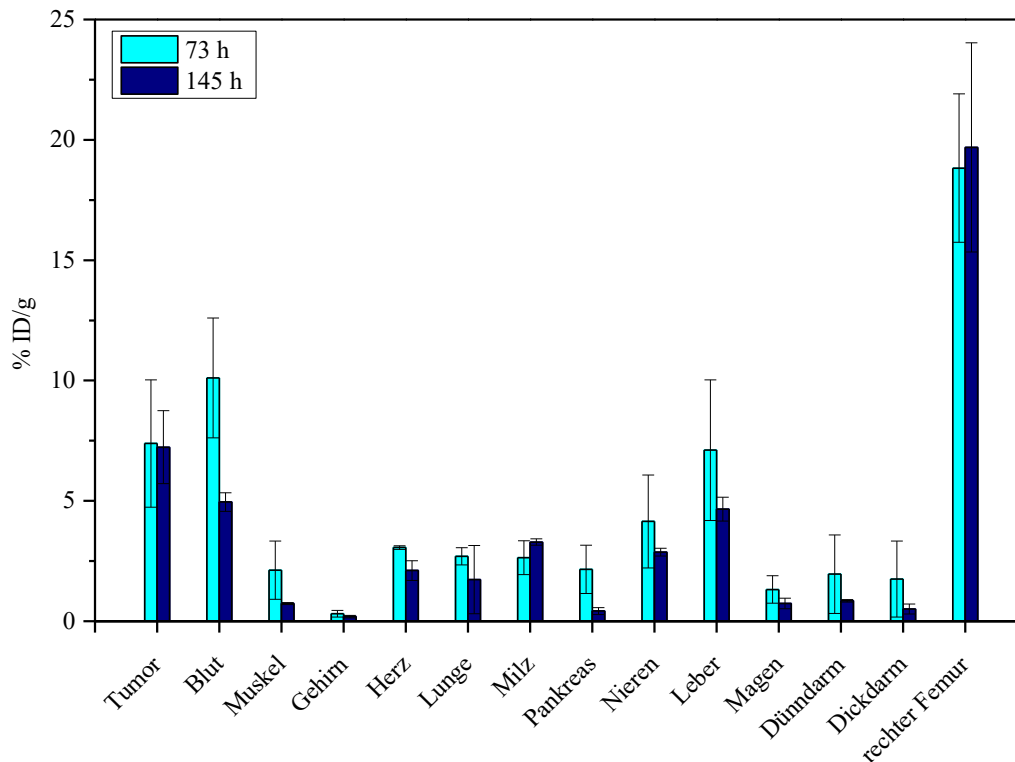
Für diesen Zweck wurden 6 Wochen alten weiblichen Nacktmäusen (Balb/cAnNRj-Foxn1<sup>nu/nu</sup>) 2.5 – 5 Mio. HT-29-Zellen subkutan (s.c.) in die rechte hintere Flanke injiziert. HT-29 ist eine humane Darmkrebszelllinie, die wie A431-Zellen den EGFR-Rezeptor überexprimiert und daher häufig als Modellzelllinie in der Testung von EGFR-Inhibitoren wie Cetuximab und EGFR-bindender Radiotracer verwendet wird. 12 – 14 Tage nach der Tumorzellinokulation erfolgte die Injektion der zuvor markierten Biokonjugate.  $5.37 \pm 2.38$  MBq [<sup>89</sup>Zr]Zr-78 (n = 7),  $5.73 \pm 3.05$  MBq [<sup>89</sup>Zr]Zr-79 (n = 7) oder  $4.42 \pm 2.37$  MBq [<sup>89</sup>Zr]Zr-80 (n = 7) wurden hierbei in die laterale Schwanzvene der tumortragenden Tiere appliziert. Direkt, 72 h und 144 h nach der i.v.-Injektion erfolgten die PET/CT-Messungen. Hierbei wurde jeweils erst eine statische PET-Messung über 60 min und im Anschluss die CT-Aufnahme durchgeführt. Nach 144 h oder bei Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere mittels zervikaler Dislokation geopfert. Anschließend wurden Tumor, Blut, Muskel, Gehirn, Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Nieren, Magen, Dünndarm, Dickdarm, rechter und linker Femur, Sternum und Schädel entnommen, gewogen und im  $\gamma$ -Counter vermessen. Aus den erhaltenen Werten wurde für jedes Organ der Anteil der injizierten Dosis pro Gramm (%ID/g) bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation des <sup>89</sup>Zr-markierten Cetuximab-Derivates wurde, wie erwartet, für alle Radiotracer aufgrund der langsamen Pharmakokinetik des Antikörpers nur eine geringfügige Tumoranreicherung in den PET-Aufnahmen beobachtet (Abbildung 35).



**Abbildung 35.** Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) der PET/CT-Messungen direkt nach der Injektion der  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Chelator-Cetuximab-Biokonjugate [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 (A); [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-79 (B) und [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-80 (C).

Nach 72 h und 144 h post i. v. Injektion sind die Tumore bei der Verwendung aller  $^{89}\text{Zr}$ -markierter Biokonjugate deutlich zu erkennen (Abbildung 37), jedoch ist die Visualisierung nach 144 h auf Grund der geringeren Hintergrundaktivität deutlich verbessert. Zwei der Tiere, denen der Radiotracer [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 appliziert wurde, wurden vorzeitig nach den PET/CT-Aufnahmen nach 73 h geopfert, da ein Abbruchkriterium erreicht wurde (Tumor zu groß). Der Vergleich der *ex vivo*-Biodistributionsdaten, die für [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78 nach 73 und 145 h erhalten wurden, bestätigt die höhere Hintergrundaktivität bei 72 h nach Injektion (Abbildung 36). So ist das Tumor/Blut-Verhältnis nach 72 h  $0.73 \pm 0.23$  und nach 144 h mit  $1.46 \pm 0.33$  etwa doppelt so hoch. Zudem zeigen die Daten, dass die Höhe der Anreicherung im Tumor für [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO-Cetuximab ([ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-78) nach 73 h nahezu unverändert blieb (Abbildung 36).



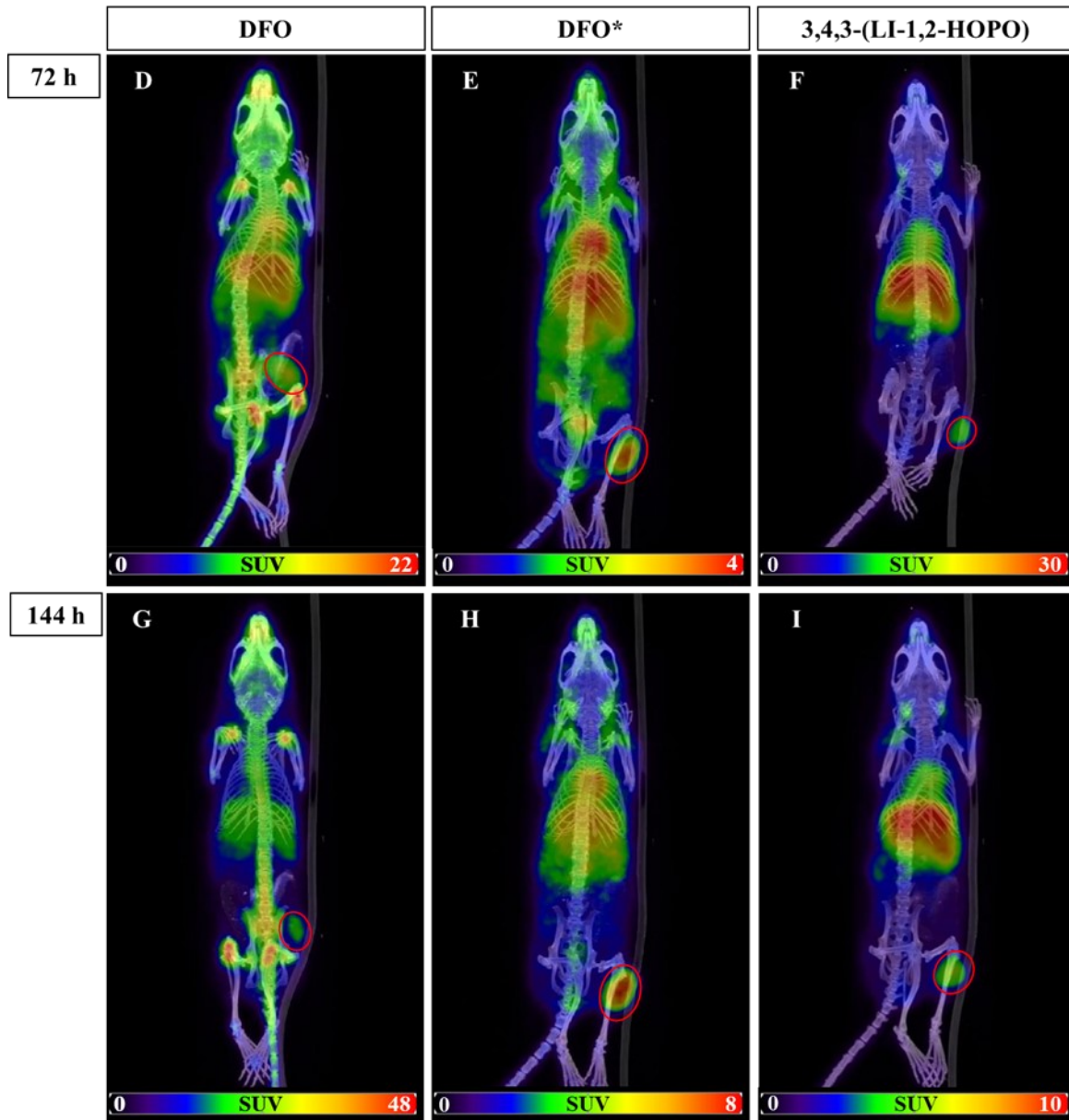
**Abbildung 36.** Graphische Darstellung der *ex vivo*-Biodistribution als %ID/g bei 73 h (hellblau) und 145 h (dunkelblau) nach der Injektion von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$ . Pro Gruppe wurden zwei (73 h) bzw. fünf Tiere (145 h) untersucht.

Die Verwendung der verschiedenen  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatoren führte insgesamt zu erheblichen Unterschieden in Bezug auf die Biodistribution der jeweiligen  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörper. So besitzt das DFO-Cetuximab-Biokonjugat  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$  die schnellste Clearance mit den geringsten Restaktivitätsmengen im Blut und den Ausscheidungsorganen, aber auch mit Abstand die höchste Aufnahme von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$  in den Knochen (Abbildung 37). Hierbei erklärt die Anreicherung in die Knochen (Schultern, Knie, Hüfte und Wirbelkörper) die hohe Clearance und die im Vergleich zu  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-79}$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  geringere Tumoranreicherung. Des Weiteren wird hierdurch die geringe kinetische Inertheit des  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ -Komplexes deutlich, die zur Freisetzung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$  und dessen Anreicherung in die phosphatreichen Hydroxylapatit-Knochen-Matrix führt. Diese Ergebnisse bestätigen die in den vorangehenden Studien sowie in den EDTA-Challenge-Experimenten demonstrierte geringe kinetische Inertheit des  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}$ -Komplexes.

Im Gegensatz dazu weisen  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-79}$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  nur eine geringe Anreicherung des Radiometalls im Knochen und damit, wie erwartet, eine hohe kinetische Inertheit der Komplexe  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO}^*$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)}$  auf. Zwar ist die Aufnahme der von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}^{4+}$  in den Knochen vergleichbar hoch, jedoch unterscheiden sich beide



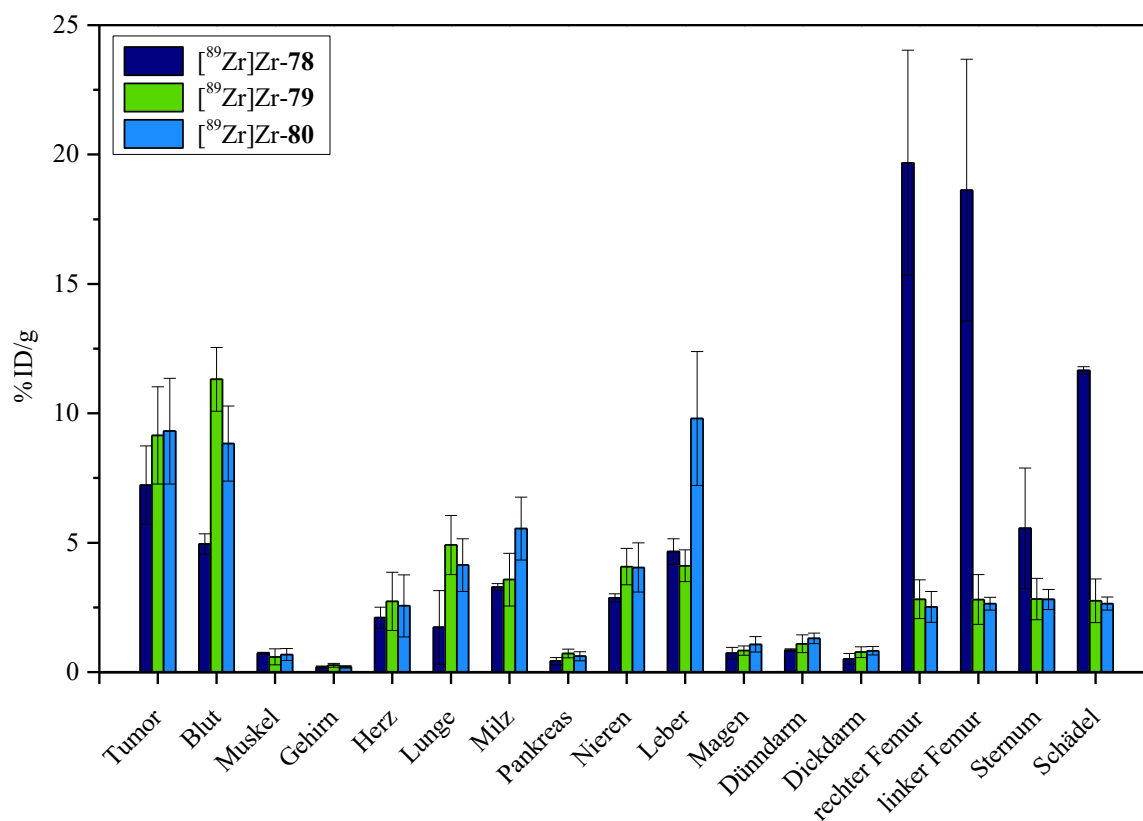
Biokonjugate im Hinblick auf ihre Biodistribution in Leber und Milz (Abbildung 37). Daher sind sie nicht gleichermaßen gut für den Einsatz in der *in vivo*-Bildgebung geeignet. [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**80** weist im PET/CT im Vergleich zu [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**78** und [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**79** eine deutlich höhere Anreicherung in Leber und Milz auf.



**Abbildung 37.** Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) der PET/CT-Messungen 72 h und 144 h nach der Injektion der  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Chelator-Cetuximab-Biokonjugate [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**78** (**D** + **G**), [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**79** (**E** + **H**) und [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**80** (**F** + **I**). Die Tumore sind mit roten Kreisen gekennzeichnet.

Dies wird durch die *ex vivo*-Biodistributionsdaten nach 145 h, die direkt im Anschluss an das letzte PET/CT erhalten wurden, bestätigt (Abbildung 38, Tabelle 7). Folglich sind die Tumor-zu-Hintergrundverhältnisse in Bezug auf Leber und Milz für [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**80** deutlich niedriger als

für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-79}$ . Für alle weiteren Organe wurde eine ähnliche Bioverteilung für  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-79}$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  beobachtet.



**Abbildung 38.** Graphische Darstellung der *ex vivo*-Biodistribution 145 h nach der Injektion von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$  (dunkelblau),  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-79}$  (grün) und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  (hellblau).

**Tabelle 7.** Ergebnisse der *ex vivo*-Biodistributionsstudien ermittelt 145 h nach der Injektion von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$  –  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$  in HT-29-tumortragenden Mäusen. Pro Gruppe wurden fünf ( $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$ ) bzw. sieben ( $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-79}$  und  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$ ) Mäuse verwendet. Die Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung in %ID/g angegeben.

Organe	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-78}$	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-79}$	$[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-80}$
<b>Tumor</b>	7.23 ± 1.52	9.15 ± 1.88	9.31 ± 2.04
<b>Blut</b>	4.95 ± 0.39	11.31 ± 1.23	8.83 ± 1.45
<b>Muskel</b>	0.73 ± 0.04	0.59 ± 0.31	0.68 ± 0.23
<b>Gehirn</b>	0.19 ± 0.05	0.27 ± 0.07	0.20 ± 0.04
<b>Herz</b>	2.10 ± 0.41	2.73 ± 1.12	2.56 ± 1.20
<b>Lunge</b>	1.72 ± 1.42	4.91 ± 1.14	4.14 ± 1.02
<b>Milz</b>	3.29 ± 0.13	3.57 ± 1.02	5.54 ± 1.22
<b>Pankreas</b>	0.42 ± 0.14	0.72 ± 0.17	0.61 ± 0.17
<b>Nieren</b>	2.87 ± 0.16	4.08 ± 0.70	4.04 ± 0.95
<b>Leber</b>	4.66 ± 0.49	4.11 ± 0.61	9.80 ± 2.58
<b>Magen</b>	0.74 ± 0.22	0.83 ± 0.18	1.07 ± 0.30

<b>Dünndarm</b>	0.84 ± 0.05	1.10 ± 0.34	1.31 ± 0.20
<b>Dickdarm</b>	0.51 ± 0.21	0.78 ± 0.21	0.82 ± 0.17
<b>rechter Femur</b>	19.68 ± 4.35	2.82 ± 0.75	2.52 ± 0.60
<b>linker Femur</b>	18.62 ± 5.06	2.81 ± 0.96	2.64 ± 0.25
<b>Sternum</b>	5.56 ± 2.33	2.82 ± 0.80	2.81 ± 0.39
<b>Schädel</b>	11.66 ± 0.14	2.76 ± 0.84	2.64 ± 0.25

Die hohe kinetische Inertheit beider Komplexe, dem [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO\*- und [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Komplex, in den *in vivo*-Experimenten, bestätigen die Ergebnisse der zuvor durchgeführten vergleichenden EDTA-Challenge-Experimente. Im Hinblick auf ihre kinetische Inertheit und des damit verbundenen hohen Tumor-zu-Hintergrundverhältnisses sind beide Chelatoren gleichermaßen zur Komplexbildung und für den Einsatz in der Bildgebung geeignet, jedoch unterscheiden sich die Chelator-Cetuximab-Biokonjugate in ihrer weiteren Bioverteilung. Die Verwendung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) als Komplexbildner führt gegenüber DFO\* und DFO zu einer verstärkten Akkumulation in Leber und Milz. Der Grund für die höhere Akkumulation in den genannten Organen ist wahrscheinlich die höhere Lipophilie von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) gegenüber DFO\* und DFO (siehe Kapitel 3.2.3). Dass bereits das Einbringen kleiner lipophiler Moleküle in Antikörper zur verstärkten Akkumulation der Biokonjugate in Leber und Milz führen kann, wurde bereits beobachtet und hier bestätigt.<sup>[113]</sup> Eine unspezifische Akkumulation in der Leber kann die Detektion von krankhaften Leberveränderungen, wie Lebermetastasen, stören, sodass 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) keinen optimalen Chelator zur Einführung von [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr<sup>4+</sup> in Biomoleküle darstellt.<sup>[114]</sup>

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass zwar beide Chelatoren DFO\* und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)  $^{89}\text{Zr}$ -Komplexe mit hoher kinetischer Inertheit bilden, jedoch die hohe Lipophilie von [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Cetuximab das pharmakokinetische Profil derivatisierter Biomoleküle negativ beeinflusst. DFO\* stellt damit den derzeit vielversprechendsten Kandidaten zur  $^{89}\text{Zr}$ -Radiomarkierung von Biomolekülen dar und kann somit am besten den aktuellen klinischen Standard DFO in der Immuno-PET ersetzen.



## 4. Kapitel 2: Synthese eines neuen bifunktionellen CB-Chelators und Vergleich der $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren

Teilergebnisse des vorliegenden Kapitels wurden vorab in *ChemMedChem*<sup>[115]</sup> publiziert.

### 4.1. Synthese

Nachfolgend wird die Synthese der vergleichend zu untersuchenden Chelator-TATE-Derivate beschrieben. Während die selektiv geschützten Chelatoren DOTA(*t*Bu)<sub>3</sub>, DOTA-GA(*t*Bu)<sub>4</sub> und *R*-NODA-GA(*t*Bu)<sub>3</sub> kommerziell erhältlich sind, wurde der neue Chelator CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> (**34**) ausgehend von CB-Cyclen (**35**) hergestellt.

#### 4.1.1. CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub>

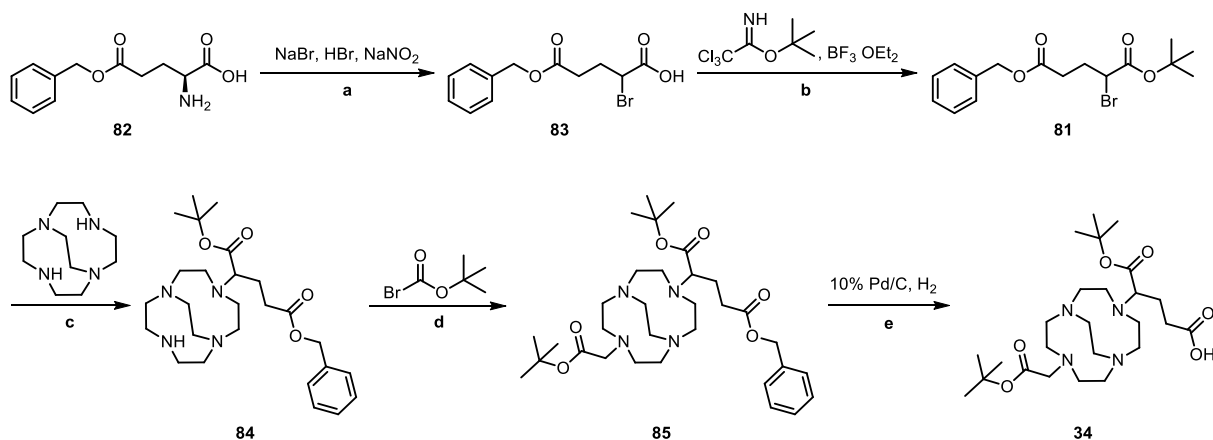
Für die Herstellung von CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> (**34**) wurde zunächst 5-Benzyl-1-*tert*-butyl-2-brompentandioat (**81**) nach EISENWIENER *et al.* synthetisiert (Schema 11).<sup>[116]</sup> Im ersten Schritt erfolgte hierbei die Diazotierung der Aminogruppe von *L*-Glutaminsäure-5-benzylester (**82**) mit Natriumnitrit und die anschließende nucleophile Substitution durch Bromid. Die Carbonsäure (**83**) wurde im Anschluss unter Verwendung von 2,2,2-Trichloracetimid säure-*tert*-butylester (TBTA) und Bortrifluorid diethyletherat *t*Bu-geschützt.

Die Herstellung von CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> (**34**) erfolgte unter Verwendung von CB-Cyclen (**35**), welches zunächst mit 1 Äq. **81** umgesetzt wurde (Schema 11). Hierbei wurde die Ausbeute durch die Bildung des zweifach-substituierten Produkts, das in einem Verhältnis von 37:63 gebildet wurde, stark herabgesetzt. Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC wurde **84** als TFA-Salz mit einer Ausbeute von 39 % erhalten.

**84** wurde nun mit 1.37 Äq. *tert*-Butylbromacetat umgesetzt. Neben dem Hauptprodukt **85** bildeten sich zusätzlich zwei Nebenprodukte, die jedoch mittels semipräparativer HPLC nur unzureichend abgetrennt werden konnten, wodurch die Reinheit des Produktes nur 90.9 % betrug.

## Ergebnisse und Diskussion

Im letzten Schritt folgte die Abspaltung der Bn-Schutzgruppe mittels Hydrierung unter Verwendung von 10 % Pd/C und **34** wurde in einer Ausbeute von 75 % erhalten. Die Reinheit des Produktes von 92.5 % war für die weitere Umsetzung ausreichend.



**Schema 11.** Synthese von CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> (**34**). **(a)** 3.50 Äq. Natriumbromid, 1.80 Äq. Natriumnitrit in 1 M HBr-Lösung, 0 °C, 2 h, dann 1.70 Äq. Schwefelsäure, Diethylether, Ausbeute: 45 %; **(b)** 2.20 Äq. *tert*-Butyltrichloroacetimidat, 0.16 Äq. Bortrifluoriddiethyletherat, 2.70 Äq. Dimethylacetamid in Chloroform/Cyclohexan (1:1, v/v), RT, 3 d, Ausbeute: 81 %; **(c)** 1.0 Äq. CB-Cyclen (**35**), 1.0 Äq. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeCN, 0 °C für 5 h dann RT für 3 d, Ausbeute: 40 %; **(d)** 1.25 Äq. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.37 Äq. *tert*-Butylbromoacetat in MeCN, RT, 2 d, Ausbeute: 59 %; **(e)** H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C in THF/Wasser (1:1, v/v), RT, 18 h, Ausbeute: 75 %.

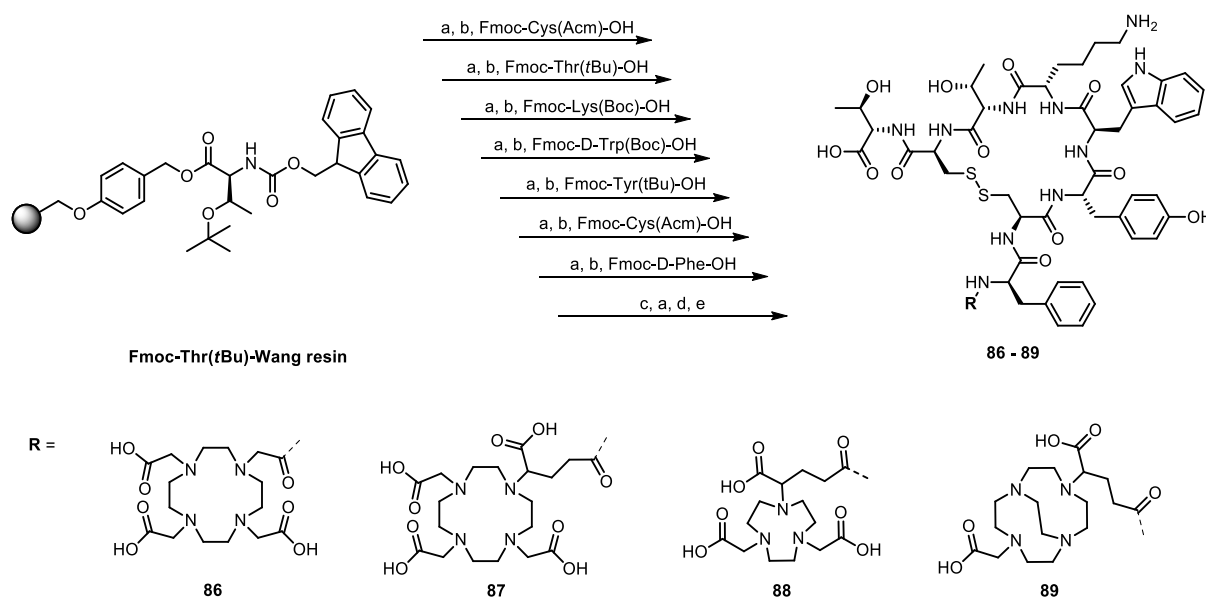
### 4.1.2. Chelator-TATE-Derivate

Zur vergleichenden Untersuchung der <sup>68</sup>Ga-Chelatoren wurden diese zunächst mittels Festphasenpeptidsynthese in das Peptid TATE eingebracht.

TATE bzw. [Tyr<sup>3</sup>, Thr<sup>8</sup>]-Ocreotid ist ein Somatostatin-Analogon, welches mit hoher Selektivität an den Rezeptor-Subtyp SST<sub>2</sub> bindet. Insbesondere der SST<sub>2</sub>-Rezeptor wird in neuroendokrinen Tumoren (NETs) und Neoplasmen (NENs) überexprimiert. [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-TATE ist daher in der molekularen Bildgebung dieser Tumore von großer Bedeutung.<sup>[11]</sup>

Die verschiedenen Chelator-TATE-Derivate wurden in Anlehnung an eine literaturbeschriebene Fmoc-basierten Festphasenpeptidsynthese in Verbindung mit einem Ultraschallbad für Kupplungsreaktion hergestellt (Schema 12).<sup>[117]</sup> Zunächst erfolgte der Aufbau der Peptidsequenz analog zu Kapitel 3.2.1 unter Verwendung eines Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harzes. Nachdem die Peptidsequenz Fmoc-D-Phe-Cys(Acm)-Tyr(*t*Bu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(*t*Bu)-Cys(Acm)-Thr(*t*Bu)-Wang vollständig war, erfolgte die Cyclisierung durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke. Hierfür war eine selektive Schützung bzw.

Entschützung der Thiolgruppen notwendig. Bei der Synthese wurden daher Acetamidomethyl (Acm)-geschützte Cysteine verwendet. Diese konnten unter Verwendung von Thallium(III)trifluoracetat abgespalten werden. Gleichzeitig führt die Verwendung von Thallium(III)trifluoracetat zur Oxidation der Thiolgruppen und damit zur Ausbildung der Disulfidbrücke. Im Folgenden wurde die Fmoc-Schutzgruppe des Peptids entfernt. Der entsprechende Chelator DOTA(*t*Bu)<sub>3</sub>, DOTA-GA(*t*Bu)<sub>4</sub>, *R*-NODA-GA(*t*Bu)<sub>3</sub> oder CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> wurde auf fester Phase unter Verwendung von HBTU und DIPEA mit dem Peptid umgesetzt. Abschließend erfolgte die Abspaltung vom Harz und gleichzeitig wurden die säurelabilen Schutzgruppen unter Verwendung der Abspaltungslösung TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (v/v/v) entfernt. Während DOTA-TATE (**86**), DOTA-GA-TATE (**87**) und *R*-NODA-GA-TATE (**88**) in einer guten Ausbeuten von 63 %, 46 % und 36 % erhalten wurden, war die Ausbeute für CB-DO2A-GA-TATE (**89**) mit 18 % deutlich niedriger. Grund hierfür war die Verwendung von nur 1.6 Äq. anstelle von 2.5 Äq. des Chelators als auch eine insgesamt geringere Ansatzgröße. Jedoch wurde auch **89** in ausreichender Menge für die Radiomarkierungsversuche und anschließenden Untersuchungen erhalten.



**Schema 12:** Synthese der TATE-Derivate **86** – **89** unter Verwendung der Fmoc-Strategie. **(a)** Fmoc-Abspaltung: Piperidin in DMF (1:1, v/v), RT, 7 min; **(b)** Aminosäurekupplung: 4.0 Äq. AS, 3.90 Äq. HBTU, 4.0 Äq. DIPEA in DMF, RT, Ultraschallbad, 10 min; **(c)** Cyclisierung: 4.0 Äq. Thallium(III)trifluoracetat in DMF, RT, 45 min; **(d)** Kupplung der Chelatoren: 2.50 Äq. Chelator, 2.45 Äq. HBTU, 5.0 Äq. DIPEA, RT, 3 h; **(e)** Abspaltung vom Harz und Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen: TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5, v/v/v), RT, 3 h, Ausbeuten über acht Stufen: 63 % (**86**), 36 % (**87**), 46 % (**88**) und 18 % (**89**).

