

# **Radiomarkierte Antikörperkonjugate für die Anwendung in der Immuno-PET und Radioimmuntherapie sowie Darstellung zielgerichteter, PET-visualisierbarer Wirkstofftransportsysteme**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“  
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

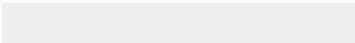
**Benedikt Klasen**

geboren in Adenau

Mainz, August 2021





Dekan: 

Erster Berichterstatter: 

Zweiter Berichterstatter: 

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2021



## Zusammenfassung

Die Positronenemissionstomographie (PET) ist ein sensitives, nicht-invasives bildgebendes Verfahren zur frühzeitigen Diagnose und Visualisierung therapeutischer Verläufe insbesondere bei onkologischen aber auch neurologischen und anderen medizinischen Fragestellungen. Neben der bildgebenden Nutzung radioaktiver Strahlung ermöglicht die Verwendung Partikel-emittierender Nuklide im Rahmen der Radionuklid- oder Endoradiotherapie außerdem, malignes Gewebe gezielt und effektiv zu behandeln. Der Einsatz monoklonaler Antikörper (mAb) für therapeutische Zwecke ist einer der bedeutendsten und schnellst wachsenden Bereiche der modernen Medizin. Neben ihrer eigenen therapeutischen oder präventiven Wirkung bieten diese hochspezifischen Immunproteine zudem die Möglichkeit, diagnostisch oder therapeutisch relevante Radionuklide zu bestimmten, beispielsweise tumorassoziierten Zielstrukturen zu transportieren und sie somit für die sogenannte Immuno-PET Bildgebung oder Radioimmuntherapie (RIT) zu nutzen. Viele konventionelle Krebstherapeutika besitzen typischerweise eine geringe Bioverfügbarkeit, unzureichende Spezifität und hohe systemische Toxizität. Durch deren Einschluss in Wirkstofftransportsysteme wie z. B. Liposome können Zirkulationszeiten und die selektive Anreicherung im Zielgewebe jedoch signifikant erhöht und somit notwendige Mengen reduziert und Nebenwirkungen vermieden werden. Die zusätzliche Markierung dieser Systeme mit einem Positron-emittierenden Radionuklid ermöglicht zudem deren Visualisierung und Evaluierung *in vivo* mittels PET.

Auf Basis dieser Grundlagen wurden im Rahmen dieser Arbeit neuartige Antikörperkonjugate für die Immuno-PET oder Radioimmuntherapie entwickelt, synthetisiert, unter Verwendung der Radionuklide  $^{89}\text{Zr}$  oder  $^{177}\text{Lu}$  radiomarkiert sowie *in vitro* und *in vivo* evaluiert.

Im ersten Teil der Arbeit konnte der DFO-funktionalisierte,  $^{89}\text{Zr}$ -markierte monoklonale Antikörper Muromonab-CD3 erfolgreich dazu verwendet werden, die Migration CD3-positiver T-Zellen bei der Entwicklung einer Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD) innerhalb eines humanisierten Mausmodells mittels Immuno-PET/MRT zu visualisieren. Bereits in frühen Stadien der Erkrankung wurde dabei eine hohe Infiltration humaner T-Zellen bzw. Akkumulation des Radioimmunkonjugats in Milz, Leber und Darm beobachtet. Insbesondere die Leber zeigte eine krankheitsbedingte und zeitlich ansteigende, heterogene Anreicherung der Aktivität in Form „inflammatorischer Hotspots“. Außerdem konnte eine eindeutige Reduktion der T-Zellen in GvHD-relevanten Organen durch den präventiven Einfluss zusätzlich verabreichter regulatorischer T-Zellen dargestellt werden. Insgesamt zeigte sich eine starke Korrelation der erhaltenen PET/MRT-Aufnahmen mit der klinischen Symptomatik sowie den Ergebnissen von *ex vivo*-Analysen.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Entwicklung und *in vitro*-Evaluierung innovativer, bifunktionaler Chelatorderivate auf Basis des hybriden 6-Amino-1,4-diazepan Grundgerüsts in Kombination mit Hydroxamat-tragenden Seitenketten für die stabile Komplexbildung von  $^{89}\text{Zr}$ . Neben der als  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  bezeichneten Grundstruktur konnten zwei weitere, *p*-Isothiocyanatophenyl- bzw. Quadratsäureamid (SA)-funktionalisierte Derivate erfolgreich synthetisiert, an den Antikörper bevacizumab gebunden und radiochemisch untersucht werden. Sowohl in freier, ungebundener Form als auch konjugiert an den Modellantikörper zeigten die neuen Chelatorderivate eine schnelle und effektive  $^{89}\text{Zr}$ -Markierung unter milden Bedingungen (82–94 % RCU) sowie ausgezeichnete *in vitro*-Komplexstabilitäten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und humanem Serum (< 3 % Dissoziation). Analog funktionalisierte, konjugierte und untersuchte Referenzsysteme auf Basis von

DFO und des erweiterten DFO\* lieferten eine leicht schnellere <sup>89</sup>Zr-Markierungskinetik sowie ähnlich hohe *in vitro*-Stabilitäten.

In einem weiteren Teilprojekt wurde ein Quadratsäureamid-Derivat des Hybridchelators AAZTA<sup>5</sup> synthetisiert und hinsichtlich seines Potentials für die <sup>177</sup>Lu-Markierung monoklonaler Antikörper für zukünftige radioimmuntherapeutische Anwendungen evaluiert. Als Vergleich dienten analog funktionalisierte und radiochemisch untersuchte Derivate des zyklischen DOTA sowie der linearen Chelatoren DTPA und CHX-A''-DTPA. Gebunden an den Modellantikörper bevacizumab zeigte AAZTA<sup>5</sup>-SA bei milden Bedingungen ausgezeichnete <sup>177</sup>Lu-Markierungseigenschaften mit einem radiochemischen Umsatz von 85–90 % schon nach 10–15 min sowie einer nahezu quantitativen Komplexbildung nach 30 min. Während für DOTA-SA-mAb nur eine vernachlässigbar geringe <sup>177</sup>Lu-Markierung (< 2 % RCU) beobachtet wurde, zeigte das DTPA-funktionalisierte Analogon sogar eine noch schnellere Komplexbildungskinetik. CHX-A''-DTPA-SA-mAb lieferte eine zwar ebenfalls sehr schnelle aber unvollständige Inkorporation des Radiometalls. Ähnlich wie auch beide DTPA-basierten Systeme zeigte [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb sowohl in PBS als auch in humanem Serum über einen Zeitraum von 15 Tagen eine sehr hohe Komplexstabilität von > 92 % bzw. > 94 % Protein-gebundener Aktivität.

Auf Basis dieser vielversprechenden Ergebnisse diente der bifunktionelle Chelator AAZTA<sup>5</sup>-SA anschließend zur <sup>177</sup>Lu-Markierung des monoklonalen Antikörpers GGSK-1/30, welcher spezifisch an humanes tumorassoziiertes Mucin1 (hu(TA)MUC1) bindet. Zur Evaluierung seines Potentials für die RIT von hu(TA)MUC1-exprimierendem Brustkrebs wurden die Bindungseigenschaften des resultierenden Radioimmunkonjugats *in vitro* und in tumortragenden Mäusen untersucht. [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 zeigte *in vitro* mit einem Anteil von max. 34–38 % gebundener Aktivität eine deutliche Affinität zu hu(TA)MUC1-exprimierenden PyMTxhuMUC1- und T47D-Zellen. Anhand *ex vivo*-Biodistributionsstudien konnte mit > 40 %ID/g und > 80 %ID/g nach 24 h bzw. 7 Tagen eine ausgesprochen hohe und weiter zunehmende Akkumulation des <sup>177</sup>Lu-markierten Antikörpers in PyMTxMUC1-Tumoren beobachtet werden. Die signifikant geringere Anreicherung in Tumorgewebe ohne Antigen-Expression bestätigte die hohe Spezifität des Immunkonjugats. Abgesehen vom Uptake der Leber und der Lymphknoten konnte insgesamt eine sehr geringe unspezifische Anreicherung (< 9 %ID/g) in anderem Nicht-Ziel-Gewebe wie Lunge, Herz, Pankreas, Magen, Nieren, Milz und Knochen beobachtet werden.

Im abschließenden Teilprojekt dieser Arbeit wurden außerdem PSMA-spezifische, PET-visualisierbare „Stealth“-Liposome für den potentiellen zielgerichteten Wirkstofftransport bei der Behandlung von Prostatakrebs hergestellt und charakterisiert. Hierfür erfolgte zunächst die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) zwischen einem Azid-tragenden, Quadratsäure-gekoppelten Derivat des PSMA-spezifischen KuE und einem Alkin-funktionalisierten Polyetherlipid, bestehend aus hyperverzweigtem Polyglycerol (*hbPG*) und zwei hydrophoben Alkylketten. Durch eine zweite CuAAC wurde das Polyetherlipid anschließend mit dem zuvor radiofluorierten Click-Synthion [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub> indirekt mit <sup>18</sup>F markiert. Unter Zusatz des Phospholipids DOPC und Cholesterin als strukturgebende bzw. stabilisierende Komponenten wurden schließlich KuE-SA-tragende, <sup>18</sup>F-markierte und *hbPG*-abgeschirmte Liposome mittels Dünnschicht-Extrusion und wiederholter Extrusion hergestellt. Mit einem per DLS ermittelten Durchmesser von 199 nm liegt die Größe der erhaltenen Partikel im angestrebten Bereich von 100–200 nm und erfüllt somit die Anforderungen für eine lange Zirkulationszeit und effektive Tumoranreicherung.

## Abstract

Positron emission tomography (PET) is a sensitive, non-invasive imaging technique for early diagnosis and visualization of therapeutic progress, particularly in oncological but also neurological and other medical issues. Beyond the diagnostic usage of radioactive radiation, the application of particle-emitting nuclides in the context of radionuclide or endoradiotherapy furthermore enables the specific and effective treatment of malignant tissue. Utilization of monoclonal antibodies (mAb) for therapeutic purposes is one of the most important and fastest growing areas of modern medicine. In addition to their own therapeutic or preventive effects, these highly specific immune proteins also offer the possibility of transporting diagnostically or therapeutically relevant radionuclides to specific, e.g. tumor-associated, target structures and thus being used for so-called immuno-PET imaging or radioimmunotherapy (RIT). Many conventional cancer therapeutics typically have low bioavailability, insufficient specificity and high systemic toxicity. However, by incorporating them in drug delivery systems such as liposomes, circulation times and selective accumulation in target tissues can be significantly increased, thereby reducing necessary doses and avoiding side effects. Furthermore, labeling of these systems with a positron-emitting radionuclide additionally enables their visualization and evaluation *in vivo* using PET.

Based on these principles, novel antibody conjugates for immuno-PET or radioimmunotherapy were developed, synthesized, radiolabeled with  $^{89}\text{Zr}$  or  $^{177}\text{Lu}$  and evaluated *in vitro* as well as *in vivo* within the scope of this work.

In the first part, the DFO-functionalized,  $^{89}\text{Zr}$ -labeled monoclonal antibody muromonab-CD3 was successfully used to visualize the migration of CD3-positive T cells during the development of graft-versus-host-disease (GvHD) in a humanized mouse model via immuno-PET/MRI. Already at early stages of the disease, a high accumulation of the radioimmunoconjugate, i.e. massive infiltration of human T cells in spleen, liver and intestine was observed. In particular, the liver exhibited a disease-related and temporally increasing heterogeneous accumulation of activity manifested as "inflammatory hotspots". Furthermore, a clear reduction of T cells in GvHD-relevant organs due to the preventive influence of additionally administered regulatory T cells could be depicted. Overall, there was a strong correlation of the obtained PET/MRI images with the clinical symptoms as well as the results of *ex vivo* analyses.

The second part of the work focused on the development and *in vitro* evaluation of innovative, bifunctional chelator derivatives based on the hybrid 6-amino-1,4-diazepane backbone in combination with hydroxamate-bearing side chains for stable complexation of  $^{89}\text{Zr}$ . In addition to the basic structure named  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ , two further derivatives, either *p*-isothiocyanatophenyl- or squaramide (SA)-functionalized, were successfully synthesized, coupled to the antibody bevacizumab and investigated radiochemically. Both stand-alone and conjugated to the model antibody, the new chelator derivatives showed fast and high yielding  $^{89}\text{Zr}$ -labeling under mild conditions (82–94% RCC) as well as excellent *in vitro* complex stabilities in phosphate-buffered saline (PBS) and human serum (< 3% dissociation). Analogously functionalized, conjugated and investigated reference systems based on DFO and the extended DFO\* revealed slightly faster  $^{89}\text{Zr}$ -labeling kinetics as well as similarly high *in vitro* stabilities.

In a further subproject, a squaramide derivative of the hybrid chelator AAZTA<sup>5</sup> was synthesized and evaluated regarding its potential for  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of monoclonal antibodies towards future radioimmunotherapeutic applications. Analogously functionalized and radiochemically investigated derivatives of cyclic DOTA as well as of the linear chelators DTPA and CHX-A''-DTPA served as references. Coupled to the model antibody bevacizumab, AAZTA<sup>5</sup>-SA showed excellent  $^{177}\text{Lu}$ -labeling

properties under mild conditions with a radiochemical conversion of 85–90% already after 10–15 min as well as almost quantitative complexation after 30 min. While only negligible  $^{177}\text{Lu}$ -labeling (< 2% RCC) was observed using DOTA-SA-mAb, the DTPA-functionalized analogue showed even faster complexation kinetics. CHX-A''-DTPA-SA-mAb provided a likewise very rapid but incomplete incorporation of the radiometal. Similar to both DTPA-based systems, [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb showed very high complex stability both in PBS and human serum with > 92% and > 94% protein-bound activity, respectively, over a period of 15 days.

Based on these promising results, the bifunctional chelator AAZTA<sup>5</sup>-SA was subsequently used for  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of the monoclonal antibody GGSK-1/30, which specifically binds to human tumor-associated mucin1 (hu(TA)MUC1). To evaluate its potential for RIT of hu(TA)MUC1 expressing breast cancer, the binding properties of the resulting radioimmunoconjugate were investigated *in vitro* and in tumor-bearing mice. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 showed distinct affinity to hu(TA)MUC1 expressing PyMTxhuMUC1 and T47D cells *in vitro* with a maximum of 34–38% bound activity. By means of *ex vivo* biodistribution studies, an extraordinarily high and further increasing accumulation of the  $^{177}\text{Lu}$ -labeled antibody in PyMTxMUC1 tumors was observed with > 40% ID/g and > 80% ID/g after 24 h and 7 days, respectively. The significantly lower accumulation in tumor tissues without antigen expression confirmed the high specificity of the immunoconjugate. Except for liver and lymph node uptake, an overall very low unspecific enrichment (< 9% ID/g) was observed in other non-target tissues such as lung, heart, pancreas, stomach, kidney, spleen, and bones.

Furthermore, in the final subproject of this work, PSMA-specific, PET-traceable "stealth" liposomes for potential targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer were prepared and characterized. For this purpose, the first step included a copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) between an azide-bearing, squaric acid-coupled derivative of PSMA-specific KuE and an alkyne-functionalized polyether lipid consisting of hyperbranched polyglycerol (*hbPG*) and two hydrophobic alkyl chains. Subsequently, a second CuAAC was applied for indirect  $^{18}\text{F}$ -labeling of the polyether lipid using the previously radiofluorinated click-synthon [ $^{18}\text{F}$ ]F-TEG-N<sub>3</sub>. After addition of the phospholipid DOPC and cholesterol as structure-defining and stabilizing components, finally KuE-SA-bearing,  $^{18}\text{F}$ -labeled and *hbPG*-shielded liposomes were prepared via thin-film hydration and repeated extrusion. With a diameter of 199 nm as determined via DLS, the size of the obtained particles is within the intended range of 100–200 nm, thus meeting the requirements for long circulation time and effective tumor accumulation.















# Inhalt

1.	Einleitung .....	1
2.	Grundlagen.....	3
2.1	Positronenemissionstomographie .....	3
2.1.1	Kernphysikalischer und -chemischer Hintergrund.....	3
2.1.2	Messprinzip und -technik.....	6
2.2	PET-relevante Radionuklide .....	9
2.2.1	Zirkonium-89 .....	11
2.2.2	Fluor-18.....	14
2.2.2.1	Radiofluorierungen .....	16
2.3	Radionuklidtherapie.....	20
2.3.1	Lutetium-177.....	23
2.4	Bifunktionelle Chelatoren .....	27
2.4.1	Azyklische Chelatoren .....	31
2.4.2	Makrozyklische Chelatoren.....	35
2.4.3	Hybridchelatoren .....	36
2.4.4	Quadratsäure .....	38
2.5	Antikörper .....	40
2.5.1	Muromonab-CD3 .....	46
2.5.2	Bevacizumab .....	47
2.5.3	GGSK-1/30.....	47
2.6	Wirkstofftransportsysteme.....	48
2.6.1	Liposome .....	50
3.	Motivation und Zielsetzung .....	53
4.	Referenzen .....	59
5.	Manuskripte .....	77
5.1	Teilprojekt A: <i>Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD</i> .....	81
5.2	Teilprojekt B: <i>Development and in vitro evaluation of new bifunctional <sup>89</sup>Zr-chelators based on the 6-amino-1,4-diazepane scaffold for immuno-PET applications</i> .....	109
5.3	Teilprojekt C: <i>AAZTA<sup>5</sup>-squaramide ester competing with DOTA-, DTPA- and CHX-A''-DTPA-analogues: promising tool for <sup>177</sup>Lu-labeling of monoclonal antibodies under mild conditions</i> .....	145
5.3.1	Ergänzende Ergebnisse zu Teilprojekt C .....	180
5.4	Teilprojekt D: <i><sup>177</sup>Lu-labeling, in vitro and in vivo evaluation of a highly potential, AAZTA<sup>5</sup>-squaramide functionalized anti-hu(TA)MUC1 antibody: a promising approach for radioimmunotherapy of breast cancer</i> .....	183

5.5	Teilprojekt E: <i><sup>18</sup>F-labeled, PSMA-specific liposomes: promising and PET-traceable tool for future targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer</i> .....	217
6.	Zusammenfassung und Ausblick .....	263
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	287
8.	Liste der Publikationen.....	293
	Danksagung .....	295
	Eidesstattliche Erklärung.....	297
	Curriculum Vitae .....	299

# 1. Einleitung

Neben Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems ist Krebs weltweit die zweithäufigste Todesursache. In mehreren Ländern haben krebsbedingte Erkrankungen bereits die Führung innerhalb dieser Statistik übernommen, was jedoch teilweise auch auf eine sinkende Mortalität anderer Krankheiten zurückzuführen ist [1]. Im Jahr 2020 gab es schätzungsweise mehr als 19 Millionen Neuerkrankungen und fast 10 Millionen krebsbedingte Todesfälle [1]. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung, wachsenden Bevölkerungszahl und Verbreitung unterschiedlicher Risikofaktoren ist in den kommenden Jahren mit einem weiteren, raschen Anstieg dieser Zahlen zu rechnen. Unter den diagnostizierten Fällen hat der (weibliche) Brustkrebs mit 11,7 % kürzlich Lungenkrebs (11,4 %) als häufigste Krebsart abgelöst. Prostatakarzinome liegen mit 7,3 % insgesamt auf dem dritten Rang [1]. Während Lungenkrebs in den meisten Fällen mit einer sehr schlechten Prognose verbunden ist, besitzen insbesondere Brust- und Prostatakrebs jedoch je nach Stadium eine hohe 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 89 % [2].

Die Überlebenswahrscheinlichkeit wird bei den meisten Tumorerkrankungen maßgeblich vom Zeitpunkt der Erstdiagnose beeinflusst. Die frühzeitige Detektion malignen Gewebes stellt daher einen wichtigen Schwerpunkt medizinischer Forschung dar. Insbesondere die nuklearmedizinische, molekulare Bildgebung in Form der Positronenemissionstomographie (PET) oder Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (*single photon emission computed tomography*, SPECT) hat in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Ihre Anwendung ist dabei nicht nur auf onkologische Fragestellungen beschränkt, sondern dient beispielsweise auch zur Visualisierung neurologischer Erkrankungen und Perfusionsprozesse [3,4]. Neben der diagnostischen Nutzung radioaktiver Strahlung bietet die Radionuklid- oder Endoradiotherapie die Möglichkeit, Tumore gezielt und effektiv unter Verwendung von Partikel-emittierenden Nukliden zu behandeln [5–7]. Je nach Anwendungsbereich, Radiopharmakon sowie Zerfallseigenschaften des Radionuklids lassen sich dabei beachtliche therapeutische Erfolge erzielen. Die Radionuklidtherapie stellt daher heute eine vielversprechende Alternative oder Ergänzung zu konventioneller Chemotherapie und externer Bestrahlung bei der Behandlung von Krebserkrankungen dar.

Die Verwendung monoklonaler Antikörper für therapeutische Zwecke beispielsweise in der Onkologie oder bei immunologischen Abstoßungsreaktionen ist einer der bedeutendsten und schnellst wachsenden Bereiche der modernen Medizin [8–10]. Während diese Immunproteine insbesondere aufgrund ihrer eigenen therapeutischen Wirkung großes Interesse erlangt haben, kann ihre spezifische Adressierung bestimmter Zielstrukturen auch zum Transport diagnostisch oder therapeutisch relevanter Radionuklide beispielsweise zu Tumorzellen genutzt werden. Sie stellen daher exzellente Trägermoleküle für die molekulare Bildgebung und Radionuklidtherapie dar [11,12].

Viele konventionelle Therapeutika besitzen nur eine geringe Bioverfügbarkeit sowie aufgrund mangelnder Spezifität und Selektivität eine hohe Toxizität für den gesamten Organismus. Ihre Verwendung ist folglich oftmals mit einer hohen Dosierung und starken Nebenwirkungen verbunden [13,14]. Um diese Nachteile zu umgehen, finden sogenannte Wirkstofftransportsysteme wie Liposome Anwendung. Sie ermöglichen den stabilen Einschluss von Wirkstoffen und können somit deren Zirkulationszeit und selektive Anreicherung im Zielgewebe signifikant erhöhen [13–16].

In den folgenden Kapiteln werden die Grundlagen sowie aktuellen Forschungsstände der beschriebenen Thematiken näher erläutert.





## 2. Grundlagen

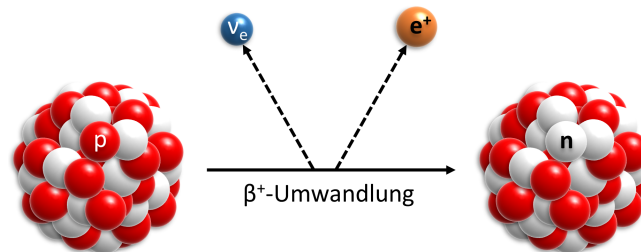
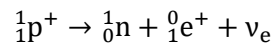
### 2.1 Positronenemissionstomographie

Neben Ultraschall, Röntgen, Magnetresonanz- (MRT) und Computertomographie (CT), stellen die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie sowie die Positronenemissionstomographie weitere nicht-invasive, bildgebende Verfahren in der medizinischen Diagnostik dar. Während bei den erstgenannten die Morphologie des untersuchten Bereichs dargestellt wird, ist mittels SPECT und PET eine funktionale Auskunft über Stoffwechselprozesse und biologische Verteilungen im Körper möglich [3,4]. Beide nuklearmedizinischen Verfahren basieren auf der radioaktiven Umwandlung instabiler Atomkerne. Je nach Fragestellung kommen hierbei verschiedene Radiopharmaka zum Einsatz, welche entweder aus der freien radioaktiven Substanz oder einem entsprechend radiomarkierten Molekül bestehen. Abhängig von der Physiologie des Radiopharmakons sowie der physikalischen Eigenschaften des Radionuklids lassen sich somit im Organismus unterschiedliche Prozesse wie beispielsweise Durchblutung, Sauerstoffaufnahme, Aminosäure- oder Glucosestoffwechsel darstellen [3,4]. Die Verwendung eines geeigneten Trägermoleküls kann zudem die Anreicherung des Radionuklids in einem diagnostisch relevanten Gewebe durch Adressierung von Rezeptoren, Antigenen, Enzymen oder anderen Zielstrukturen ermöglichen. Als solche sogenannte Targetvektoren kommen je nach Anwendungsbereich sowohl kleine niedermolekulare Inhibitoren und Liganden als auch größere Biomoleküle wie Peptide und Proteine zum Einsatz [3,4,17]. Den größten und zunehmend wachsenden Anwendungsbereich von PET und SPECT, bei dem unter anderem solche zielgerichteten Radiopharmaka verwendet werden, stellt die Diagnostik und Visualisierung von Therapieerläufen bei Krebserkrankungen dar. Aufgrund der hohen Sensitivität bei der Messung radioaktiver Strahlung sind bereits geringste Mengen eines Radiopharmakons ausreichend, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Hierbei liegt das von George de Hevesy beschriebene „Tracer-Prinzip“ (Nobelpreis Chemie 1943 [18]) zugrunde, wonach die Menge der injizierten Substanz so gering gewählt wird, dass biochemische und physiologische Prozesse lediglich abgebildet werden, ohne sie pharmakologisch wirksam zu beeinflussen [3,4,17].

#### 2.1.1 Kernphysikalischer und -chemischer Hintergrund

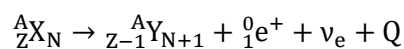
Während bei der SPECT die Detektion einzelner  $\gamma$ -Quanten aus Übergängen angeregter in energetisch niedrigere Kernzustände infolge eines primären Kernprozesses (z.B.  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Umwandlung) erfolgt, beruht das Prinzip der PET auf der Emission von Positronen beim  $\beta^+$ -Zerfall protonenreicher bzw. neutronenarmer Kerne [3]. Nuklide mit dieser Kerneigenschaft befinden sich auf der Karlsruher Nuklidkarte oberhalb der Linie der  $\beta$ -Stabilität [19]. Beim  $\beta^+$ -Zerfall wird der protonenreiche Atomkern durch Umwandlung eines Protons (p) in ein Neutron (n) in einen energetisch günstigeren und damit stabileren Kern überführt (Abbildung 1). Auf Ebene der Elementarteilchen führt die schwache Wechselwirkung dabei innerhalb des Protons zur Umwandlung eines *up*-Quarks in ein *down*-Quark [20]. Abzüglich einer geringen Rückstoßenergie des Tochterkerns verteilt sich die freiwerdende Gesamtenergie (Q) als kinetische Energie größtenteils auf zwei simultan emittierte Leptonen: das Positron ( $\beta^+$  bzw.  $e^+$ ) und das Elektronneutrino ( $\nu_e$ ). Da es sich hierbei um eine unregelmäßige Verteilung auf die zwei den Kern verlassenden Teilchen handelt, ist die Energieverteilung des Positrons (wie auch die des Elektronneutrinos) kontinuierlich, d. h. sie reicht von null bis zu einem für den

Atomkern charakteristischen Maximalwert  $E_{\beta^+, \max}$  [20]. Die Umwandlung des Protons lässt sich folgendermaßen beschreiben:

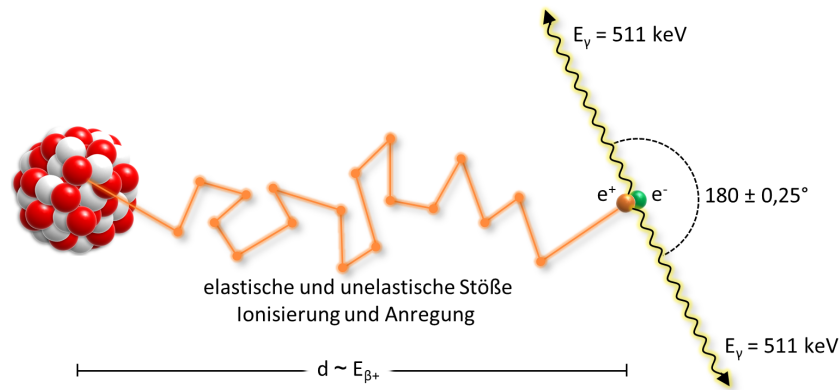


**Abbildung 1:** Allgemeine schematische Darstellung einer  $\beta^+$ -Umwandlung. Ein Proton (rot) wird unter Aussendung eines Positrons (orange) und eines Elektronenneutrinos (blau) in ein Neutron (weiß) überführt. Die Größenverhältnisse der Teilchen sind nicht maßstabsgetreu.

Die Protonenzahl und damit die Ordnungszahl  $Z$  des Mutternuklids  $X$  verringert sich in der Folge um eins, während seine Neutronenzahl  $N$  um eins erhöht wird. Es entsteht das Tochternuklid des benachbarten Elements  $Y$  mit konstanter Massezahl, d. h. unveränderter Gesamtzahl an Nucleonen  $A$ :



In der Folge eines  $\beta^+$ -Zerfalls verliert das emittierte Positron die kinetische Energie auf seinem Weg durch die umliegende Materie stetig durch elastische und unelastische Stöße (Abbildung 2) [20,21]. Die durchschnittliche Reichweite ( $d$ ) hängt dabei von der ursprünglichen kinetischen Energie des Teilchens ab und ist somit (bei gleicher Umgebung) als charakteristische Eigenschaft unmittelbar mit der mittleren  $\beta^+$ -Energie des jeweiligen Radionuklids verknüpft. In menschlichem Gewebe liegt sie typischerweise in der Größenordnung von einem halben bis zu einigen Millimetern [17,22]. Nach nahezu vollständigem Verlust seiner kinetischen Energie kann das freie Positron bei der Begegnung mit einem Elektron der Umgebung unter Aussendung sogenannter Vernichtungsstrahlung annihilieren [20,21]. Im Falle von antiparalleler Spinausrichtung von Positron und Elektron (Singulett) besteht diese Emission entsprechend Energie-, Impuls- und Paritätserhaltung aus zwei  $\gamma$ -Quanten mit einer Energie von jeweils 511 keV (nach  $E = m_e c^2$  mit der Ruhemasse der Teilchen  $m_e$ ), welche entgegengesetzt in exakt  $180^\circ (\pm 0,25^\circ)$  [23]) zueinander ausgesendet werden (Abbildung 2). Bei parallelen Spins (Triplet) werden meist drei  $\gamma$ -Quanten mit deutlich komplexerer Energie- und Winkelverteilung emittiert [21]. Aufgrund der dreifachen Entartung des Triplet-Systems ist seine relative Wahrscheinlichkeit bei der Kombination von Positron und Elektron mit 75 % deutlich höher als die des Singulett-Systems (25 %). Im Allgemeinen spielt die Paarvernichtung im Bereich höherer kinetischer Energie jedoch nur eine kleine Rolle, da sie verglichen mit der Energieübertragung durch Ionisation oder Anregung von Substratmolekülen und -atomen einen deutlich geringeren Wirkungsquerschnitt aufweist. Folglich werden nur weniger als 5 % aller Positronen vernichtet bevor ihre ursprüngliche, maximale kinetische Energie von typischerweise mehreren hundert eV bis zu wenigen MeV auf ca. 5–10 eV reduziert wurde [21].

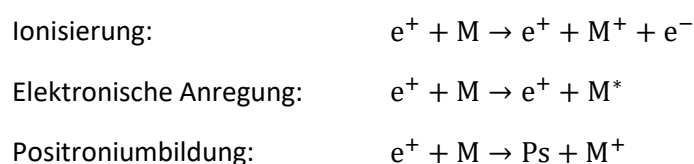


**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Zwei-Quanten-Annihilation eines emittierten Positrons. Nach ausreichendem Energieverlust durch Ionisierung und Anregung von Substratmolekülen kann die Vernichtung bei Kombination mit einem Elektron entweder direkt oder nach Bildung des (*para*-) Positroniums erfolgen.

Hat das freie Positron auf seinem Weg durch das umliegende Substrat einen gewissen Energiebereich erreicht, kann es bei Kombination mit einem Elektron in Konkurrenz zur direkten Vernichtung zunächst zur Bildung eines kurzlebigen Verbindungszustands kommen [20,21]. Dieser, von Deutsch 1951 nachgewiesene, als Positronium (Ps) bezeichnete Zustand ist analog zu einem Wasserstoffatom zu beschreiben, bei dem das Positron anstelle eines Protons das positive Gegenstück zum Elektron darstellt [24]. Anders als das Proton im Wasserstoffatom, ist das Positron aufgrund seiner sehr viel geringeren Masse jedoch nicht ruhend im Zentrum des Systems lokalisiert. Stattdessen umkreisen Teilchen und Antiteilchen im Positronium das Zentrum symmetrisch als binäres System [25]. Die Bildung dieses kurzlebigen Zustands erfolgt nur in einem kleinen Energiebereich von wenigen eV. Dieser ursprünglich für gasförmige Medien definierte und nach seinem Entwickler benannte „Ore-Bereich“ ist nach oben hin durch das erste elektronische Anregungspotential  $E_e$  der Substratmoleküle begrenzt [21]. Liegt die kinetische Restenergie des Positrons oberhalb dieses Grenzwertes, findet bei Wechselwirkung mit dem umliegenden Substrat bevorzugt weitere Energieübertragung durch Anregung statt. Die untere Grenze des Ore-Bereichs ist durch die Differenz aus Ionisierungspotential des Substratmoleküls  $V$  und der Bindungsenergie von Positron und Elektron im Positronium (6,8 eV) definiert. Unterhalb dieses Schwellenwerts reicht die kinetische Energie nicht mehr zur Positroniumbildung aus. Ist die Restenergie jedoch größer als  $V$ , wird hauptsächlich die weitere Abbremsung des Positrons durch Ionisierung von Substratmolekülen als Konkurrenzreaktion bevorzugt [21]. Für den Bereich kinetischer Energie, in dem ein Großteil der Positroniumbildung stattfindet, gilt daher:

$$E_e > E_{\text{kin}} > (V - 6,8 \text{ eV})$$

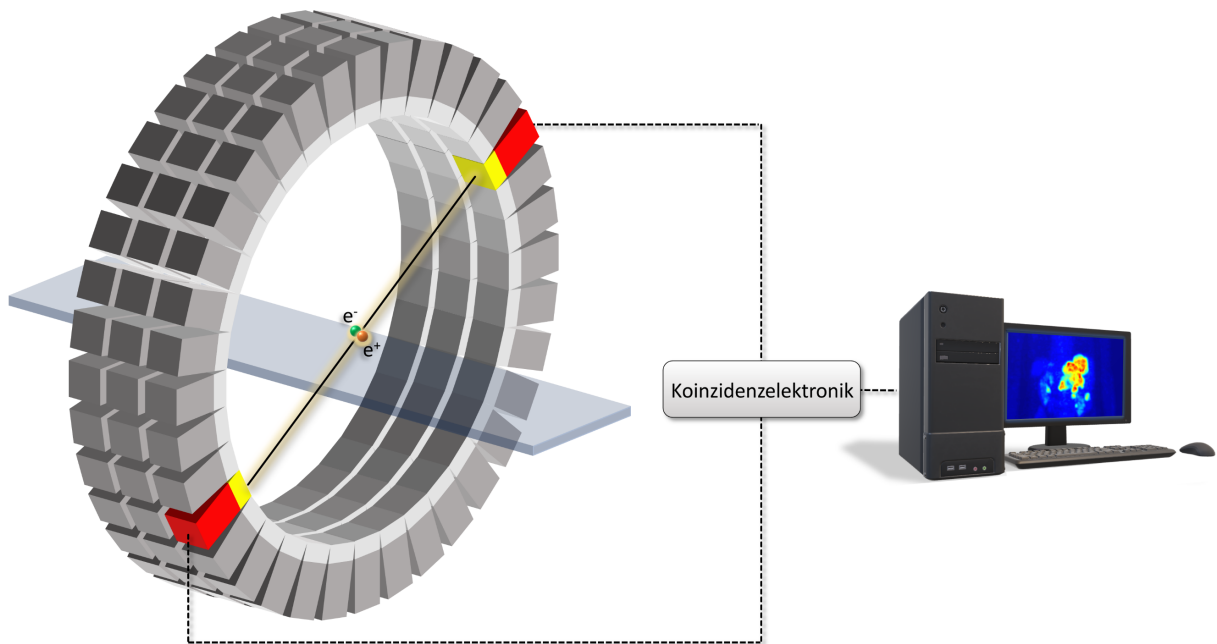
Die beschriebenen Reaktionen bei Wechselwirkung des Positrons mit umliegenden Substratmolekülen (M) lassen sich folgendermaßen formulieren [21]:



Analog zur direkten Annihilation des freien Positrons, können die Spins beider Teilchen im Positronium parallel (Triplett) oder antiparallel (Singulett) ausgerichtet sein. Aufgrund der Anzahl möglicher Quantenzustände treten *ortho*-Ps (Triplett) und *para*-Ps (Singulett) ebenfalls mit einer Wahrscheinlichkeitsverteilung von 3:1 auf [21]. Nach einer Lebensdauer von 0.125 ns zerfällt *para*-Ps analog zur direkten Zwei-Quanten-Vernichtung entsprechend der Erhaltung von Energie, Impuls und Parität unter Emission von zwei 511 keV Photonen in einem Winkel von 180° [21,26]. Freies *ortho*-Ps besitzt hingegen eine um drei Größenordnungen längere Lebensdauer von 142 ns [21,27]. Bei der Vernichtung dessen erfolgt die Aufteilung der Gesamtenergie von 1022 keV ( $2m_e c^2$ ) wiederum indiskret auf meist drei  $\gamma$ -Quanten, welche mit komplexer Winkelverteilung emittiert werden [21]. Wie im Folgenden beschrieben, ist für die PET-Messung lediglich die Zwei-Quanten-Vernichtung von Relevanz, sei es durch direkte Annihilation oder durch Zerfall des *para*-Ps. Durch Wechselwirkung mit paramagnetischen Stoffen wie Sauerstoff können sich die Spinzustände des Positroniums ineinander umwandeln. Aufgrund der deutlich geringeren Lebensdauer des Singulett-Zustands stellt die Umwandlung von *ortho*- in *para*-Ps mit anschließendem schnellem Zerfall dabei die dominierende Variante dar [21,25]. Des Weiteren kann das Positron des *ortho*-Ps durch den Einfluss eines weiteren Elektrons (mit entgegengesetztem Spin) in der sogenannten „*pick-off*“-Vernichtung annihilieren [21,25]. Diese Prozesse bedingen somit eine deutlich geringere mittlere Lebensdauer des Positroniums sowie signifikant höhere Ausbeuten der PET-relevanten Zwei-Quanten-Emission, als Lebensdauern und Auftrittswahrscheinlichkeiten der separaten Quantenzustände erwarten lassen [20,25].

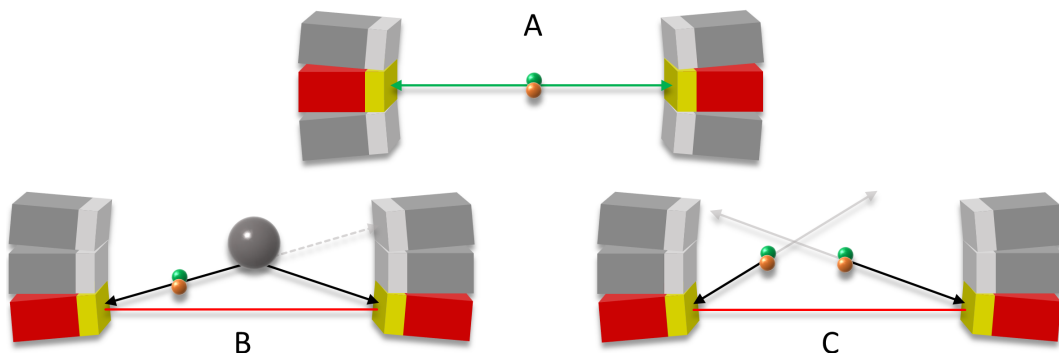
### 2.1.2 Messprinzip und -technik

Bei einer PET-Messung werden die bei der Annihilation des Elektron-Positron-Paares ausgesendeten  $\gamma$ -Quanten von typischerweise ringförmig um den Patienten angeordneten Szintillationskristallen detektiert (Abbildung 3). Die dabei erzeugten Elektronen werden anschließend mittels dahinterliegenden Photomultipliern verstärkt und in ein messbares elektrisches Signal umgewandelt [3,4,17]. Werden von zwei exakt gegenüberliegenden Detektoren zeitgleich (innerhalb 6–12 ns [28,29]) zwei Photonen mit einer Energie von 511 keV detektiert, spricht man von Koinzidenz. Aufgrund der Winkelverteilung von exakt 180° lässt sich das zugehörige Vernichtungsereignis auf der gedachten Linie zwischen diesen beiden Detektoren, der sogenannten „*line of response*“ (LOR) lokalisieren [3,4,17]. Unter Berücksichtigung einer gewissen Unschärfe in Abhängigkeit von der kinetischen Energie des Positrons (vgl. Abbildung 2) entspricht dies auch dem Ursprung der Positronemission. Durch Überlagerung aller gemessenen Verbindungslinien lässt sich die Verteilung des Radiopharmakons im Patienten schließlich anhand der Schnittpunkte digital rekonstruieren. Es können somit je nach Modus hochauflösende Schichtbilder der untersuchten Bereiche und sogar dreidimensionale Ganzkörperdarstellungen erhalten werden [3,4,17].



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Koinzidenzmessung bei der PET anhand ringförmig angeordneter Detektoren mit anschließender Rekonstruktion zur Abbildung der räumlichen Verteilung des Radiopharmakons.

Aufgrund der Beschaffenheit des Detektormaterials und des Verlusts vieler Photonen beispielsweise durch Streuung und Absorption im Patienten kann nur ein gewisser Anteil der tatsächlich stattfindenden Annihilationen detektiert werden. Zudem enthält der erhaltene Datensatz typischerweise eine Vielzahl falsch positiver Koinzidenzen, welche ebenfalls durch entsprechende Korrekturen bei der Rekonstruktion berücksichtigt werden müssen [3,4,17,30]. Beispielsweise können  $\gamma$ -Quanten ihre Richtung durch Streuung ändern und auf Detektoren treffen, welche sich nicht in einem Winkel von  $180^\circ$  zum Emissionsursprung befinden (Abbildung 4B). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Photonen zweier unabhängiger Vernichtungsereignisse zufällig gleichzeitig in gegenüberliegende Detektoren treffen (Abbildung 4C). Die in beiden Fällen erhaltenen Verbindungslinien würden somit falsche Informationen über den Ort der Annihilation und somit über die Lokalisierung des Radiotracers liefern.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung einer wahren (A), gestreuten (B) und zufälligen (C) Koinzidenz inklusive korrekter (grün) und unzutreffender (rot) LOR. Abbildung erstellt in Anlehnung an Lewellen, 2008 [30].

Bei der Wahl des geeigneten Detektors für den PET-Scanner sind verschiedene charakteristische Eigenschaften zu berücksichtigen. Der Szintillatorkristall sollte eine hohe Bremskraft besitzen, d. h. ein eintreffendes 511 keV Photon mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit vollständig absorbieren. Diese Eigenschaft steht in direktem Zusammenhang mit der effektiven Ordnungszahl und Dichte des Materials und hat maßgeblichen Einfluss auf seine Sensitivität [30,31]. Außerdem sollte der Detektor eine hohe räumliche Auflösung gewährleisten. Dieser Parameter wird in erster Linie durch die Größe und Aufteilung der einzelnen Detektoreinheiten bestimmt. Je kleiner das Kristallvolumen, in dem die Wechselwirkung mit dem  $\gamma$ -Quant stattfindet, desto präziser kann der genaue Ort der Annihilation rekonstruiert werden [30,31]. Eine weitere wichtige Eigenschaft stellt die Energieauflösung dar. Bei der Streuung im Körper des Patienten verlieren  $\gamma$ -Quanten einen Teil ihrer ursprünglichen Energie. Durch einen möglichst engen Detektionsbereich um die charakteristische Energie von 511 keV können gestreute Photonen somit von direkt aus einer Annihilation stammenden Quanten unterschieden und ausgeblendet werden [17]. Schräg einfallende Photonen können außerdem durch die Verwendung von abschirmenden Blenden und Trennwänden (Septen) am Eindringen in das Detektormaterial gehindert werden (Kollimation), wodurch jedoch die allgemeine Sensitivität des Systems beeinträchtigt wird [31]. Beide Optionen verringern den Anteil gestreuter Koinzidenzen (vgl. Abbildung 4B) und erhöhen damit die erhaltene Ortsauflösung. Aufgrund ihres Einflusses auf die Energieauflösung ist eine hohe Lichtausbeute des Detektormaterials von essentieller Bedeutung. Sie ist definiert durch die Anzahl erzeugter Szintillationsphotonen pro im Kristall deponierter Energieeinheit und steht somit in direkter Abhängigkeit zur Energie des eintreffenden  $\gamma$ -Quants [30,31]. Ein weiterer bedeutender Parameter ist die zeitliche Auflösung des Detektors. Sie wird hauptsächlich von der Abklingzeit der angeregten Zustände im Kristall bestimmt und beeinflusst einerseits das Zeitintervall der Koinzidenzmessung und andererseits den zeitlichen Abstand zwischen aufeinanderfolgenden, detektierbaren Ereignissen (Totzeit). Eine geringe Abklingzeit sorgt daher sowohl zu einem verringerten Anteil zufällig registrierter Koinzidenzen (vgl. Abbildung 4C), als auch zu einer höheren Detektionsrate nacheinander eintreffender Photonen [3,17,30,31]. Moderne „*time-of-flight*“ (TOF) PET-Scanner können aufgrund ihres kurzen Detektionsintervalls von ca. 300–600 ps sogar die unterschiedlichen Weglängen beider Photonen einer Annihilation entlang der LOR berücksichtigen und ermöglichen somit eine Verbesserung der Ortsauflösung [32].

Neben diesen physikalischen Eigenschaften spielen die Produktionskosten natürlich eine entscheidende Rolle, besonders im Hinblick auf den Bedarf vieler möglichst kleiner Detektoreinheiten. Während in den ersten PET-Scannern basierend auf ihrer hohen Lichtausbeute meist Thallium-dotierte Natriumiodid-Kristalle zum Einsatz kamen, wird in moderneren Geräten aufgrund ihrer signifikant kürzeren Abklingzeiten hauptsächlich Lutetiumoxyorthosilikat (LSO) oder Lutetiumyttriumoxyorthosilikat (LYSO), bzw. das deutlich dichtere und somit sensitivere Bismutgermanat (BGO) verwendet [4,17,30,31].

Zur Berücksichtigung der durch Streuung und vollständige Absorption im Patienten verlorenen  $\gamma$ -Quanten bei der späteren Rekonstruktion, wird vor der eigentlichen Emissionsmessung in der Regel eine Transmissionsmessung mit einer externen Photonenquelle durchgeführt. Die dadurch berechneten Korrekturen ermöglichen eine quantitative Interpretation der Messergebnisse zur Bestimmung der genauen Aktivitätsverteilung. Bei gegenwärtig typischerweise verwendeten PET/CT-Hybridgeräten kann diese Schwächungskorrektur direkt anhand der rotierenden Röntgenquelle der CT-Messung bestimmt werden [4].

## 2.2 PET-relevante Radionuklide

Die Wahl eines geeigneten Radionuklids für die PET wird, neben der Voraussetzung der  $\beta^+$ -Instabilität, von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Diese basieren sowohl auf den physikalischen und chemischen Eigenschaften des Positronemitters als auch auf dem expliziten Anwendungsbereich. Einen wichtigen und letztlich ausschlaggebenden Parameter stellt dabei die Halbwertszeit dar. Sie sollte dem zeitlichen Rahmen des abzubildenden biologischen Prozesses bzw. der Pharmakokinetik des verwendeten Trägermoleküls entsprechen. Dies bedeutet, dass für die gesamte relevante Zeitspanne ein ausreichend intensives Messsignal gewährleistet wird, ohne jedoch eine unnötig hohe Strahlenbelastung für den Patienten darzustellen. In diesem Kontext spielen zudem Synthese und Verarbeitung des Radiopharmakons eine entscheidende Rolle, da deren zeitlicher Aufwand durch die Halbwertszeit des Nuklids limitiert wird. Beispielsweise schließen die sehr kurzen Halbwertszeiten von  $^{15}\text{O}$  (ca. 2 min) und  $^{13}\text{N}$  (ca. 10 min) komplexe und zeitaufwändige Radiosynthesen weitestgehend aus [33]. Sie werden daher typischerweise unmittelbar nach ihrer Produktion zum Messort transportiert und entweder direkt oder nach kurzer Reduktion z. B. in Form von  $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$ ,  $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  oder  $[^{13}\text{N}]\text{NH}_3$  zur Untersuchung schneller Vorgänge wie Sauerstoffaufnahme und -verteilung sowie Perfusion verwendet [33–36]. Anwendungen solcher sehr kurzlebigen Radionuklide setzen demnach eine möglichst geringe räumliche Distanz zwischen Produktion und Applikation bzw. Messung voraus. Mit etwas langlebigeren Nukliden wie den häufig verwendeten  $^{11}\text{C}$  ( $t_{1/2} = 20,37$  min),  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 67,83$  min) und  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 109,7$  min) lassen sich hingegen sowohl zeitlich anspruchsvollere Markierungsreaktionen und Aufarbeitungen des entsprechenden Pharmakons durchführen als auch langsamere Vorgänge wie Metabolismus und Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen im Organismus beispielsweise für onkologische Fragestellungen abbilden [33,37–40]. Unter Voraussetzung einer ausreichend hohen Startaktivität erlaubt die Halbwertszeit von  $^{18}\text{F}$  sogar etwas längere Transportwege, wodurch die Produktion des Radionuklids direkt vor Ort nicht zwingend notwendig ist [41]. Dennoch ist die Anwendbarkeit dieser eher kurzlebigen Nuklide in der Regel auf die Radiomarkierung kleinerer Moleküle mit schneller Pharmakokinetik, d. h. schneller Anreicherung im diagnostisch relevanten Gewebe und kurzer biologischer Halbwertszeit, beschränkt. Zur Visualisierung größerer Polymere oder Biomoleküle wie Antikörper, antikörperähnlicher Strukturen und anderer Proteine mit einer typischerweise deutlich langsameren Adressierung des Zielgewebes und sehr viel längeren Verweildauer im Blutkreislauf (bis zu mehreren Tagen) finden hingegen langlebige Positronemitter wie  $^{89}\text{Zr}$  ( $t_{1/2} = 3,27$  d) oder  $^{124}\text{I}$  ( $t_{1/2} = 4,18$  d) Anwendung [41–44].

Eine weitere, zu berücksichtigende Eigenschaft des Radionuklids ist dessen tatsächlicher prozentualer  $\beta^+$ -Anteil. Mit steigender Massenzahl wandeln sich protonenreiche Kerne anstelle der Positronemission auch zu einem gewissen Anteil über den Konkurrenzprozess des Elektroneneinfangs (EC,  $\epsilon$ ) in den stabileren Tochterkern um. Dabei fängt der Kern ein Elektron aus der eigenen Elektronenhülle (meistens aus der inneren K-Schale) ein, was ebenfalls die Umwandlung eines Protons in ein Neutron unter Aussendung eines Elektronenneutrinos zur Folge hat [20]. Da hierbei jedoch kein Positron emittiert wird, besitzt dieser Vorgang keine Relevanz für die PET. Je höher die Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen  $\beta^+$ -Umwandlung, desto höher ist demnach die Signalausbeute und desto geringer ist die notwendige Messdauer und Menge bzw. Aktivität des applizierten Radiopharmakons für eine ausreichende Bildqualität [45]. Erfolgt bei der Kernumwandlung die Population eines oder mehrerer angeregter Zustände des Tochterkerns, welche sich anschließend durch Emission von  $\gamma$ -Strahlung stabilisieren, sind solche Sekundärprozesse ebenfalls zu berücksichtigen. Liegt die Emission dieser

Photonen im zeitlichen und energetischen Detektionsbereich der PET-relevanten 511 keV Koinzidenz, kann die Messung verfälscht und die Ortsauflösung beeinträchtigt werden [46].

Wie bereits in Abschnitt 2.1 erläutert, spielt die kinetische Energie des ausgesendeten Positrons eine entscheidende Rolle, da sie direkten Einfluss auf seine Reichweite im umliegenden Gewebe hat. Neben den bereits beschriebenen Einschränkungen durch die Beschaffenheit des Detektors, ist die mittlere und maximale  $\beta^+$ -Energie des verwendeten Radionuklids demnach maßgeblich für die räumliche Auflösung der PET-Messung verantwortlich [22,46,47]. Im Allgemeinen und besonders für die Visualisierung sehr kleiner Strukturen wie Metastasen oder Hirnareale sollte die  $\beta^+$ -Energie daher möglichst niedrig sein.

Neben diesen Parametern wird die Anwendbarkeit der Positronemitter natürlich durch deren Verfügbarkeit beeinflusst. Diese basiert wiederum hauptsächlich auf der jeweiligen Produktionsart. Ein Großteil der häufig verwendeten Nuklide (z. B.  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ) wird mittels Zyklotron durch Bestrahlung eines sogenannten Targets mit geladenen Teilchen erzeugt. Bei diesen Projektilen handelt es sich in der Regel um spiralförmig beschleunigte Protonen, Deuteronen oder  $\alpha$ -Partikel, welche dann dank ihrer erzeugten kinetischen Energie die erforderliche Kernreaktion des Targetnuklids auslösen können [33,41]. Der Erwerb und Betrieb eines eigenen Zyklotrons zur Radionuklidproduktion in unmittelbarer Nähe zur späteren Anwendung ist sehr aufwändig und kostenintensiv, jedoch bei vielen sehr kurzlebigen Nukliden oftmals alternativlos.

Im Gegensatz dazu ist die Verwendung von Nukliden, welche über Radionuklidgeneratoren zugänglich sind, für den Anwender in der Regel mit weniger Aufwand verbunden. Hierbei wird ein langlebigeres Mutternuklid auf einer Festphasenmatrix fixiert und je nach Differenz der Halbwertszeiten stellt sich bei der Umwandlung in das kurzlebige Tochternuklid nach einer gewissen Zeit ein säkulares oder transientes radioaktives Gleichgewicht ein. Das Tochternuklid kann anschließend bequem per Elution trägerfrei abgetrennt und entweder unmittelbar oder nach kurzen Aufarbeitungsschritten verwendet werden [25,41,48]. Je nach Einstellungsdauer des Gleichgewichts ist das entsprechende Radionuklid somit einmal oder sogar mehrmals täglich direkt vor Ort zugänglich. Neben dem prominentesten Beispiel des  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Systems zur klinischen Produktion des metastabilen SPECT-Nuklids  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  hat vor allem die Verwendung des PET-relevanten Radiometalls  $^{68}\text{Ga}$  ausgehend von  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren zunehmend an Bedeutung gewonnen [25,39,48].