## 4.2. $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierungsversuche, Untersuchung der *in vitro*-Stabilität und DTPA-Challenge

Im Folgenden wurden zunächst die Radiomarkierungseigenschaften der in Kapitel 4.1.2 hergestellten TATE-Derivate ermittelt. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Lipophilie der so erhaltenen  $^{68}\text{Ga}$ -basierten Radiotracer, sowie der Serumstabilität. Im letzten Schritt zur vergleichenden Untersuchung der relativen kinetischen Inertheit der verschiedenen  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexe wurden Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)-Challenge-Experimente durchgeführt.

### 4.2.1. $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierung

In der Literatur wurden zur  $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierung von DOTA und DOTA-GA Temperaturen  $\geq 95\text{ }^\circ\text{C}$  benötigt. NODA-GA konnte hingegen bei deutlich milderen Reaktionstemperaturen von  $\leq 45\text{ }^\circ\text{C}$  mit  $^{68}\text{Ga}$  markiert werden. Bei der Verwendung von CB-DO2A-GA wurde analog zu der Komplexierung von  $^{64}\text{Cu}$  mit CB-1,4,8,11-Tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4,11-diessigsäure (TE2A) anstelle von 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure (TETA) eine hohe Reaktionstemperatur erwartet.<sup>[113,118]</sup>

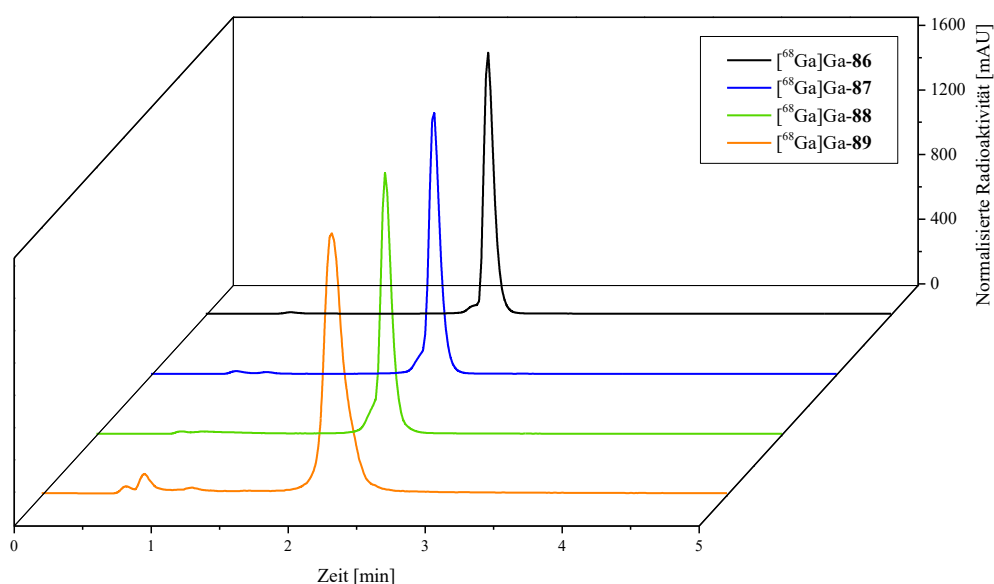
Zunächst wurde  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  durch Elution eines kommerziell verfügbaren  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators mit 0.1 M Salzsäure erhalten. Der pH-Wert der erhaltenen Lösung wurde durch Zugabe eines Natriumacetat-Puffers auf pH 3.9 – 4.1 eingestellt. Zur Evaluierung der optimalen Radiomarkierungsbedingungen der verschiedenen Chelator-TATE-Konjugate **86** – **89** wurden diese zuerst bei einer Temperatur von  $45\text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min radiomarkiert. Hierfür wurden zu 30 – 40 MBq  $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  3 – 4 nmol des jeweiligen Chelator-Peptidkonjugates **86** – **89** gegeben. Wie erwartet, konnte nur  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODA-GA-TATE}$  unter diesen Bedingungen in hoher radiochemischer Reinheit  $\geq 99\%$  erhalten werden. Des Weiteren war die erhaltene radiochemische Reinheit für  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-GA-TATE}$  mit  $\geq 96\%$  deutlich höher als die von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$  mit  $\geq 81\%$ . Grund dafür ist, das DOTA-GA-TATE noch eine zusätzliche Carboxylatgruppe zur  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexierung trägt. Für CB-DO2A-GA-TATE wurde bei  $45\text{ }^\circ\text{C}$  nur 4 % des  $^{68}\text{Ga}$  komplexiert. Folglich wurde die Optimierung der molaren Aktivität für NODA-GA-TATE (**88**) bei  $45\text{ }^\circ\text{C}$  und für die Konjugate **86**, **87** und **89** bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt.



$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-88}$  konnte mit einer optimierten molaren Aktivität von 50 – 55 MBq/nmol bei 45 °C erhalten werden. Die optimierte Aktivität von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  bzw.  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-87}$ , deren Markierungen bei 95 °C abliefen, betragen 30 – 35 MBq/nmol (**86**) bzw. 40 – 45 MBq/nmol (**87**).  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-88}$  konnten somit effektiv mit hoher radiochemischer Reinheit  $\geq 99\%$  hergestellt werden. Im Gegensatz dazu war die Radiomarkierung von **89**, wie erwartet, deutlich ineffektiver. Unter Verwendung von 8.5 MBq  $^{68}\text{Ga}$  und 8.5 nmol CB-DO2A-GA-TATE (**89**) konnte  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  erst nach 20 min bei 95 °C mit einer radiochemischen Reinheit von  $\geq 95\%$  und einer optimierten molaren Aktivität von 1 MBq/nmol erhalten werden. Nachfolgend sind die optimierten Radiomarkierungsbedingungen zusammengefasst (Tabelle 8). Die Radio-HPLC-Chromatogramme der Markierungsprodukte sind in Abbildung 39 dargestellt.

**Tabelle 8.** Zusammenfassung der optimierten Radiomarkierungsbedingungen zur Herstellung von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$ .

Markierungsvorläufer	Temperatur [°C]	Zeit [min]	molare Aktivität [MBq/nmol]	Radiochemische Reinheit [%]
DOTA-TATE ( <b>86</b> )	95	10	30 – 35	$\geq 99$
DOTA-GA-TATE ( <b>87</b> )	95	10	40 – 45	$\geq 98$
NODA-GA-TATE ( <b>88</b> )	45	10	50 – 55	$\geq 99$
CB-DO2A-GA-TATE ( <b>89</b> )	95	20	1	$\geq 95$



**Abbildung 39.** Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  nach der Herstellung unter optimierten Reaktionsbedingungen.

Der Grund für die wenig effektive  $^{68}\text{Ga}$ -Inkorporation ist im Fall von **89** die hoch rigide Struktur des CB-DO2A-GA. Wie oben erwähnt wurde dies bereits bei der  $^{64}\text{Cu}$ -Radiomarkierung von CB-DO2A im Vergleich mit CB-TE2A beobachtet.<sup>[36]</sup> Auch wenn die wenig effektive Radiomarkierung zunächst nachteilig ist, kann die hoch-rigide Struktur des Komplexbildners das  $^{68}\text{Ga}$   $\text{Ga}^{3+}$ -Ion vollständig einschließen und so einen Komplex mit hoher kinetischer Inertheit ausbilden.<sup>[95]</sup>

Des Weiteren wurden bei der Radiomarkierung von  $^{68}\text{Ga}$  **89** mehrere Produkte gebildet, die auf eine Enantiomerisierung von  $^{68}\text{Ga}$  **DO2A-GA** zurückzuführen sind. Diese wurde bereits für  $^{\text{nat}}\text{Ga}$ -DO2A-GA beschrieben. Für den Komplex wurde weiterhin eine hohe Enantiomerisierungsbarriere bestimmt, die durch eine hohe Metall-Chelator-Bindung erklärt wird und zudem dissoziative Prozesse inhibiert.<sup>[95]</sup> Daraus kann geschlossen werden, dass die Beobachtung verschiedener Enantiomere keinen Einfluss auf die kinetische Inertheit des Komplexes hat.

Für die nachfolgenden Experimente wurden alle Verbindungen mit einer molaren Aktivität von 1 MBq/nmol hergestellt, um vollständig vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten.

### 4.2.2. Lipophilie

Die Lipophilie besitzt einen hohen Einfluss auf den Metabolisierungsweg des *tracers*. Insbesondere eine hohe Lipophilie führt zur Ausscheidung über das hepatobiliäre System und kann zu einer unspezifischen Organanreicherung führen.<sup>[119,120]</sup>

Über den 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten wurde die Lipophilie der radiomarkierten Chelator-Peptidkonjugate  $^{68}\text{Ga}$  **86** –  $^{68}\text{Ga}$  **89** analog zu Kapitel 3.2.3 bestimmt (Tabelle 9). Der negativ geladene  $^{68}\text{Ga}$  **DOTA-GA**-Komplex weist die höchste Hydrophilie auf. Dies war aufgrund der zwei Carboxylatgruppen, die nicht an der Komplexierung beteiligt sind, zu erwarten. Die neutralen Komplexe  $^{68}\text{Ga}$  **86** und  $^{68}\text{Ga}$  **88** besitzen eine geringfügig niedrigere Hydrophilie.  $^{68}\text{Ga}$  **86** besitzt eine freie Carboxylatgruppe, sodass die Hydrophilie des DOTA-Derivates im Vergleich zu dem *R*-NODA-GA-Derivat noch etwas höher ist. CB-DO2A-GA-TATE (**89**) besitzt die geringste Hydrophilie. Grund hierfür ist die geringere Gesamtanzahl an Carboxylgruppen.

**Tabelle 9.** Ermittelte ( $\log_{D(7.4)}$ )-Werte der Substanzen  $[^{89}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{89}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  mit  $n = 3$  unter Angabe des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung.

Substanz	Chelator	Ladung	$\log_{D(7.4)}$
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$	DOTA	0	$-4.09 \pm 0.07$
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-87}$	DOTA-GA	-1	$-4.11 \pm 0.11$
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-88}$	NODA-GA	0	$-3.72 \pm 0.02$
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$	CB-DO2A-GA	+1	$-3.02 \pm 0.08$

### 4.2.3. Serumstabilität

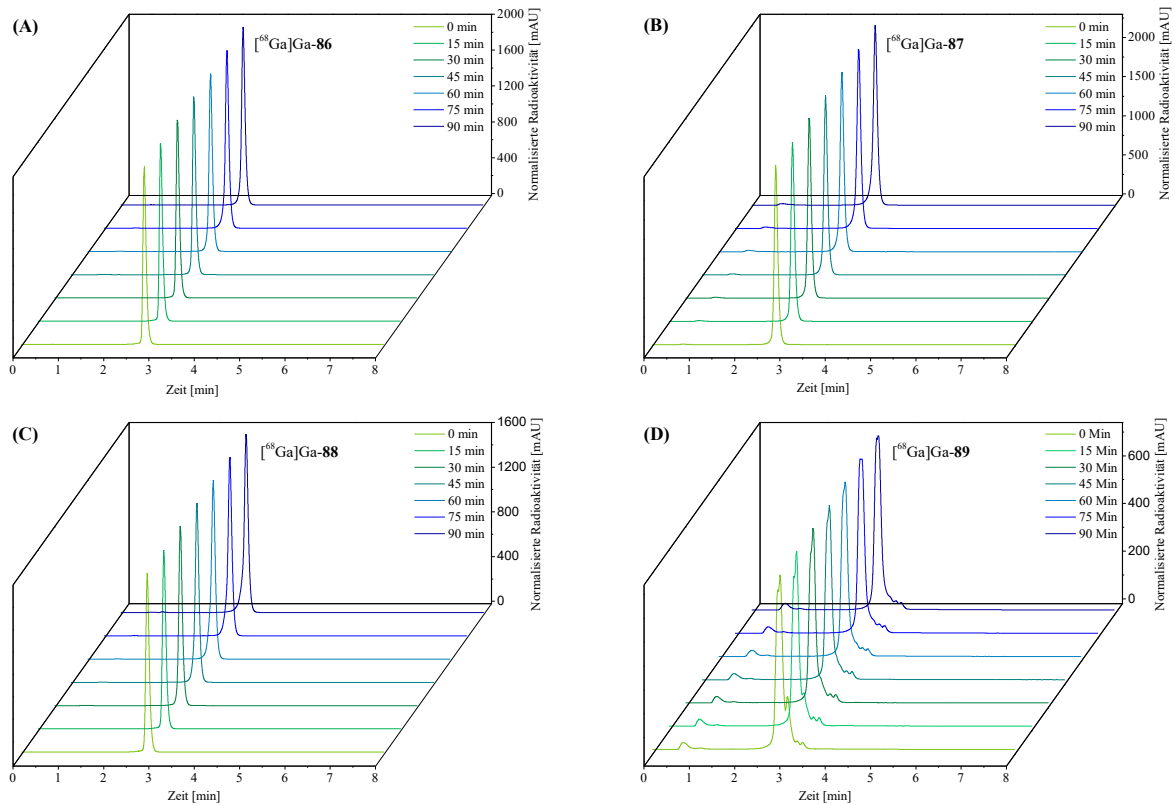
Bei der Entwicklung neuer Arzneimittel spielt die Metabolisierung dieser durch verschiedene Enzyme eine tragende Rolle. Peptide, die intravenös verabreicht werden, unterliegen zwar nicht dem *first-pass-effect*, der bei der oralen Gabe auftritt, jedoch insbesondere der Degradation durch verschiedene Peptidasen in Blut, Leber und Niere.<sup>[120]</sup> Des Weiteren befinden sich im Serum verschiedene Metallionen wie  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , die mit  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$  konkurrieren sowie Proteine wie Transferrin, die  $\text{Ga}^{3+}$  mit hoher thermodynamischer Stabilität komplexieren.<sup>[77,78,121]</sup> Der Abbau der Peptidstruktur, die für die spezifische Bindung zum *target* notwendig sind, aber auch die Transchelatierung führen zu einer geringeren Anreicherung an der Zielstruktur, z. B. dem Tumor und weiterhin zu einer höheren Hintergrundaktivität.

Um den Einfluss der verschiedenen Chelatoren auf die *in vitro*-Stabilität der radiomarkierten  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Chelator-Konjugate vergleichend zu untersuchen, wurde daher die Stabilität der Konjugate  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  in humanem Serum bestimmt. Hierfür wurden die radiomarkierten Peptide für 90 min in humanem Serum bei 37 °C inkubiert. Direkt, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min und 90 min nach der Zugabe zu dem Serum wurde eine Probe entnommen und die Serumproteine mittels Zugabe von eiskaltem Ethanol gefällt. Im Anschluss wurden die Serumproteine durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mittels Radio-HPLC (Abbildung 40) analysiert.

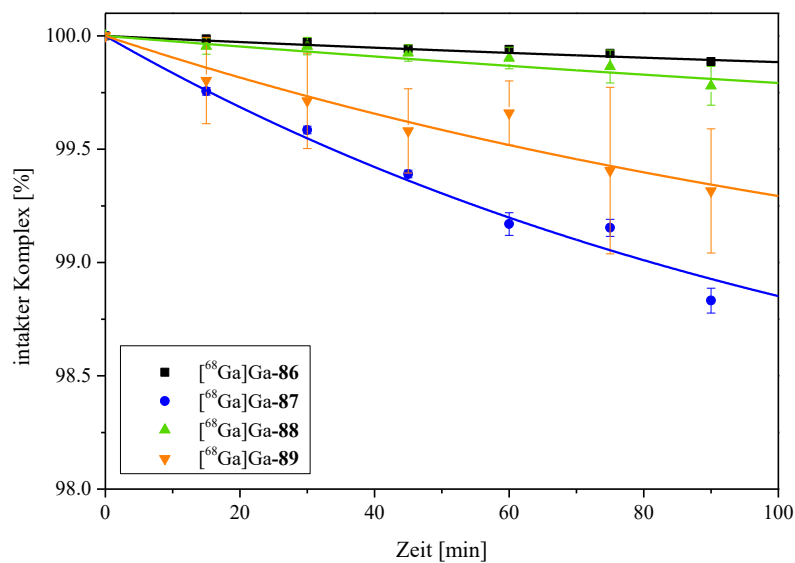
Insgesamt wiesen alle Konjugate  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  eine sehr hohe Serumstabilität auf, sodass nach 90 min noch  $\geq 98.7\%$  der Konjugate intakt waren (Abbildung 41). Auch wenn in den HPLC-Chromatogrammen keine wesentliche  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -Freisetzung beobachtet wurde, könnte  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$  durch seine chemische Ähnlichkeit zu  $\text{Fe}^{3+}$  durch Transferrin gebunden werden und somit zu einer erhöhten Radioaktivität im Serumproteinpellet

## Ergebnisse und Diskussion

führen.<sup>[77,78]</sup> Um dies auszuschließen erfolgte daher die Bestimmung der Aktivität in den Pellets sowie im Überstand. Hierbei trat keine erhöhte Aktivität in den Pellets auf. Die Ergebnisse demonstrieren daher die hohe Stabilität aller Chelatoren gegenüber humanem Serum.



**Abbildung 40.** Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme nach der Inkubation der radiomarkierten Konjugate  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  in humanem Serum nach verschiedenen Inkubationszeit-punkten.

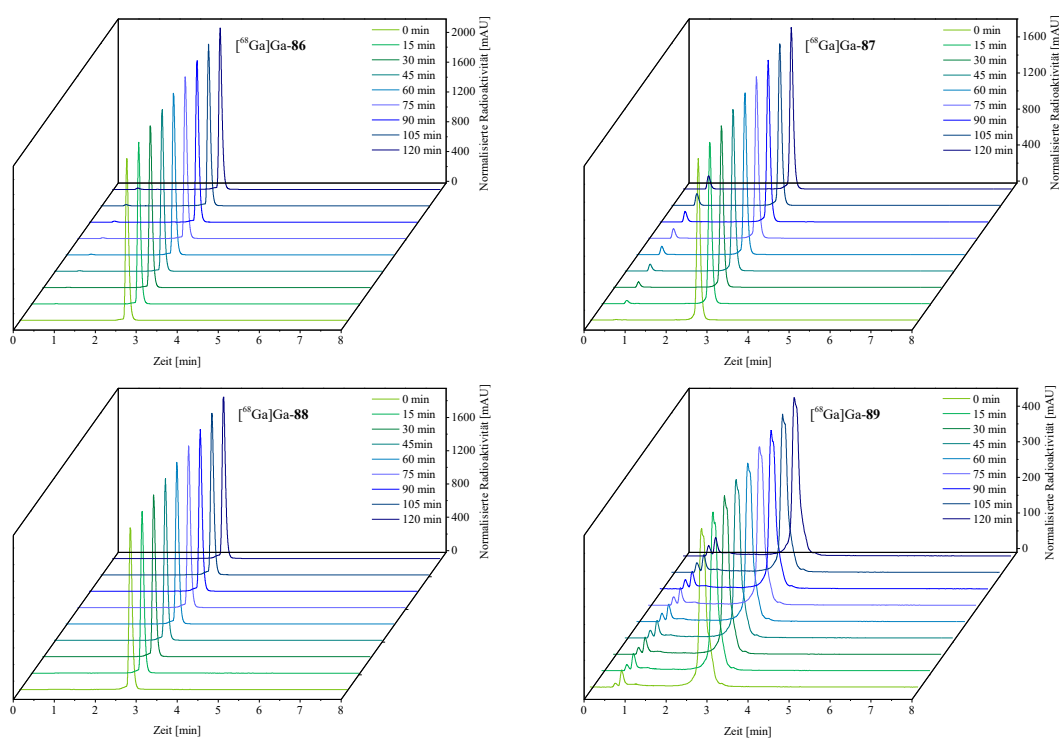


**Abbildung 41.** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Serumstabilitätsuntersuchungen von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  über 90 min. Die Radiochemische Reinheit wurde zum Zeitpunkt 0 min auf 100 % normalisiert.

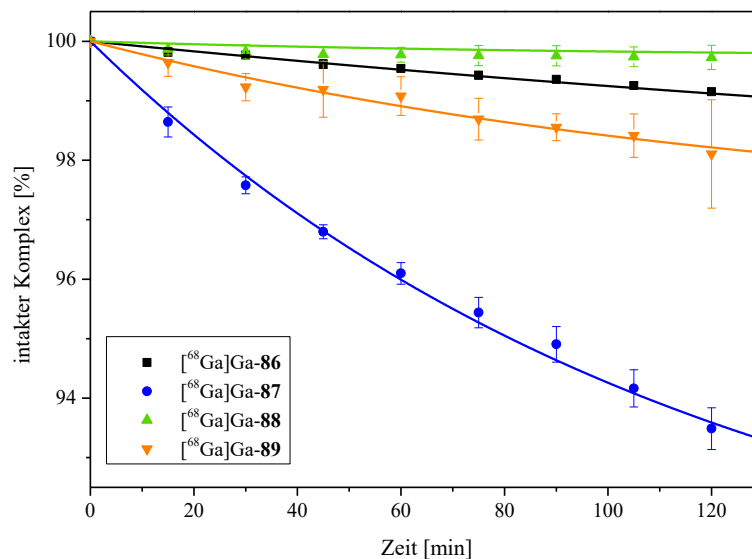
#### 4.2.4. DTPA-Challenge

Zur vergleichenden Untersuchung der kinetischen Inertheit der Chelator-Komplexe von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  wurden Challenge-Experimente gegen 1 000 Äq. DTPA, das, wie EDTA, häufig zur Komplexierung von Metallionen eingesetzt wird, durchgeführt.

Für diesen Zweck wurden die radiomarkierten Konjugate  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  mit 1 000 Äq. DTPA in Natriumacetat-Puffer bei pH 4 inkubiert. Der Transchelatierungsprozess wurde unter Verwendung der Radio-HPLC bei definierten Zeitpunkten über 2 h aufgezeichnet (Abbildung 42).



**Abbildung 42.** Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme nach der Inkubation der radiomarkierten Konjugate  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  mit 1 000 Äq. DTPA nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten.



**Abbildung 43.** Graphische Darstellung der Ergebnisse der DTPA-Challenge-Experimente von [<sup>68</sup>Ga]Ga-**86** – [<sup>68</sup>Ga]Ga-**89** über 120 min. Die Radiochemische Reinheit wurde zum Zeitpunkt 0 min auf 100 % normalisiert.

Abbildung 43 zeigt, dass der Anteil an intaktem Komplex für [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-GA-TATE ([<sup>68</sup>Ga]Ga-**87**) nach 120 min mit < 94 % geringfügig kleiner ist als für die anderen Komplexe. Grund hierfür ist die höhere Anzahl an Carboxylatgruppen, die nicht an der <sup>68</sup>Ga-Komplexierung beteiligt sind. Im Hinblick darauf zeigten PANDYA *et al.*, dass zusätzliche Carboxylate in einem Komplex, die nicht an der Koordination des Metallions beteiligt sind, die kinetische Stabilität senken, statt sie zu erhöhen.<sup>[122]</sup> Die Komplexe [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA, [<sup>68</sup>Ga]Ga-NODA-GA und [<sup>68</sup>Ga]Ga-CB-DO2A-GA waren auch noch nach 120 min mit einer Reinheit von ≥ 98 % nahezu intakt.

Insgesamt wiesen alle [<sup>68</sup>Ga]Ga-Komplexe [<sup>68</sup>Ga]Ga-**86** – [<sup>68</sup>Ga]Ga-**89** sowohl in humanem Serum als auch in der DTPA-Challenge eine sehr hohe kinetische Inertheit auf. Der Anteil an intaktem Komplex war für [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-GA insbesondere bei der DTPA-Challenge am niedrigsten. Die Experimente zeigen, dass der neu entwickelte Chelatbildner CB-DO2A-GA analog zu den etablierten Chelatoren <sup>68</sup>Ga-Komplexe mit einer hohen kinetischen Inertheit bildet und somit ein geeigneter <sup>68</sup>Ga-Chelator für *in vivo*-Anwendungen darstellt.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1. Kapitel 1: Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für $^{89}\text{Zr}$ im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET

Die Immuno-PET verbindet die hohe Sensitivität der PET mit der hohen Affinität und Selektivität von Antikörpern. Aufgrund der langsamen Pharmakokinetik sind die üblichen Radionuklide  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$  oder  $^{68}\text{Ga}$  für die Radiomarkierung der mAbs nicht geeignet.  $^{89}\text{Zr}$  stellt aufgrund seiner Halbwertszeit von 78.41 h, einer hohen Verfügbarkeit und der hohen Ortsauflösung im PET das am besten geeignete Nuklid für den Einsatz in der humanen PET mit Antikörpern.<sup>[13]</sup> Der einzige in klinischen Studien eingesetzte Chelator ist das sechszählige DFO. Allerdings wurde in mehreren präklinischen *in vivo*-Studien eine unzureichende kinetische Inertheit des [ $^{89}\text{Zr}$ ]-DFO-Komplexes, resultierend in einer hohen Anreicherung in Knochen und Gelenken, gezeigt.<sup>[26,16]</sup> In den letzten Jahren wurde eine Reihe neuer Chelatoren für  $^{89}\text{Zr}$  entwickelt, die auf einer vollständigen Absättigung der Koordinationssphäre (acht Koordinationsstellen) beruhen.<sup>[59,68,73,69,70]</sup>

Um die Schlüsselfrage zu beantworten, welcher der neuen Chelatoren am besten für den Einsatz in der humanen PET geeignet ist und somit DFO in den klinischen Anwendungen ersetzen sollte, wurden in der vorliegenden Arbeit sechs Chelatoren DFO\*, CTH36, 3,4,3-(LI-1,2-HOPO), DOTA, NOTA und DFO, das als Referenz diente, im Hinblick auf ihre Radiomarkierungseigenschaften, kinetische Inertheit und Pharmakokinetik vergleichend untersucht.

Im ersten Schritt erfolgte die Synthese der bifunktionellen Chelator-Tetrazin-Derivate, die neben der Komplexierung von [ $^{89}\text{Zr}$ ] $\text{Zr}^{4+}$  auch die Konjugation mit dem Biomolekül unter identischen Bedingungen erlaubt. CTH36- (**25**) und NODA-GA-Tetrazin (**29**) waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Während die Tetrazin-Derivate von DFO **24**, DFO\* **27** und DOTA-GA **26** problemlos synthetisiert werden konnten, war die Synthese des 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Derivates **28** mit einer Anpassung der Syntheseroute sowie der Zielstruktur verbunden. Insgesamt wurden alle Tetrazin-Derivate in ausreichender Menge für die nachfolgenden Experimente erhalten.

Zur Bestimmung der Radiomarkierungseigenschaften der Chelatoren und der kinetischen Inertheit der gebildeten [ $^{89}\text{Zr}$ ]-Chelator-Komplexe wurden die Tetrazine zunächst in einer iEDDA-Reaktion mit einem TCO-modifizierten Modellpeptid, dem Pentapeptid c(RGDfK)

(13) umgesetzt. Die Peptidkonjugate **71** – **76** wurden dabei in einer hohen Ausbeute von 59 – 84 % als DHP/Pyridazin-Gemische erhalten. In der anschließenden Radiomarkierung ergaben sich signifikante Unterschiede für die verschiedenen Chelatoren. Während [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*- und [<sup>89</sup>Zr]Zr-CTH36-c(RGDfK) **71** – **73** bereits nach einer Stunde bei 37 °C in einer hohen radiochemischen Reinheit von  $\geq 95$  % erhalten wurde, war zur Radiomarkierung von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-c(RGDfK) **74** eine deutlich längere Markierungszeit von 5 h notwendig. Auch bildeten sich für 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) mehrere Konformere, die sich aber nicht auf die kinetische Inertheit des Komplexes auswirkten. Für DOTA-GA-c(RGDfK) **75** und NODA-GA-c(RGDfK) **76** konnte weder bei 37 °C oder 99 °C, noch durch Variation des pH-Wertes oder Verwendung von [<sup>89</sup>Zr]ZrCl<sub>4</sub> eine <sup>89</sup>Zr-Inkorporation erzielt werden, sodass diese im Weiteren nicht verwendet werden konnten.

Nach der erfolgreichen Radiomarkierung wurde die Lipophilie der markierten Konjugate bestimmt. Diese war für [<sup>89</sup>Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-c(RGDfK) (**74**) mit -1.8 deutlich höher als die der anderen Konjugate mit -2.3 – -2.8.

Zur Bestimmung der relativen kinetischen Inertheit der gebildeten [<sup>89</sup>Zr]Zr-Chelator-Komplexe wurden die Peptidkonjugate **71** – **74** in einem EDTA-Challenge-Experiment mit einem 10 000-fachen Überschuss an EDTA untersucht. Dabei wies der [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-Komplex die geringste kinetische Inertheit auf. Jedoch zeigte sich auch für [<sup>89</sup>Zr]Zr-CTH36 eine hohe Labilität. Dagegen demonstrierten [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\* und [<sup>89</sup>Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO) eine hohe kinetische Inertheit gegenüber der Transchelatierung.

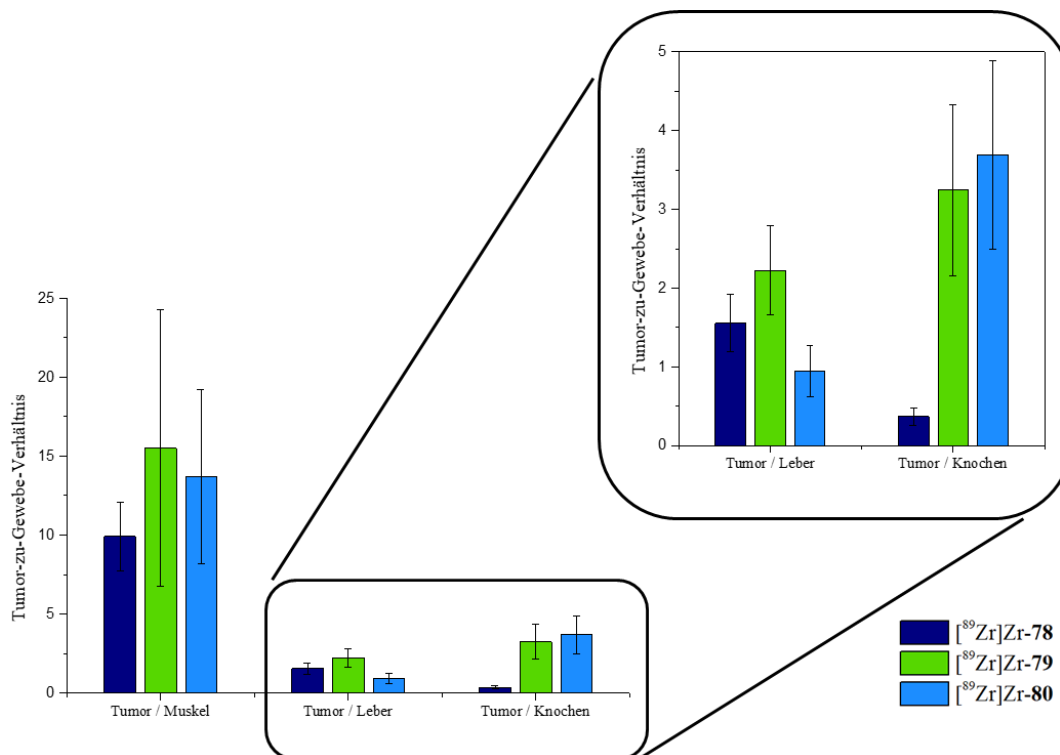
In den darauffolgenden *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten erfolgte der direkte Vergleich der beiden vielversprechendsten Chelatoren DFO\* und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) sowie der Referenz DFO. Unter Verwendung der iEDDA-Reaktion wurden zunächst die Chelator-Immunokonjugate **78** – **80** mit einer definierten Anzahl an Derivatisierungsstellen pro mAb von  $1.4 \pm 0.3$  TCOs/mAb, die mittels einer optischer Methode bestimmt wurde, hergestellt. Cetuximab wurde dabei als Modellantikörper für intakte IgGs gewählt. Alle Chelator-Cetuximab-Konjugate wurden innerhalb von 30 min mit einer hohen radiochemischen Reinheit  $\geq 99$  % und einer spezifischen Aktivität von 50 MBq/mg bei milden Reaktionsbedingungen radiomarkiert. Da sowohl die Radiomarkierung als auch die Biokonjugation und der Chelator selbst die Immunreaktivität des mAbs herabsetzen können, wurde die Immunreaktivität der markierten Antikörper-Konjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-**78** – [<sup>89</sup>Zr]Zr-**80** mittels Lindmo-Assay bestimmt. Alle Konjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-**78** – [<sup>89</sup>Zr]Zr-**80** wiesen dabei eine



Immunoreaktivität im Bereich von 86.5 – 88.1 % auf und waren daher in dieser Hinsicht gleichermaßen für die *in vivo*-Evaluierung geeignet.

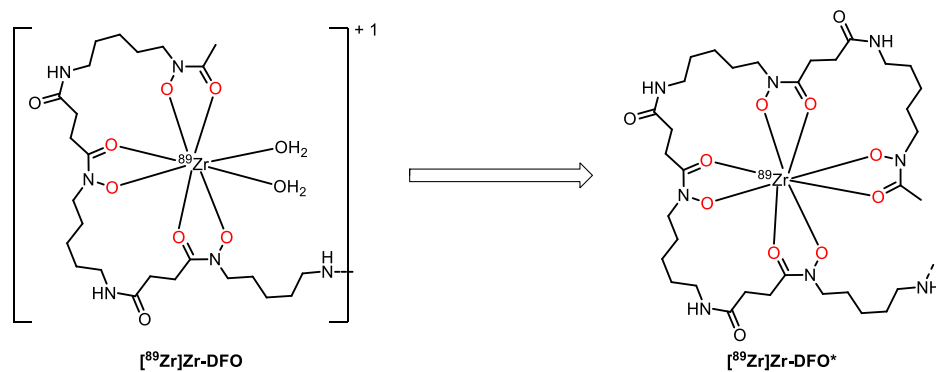
Abschließend erfolgte die Bestimmung der kinetischen Inertheit, Pharmakokinetik und Biodistribution *in vivo*. Hierfür wurden die  $^{89}\text{Zr}$ -radiomarkierten Immunokonjugate [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**78** – [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**80** HT-29-tumortragenden Mäusen intravenös verabreicht. Direkt, 72 h und 144 h nach der Injektion wurden die Tiere mittels Kleintier-PET/CT untersucht. Nach der letzten Messung erfolgte schließlich die zervikale Dislokation der Tiere und die *ex vivo*-Biodistribution wurde bestimmt. Der Tumor konnte nach 72 h und 144 h mit allen Immunokonjugaten [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**78** – [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**80** mittels PET/CT dargestellt werden, wobei nach 144 h das Tumor-zu-Hintergrundverhältnis deutlich höher war. Weiterhin wurde in den *in vivo*-Versuchen die geringe kinetische Inertheit von [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO-Cetuximab ([ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**78**) sowie die Anreicherung des freigesetzten [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr<sup>4+</sup> in den Knochen bestätigt. Die Verwendung der Chelatoren DFO\* und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) führte hingegen zu einer deutlich geringeren Anreicherung der Radioaktivität im Knochen und einem hohen Tumor-zu-Hintergrundverhältnis im PET/CT. Ein signifikanter Unterschied in der Pharmakokinetik zwischen [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)- ([ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**80**) und [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO\*-Cetuximab ([ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**79**) war die deutlich höhere Anreicherung von [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Cetuximab ([ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-**80**) in der Leber und Milz, die zu einem geringeren Tumor-zu-Organverhältnis für diese Organe führte. Eine Begründung hierfür kann die höhere Lipophilie des 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Derivates im Vergleich zu den DFO- und DFO\*-Derivaten sein.

## Zusammenfassung



**Abbildung 44.** Vergleich der Tumor-zu-Organverhältnisse für die Organe Muskel, Leber und Knochen, berechnet aus den *ex vivo*-Biodistributionsstudien in HT-29-tumortragenden Mäusen unter Verwendung von [<sup>89</sup>Zr]Zr-78, [<sup>89</sup>Zr]Zr-79 und [<sup>89</sup>Zr]Zr-80.

Alles in Allem weisen die Komplexe [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\* und [<sup>89</sup>Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO) eine deutlich höhere kinetische Inertheit in den EDTA-Challenge-Experimenten und *in vivo*-Versuchen als [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO auf. Jedoch besitzt DFO\* aufgrund seiner geringeren Lipophilie ein vorteilhafteres pharmakokinetisches Profil und stellt daher den vielversprechendsten Chelator für die stabile <sup>89</sup>Zr-Radiomarkierung von Antikörpern dar. In der Zukunft sollte daher DFO\* den derzeitigen klinischen Standard für <sup>89</sup>Zr-Radiomarkierungen DFO in der Immuno-PET ersetzen.

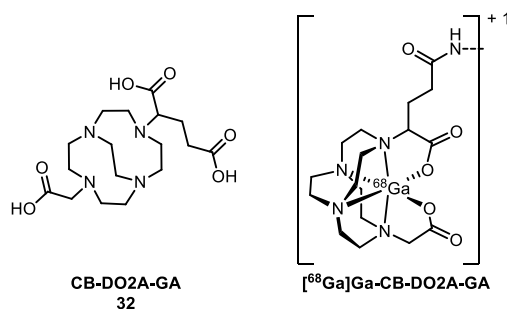


**Abbildung 45.** [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO und [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*.

## 5.2. Kapitel 2: Synthese eines neuen bifunktionellen CB-Chelators und Vergleich der $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$  stellt ein wichtiges klinisches Radionuklid in der Herstellung von peptidischen Radiotracer für die PET dar. Für die stabile Komplexierung von  $^{68}\text{Ga}$  können mehrere Chelatoren wie DOTA (**1**), NODA-GA (**23**), DOTA-GA (**22**) und NOTA (**15**) genutzt werden. Die  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Chelator-Komplexe unterscheiden sich in ihrer Ladung sowie der Zahl an freien Carboxylaten. Diese Parameter haben wiederum einen Einfluss auf die *in vivo*-Pharmakokinetik und -Biodistribution der Radiopharmaka.<sup>[87-94]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese eines *backbone*-modifizierten Chelators CB-DO2A-GA (**32**), der die Konjugation mit Peptiden ohne Änderung der Koordinationssphäre von CB-DO2A erlaubt, etabliert und seine radiochemischen und chemischen Eigenschaften mit denen der etablierten Chelatoren DOTA (**1**), NODA-GA (**23**) und DOTA-GA (**22**) verglichen.



**Abbildung 46.** Struktur von CB-DO2A-GA und  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CB-DO2A-GA}$ .

Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung peptidischer Chelator-Konjugate mittels Festphasenpeptidsynthese. Nach der Radiomarkierung der Konjugate, die für CB-DO2A-GA-TATE mit einer höheren Reaktionszeit und geringeren optimierten molaren Aktivität von 1 MBq/nmol deutlich weniger effektiv war, wurden die Lipophilie, Serumstabilität und kinetischen Inertheit in DTPA-Challenge-Experimenten untersucht. Im Vergleich zu den etablierten Chelatoren wies  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CB-DO2A-GA-TATE}$  ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -**89**), aufgrund der geringeren Zahl an geladenen Gruppen, die geringste Hydrophilie auf.  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-CB-DO2A-GA-TATE}$  ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -**89**) demonstrierte des Weiteren eine hohe kinetische Inertheit in den DTPA-Challenge-Experimenten, die die von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-GA-TATE}$  ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -**87**) übertraf, und konnte zudem im Hinblick auf die metabolische Degradation eine hohe Stabilität aufweisen.

## Zusammenfassung

Zusammenfassend stellt daher der synthetisierte Chelator CB-DO2A-GA (**32**) eine Alternative zu den etablierten Chelatoren dar, insbesondere wenn der Einsatz eines positiven  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexes zu der Verbesserung des pharmakokinetischen Profils des Radiotracers führt und daher bevorzugt wird. Für eine effiziente Radiomarkierung mit hohen spezifischen Aktivitäten sollte in Zukunft die Optimierung der Radiomarkierungsbedingungen erfolgen.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1. Verwendete Geräte

#### 6.1.1. Kernresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -NMR, $^{13}\text{C}$ -NMR)

Die *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie wurde an einem *MERCURYplus NMR* Spektrometer mit 300 MHz für das  $^1\text{H}$ -NMR, an einem *Varian NMR System* Spektrometer der Firma *Agilent Technologies* mit 500 MHz für die  $^1\text{H}$ - und 126 MHz für die  $^{13}\text{C}$ -Experimente oder an einem *Bruker Avance III HD NMR* Spektrometer mit 700 MHz für die  $^1\text{H}$ - und 176 MHz für die  $^{13}\text{C}$ -Experimente von T. Timmermann (RKU, Heidelberg) oder Dr. V. Filippou (Varimol TGU, Stuttgart) durchgeführt. Die deuterierten Lösungsmittel  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\text{Methanol-}d_4$  und  $\text{D}_2\text{O}$  wurden von der Firma *Deutero* erworben. Zur Auswertung wurde *MestReNova-6.0.2-5475* der Firma *Mestrelab Research S. L.* verwendet.<sup>[123]</sup> Als interne Standards wurden die Restsignale der Protonen der deuterierten Lösungsmittel verwendet.<sup>[124]</sup>

**Tabelle 10.** Restsignale der deuterierten Lösungsmittel.

Lösungsmittel	$\delta$ [ppm] im $^1\text{H}$	$\delta$ [ppm] im $^{13}\text{C}$
$\text{CDCl}_3$	7.26	77.16
$\text{DMSO-}d_6$	2.50	39.52
$\text{Methanol-}d_4$	3.31	49.00
$\text{D}_2\text{O}$	4.79	/

Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ -NMR und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale, aus dem *Attached proton test* (APT), erfolgte mittels 2D-Spektroskopie-Experimenten der *correlated spectroscopy* (COSY), der *heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy* (HSQC) und der *heteronuclear multiple bond spectroscopy* (HMBC). Die Angabe der chemischen Verschiebung  $\delta$  erfolgt in ppm. Die Kopplungskonstante  $J$  wird in Hertz (Hz) angegeben.

#### 6.1.2. Massenspektrometrie

##### MALDI-MS

Die MALDI-MS wurde an einem *Bruker Daltonics Microflex* Spektrometer ausgestattet mit einem *LTB MNL100 (106 PD) V 002.61* Laser unter Verwendung einer Pulsfrequenz von 60 Hz durchgeführt. Die Messungen erfolgten im positiven Modus. Die Steuerung erfolgte

## Experimenteller Teil

mit *flexControl Version 3.3 (Build 108)* und die Auswertung mit *flexAnalysis Version 3.3 (Build 80)*.<sup>[125]</sup> Als Matrices wurden  $\alpha$ -Cyanozimtsäure ( $\alpha$ -CS) als Lösung in H<sub>2</sub>O/MeCN (75/25, v/v, 10 mg/mL) oder Gentisinsäure (GS) als Lösung in H<sub>2</sub>O/MeCN (50/50, v/v, 20 mg/mL) verwendet.

### HR-ESI-MS

Die *High-Resolution-Elektrospray Ionisation* (HR-ESI)-MS wurde von Dr. Werner Spahl (Department für Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) an einem *Thermo Finnigan LTQ FT Ultra Fourier Transform Ionen Cyclotron Resonanz* Massenspektrometer durchgeführt. Die Spraykapillarenspannung am *IonMax* ESI-Kopf betrug 4 kV, die Heizkapillarentemperatur 250 °C, der Stickstoff *Sheathgasfluss* 20 und der *Sweepgasfluss* 5 Einheiten. Für Fließinjektionsanalyse (FIA) wurde mit einer *Surveyor MS* Pumpe eine Flussrate von 0.1 mL/min gewählt. Als Lösungsmittel wurde H<sub>2</sub>O/MeCN (20:80 oder 80:20, v/v) verwendet.

### 6.1.3. Spektrometrie

Die Bestimmung der Konzentration der Cetuximab-Lösungen und der Tetrazin-Konzentration erfolgte unter Verwendung des *BioSpectrometer kinetic* Spektralphotometers von *Eppendorf*. Für die Messung wurden 70  $\mu$ L-mikro UV-Küvetten der *Brand GmbH und Co. KG* (Weinheim, Deutschland) verwendet.

### 6.1.4. Aktivitätsbestimmung

#### Aktivimeter

Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit dem *ISOMED 2010* Aktivimeter von *NUVIATech Instruments GmbH*.

#### Gammazähler

Zur Messung der  $\gamma$ -Strahlung wurde der *2480 Wizard<sup>2</sup>*-Gammazähler der Firma *PerkinElmer* verwendet.

## 6.1.5. Chromatographische Methoden

### HPLC

Die analytische und semipräparative HPLC wurden an einem *Dionex UltiMate 3000 System* (*Thermo Fisher*), ausgestattet mit einer *Chromolith Performance* Säule (RP-18e, 100 – 4.6 mm, *Merck*) und einer *Chromolith SemiPrep* Säule (RP-18e, 100 – 10mm, *Merck*), durchgeführt. Die Durchflussrate betrug für die Sequenzen, soweit nicht anders angegeben, 4 mL/min. Als Laufmittel wurden H<sub>2</sub>O und MeCN mit 0.1 % TFA oder 0.1 % Ameisensäure (AS) verwendet. Für die Radio-HPLC war das System zusätzlich mit dem Radio-Detektor *Gabi Star* (*Raytest*) erweitert. Zur Analyse der [<sup>89</sup>Zr]Zr-Chelator-c(RGDfK) Experimente wurde eine *Gemini* Säule (C18, 5 µm, 250 – 4.6 mm, *Phenomenex*) mit einer Durchflussrate von 2 mL/min verwendet. Für die Cetuximab-Derivate wurde die SEC-Säule *Superdex 200 Increase 10/300 GL* (Polyethylen (PE) Filter, ~ 8.6 µm, 10 x 300 mm, *Cytiva*) verwendet. Hierfür wurde als Laufmittel ein Phosphatpuffer (0.05 M, pH = 7), der mit NaCl (0.15 M) und NaN<sub>3</sub> (0.01 M) versetzt wurde, mit einer Durchflussrate von 0.75 mL/min gewählt.

Für Steuerung der HPLC sowie die Auswertung der Daten wurde *Dionex Chromeleon 6.8* bzw. *7.1.3* von *Thermo Fisher Scientific* verwendet.<sup>[126]</sup>

### Dünnschichtchromatographie

Die Bestimmung des *R<sub>f</sub>*-Wertes und Reaktionskontrollen erfolgten mittels Dünnschichtchromatographien (DC). Hierbei wurden die Polyester-Fertigfolien *POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>* der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254$  nm. Als Laufmittel wurden Ethylacetat (EA), Hexan, DCM und Methanol verwendet.

### Radio-DC

Die Radio-DC-Analysen wurden unter Verwendung von *instant thin layer chromatography-silica gel* (ITLC-SG)-Streifen (*Agilent Technologies*) und einem Citratpuffer (0.1 M, pH 5) an einem *Scan-Ram radio-TLC Scanner* der Firma *LabLogic* durchgeführt. Die Steuerung des Scanners sowie die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software *Laura* von *LabLogic*.<sup>[127]</sup>

## **Säulenchromatographie**

Die Säulenchromatographie (SC) zur Aufreinigung der Substanzen erfolgte mit dem Kieselgel 60 (0.04 – 0.063 mm, 230 – 400 *mesh*) der Firma *Merck*. Die Laufmittelzusammensetzung für DC und SC werden in Volumenanteilen *v/v* angegeben.

### **6.1.6. Zentrifugation**

Die Zentrifugation erfolgte über die *Centrifuge 5804 R* und die *miniSpin* Zentrifuge der Firma *Eppendorf*. Für die Aufreinigung bzw. Konzentrierung der mAb-Lösungen wurde die *Varifuge 3.0 R* von *Heraeus* bei 2500 *xg* verwendet.

### **6.1.7. Lyophilisation**

Nach der Aufreinigung der Substanzen über semipräparative HPLC wurden diese über Lyophilisation mit den Gefriertrocknungsanlagen *Alpha 2-4 LD plus* der Firma *Martin Christ* und *LyoQuest* von *Telstar*<sup>®</sup> getrocknet.

### **6.1.8. Zellkultivierung**

Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter der Sicherheitswerkbank der Klasse 2, der *Thermo Scientific<sup>TM</sup> Safe 2020*-Werkbank. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten Luft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $\geq 93$  % in einem *Heracell 150i* bzw. *Heracell VIOS 160i* CO<sub>2</sub>-Inkubator von *Thermo Scientific<sup>TM</sup>* inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe von Einweg-Zählkammern *C-Chips* von *NanoEnTek*. Zur gleichzeitigen Beurteilung der Vitalität der Zellen wurde hierfür die Zellsuspension (10  $\mu$ L) mit einer 0.4%igen Trypanblaulösung (10  $\mu$ L) versetzt. Der Diazofarbstoff Trypanblau wird nur von perforierten und abgestorbenen Zellen aufgenommen. Die Vitalität aller verwendeten Zellen lag bei  $\geq 90$  %.



Die Zellzahl berechnet sich anhand der Formel 2:

$$\frac{\text{vitale Zellen}}{\text{mL}} = 10^4 \cdot n \cdot VF \quad 2$$

$n$ : Zellzahl

$VF$ : Verdünnungsfaktor

### 6.1.9. Anästhesiegerät

Zur Anästhesie der zu untersuchenden Tiere wurde das fahrbare Narkosegerät *Sulla 19* der Firma *Dräger* (Lübeck, Deutschland) verwendet. Isofluran wurde über die *Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH* von *cp-pharma* (Burgdorf, Deutschland) und der medizinische Sauerstoff über *Dräger* (Lübeck, Deutschland) bezogen.

Zum Einleiten der Narkose in der Induktionskammer wurden 5 Vol% Isofluran/3 Vol.% O<sub>2</sub> verwendet. Das Aufrechterhalten der Narkose erfolgte mit etwa 3 Vol% Isofluran/3 Vol.% O<sub>2</sub>. Nach der Umlagerung wurde die Narkose über Maske mit ca. 1 – 2 Vol% Isofluran/0.9 Vol.% O<sub>2</sub> weitergeführt.

### 6.1.10. Kleintier-PET/CT

Die *in vivo*-Bildgebung erfolgte mittels des Kleintier-PET/SPECT/CTs von Bruker, dem *Albira Imaging System*. Insgesamt besteht das PET aus drei Ringen, jeder Ring enthält dabei acht Detektoren. Die Detektoren sind Lutetium Yttrium Orthosilikat Einfachkristalle, die mit positionssensitiven Photomultiplier-Röhren verbunden sind. Die Sensitivität beträgt mit drei Ringen 9% und die Auflösung < 1.1 mm. Das transaxiale Sichtfeld FOV umfasst 80 mm und das axiale FOV 148 mm. Die Messungen erfolgten als statische Aufnahme, ein Frame mit 60 min. Die Rekonstruktion der PET-Messungen erfolgte mit Hilfe eines iterativem 2D-Rekonstruktionsalgorithmus (Zr-89 MLEM GPU 3R 20x20 0.5). Zwölf Iterationen mit einer Voxelgröße von 0.5 mm wurden durchgeführt. Des Weiteren wurden bei der Rekonstruktion Korrekturen für die Streukoinzidenzen (Scatters), zufällige Koinzidenzen (Randoms) und den radioaktiven Zerfall (Decay) durchgeführt. Die CT-Einheit besteht aus einer Röntgenquelle und dem dazugehörigen Detektor. Die Messungen erfolgten bei einer Röhrenspannung von 45 kV und einem Röhrenstrom von 400 µA. Die Rekonstruktion erfolgte mittels einer gefilterten Rückprojektion (*Filtered Back Projection*) mit einer hohen Auflösung von

0.125  $\mu\text{m}$ . Die rekonstruierten PET/CT-Daten wurden manuell unter Verwendung von *PMOD* 3.6 fusioniert und analysiert.<sup>[128]</sup>

## 6.2. Verwendete Chemikalien und Materialien

Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden, solange nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. MeCN (HPLC *grade*) und Wasser (HPLC *grade*) wurden von *Häberle Labortechnik* (Lonsee-Ettlenschieß, Deutschland) oder *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) erhalten. Für den Einsatz in der HPLC wurde zusätzlich Wasser mittels der Reinstwasseranlage *Aquinity*<sup>2</sup> von *membraPure* hergestellt. TFA (Uvasol<sup>®</sup> für die Spektroskopie) wurde von *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Deutschland) und die geschützten Aminosäurederivate wurden von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) und *Carbolution* (St. Ingbert, Deutschland) bezogen. PyBOP, das Fmoc-Asp(NovaSyn<sup>®</sup> TGA)-OAll Harz und Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz für die Peptidsynthese sowie die Tracepur<sup>®</sup> Reagenzien H<sub>2</sub>O (Tracepur<sup>®</sup>), Salzsäure (30 %) und Natronlauge (30 %, Suprapur<sup>®</sup>) wurden von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Die Erbitux Infusionslösung (5 mg/mL Cetuximab) wurde von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. DIPEA, HBTU und TFA (für die Peptidsynthese) wurden von *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) gekauft. Die Tetrazinderivate H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**) und 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure (**67**) wurden von *Varimol* (Stuttgart, Deutschland) und H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>(HCOO) (**69**) von *SiChem* (Bremen, Deutschland) bezogen. Die Chelatoren *R*-NODA-GA(*t*Bu)<sub>3</sub>, DOTA-GA(*t*Bu)<sub>4</sub>, DOTA(*t*Bu)<sub>3</sub>, der Vorläufer CB-Cyclen sowie DTPA wurde von *CheMatech* (Dijon, Frankreich) gekauft. TCO-NPC und TCO-NHS wurden von *SiChem* (Bremen, Deutschland) bezogen. Die Herstellung des HEPES-Puffer erfolgte mit HEPES (Ultrapur<sup>®</sup>) von *Gerbu Biotechnik* (Heidelberg, Deutschland). Die DPBS wurde von *VWR* (Bruchsal, Deutschland) erworben. Die [<sup>89</sup>Zr]Zr-oxalat Lösung in 1.0 M Oxalsäure wurde von *PerkinElmer* (NEZ308000MC, Rodgau, Deutschland) bezogen. Durch die Elution des <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generators *GalliaPharm*<sup>®</sup> von *Eckert & Ziegler* (Berlin, Deutschland) mit 0.1 M HCl wurde [<sup>68</sup>Ga]GaCl<sub>3</sub> erhalten.

Argon wurde von der Firma *Praxair Deutschland GmbH* (Düsseldorf, Deutschland) und Wasserstoff von *Tyczka Industrie-Gase GmbH* (Mannheim, Deutschland) erhalten.

Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel wurden von *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Deutschland), *TCI Deutschland GmbH*

(Eschborn, Deutschland), *Thermo Fisher GmbH* (Kandel, Deutschland) und *VWR* (Bruchsal, Deutschland) erhalten.

Zur Aufreinigung der Antikörperderivate wurden Zentrifugalfilter *Vivaspin 6* (Membran: 30 000 MWCO) der Firma *Sartorius* (Stonehouse, UK) und *Nap-5*, *Nap-10*, *Nap-25* Sephadex Säulen (*G-25 DNA Grade*) von *Cytiva* (Amersham Place, Buckinghamshire, UK) verwendet.

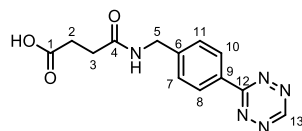
Die Zelllinien HT-29 und A431 wurden vom *Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ) (Braunschweig, Deutschland) gekauft. Das *McCoy's 5A Medium* (1X, modifiziert), das *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL) sowie die 0.25%ige mit EDTA und Phenolrot modifizierte Trypsin-Lösung wurden von *Thermo Fisher GmbH* (Kandel, Deutschland) erhalten. Das fötales Rinderserum (FBS) wurde von *Bio&Sell GmbH* (Nürnberg, Deutschland) bezogen. BSA wurde von *Carl Roth* gekauft. Das Bradford Reagenz wurde von *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Die 0.5 mL-Insulinspritzen *Omnican*<sup>®</sup> 50 zur Tumorzellinokulation, die 0.9%ige NaCl sowie die Injektions-Kanülen (0.30 x 12 mm, 30G x ½) wurden von der Firma *B. Braun* (Melsungen, Hessen) erworben. Heparin-Natrium (25 000 I. E.) wurde von *ratiopharm* bezogen. Des Weiteren erfolgte die intravenöse (i. v.) Injektion des Radiotracer über einen Polyethylenschlauch (0.28 mm ID, 0.61 mm AD) der Firma *smiths medical* (Gransbrunn, Deutschland).

## 6.3. Vergleichende Untersuchung von sechs Chelatoren für $^{89}\text{Zr}$ im Hinblick auf ihre Eignung in der Immuno-PET

### 6.3.1. Synthese der Tetrazin-Derivate

#### 6.3.1.1. 4-((4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-4-oxobutansäure (**37**)



37

In einem 5 mL-Kolben wurde Bernsteinsäureanhydrid (8 mg, 0.08 mmol, 1.20 Äq.) in absolutem DMF (1 mL) vorgelegt. Es folgte die Zugabe von H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**) (15 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.). Nachdem Triethylamin (9.3  $\mu\text{L}$ , 0.07 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben wurde, wurde die Reaktion 4 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Verwendung einer Ölpumpe entfernt. Schließlich folgte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (0 – 40 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 3.99$  min). **37** (17 mg, 0.06 mmol, 86 %) wurde nach der Lyophilisation als pinker Feststoff isoliert.

**HPLC:**  $R_t = 1.09$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 98.6 %

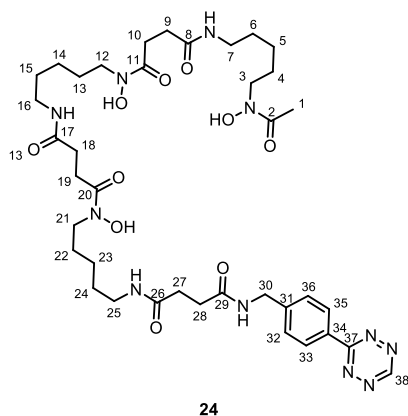
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 12.11 (s, 1H, OH), 10.57 (s, 1H, H-13), 8.52 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, NH), 8.44 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-8, H-10), 7.54 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-7, H-11), 4.41 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H, H-5), 2.53 – 2.47 (m, 2H, H-2), 2.47 – 2.41 (m, 2H, H-3).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 173.88 (C-1), 171.30 (C-4), 165.44 (C-12), 158.11 (C-13), 145.00 (C-9), 130.29 (C-6), 128.02 (C-7, C-11), 127.75 (C-8, C-10), 41.87 (C-5), 30.02 (C-3), 29.13 (C-2).

**MALDI-MS ( $m/z$ ):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 288.26 (288.11).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 288.1090 (288.1092), [M+H]<sup>-</sup> (ber.): 286.0946 (286.0945).

## 6.3.1.2. DFO-Tetrazin (24)



24

**37** (7.0 mg, 24.4  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und DFO-Mesylat (17.6 mg, 26.8  $\mu\text{mol}$ , 1.10 Äq.) wurden in DMSO (0.75 mL) vorgelegt. Es folgte die Zugabe von PyBOP (25.0 mg, 48.7  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq.) und Triethylamin (10  $\mu\text{L}$ , 73.1  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 3 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Das Rohprodukt wurde durch Zugabe von MeCN/Wasser (1:1, v/v) gefällt. Der Feststoff wurde erneut in DMSO gelöst und erneut gefällt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. DFO-Tetrazin (**24**) (13.2 mg, 15.9  $\mu\text{mol}$ , 65 %) wurde nach der Gefriertrocknung als pinker Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 2.60 \text{ min}$  (0 – 100 % MeCN + 0.1 % AS in 5 min)

Reinheit: 100 %

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta$  [ppm] = 10.58 (s, 1H, H-38), 9.64 (s, 1H, OH), 9.62 – 9.54 (m, 2H, OH), 8.49 (t,  $J = 6.1 \text{ Hz}$ , 1H, NH), 8.45 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 2H, H-33, H-35), 7.81 (t,  $J = 5.6 \text{ Hz}$ , 1H, NH), 7.77 (t,  $J = 5.6 \text{ Hz}$ , 2H, NH), 7.53 (d,  $J = 8.3 \text{ Hz}$ , 2H, H-32, H-36), 4.39 (d,  $J = 6.0 \text{ Hz}$ , 2H, H-30), 3.49 – 3.41 (m, 6H, H-3, H-12, H-21), 3.07 – 2.94 (m, 6H, H-7, H-16, H-25), 2.57 (t,  $J = 7.4 \text{ Hz}$ , 4H, H-10, H-19), 2.42 (t,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 2H, H-28), 2.35 (t,  $J = 6.9 \text{ Hz}$ , 2H, H-27), 2.26 (t,  $J = 7.4 \text{ Hz}$ , 4H, H-9, H-18), 1.96 (s, 3H, H-1), 1.55 – 1.44 (m, 6H, H-4, H-13, H-22), 1.43 – 1.32 (m, 6H, H-6, H-15, H-24), 1.27 – 1.16 (m, 6H, H-5, H-14, H-23).

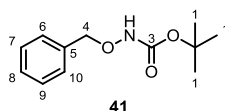
**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta$  [ppm] = 172.41 (C=O), 172.13 (C=O), 171.74 (C=O), 171.52 (C=O), 170.58 (C-2), 165.88 (C-37), 158.55 (C-38), 145.47 (C-34), 130.74 (C-31), 128.46 (C-32, C-36), 128.19 (C-33, C-35), 47.52 und 47.23 (C-3, C-12, C-21), 42.29 (C-30), 40.88, 38.87 und 38.86 (C-7, C-16, C-25), 31.29 (C-28), 31.22 (C-27), 30.34 (C-9, C-18), 29.27 (C-6, C-15, C-24), 28.01 (C-10, C-19), 26.48 (C-4, C-13, C-22), 23.94 (C-5, C-14, C-23), 20.79 (C-1).

## Experimenteller Teil

**MALDI-MS (*m/z*):**  $[M+H]^+$  (ber.): 829.66 (830.45),  $[M+Na]^+$  (ber.): 852.82 (852.43),  $[M+K]^+$  (ber.): 868.34 (868.41).

**HR-ESI-MS (*m/z*):**  $[M+H]^+$  (ber.): 830.4508 (830.4519),  $[M+Na]^+$  (ber.): 852.4327 (852.4339),  $[M-H]^-$  (ber.): 828.4374 (828.4374).

### 6.3.1.3. *t*Bu-*N*-(benzyloxy)carbamat (**41**)



Die Durchführung der Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von KADI *et al.*<sup>[99]</sup> *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid (**38**) (1.50 g, 9.40 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem 1:1-Wasser/Tetrahydrofuran (THF)-Gemisch (20 mL) vorgelegt. Es folgte die Zugabe von Triethylamin (1.30 mL, 9.30 mmol, 1.0 Äq.). Im Anschluss wurde eine Lösung an Boc<sub>2</sub>O (2.2 mL, 9.30 mmol, 1.0 Äq.) in THF (4.50 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 2.5 h bei RT gerührt. Schließlich wurde das THF unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (30 mL) aufgenommen und jeweils zweimal mit einer 0.01 M HCl-Lösung (30 mL) und mit Wasser (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde **41** (2.046 g, 9.16 mmol, 97 %, Lit: 91 %<sup>[99]</sup>) als farbloses Öl erhalten, welches nach einer Woche bei -4 °C auskristallisierte.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.50 (EA/Hexan 1:3)

**HPLC:**  $R_t = 1.51$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)  
Reinheit: 99.8 %

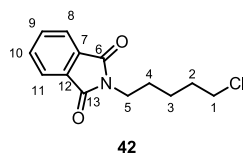
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.43 – 7.31 (m, 5H, *H*-6, *H*-7, *H*-8, *H*-9, *H*-10), 7.12 (s, 1H, *NH*), 4.86 (s, 2H, *H*-4), 1.48 (s, 9H, *H*-1).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 156.84 (*C*-3), 135.86 (*C*-5), 129.24 (*C*-7, *C*-9), 128.61 (*C*-6, *C*-8, *C*-10), 81.86 (*C*-2), 78.58 (*C*-4), 28.33 (*C*-1).