Tabelle 1 zeigt die physikalischen Eigenschaften und hauptsächlichen Produktionswege präklinisch und klinisch häufig verwendeter PET-Nuklide. „Organische“ Vertreter wie beispielsweise  $^{18}\text{F}$ ,  $^{124}\text{I}$  und  $^{11}\text{C}$  werden typischerweise unter Ausbildung stabiler kovalenter Bindungen in das Radiopharmakon eingeführt. Dabei ist es durch direkte Substitution oder Verwendung kleinerer strukturanaloger Gruppen und Moleküle möglich, die Charakteristik des Biomoleküls vollständig oder weitestgehend zu erhalten [25,33,41]. Beispielsweise kann im Fall von  $^{11}\text{C}$  ein typischerweise vorhandenes, stabiles Kohlenstoffisotop eins zu eins ersetzt werden, ohne die Struktur und (bio-)chemischen Eigenschaften des nicht-radioaktiven (authentischen) Analogons zu verändern [33,37]. Insbesondere Markierungsreaktionen mit  $^{18}\text{F}$  führen dagegen zu chemisch und biologisch gearteten Analoga des eigentlichen Biomoleküls (s. Kapitel 2.2.2.1).

„Metallische“ Radionuklide wie  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  und  $^{89}\text{Zr}$  werden in der Regel mittels koordinativen Donor-Akzeptor-Bindungen unter Verwendung von bifunktionellen Chelatoren an das Trägermolekül gebunden (vgl. Kapitel 2.4). Um eine Freisetzung des Radiometalls nach Applikation des Radiopharmakons zu verhindern, ist die thermodynamische Stabilität und kinetische Inertheit des



entsprechenden Komplexes unter physiologischen Bedingungen dabei von großer Bedeutung [25]. Die Modifizierung mit entsprechenden Chelatoren bzw. Radiokomplexen kann jedoch einen signifikanten Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften des Targetvektors haben. Dieser Einfluss muss vorher untersucht, berücksichtigt und gegebenenfalls durch Variation des Liganden und seiner Anbindungsmethode angepasst werden [25]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PET-Nuklide werden in den folgenden Unterkapiteln detaillierter beschrieben.

**Tabelle 1:** Physikalische Eigenschaften und hauptsächliche Produktionswege häufig verwendeter PET-Nuklide inklusive maximaler ( $E_{\beta^+,max}$ ) und durchschnittlicher ( $E_{\beta^+,av}$ ) Positronenergien [46,49–58].

	Nuklid	$t_{1/2}$	$E_{\beta^+,max}$ (keV)	$E_{\beta^+,av}$ (keV)	Umwandlung	Produktion
organisch	$^{11}\text{C}$	20,37 min	961	386	$\beta^+$ (99,8 %) $\epsilon$ (0,2 %)	Zyklotron: $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$
	$^{13}\text{N}$	9,97 min	1198	493	$\beta^+$ (99,8 %) $\epsilon$ (0,2 %)	Zyklotron: $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$
	$^{15}\text{O}$	2,04 min	1735	737	$\beta^+$ (99,9 %) $\epsilon$ (0,1 %)	Zyklotron: $^{14}\text{N}(d,n)^{15}\text{O}$
	$^{18}\text{F}$	109,7 min	634	249	$\beta^+$ (96,9 %) $\epsilon$ (3,1 %)	Zyklotron: $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$
	$^{124}\text{I}$	4,18 d	2138	819	$\beta^+$ (25,6 %) $\epsilon$ (74,4 %)	Zyklotron: $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$
metallisch	$^{44}\text{Sc}$	3,97 h	1474	632	$\beta^+$ (94,3 %) $\epsilon$ (5,7 %)	Generator: $^{44}\text{Ti} \xrightarrow{\epsilon} ^{44}\text{Sc}$ Zyklotron: $^{44}\text{Ca}(p,n)^{44}\text{Sc}$
	$^{64}\text{Cu}$	12,7 h	653	278	$\beta^+$ (17,5 %) $\beta^-$ (38,5 %) $\epsilon$ (44,0 %)	Zyklotron: $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$
	$^{68}\text{Ga}$	67,8 min	1899	829	$\beta^+$ (88,9 %) $\epsilon$ (11,1 %)	Generator: $^{68}\text{Ge} \xrightarrow{\epsilon} ^{68}\text{Ga}$
	$^{82}\text{Rb}$	1,27 min	3381	1480	$\beta^+$ (95,5 %) $\epsilon$ (4,5 %)	Generator: $^{82}\text{Sr} \xrightarrow{\epsilon} ^{82}\text{Rb}$
	$^{86}\text{Y}$	14,7 h	3141	640	$\beta^+$ (31,9 %) $\epsilon$ (68,1 %)	Zyklotron: $^{86}\text{Sr}(p,n)^{86}\text{Y}$
	$^{89}\text{Zr}$	3,27 d	902	396	$\beta^+$ (22,8 %) $\epsilon$ (77,2 %)	Zyklotron: $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$

### 2.2.1 Zirkonium-89

Zirkonium ist ein Übergangsmetall mit der Ordnungszahl 40 sowie der relativen Atommasse 91,22 u und befindet sich in der 5. Periode und 4. Gruppe des Periodensystems [59]. Es enthält die fünf natürlich vorkommenden Isotope  $^{90}\text{Zr}$  (51,5 %),  $^{91}\text{Zr}$  (11,2 %),  $^{92}\text{Zr}$  (17,2 %),  $^{94}\text{Zr}$  (17,4 %) und  $^{96}\text{Zr}$  (2,8 %) und seine einzige stabile Oxidationsstufe in wässriger Lösung ist +4 [59,60].  $\text{Zr}^{4+}$  ist aufgrund seines hohen Verhältnisses von Ladung zu Ionenradius nach Pearsons HSAB-Konzept (*Hard and Soft Acids and Bases*) als harte Lewis Säure einzuordnen [61]. Als oxophiles Kation geht es daher bevorzugt Verbindungen mit Sauerstoffatomen ein und präferiert in Komplexen die Bindung zu harten O-Donoren mit der Koordinationszahl 8 [62–64].

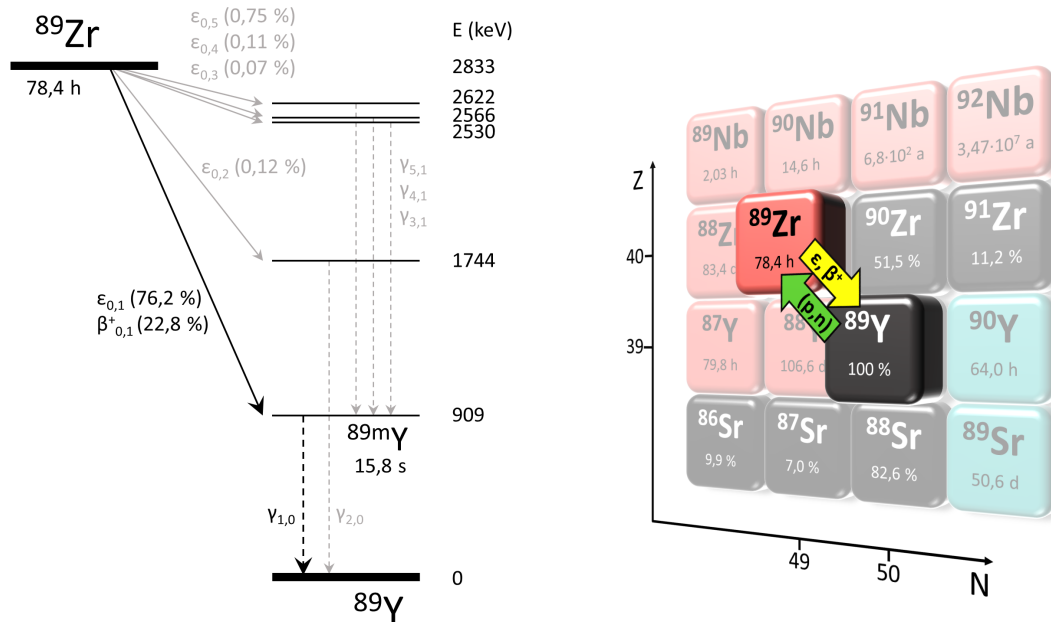
Zirkonium-89 ist eines von 31 bekannten Radioisotopen des Zirkoniums zwischen  $A = 78$  und  $A = 112$  [60]. Das Positron-emittierende Nuklid hat aufgrund seiner kernchemischen Eigenschaften in den vergangenen Jahren im Bereich der molekularen Bildgebung großes wissenschaftliches und medizinisches Interesse erlangt und zunehmend an Bedeutung gewonnen.  $^{89}\text{Zr}$  zerfällt mit einer Halbwertszeit von 78,4 h aus seinem Grundzustand zu 76,2 % mittels Elektroneneinfang und zu 22,8 % über  $\beta^+$ -Umwandlung in den ersten angeregten, metastabilen Zustand des isobaren Yttrium-89 (Abbildung 5) [53]. Die restlichen 1 % verteilen sich auf vier weitere  $\epsilon$ -Übergänge zu energetisch höheren Zuständen des Tochternuklids, welche jedoch aufgrund ihrer Wahrscheinlichkeit von geringerer Bedeutung sind. Trotz seines vergleichsweise geringen  $\beta^+$ -Anteils (vgl.  $^{18}\text{F}$ : 96,9 %,  $^{68}\text{Ga}$ : 88,9 %) weist  $^{89}\text{Zr}$  einige vorteilhafte Eigenschaften für die Anwendung in der PET-Bildgebung auf. Das Zerfallsprodukt  $^{89\text{m}}\text{Y}$  geht mit einer Halbwertszeit von 15,8 s unter Aussendung eines 909 keV  $\gamma$ -Quants in seinen Grundzustand über [53]. Abgesehen von der charakteristischen 511 keV Emission aus der Annihilation des Positrons, stellt dies mit 99,9 % die einzig relevante  $\gamma$ -Emission dar [53]. Diese verzögerten, hochenergetischen Photonen liegen einerseits außerhalb des typischen PET-relevanten Detektionsbereichs (350–650 keV, 6–12 ns) und haben somit kaum störenden Einfluss auf die Koinzidenzmessung, verursachen aber andererseits auch eine größere Strahlenbelastung für Patient und Personal [17,43,65,66].

Den größten bzw. wichtigsten Unterschied zu den meisten häufig verwendeten, kurzlebigen PET-Nukliden stellt jedoch seine signifikant längere Halbwertszeit dar. Sie ermöglicht die Visualisierung größerer Targetvektoren und Biomoleküle mit langsamer Pharmakokinetik, d. h. verzögerter Akkumulation im Zielgewebe und langer Verweilzeit im Organismus über einen ausreichend langen Zeitraum. Außerdem erlaubt sie längere Syntheszeiten und Transportwege. Das Hauptanwendungsgebiet von  $^{89}\text{Zr}$  besteht daher in der Radiomarkierung von intakten Antikörpern, antikörperähnlichen Konstrukten und anderen Immunproteinen, welche typischerweise biologische Halbwertszeiten, bzw. Blutzirkulationszeiten von mehreren Tagen aufweisen (vgl. Kapitel 2.5) [11,43]. Mittels sogenannter Immuno-PET lassen sich somit langsamere Rezeptor-vermittelte Anreicherungen bzw. Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen zur Diagnostik und Therapiekontrolle bei Krebs und anderen Erkrankungen darstellen [11,65,67].

Im Vergleich zu anderen Positronemittern wie  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  und  $^{124}\text{I}$ , die in den vergangenen Jahren häufig für präklinische und klinische Immuno-PET Studien verwendet wurden, bietet  $^{89}\text{Zr}$  einige Vorteile. Im Gegensatz zu  $^{86}\text{Y}$  ( $t_{1/2} = 14,7$  h) und  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 12,7$  h) passt seine Halbwertszeit gerade im Hinblick auf klinische Anwendungen im menschlichen Organismus deutlich besser zu den pharmakologischen Eigenschaften vollständiger Antikörper. Sie gewährleistet somit selbst nach mehreren Tagen, d. h. bei einem optimalen Kontrast zwischen Zielgewebe (z. B. Tumor) und Untergrund noch eine ausreichend hohe Aktivität [43,67].

Aufgrund einer vergleichsweise geringen durchschnittlichen und maximalen  $\beta^+$ -Energie von  $E_{\beta^+,av} = 396$  keV bzw.  $E_{\beta^+,max} = 902$  keV und einer daraus folgenden mittleren Positronreichweite ( $R_{mean}$ ) von 1,23 mm (in Wasser) zeichnen sich PET-Messungen mit  $^{89}\text{Zr}$  durch eine hohe räumliche Auflösung aus [43,45,53]. Dies stellt einen eindeutigen Vorteil gegenüber der höherenergetischen Emission von  $^{124}\text{I}$  ( $E_{\beta^+,av} = 819$  keV,  $R_{mean} = 3,4$  mm) und  $^{86}\text{Y}$  ( $E_{\beta^+,av} = 640$  keV,  $R_{mean} = 2,5$  mm) dar [55,58]. Radioiodierte Proteine neigen aufgrund der nur mäßig stabilen Kohlenstoff-Iod-Bindung zudem oftmals zur Dehalogenierung und unerwünschten Verteilung des Radionuklids im Organismus mit hauptsächlichlicher Anreicherung in der Schilddrüse [44]. Im Gegensatz dazu zeigen  $^{89}\text{Zr}$ -markierte Immunkonjugate in der Regel eine höhere *in vivo*-Stabilität und das Radiometall verbleibt nach Inkorporation typischerweise innerhalb des Zielgewebes [43,65]. Aufgrund dieser Eigenschaften ist  $^{89}\text{Zr}$  mittlerweile das Radionuklid

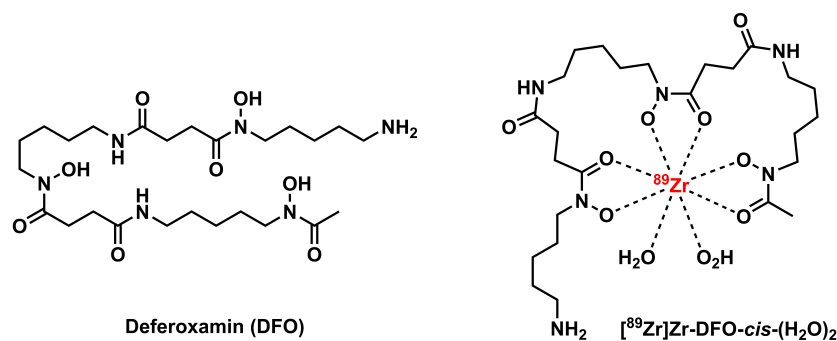
der Wahl für die meisten Antikörper-basierten PET-Anwendungen. Neben der Radiomarkierung von Immunproteinen wird es jedoch auch zur Visualisierung von Peptiden, Nanopartikeln, Mikrosphären, Nanoröhren, Liposomen, anderen Proteinen und sogar vollständigen Zellen verwendet [68–75].



**Abbildung 5:** Umwandlungsschema (links) sowie vereinfachter Ausschnitt aus der Nuklidkarte (rechts) mit Darstellung der Produktions- (grüner Pfeil) und Zerfallsroute (gelber Pfeil) von  $^{89}\text{Zr}$ . Erstellt auf Basis der Daten von Bé *et al.* 2016 [53] sowie der Internationalen Atomenergie-Organisation (IAEA) [60].

Die Produktion von  $^{89}\text{Zr}$  erfolgt mittels Zyklotron durch Bestrahlung von  $^{89}\text{Y}$ -Targets entweder mit Protonen oder Deuteronen über die Kernreaktionen  $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$  oder  $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$  [43,76]. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei  $^{89}\text{Y}$  um das einzige natürlich vorkommende Isotop des Yttriums handelt, ist die Herstellung des Targetmaterials mit vergleichsweise wenig Aufwand bzw. geringeren Kosten verbunden und die entsprechende Kernreaktion liefert das gewünschte  $^{89}\text{Zr}$  mit hohen spezifischen Aktivitäten und radionuklidischer Reinheit [43,77]. Für die (p,n)-Reaktion werden Protonen auf ca. 12–15 MeV beschleunigt, bevor sie auf das Yttriumtarget treffen [76,77]. Eine typische Strahlenergie für die Deuteronreaktion liegt bei 16–7 MeV [78]. Obwohl sie höhere Ausbeuten liefert, spielt die (d,2n)-Reaktion in der Praxis jedoch nur eine untergeordnete Rolle, da die meisten kleinen medizinischen Zyklotrons nicht in der Lage sind, solche hochenergetischen Deuteronen zu erzeugen [76]. Als mögliche Verunreinigungen sind bei beiden Produktionsrouten das  $^{88}\text{Zr}$  ( $t_{1/2} = 83,4$  d) und sein Zerfallsprodukt  $^{88}\text{Y}$  ( $t_{1/2} = 106,6$  d) zu berücksichtigen [43,60]. Da die Anregungsfunktionen bzw. Wirkungsquerschnitte der Reaktionen  $^{89}\text{Y}(p,2n)^{88}\text{Zr}$  und  $^{89}\text{Y}(d,3n)^{88}\text{Zr}$  jedoch erst bei höheren Projektilenergien relevante Werte annehmen, lässt sich die Bildung von  $^{88}\text{Zr}$  durch Unterschreiten eines bestimmten Schwellenwertes (13,1 MeV für Protonen; 15,5 MeV für Deuteronen) nahezu vollständig verhindern [79,80]. Zur Separation des  $^{89}\text{Zr}$  vom Targetmaterial hat sich neben einigen anderen Ansätzen die Kationenaustauschchromatographie anhand eines Hydroxamat-modifizierten Harzes bewährt. Hierfür wird das bestrahlte Targetmaterial in einer salzsauren Lösung auf das Austauscherharz gegeben und das durch die Hydroxamatgruppen zunächst gebundene  $^{89}\text{Zr}^{4+}$  anschließend in hoher Reinheit mittels Oxalsäurelösung eluiert [43].

Als Radiometall wird  $^{89}\text{Zr}$  über koordinative Bindungen unter Verwendung einer komplexbildenden Einheit an das entsprechende Trägermolekül gebunden. Als Gold-Standard und bis heute in präklinischen und klinischen Studien nahezu ausschließlich verwendeter Komplexbildner für  $^{89}\text{Zr}$  gilt Deferoxamin (DFO) [43,65,81]. Das Siderophor enthält drei Hydroxamatgruppen in einer offenkettigen, hexadentaten Struktur und belegt bei der Komplexierung mit seinen harten Sauerstoffdonoren sechs der acht bevorzugten Koordinationsstellen des tetravalenten  $\text{Zr}^{4+}$ . Die freien Plätze werden in wässriger Lösung durch zwei Wassermoleküle ausgefüllt (Abbildung 6). Der resultierende  $[\text{}^{89}\text{Zr}][\text{Zr-DFO-cis-(H}_2\text{O)}_2]^+$  Komplex besitzt jedoch eine gewisse Empfindlichkeit gegenüber Deprotonierung [62].  $^{89}\text{Zr}$ -markierte, DFO-funktionalisierte Proteine zeigen daher *in vivo* oftmals eine leichte (metabolische) Instabilität und Freisetzung sowie Knochenanreicherung des osteophilen Radiometalls [65,68,82,83]. Trotz seiner häufigen Anwendung stellt DFO somit offenbar nicht das bestmögliche Mittel für eine stabile Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}$  dar. Obwohl diese Instabilität aufgrund des sehr viel schnelleren Stoffwechsels hauptsächlich in Kleintieren beobachtet wurde und in Humanstudien bisher nur eine geringere Rolle spielt, befasst sich die aktuelle Forschung seit einigen Jahren mit der Entwicklung neuer, verbesserter Chelatorsysteme [43,65,82]. Hierbei werden unterschiedliche Ansätze wie die Erhöhung der Donorgruppenanzahl oder die Verwendung von starrerem, makrozyklischen Systemen verfolgt. Die Thematik (bifunktionaler) Chelatoren sowie der unterschiedlichen Anbindungsmethoden ist in Kapitel 2.4 beschrieben.



**Abbildung 6:** Strukturelle Darstellung von DFO und  $[\text{}^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-cis-(H}_2\text{O)}_2$ .

### 2.2.2 Fluor-18

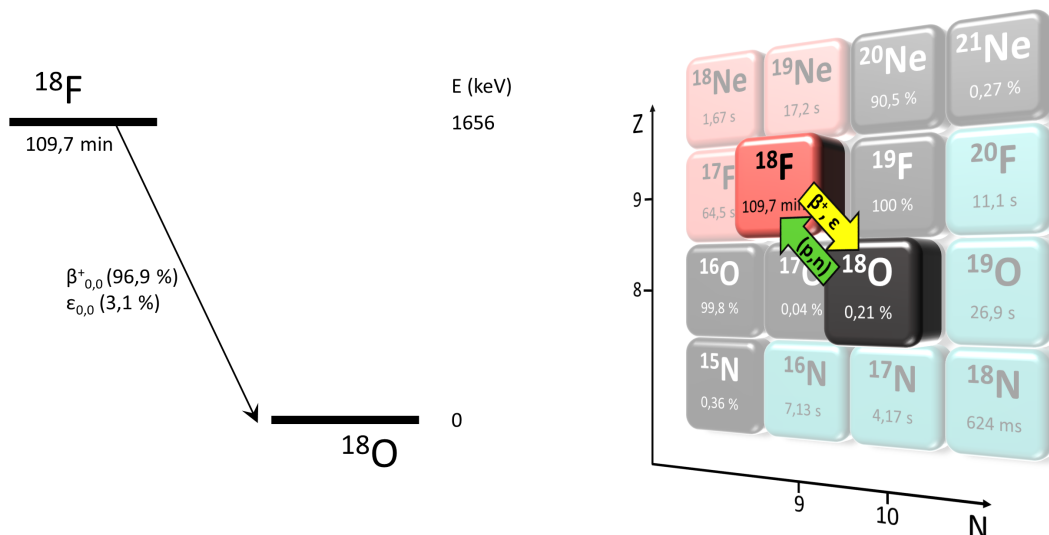
Fluor ist ein nichtmetallisches Element mit der Ordnungszahl 9 und der relativen Atommasse von 19,00 u. Es befindet sich in der zweiten Periode sowie 17. Gruppe bzw. 7. Hauptgruppe des Periodensystems und stellt somit den leichtesten Vertreter der Halogene dar. Fluor besteht aus dem einzigen stabilen Isotop  $^{19}\text{F}$  und liegt unter Standardbedingungen gasförmig als zweiatomiges  $\text{F}_2$ -Molekül vor [60,84]. Als Element mit der höchsten Elektronegativität ( $\chi_{\text{F}} = 3,98$  auf der Paulingskala) reagiert es mit nahezu allen anderen Elementen unter Aufnahme eines Elektrons und kommt in der Natur daher fast ausschließlich in Mineralen gebunden als einfach negativ geladenes Fluorid vor [84,85]. Elementares Fluor reagiert mit vielen Substanzen sofort und stark exotherm und ist beispielsweise in der Lage, viele Metalle in ihre höchstmögliche Oxidationsstufe zu überführen. In der präparativen organischen Synthese erfolgen direkte Fluorierungen hauptsächlich durch nukleophile Substitution geeigneter Abgangsgruppen wie beispielsweise Bromid, Iodid oder Tosylat unter Verwendung fluoridhaltiger Verbindungen [86]. Seltener kommen auch Ausgangssubstanzen wie elementares Fluor oder Selectfluor™

zum Einsatz, die *in situ* als Quelle von elektrophilem „F<sup>+</sup>“ dienen [86,87]. Fluor bildet dabei eine äußerst stabile und polare kovalente Bindung zu Kohlenstoffatomen aus ( $\Delta H_{C-F} = 485 \text{ kJ/mol}$ , vgl.  $\Delta H_{C-H} = 416 \text{ kJ/mol}$ ) [88].

Fluor-18 ist das langlebigste von 17 bekannten Radioisotopen des Fluors zwischen  $A = 14$  und  $A = 31$  [60]. Aufgrund seiner vorteilhaften kernphysikalischen und -chemischen Eigenschaften stellt es das mit Abstand am häufigsten verwendete Radionuklid in der präklinischen und klinischen PET-Bildgebung dar [38]. Mit einer Halbwertszeit von 109,7 min gehört  $^{18}\text{F}$  zwar ebenfalls zu den kurzlebigen Radionukliden, ermöglicht aber eine deutlich breitere Anwendung als die anderen organischen PET-Nuklide  $^{15}\text{O}$  (2,04 min),  $^{13}\text{N}$  (9,97 min) und  $^{11}\text{C}$  (20,37 min). So sind bei ausreichend hoher Startaktivität durchaus auch kürzere mehrstufige Radiosynthesen und Aufarbeitungsschritte zur Herstellung einer großen Vielfalt  $^{18}\text{F}$ -markierter PET-Tracer durchführbar. Eine Synthesedauer von mehr als einer Halbwertszeit ist dabei nicht unüblich [89]. Zudem erlaubt die Halbwertszeit die Abbildung einer Vielzahl biologischer Prozesse auch über einen vergleichsweise langen Zeitraum von bis zu einem halben Tag, ohne dabei eine erheblich höhere Strahlenbelastung für den Patienten über mehrere Tage hinweg zu verursachen [89,90]. So wird  $^{18}\text{F}$  hauptsächlich zur Radiomarkierung niedermolekularer Verbindungen, seltener aber auch in Kombination mit Polymeren, Nanopartikeln, Peptiden, Oligonucleotiden, Liposomen und kleineren Proteinen verwendet [38,90–93]. Die direkte  $^{18}\text{F}$ -Markierung temperatur- und pH-sensibler Biomoleküle wie beispielsweise Antikörper bzw. deren Fragmente gestaltet sich jedoch aufgrund der typischerweise nötigen harschen Reaktionsbedingungen zur Ausbildung der C–F-Bindung schwierig. In diesem Fall bedient man sich oftmals kleinerer Verbindungen, sogenannter prosthetischer Gruppen oder Synthons, die zunächst radiomarkiert und erst im Anschluss unter milderen Bedingungen an den entsprechenden Targetvektor gebunden werden [38,90]. Aufgrund ihrer typischen langsamen Pharmakokinetik ist die Anwendbarkeit des kurzlebigen  $^{18}\text{F}$  in Kombination mit den meisten vollständigen Antikörpern und anderen großen Biomolekülen jedoch limitiert [94].

Innerhalb eines gewissen wirtschaftlichen Rahmens erlaubt die längere Lebensdauer von  $^{18}\text{F}$  zusätzlich den Transport des Radionuklids und/oder des entsprechenden Radiopharmakons über eine begrenzte Distanz. Dadurch ist die unmittelbare räumliche Nähe zwischen Nuklidproduktion, Radiosynthese und PET-Anwendung und damit die kostenintensive Verfügbarkeit eines hauseigenen Zyklotrons oftmals nicht zwingend notwendig [41].

$^{18}\text{F}$  zerfällt zu 96,9 % unter Positronemission und zu 3,1 % über Elektroneneinfang direkt in den Grundzustand des stabilen Tochternuklids  $^{18}\text{O}$  (Abbildung 7) [51]. Aufgrund des hohen  $\beta^+$ -Anteils lassen sich somit exzellente Signalausbeuten erzielen und es tritt neben der 511 keV Vernichtungsstrahlung keine weitere  $\gamma$ -Emission mit störendem Einfluss auf die Koinzidenzmessung auf. Mit einer sehr geringen maximalen und durchschnittlichen Positronenergie von  $E_{\beta^+, \text{max}} = 634 \text{ keV}$  und  $E_{\beta^+, \text{av}} = 249 \text{ keV}$  bietet  $^{18}\text{F}$  exzellente energetische Eigenschaften [51]. Aufgrund der daraus folgenden mittleren Positronreichweite von nur 0,6 mm (in Wasser) zeichnen sich  $^{18}\text{F}$ -basierte PET-Messungen im Vergleich zu den meisten anderen PET-Nukliden wie  $^{13}\text{N}$  ( $R_{\text{mean}} = 1,8 \text{ mm}$ ),  $^{11}\text{C}$  ( $R_{\text{mean}} = 1,2 \text{ mm}$ ) und  $^{68}\text{Ga}$  ( $R_{\text{mean}} = 3,5 \text{ mm}$ ) durch eine signifikant höhere räumliche Auflösung aus [46,47].



**Abbildung 7:** Umwandlungsschema (links) sowie vereinfachter Ausschnitt aus der Nuklidkarte (rechts) mit Darstellung der Produktions- (grüner Pfeil) und Zerfallsroute (gelber Pfeil) von  $^{18}\text{F}$ . Erstellt auf Basis der Daten von Bé *et al.* 2004 [51] sowie der Internationalen Atomenergie-Organisation (IAEA) [60].

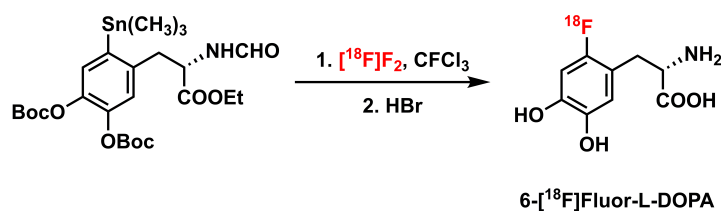
Die Radionuklidproduktion von  $^{18}\text{F}$  erfolgt mittels Zyklotron hauptsächlich durch Bestrahlung von  $^{18}\text{O}$ -Targets mit Protonen über die Kernreaktion  $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$  [38]. Die Wahl des verwendeten Targetmaterials ist dabei eng mit der späteren Anwendung verbunden. Bei der Bestrahlung von flüssigem  $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$  wird eine wässrige Lösung von  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$  erzeugt, die bei darauffolgenden, nukleophilen Substitutionsreaktionen Anwendung findet. Wird hingegen  $[^{18}\text{O}]\text{O}_2$  als Ausgangsmaterial verwendet, entsteht gasförmiges  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ , welches wiederum elektrophile Markierungsreaktionen ermöglicht [38]. Die Schwellenenergie dieser Kernreaktion beträgt ca. 3 MeV, üblicherweise verwendete Protonenenergien liegen im Bereich von 16–3 MeV [95,96].  $^{18}\text{O}$  weist nur eine sehr geringe natürliche Isotopenhäufigkeit von 0,21 % auf und muss für die Herstellung eines geeigneten Targetmaterials zunächst auf typischerweise > 95 % angereichert werden, um mögliche  $^{13}\text{N}$ -Verunreinigungen durch die Kernreaktion  $^{16}\text{O}(p,\alpha)^{13}\text{N}$  zu minimieren [95]. Die alternativen Produktionsrouten  $^{16}\text{O}(\alpha,np)^{18}\text{F}$  und  $^{16}\text{O}(^3\text{He},p)^{18}\text{F}$  bieten zwar die Möglichkeit, natürlich vorkommende Sauerstoffquellen (99,8 %  $^{16}\text{O}$ ) zu verwenden, sind in der Praxis jedoch nur von geringer Bedeutung [95,97].  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  ist ebenfalls durch Bestrahlung von Neon mit Deuteronen (14–0 MeV) über die Kernreaktion  $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$  zugänglich [95,97]. Da die Targetextraktion von  $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$  durch Zusatz von  $[^{19}\text{F}]\text{F}_2$ -Trägergas erfolgt, werden bei der Produktion dieser Spezies üblicherweise sehr viel geringere molare Aktivitäten erreicht als bei der Herstellung des trägerfreien (*no-carrier-added*, n.c.a.)  $[^{18}\text{F}]\text{Fluorids}$  [95,96]. Zudem stellt sie aufgrund der hohen Reaktivität von  $\text{F}_2$  sehr viel größere Anforderungen an die verwendeten Geräte und Materialien.

### 2.2.2.1 Radiofluorierungen

Im Gegensatz zu Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff ist Fluor ein vergleichsweise seltener Bestandteil natürlicher, biologisch aktiver Moleküle. Dies bedeutet, dass Radiomarkierungen mit  $^{18}\text{F}$  nur in den seltensten Fällen durch Austausch des natürlich vorkommenden Isotops unter vollständiger Struktur-erhaltung realisierbar sind. Die Einführung des Radionuklids ist demnach oft mit einer strukturellen

Veränderung des Moleküls verbunden und hat potentiellen Einfluss auf dessen biologische und chemische Eigenschaften [98]. Eine typische Vorgehensweise stellt den Austausch von Wasserstoffatomen dar. Aufgrund ähnlicher van der Waals Radii ( $r_F = 147 \text{ pm}$ ,  $r_H = 120 \text{ pm}$ ) verursacht dies zwar vergleichsweise geringe sterische Veränderungen, ist allerdings durch die unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften ( $\chi_F = 3,98$ ;  $\chi_H = 2,20$ ) oftmals mit einem signifikanten Einfluss auf die Polarität des Biomoleküls verbunden [85,98]. Alternativ wird  $^{18}\text{F}$  auch durch Austausch von Hydroxidgruppen eingeführt. Neben ähnlichen Bindungslängen (C–F:  $139 \text{ pm}$ , C–OH:  $143 \text{ pm}$ ) und Elektronegativitäten ( $\chi_O = 3,44$ ) bieten beide Substituenten die Eigenschaft, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden [85,98].  $^{18}\text{F}$ -Markierungsreaktionen sind prinzipiell von der makroskopischen organischen Fluorierungschemie ableitbar, jedoch durch die kurze Lebensdauer des Radionuklids zeitlich limitiert. Sie lassen sich grob in direkte nukleophile oder elektrophile Substitutionen sowie indirekte Markierungsreaktionen einordnen [96].

Wie bereits erwähnt, wird für elektrophile Substitutionsreaktionen typischerweise geträgertes (*carrier-added*, c.a.)  $^{18}\text{F}$ -Gas verwendet. Durch den Zusatz von  $^{19}\text{F}$  können mit dieser Methode nur geringe molare Aktivitäten erreicht werden, d. h. neben dem gewünschten Radiopharmakon liegt ein großer Anteil des Produkts als nichtradioaktives Analogon vor [89,96]. Die Abbildung des entsprechenden biologischen Prozesses kann dadurch teilweise blockiert werden und es sind größere Mengen des Radiopharmakons für ein ausreichendes PET-Signal nötig [38]. Ein weiteres Problem stellt die geringe Selektivität bei der Verwendung des hochreaktiven  $\text{F}_2$  dar. Aufgrund dessen wird das Gas in manchen Fällen vor der eigentlichen Markierungsreaktion in unreaktivere Verbindungen wie z. B. Xenondifluorid ( $^{18}\text{F}\text{XeF}_2$ ) oder Acetylhypofluorit ( $^{18}\text{F}\text{CH}_3\text{COOF}$ ) überführt [96]. Eine weitere Methode zur Erhöhung der Selektivität stellt die Verwendung organometallischer Präkursor dar. So lassen sich beispielsweise elektronenreiche Aromaten durch Destannylierung des entsprechenden Trimethylzinn-substituierten Vorläufers regioselektiv fluorieren. Ein prominentes Beispiel dieser elektrophilen  $^{18}\text{F}$ -Markierungsmethode ist die Synthese des klinisch etablierten Neurotracers 6- $^{18}\text{F}$ Fluor-L-DOPA (Abbildung 8) [38].



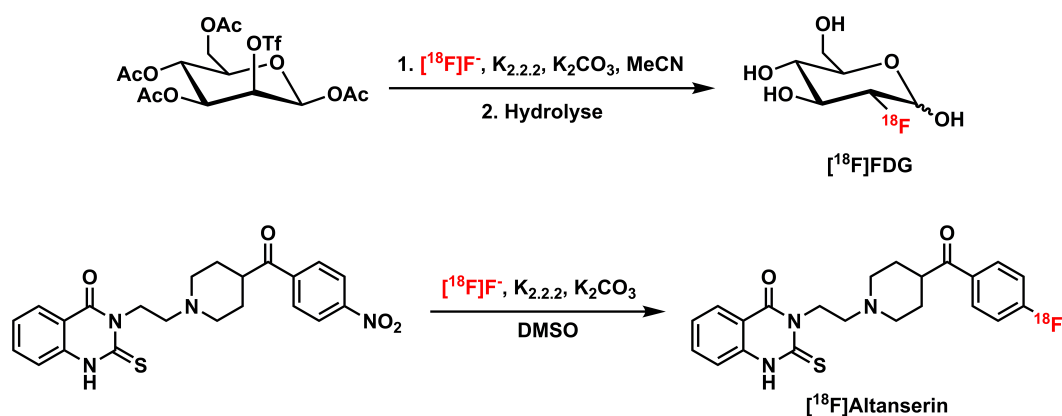
**Abbildung 8:** Radiosynthese von 6- $^{18}\text{F}$ Fluor-L-DOPA durch regioselektive Fluordestannylierung [38].

Nukleophile Substitutionsreaktionen unter Verwendung von n.c.a.  $^{18}\text{F}\text{F}^-$  zeichnen sich in der Regel durch eine höhere Selektivität aus und ermöglichen die Produktion der entsprechenden Radiotracer mit deutlich höheren maximalen molaren Aktivitäten. Daher stellen sie die häufigste Methode zur Einführung von  $^{18}\text{F}$  in organische Moleküle dar [38,96]. Fluorid ist ein starkes Nukleophil, wird in wässriger Lösung durch Hydratation jedoch inaktiviert. Zur möglichst vollständigen Entfernung des Wassers der Targetlösung wird das  $^{18}\text{F}\text{F}^-$  daher üblicherweise auf einem Anionenaustauschmaterial fixiert, mit Base und Acetonitril (MeCN) eluiert und azeotrop getrocknet [96]. Durch die Verwendung einer nicht-nukleophilen Base wie Kaliumcarbonat sowie dipolar-aprotischer Lösungsmittel wie MeCN, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Dimethylformamid (DMF) wird die Bildung von  $^{18}\text{F}\text{HF}$  verhindert und

die Markierungsreaktion beschleunigt [38,96]. Zudem finden generell Phasentransferkatalysatoren wie z. B. [2.2.2]Kryptand (4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosan, Kryptofix® 2.2.2) Anwendung. Der Aminopolyether komplexiert das K<sup>+</sup>-Gegenion und überführt es somit in eine deutlich größere, weichere Spezies, wodurch die Nukleophilie und auch die Löslichkeit des harten Fluoridions entsprechend Pearsons HSAB-Konzept deutlich erhöht wird [38,61,96]. Einen ähnlichen Effekt hat die Verwendung alternativer Basen wie beispielsweise Cäsiumcarbonat oder Tetraalkylammoniumsalze, welche bereits von Natur aus große, Pearson-weiche Kationen zur Verfügung stellen.

Nukleophile Substitutionen an aliphatischen Systemen folgen dem S<sub>N</sub>2-Mechanismus und führen daher zu einer Walden-Umkehr am Stereozentrum [96]. Häufige nukleofuge Abgangsgruppen sind: Trifluormethansulfonat (Triflat), *p*-Nitrobenzolsulfonat (Nosylat), Methansulfonat (Mesylat), *p*-Toluolsulfonat (Tosylat), Iodid, Bromid und Chlorid [38]. Als prominentestes Beispiel gilt hierbei die Synthese von [<sup>18</sup>F]Fluorodeoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG, Abbildung 9) [99]. Mit dem <sup>18</sup>F-markierten Strukturanalogon der D-Glucose lassen sich Körperregionen mit erhöhtem Glucosebedarf und -stoffwechsel, wie z. B. Gehirn oder Tumorgewebe visualisieren [100,101]. Es stellt den bislang meistverwendeten Radiotracer für die PET-Diagnostik dar und findet bei onkologischen, kardiologischen, neurologischen und einigen anderen medizinischen Fragestellungen Anwendung [33,41,102].

Für nukleophile aromatische Substitutionen (S<sub>N</sub>Ar) ist in der Regel eine Aktivierung des Aromaten durch elektronenziehende Substituenten wie Nitro-, Nitril-, Trifluormethyl- oder Carbonylgruppen in *ortho*- oder *para*-Position nötig [38]. Typische Nukleofuge sind dabei Nitro- und Trialkylammoniumgruppen. Ein Beispiel für nukleophile aromatische Radiofluorierung stellt die Synthese von [<sup>18</sup>F]Altanserin dar (Abbildung 9) [38].

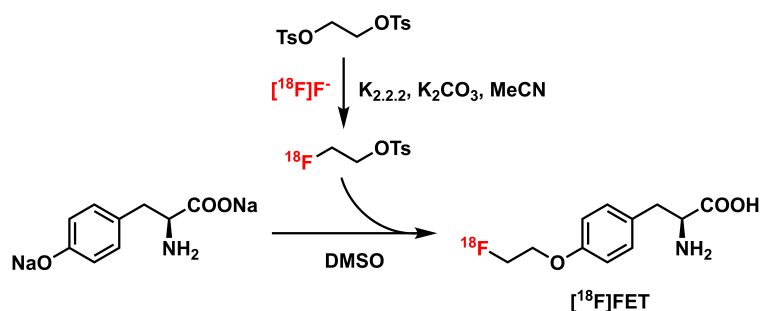


**Abbildung 9:** Synthese von [<sup>18</sup>F]FDG und [<sup>18</sup>F]Altanserin als Beispiele für nukleophile aliphatische und aromatische Radiofluorierung [38,99].

Die dritte Möglichkeit stellt die indirekte Fluorierung mit Hilfe von prosthetischen Gruppen oder Synthons dar. Sie ist vor allem dann eine Option, wenn das zu markierende Molekül aufgrund seiner Beschaffenheit bzw. Empfindlichkeit nicht für die harschen Bedingungen einer direkten Fluorierung geeignet ist [38,96]. Bei prosthetischen Gruppen handelt es sich um kleine organische Moleküle, die vergleichsweise leicht und mit möglichst hohen radiochemischen Ausbeuten und molaren Aktivitäten fluorierbar sind. Sie bieten zudem eine Funktionalität, welche die anschließende selektive Anbindung an die biologisch relevante Verbindung unter milden Reaktionsbedingungen ermöglicht. Die eigent-

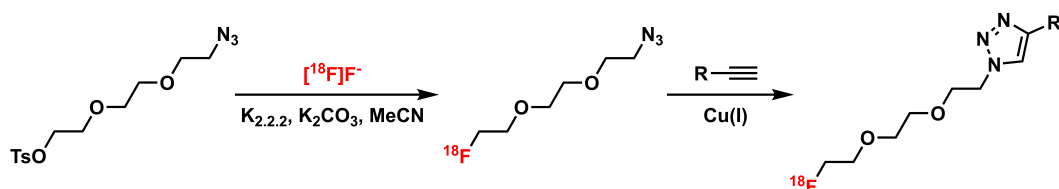


liche Radiomarkierung des Pharmakons erfolgt dabei beispielsweise mittels Alkylierung, Acylierung, Amidierung, Imidierung oder unter Verwendung sogenannter „Click“-Chemie [38]. Ein typischer Vertreter prosthetischer Gruppen ist das [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethyltosylat ([ $^{18}\text{F}$ ]FETos), welches durch nukleophile Fluorierung von 1,2-Bis(tosyloxy)ethan hergestellt wird und beispielsweise bei der Radiosynthese von *O*-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorethyl)-L-Tyrosin ([ $^{18}\text{F}$ ]FET) Anwendung findet (Abbildung 10) [103].



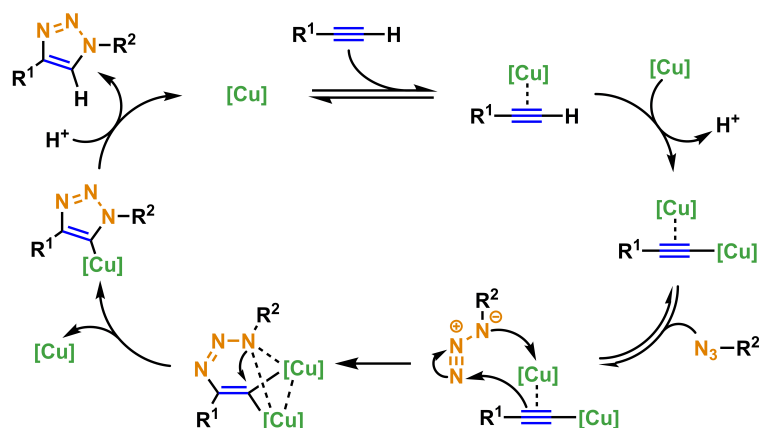
**Abbildung 10:** Radiosynthese von [ $^{18}\text{F}$ ]FET durch indirekte Markierung mit [ $^{18}\text{F}$ ]FETos [103].

Der Begriff Click-Chemie beschreibt eine Gruppe von Reaktionen, welche sich typischerweise durch eine äußerst hohe Selektivität und sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeiten selbst bei milden Bedingungen auszeichnen [38,104,105]. Eine bedeutende Variante stellt die Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) dar. Hierbei erfolgt die selektive Kopplung zwischen einer Alkin-tragenden und einer Azid-funktionalisierten Komponente unter Bildung eines 1,2,3-Triazols. In ihrer ursprünglichen, 1961 von Huisgen beschriebenen Form benötigt diese 1,3-dipolare Cycloaddition meist hohe Temperaturen und lange Reaktionszeiten [106,107]. Der katalytische Einfluss von Cu(I) führt jedoch schon bei Raumtemperatur nach kurzer Zeit zu einer hohen Reaktionseffizienz [108]. Der Katalysator kann dabei entweder direkt als Cu(I)-Salz zugegeben oder erst *in situ* durch Reduktion von Cu(II) erzeugt werden. Außerdem toleriert die CuAAC eine Vielzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen, Lösungsmittel und einen großen pH-Wert Bereich [107]. Die Verwendung einer Azid- oder Alkin-tragenden prosthetischen Gruppe ermöglicht daher die milde Markierung sensibler, entsprechend funktionalisierter Biomoleküle. Ein Beispiel für solche Verbindungen, welche sich zur indirekten Radiofluorierung mittels CuAAC eignen, ist 2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyltosylat (Ts-TEG-N<sub>3</sub>) bzw. sein  $^{18}\text{F}$ -markiertes Analogon 1-Azido-2-(2-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorethoxy)ethoxy)ethan ([ $^{18}\text{F}$ ]F-TEG-N<sub>3</sub>) (Abbildung 11) [93].



**Abbildung 11:** Indirekte Radiofluorierung mittels CuAAC unter Verwendung der prosthetischen Gruppe [ $^{18}\text{F}$ ]F-TEG-N<sub>3</sub> [93].

Nach dem von Worrel *et al.* für die CuAAC vorgeschlagenen Mechanismus wird zunächst *in situ* ein katalytisch aktiver Komplex gebildet, der aus einem  $\sigma$ -gebundenen Kupferacetylid und einem zusätzlichen,  $\pi$ -koordinierten Kupferatom besteht. Die anschließende Koordination des Azids führt zur Bildung eines sechsgliedrigen Metallazyklus, der wiederum durch Ringkontraktion und protonolytische Abspaltung des Katalysators in das Triazolyl-verbundene Produkt überführt wird (Abbildung 12) [109].



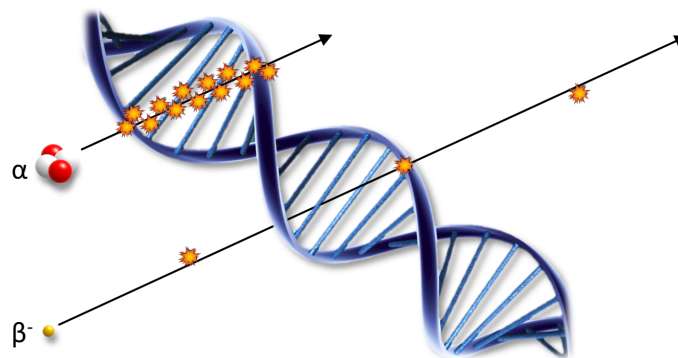
**Abbildung 12:** Vorgeschlagener Mechanismus der Kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) nach Worrel *et al.*, 2013 [109].

## 2.3 Radionuklidtherapie

Die Radionuklidtherapie (oder Endoradiotherapie) stellt eine nuklearmedizinische Methode zur Behandlung einer Vielzahl von hauptsächlich krebserkrankungen dar. Sie basiert auf dem zytotoxischen Effekt ionisierender Strahlung und bietet einige Vorteile im Vergleich zu konventioneller Chemo- und externer Strahlentherapie [5]. Ähnlich wie bei der zielgerichteten molekularen Bildgebung mittels PET oder SPECT finden hierbei meist Trägermoleküle bzw. Targetvektoren wie niedermolekulare Verbindungen, Peptide, Antikörper oder andere Proteine Anwendung, welche ein gebundenes Radionuklid im Organismus zum jeweiligen Zielbereich transportieren. Durch metabolisches „Trapping“ oder spezifische Adressierung von Rezeptoren, Antigenen und anderen Oberflächenstrukturen auf beispielsweise Tumorzellen, wird das Radiopharmakon dabei gezielt in dem zu behandelnden Gewebe angereichert [5]. Die systemische Anwendung konventioneller Chemotherapie ist aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung mit vielen starken Nebenwirkungen wie Immunsuppression, Organschädigungen, Herzrhythmusstörungen, Hand-Fuß-Syndrom usw. verbunden und stellt somit üblicherweise eine immense zusätzliche Belastung für den Patienten dar [5]. Im Gegensatz dazu bieten endoradiotherapeutische Anwendungen die Möglichkeit, Tumorzellen selektiv mit möglichst geringem Einfluss auf intakte Organe und gesundes Gewebe zu zerstören. Aufgrund dessen treten bei zielgerichteter Radionuklidtherapie deutlich weniger Nebenwirkungen auf und es sind viel geringere Mengen des Pharmakons nötig [5]. Das Ausmaß der Nebenwirkungen wird einerseits von den Zerfallseigenschaften des verwendeten Radionuklids und andererseits von der Spezifität, *in vivo*-Stabilität und Biotransformation des gesamten Radiopharmakons, bestehend aus Targetvektor, Radionuklid und gegebenenfalls Chelator, Linker, etc. beeinflusst [5,6].

Der therapeutische Effekt beruht dabei (mit Ausnahmen) ausschließlich auf der ionisierenden Emission des gebundenen Radionuklids und nicht auf einer pharmakologischen Wirkung des Targetvektors [5]. Während diagnostische Anwendungen auf der Detektion schwach wechselwirkender  $\gamma$ -Strahlung ausgehend von angeregten oder  $\beta^+$ -zerfallenden Kernen basieren, werden bei der Radionuklidtherapie hauptsächlich  $\beta^-$ - und  $\alpha$ -emittierende Radionuklide verwendet. Seltener nutzt man auch niedrigenergetische Auger-Elektronen, die infolge einer Umwandlung durch Elektroneneinfang oder Innere Konversion auftreten [5].

Die ausgesendeten geladenen Partikel ionisieren Wassermoleküle und verursachen auf subzellulärer Ebene durch Radiolyse kovalenter Bindungen die Bildung von Ionen und Radikalen. Sie lösen somit direkt oder indirekt Einzel- und Doppelstrangbrüche (SSB bzw. DSB) der DNA aus [5]. Diese und weitere mögliche Modifikationen wie Basenschäden, DNA-Protein Vernetzungen oder mehrfach beschädigte Stellen (MDS) führen über verschiedene Folge-mechanismen wie Apoptose, Nekrose oder Mitotische Katastrophe schließlich zum Zelltod [6,110]. Kleinere DNA-Schäden wie Einzelstrangbrüche können jedoch in gewissem Maße durch Reparaturmechanismen der Zelle kompensiert werden. Das Ausmaß der Schädigung sowie die Erfolgswahrscheinlichkeit solcher Reparaturen ist in erster Linie von der deponierten Energiedosis abhängig [5,6].



**Abbildung 13:** Schematische, nicht maßstabsgetreue Veranschaulichung der Ionisierungsdichte von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Partikeln und der daraus folgenden unterschiedlichen DNA-Schädigung. Erstellt in Anlehnung an Kassis, 2008 [6].

Die entscheidende Größe ist hierbei der lineare Energietransfer (LET) der emittierten Partikel. Sie beschreibt die Energiemenge, die ein ionisierendes Teilchen pro Längeneinheit des zurückgelegten Weges an das umliegende Material oder Gewebe abgibt und ist somit unmittelbar mit dessen durchschnittlicher Reichweite verbunden.  $\alpha$ -Partikel besitzen einen sehr hohen LET im Bereich von 80–100 keV/ $\mu$ m [6]. Die vergleichsweise großen und doppelt positiv geladenen He-Kerne geben ihre Energie von ca. 4–9 MeV demnach vollständig innerhalb einer sehr geringen Reichweite von 40–100  $\mu$ m, d. h. einigen wenigen Zelldurchmessern ab und verursachen dabei Doppelstrangbrüche und andere irreparable Schäden (Abbildung 13)[6,111]. Der LET schwach wechselwirkender  $\beta$ -Teilchen mit Energien von 50–2300 keV ist dagegen deutlich niedriger (ca. 0,2 keV/ $\mu$ m) [6]. Aufgrund geringerer, teilweise reparabler Schädigungen sind daher oftmals viele Zerfallsereignisse zur Zerstörung einer einzelnen Zelle notwendig [6]. Allerdings ermöglicht die hohe Reichweite der negativ geladenen Partikel von bis zu einem Zentimeter auch die Schädigung bzw. Zerstörung weiter entfernter Tumorzellen [6]. Dies bietet zudem den Vorteil, nicht jede Zelle mittels Radiopharmakon einzeln adressieren zu müssen und ermöglicht daher auch die großflächigere Bestrahlung von Tumoren mit geringer und

inhomogener Targetexpression (Crossfire-Effekt) [5,6]. Während die Anwendung von  $\alpha$ -emittierenden Radionukliden üblicherweise auf die Behandlung kleiner maligner Rückstände nach operativer Resektion, sowie Metastasen und hämatologischer Erkrankungen beschränkt ist, eignen sich insbesondere höherenergetische  $\beta$ -Partikel daher auch oder vor allem für die Therapie größerer, solider Tumore [5,7]. Andererseits bedingt dieser Effekt auch den Nachteil einer höheren Strahlenbelastung für das umliegende, gesunde Gewebe.

Ähnlich wie bei der nuklearmedizinischen Bildgebung (z. B. PET) ist die Auswahl eines geeigneten therapeutischen Radionuklids in erster Linie abhängig von dessen physikalischen Zerfallseigenschaften, Verfügbarkeit und Radiochemie sowie dem entsprechenden Anwendungsbereich [5,7,33]. Sowohl die Dimensionen und Heterogenität des zu behandelnden Gewebes als auch die Spezifität des verwendeten Targetvektors haben maßgeblichen Einfluss auf die Wahl des Nuklids hinsichtlich Art, Energie und Reichweite seiner emittierten Strahlung [5,7].