**MALDI (*m/z*):**  $[M+2Na-H]^+$  (ber.): 267.31 (268.09).

**HR-ESI-MS (*m/z*):**  $[M-H]^-$  (ber.): 222.1136 (222.1135).

### 6.3.1.4. 2-(5-Chlorpentyl)isoindolin-1,3-dion (42)



Die Durchführung der Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von KADI *et al.*<sup>[99]</sup> 1-Brom-5-chlorpentan (**40**) (2.80 g, 15.10 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem DMF (16 mL) unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Kaliumphthalimid (2.796 g, 15.10 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Suspension 20 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde eine gesättigte NaCl-Lösung (30 mL) zugegeben und dreimal mit Chloroform (20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und **42** (3.404 g, 13.53 mmol, 90 %, Lit: 84 %<sup>[99]</sup>) als farbloses Öl erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.34 (EA/Hexan 1:3)

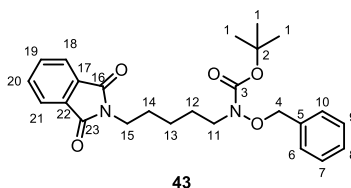
**HPLC:**  $R_t = 2.25$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

Reinheit: 88.4 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.86 – 7.81 (m, 2H, *H*-8, *H*-11), 7.74 – 7.68 (m, 2H, *H*-9, *H*-10), 3.69 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, *H*-5), 3.52 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, *H*-1), 1.86 – 1.78 (m, 2H, *H*-2), 1.76 – 1.67 (m, 2H, *H*-4), 1.54 – 1.45 (m, 2H, *H*-3).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 168.53 (*C*-6, *C*-13), 134.05, (*C*-9, *C*-10), 132.24 (*C*-7, *C*-12), 123.34 (*C*-8, *C*-11), 44.85 (*C*-1), 37.82 (*C*-5), 32.18 (*C*-2), 28.00 (*C*-4), 24.26 (*C*-3).

### 6.3.1.5. *tert*-Butyl(benzyloxy)(5-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)pentyl)carbamat (43)



Die Durchführung der Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von KADI *et al.*<sup>[99]</sup> *tert*-Butyl-*N*-(benzyloxy)carbamate (**41**) (3.0 g, 13.44 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem DMF (20 mL)

## Experimenteller Teil

unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe von Natriumiodid (0.089 g, 0.59 mmol, 0.04 Äq.) und Natriumhydrid (0.435 g, 18.14 mmol, 1.35 Äq.) wurde das Reaktionsgemisch 15 min bei 85 °C gerührt. Im Anschluss erfolgte die portionierte Zugabe von **42** (3.687 g, 14.65 mmol, 1.09 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei 85 °C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktion auf RT, wurde diese durch Zugabe von Wasser (10 mL) gestoppt. Im Anschluss wurde dreimal mit Diethylether (20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zweimal mit 20 mL einer 1%igen Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung, Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, EA/Cy 1:4) aufgereinigt. **43** (5.594 g, 12.76 mmol, 95 %, Lit: 82 %<sup>[99]</sup>) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.34 (EA/Hexan 1:3)

**HPLC:**  $R_t = 3.43$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)  
Reinheit: 99.4 %

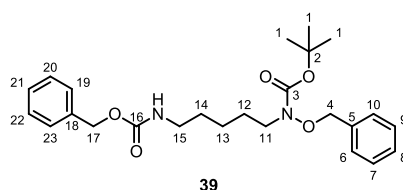
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.83 (dd,  $J = 5.4, 3.1$  Hz, 2H, *H*-18, *H*-21), 7.70 (dd,  $J = 5.5, 3.0$  Hz, 2H, *H*-19, *H*-20), 7.43 – 7.37 (m, 2H, *H*-6, *H*-10), 7.37 – 7.30 (m, 3H, *H*-7, *H*-8, *H*-9), 4.81 (s, 2H, *H*-4), 3.66 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, *H*-15), 3.39 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, *H*-11), 1.71 – 1.60 (m, 4H, *H*-12, *H*-14), 1.49 (s, 9H, *H*-1), 1.37 – 1.30 (m, 2H, *H*-13).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 168.52 (*C*-16, *C*-23), 156.69 (*C*-3), 135.81 (*C*-2), 133.99 (*C*-20, *C*-19), 132.30 (*C*-17, *C*-18), 129.52 (*C*-6, *C*-10), 128.59 (*C*-8), 128.54 (*C*-7, *C*-9), 123.30 (*C*-18, *C*-21), 77.04 (*C*-4), 49.61 (*C*-11), 38.01 (*C*-15), 28.47 (*C*-1), 28.46 (*C*-14), 26.84 (*C*-12), 24.25 (*C*-13).

**MALDI (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 460.78 (461.20), [M+K]<sup>+</sup> (ber.): 476.76 (477.18).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (ber.): 456.2498 (456.2493), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 461.2051 (461.2047), [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 438.2160 (438.2160), [M+OH]<sup>-</sup> (ber.): 455.2187 (455.2187).

### 6.3.1.6. *tert*-Butyl(benzyloxy)(5-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)pentyl)carbamate (**39**)





Die Durchführung der Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von KADI *et al.*<sup>[99]</sup> **43** (1.20 g, 2.74 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethanol (25 mL) vorgelegt. Nach der Zugabe von Hydrazinhydrat (0.656 g, 13.11 mmol, 4.79 Äq.) wurde das Reaktionsgemisch 3 h unter Reflux erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Das gesammelte Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene Feststoff in einem 2:1-Wasser/1,4-Dioxan-Gemisch (18 mL) gelöst. Nachdem die Lösung auf 0 °C abgekühlt wurde, erfolgte die Zugabe von Natriumcarbonat (0.348 g, 3.28 mmol, 1.20 Äq.). Benzylchloroformat (0.47 mL, 3.37 mmol, 1.23 Äq.) wurde langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch 24 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe einer gesättigten NaCl-Lösung (20 mL), wurde dreimal mit DCM (20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Im Anschluss wurden die Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, EA/Cy 1:3) aufgereinigt und **39** (0.753 g, 1.70 mmol, 62 %, Lit: 85 %<sup>[99]</sup>) als farbloser Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.26 (EA/Hexan 1:3)

**HPLC:** R<sub>t</sub> = 2.66 min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

Reinheit: 100 %

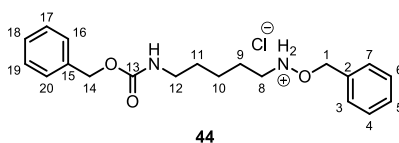
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ [ppm] = 7.45 – 7.28 (m, 10H, *H*-6, *H*-7, *H*-8, *H*-9, *H*-10, *H*-19, *H*-20, *H*-21, *H*-22, *H*-23), 5.09 (s, 2H, *H*-17), 4.81 (s, 2H, *H*-4), 3.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-11), 3.21 – 3.13 (m, 2H, *H*-15), 1.63 – 1.56 (m, 2H, *H*-12), 1.54 – 1.44 (m, 11H, *H*-1, *H*-14), 1.34 – 1.27 (m, 2H, *H*-13).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ [ppm] = 156.73 (*C*-13), 136.76 (*C*-16), 135.76 (*C*-5), 129.59 (CH<sub>Ar</sub>), 129.51 (CH<sub>Ar</sub>), 128.86 (CH<sub>Ar</sub>), 128.63 (CH<sub>Ar</sub>), 128.56 (CH<sub>Ar</sub>), 128.20 (CH<sub>Ar</sub>), 81.37 (*C*-2), 77.03 (*C*-4), 66.73 (*C*-17), 49.43 (*C*-11), 41.09 (*C*-15), 29.71 (*C*-14), 28.47 (*C*-1), 26.85 (*C*-12), 23.99 (*C*-13).

**MALDI-MS (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 464.69 (465.24).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 465.2362 (465.2360), [M+Cl]<sup>-</sup> (ber.): 477.2164 (477.2162).

**6.3.1.7. *O*-Benzyl-*N*-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)pentyl)hydroxylaminhydrochlorid (**44**)**



**39** (2.0 g, 4.52 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 1,4-Dioxan (18 mL) gelöst. Eine 4°M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan (4 mL) wurde unter Eiskühlung zugetropft. Nachdem 4 h bei RT gerührt wurde, wurde 1,4-Dioxan unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde im Ultraschallbad mit Diethylether gewaschen und **44** (1.355 g, 3.58 mmol, 79 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 1.73$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

Reinheit: 100 %

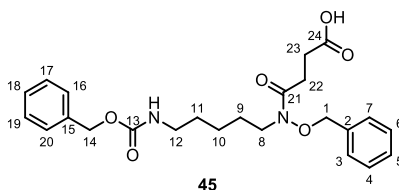
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 12.29 (s, 2H, NH), 7.44 – 7.27 (m, 10H, *H*-3, *H*-4, *H*-5, *H*-6, *H*-7, *H*-16, *H*-17, *H*-18, *H*-19, *H*-20), 5.34 (s, 2H, *H*-1), 5.07 (s, 2H, *H*-14), 3.29 – 3.21 (m, 2H, *H*-8), 3.15 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, *H*-12), 1.95 – 1.84 (m, 2H, *H*-9), 1.50 (m, 2H, *H*-11), 1.46 – 1.37 (m, 2H, *H*-10).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 156.73 (*C*-13), 136.66 (*C*-15), 132.70 (*C*-2), 129.72 (CH<sub>Ar</sub>), 129.68 (CH<sub>Ar</sub>), 128.93 (CH<sub>Ar</sub>), 128.64 (CH<sub>Ar</sub>), 128.22 (CH<sub>Ar</sub>), 128.15 (CH<sub>Ar</sub>), 76.70 (*C*-1), 66.84 (*C*-14), 49.52 (*C*-8), 40.71 (*C*-12), 29.32 (*C*-11), 23.79 (*C*-9 oder *C*-10), 23.34 (*C*-9 oder *C*-10).

**MALDI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 342.78 (343.20), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 364.66 (365.18), [M+K]<sup>+</sup> (ber.): 380.55 (381.16).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 343.2018 (343.2017), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 365.1842 (365.1836), [M+Cl]<sup>-</sup> (ber.): 377.1641 (377.1637).

### 6.3.1.8. 4-((Benzyloxy)(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)pentyl)amino)-4-oxobutan-säure (45)



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von KADI *et al.* durchgeführt.<sup>[99]</sup> **44** (0.775 g, 2.05 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Pyridin (5.63 mL, 69.55 mmol, 34.0 Äq.) gelöst. Unter Argon-Atmosphäre erfolgte die Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid (0.307 g, 3.07 mmol, 1.50 Äq.). Zunächst wurde das Reaktionsgemisch 2 h bei 100 °C und anschließend 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Diethylether (10 mL) aufgenommen. Im Anschluss wurde mit einer 20%igen KHCO<sub>3</sub> (aq.) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit einer 6 M HCl angesäuert und danach mit Diethylether extrahiert. Nachdem die organische Phase mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet wurde, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC unter Verwendung eines Gradienten von 0 – 80 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min (*R*<sub>t</sub> = 5.38 min) aufgereinigt. **45** (0.719 g, 1.63 mmol, 79 %, Lit: 72 %<sup>[99]</sup>) wurde als farbloses Öl erhalten.

**HPLC:** *R*<sub>t</sub> = 2.36 min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 97.6 %

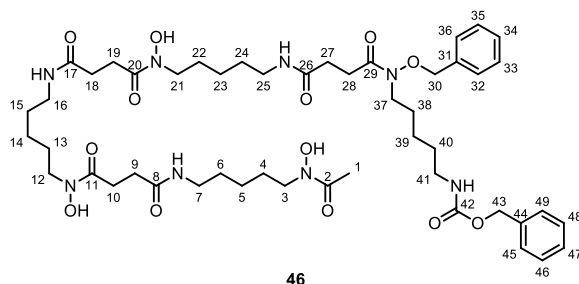
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)** δ [ppm] = 7.47 – 7.24 (m, 10H, *H*-Ar), 5.05 (s, 2H, *H*-1), 4.90 (s, 2H, *H*-14), 3.70 – 3.59 (m, 2H, *H*-8), 3.09 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-12), 2.77 – 2.64 (m, 2H, *H*-23), 2.56 – 2.51 (m, 2H, *H*-22), 1.68 – 1.57 (m, 2H, *H*-9), 1.53 – 1.43 (m, 2H, *H*-11), 1.36 – 1.24 (m, 2H, *H*-10).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)** δ [ppm] = 176.34 (*C*-24), 158.86 (*C*-13), 138.47 (*C*-15), 136.15 (*C*-2), 130.59 (CH<sub>Ar</sub>), 129.93 (CH<sub>Ar</sub>), 129.68 (CH<sub>Ar</sub>), 129.42 (CH<sub>Ar</sub>), 128.90 (CH<sub>Ar</sub>), 128.73 (CH<sub>Ar</sub>), 77.19 (*C*-14), 67.27 (*C*-1), 46.09 (*C*-8), 41.57 (*C*-12), 30.37 (*C*-11), 29.35 (*C*-22), 28.41 (*C*-23), 27.43 (*C*-9), 24.76 (*C*-10).

**MALDI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 442.56 (443.22), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 464.54 (465.20).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 443.2178 (443.2177), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 465.2002 (465.1997), [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 441.2033 (441.2031).

### 6.3.1.9. Bn-DFO\*-Cbz (46)



**45** (0.117 g, 0.26 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DMF (1.0 mL) vorgelegt. Es folgte die Zugabe von PyBOP (0.197 g, 0.38 mmol, 1.46 Äq.) und DFO-Mesyilat (0.170 g, 0.26 mmol, 1.0 Äq.). Im Anschluss wurde DIPEA (136  $\mu$ L, 0.78 mmol, 3.0 Äq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 h bei RT gerührt. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck mittels Ölpumpe entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit Aceton (3 mL) und dreimal mit destilliertem Wasser (3 mL) gewaschen. **46** (0.171 g, 0.17 mmol, 67 %) wurde nach der Lyophilisation als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 2.69$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

Reinheit: 68.9 %

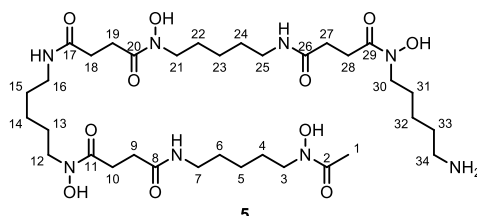
**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta$  [ppm] = 9.72 – 9.57 (OH, m, 3H, OH), 7.78 (d,  $J = 2.1$  Hz, 3H, NH), 7.48 – 7.27 (m, 10H, H-Ar), 7.22 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H, NH), 4.99 (s, 2H, H-30), 4.88 (s, 2H, H-43), 3.56 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, H-37), 3.45 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H, H-3, H-12, H-21), 3.35 (s, 2H), 3.06 – 2.93 (m, 8H, H-7, H-16, H-25, H-41), 2.60 (dt,  $J = 13.9, 6.3$  Hz, 6H, H-10, H-19, H-28), 2.29 (dt,  $J = 18.7, 7.1$  Hz, 6H, H-9, H-18, H-27), 1.96 (s, 3H, H-1), 1.57 – 1.44 (m, 8H, H-4, H-13, H-22, H-38), 1.43 – 1.33 (m, 8H, H-6, H-15, H-24, H-40), 1.27 – 1.15 (m, 8H, H-5, H-14, H-23, H-39).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta$  [ppm] = 171.96 (C=O), 171.29 (C=O), 170.99 (C=O), 156.07 (C=O), 137.30 (C-Ar), 134.96 (C-Ar), 129.25 (C-Ar), 128.61 (C-Ar), 128.48 (C-Ar), 128.32 (C-Ar), 127.69 (C-Ar), 75.42 (C-43), 65.08 (C-30), 47.08 und 46.79 (C-3, C-12, C-21), 44.42 (H-37), 40.13, 40.02, 39.86, 38.43 (C-7, C-16, C-25, C-41), 29.91 und 29.70 (C-9, C-18, C-27), 29.01 und 28.82 (C-6, C-15, C-24), H-40, 27.58 und 27.21 (C-10, C-19, C-28), 26.04 (C-4, C-13, C-22, C-38), 23.50 und 23.38 (C-5, C-14, C-23, C-39), 20.35 (C-1).

**MALDI-MS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.): 985.40 (985.56),  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (ber.): 1007.50 (1007.54),  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (ber.): 1023.48 (1024.27).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 985.5603 (985.5605),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1007.5425 (1007.5425),  $[M-H]^-$  (ber.): 983.5459 (983.5459).

### 6.3.1.10. DFO\* (5)



Die Durchführung der Synthese erfolgte in Anlehnung an PATRA *et al.*<sup>[59]</sup> Bn-DFO\*-Cbz (**46**) (100 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (80 mL) gelöst. Nach der Zugabe des Katalysators 10 % Pd/C (30 mg), wurde das Gemisch 12 h unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei RT gerührt. Das Palladium und die Aktivkohle wurden mittels Filtration entfernt. **5** (54 mg, 0.07 mmol, 70 %, Lit: 67 %<sup>[59]</sup>) wurde unter Verwendung des Rotationsverdampfers als farbloser Feststoff erhalten. Die Substanz wurde ohne Aufreinigung als Rohprodukt in der nächsten Stufe umgesetzt.

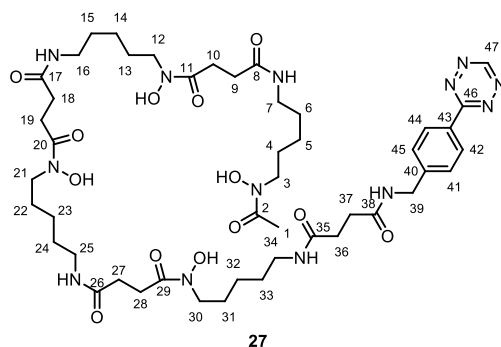
**HPLC:**  $R_t = 1.68$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 64.4 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.79 (s, 3H, NH), 3.45 (t,  $J = 7.0$  Hz, 8H, H-3, H-12, H-21, H-30), 2.99 (dd,  $J = 12.5, 6.3$  Hz, 6H, H-7, H-16, H-25), 2.61 (dt,  $J = 13.5, 7.0$  Hz, 6H, H-10, H-19, H-28), 2.26 (t,  $J = 7.0$  Hz, 6H, H-9, H-18, H-27), 1.96 (s, 3H, H-1), 1.55 – 1.45 (m, 8H, H-4, H-13, H-22, H-31), 1.41 – 1.32 (m, 8H, H-6, H-15, H-24, H-33), 1.25 – 1.18 (m, 8H, H-5, H-14, H-23, H-32).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 171.92 (C=O), 171.31 (C=O), 171.16 (C=O), 170.10 (C=O), 47.08 und 46.78 (C-3, C-12, C-21, C-30), 38.41 (C-7, C-16, C-25), 30.94, 29.94 (C-9, C-18, C-27), 29.25, 28.81 (C-6, C-15, C-24, C-33), 27.59 (C-10, C-19, C-28), 26.04 (C-4, C-13, C-22, C-31), 23.50 (H-14, H-23, H-32), 23.10, 20.36 (C-1).

**MALDI ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 761.32 (761.48),  $[M+Na]^+$  (ber.): 783.46 (783.34).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 761.4774 (761.4767),  $[M-H]^-$  (ber.): 759.4628 (759.4622).

**6.3.1.11. DFO\*-Tetrazin (27)**

**37** (6.5 mg, 22.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) und DFO\* (**5**) (17.2 mg, 22.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) wurden in DMSO (0.7 mL) vorgelegt. Es folgte die Zugabe von PyBOP (23.5 mg, 45.3  $\mu\text{mol}$ , 2.0 Äq.) und Triethylamin (9.5  $\mu\text{L}$ , 67.9  $\mu\text{mol}$ , 3.0 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 3 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt durch Zugabe von MeCN/Wasser (1:1, v/v) gefällt. Der Feststoff wurde erneut in DMSO gelöst und erneut gefällt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die Aufreinigung des Produkts erfolgte mittels semipräparativer HPLC (0 – 50 % MeCN + 0.1 % AS in 10 min bei 40 °C,  $R_t$  = 6.35 min). DFO\*-Tetrazin (**27**) (4.4 mg, 4.3  $\mu\text{mol}$ , 19 %) wurde nach der Gefriertrocknung als pinker Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t$  = 6.21 min (0 – 50 % MeCN + 0.1 % AS in 10 min)

Reinheit: 100 %

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 10.57 (s, 1H, H-47), 9.67 (s, 4H, N-OH), 8.49 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, NH), 8.45 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-42, H-44), 7.84 – 7.79 (m, 1H, NH), 7.77 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 3H, NH), 7.54 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H, H-41, H-45), 4.39 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, H-39), 3.45 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 8H, H-3, H-12, H-21, H-30), 3.33 (s, 6H, H<sub>2</sub>O?), 3.06 – 2.92 (m, 8H, H-7, H-16, H-25, H-34), 2.57 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 6H, H-10, H-19, H-28), 2.45 – 2.39 (m, 2H, H-36 oder H-37), 2.38 – 2.32 (m, 2H, H-36 oder H-37), 2.26 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 6H, H-9, H-18, H-27), 1.96 (s, 3H, H-1), 1.55 – 1.43 (m, 8H, H-4, H-13, H-22, H-31), 1.42 – 1.31 (m, 8H, H-6, H-15, H-24, H-33), 1.29 – 1.14 (m, 10H, H-5, H-14, H-23, H-32).

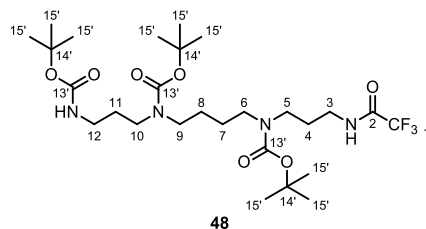
**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 171.92 (C=O), 171.66 (C=O), 171.28 (C=O), 171.05 (C=O), 165.41 (C-46), 145.00 (C-43), 130.27 (C-40), 128.00 (2 x C-Ar), 127.72 (2 x C-Ar), 47.07 und 46.77 (C-3, C-12, C-21, C-30), 41.83 (C-39), 38.41 (C-7, C-16, C-25, C-34), 30.85 (C-36 oder C-37), 30.77 (C-36 oder C-37), 29.91 (C-9, C-18, C-27), 28.80 (C-6,

C-15, C-24), 27.57 (C-10, C-19, C-28), 26.02 (C-4, C-13, C-22), 23.49 (C-5, C-14, C-23, C-32), 20.33 (C-1).

**MALDI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 1030.20 (1030.57),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1052.62 (1052.55),  $[M+K]^+$  (ber.): 1069.01 (1069.52).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 1030.5667 (1030.5680),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1052.5490 (1052.5500),  $[M-H]^-$  (ber.): 1028.5528 (1028.5535).

### 6.3.1.12. Tri-Boc-Spermin-trifluoracetamid (48)

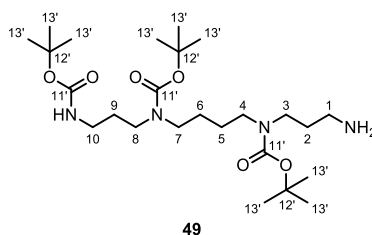


Die Durchführung der Synthese erfolgte nach DERI *et al.*<sup>[72]</sup> Spermin (**47**) (0.526 g, 2.60 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methanol (40 mL) gelöst. Nachdem die Lösung mittels einer Aceton-flüssiger Stickstoff Kältemischung auf  $-78\text{ °C}$  gekühlt wurde, erfolgte innerhalb 1 h das Zutropfen einer Lösung an Ethyltrifluoracetat (0.44 mL, 2.60 mmol, 1.0 Äq.) in Methanol (26 mL). Das Reaktionsgemisch wurde weitere 30 min bei  $-78\text{ °C}$  gerührt. Schließlich wurde die Temperatur langsam auf  $0\text{ °C}$  erhöht. Es folgte die Zugabe einer Lösung von Di-*tert*-butyldicarbonat (3.583 g, 15.60 mmol, 6.0 Äq.) in Methanol (26 mL). Nachdem die Reaktion 16 h bei RT gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (20 mL) gelöst und dreimal mit Wasser gewaschen (15 mL). Im Anschluss wurde die organische Phase über  $MgSO_4$  getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie ( $SiO_2$ , 30 – 100 % EA in Cyclohexan + 1 %  $NH_3$  aq.) aufgereinigt. Das gewünschte Produkt **48** wurde dabei als Gemisch mit dem Tetra-Boc-Spermin erhalten. Dieses wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

**$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  [ppm] = 8.25 (s, 1H, NH), 3.36 – 3.05 (m, 12H, H-3, H-5, H-6, H-9, H-10, H-12), 1.75 – 1.60 (m, 4H, H-4, H-4), 1.53 – 1.47 (m, 4H, H-7, H-8), 1.45 (s, 18H,  $H_{Boc}$ ), 1.43 (s, 9H,  $H_{Boc}$ ).

**MALDI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+Na]^+$  (ber.): 620.92 (621.34), [Tetra-Boc-Spermin+Na]<sup>+</sup> (calculated): 625.01 (625.41).

### 6.3.1.13. Tri-Boc-Spermin (49)



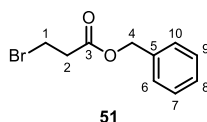
**48** aus 6.3.1.12 wurde ohne weitere Aufarbeitung verwendet. **48** wurde in Methanol (40 mL) gelöst und der pH-Wert mit einer 30%igen Ammoniaklösung (aq.) auf pH 11 – 12 eingestellt. Das Gemisch wurde 4 d gerührt bis **48** mittels HPLC nicht mehr detektiert werden konnte. **49** wurde in einem Gemisch mit Tetra-Boc-Spermin erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 8.51 – 8.12 (m, 5H, NH), 3.48 – 2.96 (m, 12H, H-1, H-3, H-4, H-7, H-8, H-10), 2.32 (s, 1H), 2.06 (s, 1H), 1.86 – 1.52 (m, 4H, H-2, H-9), 1.52 – 1.46 (m, 4H, H-5, H-6), 1.45 (s, 18H, H-Boc), 1.43 (s, 9H, H-Boc).

**<sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 157.88, 157.59, 157.30, 157.01, 156.15, 155.63, 124.95, 117.30, 115.00, 110.14, 80.46, 79.77, 79.09, 53.55, 46.98, 45.28, 44.39, 43.96, 43.12, 37.88, 37.52, 35.97, 29.83, 28.61, 28.59, 28.58, 28.50, 28.37, 28.17, 27.89, 27.34, 26.12.

**MALDI-MS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 502.43 (503.38), [Tetra-Boc-Spermin+Na]<sup>+</sup> (calculated): 625.33 (625.41).

### 6.3.1.14. Benzyl-3-bromopropanoat (51)



Die Durchführung der Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von PARKER *et al.*<sup>[129]</sup> 3-Brompropionylchlorid (**55**) (0.705 mL, 7.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM (12 mL) unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Es folgte die Zugabe von Benzylalkohol (0.728 mL, 7.0 mmol, 1.0 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (15 mL) sowie mit einer gesättigten NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. **51**



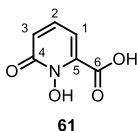
wurde nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer als farbloses Öl (1.5 g, 6.17 mmol, 88 %, Lit.: 93 %<sup>[129]</sup>) erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 2.44$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 88.1 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 7.40 – 7.32 (m, 5H, *H*-Ar), 5.18 (s, 2H, *H*-4), 3.60 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, *H*-1), 2.97 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H, *H*-2).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 170.49 (*C*-3), 135.62 (*C*-5), 128.74 (*C*-Ar), 128.55 (*C*-Ar), 128.45 (*C*-Ar), 66.95 (*C*-4), 37.89 (*C*-2), 25.89 (*C*-1).

### 6.3.1.15. 1-Hydroxy-6-oxo-1,6-dihydropyridin-2-carbonsäure (61)



Die Durchführung der Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von ZHOU *et al.*<sup>[101]</sup> 6-Hydroxypyridin-2-carbonsäure (**60**) (2.0 g, 14.38 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Eisessig (8.2 mL) und TFA (12.2 mL) unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Nach der Zugabe einer 35%igen-Lösung Peressigsäure in Essigsäure (6.9 mL, 38.82 mmol, 2.70 Äq.) wurde 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden weitere 17 h bei 80 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h im Kühlschrank gekühlt. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abfiltriert und mit eiskaltem Methanol gewaschen. **61** (1.545 g, 4.15 mmol, 69 %, Lit: 78 %<sup>[101]</sup>) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

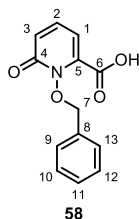
**HPLC:**  $R_t = 0.48$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)  
Reinheit: 97.6 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 10.05 (s, 1H, *OH*), 7.45 (dd,  $J = 9.0, 7.0$  Hz, 1H, *H*-2), 6.72 (dd,  $J = 9.0, 1.6$  Hz, 1H, *H*-3), 6.64 (dd,  $J = 7.0, 1.5$  Hz, 1H, *H*-1).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 161.85 (*C*-6), 157.15 (*C*-4), 138.97 (*C*-5), 136.76 (*C*-2), 120.32 (*C*-3), 106.33 (*C*-1).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 154.0146 (154.0145).

### 6.3.1.16. 1-(Benzyloxy)-6-oxo-1,6-dihydropyridin-2-carbonsäure (**58**)



Die Durchführung der Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von ZHOU *et al.*<sup>[101]</sup> **61** (1.540 g, 9.93 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Kaliumcarbonat (2.744 g, 19.86 mmol, 2.0 Äq.) in Methanol (24.9 mL) vorgelegt. Es folgte die Zugabe von Benzylchlorid (1.37 mL, 11.91 mmol, 1.20 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 16 h unter Reflux erhitzt. Im Anschluss wurde der Feststoff abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in Wasser (6 mL) gelöst und der pH-Wert mit einer 6 M HCl-Lösung auf pH 2 eingestellt. Das so erhaltene Präzipitat wurde abfiltriert und mit eiskaltem Wasser gewaschen. **58** (2.231 g, 9.10 mmol, 92 %, Lit: 85 %<sup>[101]</sup>) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 0.93$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)  
Reinheit: 99.7 %

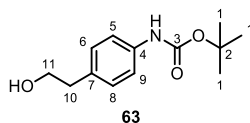
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.53 – 7.46 (m, 3H, *H*-2, *H*-9, *H*-13), 7.45 – 7.38 (m, 3H, *H*-10, *H*-11, *H*-12), 6.74 (dd, *J* = 9.3, 1.7 Hz, 1H, *H*-3), 6.56 (dd, *J* = 6.8, 1.7 Hz, 1H, *H*-1), 5.28 (s, 2H, *H*-7).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 161.65 (*C*-6), 157.64 (*C*-4), 140.45 (*C*-5), 138.64 (*C*-2), 133.84 (*C*-8), 129.62 (*C*-9, *C*-13), 129.07 (*C*-11), 128.49 (*C*-10, *C*-12), 124.08 (*C*-6), 106.00 (*C*-1), 77.89 (*C*-7).

**MALDI:** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 245.22 (246.08), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 267.50 (268.06).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 246.0764 (246.0761), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 268.0584 (268.0581), [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 244.0616 (244.0615), [2M+H]<sup>+</sup> (ber.): 489.1305 (489.1303).

### 6.3.1.17. *tert*-Butyl(4-(2-hydroxyethyl)phenyl)carbamate (**63**)



Die Durchführung der Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von BHUPATHIRAJU *et al.*<sup>[74]</sup> 2-(4-Aminophenyl)ethan-1-ol (**62**) (1.950 g, 14.21 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM (109 mL) vorgelegt. Unter Eiskühlung wurde eine Lösung an Boc<sub>2</sub>O (6.205 g, 28.43 mmol, 2.0 Äq.) in DCM (10 mL) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h gerührt und schließlich am Rotationsverdampfer auf ca. 20 mL eingengt. Die Lösung wurde dreimal mit einer gesättigten NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen und im Anschluss mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde, folgte die Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Methanol/DCM 5:95). **63** (3.243 g, 13.67 mmol, 96 %, Lit: 95 %<sup>[74]</sup>) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.56 (Methanol/DCM 1:9)

**HPLC:**  $R_t = 1.72$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

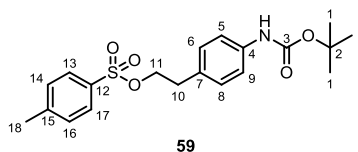
Reinheit: 100 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.32 – 7.26 (m, 2H, *H*-5, *H*-9), 7.14 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, *H*-6, *H*-8), 6.52 (s, 1H, NH), 3.81 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, *H*-11), 2.80 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, *H*-10), 1.51 (s, 9H, *H*-1).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 153.00 (*C*-3), 136.90 (*C*-4), 133.22 (*C*-7), 129.63 (*C*-6, *C*-8), 119.08 (*C*-5, *C*-9), 80.59 (*C*-3), 63.81 (*C*-11), 38.61 (*C*-10), 28.47 (*C*-1).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):** [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (ber.): 255.1706 (255.1703), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 260.1261 (260.1257).

### 6.3.1.18. 4-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)phenethyl-4-methylbenzensulfonat (**59**)



## Experimenteller Teil

Die Durchführung der Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von BHUPATHIRAJU *et al.*<sup>[74]</sup> **63** (1.911 g, 8.05 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM (62 mL) gelöst und mit Triethylamin (3.1 mL, 26.58 mmol, 3.30 Äq.) versetzt. Unter Eiskühlung erfolgte die tropfenweise Zugabe einer Lösung an Toluolsulfonylchlorid (1.612 g, 8.46 mmol, 1.05 Äq.) in THF (62 mL). Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei RT gerührt. In der Reaktionskontrolle mittels DC zeigte sich restliches Edukt. Daher wurde weiteres Toluolsulfonylchlorid (3.070 g, 16.11 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und 12 h gerührt. Die organische Phase wurde dreimal mit einer 1 M NaOH-Lösung (30 mL) und einmal mit einer gesättigten NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde, wurde **59** (3.050 g, 7.79 mmol, 97 %, Lit: 95 %<sup>[74]</sup>) als farbloser Feststoff erhalten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.59 (EA/Hexan 1:2)

**HPLC:**  $R_t = 2.60$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 100 %

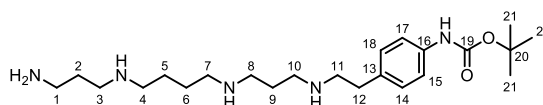
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.68 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, *H*-13, *H*-17), 7.28 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, *H*-14, *H*-16), 7.23 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, *H*-5, *H*-9), 7.01 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, *H*-6, *H*-8), 6.48 (s, 1H, *NH*), 4.16 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, *H*-11), 2.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, *H*-10), 2.42 (s, 3H, *H*-18), 1.51 (s, 9H, *H*-1).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 152.84 (*C*-3), 144.78 (*C*-15), 137.30 (*C*-4), 133.05 (*C*-12), 130.84 (*C*-7), 129.89 (*C*-14, *C*-16), 129.53 (*C*-6, *C*-8), 127.93 (*C*-13, *C*-17), 118.81 (*C*-5, *C*-9), 80.64 (*C*-2), 70.83 (*C*-11), 34.79 (*C*-10), 28.46 (*C*-1), 21.73 (*C*-18).

**MALDI (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 413.29 (414.13), [M+K]<sup>+</sup> (ber.): 429.28 (429.11).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (ber.): 409.1800 (409.1792), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 414.1355 (414.1346), [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 390.1385 (390.1380), [M+CH<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (ber.): 436.1441 (436.1435).

### 6.3.1.19. *tert*-Butyl(4-(2-((3-((4-((3-aminopropyl)amino)butyl)amino)propyl)-amino)ethyl)phenyl)carbammat (**64**)



**64**

Die Durchführung der Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von BHUPATHIRAJU *et al.*<sup>[74]</sup> Spermin (**47**) (0.30 g, 1.48 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Acetonitril (45 mL) vorgelegt und Kaliumcarbonat (0.410 g, 2.97 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Eine Lösung an **59** (0.296 g, 0.76 mmol, 0.51 Äq.) in Acetonitril (45 mL) wurde dem Reaktionsgemisch unter Eiskühlung zugetropft. Im Anschluss wurde die Reaktion für 16 h unter Reflux erhitzt. Das Kaliumcarbonat wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es folgte die Aufreinigung des Rohprodukts mittels präparativer HPLC ( $R_t = 2.60$  min, 0 – 35 % MeCN + 0.1 % AS in 8 min). **64** (0.202 g, 0.48 mmol, 63 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 1.26$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 98 %

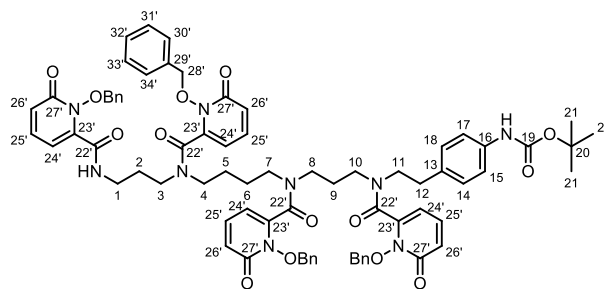
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 9.32 (s, 1H, NH), 9.05 – 8.85 (m, 5H, NH), 8.25 – 7.93 (m, 4H, NH), 7.51 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.2H, H-15, H-17), 7.40 (d,  $J = 8.2$  Hz, 0.5H, H-15, H-17), 7.17 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-14, H-18), 7.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-14, H-18), 4.16 (s, 3H, evtl von TFA), 3.27 – 2.80 (m, 16H, H-1, H-3, H-4, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12), 2.05 – 1.86 (m, 4H, H-2, H-9), 1.81 – 1.60 (m, 4H, H-5, H-6), 1.45 (s, 9H, H-21).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 158.83, 158.57, 152.80, 138.29, 130.38, 128.99, 128.79, 128.23, 125.49, 118.14, 115.77, 113.40, 78.98 (C-20), 53.09, 51.54, 48.91, 47.87, 46.11, 43.87, 36.19, 30.89, 28.13 (C-21), 23.78, 22.68, 22.64, 22.62, 22.32.

**MALDI-MS ( $m/z$ ):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 422.02 (422.35).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 422.3491 (422.3490), [M+CO]<sup>+</sup> (ber.): 450.3439 (450.3439).

### 6.3.1.20. 3,4,3-(LI-1,2-HOPOBn)-NH-Boc (65)



65

## Experimenteller Teil

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von BHUPATHIRAJU *et al.*<sup>[74]</sup> **58** (0.393 g, 1.60 mmol, 5.20 Äq.) wurde in Benzol (5.2 mL) vorgelegt. Oxalylchlorid (0.25 mL, 2.90 mmol, 9.40 Äq.) wurde unter Stickstofffluss tropfenweise zugegeben. Jede zwei Stunden wurden zwei Tropfen DMF zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr stattfand. Nach 6 h wurde Benzol und der Überschuss an Oxalylchlorid am Rotationverdampfer entfernt. Das Säurechlorid wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet. 1,2-HOPO Säurechlorid wurde in DCM (4.7 mL) gelöst und innerhalb einer halben Stunde unter Eiskühlung zu einer Lösung an **64** (0.130 g, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (3.5 mL) und einer 40%igen Kaliumcarbonat-Lösung (0.70 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit DCM (10 mL) extrahiert. Nach der Vereinigung der organischen Phasen erfolgte die Trocknung mit MgSO<sub>4</sub> und Entfernung des Lösungsmittels mittels Rotationsverdampfer. Anschließend wurde das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC ( $R_t = 6.72$  min, 10 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 12 min) aufgereinigt. Das Produkt **65** (70.3 mg, 0.05 mmol, 17 %) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 2.82$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

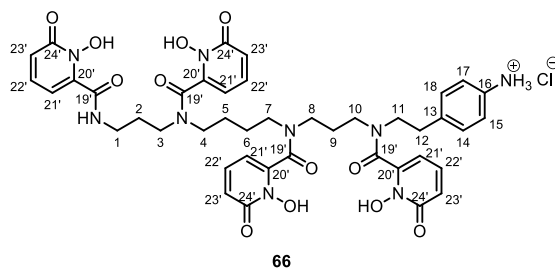
Reinheit: 97.4 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 9.37 – 4.76 (m, 44 H), 2.87-2.55 (m, 16H, *H*-1, *H*-3, *H*-4, *H*-7, *H*-8, *H*-10, *H*-11, *H*-12), 1.92-0.97 (m, 17H, *H*-2, *H*-5, *H*-6, *H*-9, *H*-21).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 161.61, 161.34, 157.92, 157.65, 153.22, 143.21, 140.70, 139.38, 139.26, 138.41, 138.25, 134.28, 134.02, 130.06, 129.59, 129.49, 129.22, 128.90, 122.87, 122.41, 118.68, 104.28, 102.82, 99.13, 79.69, 79.42, 79.33, 79.16, 78.80, 46.25, 43.89, 42.28, 37.11, 36.77, 29.45, 28.58 (*C*-21), 25.46, 25.08.

**MALDI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 1330.63 (1330.58), [M-OBn+H]<sup>+</sup> (ber.): 1224.53 (1224.54), [M-2OBn+H]<sup>+</sup> (ber.): 1118.52 (1118.50), [M-3OBn+H]<sup>+</sup> (ber.): 1012.46 (1012.46).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 1330.5817 (1330.5820), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 1352.5636 (1352.5639), [M+C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>+2H]<sup>+</sup> (ber.): 1230.5292 (1230.5295), [M+CHO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (ber.): 1374.5735 (1374.5728), [M+C<sub>2</sub>F<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (ber.): 1442.5609 (1442.5602).

6.3.1.21. 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-NH<sub>3</sub>Cl (66)

66

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von BHUPATHIRAJU *et al.*<sup>[74]</sup> **65** (60.0 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM (18.7 mL) unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Es folgte die Zugabe einer 1 M-Lösung BCl<sub>3</sub> in p-Xylen (4.8 mL, 4.83 mmol, 107.0 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 16 h gerührt. Im Anschluss wurde der farblose Niederschlag abzentrifugiert, dreimal mit Aceton (20 mL) und einmal mit Diethylether (20 mL) gewaschen. **66** (37.2 mg, 0.04 mmol, 91 %, Lit: 95 %<sup>[74]</sup>) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 1.35$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

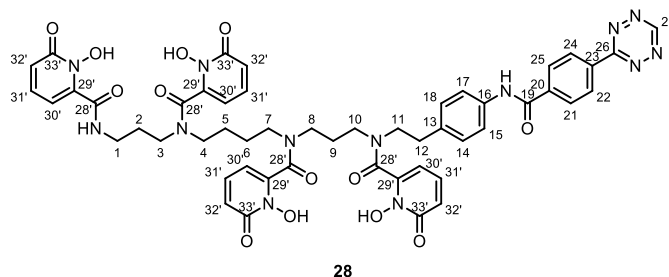
Reinheit: 96.7 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  [ppm] = 8.14 – 5.48 (m, 16H, *H*-14, *H*-15, *H*-17, *H*-18, *H*-21', *H*-22', *H*-23'), 3.80 – 2.78 (m, 16H, *H*-1, *H*-3, *H*-4, *H*-7, *H*-8, *H*-10, *H*-11, *H*-12), 2.13 – 1.29 (m, 8H, *H*-2, *H*-5, *H*-6, *H*-9).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  [ppm] = 163.69, 163.66, 163.61, 163.35, 162.59, 162.47, 160.41, 160.24, 142.89, 142.73, 142.68, 142.54, 142.27, 141.60, 141.10, 139.84, 139.65, 138.86, 131.87, 131.79, 131.70, 123.93, 120.51, 108.70, 108.11, 105.61, 105.50, 51.13, 49.51, 49.43, 48.35, 48.19, 47.78, 47.55, 47.30, 47.25, 46.65, 43.85, 43.73, 43.63, 38.33, 38.01, 34.69, 33.70, 33.51, 29.08, 27.86, 26.28, 25.89, 25.36.

**MALDI-MS (*m/z*):** [M-2O+H]<sup>+</sup> (ber.): 837.68 (838.35), [M-O+H]<sup>+</sup> (ber.): 853.67 (854.35), [M+Fe-2H]<sup>+</sup> (ber.): 922.54 (923.25), [M+Fe+Na-3H]<sup>+</sup> (ber.): 944.51 (945.24).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+Fe-2H]<sup>+</sup> (ber.): 923.2522 (923.2532), [M+Fe-4H]<sup>-</sup> (ber.): 921.2387 (921.2386).

**6.3.1.22. 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin (28)**

**66** (27.0 mg, 0.03 mmol, 1.02 Äq.) wurde in DMSO (0.6 mL) gelöst. 4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)benzoesäure (**67**) (6.0 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) und PyBOP (31.0 mg, 0.06 mmol, 2.0 Äq.) wurden in DMSO (0.6 mL) gelöst. Nach der Vereinigung beider Lösungen, wurde DIPEA (15.0  $\mu$ L, 0.09 mmol, 3.0 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt und schließlich mittels analytischer HPLC ( $R_t = 1.89$  min, 0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min) aufgereinigt. **28** (4.93 mg, 0.005 mmol, 16 %) wurde als pinker Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 1.89$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 95.3 %

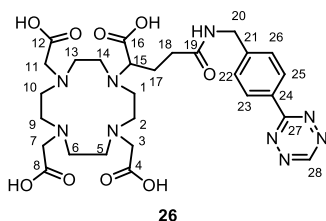
**$^1\text{H-NMR}$  (700 MHz, DMSO- $d_6$ )**  $\delta$  [ppm] = 10.66 (s, 1H,  $H$ -27), 10.50 – 10.40 (m, 1H,  $NH$ ), 8.87 – 8.68 (m, 1H,  $NH$ ), 8.70 – 8.62 (m, 2H,  $H$ -22,  $H$ -24), 8.30 – 8.21 (m, 2H,  $H$ -21,  $H$ -25), 8.21 – 5.73 (m, 16H,  $H$ -14,  $H$ -15,  $H$ -17,  $H$ -18,  $H$ -30',  $H$ -31',  $H$ -32'), 3.32 – 2.65 (m, 16H,  $H$ -1,  $H$ -3,  $H$ -4,  $H$ -7,  $H$ -8,  $H$ -10,  $H$ -11,  $H$ -12), 1.97 – 1.17 (m, 12H,  $H$ -2,  $H$ -5,  $H$ -6,  $H$ -9).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (175 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  [ppm] = 166.75, 165.13, 164.63, 161.34, 161.25, 160.26, 159.61, 157.88, 157.48, 157.32, 157.30, 142.35, 142.11, 141.94, 141.90, 141.78, 141.56, 138.46, 137.86, 137.68, 137.39, 137.23, 137.19, 137.05, 137.00, 134.55, 134.52, 129.04, 128.97, 128.89, 128.73, 128.71, 127.82, 127.79, 127.33, 120.75, 120.56, 120.50, 119.38, 119.10, 119.04, 118.98, 118.87, 117.25, 108.77, 106.32, 103.69, 103.67, 103.63, 103.61, 102.18, 102.11, 101.82, 101.49, 45.88, 26.73, 25.94.

**MALDI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 1055.32 (1054.38),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1076.30 (1076.36).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+Fe-2H]^+$  (ber.): 1107.2910 (1107.2917),  $[M+Fe+Na-3H]^+$  (ber.): 1129.2734 (1129.2742).



6.3.1.23. DOTA-GA-Tetrazin (**26**)

Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von LITAU *et al.*<sup>[86]</sup> DOTA-GA-Anhydrid (**68**) (21.9 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DMF (0.6 mL) vorgelegt. Es folgte die Zugabe einer Lösung von H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>(HCOO) (**69**) (11.1 mg, 0.05 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (0.4 mL) und DIPEA (42.0 µL, 0.24 mmol, 5.0 Äq.). Nach 10 min bei RT wurde der Feststoff über Zentrifugation entfernt. Die Lösung wurde mittels einiger Tropfen 1 M HCl angesäuert und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC unter Verwendung eines Gradienten von 0 – 25 % MeCN + 0.1 % TFA in 11 min ( $R_t = 7.29$  min) aufgereinigt. **26** (13.0 mg, 0.02 mmol, 42 %, Lit.: 44 %<sup>[86]</sup>) wurde als pinker Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 1.33$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

Reinheit: 99.5 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 10.36 (s, 1H, *H*-28), 8.37 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, *H*-23, *H*-25), 7.56 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, *H*-22, *H*-26), 4.49 (s, 2H, *H*-20), 3.98 – 3.60 (m, 7H, *H*-3, *H*-7, *H*-11, *H*-15), 3.59 – 2.84 (m, 16H, *H*-1, *H*-2, *H*-5, *H*-6, *H*-9, *H*-10, *H*-13, *H*-14), 2.72 – 2.51 (m, 2H, *H*-18), 2.14 – 1.89 (m, 2H, *H*-17).

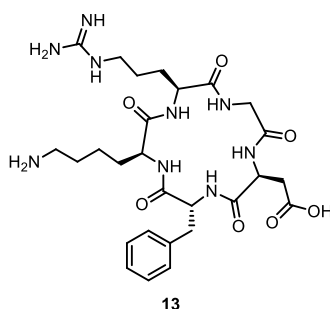
**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  [ppm] = 175.10 (*C*-19), 166.21 (*C*-27), 157.22 (*C*-28), 143.56 (*C*-24), 130.09 (*C*-21), 128.43 (*C*-23, *C*-25), 128.13 (*C*-22, *C*-26), 42.82 (*C*-20), 33.07 (*C*-18).

**MALDI (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 646.83 (646.29), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 668.65 (668.28).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 646.2950 (646.2944), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 668.2775 (668.2763), [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 644.2803 (644.2798).

## 6.3.2. Peptidsynthese und Synthese der Chelator-c(RGDfK)-Konjugate

### 6.3.2.1. c(RGDfK) (13)



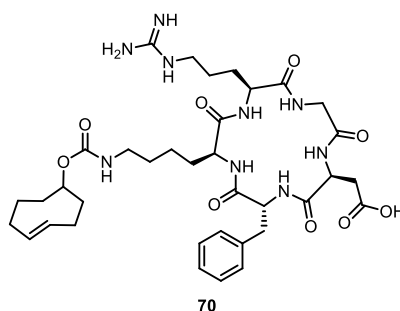
Die Synthese des cyclischen Pentapeptids c(RGDfK) (**13**) erfolgte auf Fmoc-Asp(NovaSyn<sup>®</sup> TGA)-OAll-Harz (250.0 mg, 52.5  $\mu$ mol, 1.0 Äq., Belegung: 0.21 mmol/g) unter Verwendung der Fmoc-Strategie in Anlehnung an literaturbekannte Vorschriften.<sup>[104]</sup> Zunächst wurde das Fmoc-Asp(NovaSyn<sup>®</sup> TGA)-OAll-Harz 60 min bei RT in DCM gequollen. Die Abspaltung von Fmoc erfolgte mit Piperidin in DMF (1:1, v/v) für insgesamt 7 min (2 min und 5 min). Für die Peptidkupplung wurde zunächst die jeweilige Aminosäure (210.0  $\mu$ mol, 4.0 Äq.) durch zweiminütige Inkubation mit HBTU (78.0 mg, 204.8  $\mu$ mol, 3.90 Äq.) und DIPEA (36.0  $\mu$ L, 210.0  $\mu$ mol, 4.0 Äq.) in DMF (2 mL) aktiviert. Anschließend erfolgte die Kupplung für 30 min bei RT. Diese Schritte wurden so lange wiederholt bis die folgende Sequenz Fmoc-D-Phe-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly-Asp(NovaSyn<sup>®</sup> TGA)-OAll vollständig war. Schließlich wurde die Ally-Schutzgruppe mittels Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (15.2 mg, 13.1  $\mu$ mol, 0.25 Äq.) und Phenylsilan (155.2  $\mu$ L, 1260.0  $\mu$ mol, 24.0 Äq.) in DCM (2 mL) abgespalten. Hierfür wurde Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> direkt in die Spritze gegeben und Phenylsilan in DCM gelöst und aufgezogen. Die Abspaltungszeit betrug 30 min. Der Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Es folgte die Abspaltung von Fmoc mit Piperidin in DMF (1:1, v/v), wie oben beschrieben. Die Cyclisierung erfolgte über Nacht unter Verwendung von HBTU (19.9 mg, 52.5  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) und DIPEA (6.8  $\mu$ L, 52.5  $\mu$ mol, 1.0 Äq.). Abschließend erfolgte die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen und gleichzeitige Abspaltung vom Harz mittels einer Lösung an TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (5 mL, 95:2.5:2.5, v/v/v) bei RT für 3 h. c(RGDfK) (**13**) (18.8 mg, 31.1  $\mu$ mol, 59 %) wurde nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (0 – 20 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t$  = 3.03 min) als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t$  = 2.65 min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)  
Reinheit: 100 %

**MALDI ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 604.17 (604.32),  $[M+Na]^+$  (ber.): 626.06 (626.30),  $[M+K]^+$  (ber.): 642.04 (642.28).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 604.3201 (604.3202),  $[M+Na]^+$  (ber.): 626.3029 (626.3021),  $[M-H]^-$  (ber.): 602.3059 (602.3056).

### 6.3.2.2. c(RGDfK)-TCO (**70**)



c(RGDfK)-TCO (**70**) wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von SEIBOLD *et al.* hergestellt.<sup>[68]</sup> c(RGDfK) (**13**) (6.0 mg, 9.8  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) wurde in DMF (0.2 mL) vorgelegt und mit DIPEA (3.3  $\mu$ L, 19.5  $\mu$ mol, 1.99 Äq.) versetzt. Es folgte die Zugabe einer Lösung des TCO-NPC (2.8 mg, 9.8  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) in DMF. Nachdem das Reaktionsgemisch 5 h bei RT geschüttelt wurde, wurde das Lösungsmittel mittels Vakuumdestillation entfernt. Es folgte die Aufreinigung des Rohprodukts mittels semipräparativer HPLC (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t$  = 4.30 min). **70** (3.7 mg, 4.9  $\mu$ mol, 50 %, Lit.: 52 %<sup>[68]</sup>) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

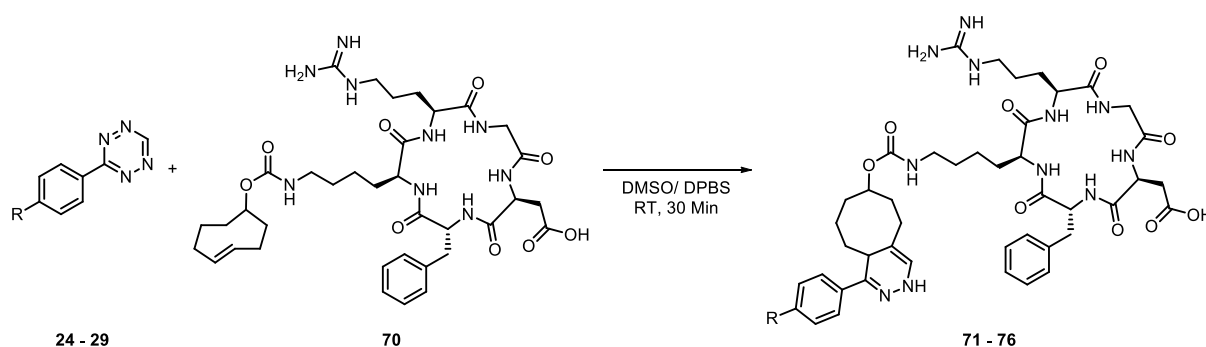
**HPLC:**  $R_t$  = 1.89 min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 97.3 %

**MALDI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 755.77 (756.40),  $[M+Na]^+$  (ber.): 777.80 (778.39).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 756.4041 (756.4039),  $[M+Na]^+$  (ber.): 778.3875 (778.3859),  $[M-H]^-$  (ber.): 754.3898 (754.3893).

### 6.3.2.3. iEDDA-Reaktion von TCO-c(RGDfK) (70) mit den Tetrazinen 24 - 29

#### 6.3.2.3.1. Allgemeine Vorschrift für die Herstellung der Peptidkonjugate

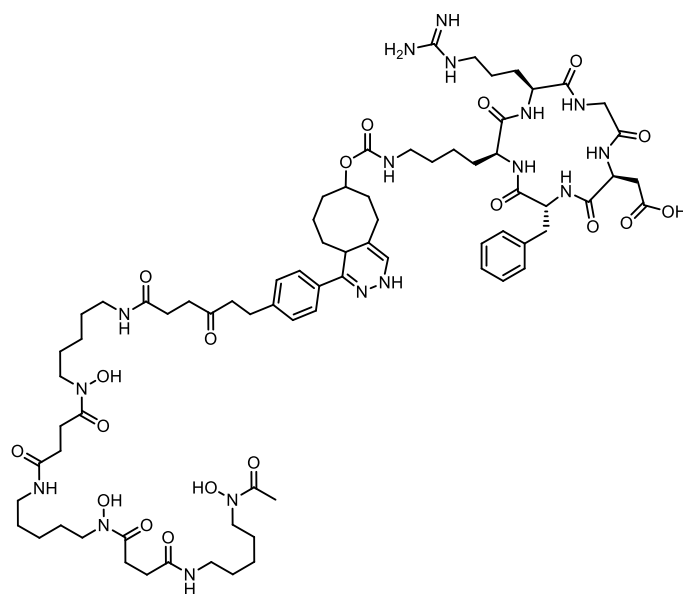


**Schema 13.** Synthese der Peptidkonjugate mittels iEDDA-Reaktion.

Zunächst wurde c(RGDfK)-TCO (70) in DMSO (50  $\mu$ L) gelöst und zu einer Lösung an DFO-Tetrazin (24) in DMSO (50  $\mu$ L) gegeben. Nach der Zugabe von DPBS (100  $\mu$ L) wurde das Reaktionsgemisch 30 min gerührt. Es folgte die Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC. Ein Gemisch der oxidierten (Pyridazin) und nicht-oxidierten (DHP) Form wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Für DOTA-GA-c(RGDfK) (75) und NODA-GA-c(RGDfK) (76) konnte die oxidierte Form isoliert werden. Hierfür wurde das erhaltene Gemisch weitere 15 h in Wasser mit 1%iger TFA (100  $\mu$ L) bei RT gerührt. Im Anschluss erfolgte erneute eine Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC.

## 6.3.2.3.2. DFO-c(RGDfK) (72)



72

**Ansatz:**

Substanz	<i>M</i> (g/mol)	<i>n</i> (μmol)	<i>m</i> (mg)	<i>V</i> (μL)	Äq.
70	755.87	1.32	1.00	/	1.0
24	829.96	1.46	1.21	/	1.1

**Aufreinigung:** $R_{t, \text{Pyridazin}} = 5.04 \text{ min}$  (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min) $R_{t, \text{DHP}} = 5.52 \text{ min}$  (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)**Ausbeute:**

1.6 mg (1.03 μmol, 78 %)

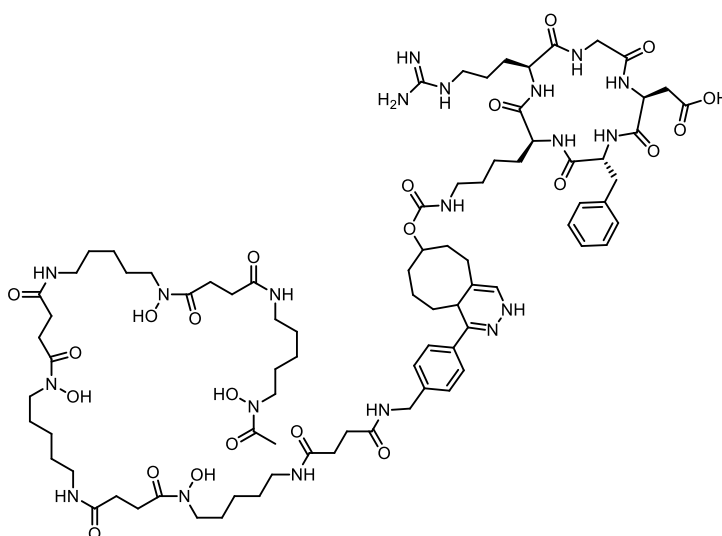
**HPLC:****DHP :**  $R_t = 2.02 \text{ min}$  (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)**Pyridazin:**  $R_t = 1.82 \text{ min}$  (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)**Reinheit (DHP + Pyridazin):** 98.1 %**MALDI (*m/z*):****DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1556.65 (1557.84),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1579.31 (1579.82).**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1555.90 (1555.83),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1578.02 (1577.81).

**HR-ESI-MS (*m/z*):**

**DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1557.8403 (1557.8424),  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 779.4243 (779.4249),  $[M-H]^-$  (ber.): 1555.8278 (1555.8283),  $[M-2H]^{2-}$  (ber.): 777.4106 (777.4103).

**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1555.8244 (1555.8267),  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 778.4161 (778.4170),  $[M-H]^-$  (ber.): 1553.8129 (1553.8122),  $[M-2H]^{2-}$  (ber.): 776.4026 (776.4024).

**6.3.2.3.3. DFO\*-c(RGDfK) (73)**



73

**Ansatz:**

Substanz	<i>M</i> (g/mol)	<i>n</i> (μmol)	<i>m</i> (mg)	<i>V</i> (μL)	Äq.
70	755.87	1.32	1.0	/	1.0
27	1030.19	1.45	1.5	/	1.1

**Aufreinigung:**  $R_{t, \text{Pyridazin}} = 6.59 \text{ min}$  (0 – 50 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

$R_{t, \text{DHP}} = 6.80 \text{ min}$  (0 – 50 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

**Ausbeute:** 1.37 mg (0.78 μmol, 59 %)

**HPLC:**

**DHP:**  $R_t = 2.12 \text{ min}$  (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

**Pyridazin:**  $R_t = 1.92 \text{ min}$  (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

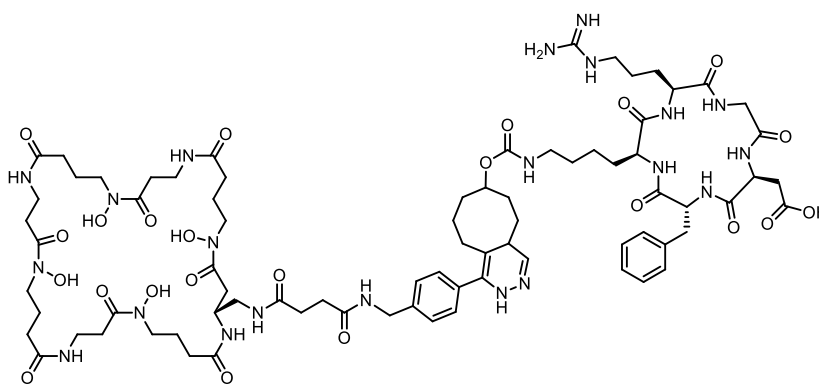
**Reinheit (DHP + Pyridazin):** 99.0 %

**MALDI ( $m/z$ ):**

**DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1757.79 (1757.96),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1779.28 (1779.94).