Wie bei der Auswahl diagnostischer Positronemitter für die PET (vgl. Kapitel 2.2), spielt auch die physikalische Halbwertszeit des Radionuklids für therapeutische Zwecke eine entscheidende Rolle. Dabei muss in erster Linie der zeitliche Rahmen für die Anreicherung und Retention des Radiopharmakons im Zielgewebe ermittelt und berücksichtigt werden [33,112]. Längere Halbwertszeiten verringern den frühzeitigen Zerfall und Verlust einer größeren Menge des Radiopharmakons, noch bevor dieses sein eigentliches Ziel erreicht hat und minimieren damit auch die unerwünschte Strahlenexposition für gesundes Gewebe [7,112]. Zudem gewährleisten langlebige und im Tumor verbleibende Radionuklide die effektive Bestrahlung über einen längeren Zeitraum, bieten bei gleicher Aktivität aber folglich eine geringere Dosisleistung als kurzlebige Vertreter [6,111]. Um die allgemeine Strahlenbelastung von Patient, Angehörigen, Umwelt und Klinikpersonal möglichst gering zu halten, sollte die Lebensdauer des verwendeten Nuklids einen gewissen Rahmen jedoch nicht überschreiten [112,113]. Die Halbwertszeiten typischer  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Strahler für die Radionuklidtherapie liegen im Bereich zwischen 7 h und 14 d (Tabelle 2). Ausnahmen bilden das kurzlebige  $^{213}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 45,6$  min) sowie das langlebige  $^{89}\text{Sr}$  ( $t_{1/2} = 50,6$  d) [51,52].

Ein weiterer großer Vorteil der zielgerichteten Endoradiotherapie gegenüber anderen Methoden besteht oftmals in der Möglichkeit, das verwendete Radiopharmakon entweder direkt oder durch Austausch des Radionuklids simultan für die Bildgebung zu nutzen. Dies ermöglicht beispielsweise eine vorläufige Beurteilung und dosimetrische Analyse sowie die Kontrolle und Begutachtung des therapeutischen Erfolgs während und nach der Behandlung [5]. Einige der verwendeten Radionuklide, wie z. B.  $^{131}\text{I}$ , bieten die zusätzliche Emission geeigneter  $\gamma$ -Strahlung als Folge sekundärer Übergänge angeregter Kernzustände und lassen sich somit mittels SPECT darstellen [113,114].  $^{64}\text{Cu}$  besitzt durch seine unterschiedlichen Zerfallsmodi die seltene Eigenschaft, sowohl für therapeutische Anwendungen ( $\beta^-$ ) als auch für die PET-Bildgebung ( $\beta^+$ ) zugänglich zu sein [115]. Bei anderen Nukliden bzw. Radiopharmaka lässt sich diese Eigenschaft durch Verwendung sogenannter theranostischer Paare mit unterschiedlichen Zerfallseigenschaften realisieren. Hierfür können sowohl Radioisotope (z. B.  $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ ) als auch Nuklide verschiedener, aber chemisch ähnlicher Elemente (z. B.  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ ) verwendet werden [33,113,116,117].

Tabelle 2 zeigt die physikalischen Zerfallseigenschaften und hauptsächlichen Produktionsrouten einiger häufig verwendeter,  $\beta^-$ - oder  $\alpha$ -emittierender Therapienuklide. Das in dieser Arbeit verwendete  $^{177}\text{Lu}$  wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

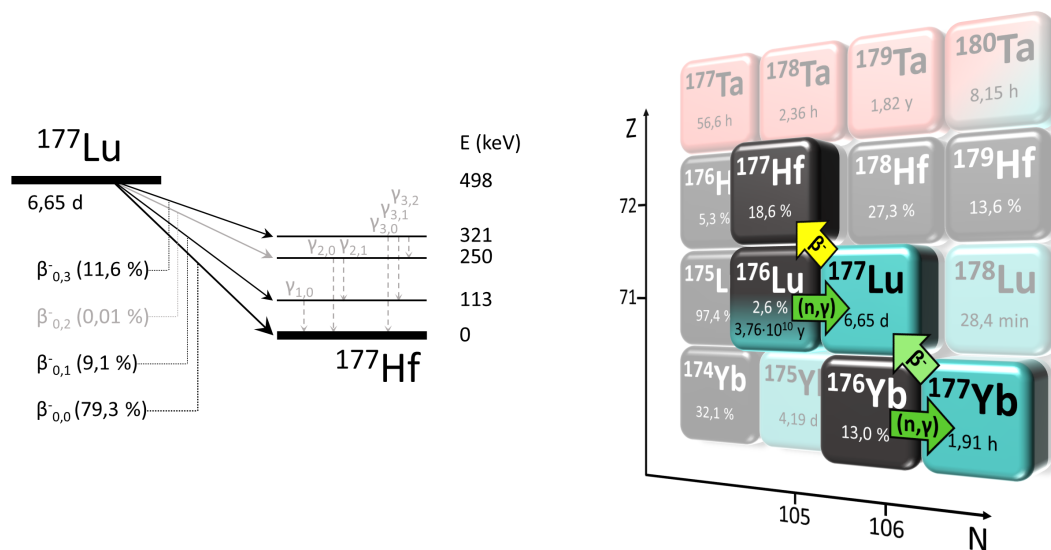
**Tabelle 2:** Physikalische Eigenschaften und hauptsächliche Produktionswege einiger typischer  $\beta^-$ - und  $\alpha$ -Emitter für die Radionuklidtherapie [49,51–53,57,112,118–126].  $E_{\max}$  und  $E_{\text{av}}$  beschreiben die maximalen und durchschnittlichen  $\beta^-$ - bzw.  $\alpha$ -Energien. Die Energiewerte der  $\alpha$ -Strahler wurden unter Berücksichtigung aller, in der jeweiligen Zerfallskette auftretenden  $\alpha$ -Emissionen anhand der Daten von Bé *et al.* 2008-2013 [52,57,121,122] angegeben bzw. gewichtet berechnet. Die relevanten Tochternuklide sind jeweils in grau unter dem Mutternuklid aufgeführt.

	Nuklid	$t_{1/2}$	$E_{\max}$ (keV)	$E_{\text{av}}$ (keV)	Umwandlung	Produktion
$\beta^-$	<sup>32</sup> P	14,3 d	1711	696	$\beta^-$ (100 %)	Reaktor: <sup>32</sup> S(n,p) <sup>32</sup> P <sup>31</sup> P(n, $\gamma$ ) <sup>32</sup> P
	<sup>64</sup> Cu	12,7 h	579	191	$\beta^-$ (38,5 %) $\beta^+$ (17,5 %) $\epsilon$ (44,0 %)	Zyklotron: <sup>64</sup> Ni(p,n) <sup>64</sup> Cu
	<sup>67</sup> Cu	61,9 h	577	141	$\beta^-$ (100 %)	Hochenergie- beschleuniger: <sup>68</sup> Zn(p,2p) <sup>67</sup> Cu
	<sup>89</sup> Sr	50,6 d	1495	585	$\beta^-$ (100 %)	Reaktor: <sup>88</sup> Sr(n, $\gamma$ ) <sup>89</sup> Sr <sup>89</sup> Y(n,p) <sup>89</sup> Sr
	<sup>90</sup> Y	64,0 h	2280	934	$\beta^-$ (100 %)	Generator: <sup>90</sup> Sr $\xrightarrow{\beta^-}$ <sup>90</sup> Y
	<sup>131</sup> I	8,02 d	807	182	$\beta^-$ (100 %)	Reaktor: <sup>130</sup> Te(n, $\gamma$ ) <sup>131</sup> Te $\xrightarrow{\beta^-}$ <sup>131</sup> I
	<sup>177</sup> Lu	6,65 d	498	134	$\beta^-$ (100 %)	Reaktor: <sup>176</sup> Lu(n, $\gamma$ ) <sup>177</sup> Lu <sup>176</sup> Yb(n, $\gamma$ ) <sup>177</sup> Yb $\xrightarrow{\beta^-}$ <sup>177</sup> Lu
	<sup>186</sup> Re	3,72 d	1070	$\beta^-$ (92,5 %) $\epsilon$ (7,5 %)	Reaktor: <sup>185</sup> Re(n, $\gamma$ ) <sup>186</sup> Re	
$\alpha$	<sup>211</sup> At <sup>211</sup> Po	7,22 h	7450	6785	$\alpha$ (41,8 %) $\epsilon$ (58,2 %)	Zyklotron: <sup>209</sup> Bi( $\alpha$ ,2n) <sup>211</sup> At
	<sup>213</sup> Bi <sup>213</sup> Po	45,6 min	8376	8323	$\alpha$ (2,1 %) $\beta^-$ (97,9 %)	Generator: <sup>225</sup> Ac $\xrightarrow{\alpha}$ <sup>221</sup> Fr $\xrightarrow{\alpha}$ <sup>217</sup> At $\xrightarrow{\alpha}$ <sup>213</sup> Bi
	<sup>223</sup> Ra <sup>219</sup> Rn, <sup>215</sup> Po, <sup>211</sup> Bi, <sup>211</sup> Po	11,4 d	7450	6605	$\alpha$ (100 %)	Generator: <sup>227</sup> Ac $\xrightarrow{\beta^-}$ <sup>227</sup> Th $\xrightarrow{\alpha}$ <sup>223</sup> Ra
	<sup>225</sup> Ac <sup>221</sup> Fr, <sup>217</sup> At, <sup>213</sup> Bi, <sup>213</sup> Po	10,0 d	8376	6871	$\alpha$ (100 %)	Generator: <sup>229</sup> Th $\xrightarrow{\alpha}$ <sup>225</sup> Ra $\xrightarrow{\beta^-}$ <sup>225</sup> Ac

### 2.3.1 Lutetium-177

Lutetium ist ein Seltenerdmetall aus der Gruppe der Lanthanoide (Ln) mit der Ordnungszahl 71 sowie der relativen Atommasse von 174,97 u [127]. Natürlich vorkommendes Lutetium besteht zu 97,4 % aus dem stabilen Isotop <sup>175</sup>Lu sowie zu 2,6 % aus schwach radioaktivem <sup>176</sup>Lu ( $\beta^-$ ,  $t_{1/2} = 3,76 \cdot 10^{10}$  a) [60]. Mit einer relativen Häufigkeit von 0,8 ppm gehört es zu den seltensten Elementen der kontinentalen Erdkruste und kommt in der Natur ausschließlich als geringe Beimischung in Mineralen anderer Seltenerdmetalle vor [127]. Wie für alle Elemente der Lanthanoidreihe charakteristisch, stellt +3 die stabilste und einzig auftretende Oxidationsstufe des Lutetiums dar [128]. Aufgrund der Lanthanoidenkontraktion besitzt das trivalente Lu<sup>3+</sup>-Kation mit 86,1 pm den kleinsten Ionenradius aller Elemente der Reihe [128]. Es ist daher als harte Lewis Säure einzuordnen, deren Akzeptorchemie durch vollständig leere s-, p-, und d-Valenzorbitale bestimmt wird. In Komplexverbindungen ist die mögliche Anzahl an Liganden aufgrund der vergleichsweise geringen Größe des Zentralatoms sterisch begrenzt. Bekannte Lutetium-Komplexe besitzen Koordinationszahlen im Bereich von 6–9 [128].

Lutetium-177 ist eines von 38 bekannten Radioisotopen des Lutetiums zwischen  $A = 150$  und  $A = 188$  [60]. Das Radionuklid hat aufgrund einiger vorteilhafter Eigenschaften in den vergangenen Jahren große wissenschaftliche und medizinische Bedeutung im Bereich endoradiotherapeutischer Anwendungen erlangt.  $^{177}\text{Lu}$  zerfällt mit einer Halbwertszeit von 6,65 d ausschließlich (100 %) über  $\beta^-$ -Umwandlung in das stabile  $^{177}\text{Hf}$  (Abbildung 14). Der Übergang erfolgt dabei zu 79,3 % direkt in den Grundzustand und zu 9,1 % und 11,6 % in den ersten bzw. dritten angeregten Zustand des Tochter-nuklids [118]. Aufgrund der sehr geringen  $\beta^-$ -Energien von  $E_{\beta^-,av} = 134 \text{ keV}$  bzw.  $E_{\beta^-,max} = 498 \text{ keV}$  besitzen die bei der Umwandlung emittierten Elektronen im Gewebe nur eine kurze Reichweite von durchschnittlich 0,2 mm und maximal 1,7 mm [118,129]. In Anbetracht eines nur schwach ausgeprägten Crossfire-Effekts eignet sich Lutetium-177 daher insbesondere zur Behandlung kleiner solider Tumore oder metastatischer Läsionen bei vergleichsweise geringer Toxizität für umliegendes Gewebe oder Ausscheidungsorgane [126,128]. Die lange Halbwertszeit von knapp einer Woche erlaubt den Transport des Radionuklids oder des  $^{177}\text{Lu}$ -markierten Radiopharmakons auch über weitere Strecken und bietet bei der Nuklidproduktion, Radiosynthese sowie Therapieplanung und -anwendung folglich eine gewisse zeitliche Flexibilität [126,128]. Wenn auch auf Kosten einer geringeren Dosisleistung, ermöglichen  $^{177}\text{Lu}$ -basierte Behandlungen zudem die effektive Bestrahlung über einen langen Zeitraum, vorausgesetzt das verwendete Radiopharmakon zeichnet sich durch eine entsprechend lange Verweilzeit im Zielgewebe aus [6].



**Abbildung 14:** Umwandlungsschema (links) sowie vereinfachter Ausschnitt aus der Nuklidkarte (rechts) mit Darstellung der Produktions- (grüne Pfeile) und Zerfallsroute (gelber Pfeil) von  $^{177}\text{Lu}$ . Erstellt auf Basis der Daten von Bé et al. 2004 [118] sowie der Internationalen Atomenergie-Organisation (IAEA) [60].

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl  $^{177}\text{Lu}$ -markierter Verbindungen in präklinischen Studien untersucht, von denen einige mittlerweile bereits Gegenstand klinischer Anwendungen sind. Als Trägermoleküle kommen dabei beispielsweise niedermolekulare Verbindungen, Peptide, Steroide oder Proteine zum Einsatz [128]. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATATE und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATOC stellen prominente Beispiele dar, welche das große Potential  $^{177}\text{Lu}$ -basierter Endoradiotherapie bereits eindrucksvoll unter Beweis stellen konnten [130–133]. Die Somatostatin Analoga werden erfolgreich bei der Behandlung neuroendokriner Tumore mittels Peptidrezeptor-vermittelter Radionuklidtherapie (PRRT) verwendet.

Ein weiteres, hochaktuelles Anwendungsbeispiel ist die Therapie von Prostatakarzinomen unter Verwendung  $^{177}\text{Lu}$ -markierter Inhibitoren, welche das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) adressieren [134–136].

Neben den häufig verwendeten Nukliden  $^{90}\text{Y}$  und  $^{131}\text{I}$  hat  $^{177}\text{Lu}$  besonders im Bereich der Radioimmuntherapie (RIT) unter Verwendung entsprechend radiomarkierter Immunproteine zunehmend Interesse erlangt. Aufgrund seiner Halbwertszeit eignet sich das Radiometall ideal für die Kombination mit intakten Antikörpern, die eine charakteristisch langsame Pharmakokinetik aufweisen. Bei der Verwendung von  $^{177}\text{Lu}$ -markierten Immunkonjugaten wird somit ein Großteil der therapeutischen Strahlung erst nach einer optimalen Anreicherung im zu behandelnden Zielgewebe, also nach typischerweise mehreren Tagen abgegeben [128]. Im Vergleich zur Anwendung kurzlebigerer Therapienuklide wie z. B.  $^{64/67}\text{Cu}$  oder  $^{90}\text{Y}$  führt dies zu einer geringeren Belastung gesunder Körperregionen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass kleine Tumore oder Metastasen für Antikörper deutlich zugänglicher sind als größere [137]. Aufgrund der niedrigenergetischen Emission und kurzen Partikelreichweite wird die Auswahl von Lutetium-177 für Antikörper-basierte Therapiemethoden dadurch zusätzlich begünstigt [128,137]. Ein vielversprechendes Beispiel stellt hierbei der  $^{177}\text{Lu}$ -markierte Antikörper J591 dar. Das Radioimmunkonjugat bindet spezifisch an PSMA und befindet sich bereits in klinischen Studien für die Behandlung von Prostatakrebs [138,139].

Mit geringer Häufigkeit treten bei der Umwandlung von Lutetium-177 neben der  $\beta^-$ -Emission zusätzlich niedrigenergetische  $\gamma$ -Quanten als Folge der Abregung angeregter Zustände des Tochternuklids  $^{177}\text{Hf}$  auf (vgl. Abbildung 14). Diese  $\gamma$ -Strahlung mit hauptsächlich  $E_{\gamma 1,0} = 113 \text{ keV}$  (6,2 %) und  $E_{\gamma 3,1} = 208 \text{ keV}$  (10,4 %) lässt sich mittels SPECT detektieren und macht  $^{177}\text{Lu}$  daher zu einem theranostischen Radionuklid [118,128,140].  $^{177}\text{Lu}$ -markierte Radiopharmaka bieten somit die Möglichkeit, vorab mit sehr viel geringeren, subtherapeutischen Aktivitäten präklinische oder klinische Bindungsstudien und dosimetrische Analysen sowie Patientenselektionen und individuelle Therapieplanungen durchzuführen [126,128]. Außerdem lassen sich Therapieverlauf und -erfolg während und nach der Behandlung visualisieren und verfolgen. Aufgrund der besseren Auflösung, Bildqualität und Quantifizierbarkeit der PET wird  $^{177}\text{Lu}$  hierfür alternativ auch häufig durch das Positron-emittierende  $^{68}\text{Ga}$  ersetzt [117,141]. Beide Elemente besitzen ähnliche chemische Eigenschaften und lassen sich ohne weitere Modifikation des Radiopharmakons und ohne signifikanten Einfluss auf dessen biologisches Verhalten gegeneinander austauschen bzw. analog verwenden.  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC und  $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE dienen beispielsweise der PET-Bildgebung bei Behandlungen mit deren  $^{177}\text{Lu}$ -markierten Äquivalenten [117].

Obwohl auch Zyklotron-basierte Kernreaktionen möglich sind, erfolgt die Produktion von Lutetium-177 aufgrund deutlich höherer Ausbeuten und geringerer Kosten in der Regel durch Neutroneneinfangreaktionen in Kernreaktoren [128]. Hierbei gibt es zwei unterschiedliche Routen, die jeweils Vor- und Nachteile im Vergleich zueinander besitzen (Abbildung 14). Bei der direkten Produktion wird  $^{177}\text{Lu}$  durch Neutronenaktivierung eines  $^{176}\text{Lu}$ -Targets über die Kernreaktion  $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$  erzeugt. Aufgrund des sehr hohen Einfangquerschnitts (2065 barn) von  $^{176}\text{Lu}$  für thermische Neutronen (ca. 0,025 eV) lassen sich mit dieser Methode hohe Ausbeuten und spezifische Aktivitäten im Bereich von 0,7–2,6 TBq/mg erzielen [126,128]. Die geringe natürliche Häufigkeit des Ausgangsnuklids führt allerdings zur Notwendigkeit von hochangereichertem Targetmaterial (> 80 %  $^{176}\text{Lu}$ ) [128]. Obwohl das Produkt nach einfacher radiochemischer Aufarbeitung als geträgertes Nuklidgemisch aus  $^{177}\text{Lu}$  und  $^{175/176}\text{Lu}$  vorliegt, sind die erhaltenen spezifischen Aktivitäten für viele Anwendungsbereiche ausreichend [126]. Des Weiteren werden in Abhängigkeit des Neutronenflusses und der Bestrahlungsdauer zusätzlich geringe Mengen des metastabilen  $^{177\text{m}}\text{Lu}$  erzeugt. Dieses langlebige Isomer ( $t_{1/2} = 160,5 \text{ d}$ )

stellt in vielen nuklearmedizinischen Einrichtungen eine zusätzliche Herausforderung hinsichtlich Strahlenschutz und Entsorgung des radioaktiven Abfalls dar [126,128].

Bei der indirekten Produktionsroute wird durch Neutronenaktivierung von  $^{176}\text{Yb}$  über die Reaktion  $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}$  zunächst das kurzlebige  $^{177}\text{Yb}$  erzeugt, welches anschließend mit einer Halbwertszeit von 1,91 h über  $\beta^-$ -Umwandlung (100 %) zu  $^{177}\text{Lu}$  zerfällt [128]. Anhand dieser Methode lässt sich das Radiometall trägerfrei (n.c.a.) in höchstmöglicher nuklidischer Reinheit und mit sehr hohen spezifischen Aktivitäten von mehr als 3,0 TBq/mg erhalten [126]. Außerdem kann die Kontamination mit langlebigem  $^{177\text{m}}\text{Lu}$  nahezu ausgeschlossen werden. Diese exzellenten Eigenschaften sind allerdings nur nach Überwindung einiger Hürden möglich. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit beider Lanthanoide stellt die Aufarbeitung des Targets bzw. Separation mikroskopischer Mengen des  $^{177}\text{Lu}$  von makroskopischem Yb-Targetmaterial eine große Herausforderung dar [126,128]. Die geringe natürliche Häufigkeit von  $^{176}\text{Yb}$  (13,0 %) bedingt auch bei dieser Produktionsroute zunächst eine isotopische Anreicherung des Targetmaterials auf bis zu 97 % [60,126,128]. Außerdem ist der Einfangquerschnitt für thermische Neutronen für die Reaktion  $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}$  mit 2,85 barn sehr gering [126,128]. Ausreichend hohe Produktionsausbeuten sind bei der indirekten Route daher verglichen zur direkten Methode mit höheren Kosten verbunden.

Typisch für Radiometalle erfolgt die Anbindung von  $^{177}\text{Lu}$  an das entsprechende Trägermolekül durch Verwendung polydentater Chelatoren. Zur Komplexierung des trivalenten Lanthanoids wurden in den vergangenen Jahren hierbei vor allem DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) und DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) verwendet [128,142]. Während Komplexe des offenkettigen DTPA oftmals eine gewisse Dissoziation und Freisetzung des entsprechenden Metalls unter physiologischen Bedingungen zeigen, bildet das makrozyklische DOTA mit vielen (Radio-) Metallen thermodynamisch sehr stabile und kinetisch inerte Verbindungen [128,142]. In Analogie zur Struktur anderer  $\text{Ln}^{3+}$ -DOTA-Komplexe, wird für freies  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA ebenfalls eine quadratisch antiprismatische  $\text{N}_4\text{O}_4$ -Koordination mit einem zusätzlichen  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül in überkappter Position vermutet (Abbildung 15) [128,143].

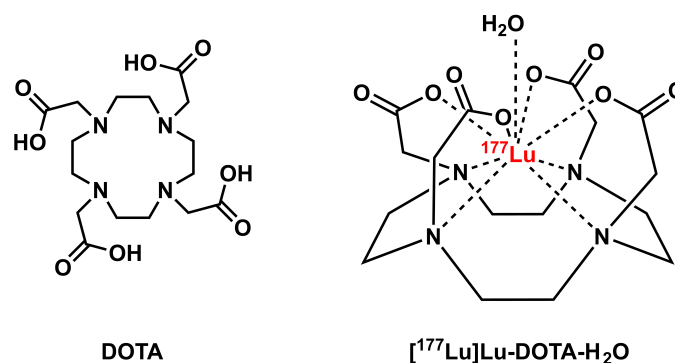


Abbildung 15: Strukturelle Darstellung von DOTA und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA- $\text{H}_2\text{O}$  [128,143].

Für ausreichend hohe Ausbeuten sind bei der Radiomarkierung von DOTA typischerweise harsche Bedingungen mit Temperaturen bis zu 95 °C oder sehr lange Reaktionszeiten notwendig [128,144]. Trotz einiger berichteter Anwendungen (z. B. Milenic *et al.* 2002, Hens *et al.* 2010, Thakral *et al.* 2014, Rasaneh *et al.* 2010 [145–148]), stellt es demnach ein eher ungeeignetes Mittel für die Markierung



temperatursensitiver Biomoleküle wie Antikörper mit  $^{177}\text{Lu}$  dar. Die Entwicklung und Anwendung alternativer Chelator-Konzepte für die stabile Komplexbildung dieses Radiometalls unter milden Bedingungen ist daher ein bedeutender Bestandteil der aktuellen Forschung.

## 2.4 Bifunktionelle Chelatoren

Für die Markierung eines Targetvektors mit diagnostisch oder therapeutisch relevanten Radiometallen finden in der Regel komplexbildende Liganden Anwendung. Da ein Großteil aller verwendeten Radionuklide metallischen Charakter hat, sind diese Komplexbildner von essentieller Bedeutung für die Nuklearmedizin sowie ständiger Begleiter aktueller Forschungen. Insbesondere haben sich dabei mehrzählige (polydentate) Liganden, sogenannte Chelatoren, welche mehrere oder sämtliche zur Komplexbildung benötigten Donorgruppen innerhalb eines einzigen Moleküls vereinen, etabliert [142,149]. Mittels koordinativer Bindungen schließen sie das meist kationische Radionuklid wie in einem Käfig möglichst stabil ein und verhindern beim Transport zum biologischen Ziel somit dessen Freisetzung und unkontrollierte Verteilung im lebenden Organismus. Als bindungsrelevante Donoren kommen dabei je nach Zentralatom in der Regel Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefel-haltige Gruppen zum Einsatz [142,149].

Entscheidende Faktoren bei der Auswahl eines geeigneten Chelators für ein bestimmtes Radiometall sind die Komplexbildungskinetik sowie die thermodynamische Stabilität und kinetische Inertheit der resultierenden Verbindung. Erstere beschreibt dabei die Bildungsrate des Radiometall-Chelator-Komplexes und ist somit ein Maß für die Markierungseffizienz. Sie wird in erster Linie von der Reaktionszeit und -temperatur beeinflusst [149]. Außerdem spielen das Reaktionsmedium bzw. dessen pH-Wert sowie die allgemeine Kompatibilität zwischen Zentralatom und Donorgruppen auf Basis des HSAB-Konzepts oftmals eine entscheidende Rolle. Besonders im Hinblick auf kurzlebige Radionuklide wie  $^{68}\text{Ga}$  oder  $^{223}\text{Bi}$  sowie temperatursensible Targetvektoren wie Antikörper sollte der Chelator im Idealfall eine möglichst vollständige radiochemische Umsetzung innerhalb kurzer Reaktionszeit und unter milden Bedingungen (Raumtemperatur) gewährleisten [144,149].

Die thermodynamische Stabilität eines Komplexes ist primär von der Stärke der Donor-Akzeptor-Wechselwirkung, also von der Lewis-Acidität des Metallions (M) und der Lewis-Basizität des Liganden (L) abhängig. Sie lässt sich in Form der Komplexbildungskonstante  $K_{ML}$  anhand des Massenwirkungsgesetzes wie folgt ausdrücken bzw. berechnen [142,149]:

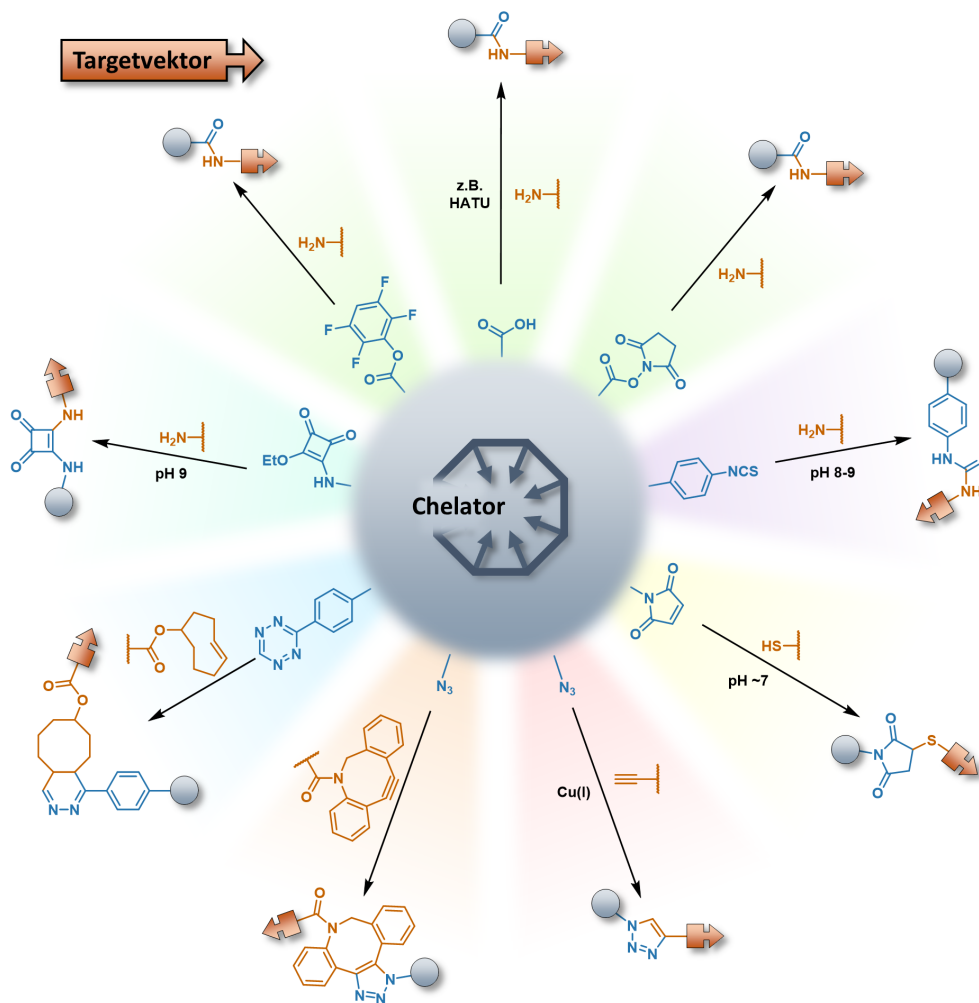


Die kinetische Inertheit eines Komplexes beschreibt seine Stabilität gegenüber Dissoziationsreaktionen wie Transchelatierung oder Transmetallierung. Die typischerweise sehr geringen Mengen eines verwendeten Radiopharmakons liegen im lebenden Organismus hochverdünnt vor und sehen sich mit einer Vielzahl konkurrierender körpereigener Komplexbildner wie z.B. Transferrin oder endogener Metallionen wie  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  konfrontiert [142,149,150]. Zur Einschätzung der tatsächlichen *in vivo*-Stabilität des Komplexes wird seinen kinetischen Eigenschaften daher eine deutlich größere Bedeutung zugesprochen als den thermodynamischen. Die kinetische Inertheit eines Komplexes kann maßgeblich durch die Struktur des verwendeten Chelators beeinflusst werden. So bieten

große, starrere und damit sterisch anspruchsvollere Systeme eine bessere Abschirmung des Zentralions und machen es somit unzugänglicher für Austauschreaktionen [151,152].

Zur Konjugation des Chelators an einen Targetvektor muss neben den für die Komplexierung relevanten Donorgruppen noch mindestens eine weitere funktionelle Gruppe zur Verfügung stehen. Diese sollte eine möglichst einfache und stabile kovalente Anbindung an eine bereits vorhandene oder zusätzlich eingeführte Funktionalität des biologisch aktiven Trägermoleküls gewährleisten. Moleküle, die diese Eigenschaft aufweisen, werden als bifunktionelle Chelatoren (BFC) bezeichnet [142,149]. Die Bifunktionalität kann dabei entweder durch Erweiterung des Chelatorgerüsts um zusätzliche Komponenten oder durch Verwendung bzw. Modifikation bereits vorhandener funktioneller Gruppen realisiert werden. Letzteres ist allerdings oftmals mit einer Verringerung der möglichen Koordinationszahl verbunden [142]. Beim bereits mehrfach erwähnten DOTATOC ist der DOTA Chelator beispielsweise über eine seiner vier ursprünglichen Carboxylgruppen an das zyklische Peptid Octreotid gebunden [40]. Im Gegensatz dazu bietet das Derivat DOTAGA eine zusätzliche Carbonsäureeinheit, die eine Kopplung unter Erhaltung der octadentaten Chelatorstruktur gewährleistet (vgl. Kapitel 2.4.2) [142,149].

Für die Konjugation an den Targetvektor werden häufig freie Carboxylgruppen oder deren entsprechend aktivierte Formen wie *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS) oder Tetrafluorophenylester (TFP) zur Ausbildung stabiler Amidbindungen verwendet (Abbildung 16) [142,149]. Ein Spezialfall der Amidkopplung stellt die Verwendung der Quadratsäure bzw. eines Quadratsäuremonoamids dar. Diese wird in Kapitel 2.4.4 näher erläutert. Eine weitere typische Methode besteht in der Bildung einer Thioharnstoffbindung ausgehend von Phenylisothiocyanatgruppen. Während diese Strategien allesamt zur Anbindung an freie Amine des Targetvektors dienen, können mittels Maleimiden auch Thiole zur Bildung von Thioethern adressiert werden [142,149].

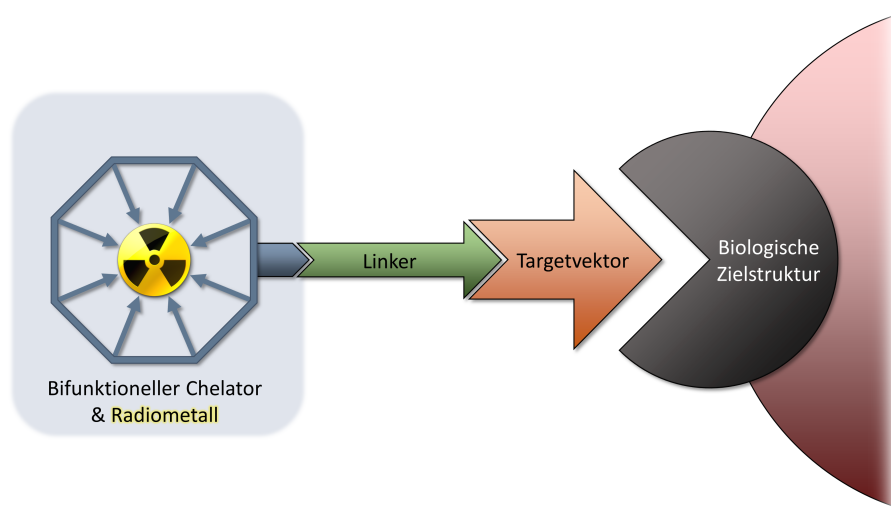


**Abbildung 16:** Darstellung häufig verwendeter Konjugationsmethoden zur Kopplung eines bifunktionellen Chelators an einen Targetvektor [142,149,153,154]. Einzig die dargestellte Quadratsäureamid-Kopplung stellt in der radiopharmazeutischen Chemie einen noch weitgehend unbedeutenden und innovativen Spezialfall dar (s. Kapitel 2.4.4).

Aufgrund ihrer typischerweise sehr hohen Schnelligkeit und Selektivität haben in den vergangenen Jahren in der Kopplungschemie außerdem verschiedene Cycloadditionsreaktionen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Als prominente Variante sogenannter Click-Reaktionen wurde in Kapitel 2.2.2.1 bereits die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Azid und einer Alkingruppe (CuAAC) vorgestellt. Eine ähnliche, aber kupferfreie Alternative stellt die spannungsvermittelte Bildung des 1,2,3-Triazols (*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC) unter Verwendung eines ringgespannten Alkins wie z. B. in Dibenzylcyclooctin (DBCO) dar [153,154]. Von besonderem Interesse in der aktuellen Forschung ist außerdem die Inverse-Elektronenbedarfs-Diels-Alder-Reaktion zwischen einem Tetrazin (Tz) und einem gespannten *trans*-Cycloocten (TCO) [153]. Diese [4+2]-Cycloaddition zur Bildung einer Dihydropyridazin-Verknüpfung verläuft hochselektiv, irreversibel und äußerst schnell ( $k > 6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [155]. Aufgrund dieser einzigartigen Eigenschaften wird sie auch in sogenannten „Pretargeting“- oder „*in vivo*-Click“-Ansätzen verwendet [156,157]. Hierbei erfolgt beispielsweise zunächst die Applikation eines TCO-modifizierten Antikörpers und die darauffolgende spezifische Anreicherung dessen im entsprechenden Zielgewebe. Nach einer bestimmten Zeit, in Abhängigkeit der Pharmakokinetik des Antikörpers, wird anschließend ein Tetrazin-haltiges, meist niedermolekulares Radiokonjugat verabreicht. Erst innerhalb des Organismus erfolgt dann die

selektive Verknüpfung zwischen diagnostisch oder therapeutisch relevantem Radionuklid und der biologisch aktiven Komponente. Überschüssige, ungebundene Aktivität wird dabei aufgrund einer deutlich schnelleren Pharmakokinetik entweder direkt oder nach Gabe eines „Clearing“-Mittels wieder ausgeschieden. Die Entkopplung von langer Zirkulationszeit des großen Biomoleküls und zytotoxischer Strahlung ermöglicht somit eine gezieltere Anwendung und deutlich geringere Belastung gesunder Körperregionen sowie die Anwendbarkeit kurzlebigerer Nuklide wie z. B.  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  oder  $^{44}\text{Sc}$  [156].

Ein Nachteil dieser Click-Reaktionen besteht darin, dass die clickfähige Komponente (Alkingruppe, TCO, DBCO) häufig erst noch eingeführt werden muss, während endständige Amin- oder Thiolgruppen oftmals bereits Bestandteil vieler Biomoleküle sind [158].



**Abbildung 17:** Allgemeiner schematischer Aufbau eines Radiometall-basierten Radiopharmakons. Erstellt in Anlehnung an Okoye *et al.*, 2019 [149].

Besonders bei Verwendung kleiner, niedermolekularer Targetvektoren kann die Einführung eines Chelators oder des entsprechenden Radiokomplexes großen Einfluss auf das biologische Verhalten des Radiopharmakons haben [142,149,159,160]. Beispielsweise ist sie oftmals mit signifikanten Veränderungen hinsichtlich Molekulargewichts, Gesamtladung, Polarität, Lipophilie, Löslichkeit usw. verbunden. Anstelle einer direkten Verknüpfung von BFC und Targetvektor werden optional daher oftmals sogenannte Linker oder Spacer verwendet (Abbildung 17) [149]. Neben der Länge des Bindungsabstandes lassen sich durch deren Variation sowohl die bereits genannten, als auch zusätzliche Eigenschaften wie z. B. die metabolische Stabilität des Gesamtsystems anpassen [161]. Als Beispiel ist die Einführung von Alkyl- oder Polyethylenglycol (PEG)-Ketten unterschiedlicher Länge zu nennen [162].

Grundsätzlich lassen sich Chelatoren in azyklische und makrozyklische Systeme einordnen. Während die Vertreter beider Kategorien oftmals ähnliche thermodynamische Stabilitäten aufweisen, zeichnen sich die Komplexe makrozyklischer Systeme typischerweise durch eine deutlich höhere kinetische Inertheit aus [142]. Durch das starrere Grundgerüst und die eingeschränkte Beweglichkeit besitzen die entsprechenden Metallbindungsstellen eine mehr oder weniger feste und präorganisierte Ausrichtung. Im Zuge der Komplexbildung erfahren makrozyklische Chelatoren daher eine vergleichsweise geringe geometrische Veränderung und folglich einen verringerten Entropieverlust [142]. Die

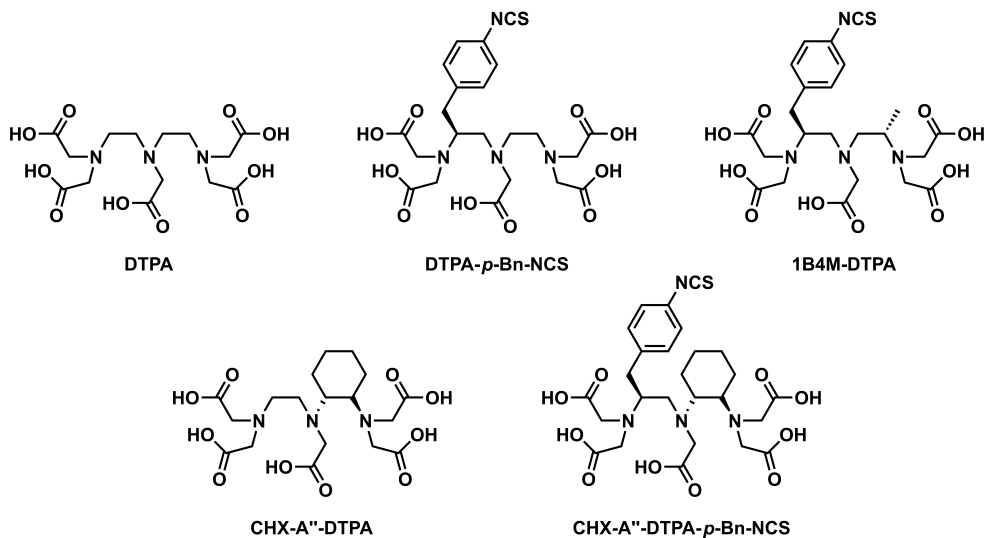
Inkorporation des Metallions ist dadurch zwar thermodynamisch begünstigt, benötigt aber in der Regel hohe Aktivierungsenergien bzw. Reaktionstemperaturen von bis zu 60–95 °C und/oder lange Reaktionszeiten (30–90 min) [142].

Azyklische, auch als offenkettig oder linear bezeichnete Chelatoren besitzen hingegen oftmals eine Vielzahl frei drehbarer Bindungen und somit eine gewisse strukturelle Flexibilität. Zur Koordination des Metallions in Lösung muss sich das Molekül mit seinen Donorgruppen daher zunächst entsprechend ausrichten. Dies ist meist nur unter drastischer Geometrieränderung und signifikantem Entropieverlust möglich [142]. Im Vergleich zu zyklischen Systemen ist die thermodynamische Antriebskraft für die Bildung des entsprechenden Metallkomplexes daher in der Regel geringer. Ein charakteristisches Merkmal und entscheidender Vorteil azyklischer Chelatoren ist jedoch ihre vergleichsweise geringe Energiebarriere, welche für die Komplexbildung überwunden werden muss. Viele offenkettige Systeme bieten somit bereits nach weniger als 15 min bei milden Bedingungen quantitative radiochemische Umsetzungen. Allerdings kann die geringe Aktivierungsenergie neben einer einfachen und schnellen Bindung des Metallions (*on-rate*) jedoch gleichzeitig auch dessen erneute Dekomplexierung (*off-rate*) begünstigen [142]. Komplexe auf Basis azyklischer Chelatoren sind daher *in vivo* typischerweise kinetisch labiler und zeigen oftmals eine gewisse Dissoziation bzw. Freisetzung des Radiometalls [142,149].

Mit DFO und DOTA wurden bereits zwei klassische Vertreter beider Kategorien vorgestellt. Im Folgenden werden diese und weitere Systeme näher erläutert.

#### 2.4.1 Azyklische Chelatoren

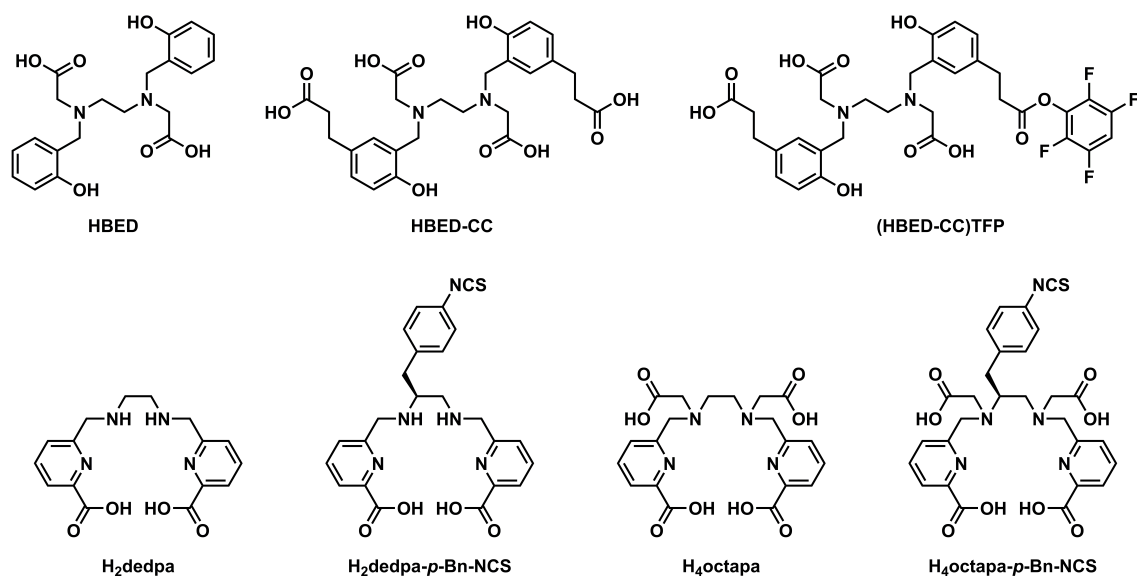
Der wohl bekannteste azyklische Chelator ist DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure, Abbildung 18). Das lineare octadentate Polyaminocarboxylat-System gehört zu den ältesten und häufigst verwendeten Komplexbildnern in der Radiochemie. DTPA bietet in Kombination mit einer Vielzahl von Radiometallen wie z. B.  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$  bereits innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur hohe radiochemische Ausbeuten [142,149,163]. Als Bestandteil der von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Radiopharmazeutika Octreoscan™ ( $^{111}\text{In}$ In-DTPA-octreotide) und ProstaScint® ( $^{111}\text{In}$ In-Capromab Pentetide) dient es beispielsweise als  $^{111}\text{In}$ -Chelator für die SPECT-Bildgebung von neuroendokrinen Tumoren und Prostatakrebs [164,165]. Die oftmals beobachtete *in vivo*-Instabilität DTPA-haltiger Radiokonjugate führte zur Entwicklung einiger modifizierter Varianten des Chelators [142,149]. Das Derivat 1B4M-DTPA enthält beispielsweise neben der Anbindungsmöglichkeit durch eine *p*-Isothiocyanatobenzyl-Einheit außerdem eine zusätzliche Methylgruppe, die zur Versteifung des Ethylen-Rückgrats dient [149,166]. Es wird erfolgreich als  $^{90}\text{Y}$ -Chelator im Radioimmunkonjugat Zevalin® ( $^{90}\text{Y}$ Y-Ibritumomab-Tuixetan) für die Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen verwendet [167,168]. Die Cyclohexylbrücke des CHX-A''-DTPA sorgt ebenfalls für ein starreres Rückgrat und demnach für eine erhöhte kinetische Stabilität entsprechender Radio Komplexe [169]. Verglichen mit DTPA bedingt sie erwartungsgemäß allerdings auch eine Verlangsamung der Markierungskinetik [142]. Nichtsdestotrotz zeigt das Derivat beispielsweise vielversprechende Eigenschaften in Kombination mit  $^{111}\text{In}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  und  $^{213}\text{Bi}$  [146,170–173]. In den vergangenen Jahren hat die Verwendung des einfachen DTPA deutlich an Bedeutung verloren, da es weitestgehend durch stabilere Derivate oder durch makrozyklische Chelatoren abgelöst wurde.



**Abbildung 18:** Struktur von DTPA sowie einiger mono- und bifunktioneller Derivate [142].

Weitere Vertreter azyklischer Chelatoren sind in Abbildung 19 dargestellt. Das phenolische HBED (*N,N'*-Bis(2-hydroxybenzyl)ethylendiamin-*N,N'*-diessigsäure) bzw. seine bifunktionellen Derivate HBED-CC und (HBED-CC)TFP werden bereits seit mehreren Jahrzehnten vor allem für die Komplexbildung von trivalentem  $^{67/68}\text{Ga}$  verwendet [174–176]. Während das Chelatorsystem lange Zeit nur von geringer klinischer Bedeutung war und zwischenzeitlich zunehmend von anderen Liganden verdrängt wurde, erlangte es in den letzten Jahren besonderes Interesse als komplexbildende Komponente in  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA-11 (HBED-CC) für die PET-Visualisierung von PSMA-exprimierenden Prostatakarzinomen [142,177].

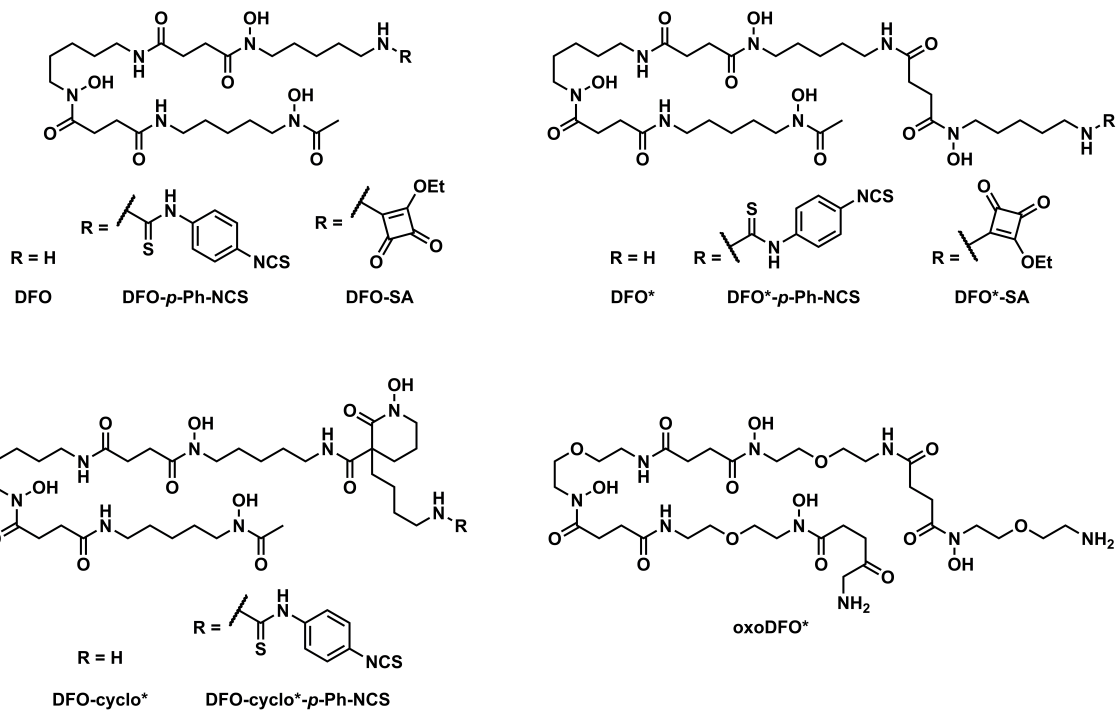
Die beiden Systeme  $\text{H}_2\text{dedpa}$  und  $\text{H}_4\text{octapa}$  gehören zu einer neuartigen und aussichtsreichen Familie azyklischer, Picolinsäure-basierter Chelatoren. Das hexadentate  $\text{H}_2\text{dedpa}$  konnte beispielsweise bereits in Kombination mit  $^{67/68}\text{Ga}$  nicht nur durch eine erwartungsgemäß schnelle Radiomarkierung bei milden Bedingungen, sondern auch durch exzellente Komplexstabilitäten sowie vielversprechende *in vivo*-Ergebnisse überzeugen [178,179]. Ähnlich gute Resultate konnten mit dem um zwei Carboxylgruppen erweiterten, octadentaten Analogon  $\text{H}_4\text{octapa}$  bei der Komplexbildung der Radiometalle  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  und  $^{177}\text{Lu}$  erzielt werden [180,181].



**Abbildung 19:** Strukturen der azyklischen Chelatorsysteme HBED, H<sub>2</sub>dedpa und H<sub>4</sub>octapa sowie entsprechender bifunktionaler Derivate [142].

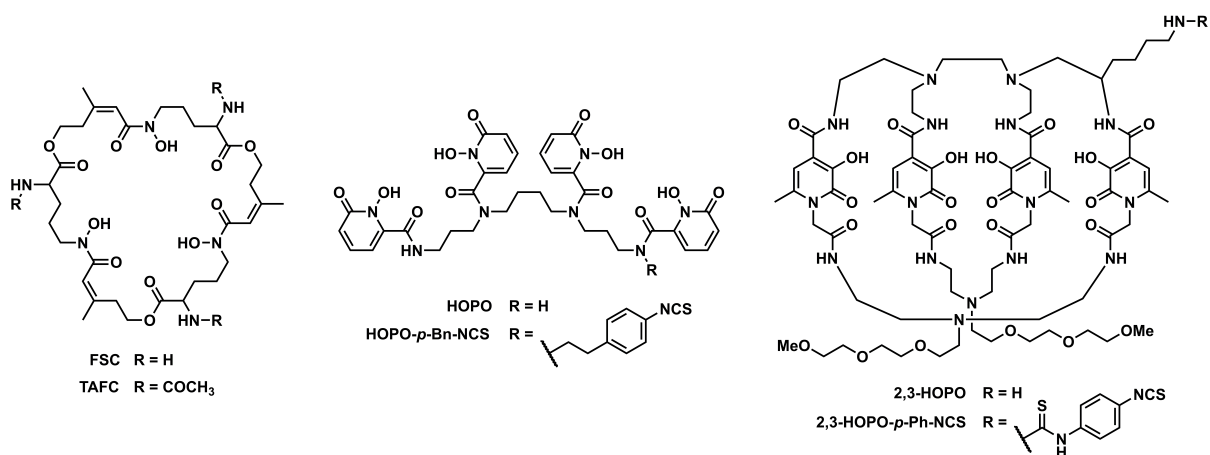
In Kapitel 2.2.2 wurde bereits das lineare DFO sowie seine große Bedeutung für <sup>89</sup>Zr-basierte Anwendungen vorgestellt. Abgesehen davon, wird das hexadentate Hydroxamatsystem gelegentlich auch für Radiomarkierungen mit <sup>68</sup>Ga verwendet [182,183]. Wie bereits erläutert, zeigen <sup>89</sup>Zr-markierte DFO-Konjugate insbesondere bei präklinischen Studien oftmals eine gewisse *in vivo*-Instabilität und Freisetzung des Radiometalls. Aufgrund dessen wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Ansätze zur Entwicklung neuer, verbesserter DFO-Derivate oder anderer Strukturen verfolgt. Ein prominentes und mittlerweile auch kommerziell erhältliches Beispiel stellt das um eine Hydroxamateinheit erweiterte DFO\* dar (Abbildung 20). Das octadentate Chelatorsystem wurde 2014 von Patra *et al.* vorgestellt und zeigte im Vergleich zur DFO-Leitstruktur eine deutlich verbesserte <sup>89</sup>Zr-Komplexstabilität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [184,185]. Das Antikörperkonjugat [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS-Trastuzumab bot neben einer geringeren Akkumulation der Aktivität im Knochen zudem eine leicht höhere spezifische Anreicherung im Tumor sowie verringerte unspezifische Bindung in Nicht-Zielgewebe [185].