**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1755.91 (1755.94).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[M+H]^+$  (ber.): 1757.9527 (1757.9585),  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 879.4819 (879.4829),  $[M-H]^-$  (ber.): 1755.9381 (1755.9439),  $[M-2H]^{2-}$  (ber.): 877.4680 (877.4683).

**6.3.2.3.4. CTH36-c(RGDfK) (71)****Durchführung:**

Das Produkt **71** war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurde vor der Verwendung in den Radiomarkierungsversuchen über die semipräparative HPLC aufgereinigt.

**HPLC:**

**DHP:**  $R_t = 1.79$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

**Pyridazin:**  $R_t = 2.01$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

**Reinheit (DHP + Pyridazin):** 98.7 %

**MALDI ( $m/z$ ):**

**DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1714.40 (1714.85),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1736.27 (1736.84).

**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1712.89 (1712.84).

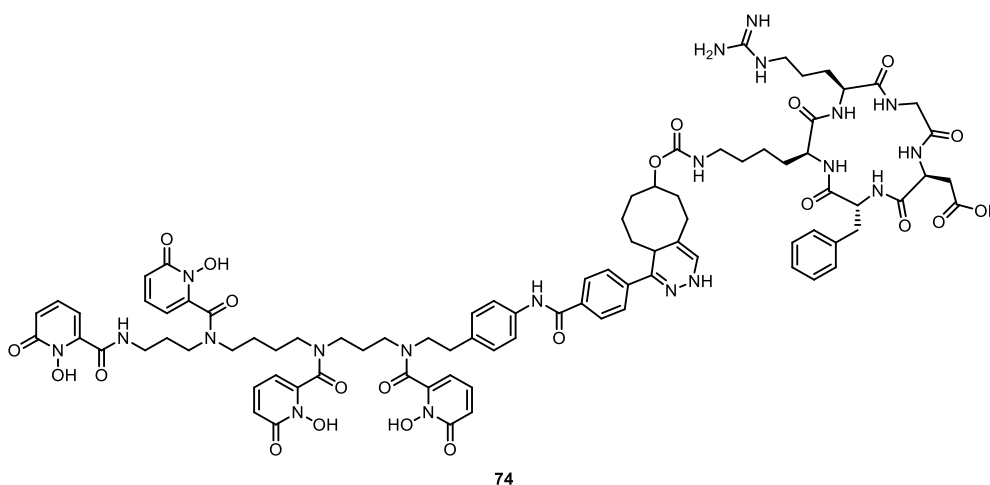
## Experimenteller Teil

### HR-ESI-MS ( $m/z$ ):

**DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1714.8499 (1714.8547),  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 857.9302 (857.9310),  $[M+Na+H]^{2+}$  (ber.): 868.9210 (868.9220),  $[M-H]^-$  (ber.): 1712.8393 (1712.8401),  $[M-2H]^{2-}$  (ber.): 855.9165 (855.9164).

**Pyridazin:** wurde nicht gemessen, da Anteil an Pyridazin zu gering

### 6.3.2.3.5. 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-c(RGDfK) (74)



### Ansatz:

Substanz	$M$ (g/mol)	$n$ ( $\mu\text{mol}$ )	$m$ (mg)	$V$ ( $\mu\text{L}$ )	Äq.
70	755.87	1.19	0.90	/	1.0
28	1054.50	1.31	1.38	/	1.1

**Aufreinigung:**  $R_{t, \text{Pyridazin}} = 5.44$  min (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

$R_{t, \text{DHP}} = 5.85$  min (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

**Ausbeute:** 1.79 mg (1.01  $\mu\text{mol}$ , 84 %)

### HPLC:

**DHP:**  $R_t = 2.25$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

**Pyridazin:**  $R_t = 2.06$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

**Reinheit (isoliertes Pyridazin):** 95.2 %

### MALDI ( $m/z$ ):

**DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1781.30 (1781.77),  $[M+H-O]^+$  (ber.): 1763.49 (1765.7758),  $[M+H-2O]^+$  (ber.): 1748.41 (1749.7809),  $[M+H-3O]^+$



(ber.): 1732.27 (1733.7859),  $[M+H-4O]^+$  (ber.): 1717.33 (1717.7910),  $[M+Fe-O]^+$  (ber.): 1816.44 (1818.6878).

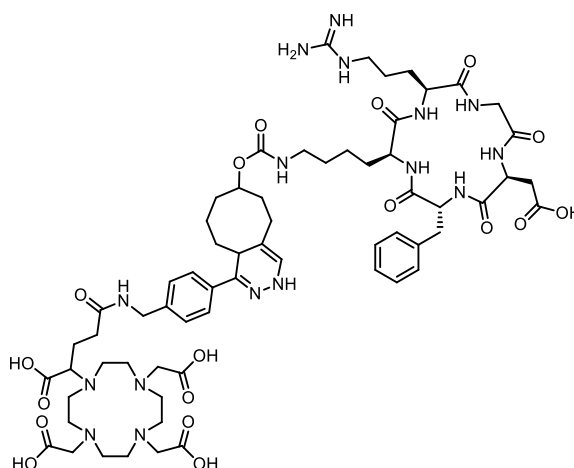
**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1780.72 (1779.76),  $[M+H-O]^+$  (ber.): 1763.60 (1763.76),  $[M+H-2O]^+$  (ber.): 1747.60 (1747.77),  $[M+H-3O]^+$  (ber.): 1731.67 (1731.77),  $[M+Fe-2H]^+$  (ber.): 1832.46 (1832.67),  $[M+Fe-O]^+$  (ber.): 1816.34 (1816.67).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**

**DHP:** vorwiegend Pyridazin sichtbar

**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1779.7513 (1779.7550),  $[M+H-O]^+$  (ber.): 1763.7554 (1763.7602),  $[M+Fe-2H]^+$  (ber.): 1832.6607 (1832.6670),  $[M+2H]^+$  (ber.): 890.3807 (890.3812).

**6.3.2.3.6. DOTA-GA-c(RGDfK) (75)**



75

**Ansatz:**

Substanz	$M$ (g/mol)	$n$ ( $\mu\text{mol}$ )	$m$ (mg)	$V$ ( $\mu\text{L}$ )	Äq.
70	755.87	1.32	1.00	/	1.0
26	645.67	1.46	0.94	/	1.1

**Aufreinigung:**  $R_{t, \text{Pyridazin}} = 4.78$  min (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

$R_{t, \text{DHP}} = 5.18$  min (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

**Ausbeute:** 1.34 mg (0.98  $\mu\text{mol}$ , 70 % oxidierte Form)

**HPLC:**

**DHP:**  $R_t = 1.91$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

## Experimenteller Teil

**Pyridazin:**  $R_t = 1.79$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

**Reinheit (isoliertes Pyridazin):** 98.2 %

### MALDI ( $m/z$ ):

**DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 13712.78 (1373.68).

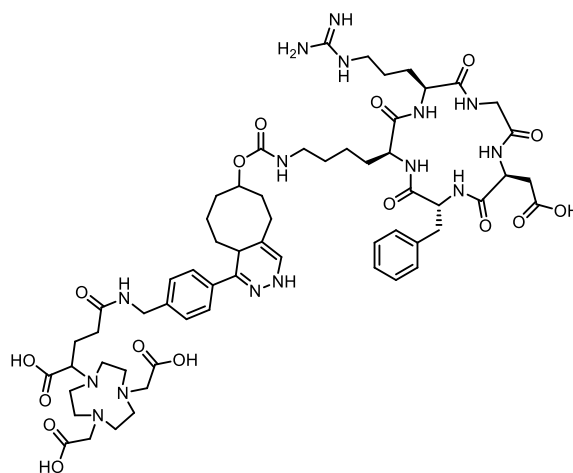
**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1371.45 (1371.67),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1393.49 (1393.65).

### HR-ESI-MS ( $m/z$ ):

**DHP:** zu hoher Anteil an Pyridazin, sodass hier nur die Massen für Pyridazin gefunden wurden

**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1371.6662 (1371.6692),  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 686.3380 (686.3383),  $[M+H+Na]^{2+}$  (ber.): 697.3380 (697.3292),  $[M-H]^-$  (ber.): 1369.6557 (1369.6546).

### 6.3.2.3.7. NODA-GA-cRGDFK (76)



76

### Ansatz:

Substanz	$M$ (g/mol)	$n$ ( $\mu$ mol)	$m$ (mg)	$V$ ( $\mu$ L)	Äq.
70	755.87	2.01	1.52	/	1.0
29	544.57	2.11	1.15	/	1.1

**Aufreinigung:**  $R_{t, \text{Pyridazin}} = 4.62$  min (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

$R_{t, \text{DHP}} = 5.10$  min (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)

**Ausbeute:** 1.73 mg (1.36  $\mu$ mol, 67 % oxidierte Form)

**HPLC:****DHP:**  $R_t = 1.87$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)**Pyridazin:**  $R_t = 1.75$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)**Reinheit (isoliertes Pyridazin):** 97.9 %**MALDI ( $m/z$ ):****DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1272.37 (1272.64),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1294.34 (1294.62).**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1270.64 (1270.62),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1292.50 (1292.60).**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):****DHP:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1272.6356 (1272.6371),  $[M-H]^-$  (ber.): 1270.6236 (1270.6225).**Pyridazin:**  $[M+H]^+$  (ber.): 1270.6204 (1270.6215),  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 635.8142 (635.8144),  $[M-H]^-$  (ber.): 1268.6076 (1268.6069).**6.3.3. Radiomarkierung der Chelator-cRGDfK-Konjugate**

Zu einer Lösung an  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-Oxalat}$  (1 M, 40 – 55 MBq) in 0.1 M HCl Lösung (~50  $\mu\text{L}$ ) wurde HEPES Puffer (0.25 M, pH = 9, 150  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde unter Zugabe einer NaOH-Lösung (30 %, 2 – 4  $\mu\text{L}$ ) auf 7.0 – 7.3 eingestellt. Im Anschluss folgte die Zugabe des jeweiligen Chelator-c(RGDfK)-Konjugats (20 nmol, 20  $\mu\text{L}$ ). Das Gemisch wurde bei 37 °C inkubiert und der Reaktionsfortschritt mittels analytischer Radio-HPLC aufgezeichnet. Die Überprüfung des Reaktionsfortschrittes der Radiomarkierung von DFO-c(RGDfK) (**72**) und DFO\*-c(RGDfK) (**73**) erfolgte zusätzlich mittels Radio-iTLC. Für DFO-c(RGDfK) (**72**), DFO\*-c(RGDfK) (**73**) und CTH36-c(RGDfK) (**71**) wurde nach 1 h eine Inkorporationsrate von  $\geq 96$  % erreicht. Das Reaktionsgemisch von 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-c(RGDfK) (**74**) musste 5 h bei 37 °C inkubiert werden um eine Inkorporation von  $\geq 96$  % zu erreichen. Die Produkte wurden mit nicht-optimierten molaren Aktivitäten von 2 – 2.75 GBq/ $\mu\text{mol}$  erhalten. Für DOTA-GA-c(RGDfK) (**75**) und NODA-GA-c(RGDfK) (**76**) konnte keine Inkorporation beobachtet werden. Die Reaktion wurde für DOTA-GA-c(RGDfK) (**75**) zusätzlich bei pH 4 und 5 sowie unter Verwendung von  $[^{89}\text{Zr}]\text{ZrCl}_4$  durchgeführt, jedoch führte auch dies nicht zur gewünschten Inkorporation.

### 6.3.3.1. Herstellung von [<sup>89</sup>Zr]ZrCl<sub>4</sub>

Eine *Sep-Pak* (46 mg) *Accell Plus QMA Carbonat Light* Kartusche (*Waters*, Eschborn, Deutschland) wurde zunächst mit Ethanol (5 mL), HCl (1 M, 7.5 mL), NaCl-Lösung (0.9 %, 7.5 mL) und anschließend mit Tracepur Wasser (7.5 mL) vorkonditioniert. Die [<sup>89</sup>Zr]Zr-oxalat Lösung (8.9 MBq) wurde auf die Kartusche geladen und mit Tracepur<sup>®</sup> Wasser (30 mL) gewaschen. [<sup>89</sup>Zr]ZrCl<sub>4</sub> wurde nach der Elution mit einer HCl-Lösung (1 M, 0.4 mL) in einer Effizienz von  $\geq 95$  % erhalten.

### 6.3.4. Bestimmung der Lipophilie log<sub>D</sub>(7.4)

Zu einem Gemisch aus 1-Octanol (800  $\mu$ L) und Phosphatpuffer (795  $\mu$ L, pH 7.4, 0.05 M) wurde eine Lösung des jeweiligen <sup>89</sup>Zr-markierten Peptidkonjugats (5  $\mu$ L, 0.8 – 1.2 MBq, 0.37 – 0.45 nmol) gegeben. Das Gemisch wurde 2 min geschüttelt. Schließlich wurden die Phasen über zwei-minütige Zentrifugation bei 12100 xg getrennt. Ein Aliquot der organischen Phase (200  $\mu$ L) und der wässrigen Phase (200  $\mu$ L) wurden jeweils in ein Gammazähler-Röhrchen überführt. Mittels Gammazähler wurde die Radioaktivität jeder Phase bestimmt. Jedes Verteilungsexperiment wurde mit mindestens n = 6 durchgeführt.

### 6.3.5. EDTA-Challenge-Versuche

Für jedes Challenge-Experiment wurden drei Aliquote EDTA (14.61 mg, 50  $\mu$ mol EDTA) in HEPES-Puffer (0.25 M, pH = 7.0, 380  $\mu$ L) vorbereitet. Der pH-Wert der Aliquoten wurde durch die Zugabe einer NaOH Lösung (30 %, 12.5  $\mu$ L) auf 7.0 eingestellt. Durch Zugabe von Tracepur Wasser (~7.5  $\mu$ L) wurde ein Endvolumen von 400  $\mu$ L erreicht. Zu jedem Aliquot wurde eine Lösung des jeweiligen <sup>89</sup>Zr-markierten Peptidkonjugates (5 nmol, 9.7 – 13.9 MBq) gegeben. Die Lösungen wurden während des Experiments bei 25 °C aufbewahrt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die <sup>89</sup>Zr-Transchelatierung mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt. Pro Verbindung wurde das Experiment mindestens zweimal durchgeführt.

### 6.3.6. Antikörper-Biokonjugation

#### 6.3.6.1. Bradford-Assay

Die Konzentrationen der Cetuximab-Lösungen wurden mittels Bradford-Assay bestimmt. Zunächst wurde eine Standardkalibriergerade aufgenommen. Hierfür wurde ausgehend von der Cetuximab-Lösung (Erbix, Infusionslösung 5 mg/mL) folgende Verdünnungsreihe in DPBS erstellt: 0.0; 0.25; 0.50; 0.75; 1.00; 1.25 mg/mL.

Für jede Verdünnung wurden jeweils 300  $\mu$ L Bradford Reagenz bei RT vorgelegt und mit 10  $\mu$ L der Verdünnung versetzt. Das Gemisch wurde mittels Eppendorf-Pipette mehrfach resuspendiert und im Anschluss in eine Küvette überführt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Absorption bei 595 nm mittels Spektralphotometer (Kapitel 6.1.3) bestimmt.

Zur Messung der Konzentrationen der zu quantifizierenden Proben wurden diese zunächst so verdünnt, dass deren Konzentrationsbereich zwischen 0.1 – 1.4 mg/mL lag. Im Anschluss erfolgte die Messung analog zu der Bestimmung der Konzentrationen der Verdünnungen.

#### 6.3.6.2. Herstellung des TCO-Cetuximab (77)

Zunächst wurde die Erbitux Infusionslösung (5 mg/mL Cetuximab) mittels eines DPBS-Puffers, der durch Zugabe einer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung (0.1 M) auf pH 8.6 – 8.8 eingestellt wurde, umgepuffert. Zu der Cetuximab Lösung (1.2 mL, 14.5 mg, 99.6 nmol, 12 mg/mL, pH 8.7 – 8.8) wurde eine Lösung von TCO-NHS in DMSO (53.2  $\mu$ L, 0.11 mg, 398.4 nmol, 2 mg/mL, 4 Äq.) gegeben. Das Gemisch wurde unter leichtem Schütteln 2 h bei RT inkubiert. Im Anschluss folgte die Aufreinigung mittels einer *NAP-25*-Säule unter Verwendung von DPBS (pH 7.4) als Laufmittel. TCO-Cetuximab wurde als farblose Lösung (2.7 mL, 4.3 mg/mL, 11.60 mg, 79.9 %) erhalten.

#### 6.3.6.3. Bestimmung des TCO/Cetuximab-Verhältnisses

Zur Bestimmung der Konzentration an Tetrazin folgte zunächst die Aufnahme einer Standardgerade des H-Tz-Bn-NH<sub>3</sub>Cl (**36**). Hierfür wurden folgende Verdünnungen in DPBS erstellt: 0; 10; 25; 50; 250; 500; 750; 1000  $\mu$ g/mL. Die Absorption wurde bei 515 nm bestimmt.

Um nun die Anzahl an TCOs pro Cetuximab zu bestimmen, wurde zu der TCO-Cetuximab-Lösung (150  $\mu$ L) ein Überschuss an **36** (10 – 15 Äq.) in DPBS (20  $\mu$ L) gegeben. Durch die

Ermittlung der Menge an abreagiertem Tetrazin konnte schließlich das Verhältnis an TCO-Einheiten pro Cetuximab bestimmt werden.

### 6.3.6.4. Synthese der Chelator-Cetuximab-Biokonjugate **78 – 80**

Das jeweilige Chelator-Tetrazin **24**, **27** und **26** (275 nmol, 8 Äq.) wurde in DMSO (30 µL) gelöst und anschließend zu der zuvor erhaltenen Lösung an TCO-Cetuximab (5 mg, 34.3 nmol, 1 Äq.) in DPBS-Puffer (1.15 mL) gegeben. Die Reaktion wurde 5 h bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über eine *NAP-25*- bzw. *NAP-10*-Säule unter Verwendung von DPBS-Puffer als Laufmittel. Nach einer zweiten Aufreinigung mittels Zentrifugalfiltration mittels Zentrifugalfilter *Vivaspin 6* (30 000 MWCO) wurde das jeweilige Chelator-Cetuximab Biokonjugat **78 – 80** (4.4 mg, 30.2 nmol, 88 %) als Lösung (1.5 – 2.5 mL) in DPBS erhalten.

### 6.3.7. Radiomarkierung der Chelator-Cetuximab-Biokonjugate

Zunächst wurde die Chelator-Cetuximab-Lösung (1.1 – 1.4 mg, 7.5 – 9.6 nmol) mittels Zentrifugalfilter *Vivaspin 6* (30 000 MWCO) auf den Markierungspuffer, den HEPES-Puffer (0.25 M, pH 7.0, 220 – 280 µL), umgepuffert. Das [<sup>89</sup>Zr]Zr-Oxalat (55 – 70 MBq, ~80 µL) in 0.1 M HCl Lösung (~80 µL) wurde in HEPES-Puffer (0.25 M, pH 9.0, 100 µL) vorgelegt. Unter Zugabe einer NaOH-Lösung (30 %, 2 – 4 µL) erfolgte die Einstellung des pH-Werts auf pH 7.0 – 7.2. Das jeweilige Chelator-Cetuximab-Biokonjugat **78 – 80** (1.1 – 1.4 mg, 7.5 – 9.6 nmol) wurde zugegeben, sodass ein nicht-optimiertes Aktivitäts-zu-Proteinmengen-Verhältnis von 50 MBq/mg erhalten wurde. Die Reaktion wurde bei 37 °C inkubiert und der Reaktionsfortschritt mittels Radio-iTLC überprüft. Für DFO-Cetuximab (**78**), DFO\*-Cetuximab (**79**) und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Cetuximab (**80**) zeigte die iTLC innerhalb 30 min eine Inkorporationsrate von ≥ 99 %. Zusätzlich wurde diese mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt. Hier wurde eine Inkorporationsrate von ≥ 96 % erhalten. Vor der Verwendung der radiomarkierten Konjugate wurde diese mittels *Nap-5*-Säule mit einer Rückgewinnungsrate von 85 – 92 % (ohne Ultrazentrifugation) aufgereinigt und falls erforderlich mittels Zentrifugalfilter mit einer Rückgewinnungsrate von 81 – 87 % (mit Ultrazentrifugation) aufkonzentriert. Nach der Aufreinigung betrug die radiochemische Reinheit ≥ 99 % (Radio-HPLC).

### 6.3.8. Zellkultivierung von A431- und HT-29-Zellen

Die Kultivierung der humanen HT-29-Darmkrebszelllinie erfolgte in *McCoy's 5A* Medium unter Zusatz von 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL). Für die Kultivierung der A431-Zellen, eine humane epidermoide Karzinom-Zelllinie, wurde DMEM mit dem Zusatz von 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL) verwendet. Die vom DSMZ erhaltenen eingefrorenen Zellen (5 Mio. Zellen/mL) wurden vorsichtig auf RT gebracht und in ein Falcon mit Nährmedium (19 mL) überführt. Zur Entfernung des DMSOs wurden die Zellen im Falcon bei 300 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in neuem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich auf 2 – 3 Zellkulturflaschen (T-150) verteilt. Das Medium wurde alle 2 – 3 d gewechselt. Sobald eine Konfluenz zwischen 70 – 90 % erreicht wurde, erfolgte das Passagieren der Zellen im Verhältnis von 1:9 (HT-29) bzw. 1:3 (A431). Hierfür wurden die Zellen zunächst mit DPBS (10 mL) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch die Inkubation mit einer 0.25 %igen Trypsin-Lösung (3 mL) für 5 min bei 37 °C und leichtem Klopfen. Die Enzymwirkung wurde unter Zugabe von Zellkulturmedium (7 mL) gestoppt, die Zellen mittels Pipette suspendiert und schließlich in neue Zellkulturflaschen mit vorgelegtem Medium (25 mL) ausgesät. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst analog zum Splitten vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 300 xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Die Zellen wurden anschließend in 90 % FBS + 10 % DMSO resuspendiert und als 1 mL-Aliquote in Kryoröhrchen überführt (5 Mio. Zellen/mL). Die Kryoröhrchen wurden in einem *Mr. Frosty* Gefrierbehälter auf -80 °C heruntergekühlt.

### 6.3.9. Bestimmung der Immunoreaktivität

Die Bestimmung der Immunoreaktivität erfolgte *in vitro* anhand eines Bindungsassays nach LINDMO *et al.*<sup>[37]</sup> Hierfür wurden A431-Zellen verwendet. Diese wurden zunächst analog zum Splitten von der Zellkulturflasche abgelöst und gezählt. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen in DPBS + 1 % BSA resuspendiert, sodass die Konzentration der Zellen 6 Mio. Zellen/950 µL betrug. Vier Aliquote mit je 950 µL Suspension wurden in jeweils ein *low binding-Eppendorf-Tube* überführt. Zu einem Aliquot wurde eine Lösung an aufgereinigtem Cetuximab (50 µg) in DPBS (50 µL) gegeben, sodass die Endkonzentration an nicht-radiomarkiertem Cetuximab 50 µg/mL betrug. Zu den anderen drei Aliquoten wurden je

## Experimenteller Teil

50  $\mu\text{L}$  DPBS zugegeben. Die Aliquote wurden 2 h unter Eiskühlung inkubiert. Im Anschluss wurde ausgehend von jedem Aliquot eine Verdünnungsreihe mit 6.0; 3.0; 1.5, 0.75, 0.375 und 0.1875 Mio. Zellen/mL erstellt. Nachdem zu jeder Verdünnung (500  $\mu\text{L}$ ) [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-Chelator-Cetuximab ( $\sim 0.12$  ng/ $\mu\text{L}$ , 6 ng, 50  $\mu\text{L}$ ,  $\sim 0.15$  kBq) gegeben wurden, wurde die Suspension 2 h unter leichtem Schütteln bei 23 °C inkubiert. Der Überstand, der nicht-gebundenes [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-Chelator-Cetuximab enthielt, wurde anschließend über Zentrifugation (3300 xg, 5 min) abgetrennt und in ein Gammazähler-Röhrchen überführt. Die Zellpellets wurden im Anschluss noch zweimal mit DPBS (250  $\mu\text{L}$ ) gewaschen. Auch die Waschlösungen wurden in das jeweilige Gammazähler-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden anschließend in DPBS (500  $\mu\text{L}$ ) resuspendiert und ebenfalls in Gammazähler-Röhrchen überführt. Das Eppendorf-Tube wurde weiterhin mit DPBS (250  $\mu\text{L}$ ) gespült.

### 6.3.10. Tierversuche

Alle Tierexperimente erfolgten unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes (TierSchG) und unter der Genehmigungsnummer 35-9185.81/G-266/17 (Regierungspräsidium Karlsruhe).

Die Bestimmung der *in vivo*-Pharmakokinetik der hergestellten [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-Chelator-Cetuximab-Derivate erfolgte an vier bis fünf Wochen alten weiblichen Balb/cAnN-Foxn1<sup>nu/nu</sup>-Rj-Nacktmäusen (*Janvier*, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich).

#### 6.3.10.1. Tumordinokulation

Als Tumormodell wurde die humane HT-29-Darmkrebszelllinie verwendet, siehe Kapitel 6.3.8. Analog zum Splitten wurden die Zellen von dem Zellkulturflaschenboden abgelöst und gezählt. Die Zentrifugation erfolgte im Anschluss für 3 min bei 4 °C und 300 xg. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in DPBS aufgenommen, sodass die Endkonzentration 50 Mio. Zellen/mL betrug. Schließlich wurden Aliquote der Suspension (200  $\mu\text{L}$ ) in autoklavierte 1.5 mL-Eppendorf-Tubes überführt, die dann bis zur Injektion auf Eis gelagert wurden.

Die subkutane Inokulation der Tumorzellen erfolgte unter Isofluran-Narkose. Nach dem erneuten Resuspendieren der Zellen wurden diese mittels Insulinspritze in die hintere rechte Flanke der Mäuse injiziert. Der ersten Gruppe wurden 2 – 5 Mio. Zellen in DPBS (100  $\mu\text{L}$ ) injiziert. Die Tiere wurden nach der Injektion täglich auf den Gesundheitszustand und das



Tumorstadium kontrolliert. Zwei der Tiere mussten vorzeitig geopfert werden, da sie das Abbruchkriterium einer zu großen Tumorstadium erreicht hatten. Für die nachfolgenden Gruppen 2 und 3 wurden daher nur 2.5 Mio. Zellen in DPBS (50 µL) verwendet. Die Gruppengröße betrug jeweils  $n = 7$ . 12 – 14 d nach der Tumorstadiuminokulation war eine Tumorstadiumgröße von 0.3 – 0.5 cm erreicht worden und es erfolgte die erste *in vivo*-Bildgebung mittels PET/CT.

### 6.3.10.2. *In vivo*-Bildgebung mittels Kleintier-PET/CT und *ex vivo*-Biodistribution

Die Radiotracer wurden, wie in Kapitel 6.3.7 beschrieben, hergestellt. Dabei wurde die Volumenaktivität auf 3 – 5 MBq/50 µL eingestellt. Die spezifische Aktivität betrug ca. 50 MBq/mg. Nach dem Einleiten der Isofluran-Narkose wurden pro Tier  $5.37 \pm 2.38$  MBq [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-Cetuximab ([<sup>89</sup>Zr]Zr-78) ( $0.11 \pm 0.05$  mg Cetuximab,  $n = 7$ ),  $5.73 \pm 3.05$  MBq [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-Cetuximab ([<sup>89</sup>Zr]Zr-79) ( $0.11 \pm 0.06$  mg Cetuximab,  $n = 7$ ) oder  $4.42 \pm 2.37$  MBq [<sup>89</sup>Zr]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Cetuximab ([<sup>89</sup>Zr]Zr-80) ( $0.09 \pm 0.05$  mg Cetuximab,  $n = 7$ ) über einen sehr dünnen Schlauch mit einem Totvolumen von 50 µL in die laterale Schwanzvene injiziert. Der Schlauch wurde zusätzlich mit 0.9%iger NaCl-Lösung (80 – 90 µL) gespült. Direkt nach der Injektion an Tag 0, sowie am Tag 4 und Tag 7 erfolgte eine PET/CT-Untersuchung.

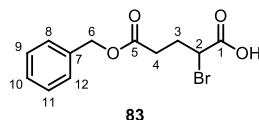
An Tag 7 wurden die Tiere direkt nach der PET/CT-Messung über zervikale Dislokation geopfert. Milz, Pankreas, Leber, Nieren, Lunge, Herz, Blut, Magen, Blinddarm mit Dickdarm, Dünndarm, Oberschenkelmuskel, Gehirn und Schwanz sowie die Knochen Schädel, Sternum, Femur rechts und links wurden entnommen, gewogen und anschließend im Gammazähler für je 1 min gemessen. Die gemessene Aktivität wurde zerfallskorrigiert. Mittels eines Standards (drei Aliquots der Tracer-Lösung) wurde die Aktivität in kBq bestimmt und die injizierte Dosis pro Gramm Organ (%ID/g) berechnet.

Da zwei Tiere der Gruppe 1 vorzeitig das Abbruchkriterium erreichten, wurden diese bereits an Tag 4 nach der zweiten PET/CT-Untersuchung euthanasiert. Für beide Tiere erfolgte, wie oben beschrieben, die Organentnahme.

## 6.4. Synthese eines neuen bifunktionellen CB-Chelators und Vergleich der <sup>68</sup>Ga-Radiomarkierungs- und Stabilitätseigenschaften mit etablierten Chelatoren

### 6.4.1. Synthese von CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub>

#### 6.4.1.1. 5-(Benzyloxy)-2-brom-5-oxopentansäure (**83**)



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von EISENWIENER *et al.*<sup>[116]</sup> durchgeführt. *L*-Glutaminsäure-5-benzylester (**82**) (4.0 g, 16.86 mmol, 1.0 Äq.) und Natriumbromid (6.07 g, 59.01 mmol, 3.50 Äq.) wurden in einer 1 M HBr-Lösung (30.3 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und es folgte die portionsweise Zugabe von Natriumnitrit (2.09 g, 30.35 mmol, 1.80 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei 0 °C gerührt. Im Anschluss wurde konzentrierte Schwefelsäure (1.53 mL, 28.66 mmol, 1.70 Äq.) gefolgt von Diethylether (30 mL) zugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether (10 mL) extrahiert. Schließlich wurden die vereinten organischen Phasen dreimal mit einer gesättigten NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen und dann über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan: EA 3:1 → 2:1). **83** (2.30 g, 7.62 mmol, 45 %, Lit: 63 %<sup>[116]</sup>) wurde als schwach gelbes Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 (EA/Hexan 1:3)

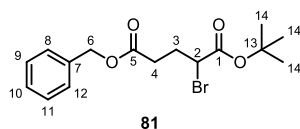
**HPLC:**  $R_t = 1.62$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

Reinheit: 92.2 %

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 7.41 – 7.32 (m, 5H, *H*<sub>Ar</sub>), 5.12 (s, 2H, *H*-6), 4.41 (dd,  $J = 8.5, 5.8$  Hz, 1H, *H*-2), 2.77 – 2.53 (m, 2H, *H*-4), 2.48 – 2.27 (m, 2H, *H*-3).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  [ppm] = 174.22 (*C*-1), 172.04 (*C*-5), 135.69 (*C*-7), 128.77 (*C*-9, *C*-11), 128.55 (*C*-10), 128.43 (*C*-8, *C*-12), 66.86 (*C*-6), 44.19 (*C*-2), 31.58 (*C*-4), 29.62 (*C*-3).

**HR-ESI-MS (*m/z*):** [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 298.9925 (298.9924).

6.4.1.2. 5-Benzyl-1-*tert*-butyl-2-brompentandioat (**81**)

Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von EISENWIENER *et al.*<sup>[116]</sup> mit minimalen Änderungen durchgeführt. **83** (2.0 g, 6.64 mmol, 1.0 Äq.) wurden in Chloroform (8 mL) gelöst unter Argon-Atmosphäre. Eine Lösung von *tert*-Butyltrichloracetimidat (2.6 mL, 14.61 mmol, 2.20 Äq.) in Cyclohexan (8 mL) wurde innerhalb 15 min zugetropft. Der gebildete Niederschlag wurde durch die Zugabe von Dimethylacetamid (2.0 mL, 17.93 mmol, 2.7 Äq.) und Bortrifluorid-diethyletherat (0.135 mL, 1.06 mmol, 0.16 Äq.) gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage bei RT gerührt. Mittels Vakuumdestillation wurden Chloroform und Cyclohexan entfernt. Die DMA-Phase wurde dreimal mit je Hexan (15 mL) extrahiert. Schließlich wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/EA 20:1 → 9:1) aufgereinigt. **81** (1.93 g, 5.41 mmol, 81 %, Lit: 61 %<sup>[116]</sup>) wurde als farbloses Öl erhalten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 (EA/Hexan 1:3)

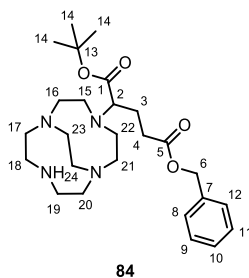
**HPLC:**  $R_t = 2.46$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 98.7 %

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.40 – 7.30 (m, 5H,  $H_{Ar}$ ), 5.13 (s, 2H,  $H-6$ ), 4.24 (dd,  $J = 8.5, 5.9$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 2.62 – 2.50 (m, 2H,  $H-4$ ), 2.41 – 2.21 (m, 2H,  $H-3$ ), 1.47 (s, 9H,  $H-14$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 172.13 ( $C-5$ ), 168.44 ( $C-1$ ), 135.85 ( $C-7$ ), 128.75 ( $C-9, C-11$ ), 128.48 ( $C-10$ ), 128.38 ( $C-8, C-12$ ), 82.79 ( $C-13$ ), 66.69 ( $C-6$ ), 46.79 ( $C-2$ ), 31.78 ( $C-4$ ), 29.86 ( $C-3$ ), 27.88 ( $C-14$ ).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):** [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 355.0375 (355.0550).

**6.4.1.3. 5-Benzyl-1-tert-butyl-2-(1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecan-4-yl)pentandioat (84)**



CB-Cyclen (**35**) (100.0 mg, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) und Kaliumcarbonat (69.7 mg, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) wurden in wasserfreiem Acetonitril (2 mL) unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Unter Kühlung auf 0 °C wurden in einer Stunde eine Lösung an **81** (180.1 mg, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) in Acetonitril (1 mL) zugetropft. Das Gemisch wurde weitere 5 h bei 0 °C und anschließend 3 Tage bei RT gerührt. Zur Entfernung des gebildeten Salzes erfolgte die Filtration über Celite. Der Feststoff wurde mit Acetonitril (20 mL) gewaschen. Die Lösung wurde eingengt und das Produkt **84** mittels semipräparativer HPLC (0 – 80 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 4.43$  min) aufgereinigt. **84** wurde in Form eines gelben Öls (117.2 mg, 0.20 mmol, 39 %) erhalten.

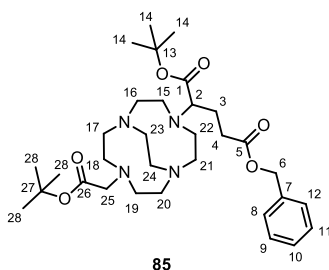
**HPLC:**  $R_t = 1.55$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
Reinheit: 98 %

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm] = 8.73 (s, 3H, NH), 7.39 – 7.29 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 5.15 – 5.09 (m, 2H,  $H-6$ ), 4.24 – 4.00 (m, 1H,  $H-2$ ), 3.86 – 2.63 (m, 21H,  $H-15$  –  $H-24$ ), 2.61 – 2.32 (m, 2H,  $H-4$ ), 2.31 – 1.77 (m, 2H,  $H-3$ ), 1.49 – 1.42 (m, 9H,  $H-14$ ).**

**$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  [ppm] = 173.15 ( $C-1$ ), 172.92 ( $C-5$ ), 160.99 (q,  $J = 37.8$ ,  $\text{CO}_{(\text{TFA})}$ ), 135.96 ( $C-7$ ), 128.78 ( $C_{\text{ArH}}$ ), 128.74 ( $C_{\text{ArH}}$ ), 128.69 ( $C_{\text{ArH}}$ ), 128.48 ( $C_{\text{ArH}}$ ), 128.33 ( $C_{\text{ArH}}$ ), 115.97 (q,  $J = 289.8$ ,  $\text{CF}_3(\text{TFA})$ ), 83.28 ( $C-13$ ), 66.64 ( $C-6$ ), 65.16 ( $C-2$ ), 64.15, 63.42, 59.09, 58.71, 58.51, 58.04, 57.23, 56.16, 56.13, 55.27, 55.09, 54.55, 53.58, 52.79, 47.00, 46.89, 44.93, 44.81, 44.53, 44.21, 43.24, 42.88, 31.33 ( $C-4$ ), 31.13, 30.88, 28.20 ( $C-14$ ), 28.15, 28.13, 25.67 ( $C-3$ ).**

**MALDI-MS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.): 474.80 (475.33).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.): 475.3279 (475.3279).

6.4.1.4. Bn-CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> (**85**)

**84** (95 mg, 16.2  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) wurde in wasserfreiem Acetonitril (1.4 mL) gelöst. Im Anschluss wurden Kaliumcarbonat (28 mg, 20.3  $\mu\text{mol}$ , 1.25 Äq.) und *tert*-Butylbromacetat (33  $\mu\text{L}$ , 22.2  $\mu\text{mol}$ , 1.37 Äq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h unter Argon-Atmosphäre gerührt. Zur Entfernung des entstandenen Salzes wurde das Reaktionsgemisch über Celite abfiltriert. Der Feststoff wurde mit Acetonitril (20 mL) gewaschen. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und das Produkt **85** mittels semipräparativer HPLC (25 – 65 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 4.57$  min) aufgereinigt. **85** wurde als gelbes Öl (67 mg, 9.5  $\mu\text{mol}$ , 59 %) erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 2.39$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)

Reinheit: 90.9 %

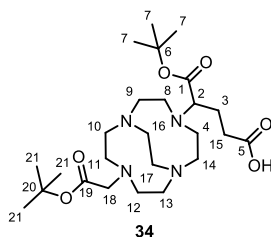
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 7.42 – 7.30 (m, 5H,  $H_{\text{Ar}}$ ), 5.17 – 5.07 (m, 2H,  $H-6$ ), 4.21 – 3.41 (m, 2H,  $H-25$ ), 3.39 – 2.81 (m, 21H, H-2,  $H-15$  –  $H-24$ ), 2.63 – 2.43 (m, 2H,  $H-4$ ), 2.21 – 1.78 (m, 2H,  $H-3$ ), 1.47 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.45 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 172.77 (C-5), 171.35 (C-1), 170.56 (C-26), 159.78 (q,  $J = 39.2$ ,  $\text{CO}_{(\text{TFA})}$ ) 135.65 (C-7), 128.89 ( $\text{C}_{\text{ArH}}$ ), 128.86 ( $\text{C}_{\text{ArH}}$ ), 128.85 ( $\text{C}_{\text{ArH}}$ ), 115.53 (q,  $J = 288.0$ ,  $\text{CF}_3_{(\text{TFA})}$ ), 82.68 (C-27), 82.07 (C-13), 66.92 (C-6), 65.24 (C-2), 57.70, 57.47, 57.28, 56.59, 56.45, 53.78, 52.15, 50.13, 46.70, 44.77, 30.87 (C-4), 28.2 ( $\text{CH}_3$ ), 28.27 ( $\text{CH}_3$ ), 26.06 (C-3).

**MALDI-MS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.): 589.02 (589.40).

**HR-ESI-MS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.): 589.3962 (589.3960).

#### 6.4.1.5. CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> (**34**)



**85** (40 mg, 56.9  $\mu$ mol) wurden in THF/Wasser (3 mL, 1:1, *v/v*) gelöst. Nach der Zugabe von 10 % Pd/C (10 mg) wurde das Gemisch 18 h bei RT unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Der Feststoff wurde mittels Filtration über Celite entfernt. Das THF wurde am Rotationsverdampfer und das Wasser schließlich mittels Lyophilisation entfernt. **34** wurde als farbloses Öl (26 mg, 42.4  $\mu$ mol, 75 %) nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (0 – 80 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min, *R*<sub>t</sub> = 5.14 min) erhalten.

**HPLC:** *R*<sub>t</sub> = 1.93 min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min)  
 Reinheit: 90.3 %

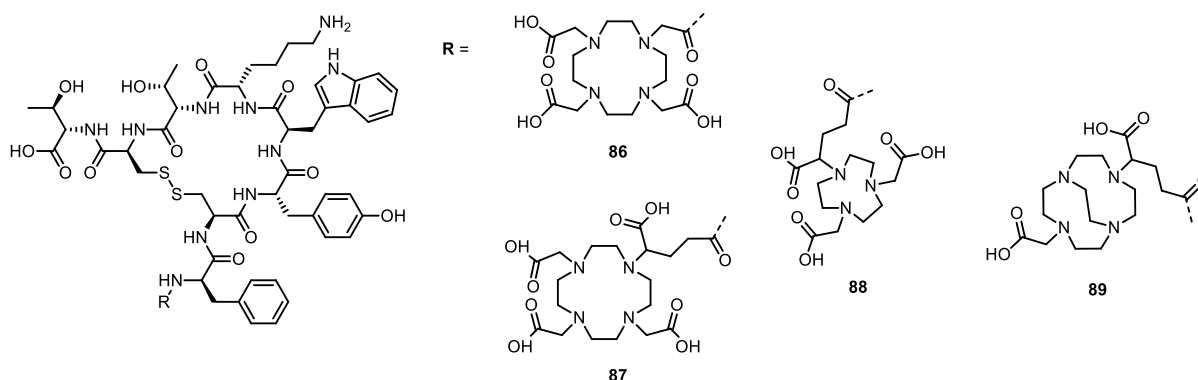
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 9.27 (s, 1H, OH), 4.22 – 3.68 (m, 1H, *H*-2), 3.54 (dd, *J* = 53.7, 17.9 Hz, 2H, *H*-18), 3.45 – 2.63 (m, 21H, *H*-2, *H*-8 – *H*-17), 2.61 – 2.46 (m, 2H, *H*-4), 2.24 – 1.76 (m, 2H, *H*-3), 1.47 (s, 9H, *H*-6 oder *H*-19), 1.45 (s, 9H, *H*-6 oder *H*-19).

**<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  [ppm] = 175.59, 171.57, 170.56, 160.63, 160.01, 159.70, 119.11, 116.82, 114.53, 112.23, 83.00, 82.68, 82.44, 65.89 (*C*-2), 62.77, 57.92, 57, 45, 57.27, 56.88, 56.71, 54.38, 53.10, 46.16, 44.85, 31.34 (*C*-4), 28.25 (*C*-6 oder *C*-19), 28.21 (*C*-6 oder *C*-19), 25.83.

**MALDI-MS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 498.94 (499.35).

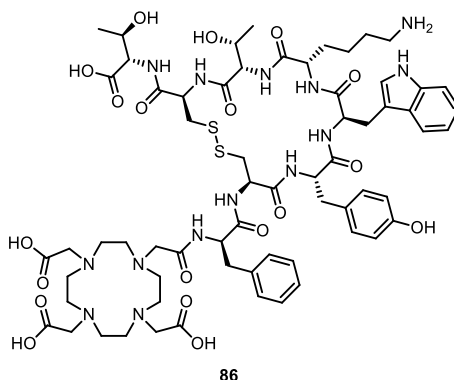
**HR-ESI-MS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup>(ber.): 499.6725 (499.3491).

## 6.4.2. TATE Derivate 86 – 89



Die Synthese der TATE-Derivate **86** – **89** (Chelator-*D*-Phe-*cyclo*[Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-OH) erfolgte auf Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (Belegung: 0.204 mmol/g bzw. 0.30 mmol/g) unter Verwendung der Fmoc-Strategie in Anlehnung an eine literaturbekannte Vorschrift.<sup>[117]</sup> Zunächst wurde das Harz in DCM für 60 min bei RT gequollen. Die Peptidkupplungen wurde im Ultraschallbad mit Aminosäure (4.0 Äq.), HBTU (3.90 Äq.) und DIPEA (4.0 Äq.) in DMF für 10 min durchgeführt. Hierfür wurden die Aminosäure zunächst mit HBTU und DIPEA 2 min vorinkubiert. Nach der Kupplung wurde Fmoc mittels Piperidin in DMF (1:1, v/v) für insgesamt 7 min (2 min und 5 min) abgespalten. Diese Schritte wurden so lange wiederholt bis die Peptidsequenz Fmoc-*D*-Phe-Cys(Acm)-Tyr(*t*Bu)-*D*-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(*t*Bu)-Cys(Acm)-Thr(*t*Bu)-Wang vollständig war. Nach der letzten Peptidkupplung von Fmoc-*D*-Phe-COOH erfolgte vor der Fmoc-Abspaltung die Cyclisierung unter Ausbildung einer Disulfidbrücke mit Thallium(III)trifluoracetat (4.0 Äq.) in DMF für 45 min. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und TATE mit dem jeweiligen Chelator (2.50 Äq.), HBTU (2.45 Äq.) und DIPEA (5.0 Äq.) für 3 h umgesetzt. Abschließend erfolgte die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen und gleichzeitige Abspaltung vom Harz mit einer Lösung TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5, v/v/v) bei RT für 3 h. Die TATE Derivate wurden mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt.

### 6.4.2.1. DOTA-TATE (86)



**86** wurde gemäß 6.4.2 auf Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (150 mg, 45.0  $\mu$ mol, 1.0 Äq., Belegung: 0.3 mmol/g) unter Verwendung von DOTA(*t*Bu)<sub>3</sub> synthetisiert. Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (0 – 70 % MeCN + 0.1 % TFA in 10 min,  $R_t$  = 5.04 min) wurde **86** (40.4 mg, 28.2  $\mu$ mol, 63 %) als farbloser Feststoff erhalten.

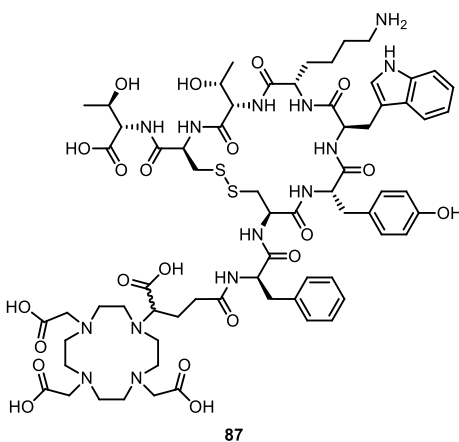
**HPLC:**  $R_t$  = 2.33 min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 10 min)

Reinheit: 100 %

**MALDI (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 1434.92 (1435.60), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 1457.10 (1457.58).

**HR-ESI-MS (m/z):** [M+2H]<sup>2+</sup> (ber.): 718.3053 (718.3047), [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 1435.6060 (1435.6021), [M-H]<sup>-</sup> (ber.): 1433.5824 (1433.5875).

### 6.4.2.2. DOTA-GA-TATE (87)



**87** wurde gemäß 6.4.2 auf Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (125 mg, 37.5  $\mu$ mol, 1.0 Äq., Belegung: 0.3 mmol/g) unter Verwendung von DOTA-GA(*t*Bu)<sub>4</sub> synthetisiert. Nach der



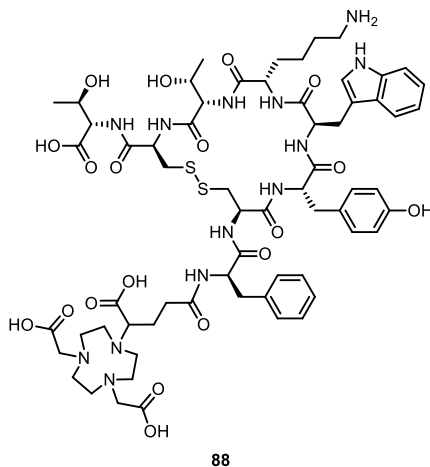
Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (10 – 20 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 6.62$  min) wurde **87** (20.4 mg, 13.5  $\mu$ mol, 36 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 2.41$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 10 min)  
Reinheit: 100 %

**MALDI (m/z):**  $[M+H]^+$  (ber.): 1507.16 (1507.62),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1529.22 (1529.61).

**HR-ESI-MS (m/z):**  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 754.3160 (754.3153),  $[M+H]^+$  (ber.): 1507.6283 (1507.6233),  $[M-H]^-$  (ber.): 1505.6040 (1505.6086).

#### 6.4.2.3. NODA-GA-TATE (**88**)



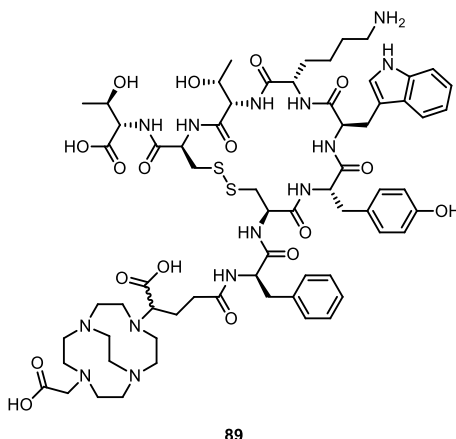
**88** wurde gemäß 6.4.2 auf Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (125 mg, 37.5  $\mu$ mol, 1.0 Äq., Belegung: 0.3 mmol/g) unter Verwendung von *R*-NODA-GA(*t*Bu)<sub>3</sub> synthetisiert. Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (12 – 20 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5.04$  min) wurde **88** (24.4 mg, 17.4  $\mu$ mol, 46 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t = 2.42$  min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 10 min)  
Reinheit: 100 %

**MALDI (m/z):**  $[M+H]^+$  (ber.): 1406.46 (1406.57),  $[M+Na]^+$  (ber.): 1428.23 (1428.56).

**HR-ESI-MS (m/z):**  $[M+2H]^{2+}$  (ber.): 703.7914 (703.7919),  $[M+H]^+$  (ber.): 1406.5796 (1406.5747),  $[M-H]^-$  (ber.): 1404.5601 (1404.5609).

#### 6.4.2.4. CB-DO2A-GA-TATE (89)



**89** wurde gemäß 6.4.2 auf Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (50 mg, 15.0  $\mu$ mol, 1.0 Äq., Belegung: 0.3 mmol/g) synthetisiert. Anders als in 6.4.2 beschrieben wurde die Kupplung des Chelators CB-DO2A-GA(*t*Bu)<sub>2</sub> (1.6 Äq.) unter Verwendung von PyBOP (2.45 Äq.) und DIPEA (5 Äq.) durchgeführt. Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (0 – 50 % MeCN + 0.1 % TFA in 10 min,  $R_t$  = 6.24 min) wurde **89** (3.7 mg, 2.6  $\mu$ mol, 18 %) als farbloser Feststoff erhalten.

**HPLC:**  $R_t$  = 2.25 min (0 – 100 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min)  
Reinheit: 100 %

**MALDI (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 1417.47 (1417.63), [M+Na]<sup>+</sup> (ber.): 1439.57 (1439.6099).

**HR-ESI-MS (m/z):** [M+2H]<sup>2+</sup> (ber.): 709.3183 (709.3176), [M+H]<sup>+</sup> (ber.): 1417.6327 (1417.6280).

#### 6.4.3. Radiomarkierung der Chelator-TATE-Konjugate

Der <sup>68</sup>Ga-Generator wurde mit einer 0.1 M HCl eluiert (1.8 mL Vorlauf, 1.8 mL Elution). Der pH-Wert des Eluats [<sup>68</sup>Ga]GaCl<sub>3</sub> (30 – 40 MBq, 100 – 150  $\mu$ L) wurde unter Zugabe eines Natriumacetat-Puffers (1.25 M, pH = 4.4, 50 – 60  $\mu$ L) auf pH 3.9 – 4.1 eingestellt. Im Anschluss folgte die Zugabe des jeweiligen Chelator-TATE-Derivats **86** – **89** (0.4 – 40 nmol). Um die optimierte molare Aktivität zu bestimmen, wurde die Substanzmenge stufenweise erniedrigt bis nach einer Reaktionsdauer von 10 min bei 95 °C oder 45 °C freies <sup>68</sup>Ga in der Radio-HPLC-Analytik auftrat. [<sup>68</sup>Ga]Ga-**86** bzw. [<sup>68</sup>Ga]Ga-**87** konnten bei 95 °C in 10 min mit einer optimierten molaren Aktivität von 30 – 35 MBq/nmol ([<sup>68</sup>Ga]Ga-**86**) bzw. 40 –

45 MBq/nmol ( $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-87}$ ) in einer radiochemischen Reinheit von  $\geq 99\%$  erhalten werden. Die optimierte molare Aktivität für  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-88}$  betrug 50 – 55 MBq/nmol. Die radiochemische Reinheit betrug  $\geq 99\%$  bei einer Reaktionstemperatur von 45 °C für 10 min. Die optimierte molare Aktivität von  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  betrug 1 MBq/nmol. Bei einer Reaktionstemperatur von 95 °C wurde nach 10 min nur eine  $^{68}\text{Ga}$ -Inkorporation von 93 % beobachtet. Nach 20 min wurde eine radiochemische Reinheit von  $\geq 95\%$  erhalten.

Für die nachfolgenden Versuche wurden alle Konjugate mit einer molaren Aktivität von 1 MBq/nmol markiert.

#### 6.4.4. Bestimmung der Lipophilie $\log_{D(7.4)}$

Die Bestimmung der Lipophilie erfolgte analog zu der Bestimmung der Lipophilie der  $^{89}\text{Zr}$ -Chelator-c(RGDfK)-Konjugate in Kapitel 6.3.4. Das jeweilige  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Chelator-TATE-Konjugat  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  (5  $\mu\text{L}$ , 0.7 – 1 MBq) wurde zu einem Gemisch aus 1-Octanol (800  $\mu\text{L}$ ) und Phosphatpuffer (795  $\mu\text{L}$ , pH 7.4, 0.05 M) gegeben. Das Gemisch wurde 2 min geschüttelt. Anschließend wurden die Phasen mittels Zentrifugation (2 min, 12100 xg) getrennt. Ein Aliquot (200  $\mu\text{L}$ ) der organischen und der wässrigen Phase wurden jeweils in ein Gammazähler-Röhrchen überführt. Die Aktivität wurde mittels Gammazähler bestimmt. Das Experiment wurde für jede Verbindung mit  $n = 3$  durchgeführt und die Lipophilie anhand Formel 1 (Kapitel 3.2.3) berechnet.

#### 6.4.5. Bestimmung der Serumstabilität

Zur Bestimmung der Serumstabilität wurde das jeweilige  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Chelator-TATE-Konjugat  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-86}$  –  $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-89}$  (125  $\mu\text{L}$ , 20 – 25 MBq) zu humanem Serum (500  $\mu\text{L}$ ) zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 1, 15, 30, 45, 60 und 90 min wurde ein Aliquot (75  $\mu\text{L}$ ) entnommen und in eiskaltes Ethanol (75  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Die Suspension wurde 90 s bei 12100 xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen. Die Aktivität des Überstandes und der ausgefallenen Serumproteine wurden im Aktivimeter bestimmt. Der Überstand wurde in ein HPLC-Fläschchen überführt und die Reinheit mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt. Für jede Verbindung wurde das Experiment mit  $n = 3$  durchgeführt.

#### 6.4.6. DTPA-Challenge-Versuche

Zu DTPA (7.4 mg, 18.75  $\mu\text{mol}$ , 1000 eq.) in Natriumacetat-Puffer (0.5 M, pH = 4.2, 500  $\mu\text{L}$ ) wurde das jeweilige [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-Chelator-TATE-Konjugat [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-**86** – [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-**89** (125 – 150  $\mu\text{L}$ , 18.75 nmol) zugegeben. Durch die Zugabe von Natriumacetat-Puffer (1.25 M, pH = 3.9) wurde das Endvolumen auf 650  $\mu\text{L}$  eingestellt. Der pH-Wert der resultierenden Lösung betrug 4. Nach 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 und 120 min wurde die  $^{68}\text{Ga}$ -Transchelatierung mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt. Das Experiment wurde für jede Verbindung mit n = 3 durchgeführt.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung der Funktionsweise der Positronen-Emissions-Tomographie. ....	2
Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Radiopharmakons. ....	3
Abbildung 3. Schematische Darstellung eines IgG <sub>1</sub> -Antikörpers. ....	6
Abbildung 4. Vereinfachtes Zerfallsschema von <sup>89</sup> Zr. Erstellt in Anlehnung an DERI <i>et al.</i> <sup>[27]</sup>	8
Abbildung 5. Nicht-selektive Biokonjugationsmethoden der Chelatoren R mit den Aminogruppen von Lysinen unter Verwendung eines (A) TFP-, (B) NCS- bzw. (C) NHS-Chelator-Derivates. Die Biomoleküle sind als graue Sphäre dargestellt. ....	10
Abbildung 6. Selektive Biokonjugationsmethoden von Chelatoren R mit generierten Thiolgruppen unter Verwendung eines (A) Bac- oder Iac-bzw. (B) Maleimid-Chelator-Derivates. Die Biomoleküle sind als graue Sphäre dargestellt. ....	11
Abbildung 7. Bioorthogonale Konjugation von modifizierten Biomolekülen mit bifunktionellen Chelatoren über die (A) CuAAC, (B) SPAAC bzw. (C) iEDDA-Reaktion. Die Biomoleküle werden als graue Sphäre und die bifunktionellen Chelatoren als R dargestellt. ....	12
Abbildung 8. Struktur der Chelatbildner EDTA ( <b>2</b> ) und DTPA ( <b>3</b> ). ....	13
Abbildung 9. Komplexstruktur von [ <sup>89</sup> Zr]Zr-DFO ([ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>4</b> ) und DFT-optimierte Struktur des achtfach-koordinierten Komplexes [[ <sup>89</sup> Zr]Zr-DFO- <i>cis</i> -(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> . Erstellt mit <i>Gaussian</i> <sup>®</sup> 09W <sup>[57]</sup> und <i>Gauss View 5.0</i> <sup>[58]</sup> mit den xyz-Koordinaten, die von HOLLAND <i>et al.</i> publiziert wurden. <sup>[55]</sup> ....	14
Abbildung 10. <sup>89</sup> Zr-Chelatoren DFO* ( <b>5</b> ) und oxoDFO* ( <b>6</b> ). ....	15
Abbildung 11. <sup>89</sup> Zr-Chelator DFOcyclo* ( <b>7</b> ). ....	15
Abbildung 12. <sup>89</sup> Zr-Chelatoren DFO-HOPO ( <b>8</b> ) und DFO2 ( <b>9</b> ). ....	16
Abbildung 13. Makrocyclische <sup>89</sup> Zr-Chelatoren FCS ( <b>10</b> ) und TAFC ( <b>11</b> ). ....	17
Abbildung 14. Makrocyclischer <sup>89</sup> Zr-Chelator CTH36 ( <b>12</b> ). ....	17
Abbildung 15. Polyazamakrozyliche <sup>89</sup> Zr-Chelatoren DOTA ( <b>1</b> ), NOTA ( <b>15</b> ) und PCTA ( <b>16</b> ). ....	18
Abbildung 16. <sup>89</sup> Zr-Chelator 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) ( <b>17</b> ). ....	18
Abbildung 17. <sup>89</sup> Zr-Chelator THPN ( <b>18</b> ). ....	19
Abbildung 18. <sup>89</sup> Zr-Chelatoren TAM-1 ( <b>19</b> ) und BPDET-LysH22-2,3-HOPO ( <b>20</b> ). ....	19
Abbildung 19. Acyclische <sup>68</sup> Ga-Chelatoren EDTA ( <b>2</b> ) und HBED ( <b>21</b> ). ....	20
Abbildung 20. Cyclische <sup>68</sup> Ga-Chelatoren DOTA ( <b>1</b> ), DOTA-GA ( <b>22</b> ), NOTA ( <b>15</b> ) und NODA-GA ( <b>23</b> ). ....	21