2016 verwendeten Rudd *et al.* ein Quadratsäuremonoamid (DFO-SA) für die Konjugation von DFO an den Antikörper. Im Vergleich zum Thioharnstoff-gekoppelten Analogon konnte auch hier eine stabilere Komplexbildung von <sup>89</sup>Zr und eine verbesserte PET-Bildqualität in tumortragenden Mäusen beobachtet werden [186]. Es wurde vermutet, dass die höhere Komplexstabilität auf die Besetzung weiterer Koordinationsstellen des Zr(IV)-Kations durch die zusätzlichen Sauerstoffatome der Quadratsäureeinheit zurückzuführen ist. Holland konnte diese Koordinationsbeteiligung kürzlich zwar mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Berechnungen in der Theorie bestätigen, allerdings nur für eines der beiden zusätzlichen Sauerstoffe [187]. DFO-SA ist demnach offenbar in der Lage, sieben der acht bevorzugten Koordinationsstellen des tetravalenten Radiometalls zu belegen. Zusätzlich wurden kürzlich Studien mit einer Kombination beider Ansätze, d. h. mit Quadratsäureamid-gekoppelten, DFO\*-funktionalisierten Immunkonjugaten durchgeführt [188,189].



**Abbildung 20:** Strukturen der azyklischen  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatoren DFO, DFO\*, DFO-cyclo\* und oxoDFO\* sowie entsprechender bifunktionaler Derivate [185,186,189–192].

Weitere Beispiele für optimierte Varianten des DFO-Grundgerüsts sind die in Abbildung 20 dargestellten DFO-cyclo\* und oxoDFO\* [191–193]. Außerdem wurden zahlreiche andere lineare und makrozyklische Chelatoren als potentielle Kandidaten für eine stabilere Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}$  untersucht bzw. entwickelt. Hierzu gehören unter anderem die zyklischen Siderophore Fusarinin C (FSC) und Triactetylfusarinin C (TAFC) sowie Hydroxypyridinon-Systeme wie HOPO und „2,3-HOPO“ (Abbildung 21) [194–197].

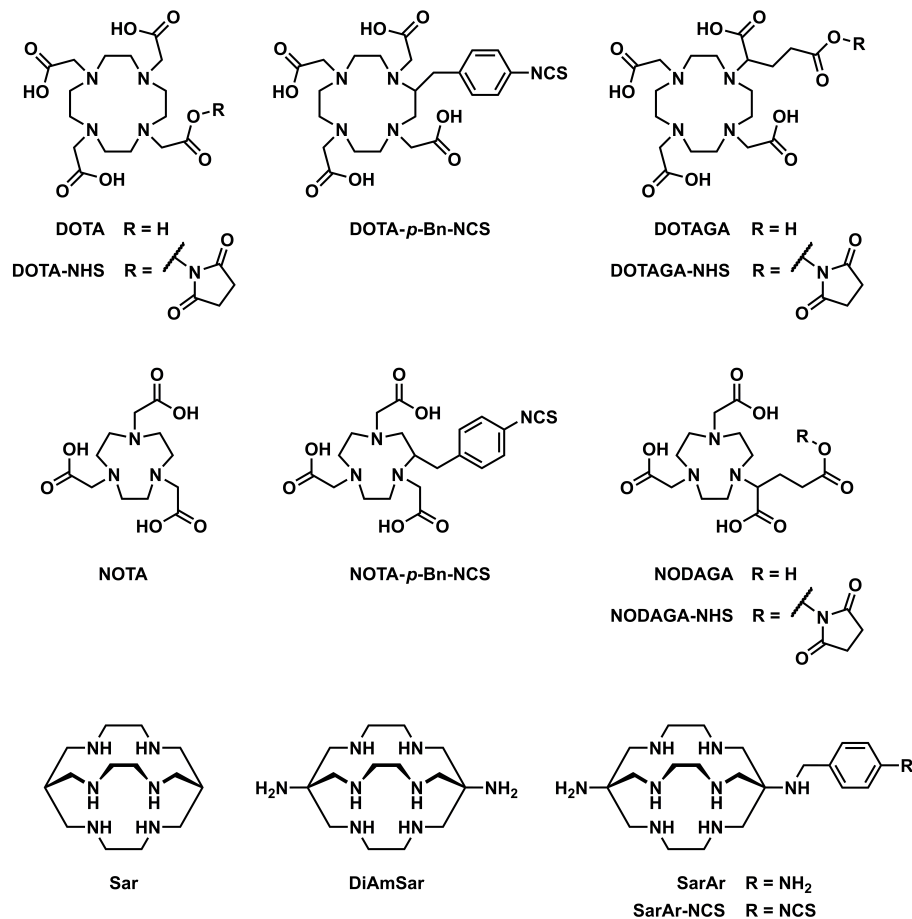


**Abbildung 21:** Strukturen der  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatoren FSC, TAFC, HOPO und „2,3-HOPO“ sowie entsprechender bifunktionaler Derivate [194–197].



## 2.4.2 Makrozyklische Chelatoren

Das bereits in Kapitel 2.3.1 vorgestellte DOTA gilt als Gold-Standard für die Komplexierung einer Vielzahl metallischer Radionuklide wie  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  und  $^{225}\text{Ac}$  [142]. Komplexe des makrozyklischen, Cyclen-basierten Polyaminocarboxylats zeichnen sich in der Regel durch ausgesprochen hohe thermodynamische und kinetische Stabilitäten aus [150,198]. Aufgrund dieser Eigenschaften und der kommerziellen Verfügbarkeit vieler unterschiedlicher Derivate besitzt DOTA daher die mit Abstand größte Bedeutung aller Chelatoren für die radiopharmazeutische Chemie [149]. Bei einigen bifunktionellen DOTA-Derivaten wie z. B. beim DOTA-NHS-ester wird eine der vier bereits vorhandenen Carboxylgruppen direkt zur weiteren Modifikation bzw. Biokonjugation verwendet (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu wurden zudem Systeme wie DOTA-*p*-Bn-NCS oder DOTAGA entwickelt, welche über eine zusätzliche Funktionalisierung am Kohlenstoffrückgrat verfügen und somit eine Anbindung an Targetvektoren unter Erhaltung der  $\text{N}_4\text{O}_4$ -Koordinationsgeometrie des DOTA-Grundgerüsts ermöglichen [142,149,198].



**Abbildung 22:** Struktur der makrozyklischen Chelatorsysteme DOTA, NOTA, Sar und DiAmSar sowie deren unterschiedlicher bifunktioneller Derivate [142,149].

Wie die Beispiele  $^{68}\text{Ga}$ [Ga]-DOTATOC/DOTATATE oder  $^{68}\text{Ga}$ [Ga]-PSMA-617 unter Beweis stellen, wird DOTA ebenfalls erfolgreich zur Komplexierung des PET-Nuklids  $^{68}\text{Ga}$  verwendet, obwohl diese Metall-Chelator-Kombination oftmals keine optimale Komplexstabilität aufweist [40,142,199,200]. Letzteres

lässt sich anhand der Größenverhältnisse zwischen Radiometall und Komplexbildner erklären. Die Koordinationsgeometrie des octa- oder heptadentaten DOTA ist demnach räumlich etwas zu groß, um das vergleichsweise kleine  $\text{Ga}^{3+}$  (Ionenradius: 62 pm bei der Koordinationszahl 6) stabil einzuschließen [163]. Die resultierende, verzerrte Komplexgeometrie weicht demnach von der bevorzugten ideal-oktaedrischen Ligandenanordnung um das Zentralion ab und ist oftmals auch nur durch hohe Reaktionstemperaturen darstellbar [142,201]. Im Gegensatz dazu geht das strukturell ähnliche aber kleinere NOTA (1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure) bereits bei Raumtemperatur eine besonders stabile Komplexverbindung mit  $^{68}\text{Ga}$  ein ( $\log K_{\text{Ga-NOTA}} = 31,0$ ;  $\log K_{\text{Ga-DOTA}} = 21,3$ ) [149,202]. Auch in Kombination mit  $\text{Cu}^{2+}$  bietet NOTA typischerweise exzellente Komplexierungseigenschaften und wird daher unter anderem zur  $^{64}\text{Cu}$ -Markierung von Antikörpern verwendet. Das Radioimmunkonjugat [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-NOTA-Trastuzumab lieferte beispielsweise bereits vielversprechende Ergebnisse in präklinischen und ersten klinischen Studien für die Immuno-PET-Bildgebung von HER2-exprimierenden Tumoren [203,204]. Aufgrund der geringeren Anzahl potentieller Donorgruppen erfolgt die Konjugation von NOTA an einen Targetvektor nur selten unter direkter Verwendung einer der ursprünglich vorhandenen Carboxylgruppen. Analog zu unterschiedlichen DOTA-Varianten, ist mittlerweile eine Vielzahl erweiterter, bifunktionaler NOTA-Derivate wie z. B. NODAGA-NHS oder NOTA-*p*-Bn-NCS kommerziell zugänglich (Abbildung 22) [142].

Trotz geringer Nachteile gegenüber NOTA wird DOTA oftmals dennoch für Radiomarkierungen mit  $^{68}\text{Ga}$  bevorzugt. Wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, dient  $^{68}\text{Ga}$  häufig als diagnostisches Gegenstück zu  $^{177}\text{Lu}$ . Im Gegensatz zu DOTA ist NOTA jedoch nicht in der Lage, das therapeutische Lanthanoid ausreichend stabil zu binden [205]. Im theranostischen Ansatz werden daher bevorzugt DOTA-funktionalisierte Radiopharmaka verwendet, da sie ohne Veränderung sowohl die Radionuklidtherapie mit  $^{177}\text{Lu}$  als auch die simultane,  $^{68}\text{Ga}$ -basierte PET-Visualisierung durch einfachen Austausch des Radiometalls ermöglichen [117]. Ein weiterer Grund liegt in der unterschiedlichen Gesamtladung der Komplexverbindungen und deren Einfluss auf das biologische Verhalten des Radiopharmakons. Die erhöhte Hydrophilie negativ geladener Ga-DOTA-Komplexe (bzw. Ga-DOTAGA-Konjugate) kann beispielsweise zu einem geringeren unspezifischen Leber-Uptake oder zu einer schnelleren Ausscheidung sorgen und somit bei manchen Anwendungen von Vorteil gegenüber neutralen Ga-NOTA-Verbindungen sein [199,206].

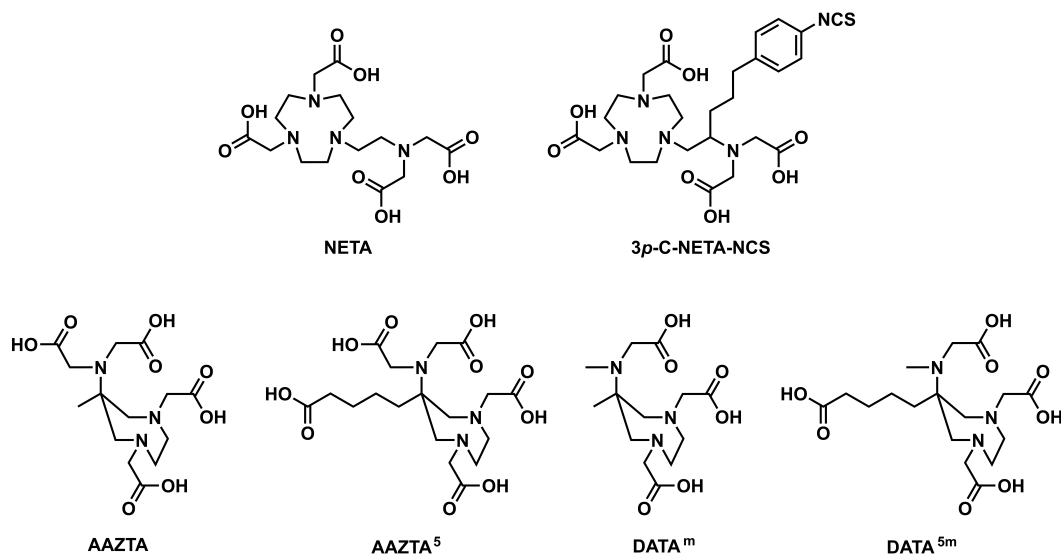
Eine weitere vielversprechende Gruppe makrozyklischer Systeme stellt die Familie der Sarcophagine (Sar)-basierten Chelatoren dar. Diese Stickstoff-reichen Bicyklen sind in Kombination mit  $^{64}\text{Cu}$  für ihre extrem schnellen Markierungskinetiken bei Raumtemperatur sowie exzellenten *in vivo*-Komplexstabilitäten bekannt. Neben dem Sar-Grundgerüst existieren mittlerweile viele verschiedene mono- und bifunktionelle Derivate wie z. B. die in Abbildung 22 dargestellten DiAmSar und SarAr bzw. SarAr-NCS [142,149].

### 2.4.3 Hybridchelatoren

Neben den genannten azyklischen und makrozyklischen Chelatorsystemen haben außerdem sogenannte Hybridchelatoren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese Systeme beinhalten typischerweise neben einem starren, zyklischen Rückgrat mindestens eine zusätzliche, flexiblere Komponente und kombinieren somit die strukturellen Besonderheiten sowie die vorteilhaften Eigenschaften beider Kategorien. NETA (4-(2-(Bis(carboxymethylamino)-ethyl)-7-carboxymethyl-[1,4,7]tri-

azonan-1-yl)essigsäure) basiert beispielsweise auf dem makrozyklischen Grundgerüst des NOTA-Chelators, besitzt allerdings nur zwei der drei ursprünglich am Ring gebundenen Essigsäuregruppen [149]. Zusätzlich enthält das System jedoch zwei weitere Carboxylgruppen, welche durch eine frei drehbare Aminoethyl-Einheit mit dem Zyklus verbunden sind (Abbildung 23). NETA bzw. entsprechende bifunktionelle Derivate wie das 3*p*-C-NETA-NCS zeigen exzellente Eigenschaften bei der Komplexierung von <sup>90</sup>Y und <sup>177</sup>Lu [207,208]. Gebunden an den Antikörper Trastuzumab bot 3*p*-C-NETA-NCS mit beiden Radiometallen bei Raumtemperatur bereits nach 1–5 min eine nahezu quantitative radiochemische Umsetzung und weder *in vitro* noch *in vivo* eine signifikante Dissoziation der gebildeten Radiokomplexe [209].

Ein weiterer Hybridchelator, der in letzter Zeit sehr vielversprechende Ergebnisse bei der Komplexierung der Übergangsmetalle <sup>44</sup>Sc und <sup>64</sup>Cu sowie des Lanthanoids <sup>177</sup>Lu lieferte, ist AAZTA (1,4-Bis(carboxymethyl)-6-(bis(carboxymethyl))amino-6-methylperhydro-1,4-diazepin; Abbildung 23) [210–214]. Das System besteht aus einem 1,4-Diazepan-Gerüst mit einem zusätzlichen exozyklischen Stickstoff in 6-Position und wurde 2004 von Aime *et al.* zunächst zur Komplexierung von Gd(III) als potentiell innovatives MRT-Kontrastmittel vorgestellt [215]. Mit insgesamt vier Stickstoff-gebundenen Carbonsäuregruppen ergibt sich für AAZTA eine heptadentate N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Koordinationsstruktur. Durch die Kombination makrozyklischer und offenkettiger Strukturelemente zeichnet sich der Chelator typischerweise durch eine schnelle Komplexierungskinetik unter milden Bedingungen, hohe Ausbeuten und vielversprechende Komplexstabilitäten aus. Das 2012 erstmals von Manzoni *et al.* eingeführte, bifunktionelle Derivat AAZTA<sup>5</sup> trägt zur Anbindung an einen Targetvektor anstelle der Methylgruppe einen zusätzlichen Pentansäure-Linker in 6-Position des Diazepan-Rings [216].



**Abbildung 23:** Struktur der Hybridchelatoren NETA, AAZTA und DATA<sup>m</sup> sowie deren bifunktioneller Derivate 3*p*-C-NETA-NCS, AAZTA<sup>5</sup> und DATA<sup>5m</sup> [142,214,215].

AAZTA wurde ebenfalls ausführlich hinsichtlich seiner Komplexierungseigenschaften mit <sup>68</sup>Ga untersucht. Die Metall-Chelator-Kombination zeigte zwar einerseits ebenfalls sehr schnelle Markierungskinetiken, andererseits jedoch auch eine pH-abhängige Bildung unterschiedlich stabiler Spezies [217]. Aufgrund der Anzahl verfügbarer Donorgruppen ist neben der bevorzugten N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>- auch eine N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-

Koordination des Radiometalls möglich. Bei sauren Bedingungen bedingt die elektrostatische und sterische Abstoßung außerdem eine Konformationsänderung des Diazepan-Rings, wobei der protonierte exozyklische Stickstoffsubstituent eine günstigere, pseudo-äquatoriale Position einnimmt. Die räumliche Separation der Donorgruppen erschwert bzw. verhindert folglich eine kooperative 6-fach-Koordination des  $\text{Ga}^{3+}$ -Ions und ermöglicht andererseits vermutlich die Bildung kinetisch „gefangener“ Strukturisomere [217]. Im Falle des bifunktionellen AAZTA<sup>5</sup> konnte eine signifikante Erhöhung der <sup>68</sup>Ga-Komplexstabilität zwischen freiem Radiokomplex und Octreotid-gebundenem Konjugat beobachtet werden [213]. Dieser Effekt zeigte sich auch in Kombination mit dem PSMA-Inhibitor L-Lysin-Urea-L-Glutamat (KuE) [211]. Die Konformationsänderung wird demnach möglicherweise durch den sterischen Anspruch der Targetvektoren verhindert und die stabilste Komplexgeometrie durch eine vordefinierte Ausrichtung ermöglicht bzw. erzwungen.

Mit dem Ziel einer verbesserten <sup>68</sup>Ga-Komplexierung wurden unterschiedliche, sterisch modifizierte Derivate auf Basis des 6-Amino-1,4-diazepan-Grundgerüsts untersucht [217–219]. Das hexadentate DATA<sup>m</sup> (1,4-Bis(carboxymethyl)-6-((carboxymethyl)methylamino)-6-methylperhydro-1,4-diazepine) und sein entsprechendes bifunktionelles Derivat DATA<sup>5m</sup> bieten schon bei Raumtemperatur und nach wenigen Minuten eine vollständige und sehr stabile Komplexierung des trivalenten Radiometalls [218,220]. In ersten klinischen Studien zeigte das Octreotid-Konjugat [<sup>68</sup>Ga]Ga-DATATOC außerdem bereits vielversprechende Ergebnisse bei der PET-Bildgebung neuroendokriner Tumore [221,222].

#### 2.4.4 Quadratsäure

Aufgrund einiger besonderer Eigenschaften stellt die Quadratsäure (3,4-Dihydroxycyclobut-3-en-1,2-dion, SA) eine interessante und vielseitige Struktureinheit dar, welche in vielen Bereichen der Chemie Anwendung findet. Das kleine zyklische Molekül verdankt seinen Trivialnamen einer planaren und nahezu perfekt quadratischen Anordnung [223,224]. Mit  $\text{p}K_{a1} = 0,5\text{--}1,2$  und  $\text{p}K_{a2} = 2,2\text{--}3,5$  besitzt die Quadratsäure eine ungewöhnlich hohe Säurestärke, was auf eine hohe Mesomeriestabilisierung der zweifach deprotonierten Spezies zurückzuführen ist (Abbildung 24) [223]. Mittels <sup>17</sup>O-NMR Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass alle vier Sauerstoffatome des  $\text{C}_4\text{O}_4^{2-}$ -Dianions chemisch vollkommen äquivalent sind [225]. Es besitzt aufgrund seiner Planarität und den zwei delokalisierten  $\pi$ -Ringelektronen im Sinne der Hückel-Regel ( $[4n + 2]$   $\pi$ -Elektronen mit  $n = 0$ ) aromatischen Charakter und ist daher besonders stabil [226].

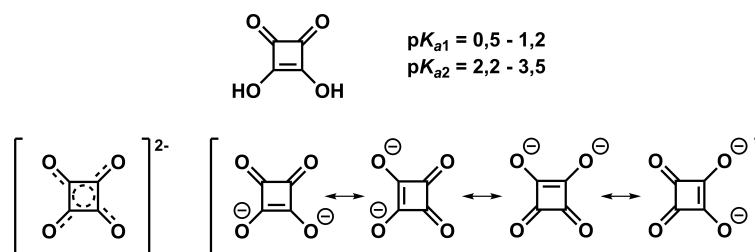
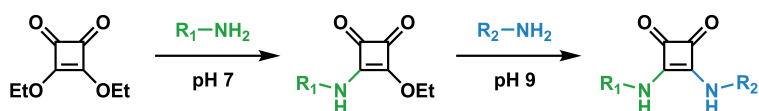


Abbildung 24: Struktur der Quadratsäure sowie des mesomeriestabilisierten Dianions [223,225].

Insbesondere die Diamide der Quadratsäure haben für viele unterschiedliche chemische und biochemische Anwendungen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Beispielsweise stellen sie wichtige Strukturelemente von Organokatalysatoren, selbstorganisierenden Supramolekülen, Anionen-Rezeptoren und -Transportern sowie Medikamenten dar [227]. Außerdem dienen sie als verknüpfende Komponente in zahlreichen Biokonjugaten [227,228]. Für die Herstellung dieser Konjugate finden in erster Linie Alkylester der Quadratsäure wie z. B. Quadratsäurediethylester Anwendung. Ihre Kopplungschemie bietet einige vorteilhafte Eigenschaften im Vergleich zu anderen Konjugationsstrategien. Beispielsweise reagiert der Ester hochselektiv mit primären und sekundären Aminen unter Bildung des entsprechenden Monoamids. Die Reaktion findet dabei sowohl in wässrigen Medien als auch organischen Lösungsmitteln bereits bei Raumtemperatur mit hohen Ausbeuten statt und toleriert die Anwesenheit einer Vielzahl anderer funktioneller Gruppen [223,228]. Aufwändige, orthogonale Schutzgruppenstrategien sind daher oftmals nicht notwendig. Dies stellt vor allem dann einen erheblichen Vorteil dar, wenn es sich bei mindestens einem der Kopplungspartner um ein sensitives Biomolekül handelt, welches die typischerweise harschen (z. B. stark sauren) Bedingungen anschließender Entschützungsreaktionen nicht unbeschadet überstehen würde.

Bei der Bildung des Monoamids im ersten Schritt erhöht sich sowohl die Elektronendichte im Cyclobuten-Ring als auch die Basizität der Carbonyl-Sauerstoffe. Das (protonierte) Molekül gewinnt folglich an zusätzlicher aromatischer Stabilität und ist bei neutralen Bedingungen (pH = 7) zunächst unzugänglich für einen weiteren nucleophilen Angriff (Abbildung 25) [229,230]. Aus diesem Grunde kommt es zu keiner direkten Bildung von Homodimeren, d. h. symmetrischen Quadratsäurediamiden [228]. Der entsprechende vinyloge Amidester kann daher typischerweise in hoher Ausbeute und Reinheit erhalten, isoliert und gelagert werden. Im Gegensatz zu häufig verwendeten und hydrolyseempfindlichen NHS-Aktivestern sind diese Substanzen üblicherweise auch in Lösung über mehrere Tage stabil [223]. Erst bei basischeren Bedingungen (ca. pH = 9 in wässrigem Medium bzw. Zusatz von z. B. Triethylamin in organischen Lösungsmitteln) kommt es in Gegenwart eines weiteren Amins zur Bildung des entsprechenden symmetrischen oder unsymmetrischen Quadratsäurediamids [228]. Quadratsäuredialkylester ermöglichen demnach die stufenweise, pH-abhängige Verknüpfung zweier gleicher oder unterschiedlicher, Amin-funktionalisierter Komponenten. Beispielsweise werden sie häufig zur Kopplung von Amino-Sacchariden oder Peptiden an Proteine verwendet [223].



**Abbildung 25:** Stufenweise, pH-abhängige Amidierung von Quadratsäurediethylester [228].

Trotz dieser einzigartigen und vorteilhaften Eigenschaften sind Quadratsäure-basierte Anwendungen in der radiopharmazeutischen Chemie bisher eher selten und daher von geringerer nuklearmedizinischer Bedeutung. Die Verwendung eines Quadratsäuredialkylesters als Kopplungsreagenz stellt jedoch eine vielversprechende und innovative Strategie für die einfache Anbindung eines bifunktionellen Chelators an einen Targetvektor dar. Je nach Anwendungsgebiet kann hierbei zuerst der Quadratsäuremonoamidester eines Amin-funktionalisierten Chelators hergestellt und als vielseitiger Synthesebaustein isoliert werden. Im nächsten Schritt ist anschließend dessen Kopplung an einen oder mehrere unterschiedliche Targetvektoren für deren Radiomarkierung möglich. Umgekehrt kann auch

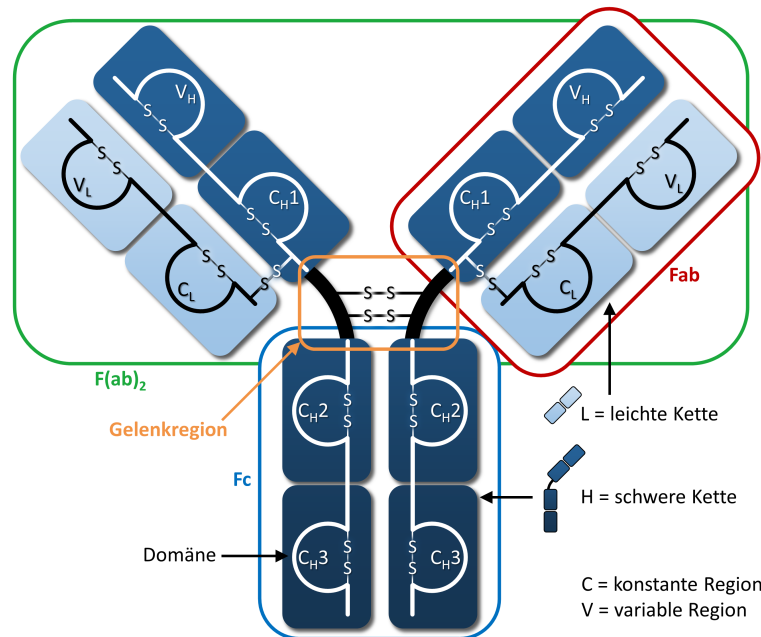
zuerst die Amidierung des Trägermoleküls und erst anschließend die Anbindung des unmodifizierten, bifunktionellen Chelators erfolgen. Diese Route ist besonders bei der Evaluierung mehrerer unterschiedlicher Komplexbildner in Kombination mit ein und demselben Biomolekül von Vorteil.

Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse aktueller Studien mit Quadratsäure-gekoppelten, niedermolekularen Chelator-Inhibitor-Konjugaten konnten das große Potential dieser Methode für die radiopharmazeutische Chemie bereits unter Beweis stellen [211,231,232]. Aufgrund der hohen Selektivität und schonenden Reaktionsbedingungen stellt sie außerdem besonders für die Modifizierung temperatur- und pH-empfindlicher Biomoleküle wie Antikörper eine äußerst vielversprechende Konjugationsstrategie dar.

## 2.5 Antikörper

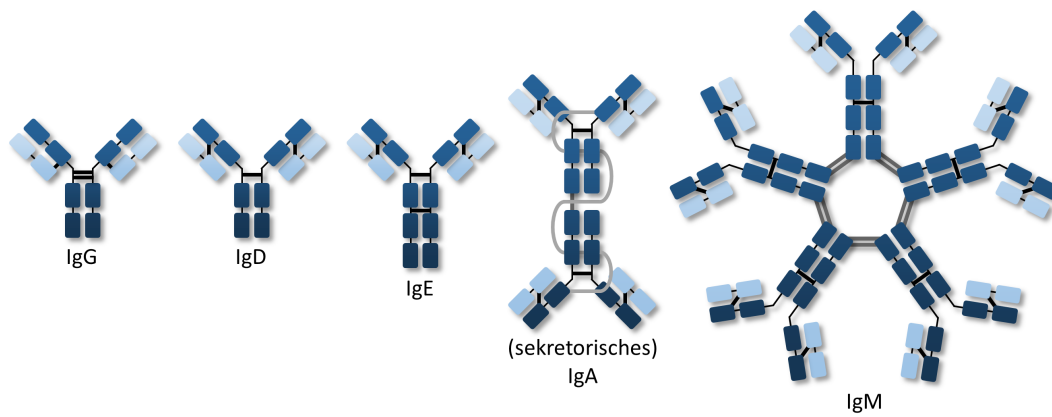
Antikörper, auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet, sind wichtige Proteine des Immunsystems von Menschen bzw. aller Wirbeltiere. Sie werden als Immunantwort auf bestimmte körperfremde Erreger bzw. auch geschädigte, körpereigene Substanzen gebildet und machen ca. 20 % aller Plasmaproteine aus [233]. Für die Produktion von Antikörpern sind Plasmazellen zuständig, welche sich wiederum aus B-Lymphozyten entwickeln. Die zusammenfassend als Immunreaktion bezeichneten Vorgänge werden durch sogenannte Antigene ausgelöst und lassen sich in zwei Phasen einordnen, die Induktionsphase und die Abwehrphase [233]. Antigene sind spezifische Strukturen, die sich entweder auf der Oberfläche eines Erregers bzw. eingedrungenen Fremdkörpers oder auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) nach Verarbeitungsmechanismen befinden. Sie bestehen in der Regel aus einem makromolekularen Trägermolekül (z. B. Protein) und sogenannten Epitopen, also frei zugänglichen kleineren Strukturelementen wie einfachen Kohlenhydraten oder kurzen Peptidsequenzen [233]. Als spezifische Reaktion auf ein Antigen werden in der Induktionsphase Antikörper sowie aktivierte T-Lymphozyten, zusammenfassend als Effektoren bezeichnet, gebildet. In der Abwehrphase binden diese Effektoren anschließend an das entsprechende Epitop und blockieren über verschiedene Folgemechanismen schließlich die toxische Wirkung des Antigens bzw. induzieren den Abbau durch weitere Bestandteile des Immunsystems [233].

Die Struktur von Antikörpern lässt sich allgemein durch ein Ypsilon-förmiges Ig-Grundmodell beschreiben (Abbildung 26). Es besteht aus zwei leichten (L, 25 kDa) und zwei schweren (H, 50–70 kDa) Ketten, die innerhalb eines Antikörpermoleküls jeweils identisch und durch kovalente Disulfidbrücken und nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind [233]. Innerhalb der Ketten lassen sich die Proteinabschnitte in sogenannte Domänen unterteilen. Eine Antikörperdomäne beschreibt eine repetitive (homologe) Sequenz, bestehend aus ca. 110 Aminosäuren, welche die Form einer Disulfid-verknüpften Schleife annimmt (Abbildung 26) [233]. Leichte Ketten bestehen jeweils aus einer variablen (V) und einer konstanten (C) Domäne, schwere Ketten aus einer variablen und 3–4 konstanten Domänen. Während sich konstante Regionen innerhalb einer Ig-Klasse nur geringfügig unterscheiden, zeichnen sich die variablen Domänen durch eine hohe Diversität zwischen Antikörpern unterschiedlicher Spezifität aus [233]. Die endständigen Domänen  $V_H$  und  $V_L$  sind für die spezifische Bindung am Antigen zuständig. Sie beinhalten sowohl Bereiche mit geringer als auch sehr hoher Variabilität. Letztere, hypervariable Aminosäuresequenzen weisen die zur Bindung erforderliche Strukturkomplementarität zum entsprechenden Epitop auf [233].



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung der Struktur von Antikörpern anhand des Ypsilon-förmigen Ig(G)-Grundmodells. Erstellt in Anlehnung an Kaufmann, 2014 [233].

Die erste (C<sub>H1</sub>) und zweite (C<sub>H2</sub>) konstante Domäne einer schweren Kette sind durch eine Peptidkette von ca. 15 Aminosäuren miteinander verbunden. Diese „Gelenkregion“ beinhaltet zudem 1–2 Disulfidbrücken, die beide schweren Ketten eines Antikörpermoleküls miteinander verbinden. Außerdem führt sie zu einer strukturellen Flexibilität des Proteins und stellt die hauptsächliche Angriffsstelle für eine enzymatische Spaltung dar [233]. Der Einfluss von Papain spaltet das Molekül in drei Fragmente. Zwei dieser Fragmente sind identisch und beide zur Bindung des Antigens befähigt. Sie werden daher als Fab (*fragment antigen binding*) bezeichnet und beinhalten jeweils die Domänen V<sub>H</sub>, C<sub>H1</sub>, V<sub>L</sub> und C<sub>L</sub> (Abbildung 26) [233]. Das dritte Fragment besteht aus den restlichen konstanten Domänen der schweren Ketten und kristallisiert aufgrund seiner Homogenität innerhalb einer Ig-Klasse leicht aus. Es wird daher als Fc (*fragment crystallizable*) bezeichnet und dient unter anderem als Bindungsstelle für weitere Eliminierungsmechanismen [233]. Nachdem eine Erregerzelle oberflächlich mit Antikörpern beladen wurde, können Phagozyten oder NK-Zellen diese beispielsweise mittels Fc-Rezeptoren erkennen und aufnehmen bzw. zerstören (Opsonisierung und antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, ADCC) [233]. Das Enzym Pepsin spaltet die Gelenkregion hingegen unterhalb der Disulfidbrücken. Das erhaltene F(ab)<sub>2</sub>-Fragment beinhaltet somit noch beide verbundenen Fab und daher die ursprüngliche Anzahl an Antigenbindungsstellen des vollständigen Antikörpermoleküls. Das Fc-Fragment zerbricht in diesem Fall in mehrere Teile [233].



**Abbildung 27:** Strukturelle Darstellung der fünf Antikörperklassen. Erstellt in Anlehnung an Kaufmann, 2014 [233].

Antikörper lassen sich allgemein in die fünf Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE unterteilen, welche sich in Struktur, Auftreten, Häufigkeit und Funktion unterscheiden [233]. Die schematischen Strukturen sowie einige Eigenschaften und Funktionen dieser Klassen sind in Abbildung 27 und Tabelle 3 dargestellt. B-Lymphozyten tragen hauptsächlich membranständige IgM-Monomere als Antigenrezeptoren. Beim Erstkontakt mit einem Antigen wird die B-Zelle geeigneter Spezifität stimuliert und durch klonale Expansion entstehen sowohl Plasma- als auch Gedächtniszellen [233]. Die Plasmazellen produzieren anschließend in erster Linie IgM-Pentamere als Primärantwort. Bei einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Antigen vermehren sich die Gedächtniszellen schlagartig und entwickeln sich ebenfalls zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Bei der Sekundärantwort stehen demnach schneller sehr viel mehr Immunglobuline zur Verfügung [233]. Aufgrund eines Ig-Klassenwechsels zwischen Primär- und Sekundärantwort wird letztere hauptsächlich durch die Produktion von IgG-Antikörpern gleicher Spezifität bestimmt. IgG stellt demnach die häufigste und biologisch bedeutendste Klasse dar [233].

**Tabelle 3:** Eigenschaften und Funktionen der fünf Antikörperklassen [233].

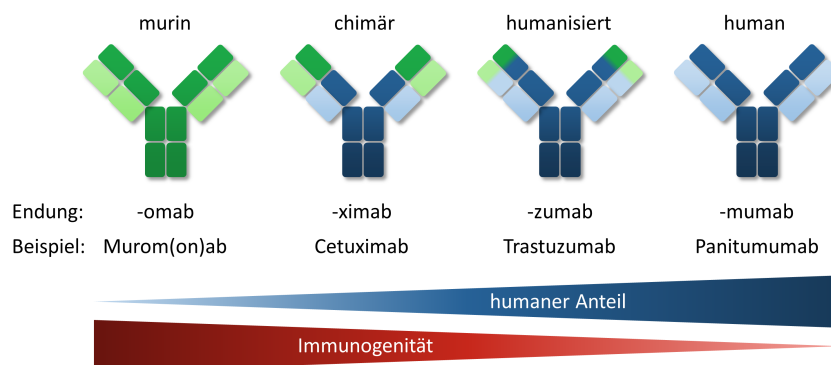
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
<b>M (kDa)</b>	150	150 (Serum-IgA) 380 (sekretorisch)	180 (Monomer) 970 (Pentamer)	180	190
<b>Serumkonz. (mg/100 mL)</b>	1300	350	150	3	0,03
<b>Anteil (%)</b>	75–85	7–15	5–10	0,3	0,003
<b>Funktion</b>	Sekundärantwort	lokale Abwehrbarriere	B-Zell-Rezeptor (Monomer) Primärantwort (Pentamer)	B-Zell-Rezeptor	Sofortallergie

Komplexe Antigene tragen oftmals eine Vielzahl verschiedener Epitope. Die ausgelöste Immunantwort beinhaltet daher viele Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität und Affinität, welche wiederum von unterschiedlichen Zellklonen produziert werden und damit von verschiedenen B-Lymphozyten abstammen. Man nennt dieses Antikörpergemisch daher polyklonal [233]. Für die Forschung und medizinische Anwendung sind jedoch insbesondere monoklonale Antikörper (mAb) von großer Bedeutung. Diese stammen von Zellklonen, welche alle auf eine einzige Ursprungszelle zurückzuführen sind. Sie sind daher untereinander vollkommen identisch, besitzen also alle die gleiche Struktur sowie Spezifität und Affinität zu einem bestimmten Epitop [233].



Plasmazellen stellen das Endstadium der Differenzierungsreihe einer B-Zelle dar. Sie sind daher vermehrungsunfähig und besitzen eine vergleichsweise geringe Lebensdauer [233,234]. 1975 gelang es G. Köhler und C. Milstein erstmals, antikörperproduzierende Plasmazellen mit geeigneten, sich unbegrenzt vermehrenden Tumorzellen (Myelomzellen) zu fusionieren [233,235]. Für die Entdeckung dieser Technik erhielten sie 1984 den Nobelpreis für Medizin [236,237]. Die so erzeugten Hybridomzellen sind in der Lage, nahezu unbegrenzt Zellklone zu liefern, welche wiederum identische, d. h. monoklonale Antikörper mit gleicher Spezifität hervorbringen. Mit Hilfe dieser Hybridom-Technik ist es heutzutage möglich, monoklonale Antikörper für viele verschiedene Anwendungen gezielt in großen Mengen und mit gewünschter Antigen-spezifität zu produzieren [233].

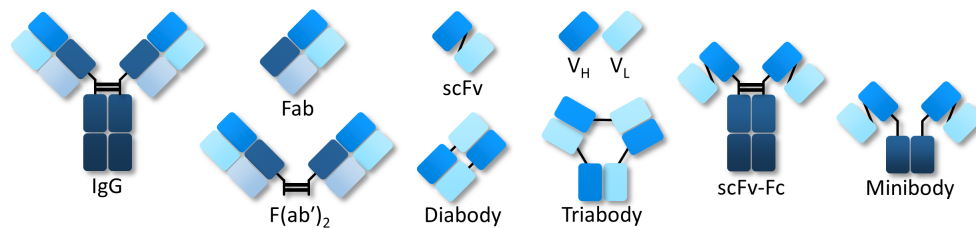
1985, d. h. nur ein Jahr nach der Auszeichnung für die Entdeckung der Hybridom-Technik, wurde mit Muromonab-CD3 der erste monoklonale Antikörper von der FDA für therapeutische Zwecke zugelassen [236]. Der CD3-spezifische mAb wird zur Immunsuppression bei Abstoßungsreaktionen in Folge einer Organtransplantation verwendet (vgl. Kapitel 2.5.1). Wie bei allen Hybridom-produzierten Antikörpern der ersten Generation, handelt es sich bei Muromonab-CD3 um ein murines (Maus-) Protein. Diese murinen Antikörper besitzen typischerweise eine hohe Immunogenität, d. h. sie bewirken im menschlichen Organismus selbst ebenfalls eine Immunantwort inklusive der Produktion von anti-Maus Antikörpern, was häufig mit starken Nebenwirkungen sowie schneller Neutralisierung des Wirkstoffes verbunden ist [9,238,239]. Aufgrund dieser Einschränkungen fanden trotz ihres hohen Potentials zunächst nur wenige weitere Antikörper den Weg in die tatsächliche klinische Anwendung.



**Abbildung 28:** Schematische Darstellung monoklonaler Antikörpervarianten geordnet nach steigendem humanen Proteinanteil und abnehmender Immunogenität gegenüber dem menschlichen Organismus. Erstellt in Anlehnung an Rosenblum *et al.*, 2011 [239] und Van Hoecke *et al.*, 2019 [9].

Erst durch die Entwicklung rekombinanter Produktionstechnologien in den frühen 90er Jahren gelang der entscheidende Durchbruch [9]. Die dadurch hervorgebrachten chimären Konstrukte enthalten konstante Domänen menschlichen Ursprungs und weisen daher eine geringere Immunogenität auf. Weitere molekularbiologische Fortschritte ermöglichten schließlich die sukzessive Reduktion muriner Proteinanteile zur Herstellung humanisierter bis hin zu vollständig humaner Antikörper (Abbildung 28) [9,239]. Als Ergebnis dieser Entwicklungen gehören Antikörper heutzutage zu den bedeutendsten und schnellst wachsenden Bereichen der Medizin und pharmazeutischen Industrie. Vor allem in der Onkologie spielen sie eine entscheidende Rolle. Erst kürzlich wurde von der FDA der 100. antikörperbasierte Wirkstoff zugelassen, ca. 870 weitere befinden sich bereits in klinischer Entwicklung [10]. Insbesondere sogenannte Checkpoint-Inhibitoren, welche beispielsweise PD-1 (*programmed cell*

*death protein 1*) oder dessen Ligand PD-L1 adressieren, haben eine immense Bedeutung für die Therapie von Krebserkrankungen erlangt [240]. Die Entwicklungen der letzten Jahre machten zudem verschiedene kleinere Antikörperfragmente, modifizierte Varianten und andere abgeleitete Konstrukte für Forschung und medizinische Anwendungen zugänglich. Diese können sich im Vergleich zu vollständigen, kanonischen Antikörpern beispielsweise durch eine schnellere Pharmakokinetik, geringere Immunogenität oder höhere Selektivität und Spezifität auszeichnen [241,242]. Einige Beispiele sind schematisch in Abbildung 29 dargestellt.



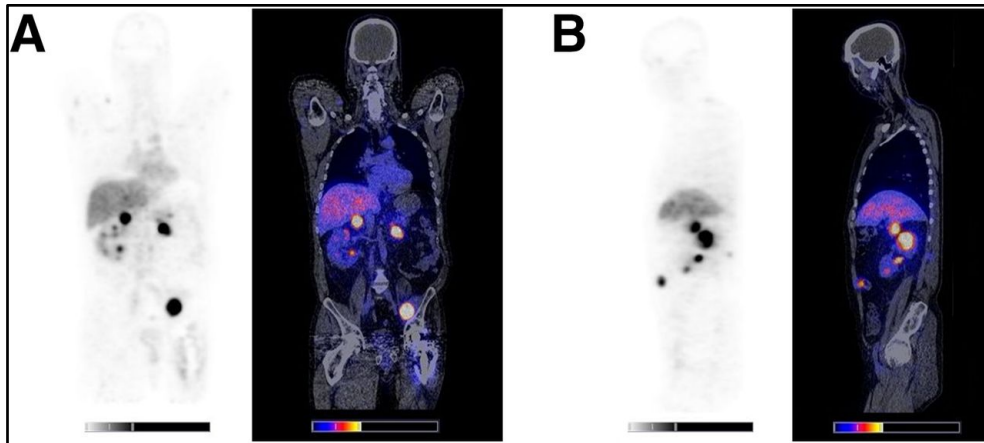
**Abbildung 29:** Schematische Darstellung einiger Antikörperfragmente und abgeleiteter Konstrukte. Erstellt in Anlehnung an Holliger *et al.*, 2005 [242] und Alibakhshi *et al.*, 2017 [241].

Abgesehen von ihren nativen therapeutischen Effekten wie z. B. Apoptoseinduktion, ADCC sowie Blockierung der Immunhemmung oder der Tumorzellproliferation, stellen monoklonale Antikörper vielversprechende Targetvektoren für den Transport von diagnostisch oder therapeutisch relevanten Radionukliden dar [8]. Aufgrund ihrer einzigartigen Spezifität lassen sich somit gezielt verschiedene tumorassoziierte Antigene oder andere pathologische Ziele adressieren. In Kombination mit einem Positron-emittierenden Nuklid bilden sie daher exzellente Mittel für die (Immuno-)PET Bildgebung bei einer Vielzahl unterschiedlicher Erkrankungen. Dabei können die erhaltenen Radioimmunkonjugate nicht nur zur Erstdiagnose, sondern auch zur Prognose, Darstellung und Kontrolle des therapeutischen Fortschritts oder zur *in vivo*-Evaluierung potentieller Immuntherapeutika verwendet werden [11,65,67]. Durch Markierung mit therapeutischen  $\beta^-$ - oder  $\alpha$ -Strahlern lassen sich hingegen hoch-effiziente und -spezifische Radiopharmaka für die Radioimmuntherapie, die Antikörper-basierte Form der zielgerichteten Endoradiotherapie erhalten [12].

Wie bereits erläutert, ist die Auswahl geeigneter Radionuklide aufgrund der typischerweise langsamen Pharmakokinetik vollständiger Antikörper limitiert. In den Kapiteln 2.2.1 und 2.3.1 wurden mit  $^{89}\text{Zr}$  und  $^{177}\text{Lu}$  bereits zwei typische Vertreter mit exzellenten Eigenschaften entweder für die Immuno-PET-Diagnostik oder die therapeutische Anwendung ausführlich vorgestellt.

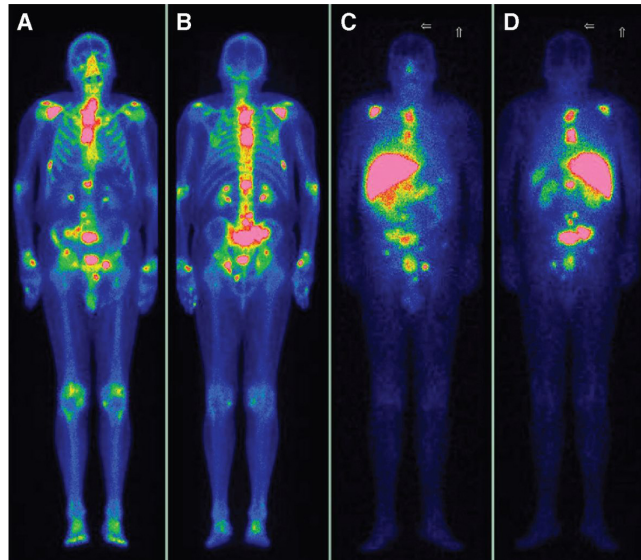
Obwohl der Einsatz radiomarkierter Immunkonjugate für die Diagnose und Behandlung von Krebs und anderen Krankheiten eine vielversprechende Strategie darstellt, ist die Anzahl bisher klinisch zugelassener Wirkstoffe begrenzt. Beispiele sind die  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - oder  $^{111}\text{In}$ -markierten Antikörper Scintimun<sup>®</sup>, LeukoScan<sup>®</sup>, OncoScint<sup>®</sup>, Verluma<sup>®</sup>, CEA-Scan<sup>®</sup> und ProstaScint<sup>®</sup> für die SPECT-Bildgebung sowie die  $^{90}\text{Y}$ - oder  $^{131}\text{I}$ -markierten Konjugate Zevalin<sup>®</sup> und Bexxar<sup>®</sup> für die RIT [243–245]. 2018 wurde zudem das  $^{177}\text{Lu}$ -markierte Konjugat Betalutin<sup>®</sup> ( $^{177}\text{Lu}$ -Lilotomab Satetraxetan) in das beschleunigte Zulassungsverfahren „Fast-Track“ der FDA für die Behandlung von refraktären oder rezidivierten Non-Hodgkin-Lymphomen aufgenommen [246]. Abgesehen davon befindet sich eine Vielzahl vielversprechender Radioimmunkonjugate in aktuellen klinischen Studien. Ein großer Teil dieser Studien basiert auf  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörpern für die Immuno-PET unterschiedlicher Tumorerkrankungen [247].

Prominente Beispiele sind [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-Trastuzumab und [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-Bevacizumab zur Bildgebung bei HER2- oder VEGF-A-exprimierenden Tumoren sowie das PSMA-spezifische [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-J591 [248–250]. Abbildung 30 zeigt beispielhafte PET-Aufnahmen eines Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom (mRCC) unter Verwendung von [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-Bevacizumab.



**Abbildung 30:** Coronale (A) und sagittale (B), zweidimensionale PET- sowie kombinierte PET/CT-Aufnahmen eines mRCC-Patienten vier Tage nach Injektion von [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO-Bevacizumab (37 MBq, 5 mg). Je dunkler das Signal bei der PET-Aufnahme (jeweils links), desto höher die Anreicherung des Radiopharmakons. Neben einem wiedergekehrten Primärtumor in der linken Niere sind außerdem Metastasen in der rechten Niere und Nebenniere, oberhalb des linken Beckenknochens sowie in der Bauchdecke deutlich erkennbar. Ursprünglich von van Es *et al.*, 2017 [250] in *JNM* publiziert und mit Genehmigung der *Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* verwendet, © 2017 SNMMI.

Neben diesen diagnostischen Vertretern werden ebenfalls einige radioimmuntherapeutische Ansätze hinsichtlich ihrer klinischen Anwendbarkeit untersucht. Als bedeutendes Beispiel ist hierbei das bereits in Kapitel 2.3.1 vorgestellte [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-J591 zur Behandlung von Prostatakrebs zu nennen. Andere klinische Studien beinhalten außerdem  $^{225}\text{Ac}$ - oder  $^{227}\text{Th}$ -markierte,  $\alpha$ -emittierende Konjugate und weitere  $^{177}\text{Lu}$ - sowie  $^{90}\text{Y}$ -,  $^{131}\text{I}$ - oder  $^{212}\text{Pb}$ -markierte,  $\beta$ -emittierende Kandidaten [12,251]. Abbildung 31 zeigt die spezifische Anreicherung von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-J591 in einem Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakrebs (mCRPC) durch Messung mittels Gammakamera im Vergleich zu vorausgegangener  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Skelettszintigraphie.



**Abbildung 31:** Planare, frontale (C) sowie rückseitige (D) Gamma-Ganzkörperaufnahmen eines Patienten mit mCRPC sieben Tage nach Injektion von  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-J591}$  (0,44–0,56 GBq/mg). Die Bilder zeigen eine hohe spezifische Bindung an zuvor mittels  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Skelettszintigraphie (A und B) identifizierte Knochenmetastasen. Die unspezifische Anreicherung in der Leber spiegelt den hepatischen Ausscheidungsweg des Antikörperkonjugats wider. Ursprünglich von Tagawa *et al.*, 2013 [138] in *Clin Cancer Res* publiziert und mit Genehmigung der *American Association for Cancer Research* verwendet, © 2013 AACR.

### 2.5.1 Muromonab-CD3

Bei allogenen Organtransplantationen, bei denen das Transplantat also von einem genetisch nicht identischen Spender stammt, kommt es in der Regel zu einer akuten Abstoßungsreaktion des Empfängerorganismus. T-Lymphozyten des Empfängers erkennen hierbei Antigene des fremden Gewebes auf der Oberfläche von APCs und werden durch deren Bindung aktiviert [236]. Durch anschließende Proliferation, Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen, Expression von Kostimulatoren und Freisetzung von Zytokinen kommt es schließlich zur Immunantwort gegen das transplantierte Organ [252]. Für die Erkennung und Bindung körperfremder Antigenstrukturen sowie für die Signalübertragung an die T-Zelle ist der sogenannte T-Zell-Rezeptor-Komplex zuständig. Dieser besteht einerseits aus dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und andererseits aus eng assoziierten Polypeptidketten, welche als „Cluster of Differentiation 3“ (CD3-Rezeptor) bezeichnet werden [236].

Das bereits erwähnte Muromonab-CD3 (Handelsname Orthoclone OKT3<sup>®</sup>, auch als „anti-human CD3 mAb“ bezeichnet) ist ein kommerziell erhältlicher monoklonaler Antikörper murinen Ursprungs, welcher spezifisch an den T-Zell-Rezeptor-Komplex, bzw. genauer gesagt an eine  $\epsilon$ -Untereinheit des CD3-Rezeptors bindet [236]. Diese Interaktion sorgt zunächst für eine kurzfristige Aktivierung der T-Zelle, was mit der direkten Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen und Lymphokinen und somit typischerweise mit einigen akuten Nebenwirkungen verbunden ist. Andererseits führt die Bindung des Antikörpers zur sterischen Blockierung des gesamten Rezeptor-Komplexes und verhindert somit die Wechselwirkung mit APCs sowie die daraus folgende Signaltransduktion, Proliferation und Differenzierung [236]. Außerdem kommt es bereits nach kurzer Zeit durch Opsonisierung und Abbau mittels Makrophagen sowie durch Modulation und Internalisierung des Rezeptorkomplexes zur vollständigen Eliminierung bzw. immunologischen Inaktivierung aller CD3-positiven T-Zellen in der Blutzirkulation [236]. Muromonab-CD3 schützt das körperfremde Transplantat also vorübergehend vor dem Immunsystem des Empfängers. Auch bei der sogenannten „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD), also der

umgekehrten Abwehrreaktion ausgehend von T-Lymphozyten einer allogenen Blutzellspende gegen APCs des Empfängers, wurde Muromonab-CD3 bereits erfolgreich verwendet [253].

### **2.5.2 Bevacizumab**

Bevacizumab (Handelsname Avastin®) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der als Angiogenesehemmer ursprünglich für die Behandlung von metastasiertem Darmkrebs zugelassen wurde, heutzutage aber auch bei der Therapie von Mamma-, Bronchial-, Nierenzell-, Ovarial- und Zervixkarzinomen sowie Glioblastomen Anwendung findet [254].

Im Vergleich zu normalen, gesunden Zellen besitzen Krebszellen einen stärker ausgeprägten Stoffwechselbedarf und benötigen somit eine hohe Nährstoff- und Sauerstoffversorgung. Während dieser Bedarf in frühen Stadien noch mittels Diffusion gedeckt werden kann, sind größere solide Tumore auf ein eigenes Blutgefäßsystem angewiesen [255]. Die Ausbildung neuer Blutgefäße erfolgt dabei durch Sprossungsprozesse ausgehend von bereits vorhandenen Gefäßen. Diese Art der Neovaskularisation wird als Angiogenese bezeichnet. Sie wird durch ein komplexes Zusammenspiel von pro- und antiangiogenen Faktoren reguliert und ist im gesunden erwachsenen Körper mit wenigen Ausnahmen (z. B. Wundheilungsprozesse) weitestgehend inaktiv [254]. Viele wachsende Tumore sind ab einer gewissen Größe jedoch in der Lage, eine Aktivierung der Angiogenese zu bewirken. Beim sogenannten „angiogenen Switch“ setzen Tumorzellen pro-angiogene Wachstumsfaktoren frei, welche die Bildung neuer Blutgefäße in Richtung des Tumors auslösen [254]. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF-A) ein. Er bindet an VEGF-Rezeptoren, d. h. Tyrosinkinase auf der Oberfläche von Endothelzellen, stimuliert somit deren Proliferation und Überlebensfähigkeit und erhöht die Durchlässigkeit der Blutgefäße [254]. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigten zudem, dass VEGF-A auch in andere, Angiogenese-unabhängige Prozesse wie Tumorzellproliferation und Krebsimmuntoleranz involviert ist [254].

Bevacizumab bindet spezifisch an VEGF-A Proteine und verhindert deren Interaktion mit VEGF-Rezeptoren. Die aktivierende Signalübertragung an Endothelzellen wird somit gehemmt und die Neovaskularisation folglich unterbunden. Bereits neugebildete Gefäße bilden sich außerdem zurück und durch die verringerte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wird das Tumorwachstum schließlich gebremst [254].

### **2.5.3 GSK-1/30**

Für eine genaue Diagnose, Prognose und Auswahl möglicher Behandlungsoptionen werden Mammakarzinome in der Regel immunhistochemisch (IHC) auf die Expression verschiedener, Tumorassoziierter Marker untersucht und entsprechend klassifiziert. Etablierte IHC-Marker sind dabei der Östrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR) (auch als Hormonrezeptoren, HR zusammengefasst) sowie der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) [256]. Je nach Präsenz dieser Rezeptoren erfolgt die Einteilung in bestimmte Subtypen und dementsprechende Behandlung. [HR-/HER2], auch triple-negativer Brustkrebs (TNBC) genannt, ist dabei aufgrund geringer Differenzierung, hoher Aggressivität und weniger Therapieoptionen typischerweise mit der schlechtesten Prognose verbunden [256]. Aufgrund der heterogenen Verteilung dieser konventionellen Biomarker unter allen

Brustkrebsfällen ist eine eindeutige Kategorisierung oftmals jedoch schwierig. Infolgedessen mangelt es der Prognose und der Einschätzung des therapeutischen Erfolgs verschiedener Behandlungsoptionen häufig an Genauigkeit und Zuverlässigkeit [257]. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich daher seit vielen Jahren mit der Entdeckung weiterer brustkrebsrelevanter Strukturen, die nicht nur eine präzisere Vorhersage des Ansprechens auf vorhandene Therapiemöglichkeiten gewährleisten, sondern auch potentielle Ziele für innovative Behandlungskonzepte darstellen.

Tumorassoziiertes Mucin1 ((TA)MUC1) ist ein vielversprechendes Glykoprotein, das in der Lage ist, diese Anforderungen zu erfüllen [257–259]. Das Antigen wird von mehr als 90 % aller Brust- und sogar 94 % aller TNBC-Tumore exprimiert [260,261]. (TA)MUC1 zeigt ein aberrantes Glykosylierungsmuster, das zu einem teilweise offenliegenden, zugänglichen Peptidrückgrat führt und sich daher stark von dicht glykosyliertem MUC1 auf gesunden Epithelzellen unterscheidet [262,263]. Durch die Synthese eines spezifischen „Tandem-Repeat“-Glykopeptids, welches einer glykosylierten Struktureinheit des humanen tumorassoziierten Antigens entspricht, und anschließende Kopplung an immunstimulierendes Tetanustoxoid (TTox) konnte ein hochwirksamer Antitumor-Impfstoff erhalten werden [263,264]. Die Verwendung dieses Vakzins löste in BALB/c Mäusen eine starke T-Zell-vermittelte Immunantwort inklusive der Produktion einer Vielzahl von IgG Antikörpern mit Spezifität zu dem synthetischen Glykopeptid aus [263].

Neben einigen anderen zeigte insbesondere der als GGSK-1/30 bezeichnete mAb eine hohe Spezifität zu humanem (TA)MUC1 auf Brustkrebszellen und gleichzeitig eine hohe Selektivität gegenüber normal glykosyliertem MUC1 auf gesunden Zellen [263]. Zur Untersuchung der Pharmakokinetik dieses neuartigen Antikörpers sowie seiner Anwendbarkeit für die diagnostische Immuno-PET Bildgebung von Brustkrebs wurden kürzlich präklinische Studien mit dem entsprechenden, <sup>89</sup>Zr-markierten Radioimmunkonjugat in Mäusen mit hu(TA)MUC1-exprimierenden Tumoren durchgeführt. Anhand hoher spezifischer Anreicherung im Zielgewebe sowie deutlichem Tumor-zu-Untergrund Kontrast konnte das vielversprechende Potential dieses Proteins sowie entsprechender Radiokonjugate bestätigt werden [257].

## 2.6 Wirkstofftransportsysteme

Viele Therapeutika finden trotz ihrer hohen Effizienz nicht den Weg in die tatsächliche klinische Anwendung bzw. Zulassung oder sind nur eingeschränkt nutzbar. Hauptgründe sind hierbei oftmals eine zu kurze Verweilzeit im Organismus und damit schlechte Bioverfügbarkeit sowie die gleichzeitige, unspezifische Beeinträchtigung gesunder Körperregionen [13,14]. Insbesondere kleine, niedermolekulare Wirkstoffe werden typischerweise sehr schnell entweder unverändert oder nach metabolischer Verarbeitung über Nieren oder die Leber ausgeschieden [265]. Um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erreichen, muss der entsprechende Wirkstoff daher in hohen Dosen verabreicht werden, was in Kombination mit einer geringen Spezifität und Selektivität oftmals zu starken bzw. nicht vereinbaren, systemischen Nebenwirkungen führt [14].

Eine Möglichkeit, diese Nachteile zu umgehen, ist die Verwendung sogenannter Wirkstofftransportsysteme (*drug delivery systems*, DDS). Mit dem Ziel, die pharmakologischen Eigenschaften von Wirkstoffen zu verbessern, wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Varianten solcher Systeme entwickelt und untersucht. Eine Methode stellt dabei die direkte Anbindung des Therapeutikums an ein großes, zielgerichtetes Biomolekül wie beispielsweise bei Antikörper-Wirkstoff-

Konjugaten (*antibody-drug-conjugates*, ADC) dar [266]. Außerdem haben sowohl organische als auch anorganische Nanopartikel z. B. auf Basis von Polymeren, Lipiden, Metallverbindungen oder Silica zunehmend an Bedeutung gewonnen. Je nach Material und Struktur dieser, auch als „Nanocarrier“ bezeichneten Verbindungen wird der Wirkstoff entweder auf der Oberfläche gebunden bzw. adsorbiert oder in deren Inneren eingeschlossen [267].

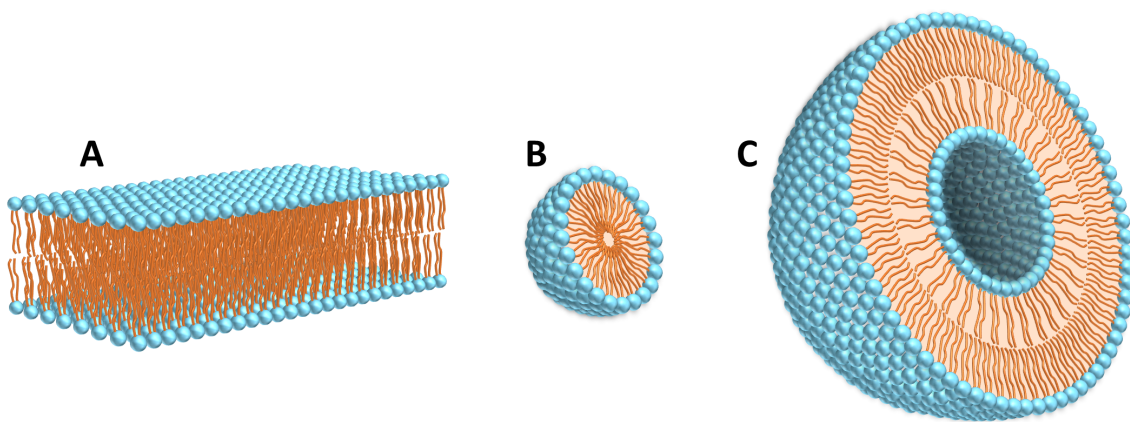
Die Verwendung solcher Transportsysteme kann das biologische Verhalten eines Wirkstoffes auf unterschiedliche Weise positiv beeinflussen. Beispielsweise kann die Blutlöslichkeit hydrophober Moleküle durch Einschluss in sphärische Partikel, die sich aus amphiphilen Struktureinheiten zusammensetzen (z. B. Mizellen), erhöht werden [13,267]. Durch die Kombination des Wirkstoffs mit einem Nanopartikel kann zudem die größenabhängige Toleranzgrenze der Nieren (Porengröße 3–5 nm) überschritten und eine direkte renale Ausscheidung somit verhindert oder verzögert werden [265,268,269]. Außerdem wird die inkorporierte Substanz nach außen hin vor möglichen metabolischen oder immunologischen Vorgängen abgeschirmt und gleichzeitig gesunde Körperregionen vor einer systemischen Toxizität des Wirkstoffes geschützt. Insgesamt ist somit eine deutlich längere Blutzirkulationszeit und verbesserte Bioverfügbarkeit möglich [13,14,267,269]. DDS können auch eine selektivere Anreicherung eines eigentlich unspezifisch wirksamen Therapeutikums beispielsweise in zu behandelndem Tumorgewebe bewirken und somit dessen nötige Dosis sowie Nebenwirkungen signifikant verringern [13,14]. Hierbei unterscheidet man zwischen aktivem und passivem „Targeting“. Die aktive Adressierung ist nicht nur durch die bereits erwähnte, direkte Konjugation an ein spezifisches Biomolekül (z. B. ADC), sondern auch durch Funktionalisierung der Oberfläche von Wirkstoff-tragenden Nanopartikeln mit Targetvektoren möglich [13,14]. Der Prozess des passiven Targetings beruht hingegen auf dem sogenannten EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*) [14,267,269]. Dieser beschreibt die deutlich höhere Anreicherung und Retention von makromolekularen Stoffen in malignen Tumoren verglichen mit gesundem Gewebe. Neugebildete, tumorassoziierte Blutkapillaren besitzen aufgrund von Fenestrierungen eine höhere Durchlässigkeit und ermöglichen Nanopartikeln somit das Eindringen ins Tumorgewebe. Aufgrund eines zusätzlich nur geringfügig ausgebildeten, bzw. fehlerhaften, lymphatischen Systems innerhalb des Tumors ist der anschließende Abtransport der Partikel außerdem gehindert [270].

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung geeigneter DDS besteht darin, dass diese den entsprechenden Wirkstoff einerseits stabil einschließen bzw. binden, andererseits jedoch am Zielort bzw. unter bestimmten Bedingungen wieder freigeben sollen. Hierbei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Biologisch abbaubare oder diffusionsdurchlässige DDS ermöglichen eine zwar unspezifische aber langsame und kontinuierliche Freisetzung und können somit über einen langen Zeitraum eine gleichbleibende Konzentration des Therapeutikums im Blut gewährleisten [271]. Diese Konzentration befindet sich idealerweise zwischen der minimalen effektiven (MEC) und minimalen toxischen Konzentration (MTC) des Wirkstoffes [271]. Andere Systeme sind darauf ausgelegt, ihre Fracht spezifisch erst am Zielort durch den Einfluss bestimmter Reize freizusetzen. Diese Reize können beispielsweise durch abweichende, pathologische Bedingungen wie erhöhte Temperaturen oder veränderte pH-Werte sowie durch äußerliche Einflüsse wie Ultraschall ausgelöst werden [271].



## 2.6.1 Liposome

Liposome sind sphärische Vesikel die sich hauptsächlich aus Phospholipiden zusammensetzen [15,267]. Phospholipide bestehen aus einem hydrophilen, Phosphat-tragenden „Kopf“ und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten [15]. In wässriger Lösung richten sich diese amphiphilen Moleküle entsprechend aus, sodass die Köpfe zur polaren Umgebung zeigen und die „Schwänze“ das Wasser abstoßen und untereinander wechselwirken. Es entstehen somit Doppellipidschichten und geschlossene sphärische Strukturen wie Mizellen und Liposome (Abbildung 32) [272]. Mizellen bestehen aus einer einzelnen Schicht von Molekülen und besitzen somit einen lipophilen Kern. Liposome hingegen enthalten eine (unilamellar) oder mehrere (multilamellar) Doppelschichten. Die hydrophilen Teile der innersten Phospholipide sind demnach nach innen gerichtet und umschließen einen wässrigen Kern.



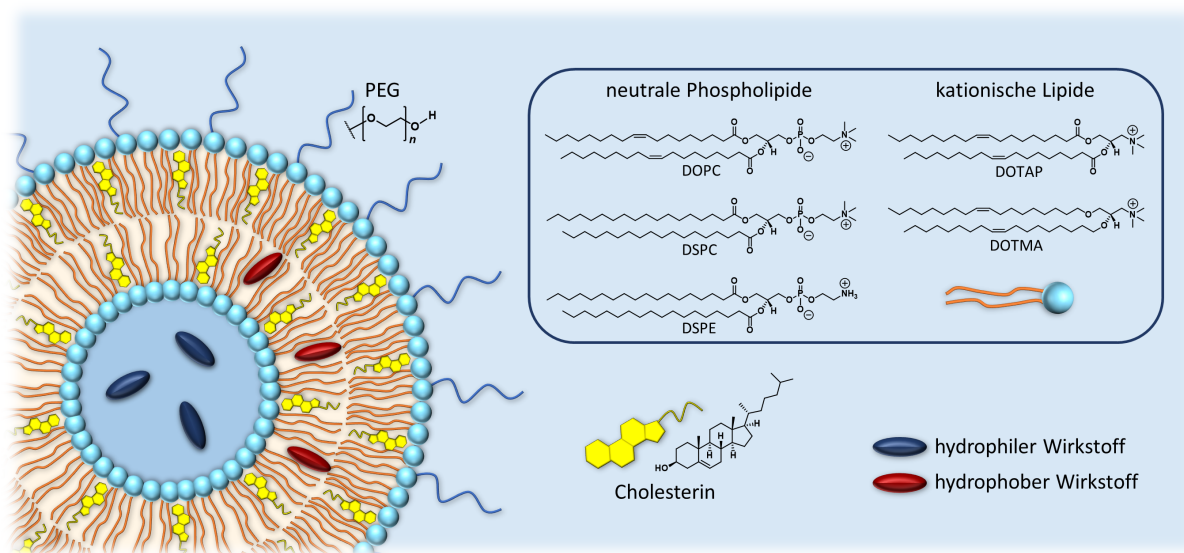
**Abbildung 32:** Schematische Darstellung unterschiedlicher Anordnungsmöglichkeiten von Phospholipiden, bestehend aus einem hydrophilen Kopf (blau) und zwei hydrophoben Ketten (braun), in wässriger Lösung: (A) Doppellipidschicht, (B) Mizelle, (C) Liposom. Erstellt in Anlehnung an Bozzuto *et al.*, 2015 [272].

Die Entdeckung der Liposome geht auf Bangham *et al.*, 1965 zurück [273]. 1971 erkannten Gregoriadis *et al.* erstmalig ihr Potential als Transportsystem für Enzyme und Wirkstoffe [274]. Aufgrund einiger vorteilhafter Eigenschaften gehören Liposome seitdem zu den meist untersuchten und bedeutendsten DDS überhaupt. Beispielsweise ermöglicht ihr struktureller Aufbau den Transport sowohl hydrophiler als auch lipophiler Substanzen. Hydrophile Frachten können dabei im wässrigen Kern oder zwischen den Schichten multilamellarer Vesikel eingeschlossen werden. Lipophile Wirkstoffe lagern sich hingegen innerhalb der Doppellipidschicht an [15]. Natürliche Zellmembranen bestehen ebenfalls hauptsächlich aus Phospholipiden. (Synthetische) Liposome besitzen daher eine hohe Biokompatibilität, d. h. sie sind biologisch abbaubar und weisen eine geringe Toxizität und Immunogenität auf [15].

Wichtige Eigenschaften liposomaler Systeme wie Stabilität, Lamellarität, Größe und Permeabilität werden unter anderem von der Wahl des Phospholipids bzw. von der genauen Zusammensetzung mehrerer unterschiedlicher Bestandteile beeinflusst. Ein charakteristisches und entscheidendes Merkmal von Phospholipiden ist deren Phasenübergangstemperatur. Unterhalb dieser Temperatur liegen sie als Gel, oberhalb in flüssig-kristalliner Form vor [15]. Während sich Gelphasen-Liposome typischerweise durch eine höhere Stabilität auszeichnen, sind Flüssigphasen-Liposome in der Regel durchlässiger für Wasser und die eingeschlossene Fracht [16]. Außerdem spielt die Ladung der einzelnen Bestandteile bzw. die Gesamtladung des Liposoms eine große Rolle. Viele verwendete



Phospholipide wie z. B. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC) oder 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DSPE) besitzen neben der negativ geladenen Phosphateinheit eine positiv geladene Ammoniumgruppe, sie sind also zwitterionisch bzw. insgesamt neutral geladen [15,275]. Für einen stabilen Einschluss und Transport anionischer Substanzen wie z. B. Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA) finden hingegen positiv geladene Bestandteile wie die kationischen Lipide 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTAP) oder 1,2-Di-*O*-octadecenyl-3-trimethylammoniumpropan (DOTMA) Anwendung [275]. Zur weiteren Stabilisierung kommt bei der Herstellung von Liposomen oftmals auch Cholesterin als sogenanntes Helfer-Lipid zum Einsatz (Abbildung 33). Das lipophile Sterol besetzt den freien Raum innerhalb der Doppellipidschicht und verringert dadurch die Flexibilität und Mobilität der benachbarten Flüssigphasenlipide, was zu einer erhöhten mechanischen Belastbarkeit, verringerten Permeabilität und reduzierten Aggregationstendenz des liposomalen Systems führt [276,277].



**Abbildung 33:** Schematischer Querschnitt eines unilamellaren, Cholesterin-stabilisierten und PEG-geschützten Stealth-Liposoms als DDS für hydrophile (dunkelblau) oder hydrophobe (dunkelrot) Wirkstoffe.

Die Pharmakokinetik bzw. Zirkulationszeit von Liposomen ist in erster Linie von deren Größe abhängig. Typische Durchmesser liegen im Bereich zwischen 50 nm und 450 nm [272]. Während die renale Ausscheidung bei ausreichender Stabilität aufgrund der geringen Porengröße der Niere demnach in der Regel nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist insbesondere die größenabhängige Aufnahme in Leber und Milz von Bedeutung. Im Idealfall sollte der Durchmesser groß genug sein, um die Filtration durch die Leber, welche bis zu einer Partikelgröße von 50–100 nm auftritt, zu vermeiden. Andererseits sollte er 300 nm nicht überschreiten, da ansonsten eine signifikante Akkumulation in der Milz zu erwarten ist [278]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Liposomen mit einer Größe von 100–200 nm am effektivsten von der Permeabilität des Tumors profitieren und somit die bestmögliche Anreicherung im Zielgewebe erreichen [278].

Klassische Liposome werden vom Organismus trotz ihrer Ähnlichkeit zur natürlichen Zellmembran dennoch in gewissem Maße als körperfremde Substanzen erkannt und von Bestandteilen des Retikuloendothelialen Systems (RES) aufgenommen [15,16,272]. Um diesen Effekt zu umgehen, wurden zahl-

reiche Strategien entwickelt, die Oberfläche von liposomalen Systemen zu modifizieren und sie somit vor dem RES zu tarnen. Ein bedeutendes Beispiel stellt hierbei die Verwendung von hydrophilen Polymerketten, beispielsweise kovalent an den Kopf von Phospholipiden oder an andere Bestandteile gebunden, dar. Insbesondere Polyethylenglycol (PEG) hat sich über viele Jahre als Gold-Standard für die äußere Abschirmung sogenannter „Stealth“-Liposome etabliert (Abbildung 33) [15,16,272]. Das Polymer zeichnet sich ebenfalls durch eine hohe Biokompatibilität und Wasserlöslichkeit aus und bewirkt zudem eine sterische Abstoßung sowohl zwischen mehreren Liposomen als auch zwischen Liposom und Zellen oder Plasmaproteinen [16,272]. Das Ergebnis ist eine erschwerte Detektion durch das RES, verringerte Tendenz zur Aggregation und folglich längere Zirkulationszeit im Blut [15,272]. Das 1995 als erstes liposomales Medikament von der FDA zugelassene Doxil® beinhaltet PEGylierte Liposome als DDS für das Zytostatikum Doxorubicin [15]. Alternative Ansätze zur Herstellung sterisch geschützter Systeme bestehen beispielsweise in der Verwendung von Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid) (pHPMA) oder von hyperververzweigtem Polyglycerol (*hbPG*) [93,279–281].

### 3. Motivation und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Teilprojekte A–E bearbeitet. Die Projekte A–D beinhalten dabei die Synthese, Radiomarkierung sowie *in vitro*- und *in vivo*-Evaluierung neuartiger Antikörperkonjugate für die Immuno-PET Bildgebung oder Radioimmuntherapie unter Verwendung der Radionuklide  $^{89}\text{Zr}$  und  $^{177}\text{Lu}$ . In den Teilprojekten B und C wurden hierbei zudem neue Chelator-konzepte für eine effiziente und stabile Komplexbildung dieser beiden Radiometalle bezüglich Antikörper-basierter Anwendungen entwickelt und im Vergleich zu bereits bekannten Komplexbildnern untersucht. Teilprojekt E umfasst die Synthese,  $^{18}\text{F}$ -Markierung und Charakterisierung funktionalisierter, PET-visualisierbarer Liposome für den zielgerichteten Wirkstofftransport bei der Behandlung von Prostatakrebs.

Im Folgenden werden die Ziele und Motivation der einzelnen Teilprojekte kurz erläutert. Zudem zeigen die Abbildungen 34–36 einen unterstützenden, grafischen Überblick.

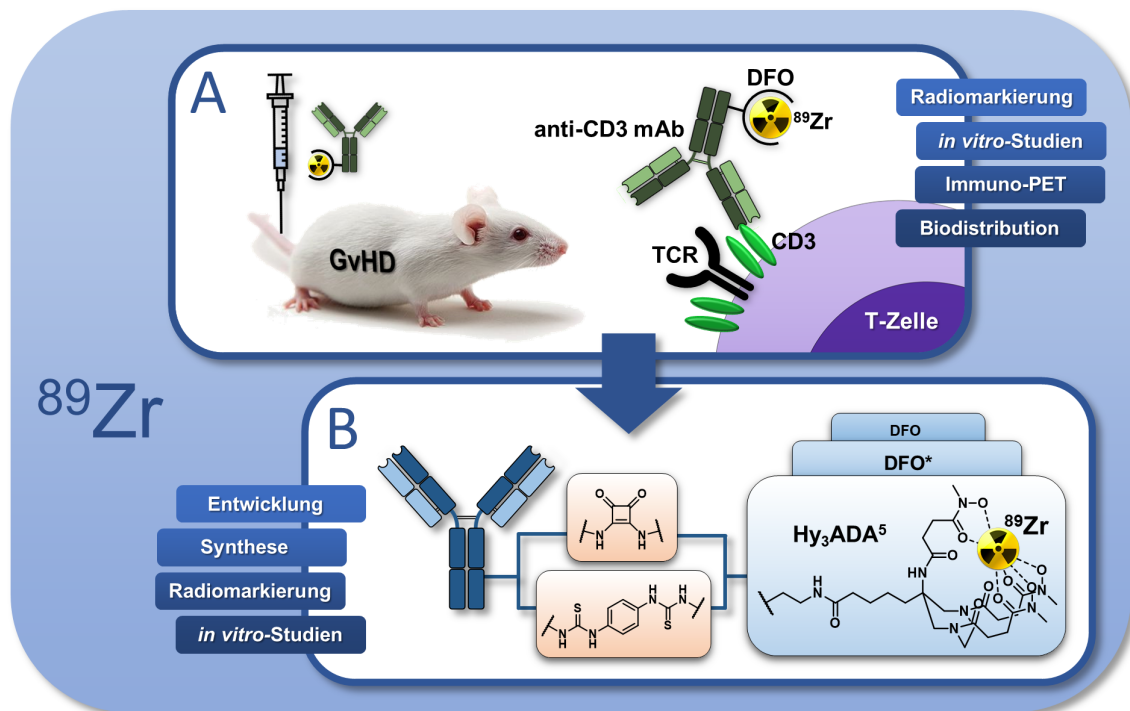


Abbildung 34: Grafischer Überblick über die  $^{89}\text{Zr}$ -basierten Teilprojekte A und B.

#### Teilprojekt A:

Bei den meisten malignen hämatologischen Erkrankungen und Immundefekten stellt die Spende blutbildender Stammzellen die einzige effiziente Behandlungsmöglichkeit dar. In vielen Fällen ist sie jedoch mit schweren Komplikationen aufgrund einer Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD) verbunden, wobei Donor-T-Zellen den Empfängerorganismus angreifen. Im Rahmen von Teilprojekt A sollte das Potential der Immuno-PET zur diagnostischen Darstellung humaner T-Zellen sowie deren Migration bei der Entwicklung einer GvHD innerhalb eines humanisierten Mausmodells untersucht werden. Hierfür wurde der kommerziell erhältliche, CD3-spezifische mAb Muromonab-CD3 zunächst mit dem Chelator DFO funktionalisiert und mit  $^{89}\text{Zr}$  radiochemisch hinsichtlich Markierungseffizienz

und *in vitro*-Stabilität untersucht. Das resultierende Radioimmunkonjugat sollte anschließend immundefizienten Mäusen appliziert werden, bei denen zuvor durch Transfer humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) eine GvHD ausgelöst wurde. Durch Verwendung unterschiedlicher zeitlicher Abstände zwischen Applikation der PBMC und des  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörpers wurden dabei diverse Stadien der Erkrankung berücksichtigt. Anhand Kleintier-PET/MRT Messungen und *ex vivo*-Biodistributionsstudien zu verschiedenen Zeitpunkten nach mAb-Injektion sollte schließlich die Adressierung CD3-positiver, humaner T-Zellen bzw. deren Verteilung in entzündeten, GvHD-relevanten Organen visualisiert und quantifiziert werden. Im Vergleich dazu sollte zudem der immunsuppressive Einfluss regulatorischer T-Zellen ( $T_{\text{reg}}$ ) zur Prävention von GvHD-Symptomen untersucht bzw. dargestellt werden.

### **Teilprojekt B:**

DFO gilt als Gold-Standard und nahezu ausschließlich verwendeter Chelator zur Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}$ . Bedingt durch seine offenkettige, hexadentate Struktur zeigen  $^{89}\text{Zr}$ -markierte DFO-Konjugate jedoch *in vivo* insbesondere in präklinischen Studien oftmals eine gewisse Instabilität und Freisetzung des osteophilen Radiometalls. Dieser Effekt konnte beispielsweise in geringem Maße auch in Teilprojekt A beobachtet werden. Die Suche nach neuen, verbesserten Chelatorsystemen ist seit einigen Jahren Gegenstand aktueller Forschungen (vgl. Kapitel 2.2.1 und 2.4.1). Ziel von Teilprojekt B war daher die Entwicklung, Synthese, Charakterisierung und *in vitro*-Evaluierung neuer bifunktionaler  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatorderivate auf Basis des 6-Amino-1,4-diazepan Grundgerüsts. Als Leitstruktur dienten hierbei die Carboxyl-basierten Hybridchelatoren AAZTA<sup>5</sup> und DATA<sup>5m</sup>, die sich durch exzellente Markierungseigenschaften in Verbindung mit einer Vielzahl von anderen Radiometallen auszeichnen (vgl. Kapitel 2.4.3). In Anlehnung an DFO wurde das Rückgrat zur stabilen Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}$  anstelle von Carbonsäuregruppen jedoch mit Hydroxamat-tragenden Seitenketten funktionalisiert. Analog zu AAZTA<sup>5</sup> und DATA<sup>5m</sup> sollte die Bifunktionalität des Systems durch einen zusätzlichen Pentansäure-Linker gewährleistet werden. Ergänzend zu der Grundstruktur wurden außerdem zwei weitere Derivate für eine erleichterte Anbindung an Amin-tragende Biomoleküle wie Antikörper synthetisiert. Hierfür wurde das System einerseits um eine *p*-Isothiocyanatophenyl- und andererseits um eine Quadratsäureamideinheit erweitert. Die somit erhaltenen Chelatorderivate sollten anschließend hinsichtlich ihrer  $^{89}\text{Zr}$ -Markierungskinetik unter milden Bedingungen sowie *in vitro*-Komplexstabilität sowohl als freie, eigenständige Moleküle als auch gebunden an einen Modellantikörper (Bevacizumab) untersucht werden. Analog dazu dienten ähnlich funktionalisierte Derivate des DFO und des octadentaten DFO\* sowie deren entsprechende Immunkonjugate als Referenz.

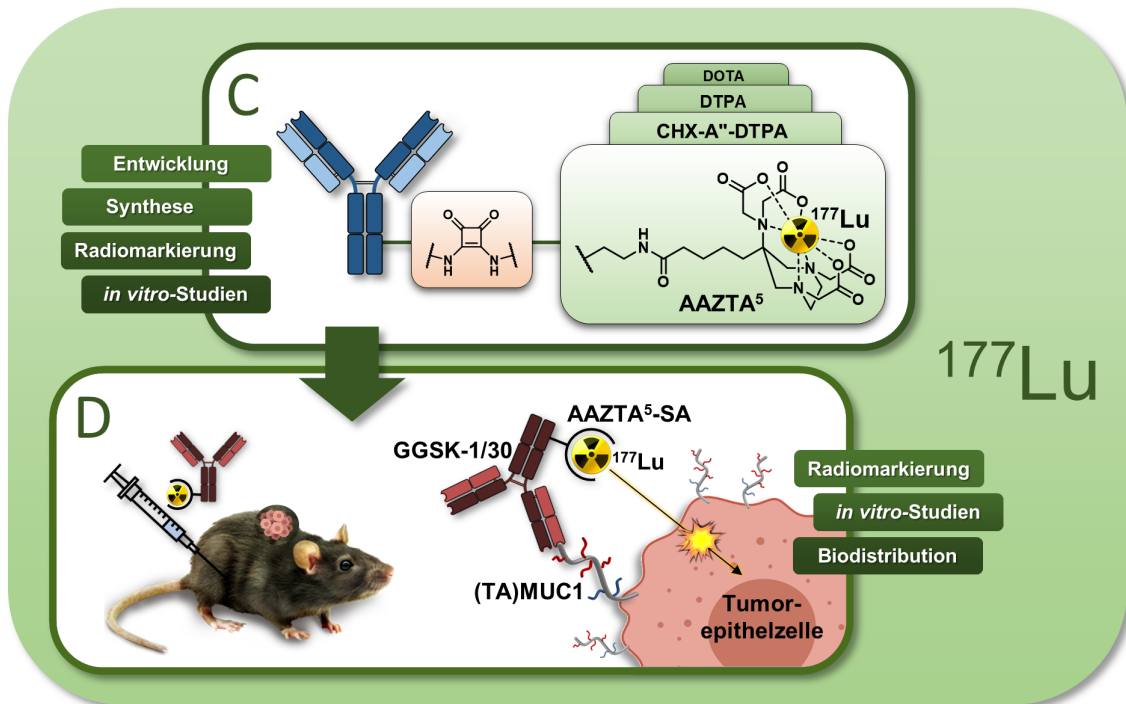


Abbildung 35: Grafischer Überblick über die <sup>177</sup>Lu-basierten Teilprojekte C und D.

### Teilprojekt C:

Mit seiner ausreichend langen Halbwertszeit und niedrigenergetischen  $\beta^-$ -Emission besitzt <sup>177</sup>Lu exzellente Eigenschaften für radioimmuntherapeutische Anwendungen insbesondere bei der Behandlung kleiner solider Tumore oder Metastasen (vgl. Kapitel 2.3.1). Typische Chelatoren, die zur Komplexbildung dieses Radiometalls verwendet werden, sind DOTA und DTPA. Komplexe des makrozyklischen DOTA lassen sich jedoch meist nur unter harschen Bedingungen (bis zu 95 °C) oder sehr langen Reaktionszeiten in ausreichend hoher Ausbeute darstellen. Im Gegensatz dazu weisen DTPA-Komplexe oftmals eine gewisse Dissoziation unter physiologischen Bedingungen auf (vgl. Kapitel 2.3.1, 2.4). Beide Systeme sind daher nur eingeschränkt für eine schnelle und stabile <sup>177</sup>Lu-Markierung sensitiver Biomoleküle wie Antikörper geeignet. Der heptadentate, bifunktionelle Hybridchelator AAZTA<sup>5</sup> vereint hingegen die Vorteile makrozyklischer und azyklischer Strukturen und bietet typischerweise eine schnelle Markierungskinetik unter milden Bedingungen sowie vielversprechende Komplexstabilitäten in Kombination mit <sup>177</sup>Lu und einigen anderen Radiometallen (vgl. Kapitel 2.4.3). Im Rahmen von Teilprojekt C sollte AAZTA<sup>5</sup> daher hinsichtlich seiner Anwendbarkeit für die <sup>177</sup>Lu-Markierung von monoklonalen Antikörpern untersucht werden. Aufgrund einiger vorteilhafter Eigenschaften der Quadratsäure-basierten Konjugationsstrategie (vgl. Kapitel 2.4.4) sollte zunächst ein Quadratsäuremonoamidester des Chelators (AAZTA<sup>5</sup>-SA) synthetisiert und anschließend an den Modellantikörper Bevacizumab gebunden werden. Für Vergleichsstudien wurden zudem analoge Quadratsäurederivate der Chelatoren DOTA, DTPA und CHX-A''-DTPA sowie deren entsprechende Immunkonjugate hergestellt. Sowohl in freier, eigenständiger als auch Protein-gebundener Form sollten alle erhaltenen Chelatorerivate schließlich mit <sup>177</sup>Lu bezüglich ihrer Komplexbildungseffizienz unter identischen, milden Bedingungen sowie ihrer *in vitro*-Stabilität evaluiert werden.

### Teilprojekt D:

Tumorassoziiertes Mucin1 wird von mehr als 90 % aller Brustkrebstumore exprimiert und unterscheidet sich stark von dicht glykosyliertem Mucin1 auf gesunden Epithelzellen. Es stellt daher eine vielversprechende Zielstruktur für innovative Diagnostik- und Therapiekonzepte dar. Durch die Verwendung eines synthetischen Antitumor-Vakzins konnte der monoklonale Antikörper GGSK-1/30 generiert werden, welcher sich durch eine hohe Spezifität zu humanem (hu) (TA)MUC1 und hohe Selektivität gegenüber physiologischem MUC1 auszeichnet. In präklinischen Vorarbeiten mit  $^{89}\text{Zr}$ -markiertem GGSK-1/30 wurde das vielversprechende Potential dieses Proteins bzw. entsprechender Radioimmunkonjugate für die diagnostische Immuno-PET Bildgebung von Brustkrebs bereits unter Beweis gestellt (vgl. Kapitel 2.5.3). In Teilprojekt D dieser Arbeit sollte nun die Anwendbarkeit des Antikörpers als Targetvektor für die  $^{177}\text{Lu}$ -basierte Radioimmuntherapie anhand von *in vitro*- und ersten *in vivo*-Studien untersucht werden. Basierend auf den Ergebnissen von Teilprojekt C wurde das (TA)MUC1-spezifische Protein hierfür zunächst mit AAZTA<sup>5</sup>-SA unter Bildung des entsprechenden Quadratsäurediamids funktionalisiert und unter milden Bedingungen mit  $^{177}\text{Lu}$  markiert. Das erhaltene Radioimmunkonjugat sollte anschließend *in vitro* hinsichtlich seiner Komplexstabilität und Bindung zu Tumorzellen unterschiedlicher (TA)MUC1-Expression untersucht werden. Zur Ermittlung seiner Pharmakokinetik und *in vivo*-Bindungseigenschaften wurde das  $^{177}\text{Lu}$ -markierte Konjugat schließlich tumortragenden Mäusen verabreicht und die Biodistribution zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion bestimmt. Teilprojekt D beinhaltet demnach zudem die erste *in vivo*-Anwendung bzw. Evaluierung des neuen, in Teilprojekt C beschriebenen Chelator-konzepts zur  $^{177}\text{Lu}$ -Markierung von Antikörpern.

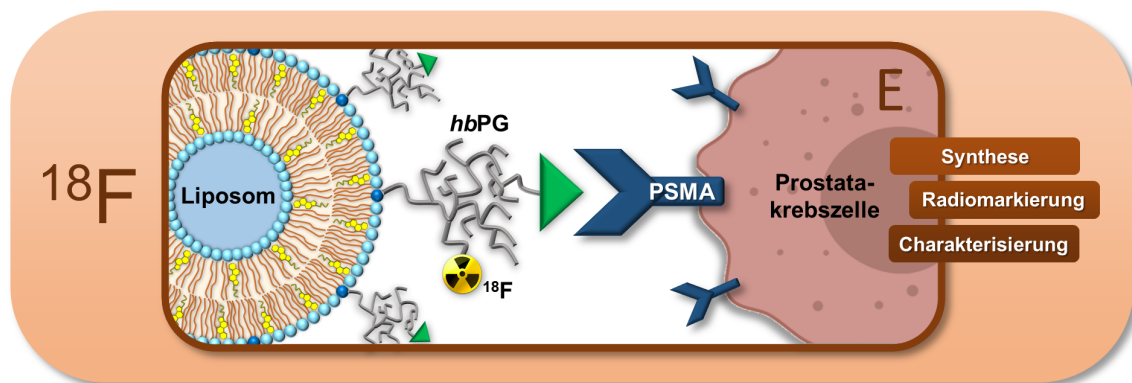


Abbildung 36: Grafischer Überblick über das  $^{18}\text{F}$ -basierte Teilprojekt E.

### Teilprojekt E:

Das membrangebundene Glykoprotein PSMA gehört zur Gruppe der Carboxypeptidasen und katalysiert beispielsweise die Hydrolyse von *N*-Acetyl-Aspartyl-Glutamat (NAAG) zu *N*-Acetyl-Aspartat. Es kommt in gesundem Gewebe eher selten vor, wird jedoch von Prostatakrebszellen überexprimiert und ist damit eng mit der Diagnose von Prostatakarzinomen verbunden [282]. Eine Vielzahl bekannter PSMA-Inhibitoren enthält zur spezifischen Adressierung dieses Antigens eine Harnstoff-gebundene Glutamateinheit. So basieren die radiopharmazeutisch relevanten Strukturen PSMA-11 und PSMA-617 auf einem L-Lysin-Urea-L-Glutamat (KuE) Bindungsmotiv, welches *N*-Acetyl-Aspartyl-Glutamat ähnelt und somit spezifisch an PSMA bindet ohne jedoch enzymatisch gespalten zu werden [282,283]. Viele

klassische Krebstherapeutika besitzen eine geringe Bioverfügbarkeit, unzureichende Spezifität und hohe systemische Toxizität. Durch deren Einschluss in liposomale Wirkstofftransportsysteme lässt sich ihre Zirkulationszeit sowie Anreicherung im Zielgewebe jedoch signifikant verbessern. Dies führt zu einer niedrigeren erforderlichen Dosierung, geringeren Toxizität für gesunde Körperregionen und höheren Behandlungseffizienz (vgl. Kapitel 2.6, 2.6.1). Ziel von Teilprojekt E war es, PSMA-spezifische Stealth-Liposome für einen möglichen zielgerichteten Wirkstofftransport bei der Behandlung von Prostatakrebs herzustellen. Neben einer PSMA-bindenden Komponente und einer äußeren sterischen Abschirmung sollten die Liposome zusätzlich das Positron-emittierende Radionuklid  $^{18}\text{F}$  tragen, um sie für künftige PET-basierte *in vivo*-Evaluierungen zugänglich zu machen. Hierfür sollte zunächst ein Quadratsäure-gekoppeltes, Azid-tragendes KuE-Derivat (KuE-SA-N<sub>3</sub>) mittels CuAAC an ein Polyetherlipid, bestehend aus Alkin-funktionalisiertem, hyperverzweigtem Polyglycerol und zwei hydrophoben Alkylketten, gebunden werden. Die Quadratsäureeinheit in der Linkerstruktur ist möglicherweise in der Lage, mit einer aromatischen Bindungsstelle des PSMA-Enzyms zu interagieren und somit die Affinität des Inhibitors zu erhöhen [231,283]. Im nächsten Schritt wurde eine  $^{18}\text{F}$ -markierte prosthetische Gruppe ausgehend von Ts-TEG-N<sub>3</sub> hergestellt und ebenfalls via CuAAC an verbliebene Alkin-Gruppen des Polyetherlipids gekoppelt. Unter Zugabe von DOPC und Cholesterin sollten anschließend entsprechend radiomarkierte, KuE-funktionalisierte und sterisch abgeschirmte Liposome erzeugt werden. Durch wiederholte Extrusion sollte die Größenverteilung und Lamellarität der Partikel schließlich reproduzierbar angepasst werden.





## 4. Referenzen

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
- [2] Robert Koch-Institute, Association of Population-based Cancer Registries in Germany. *Cancer in Germany in 2015/2016*. 12th ed. Berlin: 2020.
- [3] Wernick MN, Aarsvold JN. *Emission tomography: the fundamentals of PET and SPECT*. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press; 2004.
- [4] Mohnike W, Hör G, Hertel A, Schelbert H. *PET/CT-Atlas*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
- [5] Zoller F, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. Endoradiotherapy in cancer treatment — Basic concepts and future trends. *Eur J Pharmacol* 2009;625:55–62.
- [6] Kassis AI. Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles. *Semin Nucl Med* 2008;38:358–66.
- [7] Stigbrand T, Carlsson J, Adams GP. *Targeted radionuclide tumor therapy*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008.
- [8] Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep* 2018;45:2935–40.
- [9] Van Hoecke L, Roose K. How mRNA therapeutics are entering the monoclonal antibody field. *J Transl Med* 2019;17:1–14.
- [10] Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product. *Nat Rev Drug Discov* 2021.
- [11] Wei W, Rosenkrans ZT, Liu J, Huang G, Luo QY, Cai W. ImmunoPET: concept, design, and applications. *Chem Rev* 2020;120:3787–851.
- [12] Kawashima H. Radioimmunotherapy: a specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies. *Sci World J* 2014;2014:1–10.
- [13] Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett* 2010;10:3223–30.
- [14] Yan L, Shen J, Wang J, Yang X, Dong S, Lu S. Nanoparticle-based drug delivery system: a patient-friendly chemotherapy for oncology. *Dose-Response* 2020:1–12.
- [15] Beltrán-Gracia E, López-Camacho A, Higuera-Ciapara I, Velázquez-Fernández JB, Vallejo-Cardona AA. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnol* 2019;10:11.
- [16] Pattni BS, Chupin V V., Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev* 2015;115:10938–66.
- [17] Bailey DL, Townsend DW, Valk PE, Maisey MN, editors. *Positron emission tomography*. London: Springer-Verlag; 2005.
- [18] Hevesy G. Some applications of isotopic indicators. *Nobel Lect* 1944.
- [19] Sóti Z, Magill J, Dreher R. Karlsruhe nuclide chart – new 10th edition 2018. *EPJ Nucl Sci Technol* 2019;5:6.
- [20] Rösch F. *Nuclear- and radiochemistry volume 1: introduction*. 1st ed. Berlin: De Gruyter; 2014.

- [21] Ache HJ. Chemie des Positrons und Positroniums. *Angew Chemie* 1972;84:234–55.
- [22] Ganguly BN, Mondal NN, Nandy M, Roesch F. Some physical aspects of positron annihilation tomography: A critical review. *J Radioanal Nucl Chem* 2009;279:685–98.
- [23] Levin CS, Hoffman EJ. Calculation of positron range and its effect on the fundamental limit of positron emission tomography system spatial resolution. *Phys Med Biol* 2000;45:559–559.
- [24] Deutsch M. Evidence for the formation of positronium in gases. *Phys Rev* 1951;82:455–6.
- [25] Vértes A, Nagy S, Klencsár Z, Lovas RG, Rösch F, editors. *Handbook of nuclear chemistry*. Boston, MA: Springer US; 2011.
- [26] Al-Ramadhan AH, Gidley DW. New precision measurement of the decay rate of singlet positronium. *Phys Rev Lett* 1994;72:1632–5.
- [27] Vallery RS, Zitzewitz PW, Gidley DW. Resolution of the orthopositronium-lifetime puzzle. *Phys Rev Lett* 2003;90:203402.
- [28] Herzog H, Rösch F. PET- und SPECT-Technik: Chemie und Physik der Bildgebung. *Pharm Unserer Zeit* 2005;34:468–73.
- [29] Humm JL, Rosenfeld A, Del Guerra A. From PET detectors to PET scanners. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:1574–97.
- [30] Lewellen TK. Recent developments in PET detector technology. *Phys Med Biol* 2008;53.
- [31] Schmitz RE, Alessio AM, Kinahan PE. The physics of PET/CT scanners. In: Lin EC, Alavi A, editors. *PET PET/CT*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019, p. 1–16.
- [32] Conti M, Bendriem B. The new opportunities for high time resolution clinical TOF PET. *Clin Transl Imaging* 2019;7:139–47.
- [33] Rösch F, editor. *Nuclear- and radiochemistry volume 2: modern applications*. vol. 2. De Gruyter; 2016.
- [34] Scott PJH, editor. *Radiochemical syntheses*. vol. 2. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2015.
- [35] Wieland B, Bida G, Padgett H, Hendry G, Zippi E, Kabalka G, et al. In-target production of [<sup>13</sup>N]ammonia via proton irradiation of dilute aqueous ethanol and acetic acid mixtures. *Int J Radiat Appl Instrumentation Part* 1991;42:1095–8.
- [36] Fan AP, An H, Moradi F, Rosenberg J, Ishii Y, Nariai T, et al. Quantification of brain oxygen extraction and metabolism with [<sup>15</sup>O]-gas PET: a technical review in the era of PET/MRI. *Neuroimage* 2020;220:117136.
- [37] Tu Z, Mach RH. C-11 radiochemistry in cancer imaging applications. *Curr Top Med Chem* 2010;10:1060–95.
- [38] Jacobson O, Kiesewetter DO, Chen X. Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjug Chem* 2015;26:1–18.
- [39] Meisenheimer M, Saenko Y, Eppard E. Gallium-68: radiolabeling of radiopharmaceuticals for PET imaging - a lot to consider. *Med. Isot.*, vol. 68, IntechOpen; 2021, p. 1–21.
- [40] Breeman WAP, de Blois E, Sze Chan H, Konijnenberg M, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. <sup>68</sup>Ga-labeled DOTA-peptides and <sup>68</sup>Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. *Semin Nucl Med* 2011;41:314–21.

- [41] Khalil MM, editor. Basic sciences of nuclear medicine. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011.
- [42] wyffels L, Verbrugghen T, Monnery BD, Glassner M, Stroobants S, Hoogenboom R, et al.  $\mu$ PET imaging of the pharmacokinetic behavior of medium and high molar mass  $^{89}\text{Zr}$ -labeled poly(2-ethyl-2-oxazoline) in comparison to poly(ethylene glycol). *J Control Release* 2016;235:63–71.
- [43] Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, Lewis JS. PET imaging with  $^{89}\text{Zr}$ : from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol* 2013;40:3–14.
- [44] Koehler L, Gagnon K, McQuarrie S, Wuest F. Iodine-124: a promising positron emitter for organic PET chemistry. *Molecules* 2010;15:2686–718.
- [45] Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Slump CH, Boerman OC, Oyen WJGG, et al. Image-quality assessment for several positron emitters using the NEMA NU 4-2008 standards in the siemens inveon small-animal PET scanner. *J Nucl Med* 2010;51:610–7.
- [46] Conti M, Eriksson L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. *EJNMMI Phys* 2016;3:8.
- [47] Carter LM, Kesner AL, Pratt EC, Sanders VA, Massicano AVF, Cutler CS, et al. The impact of positron range on PET resolution, evaluated with phantoms and PHITS Monte Carlo simulations for conventional and non-conventional radionuclides. *Mol Imaging Biol* 2020;22:73–84.
- [48] Rösch F. Radionuklid-Generatorsysteme für die PET. *Der Nukl* 2004;27:226–35.
- [49] Lewis JS, Windhorst AD, Zeglis BM, editors. Radiopharmaceutical chemistry. Cham: Springer International Publishing; 2019.
- [50] Krajewski S, Cydzik I, Abbas K, Bulgheroni A, Simonelli F, Holzwarth U, et al. Cyclotron production of  $^{44}\text{Sc}$  for clinical application. *Radiochim Acta* 2013;101:333–8.
- [51] Bé M-M, Chisté V, Dulieu D, Browne E, Chevchev V, Kuzmenko N, et al. Table of radionuclides. vol. 1. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2004.
- [52] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Mougeot X, Chechev VP, Kondev FG, et al. Table of radionuclides. vol. 7. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2013.
- [53] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Kellett MA, Mougeot X, Arinc A, et al. Table of radionuclides. vol. 8. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2016.
- [54] Roesch F. Scandium-44: benefits of a long-lived PET radionuclide available from the  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$  generator system. *Curr Radiopharm* 2012;5:187–201.
- [55] Kuker R, Sztejnberg M, Gulec S. I-124 imaging and dosimetry. *Mol Imaging Radionucl Ther* 2017;26:66–73.
- [56] Schmitz J. The production of [ $^{124}\text{I}$ ]iodine and [ $^{86}\text{Y}$ ]yttrium. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:4–9.
- [57] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Mougeot X, Chechev VP, Kuzmenko NK, et al. Table of radionuclides. vol. 6. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2011.
- [58] Jødal L, Le Loirec C, Champion C. Positron range in PET imaging: non-conventional isotopes. *Phys Med Biol* 2014;59:7419–34.
- [59] H. Nielsen R, H. Schlewitz J, Nielsen H. Zirconium and zirconium compounds. *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013.
- [60] International Atomic Energy Agency - Nuclear Data Services. <https://www-nds.iaea.org/>

- [61] Pearson RG. Hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc* 1963;85:3533–9.
- [62] Toporivska Y, Gumienna-Kontecka E. The solution thermodynamic stability of desferrioxamine B (DFO) with Zr(IV). *J Inorg Biochem* 2019;198:110753.
- [63] Dilworth JR, Pascu SI. The chemistry of PET imaging with zirconium-89. *Chem Soc Rev* 2018;47:2554–71.
- [64] Guérard F, Lee YS, Tripier R, Szajek LP, Deschamps JR, Brechbiel MW. Investigation of Zr(IV) and <sup>89</sup>Zr(IV) complexation with hydroxamates: progress towards designing a better chelator than desferrioxamine B for immuno-PET imaging. *Chem Commun* 2013;49:1002–4.
- [65] Heskamp S, Raavé R, Boerman O, Rijpkema M, Goncalves V, Denat F. <sup>89</sup>Zr-Immuno-positron emission tomography in oncology: state-of-the-art <sup>89</sup>Zr radiochemistry. *Bioconjug Chem* 2017;28:2211–23.
- [66] Alzimami KS, Ma AK. Effective dose to staff members in a positron emission tomography/CT facility using zirconium-89. *Br J Radiol* 2013;86:20130318.
- [67] van de Watering FCJJ, Rijpkema M, Perk L, Brinkmann U, Oyen WJGG, Boerman OC. Zirconium-89 labeled antibodies: a new tool for molecular imaging in cancer patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–13.
- [68] Fischer G, Seibold U, Schirmacher R, Wängler B, Wängler C. <sup>89</sup>Zr, a radiometal nuclide with high potential for molecular imaging with PET: chemistry, applications and remaining challenges. *Molecules* 2013;18:6469–90.
- [69] Jacobson O, Zhu L, Niu G, Weiss ID, Szajek LP, Ma Y, et al. MicroPET imaging of integrin  $\alpha v \beta 3$  expressing tumors using <sup>89</sup>Zr-RGD peptides. *Mol Imaging Biol* 2011;13:1224–33.
- [70] Keliher EJ, Yoo J, Nahrendorf M, Lewis JS, Marinelli B, Newton A, et al. <sup>89</sup>Zr-labeled dextran nanoparticles allow *in vivo* macrophage imaging. *Bioconjug Chem* 2011;22:2383–9.
- [71] Avila-Rodriguez MA, Selwyn RG, Hampel JA, Thomadsen BR, DeJesus OT, Converse AK, et al. Positron-emitting resin microspheres as surrogates of <sup>90</sup>Y SIR-spheres: a radiolabeling and stability study. *Nucl Med Biol* 2007;34:585–90.
- [72] McDevitt M, McDevitt M, Alessandro Ruggiero, Carlos H. Villa, Jason P. Holland, Shanna R. Sprinkle, et al. Imaging and treating tumor vasculature with targeted radiolabeled carbon nanotubes. *Int J Nanomedicine* 2010;5:783.
- [73] Abou DS, Thorek DLJ, Ramos NN, Pinkse MWH, Wolterbeek HT, Carlin SD, et al. <sup>89</sup>Zr-labeled paramagnetic octreotide-liposomes for PET-MR imaging of cancer. *Pharm Res* 2013;30:878–88.
- [74] Evans MJ, Holland JP, Rice SL, Doran MG, Cheal SM, Campos C, et al. Imaging tumor burden in the brain with <sup>89</sup>Zr-transferrin. *J Nucl Med* 2013;54:90–5.
- [75] Bansal A, Pandey MK, Demirhan YE, Nesbitt JJ, Crespo-Diaz RJ, Terzic A, et al. Novel <sup>89</sup>Zr cell labeling approach for PET-based cell trafficking studies. *EJNMMI Res* 2015;5:19.
- [76] La MT, Tran VH, Kim H-K. Progress of coordination and utilization of zirconium-89 for positron emission tomography (PET) studies. *Nucl Med Mol Imaging (2010)* 2019;53:115–24.
- [77] Wooten A, Madrid E, Schweitzer G, Lawrence L, Mebrahtu E, Lewis B, et al. Routine production of <sup>89</sup>Zr using an automated module. *Appl Sci* 2013;3:593–613.
- [78] Zweit J, Downey S, Sharma HL. Production of no-carrier-added zirconium-89 for positron emission tomography. *Int J Radiat Appl Instrumentation Part A Appl Radiat Isot* 1991;42:199–201.