Abbildung 21. Darstellung der zu vergleichenden $^{89}\text{Zr}$ -Komplexe. Die Referenz $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO sowie die vielversprechenden Chelator-Komplexe $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO*, $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-CTH36, $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-NODA-GA, $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DOTA-GA und $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-3,4,3-(LI-1,2-HOPO). .....	24
Abbildung 22. Darstellung der etablierten $^{68}\text{Ga}$ -Komplexe $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA, $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-NODA-GA, $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-DOTA-GA und der Zielstruktur CB-DO2A-GA sowie des resultierenden $^{68}\text{Ga}$ -Komplexes. ....	26
Abbildung 23. Darstellung der Chelator-Tetrazin-Derivate DFO- ( <b>24</b> ), DFO*- ( <b>27</b> ), CTH36- ( <b>25</b> ), DOTA-GA- ( <b>26</b> ), NODA-GA- ( <b>29</b> ) und 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)-Tetrazin ( <b>28</b> ).....	27
Abbildung 24. Reaktionskontrolle der Synthese von <b>54</b> unter Verwendung von (A) Benzylacrylat ( <b>52</b> ) oder (B) Benzyl-3-bromopropanoat ( <b>53</b> ) mittels analytischer HPLC. ....	32
Abbildung 25. Darstellung des Mechanismus der iEDDA-Reaktion.....	38
Abbildung 26. Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme der Radiomarkierung und des anschließenden Homogenisierungsprozesses des Markierungsproduktes durch Oxidation, exemplarisch für $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>72</b> .....	40
Abbildung 27. Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme der Radiomarkierungsprodukte $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>71</b> – $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>74</b> . ....	41
Abbildung 28. Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>71</b> – $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>74</b> während der Challenge-Experimente mit 10 000 Äq. EDTA zu den Zeitpunkten 0, 1, 7.8, 14.6, 21.4, 28.2, 35, 41.8 und 48.6 h. ....	44
Abbildung 29. Zusammenfassung der Ergebnisse der EDTA-Challenge-Experimente. Auftragung des Anteils an intaktem $^{89}\text{Zr}$ -Komplex in % gegen die Zeit in h. Die radiochemische Reinheit der Konjugate zu Beginn der EDTA-Challenge wurde auf 100 % normalisiert.....	44
Abbildung 30. Bestimmung der Anzahl an Derivatisierungsstellen pro Antikörper mittels Rücktitration. (A) UV/VIS-Spektrum von H-Tz-Bn-NH <sub>3</sub> Cl ( <b>36</b> ); (B) Standardkalibriergerade des H-Tz-Bn-NH <sub>3</sub> Cl ( <b>36</b> ); (C) Kalibriergerade des Bradford-Assays mit Cetuximab. ....	48
Abbildung 31. SEC-HPLC-Chromatogramme von Cetuximab und den Chelator-Cetuximab-Biokonjugaten <b>78</b> – <b>80</b> . ....	50
Abbildung 32. HPLC-Chromatogramme der Radiomarkierung der Biokonjugate $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>78</b> – $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>80</b> nach der Aufreinigung. Die Radio-Chromatogramme sind in A – C und die zugehörigen UV-Chromatogramme in D – F dargestellt. ....	51
Abbildung 33. HPLC-Chromatogramme des freien $^{89}\text{Zr}$ ]Zr <sup>4+</sup> und der Radiomarkierungslösungen des Biokonjugates $^{89}\text{Zr}$ ]Zr- <b>80</b> mit einer spezifischen Aktivität	

von 50 MBq/mg (B bzw. E) und 25 MBq/mg (C bzw. F). Die Radio-Chromatogramme sind in A – C und die UV-Chromatogramme in D – F dargestellt. ....	52
Abbildung 34. Exemplarische Darstellung der Lindmo-Plots zur Bestimmung der immunoreaktiven Fraktion von [ <sup>89</sup> Zr]Zr-78 – [ <sup>89</sup> Zr]Zr-80. A: Bindungskurven; B: doppelt reziproke Auftragung bzw. Lindmo-Plots.....	53
Abbildung 35. Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) der PET/CT-Messungen direkt nach der Injektion der <sup>89</sup> Zr-markierten Chelator-Cetuximab-Biokonjugate [ <sup>89</sup> Zr]Zr-78 (A); [ <sup>89</sup> Zr]Zr-79 (B) und [ <sup>89</sup> Zr]Zr-80 (C).....	55
Abbildung 36. Graphische Darstellung der <i>ex vivo</i> -Biodistribution als %ID/g bei 73 h (hellblau) und 145 h (dunkelblau) nach der Injektion von [ <sup>89</sup> Zr]Zr-78. Pro Gruppe wurden zwei (73 h) bzw. fünf Tiere (145 h) untersucht.....	56
Abbildung 37. Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) der PET/CT-Messungen 72 h und 144 h nach der Injektion der <sup>89</sup> Zr-markierten Chelator-Cetuximab-Biokonjugate [ <sup>89</sup> Zr]Zr-78 (D + G), [ <sup>89</sup> Zr]Zr-79 (E + H) und [ <sup>89</sup> Zr]Zr-80 (F + I). Die Tumore sind mit roten Kreisen gekennzeichnet. ....	57
Abbildung 38. Graphische Darstellung der <i>ex vivo</i> -Biodistribution 145 h nach der Injektion von [ <sup>89</sup> Zr]Zr-78 (dunkelblau), [ <sup>89</sup> Zr]Zr-79 (grün) und [ <sup>89</sup> Zr]Zr-80 (hellblau). ....	58
Abbildung 39. Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme von [ <sup>68</sup> Ga]Ga-86 – [ <sup>68</sup> Ga]Ga-89 nach der Herstellung unter optimierten Reaktionsbedingungen. ....	65
Abbildung 40. Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme nach der Inkubation der radiomarkierten Konjugate [ <sup>68</sup> Ga]Ga-86 – [ <sup>68</sup> Ga]Ga-89 in humanem Serum nach verschiedenen Inkubationszeit-punkten. ....	68
Abbildung 41. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Serumstabilitätsuntersuchungen von [ <sup>68</sup> Ga]Ga-86 – [ <sup>68</sup> Ga]Ga-89 über 90 min. Die Radiochemische Reinheit wurde zum Zeitpunkt 0 min auf 100 % normalisiert. ....	68
Abbildung 42. Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme nach der Inkubation der radiomarkierten Konjugate [ <sup>68</sup> Ga]Ga-86 – [ <sup>68</sup> Ga]Ga-89 mit 1 000 Äq. DTPA nach verschiedenen Inkubationszeit-punkten. ....	69
Abbildung 43. Graphische Darstellung der Ergebnisse der DTPA-Challenge-Experimente von [ <sup>68</sup> Ga]Ga-86 – [ <sup>68</sup> Ga]Ga-89 über 120 min. Die Radiochemische Reinheit wurde zum Zeitpunkt 0 min auf 100 % normalisiert. ....	70
Abbildung 44. Vergleich der Tumor-zu-Organverhältnisse für die Organe Muskel, Leber und Knochen, berechnet aus den <i>ex vivo</i> -Biodistributionsstudien in HT-29-tumortragenden Mäusen unter Verwendung von [ <sup>89</sup> Zr]Zr-78, [ <sup>89</sup> Zr]Zr-79 und [ <sup>89</sup> Zr]Zr-80.....	74

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 45. [ <sup>89</sup> Zr]Zr-DFO und [ <sup>89</sup> Zr]Zr-DFO* .....	74
Abbildung 46. Struktur von CB-DO2A-GA und [ <sup>68</sup> Ga]Ga-CB-DO2A-GA.....	75



## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht über die wichtigsten Radionuklide in der PET. <sup>[12]</sup> .....	4
Tabelle 2. Therapeutische mAbs in der Entwicklung von Radioimmunokongjugaten. <sup>[23]</sup> .....	7
Tabelle 3. Anteil an Pyridazin und DHP in % nach der HPLC-Aufreinigung der Rohprodukte <b>71 – 76</b> .....	38
Tabelle 4. Ermittelte $\log_{D(7.4)}$ -Werte der Substanzen [ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>71</b> – [ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>74</b> mit n = 6 – 12 unter Angabe des Mittelwerts ± Standardabweichung.....	43
Tabelle 5. Zusammenfassung der TCO-Modifizierung von Cetuximab unter Verwendung von unterschiedlichen Mengen des TCO-Aktivesters TCO-NHS bzw. TCO-NPC.....	49
Tabelle 6. Ermittelte Immunoreaktivität der radiomarkierten Biokonjugate [ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>78</b> – [ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>80</b> mit n = 3 unter Angabe des Mittelwerts ± Standardabweichung.....	53
Tabelle 7. Ergebnisse der <i>ex vivo</i> -Biodistributionsstudien ermittelt 145 h nach der Injektion von [ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>78</b> – [ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>80</b> in HT-29-tumortragenden Mäusen. Pro Gruppe wurden fünf ([ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>78</b> ) bzw. sieben ([ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>79</b> und [ <sup>89</sup> Zr]Zr- <b>80</b> ) Mäuse verwendet. Die Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung in %ID/g angegeben.....	58
Tabelle 8. Zusammenfassung der optimierten Radiomarkierungsbedingungen zur Herstellung von [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>86</b> – [ <sup>68</sup> Ga]Ga- <b>89</b> .....	65
Tabelle 9. Ermittelte ( $\log_{D(7.4)}$ )-Werte der Substanzen [ <sup>89</sup> Ga]Ga- <b>86</b> – [ <sup>89</sup> Ga]Ga- <b>89</b> mit n = 3 unter Angabe des Mittelwerts ± Standardabweichung.....	67
Tabelle 10. Restsignale der deuterierten Lösungsmittel.....	77



## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Äq.	Äquivalent(e)
APT	<i>Attached proton test</i>
Bac	Bromacetyl
ber.	Berechnet
BFC	bifunktionelle Chelatoren
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
C	konstante Domäne im Antikörper
CB	<i>cross-bridged</i>
Cbz	Benzoyloxycarbonyl
Chx-Mal	Maleimidcyclohexyl
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CT	Computertomographie
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkylen [3+2]-Cycloaddition
D	Tag(e)
DCM	Dichlormethan
DFO	Deferoxamin, Desferrioxamin B
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTA-GA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1-glutarsäure-4,7,10-tetraessigsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung
DSMZ	<i>Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
<i>E</i>	Energie
EA	Ethylacetat
EC	Elektroneneinfang
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

## Abkürzungsverzeichnis

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
F <sub>ab</sub>	Antigen-bindendes Fragment des mAb
F <sub>c</sub>	kristallisierbares Fragment des mAb
FBS	fötale Rinderserum
FCS	Fusarinin C
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
[ <sup>18</sup> F]FDG	[ <sup>18</sup> F]-2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FOV	<i>field of view</i>
Xg	relative Zentrifugalkraft
H	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBED	<i>N,N'</i> -Di(2-hydroxybenzyl)ethylendiamin- <i>N,N'</i> -diessigsäure
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluor-phosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
H(-Kette)	schwere Polypeptidkette des mAb
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond spectroscopy</i>
HOPO	Hydroxypyridinon
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-ESI	<i>High-Resolution-Elektrospray Ionisation</i>
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>
H-Tz-Bn-NH <sub>3</sub> Cl	(4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl)methylammoniumchlorid
H-Tz-Bn-NH <sub>3</sub> (HCOO)	(4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl)methylammoniumformiat
Iac	Iodacetyl
iEDDA	<i>Inverse electron-demand Diels-Alder</i>
kBq	Kilobecquerel
kDa	Kilodalton
L(-Kette)	leichte Polypeptidkette des mAb
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MBq	Megabecquerel
MeCN	Acetonitril
Min	Minute(n)
MRT	Magnetresonanztomographie

MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molekulargewichtsgrenze
NCS	<i>p</i> -Isothiocyanat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NODA-GA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure
Ns	Nanosekunde
LOR	<i>line-of-response</i>
PCTA	3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien-4- <i>S</i> -(4-isothiocyanobenzyl)-3,6,9-triessigsäure
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0)
Ph	Phenyl
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
SATA	<i>S</i> -Acetylthioacetat
s.c.	subkutan
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
SPAAC	ringgespannte Alkin-Azid-Cycloaddition
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
Suc	Succinimid
<i>t</i> <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TAFC	Triacylfusarinin C
TAM	Terephthalamidgruppen
TETA	1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure
TE2A	1,4,8,11-Tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan-4,11-diessigsäure
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBTA	2,2,2-Trichloracetimidensäure- <i>tert</i> -butylester
TCO	<i>trans</i> -Cycloocten
TCO-NPC	( <i>E</i> )-Cyclooct-2-en-1-yl-(4-nitrophenyl)carbonat
TCO-NHS	( <i>E</i> )-Cyclooct-2-en-1-yl-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)carbonat
TFA	Trifluoressigsäure
TFP	2,3,5,6-Tetrafluorphenol
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tris(hydroxypyridinon)
TIS	Triisopropylsilan
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytrispyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat

## Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
V	variablen Domäne im mAb
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor

## 10. Literaturverzeichnis

- [1] G. Hevesy, *Biochem. J.* **1923**, *17*, 439.
- [2] S. Vallabhajosula, *Molecular Imaging*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**.
- [3] a) D. W. Townsend, J. P. J. Carney, J. T. Yap, N. C. Hall, *J. Nucl. Med.* **2004**, *45 Suppl 1*, 4S-14S; b) W. Mohnike, *PET/CT-Atlas. Ein interdisziplinärer Leitfaden der onkologischen PET/CT-Diagnostik (German Edition)*, Springer, Dordrecht, **2007**.
- [4] *SpringerLink Bücher*, Springer New York, New York, NY, **2006**.
- [5] M. L. James, S. S. Gambhir, *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897.
- [6] W. Wadsak, M. Mitterhauser, *Eur. J. Radiol.* **2010**, *73*, 461.
- [7] H. Herzog, F. Rösch, *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34*, 468.
- [8] P. S. Conti, D. L. Lilien, K. Hawley, J. Keppler, S. T. Grafton, J. R. Bading, *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 717.
- [9] I. Velikyan, *Theranostics* **2013**, *4*, 47.
- [10] R. A. Werner, C. Bluemel, M. S. Allen-Auerbach, T. Higuchi, K. Herrmann, *Ann. Nucl. Med.* **2015**, *29*, 1.
- [11] M. Fani, R. Mansi, G. P. Nicolas, D. Wild, *Cancers* **2022**, *14*.
- [12] B. M. Zeglis, J. S. Lewis, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6168.
- [13] N. B. Bhatt, D. N. Pandya, T. J. Wadas, *Molecules* **2018**, *23*.
- [14] I. Verel, G. W. M. Visser, G. A. van Dongen, *J. Nucl. Med.* **2005**, *46 Suppl 1*, 164S-71S.
- [15] M. Morais, M. T. Ma, *Drug Discov. Today Technol.* **2018**, *30*, 91.
- [16] S. Heskamp, R. Raavé, O. Boerman, M. Rijpkema, V. Goncalves, F. Denat, *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2211.
- [17] G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, *256*, 495.
- [18] A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 491.
- [19] D. Schrama, R. A. Reisfeld, J. C. Becker, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 147.
- [20] G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispens, *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 520.

- [21] G. A. M. S. van Dongen, W. Beaino, A. D. Windhorst, G. J. C. Zwezerijnen, D. E. Oprea-Lager, N. H. Hendrikse, C. van Kuijk, R. Boellaard, M. C. Huisman, D. J. Vugts, *J. Nucl. Med.* **2021**, *62*, 438.
- [22] W. Wei, Z. T. Rosenkrans, J. Liu, G. Huang, Q.-Y. Luo, W. Cai, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 3787.
- [23] F. C. J. van de Watering, M. Rijpkema, L. Perk, U. Brinkmann, W. J. G. Oyen, O. C. Boerman, *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 203601.
- [24] S. J. Goldsmith, *Semin. Nucl. Med.* **2010**, *40*, 122.
- [25] J. Dewulf, K. Adhikari, C. Vangestel, T. van den Wyngaert, F. Elvas, *Cancers* **2020**, *12*.
- [26] M. Chomet, G. A. M. S. van Dongen, D. J. Vugts, *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 1315.
- [27] M. A. Deri, B. M. Zeglis, L. C. Francesconi, J. S. Lewis, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 3.
- [28] M. Lubberink, H. Herzog, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2011**, *38 Suppl 1*, S10-8.
- [29] M. T. Hays, D. H. Solomon, *J. Clin. Investig.* **1965**, *44*, 117.
- [30] I. Verel, G. W. M. Visser, O. C. Boerman, J. E. M. van Eerd, R. Finn, R. Boellaard, M. J. W. D. Vosjan, M. Stigter-van Walsum, G. B. Snow, G. A. M. S. van Dongen, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2003**, *18*, 655.
- [31] J. Zweit, S. Downey, H. L. Sharma, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1991**, *42*, 199.
- [32] J. P. Holland, Y. Sheh, J. S. Lewis, *Nucl. Med. Biol.* **2009**, *36*, 729.
- [33] S. L. Queern, T. A. Aweda, A. V. F. Massicano, N. A. Clanton, R. El Sayed, J. A. Sader, A. Zyuzin, S. E. Lapi, *Nucl. Med. Biol.* **2017**, *50*, 11.
- [34] W. E. Meijs, J. D.M. Herscheid, H. J. Haisma, R. Wijbrandts, F. van Langevelde, P. J. van Leuffen, R. Mooy, H. M. Pinedo, *Appl. Radiat.* **1994**, *45*, 1143.
- [35] H.-C. Mahler, W. Friess, U. Grauschopf, S. Kiese, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2909.
- [36] C. A. Boswell, X. Sun, W. Niu, G. R. Weisman, E. H. Wong, A. L. Rheingold, C. J. Anderson, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1465.
- [37] T. Lindmo, E. Boven, F. Cuttitta, J. Fedorko, P. A. Bunn, *J. Immunol. Methods* **1984**, *72*, 77.
- [38] W. E. Meijs, H. J. Haisma, R. van der Schors, R. Wijbrandts, K. van den Oever, R. P. Klok, H. M. Pinedo, J. D. M. Herscheid, *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 439.



- [39] W. E. Meijs, H. J. Haisma, R. P. Klok, F. B. van Gog, E. Kievit, H. M. Pinedo, J. D. Herscheid, *J. Nucl. Med.* **1997**, *38*, 112.
- [40] M. R. Lewis, J. E. Shively, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 72.
- [41] I. Verel, G. W. M. Visser, R. Boellaard, M. Stigter-van Walsum, G. B. Snow, G. A. M. S. van Dongen, *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 1271.
- [42] L. R. Perk, M. J. W. D. Vosjan, G. W. M. Visser, M. Budde, P. Jurek, G. E. Kiefer, G. A. M. S. van Dongen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 250.
- [43] J. N. Tinianow, H. S. Gill, A. Ogasawara, J. E. Flores, A. N. Vanderbilt, E. Luis, R. Vandlen, M. Darwish, J. R. Junutula, S.-P. Williams et al., *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 289.
- [44] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057; c) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.
- [45] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518.
- [46] R. García-Vázquez, U. Battisti, M. Herth, *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 685.
- [47] M. Handula, K.-T. Chen, Y. Seimbille, *Molecules* **2021**, *26*.
- [48] B. M. Zeglis, P. Mohindra, G. I. Weissmann, V. Divilov, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, J. S. Lewis, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2048.
- [49] E. W. Price, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 260.
- [50] D. S. Abou, T. Ku, P. M. Smith-Jones, *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 675.
- [51] a) A. I. Pozhidaev, M. A. Porai-Koshits, T. N. Polynova, *J. Struct. Chem.* **1975**, *15*, 548; b) A. B. Ilyukhin, R. L. Davidovich, I. N. Samsonova, L. V. Teplukhina, *Crystallogr. Rep.* **2000**, *45*, 39.
- [52] L. R. Perk, O. J. Visser, M. Stigter-van Walsum, M. J. W. D. Vosjan, G. W. M. Visser, J. M. Zijlstra, P. C. Huijgens, G. A. M. S. van Dongen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2006**, *33*, 1337.
- [53] I. V. J. Feiner, M. Brandt, J. Cowell, T. Demuth, D. Vugts, G. Gasser, T. L. Mindt, *Cancers* **2021**, *13*.

- [54] W. E. Meijs, J. D.M. Herscheid, H. J. Haisma, H. M. Pinedo, *Int. J. Rad. Appl. Instr. A* **1992**, *43*, 1443.
- [55] J. P. Holland, V. Divilov, N. H. Bander, P. M. Smith-Jones, S. M. Larson, J. S. Lewis, *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 1293.
- [56] a) L. R. Perk, G. W. M. Visser, M. J. W. D. Vosjan, M. Stigter-van Walsum, B. M. Tijink, C. R. Leemans, G. A. M. S. van Dongen, *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 1898; b) P. Laverman, T. van der Geest, S. Y. A. Terry, D. Gerrits, B. Walgreen, M. M. Helsen, T. K. Nayak, A. Freimoser-Grundschober, I. Waldhauer, R. J. Hosse et al., *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 778.
- [57] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel et al., *Gaussian 09W*, Gaussian, Inc., Wallingford, **2009**.
- [58] R. D. Dennington, T. A. Keith, J. M. Millam, *Gauss View 5.0*, Gaussian, Inc., Wallingford.
- [59] M. Patra, A. Bauman, C. Mari, C. A. Fischer, O. Blacque, D. Häussinger, G. Gasser, T. L. Mindt, *Chem. Commun. (Camb.)* **2014**, *50*, 11523.
- [60] D. J. Vugts, C. Klaver, C. Sewing, A. J. Poot, K. Adamzek, S. Huegli, C. Mari, G. W. M. Visser, I. E. Valverde, G. Gasser et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2017**, *44*, 286.
- [61] M. Chomet, M. Schreurs, M. J. Bolijn, M. Verlaan, W. Beaino, K. Brown, A. J. Poot, A. D. Windhorst, H. Gill, J. Marik et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2021**, *48*, 694.
- [62] a) M. Brandt, J. Cowell, M. L. Aulsebrook, G. Gasser, T. L. Mindt, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2020**, *25*, 789; b) M. Briand, M. L. Aulsebrook, T. L. Mindt, G. Gasser, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 16387.
- [63] R. Raavé, G. Sandker, P. Adumeau, C. B. Jacobsen, F. Mangin, M. Meyer, M. Moreau, C. Bernhard, L. Da Costa, A. Dubois et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2019**, *46*, 1966.
- [64] D. L. White, P. W. Durbin, N. Jeung, K. N. Raymond, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 11.
- [65] a) L. Allott, C. Da Pieve, J. Meyers, T. Spinks, D. M. Ciobota, G. Kramer-Marek, G. Smith, *Chem. Commun. (Camb.)* **2017**, *53*, 8529; b) E. K. Sarbisheh, A. K. Salih, S. J. Raheem, J. S. Lewis, E. W. Price, *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 11715.

- [66] C. Zhai, D. Summer, C. Rangger, G. M. Franssen, P. Laverman, H. Haas, M. Petrik, R. Haubner, C. Decristoforo, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 2142.
- [67] D. Summer, J. Garousi, M. Oroujeni, B. Mitran, K. G. Andersson, A. Vorobyeva, J. Löfblom, A. Orlova, V. Tolmachev, C. Decristoforo, *Mol. Pharm.* **2017**, *15*, 175.
- [68] U. Seibold, B. Wängler, C. Wängler, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 1555.
- [69] D. N. Pandya, N. Bhatt, H. Yuan, C. S. Day, B. M. Ehrmann, M. Wright, U. Bierbach, T. J. Wadas, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2309.
- [70] D. N. Pandya, K. E. Henry, C. S. Day, S. A. Graves, V. L. Nagle, T. R. Dilling, A. Sinha, B. M. Ehrmann, N. B. Bhatt, Y. Menda et al., *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 17473.
- [71] A. E. V. Gorden, J. Xu, K. N. Raymond, P. Durbin, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4207.
- [72] M. A. Deri, S. Ponnala, B. M. Zeglis, G. Pohl, J. J. Dannenberg, J. S. Lewis, L. C. Francesconi, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4849.
- [73] M. A. Deri, S. Ponnala, P. Kozlowski, B. P. Burton-Pye, H. T. Cicek, C. Hu, J. S. Lewis, L. C. Francesconi, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2579.
- [74] N. V. S. D. K. Bhupathiraju, A. Younes, M. Cao, J. Ali, H. T. Cicek, K. M. Tully, S. Ponnala, J. W. Babich, M. A. Deri, J. S. Lewis et al., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 6866.
- [75] C. Buchwalder, C. Rodríguez-Rodríguez, P. Schaffer, S. K. Karagiozov, K. Saatchi, U. O. Häfeli, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 9654.
- [76] a) D. N. Pandya, S. Pailloux, D. Tatum, D. Magda, T. J. Wadas, *Chem. Commun. (Camb.)* **2015**, *51*, 2301; b) J. N. Tinianow, D. N. Pandya, S. L. Pailloux, A. Ogasawara, A. N. Vanderbilt, H. S. Gill, S.-P. Williams, T. J. Wadas, D. Magda, J. Marik, *Theranostics* **2016**, *6*, 511.
- [77] C. R. Chitambar, *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863*, 2044.
- [78] A. Autio, H. Virtanen, T. Tolvanen, H. Liljenbäck, V. Oikonen, T. Saanijoki, R. Siitonen, M. Käkälä, A. Schüssele, M. Teräs et al., *EJNMMI Res.* **2015**, *5*, 117.
- [79] a) F. Rösch, *Recent Results Cancer Res.* **2013**, *194*, 3; b) R. A. Hawkins, M. E. Phelps, S. C. Huang, J. A. Wapenski, P. D. Grimm, R. G. Parker, G. Juillard, P. Greenberg, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1984**, *4*, 507.
- [80] P. Spang, C. Herrmann, F. Roesch, *Semin. Nucl. Med.* **2016**, *46*, 373.

- [81] M. Eder, B. Wängler, S. Knackmuss, F. LeGall, M. Little, U. Haberkorn, W. Mier, M. Eisenhut, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 1878.
- [82] A. E. Martell, R. J. Motekaitis, E. T. Clarke, R. Delgado, Y. Sun, R. Ma, *Supramol. Chem.* **1996**, *6*, 353.
- [83] J. A. Delage, A. Faivre-Chauvet, J. Barbet, J. K. Fierle, N. Schaefer, G. Coukos, D. Viertl, S. M. Dunn, S. Gnesin, J. O. Prior, *Pharmaceutics* **2021**, *13*.
- [84] C. Wängler, G. Moldenhauer, M. Eisenhut, U. Haberkorn, W. Mier, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 813.
- [85] D. Lumen, D. Vugts, M. Chomet, S. Imlimthan, M. Sarparanta, R. Vos, M. Schreurs, M. Verlaan, P. A. Lang, E. Hippeläinen et al., *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33*, 956.
- [86] S. Litau, U. Seibold, B. Wängler, R. Schirmmacher, C. Wängler, *ASC Omega* **2018**, *3*, 14039.
- [87] S. S. Rinne, C. Dahlsson Leitao, J. Gentry, B. Mitran, A. Abouzayed, V. Tolmachev, S. Ståhl, J. Löfblom, A. Orlova, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 17710.
- [88] D. Satpati, A. Shinto, K. K. Kamaleshwaran, H. D. Sarma, A. Dash, *Mol. Imaging Biol.* **2017**, *19*, 878.
- [89] S. Roosenburg, P. Laverman, L. Joosten, M. S. Cooper, P. K. Kolenc-Peitl, J. M. Foster, C. Hudson, J. Leyton, J. Burnet, W. J. G. Oyen et al., *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 3930.
- [90] E. Renard, M. Moreau, P.-S. Bellaye, M. Guillemin, B. Collin, A. Prignon, F. Denat, V. Goncalves, *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 8564.
- [91] D. Satpati, R. Sharma, H. D. Sarma, A. Dash, *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 781.
- [92] D. Satpati, K. Vats, R. Sharma, H. D. Sarma, A. Dash, *J. Pept. Sci.* **2020**, *26*, e3241.
- [93] Z. Varasteh, B. Mitran, U. Rosenström, I. Velikyan, M. Rosestedt, G. Lindeberg, J. Sörensen, M. Larhed, V. Tolmachev, A. Orlova, *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42*, 446.
- [94] E. von Witting, J. Garousi, S. Lindbo, A. Vorobyeva, M. Altai, M. Oroujeni, B. Mitran, A. Orlova, S. Hober, V. Tolmachev, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *140*, 109.
- [95] W. Niu, E. H. Wong, G. R. Weisman, Y. Peng, C. J. Anderson, L. N. Zakharov, J. A. Golen, A. L. Rheingold, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, *2004*, 3310.
- [96] H. Damerow, R. Hübner, B. Judmann, R. Schirmmacher, B. Wängler, G. Fricker, C. Wängler, *Cancers* **2021**, *13*.

- [97] H. Damerow, X. Cheng, V. von Kiedrowski, R. Schirmmacher, B. Wängler, G. Fricker, C. Wängler, *Pharmaceutics* **2022**, *14*.
- [98] J. D. Herscheid, A. Hoekstra, C. M. Vos, *Eur. J. Nucl. Med.* **1984**, *9*, 508.
- [99] N. Kadi, D. Oves-Costales, F. Barona-Gomez, G. L. Challis, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 652.
- [100] M. S. Gibson, R. W. Bradshaw, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 919.
- [101] T. Zhou, X.-L. Kong, R. C. Hider, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 3459.
- [102] a) S. Liu, *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 472; b) T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Zarka, U. Reuning, J. Notni, H.-J. Wester, C. Mas-Moruno et al., *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39805.
- [103] C. Wängler, S. Maschauer, O. Prante, M. Schäfer, R. Schirmmacher, P. Bartenstein, M. Eisenhut, B. Wängler, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2168.
- [104] A. Del Gatto, M. de Simone, I. de Paola, M. Saviano, L. Zaccaro, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2011**, *17*, 39.
- [105] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895.
- [106] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131.
- [107] J. C. T. Carlson, H. Mikula, R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 3603.
- [108] S. A. Graves, C. Kuttyreff, K. E. Barrett, R. Hernandez, P. A. Ellison, S. Happel, E. Aluicio-Sarduy, T. E. Barnhart, R. J. Nickles, J. W. Engle, *Nucl. Med. Biol.* **2018**, *64-65*, 1.
- [109] L. Gower-Fry, T. Kronemann, A. Dorian, Y. Pu, C. Jaworski, C. Wängler, P. Bartenstein, L. Beyer, S. Lindner, K. Jurkschat et al., *Pharmaceutics* **2021**, *14*.
- [110] a) G. Fornasier, S. Francescon, P. Baldo, *Adv. Ther.* **2018**, *35*, 1497; b) E. Muraro, G. Fanetti, V. Lupato, V. Giacomarra, A. Steffan, C. Gobitti, E. Vaccher, G. Franchin, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2021**, *164*, 103424; c) European Medicines Agency, "Erbix", zu finden unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/erbitux>; d) A. Yamaguchi, A. Achmad, H. Hanaoka, Y. D. Heryanto, A. Bhattarai, Ratianto, E. Khongorzul, R. Shintawati, A. A. P. Kartamihardja, A. Kanai et al., *BMC cancer* **2019**, *19*, 1000.
- [111] S. J. Compton, C. G. Jones, *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369.

- [112] S. Benedetto, R. Pulito, S. G. Crich, G. Tarone, S. Aime, L. Silengo, J. Hamm, *Magn. Reson. Med.* **2006**, *56*, 711.
- [113] C. A. Boswell, E. E. Mundo, C. Zhang, D. Bumbaca, N. R. Valle, K. R. Kozak, A. Fourie, J. Chuh, N. Koppada, O. Saad et al., *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1994.
- [114] a) K.-J. Choi, I. H. Baik, S.-K. Ye, Y.-H. Lee, *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38*, 986; b) M. C. Cummings, P. T. Simpson, L. E. Reid, J. Jayanthan, J. Skerman, S. Song, A. E. McCart Reed, J. R. Kutasovic, A. L. Morey, L. Marquart et al., *J. Pathol.* **2014**, *232*, 23; c) Q.-Y. Feng, Y. Wei, J.-W. Chen, W.-J. Chang, L.-C. Ye, D.-X. Zhu, J.-M. Xu, *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 4263.
- [115] H. Damerow, B. Wängler, R. Schirmacher, G. Fricker, C. Wängler, *ChemMedChem* **2022**.
- [116] K.-P. Eisenwiener, P. Powell, H. R. Mäcke, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2133.
- [117] S. Litau, S. Niedermoser, N. Vogler, M. Roscher, R. Schirmacher, G. Fricker, B. Wängler, C. Wängler, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2350.
- [118] a) J. C. Garrison, T. L. Rold, G. L. Sieckman, S. D. Figueroa, W. A. Volkert, S. S. Jurisson, T. J. Hoffman, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1327; b) J. E. Sprague, Y. Peng, X. Sun, G. R. Weisman, E. H. Wong, S. Achilefu, C. J. Anderson, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 8674; c) T. J. Wadas, C. J. Anderson, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 3062.
- [119] a) M. Glaser, M. Morrison, M. Solbakken, J. Arukwe, H. Karlsen, U. Wiggen, S. Champion, G. M. Kindberg, A. Cuthbertson, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 951; b) E. García Garayoa, C. Schweinsberg, V. Maes, L. Brans, P. Bläuenstein, D. A. Tourwe, R. Schibli, P. A. Schubiger, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2409.
- [120] A. Saleem, P. Price in *Cancer Drug Discovery and Development* (Hrsg.: A. F. Shields, P. Price), Humana Press, Totowa, NJ, **2007**, S. 169–204.
- [121] R. Chakravarty, S. Chakraborty, A. Dash, M.R.A. Pillai, *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 197.
- [122] D. N. Pandya, J. Y. Kim, J. C. Park, H. Lee, P. B. Phapale, W. Kwak, T. H. Choi, G. J. Cheon, Y.-R. Yoon, J. Yoo, *Chem. Commun. (Camb.)* **2010**, *46*, 3517.
- [123] Mestrelab Research S. L., *MestReNova-6.0.2-5475*.
- [124] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176.

- [125] a) Bruker, *flexControl Version 3.3 (Build 108)*; b) Bruker, *flexAnalysis Version 3.3 (Build 80)*.
- [126] Dionex Corporation - Thermo Fisher Scientific, *Chromeleon*.
- [127] LabLogic Systems GmbH, *Laura-4.1.12.89*, Koblenz am Rhein, Deutschland.
- [128] PMOD Technologies Ltd, *PMOD*, Zürich.
- [129] J. P. Parker, M. Devocelle, C. J. Marmion, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2013**, 639, 1628.