- [79] Queern SL, Aweda TA, Massicano AVF, Clanton NA, El Sayed R, Sader JA, et al. Production of Zr-89 using sputtered yttrium coin targets. *Nucl Med Biol* 2017;50:11–6.
- [80] Manenti S, Haddad F, Groppi F. New excitation functions measurement of nuclear reactions induced by deuteron beams on yttrium with particular reference to the production of <sup>89</sup>Zr. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect B Beam Interact with Mater Atoms* 2019;458:57–60.
- [81] Bhatt NB, Pandya DN, Wadas TJ. Recent advances in zirconium-89 chelator development. *Molecules* 2018;23.
- [82] Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. *In vivo* biodistribution and accumulation of <sup>89</sup>Zr in mice. *Nucl Med Biol* 2011;38:675–81.
- [83] Laverman P, Van Der Geest T, Terry SYA, Gerrits D, Walgreen B, Helsen MM, et al. Immuno-PET and immuno-SPECT of rheumatoid arthritis with radiolabeled anti-fibroblast activation protein antibody correlates with severity of arthritis. *J Nucl Med* 2015;56:778–83.
- [84] Jaccaud M, Faron R, Devilliers D, Romano R. Fluorine. *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.*, vol. 3, Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2000, p. 381–95.
- [85] Allred AL. Electronegativity values from thermochemical data. *J Inorg Nucl Chem* 1961;17:215–21.
- [86] Kirsch P. *Modern fluoroorganic chemistry*. Wiley-VCH; 2004.
- [87] Chambers RD, Skinner CJ, Thomson J, Hutchinson J. Electrophilic fluorination using elemental fluorine. *J Chem Soc Chem Commun* 1995;7:17.
- [88] Maienfisch P, Hall RG. The importance of fluorine in the life science industry. *Chim Int J Chem* 2004;58:93–9.
- [89] Cole E, Stewart M, Littich R, Hoareau R, Scott P. Radiosyntheses using fluorine-18: the art and science of late stage fluorination. *Curr Top Med Chem* 2014;14:875–900.
- [90] Wu Z, Kandeel F. <sup>18</sup>F-labeled proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 2010;11:572–80.
- [91] Stockhofe K, Postema J, Schieferstein H, Ross T. Radiolabeling of nanoparticles and polymers for PET imaging. *Pharmaceuticals* 2014;7:392–418.
- [92] Okarvi S. Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med* 2001;28:929–38.
- [93] Reibel AT, Müller SS, Pektor S, Bausbacher N, Miederer M, Frey H, et al. Fate of linear and branched polyether-lipids *in vivo* in comparison to their liposomal formulations by <sup>18</sup>F-radiolabeling and positron emission tomography. *Biomacromolecules* 2015;16:842–51.
- [94] Bailly C, Cléry P-F, Faivre-Chauvet A, Bourgeois M, Guérard F, Haddad F, et al. Immuno-PET for clinical theranostic approaches. *Int J Mol Sci* 2016;18:57.
- [95] International Atomic Energy Agency. *Cyclotron produced radionuclides: physical characteristics and production methods*. Tech. Reports Ser. No. 468, Vienna: IAEA; 2009.
- [96] Schubiger PA, Lehmann L, Friebe M, editors. *PET chemistry*. Springer Berlin Heidelberg; 2007.
- [97] Guillaume M, Luxen A, Nebeling B, Argentini M, Clark JC, Pike VW. Recommendations for fluorine-18 production. *Int J Radiat Appl Instrumentation Part A Appl Radiat Isot* 1991;42:749–62.
- [98] Park BK, Kitteringham NR, O'Neill PM. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:443–70.

- [99] Hamacher K, Coenen HH, Stöcklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-<sup>18</sup>F-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med* 1986;27:235–8.
- [100] Smith A, Barnes A. PET/CT in brain disorders. Cham: Springer International Publishing; 2019.
- [101] d’Amico A. Review of clinical practice utility of positron emission tomography with <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose in assessing tumour response to therapy. *Radiol Med* 2015;120:345–51.
- [102] Zhuang H, Codreanu I. Growing applications of FDG PET-CT imaging in non-oncologic conditions. *J Biomed Res* 2015;29:189–202.
- [103] Wester HJ, Herz M, Weber W, Heiss P, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, et al. Synthesis and radiopharmacology of *O*-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J Nucl Med* 1999;40:205–12.
- [104] Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chemie Int Ed* 2001;40:2004–21.
- [105] Kettenbach K, Schieferstein H, Ross TL. <sup>18</sup>F-labeling using click cycloadditions. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–16.
- [106] Huisgen R. 1,3-Dipolar cycloaddition. *Proc Chem Soc* 1961:357–69.
- [107] Bock VD, Hiemstra H, van Maarseveen JH. Cu<sup>I</sup>-catalyzed alkyne–azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European J Org Chem* 2006;2006:51–68.
- [108] Rostovtsev V V., Green LG, Fokin V V., Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew Chemie Int Ed* 2002;41:2596–9.
- [109] Worrell BT, Malik JA, Fokin V V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science (80- )* 2013;340:457–60.
- [110] Sia J, Szymd R, Hau E, Gee HE. Molecular mechanisms of radiation-induced cancer cell death: a primer. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:1–8.
- [111] Rösch F. Radiolanthanides in endoradiotherapy: an overview. *Radiochim Acta* 2007;95:303–11.
- [112] Yeong C, Cheng M, Ng K. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *J Zhejiang Univ Sci B* 2014;15:845–63.
- [113] Wheat J, Currie G, Davidson R, Kiat H. Radionuclide therapy. *Radiographer* 2011;58:53–9.
- [114] Xue Y-L, Qiu Z-L, Perotti G, Salvatori M, Luo Q-Y. <sup>131</sup>I SPECT/CT: a one-station imaging modality in the management of differentiated thyroid cancer. *Clin Transl Imaging* 2013;1:163–73.
- [115] Lewis JS, Laforest R, Buettner TL, Song S-K, Fujibayashi Y, Connett JM, et al. Copper-64-diacetyl-bis(*N*<sup>4</sup>-methylthiosemicarbazone): an agent for radiotherapy. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:1206–11.
- [116] Ehlerding EB, Ferreira CA, Aluicio-Sarduy E, Jiang D, Lee HJ, Theuer CP, et al. <sup>86/90</sup>Y-based theranostics targeting angiogenesis in a murine breast cancer model. *Mol Pharm* 2018;15:2606–13.
- [117] Werner RA, Bluemel C, Allen-Auerbach MS, Higuchi T, Herrmann K. <sup>68</sup>Gallium- and <sup>90</sup>Yttrium-/<sup>177</sup>Lutetium: “theranostic twins” for diagnosis and treatment of NETs. *Ann Nucl Med* 2015;29:1–7.

- [118] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Browne E, Chevchev V, Kuzmenko N, et al. Table of radionuclides. vol. 2. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2004.
- [119] Makvandi M, Dupis E, Engle JW, Nortier FM, Fassbender ME, Simon S, et al. Alpha-emitters and targeted alpha therapy in oncology: from basic science to clinical investigations. *Target Oncol* 2018;13:189–203.
- [120] Robertson AKH, Ramogida CF, Schaffer P, Radchenko V. Development of  $^{225}\text{Ac}$  radiopharmaceuticals: TRIUMF perspectives and experiences. *Curr Radiopharm* 2018;11:156–72.
- [121] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Browne E, Chevchev V, Kuzmenko N, et al. Table of radionuclides. vol. 4. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2008.
- [122] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Mougeot X, Browne E, Chevchev V, et al. Table of radionuclides. vol. 5. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2010.
- [123] Gopalakrishna A, Suryanarayana SV, Naik H, Dixit TS, Nayak BK, Kumar A, et al. Production, separation and supply prospects of  $^{67}\text{Cu}$  with the development of fast neutron sources and photonuclear technology. *Radiochim Acta* 2018;106:549–57.
- [124] Siwowska K, Guzik P, Domnanich KA, Monné Rodríguez JM, Bernhardt P, Ponsard B, et al. Therapeutic potential of  $^{47}\text{Sc}$  in comparison to  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{90}\text{Y}$ : preclinical investigations. *Pharmaceutics* 2019;11:424.
- [125] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Browne E, Baglin C, Chevchev V, et al. Table of radionuclides. vol. 3. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2006.
- [126] Dash A, Pillai MRA, Knapp FF. Production of  $^{177}\text{Lu}$  for targeted radionuclide therapy: available options. *Nucl Med Mol Imaging (2010)* 2015;49:85–107.
- [127] Wells WH, Wells VL. The lanthanides, rare earth elements. *Patty's Toxicol.*, vol. 1, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012, p. 817–40.
- [128] Banerjee S, Pillai MRA, Knapp FF. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chem Rev* 2015;115:2934–74.
- [129] Hosono M, Ikebuchi H, Nakamura Y, Nakamura N, Yamada T, Yanagida S, et al. Manual on the proper use of lutetium-177-labeled somatostatin analogue (Lu-177-DOTA-TATE) injectable in radionuclide therapy (2nd ed.). *Ann Nucl Med* 2018;32:217–35.
- [130] Forrer F, Uusijärvi H, Storch D, Maecke HR, Mueller-Brand J. Treatment with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC. *J Nucl Med* 2005;46:1310–6.
- [131] Lapa C, Kircher M, Hänscheid H, Schirbel A, Grigoleit GU, Klinker E, et al. Peptide receptor radionuclide therapy as a new tool in treatment-refractory sarcoidosis - initial experience in two patients. *Theranostics* 2018;8:644–9.
- [132] Demirci E, Kabasakal L, Toklu T, Ocak M, Şahin OE, Alan-Selcuk N, et al.  $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE therapy in patients with neuroendocrine tumours including high-grade (WHO G3) neuroendocrine tumours: response to treatment and long-term survival update. *Nucl Med Commun* 2018;39:789–96.
- [133] Kasi PM, Sharma A, Jain MK. Expanding the indication for novel theranostic  $^{177}\text{Lu}$ -Dotatate peptide receptor radionuclide therapy: proof-of-concept of PRRT in Merkel cell cancer. *Case Rep Oncol* 2019;12:98–103.

- [134] Bräuer A, Grubert LS, Roll W, Schrader AJ, Schäfers M, Bögemann M, et al. <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 radioligand therapy and outcome in patients with metastasized castration-resistant prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44:1663–70.
- [135] Heck MM, Tauber R, Schwaiger S, Retz M, D'Alessandria C, Maurer T, et al. Treatment outcome, toxicity, and predictive factors for radioligand therapy with <sup>177</sup>Lu-PSMA-I&T in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol* 2019;75:920–6.
- [136] Wester H-J, Schottelius M. PSMA-targeted radiopharmaceuticals for imaging and therapy. *Semin Nucl Med* 2019;49:302–12.
- [137] Barbet J, Bardiès M, Bourgeois M, Chatal J-F, Chérel M, Davodeau F, et al. Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. In: Chames P, editor. *Methods Mol. Biol.*, vol. 907. 2nd ed., Springer; 2012, p. 681–97.
- [138] Tagawa ST, Milowsky MI, Morris M, Vallabhajosula S, Christos P, Akhtar NH, et al. Phase II study of lutetium-177–labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19:5182–91.
- [139] Tagawa ST, Vallabhajosula S, Christos PJ, Jhanwar YS, Batra JS, Lam L, et al. Phase 1/2 study of fractionated dose lutetium-177–labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 (<sup>177</sup>Lu-J591) for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer* 2019;125:cncr.32072.
- [140] Ghodsirad MA, Pirayesh E, Akbarian R, Javanmard B, Kaghazchi F, Tavakoli M, et al. Diagnostic utility of lutetium-177 (Lu 177) prostate-specific membrane antigen (PSMA) scintigraphy in prostate cancer patients with PSA rise and negative conventional imaging. *Urol J* 2020;17:374–8.
- [141] Baum RP, Kulkarni HR. THERANOSTICS: from molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy - the Bad Berka experience. *Theranostics* 2012;2:437–47.
- [142] Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 2014;43:260–90.
- [143] Stasiuk GJ, Long NJ. The ubiquitous DOTA and its derivatives: the impact of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid on biomedical imaging. *Chem Commun* 2013;49:2732.
- [144] Boros E, Holland JP. Chemical aspects of metal ion chelation in the synthesis and application antibody-based radiotracers. *J Label Compd Radiopharm* 2018;61:652–71.
- [145] Milenic DE, Garmestani K, Chappell LL, Dadachova E, Yordanov A, Ma D, et al. *In vivo* comparison of macrocyclic and acyclic ligands for radiolabeling of monoclonal antibodies with <sup>177</sup>Lu for radioimmunotherapeutic applications. *Nucl Med Biol* 2002;29:431–42.
- [146] Hens M, Vaidyanathan G, Zhao XG, Bigner DD, Zalutsky MR. Anti-EGFRvIII monoclonal antibody armed with <sup>177</sup>Lu: *in vivo* comparison of macrocyclic and acyclic ligands. *Nucl Med Biol* 2010;37:741–50.
- [147] Thakral P, Singla S, Yadav MP, Vasisht A, Sharma A, Gupta SK, et al. An approach for conjugation of <sup>177</sup>Lu- DOTA-SCN-rituximab (Biosim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non Hodgkins lymphoma patients. *Indian J Med Res* 2014;139:544–54.
- [148] Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Johari Daha F. Synthesis and biodistribution studies of <sup>177</sup>Lu-trastuzumab as a therapeutic agent in the breast cancer mice model. *J Label Compd Radiopharm* 2010;53:575–9.



- [149] Okoye NC, Baumeister JE, Najafi Khosroshahi F, Hennkens HM, Jurisson SS. Chelators and metal complex stability for radiopharmaceutical applications. *Radiochim Acta* 2019;107:1087–120.
- [150] Baranyai Z, Tircsó G, Rösch F. The use of the macrocyclic chelator DOTA in radiochemical separations. *Eur J Inorg Chem* 2020;2020:36–56.
- [151] Lehn JM. Cryptates: macropolycyclic inclusion complexes. *Pure Appl Chem* 1977;49:857–70.
- [152] Kalsani V, Schmittl M, Listorti A, Accorsi G, Armaroli N. Novel phenanthroline ligands and their kinetically locked copper(I) complexes with unexpected photophysical properties. *Inorg Chem* 2006;45:2061–7.
- [153] Zeng D, Zeglis BM, Lewis JS, Anderson CJ. The growing impact of bioorthogonal click chemistry on the development of radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 2013;54:829–32.
- [154] Notni J, Wester H-J. A practical guide on the synthesis of metal chelates for molecular imaging and therapy by means of click chemistry. *Chem - A Eur J* 2016;22:11500–8.
- [155] Reiner T, Keliher EJ, Earley S, Marinelli B, Weissleder R. Synthese und *in-vivo*-Bildgebung eines <sup>18</sup>F-markierten PARP1-Inhibitors mithilfe eines chemisch orthogonalen, Abfangreagens-gestützten Hochdurchsatzverfahrens. *Angew Chemie* 2011;123:1963–6.
- [156] Zeglis BM, Sevak KK, Reiner T, Mohindra P, Carlin SD, Zanzonico P, et al. A pretargeted PET imaging strategy based on bioorthogonal Diels–Alder click chemistry. *J Nucl Med* 2013;54:1389–96.
- [157] Karver MR, Weissleder R, Hilderbrand SA. Synthesis and evaluation of a series of 1,2,4,5-tetrazines for bioorthogonal conjugation. *Bioconjug Chem* 2011;22:2263–70.
- [158] Hu X, Zhao X, He B, Zhao Z, Zheng Z, Zhang P, et al. A simple approach to bioconjugation at diverse levels: metal-free click reactions of activated alkynes with native groups of biotargets without prefunctionalization. *Research* 2018;2018:1–12.
- [159] Ray Banerjee S, Pullambhatla M, Foss CA, Falk A, Byun Y, Nimmagadda S, et al. Effect of chelators on the pharmacokinetics of <sup>99m</sup>Tc-labeled imaging agents for the prostate-specific membrane antigen (PSMA). *J Med Chem* 2013;56:6108–21.
- [160] Dahlsson Leitao C, Rinne S, Mitran B, Vorobyeva A, Andersson K, Tolmachev V, et al. Molecular design of HER3-targeting affibody molecules: influence of chelator and presence of HEHEHE-tag on biodistribution of <sup>68</sup>Ga-labeled tracers. *Int J Mol Sci* 2019;20:1080.
- [161] Evans BJ, King AT, Katsifis A, Matesic L, Jamie JF. Methods to enhance the metabolic stability of peptide-based PET radiopharmaceuticals. *Molecules* 2020;25.
- [162] Rogers BE, Della Manna D, Safavy A. *In vitro* and *In vivo* evaluation of a <sup>64</sup>Cu-labeled polyethylene glycol-bombesin conjugate. *Cancer Biother Radiopharm* 2004;19:25–34.
- [163] Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev* 2010;110:2858–902.
- [164] Olsen JO, Pozderac R V., Hinkle G, Hill T, O’Dorisio TM, Schirmer WJ, et al. Somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors with indium-111 pentetretotide (Octreoscan). *Semin Nucl Med* 1995;25:251–61.
- [165] Taneja SS. ProstaScint(R) scan: contemporary use in clinical practice. *Rev Urol* 2004;6:S19-28.

- [166] Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Brechbiel MW, Wu C, Pai LH, et al. Comparative biodistribution of indium- and yttrium-labeled B3 monoclonal antibody conjugated to either 2-(*p*-SCN-Bz)-6-methyl-DTPA (1B4M-DTPA) or 2-(*p*-SCN-Bz)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (2B-DOTA). *Eur J Nucl Med* 1994;21:640–6.
- [167] Wiseman GA, White CA, Sparks RB, Erwin WD, Podoloff DA, Lamonica D, et al. Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized controlled trial of Zevalin™ radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;39:181–94.
- [168] Grillo-López AJ. Zevalin: the first radioimmunotherapy approved for the treatment of lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002;2:485–93.
- [169] Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Pai LH, et al. Evaluation of the serum stability and *in vivo* biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1994;35:882–9.
- [170] Baur B, Solbach C, Andreolli E, Winter G, Machulla H-J, Reske S. Synthesis, radiolabelling and *in vitro* characterization of the gallium-68-, yttrium-90- and lutetium-177-labelled PSMA ligand, CHX-A''-DTPA-DUPA-Pep. *Pharmaceuticals* 2014;7:517–29.
- [171] Wei L, Zhang X, Gallazzi F, Miao Y, Jin X, Brechbiel MW, et al. Melanoma imaging using <sup>111</sup>In-, <sup>86</sup>Y- and <sup>68</sup>Ga-labeled CHX-A''-Re(Arg<sup>11</sup>)CCMSH. *Nucl Med Biol* 2009;36:345–54.
- [172] Malmberg J, Tolmachev V, Orlova A. Imaging agents for *in vivo* molecular profiling of disseminated prostate cancer: cellular processing of [<sup>111</sup>In]-labeled CHX-A''DTPA-trastuzumab and anti-HER2 ABY-025 affibody in prostate cancer cell lines. *Exp Ther Med* 2011;2:523–8.
- [173] Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Garmestani K, et al. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med* 1999;40:166–76.
- [174] Mathias CJ, Sun Y, Welch MJ, Green MA, Thomas JA, Wade KR, et al. Targeting radiopharmaceuticals: comparative biodistribution studies of gallium and indium complexes of multidentate ligands. *Int J Radiat Appl Instrumentation Part B Nucl Med Biol* 1988;15:69–81.
- [175] Eder M, Krivoshein A V., Backer M, Backer JM, Haberkorn U, Eisenhut M. ScVEGF-PEG-HBED-CC and scVEGF-PEG-NOTA conjugates: comparison of easy-to-label recombinant proteins for [<sup>68</sup>Ga]PET imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature. *Nucl Med Biol* 2010;37:405–12.
- [176] Eder M, Wängler B, Knackmuss S, LeGall F, Little M, Haberkorn U, et al. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for <sup>68</sup>Ga-labeled small recombinant antibodies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35:1878–86.
- [177] Bois F, Noirot C, Dietemann S, Mainta IC, Zilli T, Garibotto V, et al. [<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-11 in prostate cancer: a comprehensive review. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2020;10:349–74.
- [178] Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, Gill RK, Price EW, Adam MJ, et al. RGD conjugates of the H<sub>2</sub>dedpa scaffold: synthesis, labeling and imaging with <sup>68</sup>Ga. *Nucl Med Biol* 2012;39:785–94.
- [179] Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, Price EW, Patrick BO, Wester DW, et al. Acyclic chelate with ideal properties for <sup>68</sup>Ga PET imaging agent elaboration. *J Am Chem Soc* 2010;132:15726–33.
- [180] Price EW, Zeglis BM, Cawthray JF, Ramogida CF, Ramos N, Lewis JS, et al. H<sub>4</sub>octapa-trastuzumab: versatile acyclic chelate system for <sup>111</sup>In and <sup>177</sup>Lu imaging and therapy. *J Am Chem Soc* 2013;135:12707–21.

- [181] Price EW, Edwards KJ, Carnazza KE, Carlin SD, Zeglis BM, Adam MJ, et al. A comparative evaluation of the chelators H<sub>4</sub>octapa and CHX-A''-DTPA with the therapeutic radiometal <sup>90</sup>Y. *Nucl Med Biol* 2016;43:566–76.
- [182] Oroujeni M, Garousi J, Andersson K, Löfblom J, Mitran B, Orlova A, et al. Preclinical evaluation of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DFO-ZEGFR:2377: a promising affibody-based probe for noninvasive PET imaging of EGFR expression in tumors. *Cells* 2018;7:141.
- [183] Petrik M, Umlaufova E, Raclavsky V, Palyzova A, Havlicek V, Pfister J, et al. <sup>68</sup>Ga-labelled desferrioxamine-B for bacterial infection imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021;48:372–82.
- [184] Patra M, Bauman A, Mari C, Fischer CA, Blacque O, Häussinger D, et al. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem Commun* 2014;50:11523–5.
- [185] Vugts DJ, Klaver C, Sewing C, Poot AJ, Adamzek K, Huegli S, et al. Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO\*-*p*Phe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-*p*Phe-NCS for <sup>89</sup>Zr-immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44:286–95.
- [186] Rudd SE, Roselt P, Cullinane C, Hicks RJ, Donnelly PS. A desferrioxamine B squaramide ester for the incorporation of zirconium-89 into antibodies. *Chem Commun* 2016;52:11889–92.
- [187] Holland JP. Predicting the thermodynamic stability of zirconium radiotracers. *Inorg Chem* 2020;59:2070–82.
- [188] Berg E, Gill H, Marik J, Ogasawara A, Williams S, van Dongen G, et al. Total-body PET and highly stable chelators together enable meaningful <sup>89</sup>Zr-antibody PET studies up to 30 days after injection. *J Nucl Med* 2020;61:453–60.
- [189] Chomet M, Schreurs M, Bolijn MJ, Verlaan M, Beaino W, Brown K, et al. Head-to-head comparison of DFO\* and DFO chelators: selection of the best candidate for clinical <sup>89</sup>Zr-immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021;48:694–707.
- [190] Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:250–9.
- [191] Raavé R, Sandker G, Adumeau P, Jacobsen CB, Mangin F, Meyer M, et al. Direct comparison of the *in vitro* and *in vivo* stability of DFO, DFO\* and DFOcyclo\* for <sup>89</sup>Zr-immunoPET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019;46:1966–77.
- [192] Briand M, Aulsebrook ML, Mindt TL, Gasser G. A solid phase-assisted approach for the facile synthesis of a highly water-soluble zirconium-89 chelator for radiopharmaceutical development. *Dalt Trans* 2017;46:16387–9.
- [193] Brandt M, Cowell J, Aulsebrook ML, Gasser G, Mindt TL. Radiolabelling of the octadentate chelators DFO\* and oxoDFO\* with zirconium-89 and gallium-68. *JBIC J Biol Inorg Chem* 2020;25:789–96.
- [194] Tinianow JN, Pandya DN, Pailloux SL, Ogasawara A, Vanderbilt AN, Gill HS, et al. Evaluation of a 3-hydroxypyridin-2-one (2,3-HOPO) based macrocyclic chelator for <sup>89</sup>Zr<sup>4+</sup> and its use for immunoPET imaging of HER2 positive model of ovarian carcinoma in mice. *Theranostics* 2016;6:511–21.
- [195] Deri MA, Ponnala S, Zeglis BM, Pohl G, Dannenberg JJ, Lewis JS, et al. Alternative chelator for <sup>89</sup>Zr radiopharmaceuticals: radiolabeling and evaluation of 3,4,3-(LI-1,2-HOPO). *J Med Chem* 2014;57:4849–60.

- [196] Deri MA, Ponnala S, Kozlowski P, Burton-Pye BP, Cicek HT, Hu C, et al. *p*-SCN-Bn-HOPO: a superior bifunctional chelator for <sup>89</sup>Zr immunoPET. *Bioconjug Chem* 2015;26:2579–91.
- [197] Zhai C, Summer D, Rangger C, Franssen GM, Laverman P, Haas H, et al. Novel bifunctional cyclic chelator for <sup>89</sup>Zr labeling–radiolabeling and targeting properties of RGD conjugates. *Mol Pharm* 2015;12:2142–50.
- [198] Lattuada L, Barge A, Cravotto G, Giovenzana GB, Tei L. The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem Soc Rev* 2011;40:3019.
- [199] Xia Y, Zeng C, Zhao Y, Zhang X, Li Z, Chen Y. Comparative evaluation of <sup>68</sup>Ga-labelled TATEs: the impact of chelators on imaging. *EJNMMI Res* 2020;10:36.
- [200] Afshar-Oromieh A, Hetzheim H, Kratochwil C, Benesova M, Eder M, Neels OC, et al. The theranostic PSMA ligand PSMA-617 in the diagnosis of prostate cancer by PET/CT: biodistribution in humans, radiation dosimetry, and first evaluation of tumor lesions. *J Nucl Med* 2015;56:1697–705.
- [201] Holub J, Meckel M, Kubiček V, Rösch F, Hermann P. Gallium(III) complexes of NOTA-bis (phosphonate) conjugates as PET radiotracers for bone imaging. *Contrast Media Mol Imaging* 2015;10:122–34.
- [202] Chakravarty R, Chakraborty S, Dash A, Pillai MRA. Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted <sup>68</sup>Ga with different bifunctional chelators. *Nucl Med Biol* 2013;40:197–205.
- [203] Woo S-K, Jang SJ, Seo M-J, Park JH, Kim BS, Kim EJ, et al. Development of <sup>64</sup>Cu-NOTA-trastuzumab for HER2 targeting: a radiopharmaceutical with improved pharmacokinetics for human studies. *J Nucl Med* 2019;60:26–33.
- [204] Guo X, Zhu H, Zhou N, Chen Z, Liu T, Liu F, et al. Noninvasive detection of HER2 expression in gastric cancer by <sup>64</sup>Cu-NOTA-trastuzumab in PDX mouse model and in patients. *Mol Pharm* 2018;15:5174–82.
- [205] Pandey U, Gamre N, Lohar SP, Dash A. A systematic study on the utility of CHX-A''-DTPA-NCS and NOTA-NCS as bifunctional chelators for <sup>177</sup>Lu radiopharmaceuticals. *Appl Radiat Isot* 2017;127:1–6.
- [206] Rinne SS, Dahlsson Leitao C, Gentry J, Mitran B, Abouzayed A, Tolmachev V, et al. Increase in negative charge of <sup>68</sup>Ga/chelator complex reduces unspecific hepatic uptake but does not improve imaging properties of HER3-targeting affibody molecules. *Sci Rep* 2019;9:17710.
- [207] Kang CS, Chen Y, Lee H, Liu D, Sun X, Kweon J, et al. Synthesis and evaluation of a new bifunctional NETA chelate for molecular targeted radiotherapy using <sup>90</sup>Y or <sup>177</sup>Lu. *Nucl Med Biol* 2015;42:242–9.
- [208] Chong H-S, Song HA, Kang CS, Le T, Sun X, Dadwal M, et al. A highly effective bifunctional ligand for radioimmunotherapy applications. *Chem Commun* 2011;47:5584–6.
- [209] Kang CS, Sun X, Jia F, Song HA, Chen Y, Lewis M, et al. Synthesis and preclinical evaluation of bifunctional ligands for improved chelation chemistry of <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu for targeted radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem* 2012;23:1775–82.
- [210] Pfister J, Summer D, Rangger C, Petrik M, von Guggenberg E, Minazzi P, et al. Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. *EJNMMI Res* 2015;5:74.

- [211] Greifenstein L, Grus T, Nagel J, Sinnes JP, Rösch F. Synthesis and labeling of a squaric acid containing PSMA-inhibitor coupled to AAZTA<sup>5</sup> for versatile labeling with <sup>44</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga and <sup>177</sup>Lu. *Appl Radiat Isot* 2020;156:108867.
- [212] Nagy G, Szikra D, Trencsényi G, Fekete A, Garai I, Giani AM, et al. AAZTA: an ideal chelating agent for the development of <sup>44</sup>Sc PET imaging agents. *Angew Chemie Int Ed* 2017;56:2118–22.
- [213] Sinnes J, Nagel J, Rösch F. AAZTA<sup>5</sup>/AAZTA<sup>5</sup>-TOC: synthesis and radiochemical evaluation with <sup>68</sup>Ga, <sup>44</sup>Sc and <sup>177</sup>Lu. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2019;4:18.
- [214] Greifenstein L, Späth D, Sinnes JP, Grus T, Rösch F. Mild and efficient <sup>64</sup>Cu labeling of perhydro-1,4-diazepine derivatives for potential use with large peptides, proteins and antibodies. *Radiochim Acta* 2020;108:555–63.
- [215] Aime S, Calabi L, Cavallotti C, Gianolio E, Giovenzana GB, Losi P, et al. [Gd-AAZTA]-: a new structural entry for an improved generation of MRI contrast agents. *Inorg Chem* 2004;43:7588–90.
- [216] Manzoni L, Belvisi L, Arosio D, Bartolomeo MP, Bianchi A, Brioschi C, et al. Synthesis of Gd and <sup>68</sup>Ga complexes in conjugation with a conformationally optimized RGD sequence as potential MRI and PET tumor-imaging probes. *ChemMedChem* 2012;7:1084–93.
- [217] Waldron BP, Parker D, Burchardt C, Yufit DS, Zimny M, Roesch F. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. *Chem Commun* 2013;49:579–81.
- [218] Seemann J, Waldron BP, Roesch F, Parker D. Approaching 'kit-type' labelling with <sup>68</sup>Ga: the DATA chelators. *ChemMedChem* 2015;10:1019–26.
- [219] Parker D, Waldron BP. Conformational analysis and synthetic approaches to polydentate perhydro-diazepine ligands for the complexation of gallium(iii). *Org Biomol Chem* 2013;11:2827.
- [220] Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type <sup>68</sup>Ga labelling of TOC at ambient temperature. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2017;1:4.
- [221] Sinnes J-P, Nagel J, Waldron BP, Maina T, Nock BA, Bergmann RK, et al. Instant kit preparation of <sup>68</sup>Ga-radiopharmaceuticals via the hybrid chelator DATA: clinical translation of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DATA-TOC. *EJNMMI Res* 2019;9:48.
- [222] Yadav D, Ballal S, Yadav MP, Tripathi M, Roesch F, Bal C. Evaluation of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DATA-TOC for imaging of neuroendocrine tumours: comparison with [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-NOC PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2020;47:860–9.
- [223] Wurm FR, Klok H-A. Be squared: expanding the horizon of squaric acid-mediated conjugations. *Chem Soc Rev* 2013;42:8220.
- [224] Wang Y, Stucky GD, Williams JM. Is squaric acid square? A combined X-ray and neutron diffraction study of 3,4-dihydroxycyclobut-3-ene-1,2-dione. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1974:35.
- [225] Cerioni G, Janoschek R, Rappoport Z, Tidwell TT. Cyclobutene-1,2-diones. A theoretical and spectroscopic study. *J Org Chem* 1996;61:6212–7.
- [226] West R, Powell DL. New aromatic anions. III. Molecular orbital calculations on oxygenated anions. *J Am Chem Soc* 1963;85:2577–9.
- [227] Marchetti LA, Kumawat LK, Mao N, Stephens JC, Elmes RBP. The versatility of squaramides: from supramolecular chemistry to chemical biology. *Chem* 2019;5:1398–485.

- [228] Tietze LF, Arlt M, Beller M, Glüsenkamp K, Jähde E, Rajewsky MF, et al. Squaric acid diethyl ester: a new coupling reagent for the formation of drug biopolymer conjugates. Synthesis of squaric acid ester amides and diamides. *Chem Ber* 1991;124:1215–21.
- [229] Quiñonero D, Frontera A, Ballester P, Deyà PM. A theoretical study of aromaticity in squaramide and oxocarbons. *Tetrahedron Lett* 2000;41:2001–5.
- [230] Dingels C, Wurm F, Wagner M, Klok H-A, Frey H. Squaric acid mediated chemoselective PEGylation of proteins: reactivity of single-step-activated  $\alpha$ -amino poly(ethylene glycol)s. *Chem - A Eur J* 2012;18:16828–35.
- [231] Greifenstein L, Engelbogen N, Lahnif H, Sinnes J, Bergmann R, Bachmann M, et al. Synthesis, labeling and preclinical evaluation of a squaric acid containing PSMA inhibitor labeled with  $^{68}\text{Ga}$ : a comparison with PSMA-11 and PSMA-617. *ChemMedChem* 2020;15:695–704.
- [232] Moon ES, Elvas F, Vliegen G, De Lombaerde S, Vangestel C, De Bruycker S, et al. Targeting fibroblast activation protein (FAP): next generation PET radiotracers using squaramide coupled bifunctional DOTA and DATA<sup>5m</sup> chelators. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2020;5:19.
- [233] Kaufmann SHE. *Basiswissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
- [234] Sagaert X, De Wolf-Peeters C. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunol Lett* 2003;90:179–86.
- [235] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495–7.
- [236] Smith SL. Ten years of orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *J Transpl Coord* 1996;6:109–21.
- [237] Köhler G. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Nobel Lect* 1984.
- [238] Sgro C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* 1995;105:23–9.
- [239] Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Quantitative and specific molecular imaging of cancer with labeled engineered monoclonal antibody fragments. *Ther Deliv* 2011;2:345–58.
- [240] Taieb J, Moehler M, Boku N, Ajani JA, Yañez Ruiz E, Ryu M-H, et al. Evolution of checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic gastric cancers: current status and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 2018;66:104–13.
- [241] Alibakhshi A, Abarghooi Kahaki F, Ahangarzadeh S, Yaghoobi H, Yarian F, Arezumand R, et al. Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. *J Control Release* 2017;268:323–34.
- [242] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1126–36.
- [243] Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol* 2007;34:757–78.
- [244] Richter WS, Ivancevic V, Meller J, Lang O, Le Guludec D, Szilvazi I, et al.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -besilesomab (Scintimun®) in peripheral osteomyelitis: comparison with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled white blood cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:899–910.
- [245] Quigley A-M, Gnanasegaran G, Buscombe JR, Hilson AJW. Technetium-99m-labelled sulesomab (LeukoScan) in the evaluation of soft tissue infections. *Med Princ Pract* 2008;17:447–52.

- [246] Kolstad A, Illidge T, Bolstad N, Spetalen S, Madsbu U, Stokke C, et al. Phase 1/2a study of <sup>177</sup>Lu-lilotomab satetraxetan in relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphoma. *Blood Adv* 2020;4:4091–101.
- [247] Moek KL, Giesen D, Kok IC, de Groot DJA, Jalving M, Fehrmann RSN, et al. Theranostics using antibodies and antibody-related therapeutics. *J Nucl Med* 2017;58:835-905.
- [248] Laforest R, Lapi SE, Oyama R, Bose R, Tabchy A, Marquez-Nostra B V., et al. [<sup>89</sup>Zr]Trastuzumab: evaluation of radiation dosimetry, safety, and optimal imaging parameters in women with HER2-positive breast cancer. *Mol Imaging Biol* 2016;18:952–9.
- [249] Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Durack JC, Lyashchenko SK, Cheal SM, Beylergil V, et al. A phase I/II study for analytic validation of <sup>89</sup>Zr-J591 ImmunPET as a molecular imaging agent for metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:5277–85.
- [250] van Es SC, Brouwers AH, Mahesh SVK, Leliveld-Kors AM, de Jong IJ, Lub-de Hooge MN, et al. <sup>89</sup>Zr-bevacizumab PET: potential early indicator of everolimus efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Nucl Med* 2017;58:905–10.
- [251] White JM, Escorcía FE, Viola NT. Perspectives on metals-based radioimmunotherapy (RIT): moving forward. *Theranostics* 2021;11:6293–314.
- [252] Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol* 2010;25:61–74.
- [253] Knop S, Hebart H, Gratwohl A, Kliem C, Faul C, Holler E, et al. Treatment of steroid-resistant acute GVHD with OKT3 and high-dose steroids results in better disease control and lower incidence of infectious complications when compared to high-dose steroids alone: a randomized multicenter trial by the EBMT chronic leukemia working party. *Leukemia* 2007;21:1830–3.
- [254] Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: a review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev* 2020;86:102017.
- [255] Turkbey B, Kobayashi H, Ogawa M, Bernardo M, Choyke PL. Imaging of tumor angiogenesis: functional or targeted? *Am J Roentgenol* 2009;193:304–13.
- [256] Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J Cancer* 2016;7:1281–94.
- [257] Stergiou N, Nagel J, Pektor S, Heimes AS, Jäkel J, Brenner W, et al. Evaluation of a novel monoclonal antibody against tumor-associated MUC1 for diagnosis and prognosis of breast cancer. *Int J Med Sci* 2019;16:1188–98.
- [258] Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 2014;20:332–42.
- [259] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles D., Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1999;1455:301–13.
- [260] Miller-Kleinhenz JM, Bozeman EN, Yang L. Targeted nanoparticles for image-guided treatment of triple-negative breast cancer: clinical significance and technological advances. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* 2015;7:797–816.
- [261] Siroy A, Abdul-Karim FW, Miedler J, Fong N, Fu P, Gilmore H, et al. MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Hum Pathol* 2013;44:2159–66.

- [262] Brockhausen I, Yang J-M, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 1995;233:607–17.
- [263] Palitzsch B, Gaidzik N, Stergiou N, Stahn S, Hartmann S, Gerlitzki B, et al. A synthetic glycopeptide vaccine for the induction of a monoclonal antibody that differentiates between normal and tumor mammary cells and enables the diagnosis of human pancreatic cancer. *Angew Chemie Int Ed* 2016;55:2894–8.
- [264] Gaidzik N, Kaiser A, Kowalczyk D, Westerlind U, Gerlitzki B, Sinn HP, et al. Synthetic antitumor vaccines containing MUC1 glycopeptides with two immunodominant domains-induction of a strong immune response against breast tumor tissues. *Angew Chemie Int Ed* 2011;50:9977–81.
- [265] Talevi A, Bellera CL. Drug excretion. *ADME Process. Pharm. Sci.*, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 81–96.
- [266] Alley SC, Okeley NM, Senter PD. Antibody–drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14:529–37.
- [267] Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology* 2018;16:71.
- [268] Caliceti P. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)–protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1261–77.
- [269] Peng C, Huang Y, Zheng J. Renal clearable nanocarriers: overcoming the physiological barriers for precise drug delivery and clearance. *J Control Release* 2020;322:64–80.
- [270] Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63:136–51.
- [271] Lee JH, Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem Eng Sci* 2015;125:75–84.
- [272] Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* 2015;10:975.
- [273] Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238-IN27.
- [274] Gregoriadis G, Ryman BE. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J* 1971;124:58P-58P.
- [275] Lu Z, Laney VEA, Hall R, Ayat N. Environment-responsive lipid/siRNA nanoparticles for cancer therapy. *Adv Healthc Mater* 2021;10:2001294.
- [276] Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface* 2014;11:20140459.
- [277] Briuglia M-L, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposome stability and on *in vitro* drug release. *Drug Deliv Transl Res* 2015;5:231–42.
- [278] Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li S-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release* 2013;172:782–94.
- [279] Whiteman KR, Subr V, Ulbrich K, Torchilin VP. Poly(HPMA)-coated liposomes demonstrate prolonged circulation in mice. *J Liposome Res* 2001;11:153–64.



- [280] Hofmann AM, Wurm F, Hühn E, Nawroth T, Langguth P, Frey H. Hyperbranched polyglycerol-based lipids via oxyanionic polymerization: toward multifunctional stealth liposomes. *Biomacromolecules* 2010;11:568–74.
- [281] Wagener K, Worm M, Pektor S, Schinnerer M, Thiermann R, Miederer M, et al. Comparison of linear and hyperbranched polyether lipids for liposome shielding by <sup>18</sup>F-radiolabeling and positron emission tomography. *Biomacromolecules* 2018;19:2506–16.
- [282] Okarvi SM. Recent developments of prostate-specific membrane antigen (PSMA)-specific radiopharmaceuticals for precise imaging and therapy of prostate cancer: an overview. *Clin Transl Imaging* 2019;7:189–208.
- [283] Kopka K, Benešová M, Bařinka C, Haberkorn U, Babich J. Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers. *J Nucl Med* 2017;58:17S-26S.



## 5. Manuskripte

Die vorliegende Arbeit basiert auf mehreren Manuskripten, welche zusammen mit der jeweiligen Autorenbeteiligung im Folgenden aufgelistet sind.

### 5.1 "Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD"

[REDACTED], Benedikt Klasen, [REDACTED]  
[REDACTED]

\*gleichwertige Beteiligung

§geteilte Seniorautorenschaft

publiziert in *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2020; 47: 1314–25.

verwendet mit Genehmigung von *Springer Nature* (Lizenznr.: 5025841357770), © Springer-Verlag GmbH Germany, Teil von Springer Nature 2019.

Autorenbeteiligung: Die Konzeption und Planung der Experimente sowie die Vorbereitung und Injektion humaner PBMC und T<sub>reg</sub> wurde von [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt. [REDACTED] war für die Kontrolle und Bewertung der Krankheitsentwicklung und Symptomatik der Tiere zuständig. Die Antikörperkonjugation sowie radiochemische Synthese, Evaluierung und Optimierung erfolgte durch B. Klasen. Sämtliche Tierversuche unter Verwendung des radiomarkierten Antikörpers wurden von [REDACTED], B. Klasen und [REDACTED] durchgeführt. [REDACTED] war für PET/MRT-Messungen und deren Auswertung zuständig. *Ex vivo*-Biodistributionsstudien wurden von [REDACTED] und B. Klasen durchgeführt und von B. Klasen ausgewertet. FACS-Messungen und entsprechende Auswertungen erfolgten durch [REDACTED]. [REDACTED] führte die immunhistochemischen Analysen durch. [REDACTED] assistierte bei den Tierversuchen und der Tierpflege. [REDACTED] und B. Klasen verfassten das Manuskript. [REDACTED] und [REDACTED] stellten die notwendige Infrastruktur zur Verfügung und trugen zur Interpretation der Ergebnisse bei. [REDACTED] und [REDACTED] waren für die Organisation und Leitung des Projekts zuständig.

### 5.2 "Development and in vitro evaluation of new bifunctional <sup>89</sup>Zr-chelators based on the 6-amino-1,4-diazepane scaffold for immuno-PET applications"

Benedikt Klasen, [REDACTED]

publiziert in *Nuclear Medicine and Biology* 2021; 102–103: 12–13.

verwendet im Rahmen der Autorenrechte mit Genehmigung von *Elsevier*, © 2021 Elsevier Inc.

Autorenbeteiligung: B. Klasen plante und konzipierte die gesamte Studie und verfasste das Manuskript. B. Klasen und [REDACTED] waren für die organische Synthese und anschließende Charakterisierung zuständig. B. Klasen führte die radiochemischen Synthesen und Evaluierungen sowie die Auswertung der Ergebnisse durch. [REDACTED] und [REDACTED] trugen zur Interpretation der Ergebnisse bei. [REDACTED] leitete das gesamte Projekt.

### **5.3 “AAZTA<sup>5</sup>-squaramide ester competing with DOTA-, DTPA- and CHX-A“-DTPA-analogues: promising tool for <sup>177</sup>Lu-labeling of monoclonal antibodies under mild conditions”**

Benedikt Klasen, [REDACTED]

publiziert in *Nuclear Medicine and Biology* 2021; 96–97: 80–93.

verwendet im Rahmen der Autorenrechte mit Genehmigung von Elsevier, © 2021 Elsevier Inc.

Autorenbeteiligung: B. Klasen plante und konzipierte die vorliegende Studie und schrieb das Manuskript. B. Klasen und [REDACTED] waren für organische und radiochemische Synthesen und Evaluierungen zuständig. B. Klasen führte die Auswertung der Ergebnisse durch. [REDACTED] leitete das gesamte Projekt.

### **5.4 “<sup>177</sup>Lu-labeling, in vitro and in vivo evaluation of a highly potential, AAZTA<sup>5</sup>-squaramide functionalized anti-hu(TA)MUC1 antibody: a promising approach for radioimmunotherapy of breast cancer”**

Benedikt Klasen\*, [REDACTED]

\*gleichwertige Beteiligung

§gemeinsame Seniorautorenschaft

in Bearbeitung zur Veröffentlichung.

Autorenbeteiligung: B. Klasen und [REDACTED] planten und konzipierten die vorliegende Studie und verfassten das Manuskript. B. Klasen führte die organische und radiochemische Synthese, Evaluierung und Auswertung durch. Die Antikörperkonjugation sowie Aufreinigung und Charakterisierung des Immunkonjugats erfolgte durch B. Klasen und [REDACTED]. [REDACTED] war für die Zellkultur, FACS-Messungen und Tierpflege verantwortlich. B. Klasen und [REDACTED] führten *in vitro*-Zellbindungsstudien und *in vivo*-Experimente und Analysen unter Verwendung des radiomarkierten Antikörpers durch. B. Klasen war für die Auswertung der Messergebnisse zuständig. [REDACTED] und [REDACTED] leiteten das gesamte Projekt.

**5.5 “<sup>18</sup>F-labeled, PSMA-specific liposomes: promising and PET-traceable tool for future targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer”**

██████████, Benedikt Klasen\*, ██████████

\*gleichwertige Beteiligung

in Bearbeitung zur Veröffentlichung.

Autorenbeteiligung: ██████████, B. Klasen und ██████████ planten und konzipierten die vorliegende Studie und verfassten das Manuskript. ██████████ war für die Synthese und Charakterisierung der Alkin-funktionalisierten Polyetherlipide zuständig. ██████████ führte die Synthese des Azid-tragenden KuE-Derivats durch. Die KuE-Funktionalisierung der Polyetherlipide und anschließende Aufreinigung und Charakterisierung erfolgte durch ██████████, B. Klasen und ██████████. B. Klasen und ██████████ waren für die radiochemische Synthese und Evaluierung sowie Herstellung und Aufreinigung der Liposome zuständig. ██████████ und ██████████ leiteten das gesamte Projekt.



**5.1 Teilprojekt A: *Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD***





# Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD

[redacted], Benedikt Klasen<sup>3</sup>, [redacted]  
[redacted]  
[redacted]

[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
<sup>3</sup>*Department of Chemistry – TRIGA site, Johannes Gutenberg University Mainz,  
Fritz-Strassmann Weg 2, D-55128 Mainz, Germany*

[redacted]  
[redacted]  
*\*equal contribution*

*§shared senior authorship*

## ABSTRACT

**Purpose:** Hematopoietic stem cell transplantation is the only curative treatment for several hematological malignancies and immune deficiency syndromes. Nevertheless, the development of graft-versus-host-disease (GvHD) after transplantation is a severe complication with high morbidity and mortality. The aim of this study was to image human T cells during GvHD development and their migration into GvHD-related organs. By using a radiolabeled anti-human CD3 monoclonal antibody (mAb) we were able to visualize GvHD progression in a humanized mouse model.

**Methods:** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were transferred into immunodeficient mice (initially  $n = 11$  mice/group) to induce GvHD. One group additionally received regulatory T cells ( $T_{reg}$ ) for prevention of GvHD. T cell migration was visualized by sequential small animal PET/MRI using  $^{89}Zr$ -labeled anti-human CD3 mAb. Flow cytometry and immunohistochemistry was used to measure T cell frequencies in relevant organs at different time points after engraftment.

**Results:** Using radiolabeled anti-CD3 mAb, we successfully visualized human T cells in inflamed organs of mice by  $^{89}Zr$ -anti-CD3-PET/MRI. Upon GvHD progression we observed increased numbers of  $CD3^+$  T cells in liver (22.9% on day 3, 94.2% on day 10) and spleen (4.4% on day 3, 58.8% on day 10) which correlated with clinical symptoms. The liver showed distinct spot-like lesions representing strong focal accumulation of T cells. Administration of  $T_{reg}$  prior GvHD induction reduced T cell accumulation in the liver from  $857 \pm 177$   $CD3^+$  cells/ $mm^2$  to  $261 \pm 82$   $CD3^+$  cells/ $mm^2$  and thus prevented GvHD.

**Conclusion:**  $^{89}Zr$ -labeled anti-human CD3 mAb can be used as a proof-of-concept to detect the exact spatio-temporal distribution of GvHD-mediating T cells. In the future, radiolabeled T cell-specific mAb could be employed as a predictive early biomarker during the course of GvHD maybe even before clinical signs of the disease become evident. Furthermore, monitoring T cell migration and proliferation might improve tailored GvHD therapy.

**Keywords:** GvHD, T cell imaging,  $^{89}Zr$ -labeled anti-CD3 antibody,  $T_{reg}$ , immuno-PET/MRI, humanized mouse

## INTRODUCTION

Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells (HSC) is a potential curative therapy for selected hematological malignancies and autoimmune diseases. T cells within the donor grafts facilitate engraftment of hematopoietic cells, accelerate immune reconstitution and are crucial to immunologic tumor control. Although HSC transplantation has been used successfully for treatment of malignant and non-malignant disorders, its broad application is limited by the high incidence of graft-versus-host-disease (GvHD) [1]. The development of GvHD is the most prevalent cause of morbidity in allogeneic HSC transplant recipients and leads to up to 40% of mortality. Early following transplantation, donor T cells interact with activated host antigen presenting cells (APC, activated by the conditioning regimen before transplantation) which leads to differentiation into effector T cells with predominantly  $T_H1$  or  $T_H17$  profile for  $CD4^+$  T cells and  $T_C1$  profile for  $CD8^+$  T cells [2–4]. A massive cytokine production and upregulation of chemokines promote the recruitment of more effector cells like cytotoxic T cells, natural killer cells and macrophages leading to direct organ damage typically affecting liver, gastrointestinal tract (GIT) and skin [5].

Post HSC transplantation, GvHD can occur at any time point, but most commonly occurs either within the first few months or after reducing the dose of immunosuppressive therapy. Early diagnosis of GvHD at the onset of clinical symptoms is still a challenging problem. Besides histological confirmation via skin, liver or GIT biopsy, scientists are investigating biomarkers and combinations of those which are associated with GvHD induction and progression. However, no individual biomarker is yet ready for broad clinical application.

Using immuno-PET/MRI to visualize biomarker expression after HSC transplantation is an attractive and sensitive method. This specific technique allows distinguishing between different types of GvHD such as intestinal, cutaneous or hepatic GvHD, thus being a great benefit for further treatment options [6]. Furthermore, PET/MRI can elucidate the true spatial allocation of different donor cell subpopulations during GvHD development leading to better understanding of the kinetics of donor T cell distribution and assisting in the diagnosis and disease staging early before clinical signs become evident.

GvHD induction is dependent on the presence of T cells which get activated by host APC, thus leading to massive tissue and organ damage [7]. A well-described model for studying GvHD in the human context is the humanized mouse. Transfer of human blood mononuclear cells (PBMC) into immunodeficient mice results in GvHD mediated by donor-derived human T cells responding to xenogeneic host antigens [8,9]. GvHD mice show typical clinical symptoms such as dermatitis, colitis and hepatitis which are commonly observed in GvHD patients. Novel cell-based immunomodulatory strategies for treatment of GvHD involve the use of regulatory T cells ( $T_{reg}$ ), one mandatory cell type to maintain immune tolerance and to prevent overshooting immune responses such as in GvHD [10]. Several studies already described the successful use of adoptively transferred  $T_{reg}$  in reducing the risk of GvHD development in preclinical mouse models of HSC transfer [11,12] as well as in humans [13].

In the present study we made use of a humanized mouse model for GvHD to monitor the kinetics of T cell-mediated inflammation as well as treatment efficiency of GvHD using immuno-PET/MRI. Our aim was to investigate whether immuno-PET/MRI is a suitable method to detect proliferation of donor T cells *in vivo* and their migration into GvHD-relevant organs. As a proof-of-concept, anti-human CD3 mAb was functionalized with DFO-*p*-Ph-NCS and radiolabeled with  $^{89}Zr$  to visualize human T cells *in*

*vivo* during GvHD development. Small animal PET/MRI kinetic studies were performed to follow early and late T cell manifestations.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of human PBMC

Buffy coats and leukapheresis products were obtained from healthy donors at the University Medical Center Mainz. PBMC were isolated by standard density gradient centrifugation using Biocoll (1.077 g/ml, Biochrom) according to manufacturer's instruction. Patients provided written informed consent according to the principles expressed in the Helsinki Declaration and to the ethics committee-approved protocols (Landesärztekammer Rheinland Palatinate No. 837.019.10 (7028), approved on 4 March 2010).

### Isolation of T<sub>reg</sub>

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> were isolated from PBMC as described before [14]. Briefly, CD25<sup>+</sup> cells were enriched using limited amounts of anti-CD25 MicroBeads (Miltenyi Biotec) and depleted of contaminating CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> cells with Dynabeads (Invitrogen, Hamburg, Germany). Purity was routinely > 80%, T<sub>reg</sub> functionality was ensured in standard suppressor assays.

### Animals

3–6 weeks old Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> and NOD/Scidγc<sup>-/-</sup> (NSG) mice were obtained from the central animal facility (Translational Animal Research Center, Johannes Gutenberg-University Mainz, Germany) and were kept under specific pathogen-free conditions. All experiments were performed in accordance with relevant federal laws and institutional guidelines and approved by the ethical committee of the state of Rhineland-Palatinate (according to §8 Abs. 1 Tierschutzgesetz, Landesuntersuchungsamt).

### GvHD induction

GvHD was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 50 × 10<sup>6</sup> PBMC into adult mice alone or together with isolated syngeneic T<sub>reg</sub> at a ratio of 10:1 (PBMC:T<sub>reg</sub>). For T<sub>reg</sub> activation, T<sub>reg</sub> were pre-incubated with 1 μg/ml gp140 for 16 h at 37 °C prior to transfer into mice. Untreated mice served as controls. Body weight, activity, fur texture and skin integrity was measured every second day. Results are presented as percent mean body weight ± SEM based on initial weight.

### Synthesis of DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb

Anti-human CD3 mAb (OKT3, BioXCell) was functionalized with *p*-isothiocyanatophenyl-deferoxamine (DFO-*p*-Ph-NCS) according to the literature [15,16]. In detail, a tenfold molar excess of DFO-*p*-Ph-NCS (20.5 μl, 2.51 mg/ml in DMSO) was added to 1 ml antibody solution (1 mg/ml in PBS set to pH 9.0 with 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). The reaction mixture was shaken for 45 min at 37 °C and 550 rpm via thermomixer

(HLC Ditabis). The resulting conjugate DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb was purified via size exclusion chromatography (SEC) using a PD-10 column (GE Healthcare Life Science) and PBS as eluent.

## **PET/MRI**

Three, six, ten and 19 days after PBMC transfer mice were injected with 3–5 µg (2.0–3.3 MBq) [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb and subsequently imaged by PET/MRI on day 1, 2, 3 and 7 after antibody injection. Mice were anesthetized with 2% isoflurane and MRI measurements (Material Map for co-registration of the PET scan; 3D Gradient Echo External Averaging (GRE-EXT), Multi Field of View (FOV); slice thickness: 0.6 mm; TE: 2 ms; TR: 15 ms; flip angle: 25 deg) were performed followed by a static PET scan (collecting 20 × 10<sup>6</sup> counts) with the nanoScan PET/MRI (Mediso, Budapest, Hungary). PET data were reconstructed with Teratomo 3D (4 iterations, 6 subsets, voxel size 0.4 mm), co-registered to the MR and analyzed with Pmod software (version 3.6). Ellipsoid ROIs were manually drawn to calculate *in vivo* uptake in organs as injected dose per milliliter (% ID/ml). For *ex vivo* biodistribution studies, organs were collected, weighed and measured using a Wizard<sup>2</sup> 2470 gamma counter (PerkinElmer) to calculate the percentage of accumulated activity per gram (% ID/g).

## **Culture medium and antibodies**

PBMC and immune cells re-isolated from spleens of humanized mice were cultured in X-VIVO-15 (Lonza, Verviers, Belgium). Flow cytometric analysis was performed using the following antibodies: anti-human CD3 (UCHT1), anti-human CD4 (RPA-T4), anti-mouse CD45 (30-F11) all from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany); anti-human CD45, anti-human CD25 from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Cell viability during flow cytometric analyses was determined using fixable viability dye eFluor 506 (eBioscience, San Diego, CA, USA).

## **Flow cytometry**

For surface staining of PBMC antibodies were incubated for 30 min at 4 °C and washed twice with PBS. Stained cells were measured on FACSVia™ and data was analyzed with BD FACSVia Research Software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

## **Cell isolation from spleen and liver**

Spleen and liver were harvested at indicated time points and analyzed for infiltration of human immune cells. Organs were homogenized through a cell strainer (100 µm; BD Biosciences). Erythrocytes were lysed with ACK lysis buffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.2–7.4). Immune cells from the liver were additionally purified by density gradient centrifugation using Biocoll (Biochrom, Berlin, Germany). Single-cell preparations were used for flow cytometry.

## **GPT level**

GPT levels of GvHD and untreated mice were determined using Reflotron® GPT Plus System (Roche Diagnostics). Blood was taken at indicated time points, serum was collected using Microvette® 200 Z (Sarstedt) and GPT levels were determined according to manufacturer's protocol.

## **Immunohistochemistry**

For immunohistochemical analysis organs were fixed in PBS + 4% PFA (Roth, Karlsruhe, Germany). Fixed samples of liver and spleen of each group were embedded in paraffin, cut into 3 µm sections and stained with primary antibodies for CD3 (NCL-LCD3-565, 1:100, Novocastra), CD4 (104R-25, 1:50, Cellmarque), CD8 (M7103, 1:100, Dako) and Ki-67 (VWRKILM9252-C05, 1:50, ImmunoLogic) according to manufacturer's instructions. For visualization Dako Real ENVision detection system peroxidase/DAB kit (cat. K5007, Dako, Denmark) was used. Cell nuclei were counterstained with Hematoxylin (Dako).

## **Quantification of T cells in liver slices**

Stained slides were digitized using a NanoZoomer slide scanner (Hamamatsu, Japan) and analyzed by means of the HALO image analysis software (Indica Labs, USA). Absolute numbers of CD3 immunoreactive cells were quantified using the CytoNuclear v1.6 module and expressed as cell number per liver area. Regions with inaccurate cell detection due to tissue processing or staining artefacts were manually excluded from the analysis.

## **Statistical analysis**

Statistical significance was determined using unpaired Student's t-test. P-values of less than 0.05 were considered significant and indicated in the corresponding figures (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

## RESULTS

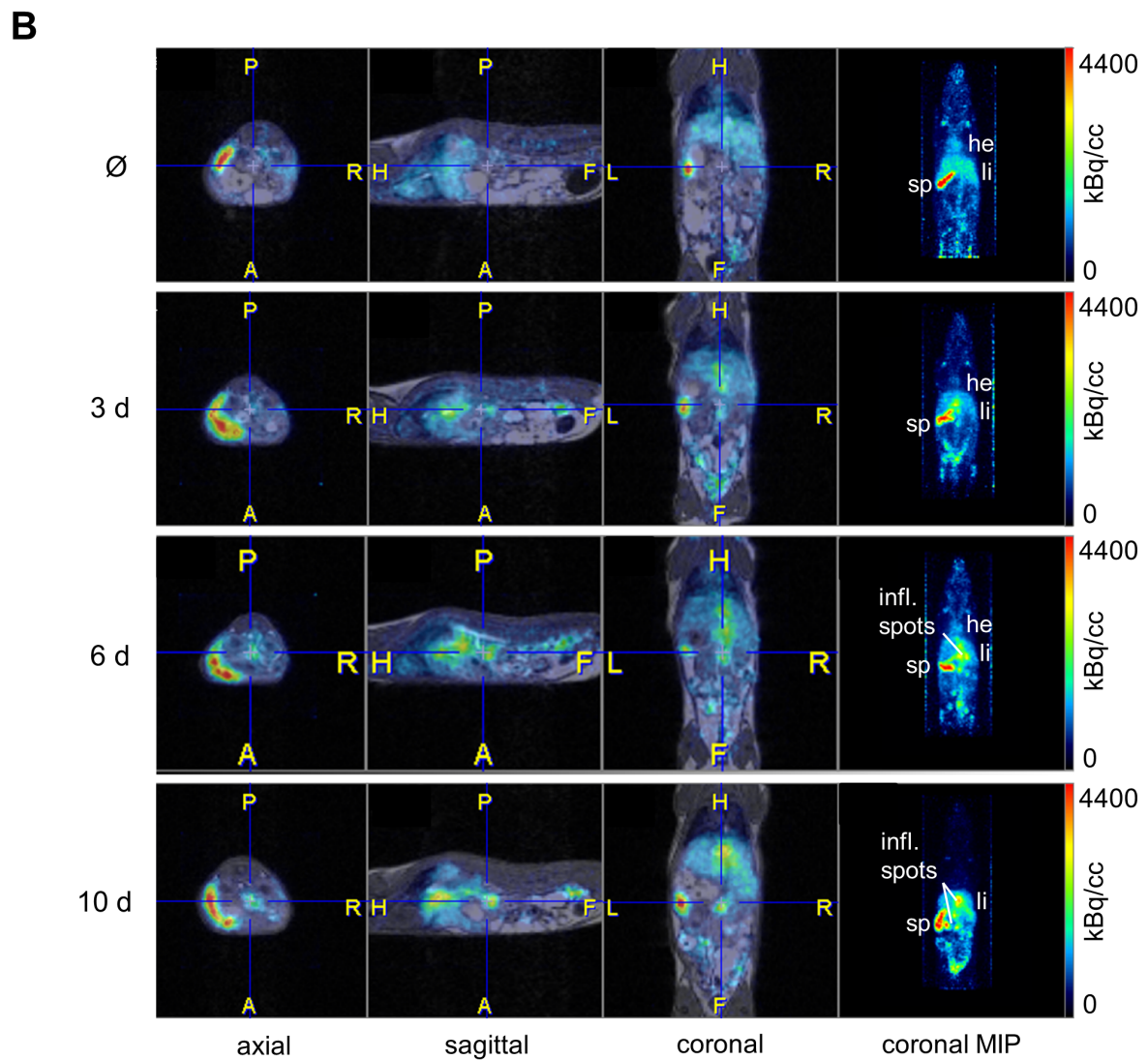
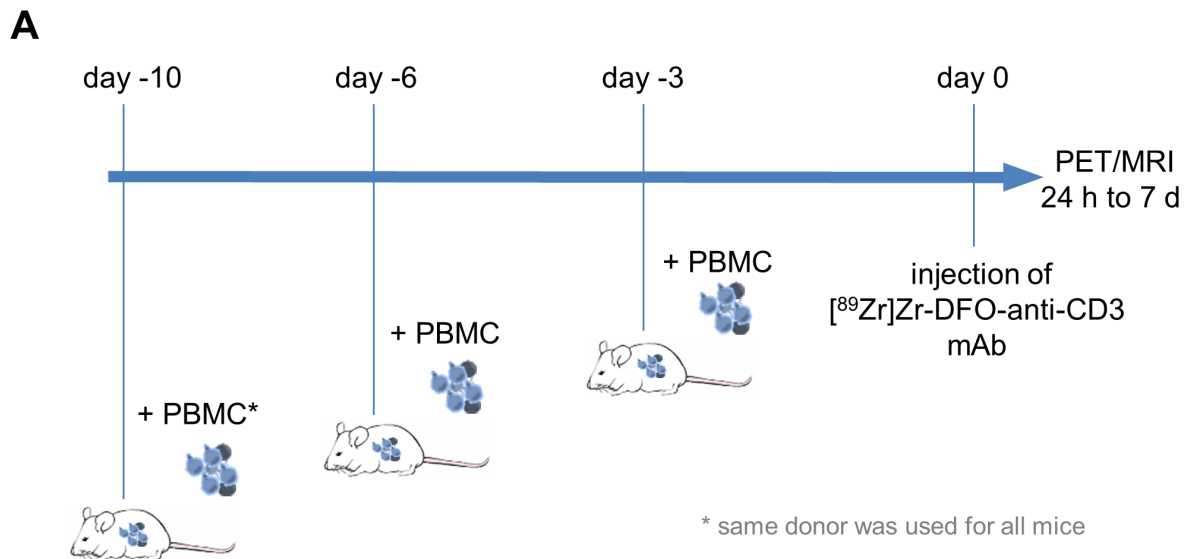
### Characteristics of DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb: <sup>89</sup>Zr-labeling, *in vitro* stability and binding properties to TCR

Anti-human CD3 mAb was functionalized with a tenfold molar excess of DFO-*p*-Ph-NCS resulting in an estimated ratio of bound chelator moieties per protein of 4–5 (Fig. S1A). Functionalization did not affect the binding properties of the antibody as DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb showed a similar binding to the T cell receptor (TCR) compared to unmodified anti-CD3 mAb. The binding of DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb to TCR leads to T cell proliferation, which was measured via [<sup>3</sup>H]-Tdr incorporation (Fig. S1B). Coupling of the chelator to the antibody could be confirmed by successful radiolabeling of the resulting conjugate with <sup>89</sup>Zr. In detail, complexation of <sup>89</sup>Zr was performed with a radiochemical yield (RCY) of 85% after 90 min at 37 °C (Fig. S1C). After purification via SEC the radioconjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb was obtained with a radiochemical purity of > 93% and an apparent specific activity of 87–131 GBq/μmol. Over a period of 7 days [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb showed a complex stability of 80 ± 1% and 78 ± 3% protein-bound radioactivity in PBS and human serum, respectively (Fig. S1D).

### CD3 PET imaging is suitable for displaying GvHD progression in GvHD-relevant organs of humanized mice

Sensitive detection of T cell proliferation and accumulation in GvHD-relevant organs is one important first step to determine GvHD induction in the early phase after HSC transplantation. To further test whether PET imaging is a suitable tool for displaying GvHD induction and progression mediated by donor T cells, we made use of our humanized mouse model for GvHD. Nine mice ( $n = 3/\text{group}$ ) were injected with  $50 \times 10^6$  PBMC followed by [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb application 3, 6 and 10 days after transfer of human immune cells. GvHD induction was monitored by PET/MRI (Fig. 1A). Already 24 h after antibody application PET/MRI showed first CD3 antibody accumulation in spleen, colon and liver of all three groups of PBMC-engrafted mice, whereby mice, which received PBMC 10 days before, showed the strongest enrichment above all in the liver (Fig. S2). This uptake slightly increased over 48 h and remained stable until day 7. Over all, the highest uptake of <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb was found in the 10-day-PBMC group with distinct “inflammatory hotspots” in the area around the portal vein in the liver as well as in the gut (Fig. 1B, S2). The observed antibody accumulation in the spleen of untreated mice is most probably related to an interaction with Fc receptor<sup>+</sup> cells. OKT3 is a mouse anti-human CD3 antibody, whose Fc part can bind to Fc receptors expressed on murine cells located in the spleen, such as macrophages.





**Figure 1:** PET/MRI depicts a time-dependent accumulation of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled anti-CD3 mAb during GvHD development. Experimental setup: mice were engrafted with  $50 \times 10^6$  PBMC followed by  $^{89}\text{Zr}$ -labeled anti-CD3 mAb application (3, 6 and 10 days later). PET/MRI was performed 24, 48, 72 h and 7 days after antibody injection (A). Representative PET/MRI images 48 h p.i.,  $n = 3/\text{group}$  (B). he: heart, infl. spots: inflammatory spots, li: liver, sp: spleen, MIP: maximum intensity projection.

## **T cell accumulation monitored by PET/MRI correlates with *ex vivo* analysis of respective organs and clinical symptoms of GvHD mice**

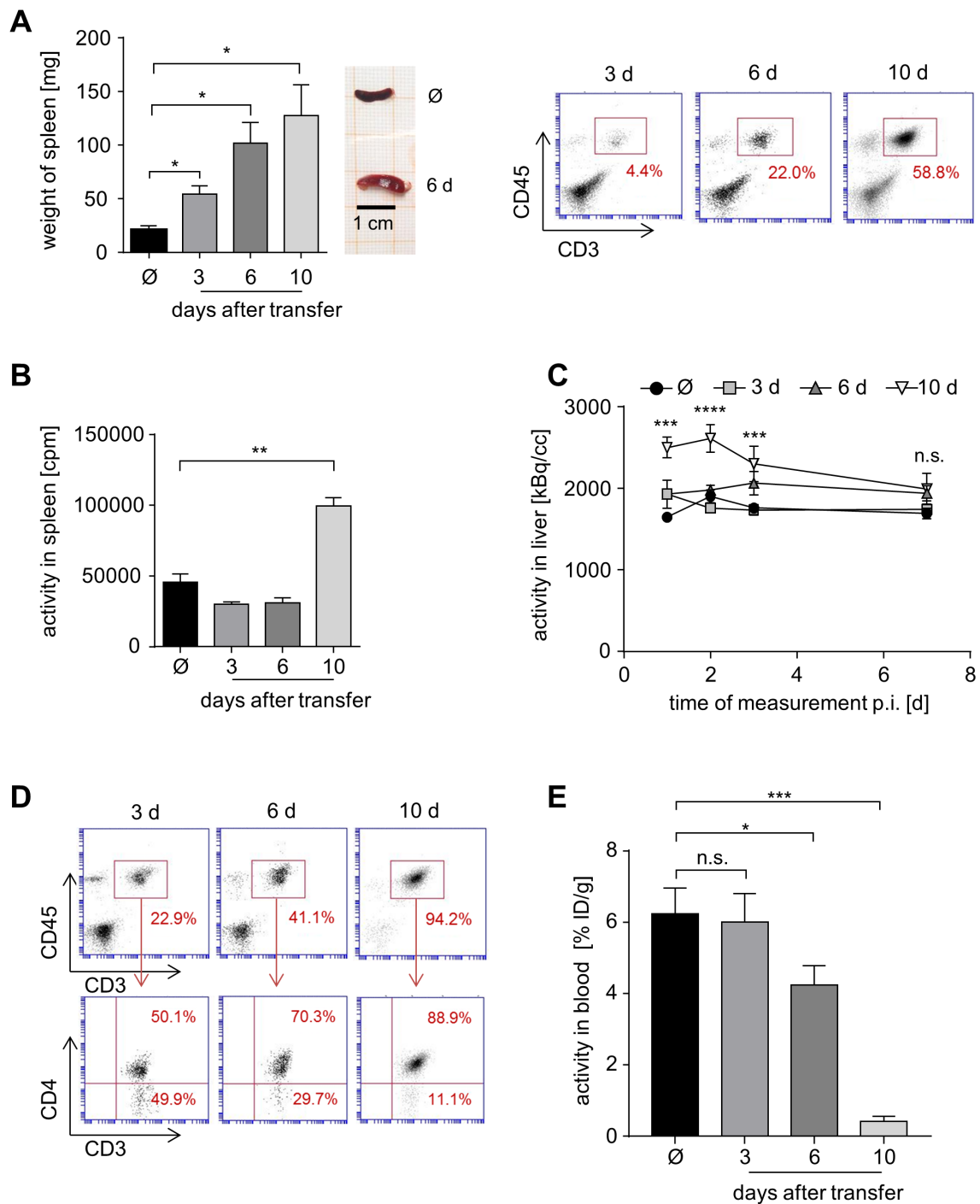
Upon GvHD induction in humanized mice, T cells get activated and expand in the spleen thus leading to a massive enlargement of the spleen. Mice studied 3 days after PBMC transfer already showed slight enlargement of the spleen with an average weight of  $54.17 \pm 7.73$  mg (Fig. 2A). 10 days after PBMC transfer, spleen size further increased to  $127.7 \pm 28.34$  mg, about 6-fold higher compared to the control group without PBMC transfer ( $18.90 \pm 3.03$  mg). The enlargement of spleen also correlated with the proportion of human T cells in the spleen: in the 10-day-PBMC group an average 10-fold increase in CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cell ratio could be observed compared to the 3-day-PBMC group. Furthermore, the number of activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells also increased over time (Fig. S3). Since spleens of GvHD mice showed a significant enlargement in size, we further analyzed total accumulated radioactivity *ex vivo* without referring to the weight of each individual spleen (Fig. 2B). The highest uptake of <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb was detected in the 10-day-PBMC group ( $99650 \pm 5955$  cpm). Significantly less activity was measured in spleens of 3-day-PBMC group ( $30007 \pm 1508$  cpm) and 6-day-PBMC group ( $31217 \pm 3327$  cpm), indicating that the amount of detected activity correlates with the proportion of human CD3<sup>+</sup> T cells in the spleen.

The destruction of liver tissue by donor immune cells is a common symptom of GvHD patients after aHSCT, which can be also observed in immunodeficient mice after PBMC engraftment. This destruction is characterized by a massive accumulation of donor T cells in the liver. Using PET/MRI, we were able to display a strong accumulation of <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb and thus CD3<sup>+</sup> T cells in the liver of GvHD mice 10 days after PBMC transfer (Fig. 2C). Mice which received PBMC 6 days before showed a significantly reduced accumulation of <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb compared to the 10-day-PBMC group. Lowest signals were obtained from mice which received PBMC 3 days before as well as from untreated mice. *Ex vivo* flow cytometric analysis of the liver revealed increasing numbers of human T cells over time of engraftment with lowest values 3 days and highest values 10 days p.i. of PBMC. Furthermore, they showed increasing numbers of CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2D). In addition, activity in the blood was determined. The activity in the blood of control mice was  $6.23 \pm 0.52\%$  ID/g, whereas in the 10-day-PBMC group activity was remarkably reduced to  $0.42 \pm 0.08\%$  ID/g as well as in the 6-day-PBMC group ( $4.23 \pm 0.32\%$  ID/g, Fig. 2E). This is in line with our expectations: Due to the high antibody enrichment in the spleen and liver of mice, which received PBMC 10 and 6 days earlier, less activity can be detected in the blood. In addition, *ex vivo* gamma counting of dissected organs was performed 7 days after <sup>89</sup>Zr-labeled antibody application. In contrast to the PET/MRI data, the *ex vivo* measured activity showed no significant differences between the four groups (Fig. S4).

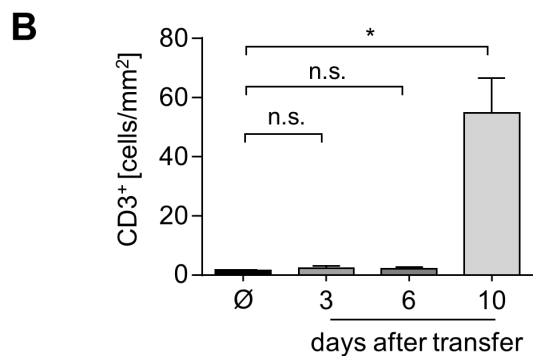
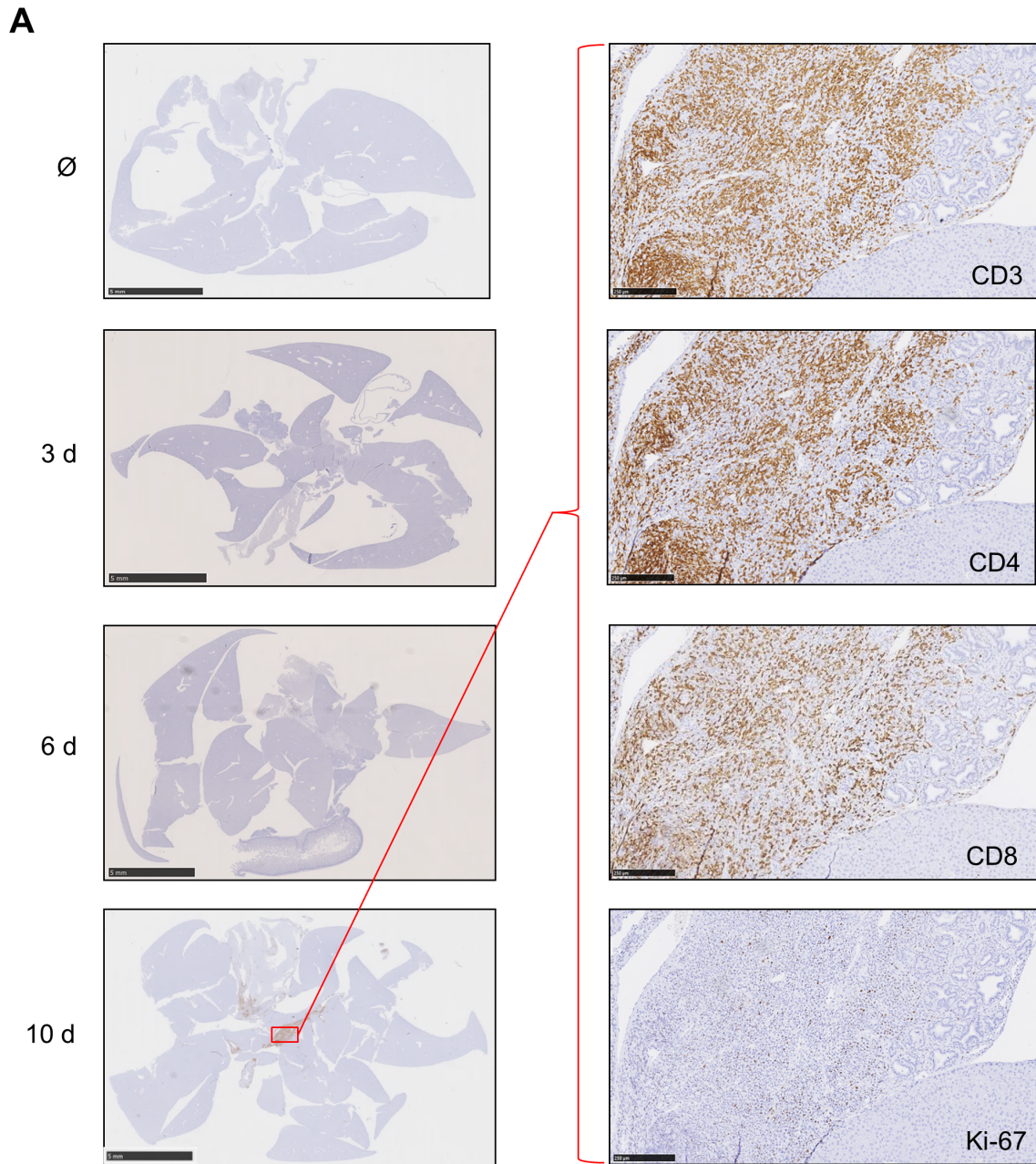
## **Human T cells are localized around the portal vein in the liver**

PET/MRI of GvHD mice displayed a significant accumulation of <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb in the liver. Compared to the spleen, signals observed in the liver showed a more spot-like manifestation reflecting migration combined with local proliferation. To analyze spatial distribution and phenotype of CD3<sup>+</sup> T cells, the liver of differentially treated mice was preserved and stained immunohistochemically for CD3, CD4, CD8 and Ki-67 expression (Fig. 3A). Similar to the PET/MRI results we found major accumulation in certain inflammatory hotspots around the portal vein most prominently in the 10-day-PBMC group (Fig. 3A, B). Those CD3<sup>+</sup> T cells were mainly attributed to CD4<sup>+</sup> phenotype but also to CD8<sup>+</sup>

T cells. Furthermore, some of the cells in this area showed a proliferating phenotype indicated by Ki-67 expression (Fig. 3A).



**Figure 2:**  $^{89}\text{Zr}$ -labeled anti-CD3 mAb accumulation correlates with T cell immigration into GvHD-related organs. *Ex vivo* analysis of spleen regarding weight, size and amount of immigrated human  $\text{CD45}^+\text{CD3}^+$  T cells 7 days after injection of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled anti-CD3 mAb. Mean values  $\pm$  SEM of  $n = 3/\text{group}$  are shown for weight of spleen. Dot plots depict representative results regarding the amount of  $\text{CD45}^+\text{CD3}^+$  T cells (A). *Ex vivo* quantification of mAb enrichment in spleen of PBMC-engrafted and control mice. Mean values  $\pm$  SEM of  $n = 3/\text{group}$  are shown (B). *In vivo* quantification of mAb accumulation in the liver. Mean values  $\pm$  SD of 5 ROI per group are shown (C). *Ex vivo* analysis of human  $\text{CD45}^+\text{CD3}^+\text{CD4}^+$  T cells in the liver 7 days after antibody injection (D). *Ex vivo* quantification of mAb activity in blood 7 days p.i. Mean values  $\pm$  SD of  $n = 3$  animals/group are shown (E).



**Figure 3:** During GvHD development infiltrated CD3<sup>+</sup> T cells form distinct “inflammatory hotspots” in the liver. 3, 6 and 10 days after PBMC transfer mice received <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb. 7 days after application mice were sacrificed and organs were removed for immunohistochemical analysis. Representative images of liver slices are shown (one representative, 3 mice/group). Left panel: analysis of CD3 expression in liver slices of PBMC-engrafted mice at different time points of GvHD. Untreated (Ø) animals served as controls (0.5 × magnification, black bar: 5 mm). Right panel: analysis of CD3, CD4, CD8 and Ki-67 expression in the liver of 10-day-PBMC group (10 × magnification, black bar: 250 µm) (A). Quantification of CD3<sup>+</sup> cells in liver sections (B), *n* = 3 mice/group.

## CD3-PET-imaging can be used to monitor therapy efficiency of T<sub>reg</sub> in preventing GvHD development in humanized mice

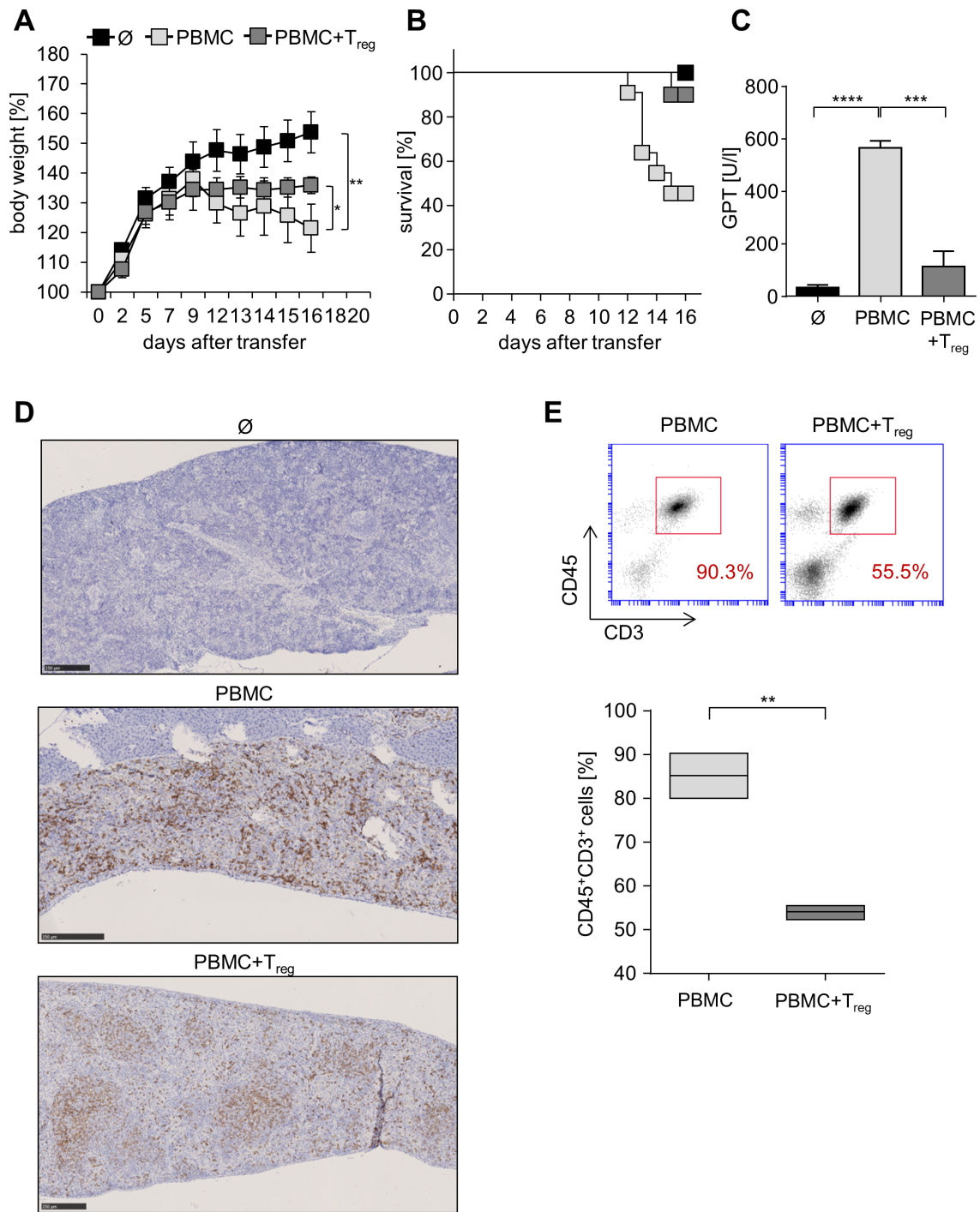
Despite their relatively low frequency (2–5% of all peripheral blood cells), T<sub>reg</sub> are important key players in controlling immune responses and maintaining immunological self-tolerance [17]. In the context of GvHD, it has been shown that adoptively transferred T<sub>reg</sub> promote tolerance in mouse models of aHST [11,12] and the therapeutic efficacy has furthermore been demonstrated in humans in reducing the risk for GvHD [13,18].

To investigate if CD3-PET-imaging can be used to monitor therapy outcome of treated GvHD patients, we employed again our humanized mouse model for GvHD and transferred  $50 \times 10^6$  PBMC with or without syngeneic T<sub>reg</sub> (PBMC:T<sub>reg</sub> ratio 10:1) into adult mice ( $n = 11/\text{group}$ ) and followed GvHD development until week 3 after transfer. For T<sub>reg</sub> activation, T<sub>reg</sub> were pre-incubated with gp140 prior to transfer into mice. Gp140 (HIV-1 envelope glycoprotein 140) binds with high affinity to CD4 expressed on T cells, hereby inducing a signaling cascade which specifically activates the suppressive function of T<sub>reg</sub> [8]. Importantly, the function of CD4<sup>+</sup> T effector cells is not affected by the binding of gp140.

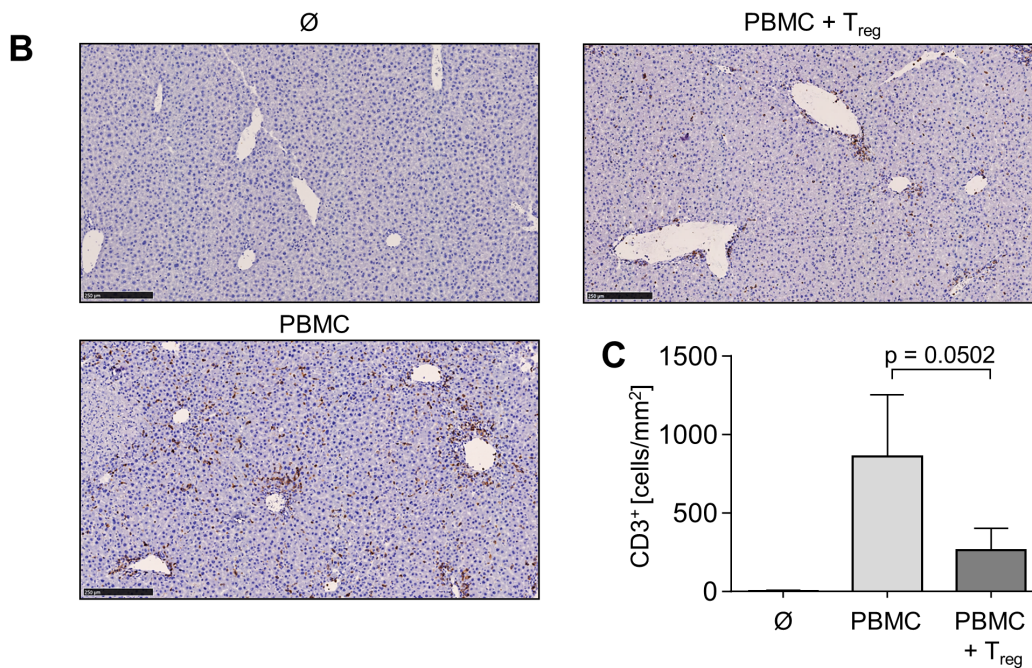
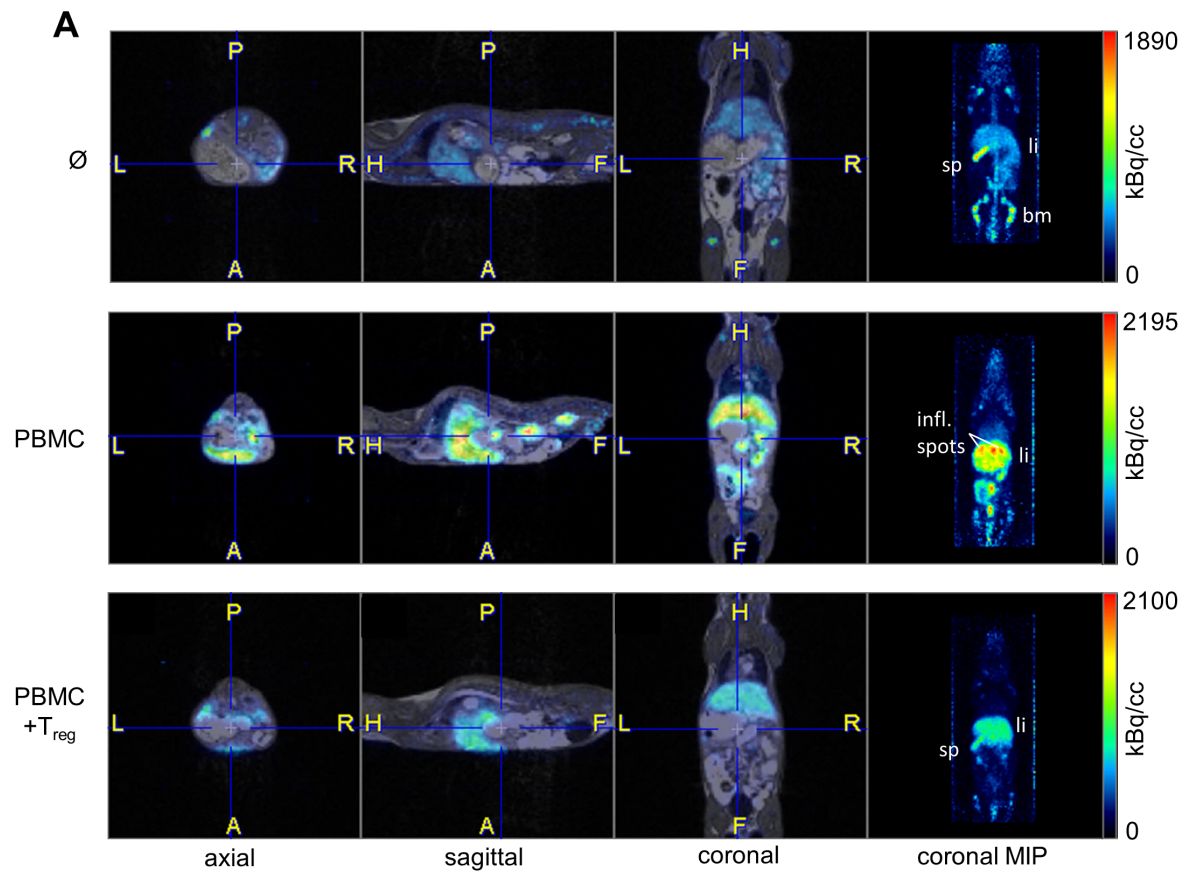
Mice which received PBMC alone developed severe GvHD symptoms indicated by a significant loss in body weight of circa 30% compared to untreated controls (Fig. 4A). Furthermore, GvHD mice showed increased GPT levels ( $564 \pm 20$  U/l) caused by tissue damage in the liver, as well as reduced survival rates compared to untreated controls (GPT:  $33.30 \pm 4.21$  U/l, Fig. 4B, C). Transfer of syngeneic T<sub>reg</sub> prevented a severe loss of body weight and thus increased survival rate of the animals. In addition, the risk for developing hepatitis was reduced which is shown by significantly lower GPT levels ( $112.4 \pm 29.2$  U/l) than those in GvHD mice.

*Ex vivo* analysis revealed a high accumulation of  $85.15 \pm 5.15\%$  CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells in the spleen of GvHD mice, which was significantly reduced to  $54.07 \pm 0.98\%$  in mice treated with syngeneic T<sub>reg</sub> (Fig. 4D–E). PET/MRI furthermore illustrated a strong accumulation of CD3<sup>+</sup> T cells in the liver 19 days after PBMC transfer alone (24 h after i.v. injection of radiolabeled antibody), again showing selective “hotspots” near the hepatic portal veins (Fig. 5A). Moreover, T cells also migrated deep into the liver tissue as they could be also found at the outer rim of the analyzed sections (Fig. 5B). Interestingly, mice which received PBMC + T<sub>reg</sub> showed a reduced accumulation of CD3<sup>+</sup> T cells in the liver close to the portal veins and a diminished formation of “inflammatory hotspots” (Fig. 5A). Compared to the massive T cell migration deep into the liver tissues of PBMC-engrafted mice, only low amounts of CD3<sup>+</sup> T cells were observed in mice treated with T<sub>reg</sub> (Fig. 5B). These findings could also be confirmed by the *ex vivo* biodistribution data (Fig. S5) and by the quantification of CD3<sup>+</sup> cells in liver sections: by administering T<sub>reg</sub> prior to GvHD induction, T cell accumulation in the liver was clearly reduced from  $857 \pm 177$  CD3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup> to  $261 \pm 82$  CD3<sup>+</sup> cells/mm<sup>2</sup> (Fig. 5C). In summary, we were able to show that CD3-PET/MRI can be used to monitor the protective capabilities of T<sub>reg</sub> therapy in GvHD by preventing T cell proliferation and migration.





**Figure 4:** Reduced clinical signs of GvHD are associated with lower numbers of T cells in T<sub>reg</sub>-treated animals. 3–4 weeks old NSG mice were engrafted with  $50 \times 10^6$  PBMC  $\pm$  T<sub>reg</sub> (PBMC:T<sub>reg</sub> ratio 10:1,  $n = 11$  mice/group) and weight (A) and survival (B) was recorded over a time course of 19 days. Untreated mice served as controls ( $\emptyset$ ). Mean bodyweight  $\pm$  SD is shown. At the end of the experiment, GPT levels of  $n = 3$  mice/group were determined (C) and the spleens were immunohistochemically analyzed for CD3 expression (black bar: 250  $\mu$ m) (D). Flow cytometric analysis of human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells in the spleen of mice which received PBMC  $\pm$  T<sub>reg</sub>. Upper panel: one representative analysis of immigrated human CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T cells; lower panel: cumulative data of  $n = 3$  mice/group (E).



**Figure 5:** CD3-PET/MRI displays the efficiency of T<sub>reg</sub> in preventing GvHD induction. 3–4 weeks old NSG mice were engrafted with  $50 \times 10^6$  PBMC  $\pm$  T<sub>reg</sub> (PBMC:T<sub>reg</sub> ratio 10:1,  $n = 11$  mice/group). 19 days later, mice received <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb. 24 h p.i. PET/MRI was performed with untreated (upper panel), PBMC-engrafted (middle panel) and PBMC + T<sub>reg</sub>-treated mice (lower panel). One representative image per group is shown (A). Liver slices were immunohistochemically analyzed for CD3 expression (B). Quantification of CD3<sup>+</sup> cells in liver sections,  $n = 3$ –5 mice/group (C).

## DISCUSSION

Since donor T cells are the disease-mediating immune cells, we imaged T cell distribution in a clinically relevant GvHD model using immunodeficient mice that were engrafted with a human immune system. By  $^{89}\text{Zr}$ -labeled anti-human CD3 mAb and PET/MRI we show fast and massive infiltration of T cells into spleen and liver of humanized mice. We were able to show that distribution and proliferation of T cells *in vivo* could not only be visualized by immuno-PET/MRI but furthermore strongly correlated with clinical symptoms of GvHD. The most affected organ in the early phase of GvHD development was the liver with enormous T cell infiltration in distinct areas. In particular, the pattern of tracer accumulation within the liver with a spot-like periportal accumulation reflects early signs of GvHD that cannot be captured by other noninvasive methods. Transfer of  $T_{\text{reg}}$  significantly suppressed T cell proliferation and thus prevented GvHD-associated clinical symptoms such as hepatitis. Immuno-PET/MRI data revealed a marked reduction in T cell infiltration in the liver as well as GIT.

Imaging of T cells is an increasingly important need reflecting the pivotal role of T cells in both tumor therapy and immunologic side effects. Thus, T cells have been in the focus of immunological therapies towards lymphoproliferative diseases like leukemia. Conventional transplantation of bone marrow has led to a curative approach in many cases. However, the potency of T cells is associated with significant side effects when cross-reaction with normal tissue occurs. The exact understanding of the temporal and spatial processes of T cell proliferation, infiltration and immunoreactive effect are crucial to further develop new T cell-based therapeutic strategies. To demonstrate the impact of imaging towards such an understanding, a humanized mouse model for GvHD, well reflecting the situation in GvHD patients, was investigated. Although noninvasive conventional imaging has played a role in GvHD management, the structural manifestations that are detectable are often only present at very late disease stages [19,20]. Molecular imaging of GvHD in the clinical situation often uses [ $^{18}\text{F}$ ]FDG-PET imaging of the glucose metabolism, yielding a sensitive detection and localization of GvHD manifestations [6]. As [ $^{18}\text{F}$ ]FDG is a nonspecific tracer which accumulates in many cell types upon activation of the immune system [21], more specific markers are needed to follow the kinetics of inflammation during GvHD. A good alternative is the use of antibodies that mark the particular cell population causing the disease. Since GvHD is a T-cell-mediated disease, application of T-cell-specific antibodies such as anti-CD3 mAb to track T cell migration would be beneficial. T cells could be followed up from their priming sites very early before massive proliferation and tissue destruction may occur. Furthermore, antibodies could be suitable to label T cells in other disease settings such as cancer or autoimmune diseases. First experiments were already performed by Beckford *et al.*, using  $^{89}\text{Zr}$ -radiolabeled anti-CD3 mAb in tumor-bearing mice to image tumor-infiltrating lymphocytes [22]. In another study,  $\text{CD4}^+$  T cells were visualized by PET in a DSS-induced colitis model. The authors were able to detect  $\text{CD4}^+$  T cells in the colons, ceca and mesenteric lymph nodes of colitic mice, showing that Immuno-PET of T cells could be a noninvasively alternative to colonoscopy [23].

However, such antibodies, especially anti-CD3 mAb, have to be used with caution. In our study,  $^{89}\text{Zr}$ -muromonab, a mouse anti-human CD3 mAb, was applied as a proof of concept to image T cells in a GvHD model. For clinical studies in humans, optimized antibodies are necessary to prevent induction of human anti-mouse antibodies, for example. Alternatives such as foralumab, a fully human anti-CD3 mAb, display no Fc receptor binding and immunogenicity is clearly reduced compared to muromonab [24].



As early as 3 days after transplantation we observed T cell infiltration in the spleen. Beilhack *et al.* defined the first three days after HSC transplantation as the effector phase in which donor T cells migrate to lymphoid organs before infiltrating mucosal GvHD target sites [25,26]. In our study, we were able to visualize the start of the effector phase as the T cells (day 4 after transplantation) predominantly migrate into distinct areas of the liver where they subsequently cause tissue damage leading to liver cirrhosis at later time points. Tissue destruction starts around the hepatic portal vein where the inflammatory hotspots were visible first and then spread into the liver parenchyma as the T cells migrate deeper into the liver tissue over time. This could be prevented by the additional injection of  $T_{reg}$  as it was shown by CD3-PET/MRI. The observed anti-CD3 mAb accumulation in the spleen of control mice is most probably related to the interaction between Fc receptor expressing murine myeloid cells and the murine Fc part of anti-CD3 mAb. Spleens of NSG as well as  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$  mice contain dendritic cells, granulocytes and macrophages which express high levels of Fc receptors causing distinct background signals [27]. *In vivo* blocking of Fc receptors or the use of Fab-fragments could be possible solutions to circumvent this in the future.

Overall, there is still no established blood or imaging biomarker available which can be used for early diagnosis of GvHD. Several attempts have been made to identify certain predictive markers that are upregulated prior to tissue damage and before clinical symptoms become evident, e.g. homing receptors  $\alpha 4\beta 7$  integrin and P-selectin are upregulated during migration of donor T cells from lymphoid organs to target organs and could be measured in the peripheral blood to define a diagnostic window for a timely therapeutic intervention [28].  $[^{89}Zr]Zr$ -DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3-PET/MRI could enable earlier diagnosis of GvHD than a blood-based strategy by detecting T cells in their priming sites prior to migration into peripheral blood and to their homing sites in GvHD-affected organs. In the end, an early diagnosis allows for early therapeutic interventions, which can increase the patients' chances of survival.

## CONCLUSION

$^{89}\text{Zr}$ -anti-CD3-PET/MRI can detect the exact spatio-temporal distribution of GvHD-mediating T cells and monitor inflammation as well as its prevention by  $T_{\text{reg}}$ . Immuno-PET imaging results strongly correlated with GvHD severity showing that immuno-PET/MRI is a suitable method to noninvasively visualize the onset of GvHD development and treatment efficiency over time *in vivo*.

## Acknowledgements

The authors thank [REDACTED] and [REDACTED] for excellent technical help.

## Funding information

The work was supported by the German Research Foundation (SFB 1066).

## Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

## REFERENCES

- [1] Ferrara JLM, Levine JE. Graft-versus-host disease in the 21st century: new perspectives on an old problem. *Semin Hematol* 2006;43:1–2.
- [2] Fowler DH, Breglio J, Nagel G, Eckhaus MA, Gress RE. Allospecific CD8<sup>+</sup> Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. *J Immunol* 1996;157:4811–21.
- [3] Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007;109:1756–64.
- [4] Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, Murphy WJ, Blazar BR, Serody JS. Effector CD4<sup>+</sup> T cells, the cytokines they generate, and GvHD: something old and something new. *Blood* 2011;117:3268–76.
- [5] Antin J, Ferrara J. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992;80:2964–8.
- [6] Stelljes M, Hermann S, Albring J, Köhler G, Löffler M, Franzius C, et al. Clinical molecular imaging in intestinal graft-versus-host disease: mapping of disease activity, prediction, and monitoring of treatment efficiency by positron emission tomography. *Blood* 2008;111:2909–18.
- [7] Truitt RL, Atasoylu AA. Contribution of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 1991;8:51–8.
- [8] Becker C, Taube C, Bopp T, Becker C, Michel K, Kubach J, et al. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2009;114:1263–9.
- [9] Hahn SA, Stahl HF, Becker C, Correll A, Schneider F-J, Tuettenberg A, et al. Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2013;122:1182–91.
- [10] Beres AJ, Drobyski WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol* 2013;4:1–9.
- [11] Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493–9.
- [12] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144–50.
- [13] Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903–11.
- [14] Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their energy and suppressive function. *Blood* 2007;110:1550–8.
- [15] Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:250–9.

- [16] Vosjan MJWD, Perk LR, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate *p*-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc* 2010;5:739–43.
- [17] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775–87.
- [18] Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (T<sub>reg</sub>) content is associated with a low risk of GvHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006;108:1291–7.
- [19] Mentzel H-J, Kentouche K, Kosmehl H, Gruhn B, Vogt S, Sauerbrey A, et al. US and MRI of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Pediatr Radiol* 2002;32:195–8.
- [20] Kalantari BN, Mortelé KJ, Cantisani V, Ondategui S, Glickman JN, Gogate A, et al. CT features with pathologic correlation of acute gastrointestinal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation in adults. *Am J Roentgenol* 2003;181:1621–5.
- [21] Pektor S, Bausbacher N, Otto G, Lawaczeck L, Grabbe S, Schreckenberger M, et al. Toll like receptor mediated immune stimulation can be visualized *in vivo* by [<sup>18</sup>F]FDG-PET. *Nucl Med Biol* 2016;43:651–60.
- [22] Beckford Vera DR, Smith CC, Bixby LM, Glatt DM, Dunn SS, Saito R, et al. Immuno-PET imaging of tumor-infiltrating lymphocytes using zirconium-89 radiolabeled anti-CD3 antibody in immune-competent mice bearing syngeneic tumors. *PLoS One* 2018;13:e0193832.
- [23] Freise AC, Zettlitz KA, Salazar FB, Tavaré R, Tsai W-TK, Chatziioannou AF, et al. Immuno-PET in inflammatory bowel disease: imaging CD4-positive T cells in a murine model of colitis. *J Nucl Med* 2018;59:980–5.
- [24] Dean Y, Dépis F, Kosco-Vilbois M. Combination therapies in the context of anti-CD3 antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Swiss Med Wkly* 2012;142:1–11.
- [25] Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Nishimura R, Baker EM, et al. Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood* 2008;111:2919–28.
- [26] Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Wieland CB, Herman EI, et al. *In vivo* analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* 2005;106:1113–22.
- [27] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012;119:5640–9.
- [28] Bäuerlein CA, Riedel SS, Baker J, Brede C, Garrote A-LJ, Chopra M, et al. A diagnostic window for the treatment of acute graft-versus-host disease prior to visible clinical symptoms in a murine model. *BMC Med* 2013;11:134.

## SUPPORTING INFORMATION

### Methods

#### **<sup>89</sup>Zr-labeling of DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb and analytical quality control**

Radiolabeling of 170–260 µg DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb with <sup>89</sup>Zr was performed in 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) according to the literature [1,2]. Radiolabeling efficiency was investigated at different time points via radio thin layer chromatography (stationary phase: Merck Silica 60 F<sub>254</sub> TLC plates; mobile phase: 0.1 M citrate-buffer pH 4), image plate scanner (CR35-Bio, Elysia Raytest) and AIDA Image Analysis software (Elysia Raytest). As negative control, the radiolabeling procedure was performed analogously with unmodified anti-CD3 mAb. The obtained radioconjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb was purified via SEC using a PD-10 column and PBS as eluent. Radiochemical purity was determined via radio-TLC and radio-SEC-HPLC monitoring (HPLC system: Merck LaChrom; pump: Hitachi L7100; UV-detector: L7400) using a BioSep SEC-S 2000 column (Phenomenex) and 0.05 M sodium phosphate (pH 7) as mobile phase (1 mL/min).

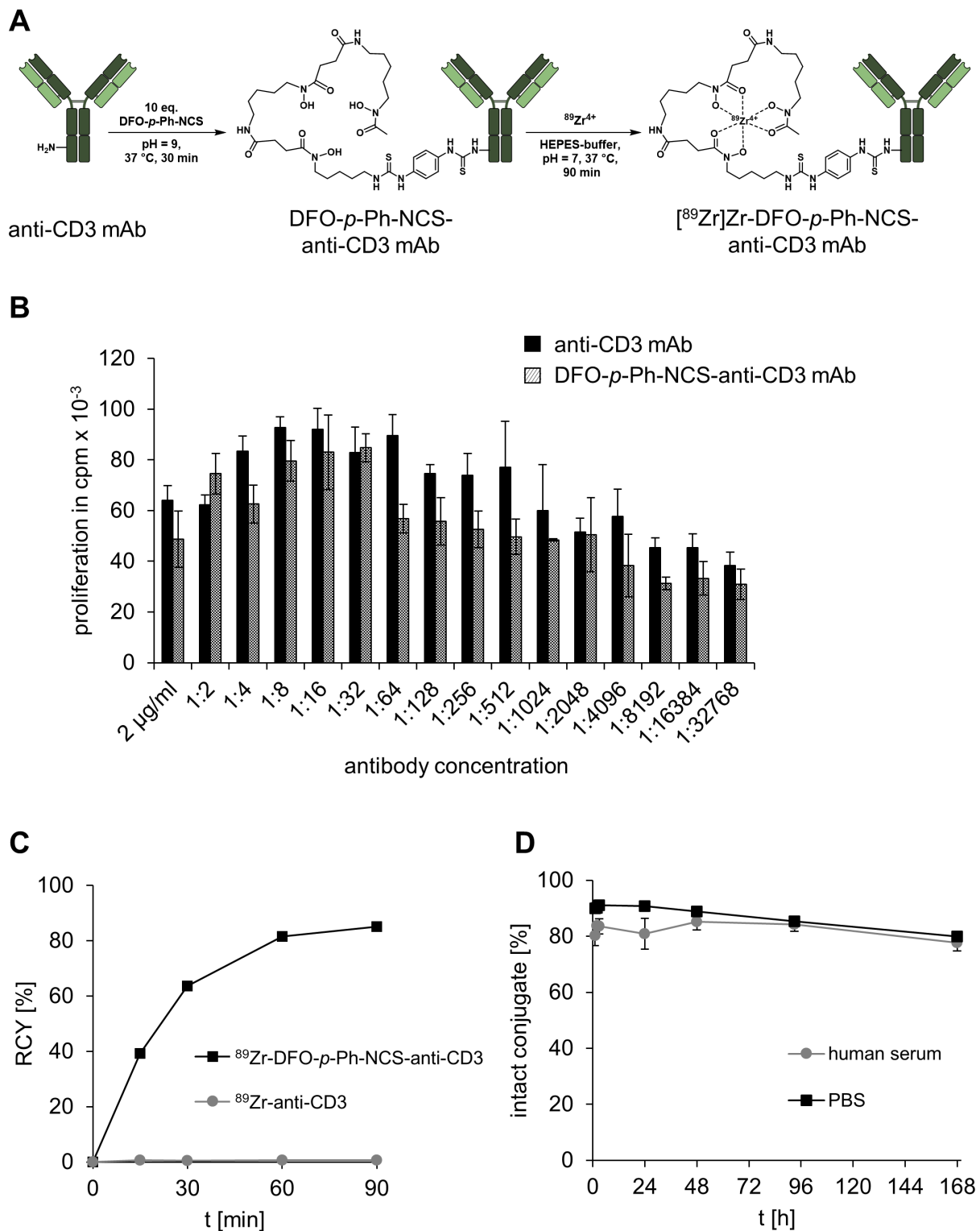
#### ***In vitro* stability of [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb**

[<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb was added to human serum ( $n = 3$ ; Sigma-Aldrich, from human male AB plasma) and to PBS ( $n = 3$ ). The samples were incubated at 37 °C and analyzed at different time points via radio-TLC.

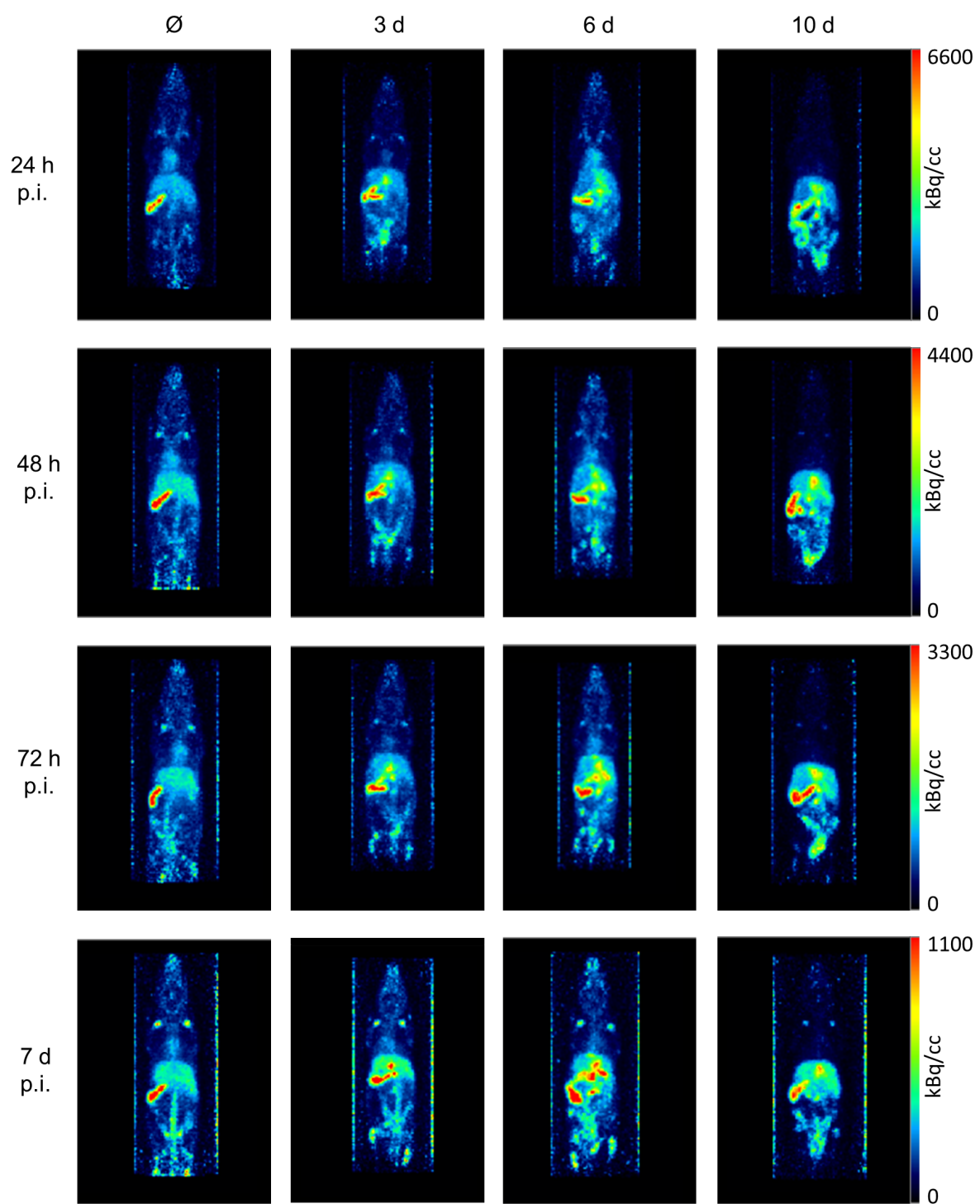
#### **Stimulation of T cells with modified and unmodified anti-CD3 mAb**

Binding of anti-CD3 mAb to the TCR induces T cell activation and proliferation. To test whether modification of anti-CD3 mAb effects its binding capacity to TCR, we incubated PBMC (10<sup>5</sup> cells/well of 96 flat-bottom cell culture plate) with different concentrations of DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb for 3 days at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Incubation with unmodified anti-CD3 mAb served as a control. At day 3, [<sup>3</sup>H]-Tdr (37 kBq/well) was added to each well for an additional 16 h. Proliferation of PBMC was determined by measuring [<sup>3</sup>H]-Tdr incorporation with the use of a liquid β-scintillation counter.

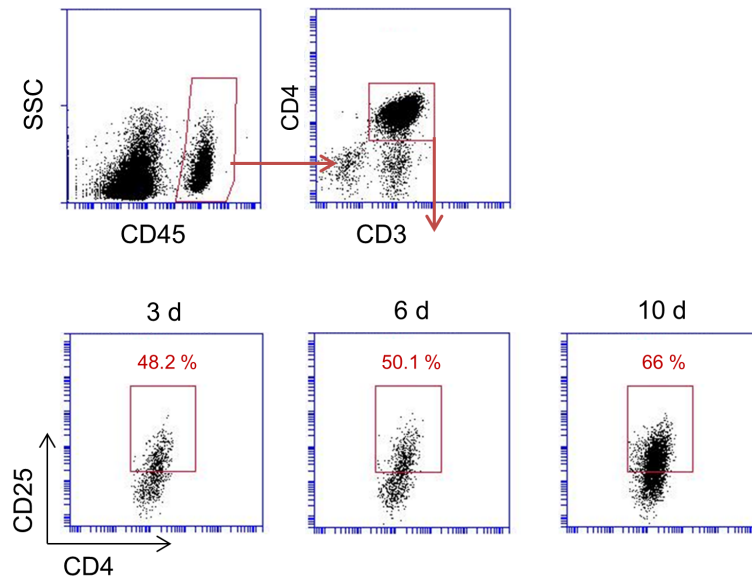
## Figures



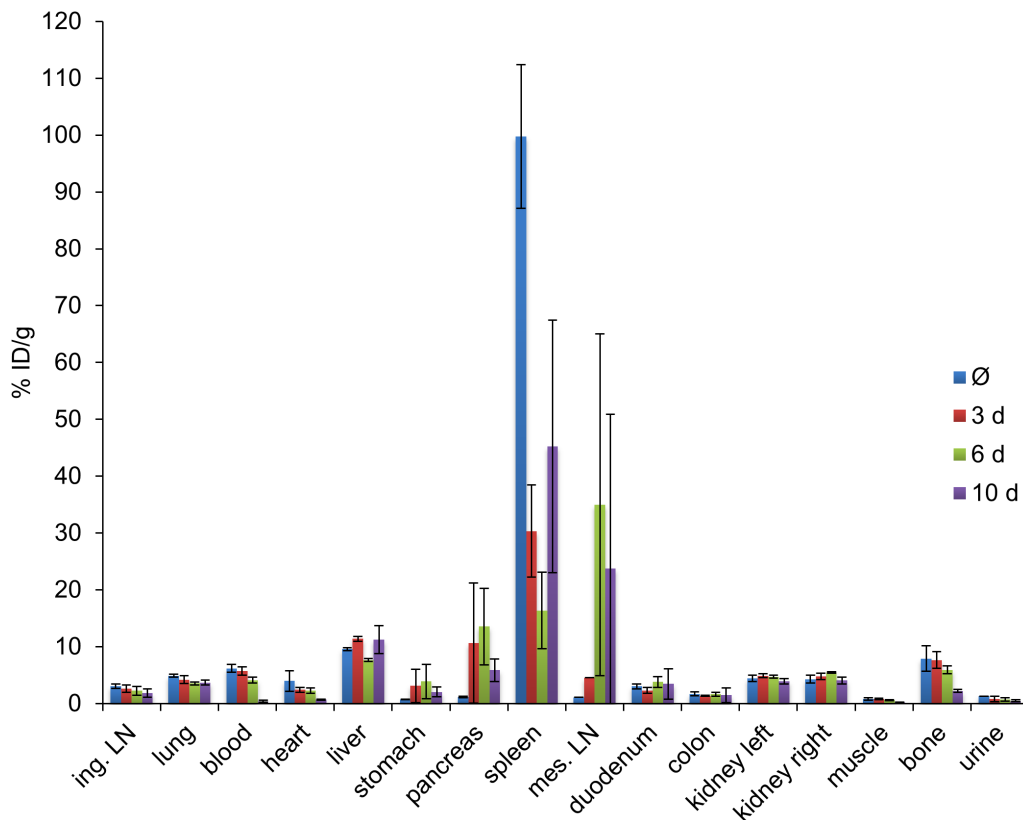
**Figure S1:** Radiolabeling and *in vitro* complex stability. Illustration shows reaction scheme of anti-CD3 mAb with DFO-*p*-Ph-NCS and complexation with <sup>89</sup>Zr (A). PBMC were incubated with different concentrations of DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb (1:2 serial dilutions) and proliferation was determined by measuring [<sup>3</sup>H]-Tdr incorporation. Unmodified anti-CD3 mAb served as a control (B). Radiochemical yield (RCY) of [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb at different time points (C). Stability of [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb in human serum and in PBS (D).



**Figure S2:** Pharmacokinetics of  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-p-Ph-NCS-anti-CD3}$  mAb in GvHD development. MIP of subsequent PET measurements (24, 48, 72 h and 7 d p.i.) of mice which received PBMC at different time points (3, 6, 10 d prior injection).

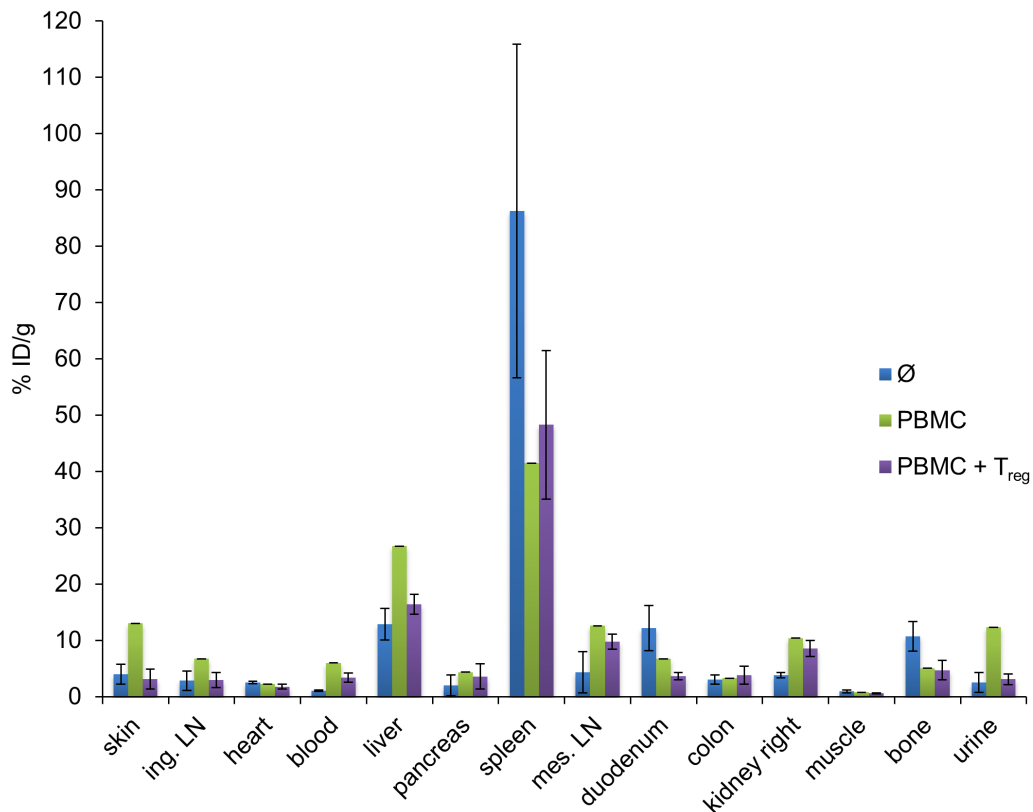


**Figure S3:** Human CD4<sup>+</sup> T cells upregulate CD25 during GvHD development. At the end of the experiment, mice were sacrificed and spleen was analyzed *ex vivo* regarding human T cell infiltration and CD25 expression using flow cytometry.



**Figure S4:** *Ex vivo* biodistribution of [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-p-Ph-NCS-anti-CD3 mAb – kinetics. GvHD was induced by transferring  $50 \times 10^6$  human PBMC into adult immunodeficient mice (Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>). <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb was injected at different time points of GvHD development. 7 days after antibody injection, organs were dissected and biodistribution of <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb was measured by a gamma-counter ( $n = 3$ ). ing. LN: inguinal lymph node, mes. LN: mesenteric lymph node.





**Figure S5:** Ex vivo biodistribution of [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb – preventive approach with T<sub>reg</sub>. GvHD was induced by transferring 50 × 10<sup>6</sup> human PBMC into adult immunodeficient mice (NSG). Some mice also received syngeneic T<sub>reg</sub> (PBMC:T<sub>reg</sub> ratio 10:1) to prevent GvHD development. <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb was injected 19 days later. 24 h after antibody injection, organs were dissected and biodistribution of <sup>89</sup>Zr-labeled anti-CD3 mAb was measured by a gamma-counter (*n* = 3). ing. LN: inguinal lymph node, mes. LN: mesenteric lymph node.

## References

- [1] Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:250–9.
- [2] Vosjan MJWD, Perk LR, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate *p*-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc* 2010;5:739–43.



**5.2 Teilprojekt B: *Development and in vitro evaluation of new bifunctional <sup>89</sup>Zr-chelators based on the 6-amino-1,4-diazepane scaffold for immuno-PET applications***



# Development and *in vitro* evaluation of new bifunctional $^{89}\text{Zr}$ -chelators based on the 6-amino-1,4-diazepane scaffold for immuno-PET applications

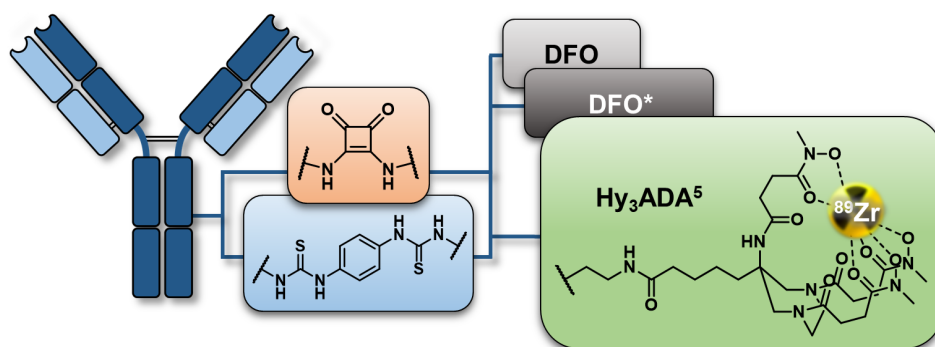
Benedikt Klasen<sup>1</sup>,

*<sup>1</sup>Department of Chemistry – TRIGA site, Johannes Gutenberg University Mainz,  
Fritz-Strassmann Weg 2, D-55128 Mainz, Germany*

## ABSTRACT

**Introduction:** Combination of hydroxamate bearing side chains with the 6-amino-1,4-diazepane scaffold provides a promising strategy for fast and stable  $^{89}\text{Zr}$ -labeling of antibodies. Following this approach, we hereby present the development, labeling kinetics and *in vitro* complex stability of three resulting bifunctional chelator derivatives both stand-alone and coupled to a model protein in comparison to different linear deferoxamine (DFO) derivatives.

**Methods:** The novel  $^{89}\text{Zr}$ -chelator  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  was prepared via amide-coupling of separately synthesized 6-amino-1,4-diazepane-6-pentanoic acid and hydroxamate-containing side chains. Two further bifunctional derivatives were synthesized by extending the resulting system with either a squaramide or *p*-isothiocyanatophenyl moiety for simplified binding to proteins. After coupling to a model antibody and purification, the resulting immunoconjugates as well as the unbound chelator derivatives were  $^{89}\text{Zr}$ -labeled at room temperature (RT) and neutral pH. For comparison, different DFO derivatives were analogously coupled, purified and radiolabeled. *In vitro* complex stability of the resulting radioconjugates was investigated in phosphate buffered saline (PBS) and human serum at 37 °C over a period of 7 days.



**Results:**  $^{89}\text{Zr}$ -labeling of the novel unbound  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  derivatives indicated rapid complexation kinetics resulting in high radiochemical conversions (RCC) of 84–94% after 90 min. Similar or even faster radiolabeling with slightly increased maximum yields was obtained using the DFO-analogues. Initially, [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO\*–*p*-Ph-NCS showed a delayed formation, nevertheless reaching almost quantitative complexation. Radiolabeling of the corresponding immunoconjugates  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -SA-mAb and  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -*p*-Ph-NCS-mAb resulted in  $82.0 \pm 1.1$  and  $89.2 \pm 0.7\%$  RCC, respectively after 90 min representing high but slightly lower labeling efficiency compared to the DFO- and DFO\*-functionalized analogues. All examined radioimmunoconjugates showed very high *in vitro* complex stability both in human serum and PBS, providing no significant release of the radiometal. In the case of unbound chelators, however, the *p*-Ph-NCS-functionalized derivatives indicated considerable instability in human serum already after one hour.

**Conclusion:** The novel chelator derivatives based on hydroxamate-functionalized 6-amino-1,4-diazepane revealed fast and high yielding  $^{89}\text{Zr}$ -labeling kinetics as well as high *in vitro* complex stability both stand-alone and coupled to an antibody. Therefore,  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  represents a promising tool for radiolabeling of biomolecules such as antibodies at mild conditions for immuno-PET applications.

**Keywords:** Zirconium-89, Hybrid-chelator, Hydroxamic acid, Deferoxamine, Antibody, Immuno-PET

## BACKGROUND

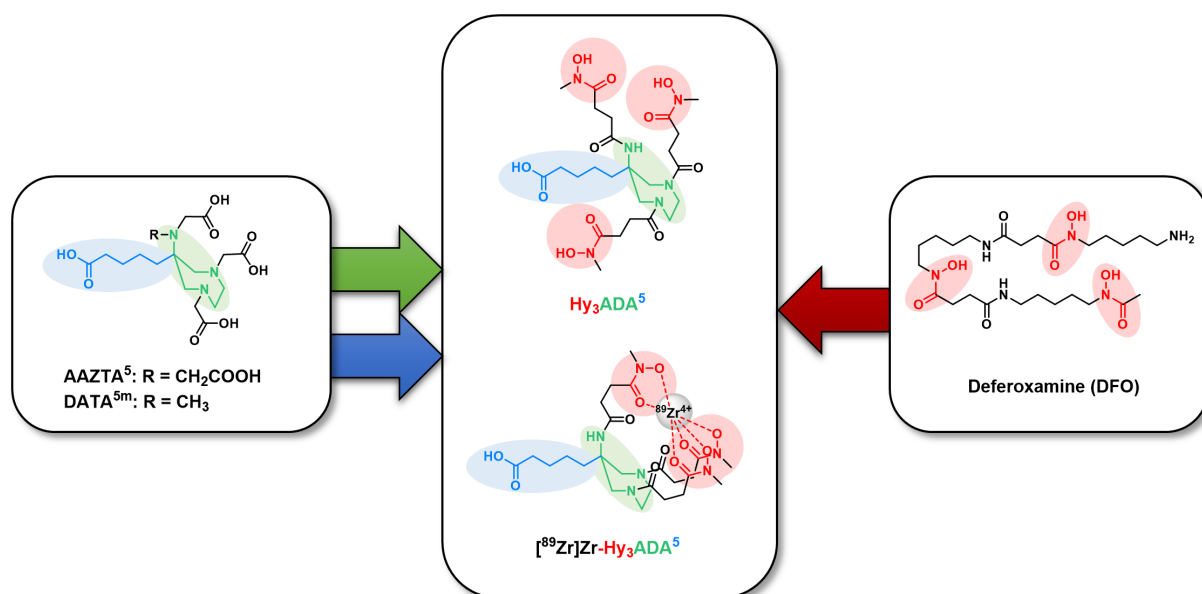
In the past years, utilization of monoclonal antibodies (mAbs) for imaging of cancer and other diseases via immuno-positron emission tomography (immuno-PET) has gained increasing importance. Due to their highly selective binding to specific targets, antibodies being labeled with a positron-emitting radionuclide represent excellent tools not only for initial diagnosis but also for drug development, individual treatment planning, patient selection and monitoring of therapeutic progresses [1–6].

The physical half-life represents a crucial factor in the selection of a suitable radionuclide for immuno-PET applications, since it has to match the typically slow pharmacokinetics of intact antibodies to ensure an optimal contrast defined by high target accumulation versus low residual activity circulating in the blood and non-target tissues [1,2,5–9]. Among several other longer-lived positron emitters, the radiometal zirconium-89 provides excellent and advantageous properties. Its physical decay half-life of 78.4 h matches almost exactly the biological half-life of full-size antibodies and therefore allows for high-quality PET-imaging even several days post administration of the corresponding radioconjugate, i.e. within a period that is typically required for optimal target-to-background ratios [6–8]. Additionally, due to low maximum and average positron energies of 902 keV and 396 keV, respectively, the mean range of the emitted particles (in water) is merely 1.23 mm prior to annihilation thus leading to a high spatial resolution [9–12]. Zirconium-89 decays via  $\beta^+$  (22.8%) and electron capture (76.2%) to the metastable yttrium-89m, which in turn is transformed into the stable yttrium-89 by  $\gamma$ -deexcitation [12]. This almost exclusively (99.9%) occurring  $\gamma$ -emission of 909 keV is outside the detection range of the PET-relevant 511 keV photons (350–650 keV), and thus does not cause any interfering incidents [1,9,13,14]. Zirconium-89 therefore gained extensively increased interest for immuno-PET applications in recent years.

The gold standard and to date almost exclusively used chelator for complexation of zirconium-89 is deferoxamine (DFO) [2,6,7,9,13]. The bacteria-produced siderophore DFO-B contains three hydroxamate groups and a terminal primary amine leading to an open-chain hexadentate bifunctional structure. Among multiple different approaches for stable coupling of the chelator to the protein, utilization of a *p*-isothiocyanatophenyl-functionalized DFO derivative, which provides a single step linkage to the lysine side chains of the antibody via formation of a stable thiourea bond, quickly became the method of choice for  $^{89}\text{Zr}$ -labeling of monoclonal antibodies [15].

Since tetravalent oxophilic  $\text{Zr}^{4+}$  offers eight coordination sites and therefore prefers an octadentate coordination geometry, the six donor oxygens of DFO are supplemented by two additional water molecules in aqueous solution, resulting in a  $[\text{Zr}^{89}][\text{Zr}(\text{DFO})\text{-cis-(H}_2\text{O)}_2]^+$  complex tending to be sensitive to deprotonation [16–18]. Reportedly, DFO-functionalized,  $^{89}\text{Zr}$ -labeled proteins therefore frequently show a certain (metabolic) instability *in vivo* leading to a release of the osteophilic radiometal and undesired accumulation in bone tissue [19–22]. Therefore, in recent years, several approaches have been pursued to develop new linear or macrocyclic chelator derivatives aiming for an improved complex stability based on more rigid systems or an increased number of donor atoms [6,7]. Among others, these include modified or extended versions of deferoxamine like DFO\*, DFO-squaramide, DFO-cyclo\* and oxoDFO\* as well as other hydroxamate-based systems like fusarinin-C and respectively functionalized cyclen and cyclam derivatives [23–32]. Furthermore, hydroxypyridinone-systems like HOPO, 2,3-HOPO and CP256 or terephthalamide-containing structures such as TAM1 and TAM2 were introduced [33–36].

Two further chelator systems that have shown very promising results in combination with various radiometals such as gallium-68, scandium-44, copper-64 and lutetium-177 are AAZTA (1,4-Bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine) and DATA<sup>m</sup> (1,4-Bis(carboxymethyl)-6-[(carboxymethyl)methylamino]-6-methylperhydro-1,4-diazepine) as well as the corresponding bifunctional derivatives AAZTA<sup>5</sup> and DATA<sup>5m</sup>. Both are based on a backbone consisting of two nitrogens being part of a macrocyclic diazepane scaffold and one exocyclic nitrogen. These hybrid chelator structures therefore combine the advantages of both linear and cyclic systems enabling fast radiolabeling at mild conditions as well as high complex stability [37–49]. However, in our preliminary experiments squaramide-functionalized AAZTA<sup>5</sup> did not show any complexation of <sup>89</sup>Zr, at least at room temperature and neutral pH (data not shown).

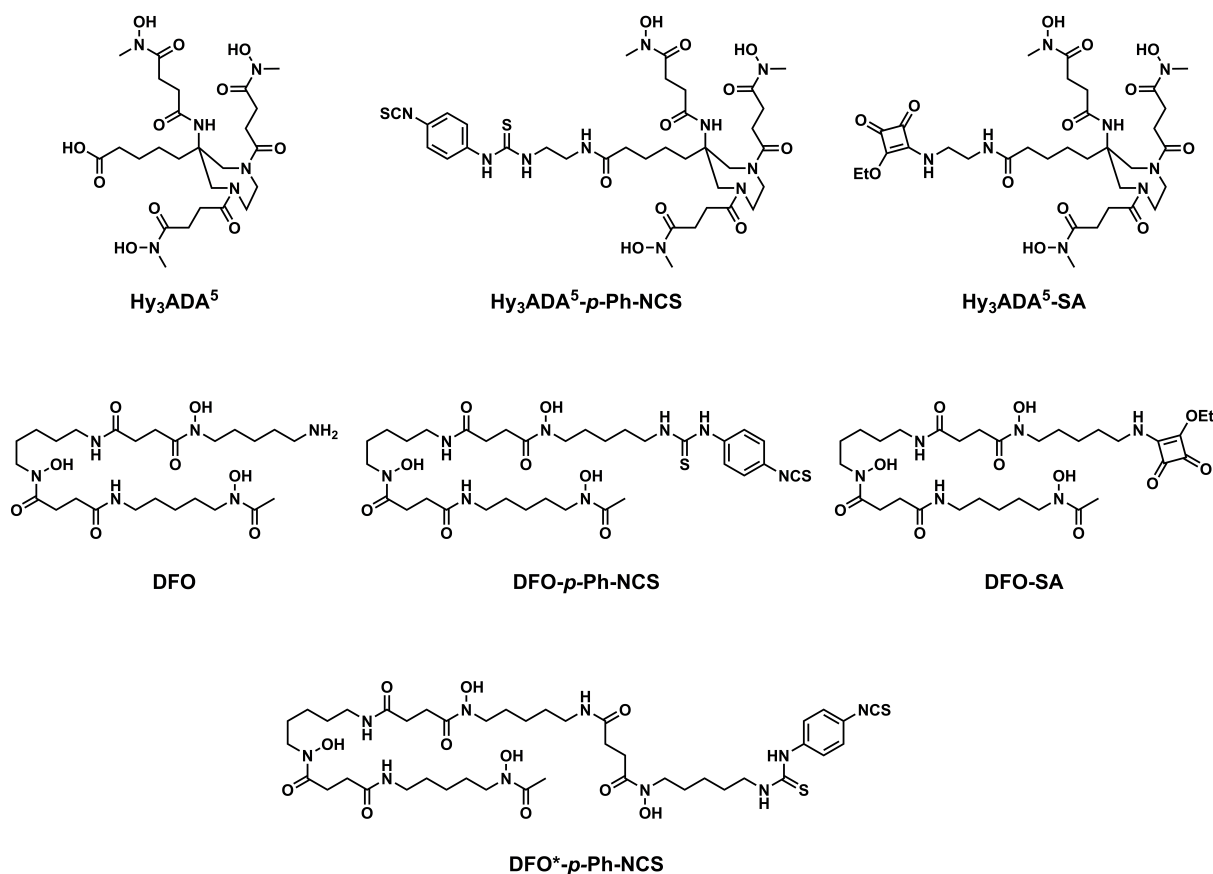


**Figure 1:** Schematic overview illustrating the design concept of the new bifunctional <sup>89</sup>Zr-chelator Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> consisting of a 6-amino-1,4-diazepane backbone (green), a pentanoic acid linker (blue) and three hydroxamate bearing sidechains (red), AAZTA<sup>5</sup>/DATA<sup>5m</sup> and deferoxamine served as guiding structures.

Therefore, we hereby present the development and *in vitro* evaluation of novel <sup>89</sup>Zr-chelator derivatives based on hydroxamate-functionalized 6-amino-1,4-diazepane for future immuno-PET applications. Compared to linear DFO derivatives, the more rigid basic scaffold in combination with six oxygen donors being potentially supported by three additional amide groups represents a promising system to ensure high <sup>89</sup>Zr-complex stability while still allowing for rapid radiolabeling kinetics under mild conditions. Analogously to AAZTA<sup>5</sup> and DATA<sup>5m</sup>, bifunctionality is given by means of a pentanoic acid linker (Fig. 1). Two further bifunctional derivatives were prepared by extending the free carboxylic acid with either a *p*-isothiocyanatophenyl or squaramide functionality for bioconjugation chemistry. Similarly to the thiourea-strategy, utilization of a squaramide linker provides straightforward functionalization of amine residues of the antibody selectively leading to squaric acid diamides. Despite several beneficial advantages such as high selectivity for primary amines, stepwise pH dependent amidation and introduction of further potential donor oxygens, squaramide-coupling still represents an unconventional but innovative method in radiopharmaceutical chemistry [50,51].



We evaluated these novel bifunctional chelator derivatives regarding  $^{89}\text{Zr}$ -labeling kinetics at mild conditions and *in vitro* complex stability both stand-alone and coupled to the antibody bevacizumab (trade name Avastin®). In our study, this commercially available VEGF-A inhibitor merely served as model biomolecule with mAb profile without addressing its pharmacology in detail. For comparison, we analogously investigated different DFO derivatives and their corresponding immunoconjugates (Fig. 2).



**Figure 2:** Overview showing the structures of the novel bifunctional chelators Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS as well as of corresponding deferoxamine derivatives DFO, DFO-SA, DFO-*p*-Ph-NCS and DFO\* -*p*-Ph-NCS that served as reference systems.

## MATERIALS AND METHODS

### General

All nonradioactive chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Merck, VWR, TCI, Acros Organics, Fluka, AlfaAesar, Fisher Scientific, Chematech and Macrocyclics and used without further purification unless otherwise declared. For radiolabeling reactions trace metal-free substances were used. Column chromatography was performed using silica gel 60 (0.063–0.200 mm, Acros Organics) as stationary phase and the respectively specified solvents as mobile phase. NMR measurements were performed using a Bruker Avance III HD 400 (400 MHz) or Avance III 600 (600 MHz). ESI<sup>+</sup> mass spectrometry was measured via Agilent Technologies 1220 Infinity LC system coupled to an Agilent Technologies 6130 Single Quadrupole LC/MS system. HPLC purification and analysis was performed using a Merck LaChrom system with Hitachi L7100 pump and L7400 UV-detector and the respectively mentioned column and conditions. Purification of the immunoconjugates was performed via fractionated SEC using PD-10 Desalting Columns (8.3 mL Sephadex™ G-25, GE Healthcare). Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry was measured in linear positive mode via Bruker autoflex® maX MALDI-TOF/TOF system and analyzed via Bruker flexAnalysis software. For radiolabeling experiments n.c.a. [<sup>89</sup>Zr]Zr-oxalate in 1 M oxalic acid (PerkinElmer, Boston, USA) was used. Radioactivity of the samples was measured using a PC-based dose calibrator (ISOMED 2010, Nuklear Medizintechnik Dresden GmbH). Radiochemical conversions and purities were determined via radio thin layer chromatography (radio-TLC, stationary phase: Merck Silica 60 F<sub>254</sub> TLC plates; mobile phase: 0.1 M citrate-buffer pH 4), image plate scanner (CR35-Bio, Elysia Raytest) and AIDA Image Analysis software (Elysia Raytest).

### Organic Synthesis

#### 4-((Benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoic acid (**4**)

4-((Benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoic acid **4** was synthesized in four steps according to the literature [52]. Detailed synthesis descriptions are provided in the Supporting Information.

#### Methyl-5-(1,4-dibenzyl-6-nitro-1,4-diazepan-6-yl)pentanoate (**5**)

A mixture of 2-nitrocyclohexanone (2.00 g, 13.9 mmol), Amberlyst® A21 (1.05 g) and abs. methanol (35 mL) was stirred at 60 °C under reflux for 1 h. *N,N'*-Dibenzylethylenediamine (3.36 g, 13.9 mmol) and paraformaldehyde (1.67 g, 55.5 mmol) were added to the solution. The resulting suspension was heated to 80 °C and stirred overnight. After completion of the reaction, the mixture was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After purification via column chromatography (cyclohexane/ethylacetate 9:1, *R<sub>f</sub>* = 0.27) product **5** was obtained as yellow oil (5.20 g, 11.8 mmol, 85%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 7.27 (m, 10H); 3.72 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H); 3.64 (s, 3H); 3.56 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H); 3.49 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H); 2.94 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H); 2.59 (m, 4H); 2.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H); 1.55 (m, 2H); 1.29 (m, 2H); 0.76 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 173.6 (s); 139.1 (s); 129.1 (s); 128.3 (s); 127.3 (s); 94.8 (s); 64.9 (s); 61.8 (s); 58.9 (s); 51.5 (s); 36.5 (s); 33.6 (s); 24.6 (s); 22.6 (s). MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 440.3 [*M* + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 439.25.

**Methyl-5-(6-(4-((benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanamido)-1,4-bis(4-((benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-1,4-diazepan-6-yl)pentanoate (7)**

**5** (505 mg, 1.15 mmol) was dissolved in abs. methanol (15 mL) and a catalytic amount of Pd(OH)<sub>2</sub>/C (20 wt%) was added. The resulting mixture was stirred intensively for 16 h under an atmosphere of hydrogen. After completion of the reaction, the catalyst was removed via filtration over Celite® and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The crude yellowish, oily product **6** (246 mg) was used for the following reaction without further purification. MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 230.2 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 229.18.

To a solution of **4** (914 mg, 3.85 mmol) and DIPEA (2.01 mL, 11.8 mmol) in anhydrous DMF (15 mL) HATU (1.88 g, 4.94 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature under argon atmosphere. Subsequently **6** (246 mg, 1.07 mmol) was added and stirring continued overnight. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was dissolved in chloroform (30 mL), washed with water (3 × 10 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated again. The crude product was purified via column chromatography (chloroform/methanol 25:1, R<sub>f</sub> = 0.36) to yield **7** (487 mg, 0.55 mmol, 51%) as amber-colored solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 7.44–7.31 (m, 15H); 4.96–4.80 (m, 6H); 4.51 (dd, *J* = 15.0, 7.8 Hz, 1H); 4.08–3.97 (m, 1H); 3.72–3.59 (m, 3H); 3.49–3.38 (m, 1H); 3.37–3.24 (m, 2H); 3.22 (s, 1H); 3.19–3.16 (m, 3H); 3.13 (d; *J* = 5.46, 4H); 3.01–2.86 (m, 2H); 2.83 (s, 3H); 2.80–2.47 (m, 10H); 2.46–2.34 (m, 2H); 2.34–2.23 (m, 2H); 1.66–1.54 (m, 2H); 1.44–1.19 (m, 3H). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 887.4 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>47</sub>H<sub>62</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>: 886.45.

**5-(6-(4-((Benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanamido)-1,4-bis(4-((benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-1,4-diazepan-6-yl)pentanoic acid (8)**

1 M LiOH (508 μL, 0.51 mmol) was added to a solution of **7** (226 mg, 0.25 mmol) in 1,4-dioxane/water (2:1, 3 mL) and the resulting solution was stirred for 3 h at room temperature. After evaporation of the solvents under reduced pressure, the residue was treated with 1 M NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) and extracted with chloroform (4 × 10 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure yielding **8** (171 mg, 0.20 mmol, 78%) as colorless solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 7.42–7.27 (m, 15H); 4.92–4.79 (m, 5H); 4.55–4.36 (m, 2H); 4.32–4.11 (m, 2H); 4.10–3.88 (m, 2H); 3.36–3.07 (m, 10H); 2.96–2.81 (m, 3H); 2.80 (s, 3H); 2.78–2.24 (m, 11H); 2.23–2.09 (m, 2H); 1.61–1.44 (m, 2H); 1.42–1.17 (m, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 180.0 (s); 175.3 (s); 174.0 (s); 172.9 (s); 172.6 (s); 134.8 (s); 134.6 (s); 129.3 (s); 129.3 (s); 129.2 (s); 129.2 (s); 128.9 (s); 128.7 (s); 128.7 (s); 128.6 (s); 128.4 (s); 128.3 (s); 127.8 (s); 77.25 (s); 76.2 (s); 75.6 (s); 67.1 (s); 61.4 (s); 56.0 (s); 50.4 (s); 49.9 (s); 47.0 (s); 46.8 (s); 39.3 (s); 38.6 (s); 36.5 (s); 36.4 (s); 33.4 (s); 31.4 (s); 31.1 (s); 27.9 (s); 27.5 (s); 26.9 (s); 25.9 (s); 22.9 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 873.4 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>46</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>: 872.43.

**5-(6-(4-(Hydroxy(methyl)amino)-4-oxobutanamido)-1,4-bis(4-(hydroxy(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-1,4-diazepan-6-yl)pentanoic acid (9)**

To a solution of **8** (50 mg, 57.3  $\mu\text{mol}$ ) in abs. methanol (3 mL) a catalytic amount of Pd/C (10 wt%) was added. The resulting mixture was intensively stirred for 30 min under an atmosphere of hydrogen. After completion of the reaction the suspension was filtered over Celite<sup>®</sup> and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After purification via HPLC (column: Phenomenex Synergi C18 semipreparative (250  $\times$  10 mm) 4  $\mu$ , flow rate: 5 mL/min, 10% to 16% MeCN + 0.1% TFA in 20 min,  $t_R$  = 14.8 min) **9** (9.1 mg, 15.1  $\mu\text{mol}$ , 26%) was obtained as pale amber-colored solid. MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 603.3 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>: 602.29.

**N<sup>1</sup>-(6-(5-((2-(Benzylamino)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-bis(4-(benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-1,4-diazepan-6-yl)-N<sup>4</sup>-(benzyloxy)-N<sup>4</sup>-methylsuccinamide (10)**

**8** (171 mg, 0.20 mmol) was dissolved in anhydrous acetonitrile (3 mL) under argon atmosphere. Successively, HBTU (75 mg, 0.20 mmol), HOBt (78 mg, 0.58 mmol) and DIPEA (100  $\mu\text{L}$ , 0.59 mmol) were added and the resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature. *N*-Benzyloxyethylendiamine (59  $\mu\text{L}$ , 0.39 mmol) was added and stirring continued for further 3 h. After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in chloroform (20 mL). The organic solution was washed with water (3  $\times$  10 mL) and the aqueous phases were re-extracted once again with chloroform (20 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure yielding **10** (182 mg, 0.18 mmol, 92%) as colorless oil. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 7.47–7.20 (m, 20H); 4.96–4.79 (m, 5H); 4.33–4.24 (m, 1H); 4.07–3.99 (m, 2H); 3.98–3.86 (m, 2H); 3.70–3.60 (m, 2H); 3.53–3.43 (m, 2H); 3.31–3.22 (m, 1H); 3.19–3.09 (m, 8H); 3.07–2.92 (m, 2H); 2.80 (s, 9H); 2.75–2.61 (m, 4H); 2.60–2.52 (m, 2H); 2.44–2.38 (m, 1H); 2.22–2.12 (m, 2H); 1.49–1.10 (m, 6H). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 1005.5 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>55</sub>H<sub>72</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 1004.54.

**N<sup>1</sup>-(6-(5-((2-Aminoethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-bis(4-(hydroxy(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-1,4-diazepan-6-yl)-N<sup>4</sup>-hydroxy-N<sup>4</sup>-methylsuccinamide (11)**

To a solution of **10** (100 mg, 99.5  $\mu\text{mol}$ ) in abs. methanol (5 mL) a catalytic amount of Pd/C (10 wt%) was added and the resulting mixture was intensively stirred for 4 h under an atmosphere of hydrogen. After completion of the reaction, the catalyst was removed via filtration over Celite<sup>®</sup> and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield **11** (59.7 mg, 92.6  $\mu\text{mol}$ , 93%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 3.72–3.63 (m, 4H); 3.51–3.47 (m, 1H); 3.28–3.17 (m, 5H); 3.04–2.93 (m, 2H); 2.83–2.77 (m, 2H); 1.48–1.34 (m, 8H); 1.31–1.17 (m, 7H); 1.25 (s, 9H); 1.16–1.09 (m, 2H); 0.88 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 645.3 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>O<sub>10</sub>: 644.35.

***N*<sup>1</sup>-(6-(5-((2-((2-Ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-bis(4-(hydroxy(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-1,4-diazepan-6-yl)-*N*<sup>4</sup>-hydroxy-*N*<sup>4</sup>-methylsuccinamide (12)**

To a solution of **11** (17.8 mg, 27.6  $\mu$ mol) in phosphate-buffer (0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7, 2 mL) 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (8.2  $\mu$ L, 55.4  $\mu$ mol) was added. The pH was readjusted to 7 with 1 M NaOH and the solution was stirred for 3 h at room temperature. After completion of the reaction, the product was purified via HPLC (column: Phenomenex Synergi C18 semipreparative (250  $\times$  10 mm) 4  $\mu$ , flow rate: 5 mL/min, 12% to 18% MeCN + 0.1% TFA in 30 min, *t*<sub>R</sub> = 18.0 min) yielding **12** (7.4 mg, 9.6  $\mu$ mol, 35%) as pale amber-colored solid. MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 769.4 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>33</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>: 768.37.

***N*<sup>1</sup>-(1,4-Bis(4-(hydroxy(methyl)amino)-4-oxobutanoyl)-6-(5-((2-(3-(4-isothiocyanatophenyl)thio-ureido)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-6-yl)-*N*<sup>4</sup>-hydroxy-*N*<sup>4</sup>-methylsuccinamide (13)**

**11** (20.0 mg, 31.0  $\mu$ mol) was dissolved in isopropanol/water (4:1, 4 mL). Subsequently, a solution of 1,4-phenylene diisocyanate (61.2 mg, 0.32 mmol) in chloroform (4 mL) was added while stirring followed by immediate addition of triethylamine (40.5  $\mu$ L, 0.29 mmol). The resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature. After completion of the reaction the solvents were evaporated under reduced pressure and the crude product was purified via HPLC (column: Phenomenex Synergi C18 semipreparative (250  $\times$  10 mm) 4  $\mu$ , flow rate: 5 mL/min, 25% to 40% MeCN + 0.1% TFA in 20 min, *t*<sub>R</sub> = 15.5 min) to yield **13** (7.3 mg, 8.7  $\mu$ mol, 28%) as colorless powder. MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 837.3 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>: 836.33.

**Deferoxamine squaramide ethyl ester (14)**

Deferoxamine squaramide ethyl ester **14** was synthesized according to the literature [25]. Detailed synthesis description is provided in the Supporting Information.

**Antibody coupling and radiolabeling with <sup>89</sup>Zr**

**Synthesis and purification of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb and DFO-SA-mAb**

120  $\mu$ L of bevacizumab solution (3.0 mg mAb, 20.1 nmol, 25 mg/mL, Avastin<sup>®</sup>, Roche) was diluted with 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-buffer (pH 9, 1 mL). A tenfold molar excess of a solution of either Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA (60.4  $\mu$ L, 201.3 nmol, 2.563 mg/mL in DMSO) or DFO-SA (60.4  $\mu$ L, 201.3 nmol, 2.283 mg/mL in DMSO) was added in 6 portions while shaking via thermomixer (500 rpm). The pH of the mixture was adjusted to 9 with 1 M NaOH solution before shaking overnight at room temperature. The resulting immunoconjugates were subsequently purified via fractionated SEC. In detail, the PD-10 column was first preconditioned with 20 mL PBS. The respective reaction mixture was then completely applied to the column and the flow-through was collected in the first fraction. Subsequently, a further 9 fractions of 0.5 mL PBS each were collected. The protein containing fractions 6 and 7 were combined and homogenized before subsequent radiolabeling.

### **Synthesis and purification of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, DFO-*p*-Ph-NCS-mAb and DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb**

120  $\mu$ L of bevacizumab solution (3.0 mg mAb, 20.1 nmol, 25 mg/mL, Avastin<sup>®</sup>, Roche) was diluted with 880  $\mu$ L PBS and the pH of the mixture was adjusted to 9 with 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. A tenfold molar excess of a solution of either Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS (60.4  $\mu$ L, 201.3 nmol, 2.790 mg/mL in DMSO), DFO-*p*-Ph-NCS (60.4  $\mu$ L, 201.3 nmol, 2.510 mg/mL in DMSO) or DFO\*-*p*-Ph-NCS (60.4  $\mu$ L, 201.3 nmol, 3.177 mg/mL in DMSO) was added in 6 portions while shaking via thermomixer (500 rpm). The mixture was shaken for 1 h at 37 °C. The resulting immunoconjugates were subsequently purified via fractionated SEC similarly to the squaramide-coupled analogues.

### **Determination of chelator-to-antibody ratios (CAR) using MALDI-TOF mass spectrometry**

Solutions of unmodified bevacizumab and of the SEC-purified immunoconjugates Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, DFO-SA-mAb, DFO-*p*-Ph-NCS-mAb and DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb were desalted via PD-10 column and lyophilized. Subsequently, a 1:1 solution of acetonitrile and water containing 0.1% TFA was added. The samples were mixed with a matrix solution of sinapinic acid on the target plate, air dried and MALDI-TOF mass spectrometry was measured using linear positive mode. The obtained molecular weights were used to determine the average number of conjugated chelator moieties per protein as follows:

$$\text{CAR} = \frac{\text{MW}_{\text{conj}} - \text{MW}_{\text{mAb}}}{\text{MW}_{\text{chel}}}$$

with MW<sub>conj</sub> = measured average molecular weight of the respective immunoconjugate, MW<sub>mAb</sub> = measured average molecular weight of unmodified bevacizumab and MW<sub>chel</sub> = mass gain per respectively conjugated chelator moiety.

### **Radiolabeling of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS, DFO mesylate, DFO-SA, DFO-*p*-Ph-NCS and DFO\*-*p*-Ph-NCS with zirconium-89**

100  $\mu$ L [<sup>89</sup>Zr]Zr-oxalate solution (1 M oxalic acid, 10–12 MBq) was neutralized with 45  $\mu$ L 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and incubated for 3 min at room temperature. Subsequently, 150  $\mu$ L 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) and 200  $\mu$ L of a solution of either Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS, DFO mesylate, DFO-SA, DFO-*p*-Ph-NCS or DFO\*-*p*-Ph-NCS (20 nmol, 6  $\mu$ L of 3.33 mmol/L chelator in DMSO diluted with 194  $\mu$ L PBS) were added. Finally, the solution was filled up with further 255  $\mu$ L 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) to a total volume of 750  $\mu$ L. The reaction mixture was shaken for 90 min at room temperature and 500 rpm via thermomixer. Radiolabeling efficiency was investigated at different times via radio TLC (<sup>89</sup>Zr-labeled chelator: R<sub>f</sub> = 0–0.1; free zirconium-89: R<sub>f</sub> = 0.4–0.6).

### **Radiolabeling of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, DFO-SA-mAb, DFO-*p*-Ph-NCS-mAb and DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb with zirconium-89 and purification of the resulting radioimmunoconjugates**

100 µL [<sup>89</sup>Zr]Zr-oxalate solution (1 M oxalic acid, 10–12 MBq) was neutralized with 45 µL 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and incubated for 3 min at room temperature. Subsequently, 150 µL 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) and 200 µL of a PBS-solution of either Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, DFO-SA-mAb, DFO-*p*-Ph-NCS-mAb or DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb (472–731 µg protein) were added. Finally, the solution was filled up with further 255 µL 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) to a total volume of 750 µL. The reaction mixture was shaken for 90 min at room temperature and 500 rpm via thermomixer. Radiolabeling efficiency was investigated at different times via radio TLC (<sup>89</sup>Zr-labeled mAb: R<sub>f</sub> = 0; free zirconium-89: R<sub>f</sub> = 0.4–0.6). The resulting radioimmunoconjugates [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-mAb and [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb were purified via fractionated SEC using the same conditions as for purification prior to radiolabeling. The antibody-containing fractions were identified by measurement of radioactivity and radiochemical purity was determined via radio-TLC before combination and homogenization.

### **Determination of *in vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled chelator derivatives**

The solution of [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO mesylate, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-SA, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS or [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS (200 µL) was added to either 500 µL human serum or 500 µL PBS and the resulting mixtures were shaken via thermomixer at 37 °C and 500 rpm for 7 d. The proportion of the intact conjugate versus released radionuclide was determined via radio-TLC at various times.

### **Determination of *in vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled radioimmunoconjugates**

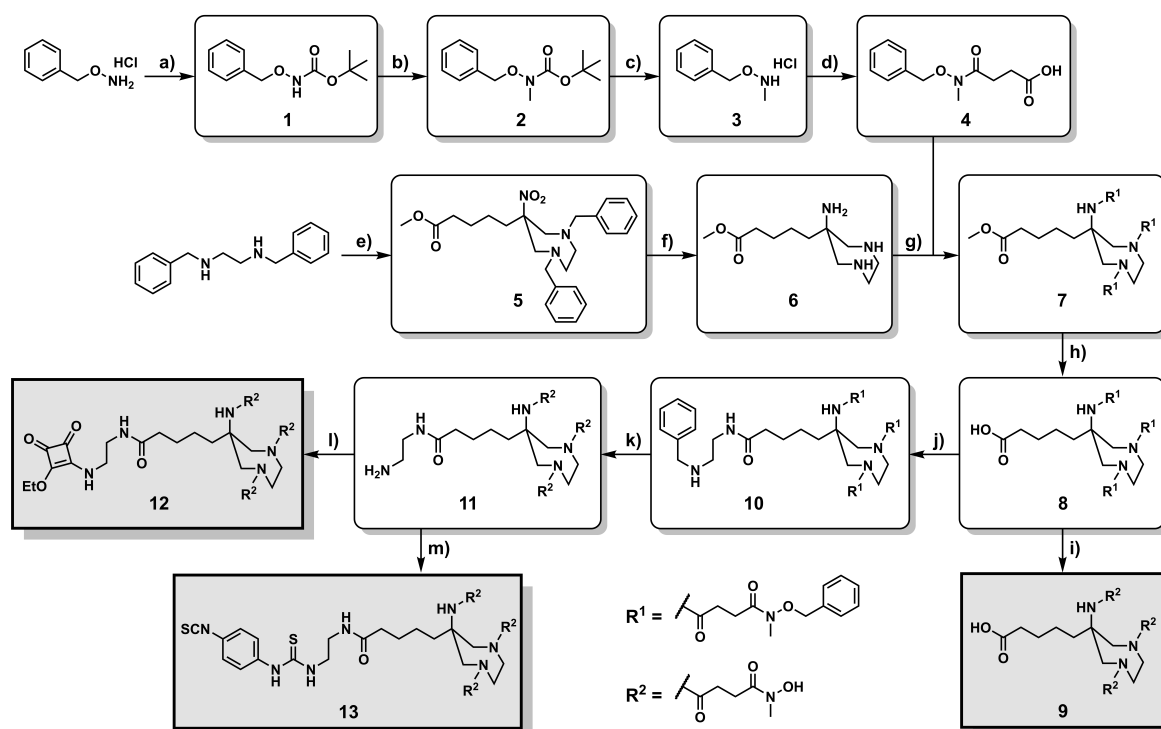
The purified radioimmunoconjugate [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-mAb or [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb (in 300 µL PBS) was added to either 500 µL human serum or 500 µL PBS and the resulting mixtures were shaken via thermomixer at 37 °C and 500 rpm for 7 d. The proportion of the intact conjugate versus released radionuclide was determined via radio-TLC at various times.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Organic Synthesis

The benzyl-protected, hydroxamate bearing precursor **4** was synthesized in four steps with an overall yield of 87% according to the procedure described by Olshvang *et al.* [52]. Starting from *O*-benzylhydroxylamine hydrochloride, successive Boc-protection, methylation, deprotection and reaction with succinic anhydride led to the desired product containing of a linkable carboxylic acid (Scheme 1).

The 6-amino-1,4-diazepane scaffold including a pentanoic acid linker was prepared similarly to the first steps of the AAZTA<sup>5</sup> synthesis already published by our group [43]. Formation of the diazepane cycle of **5** was achieved by *in situ* ring-opening of 2-nitrocyclohexane and subsequent double Nitro-Mannich reaction of the resulting nucleophilic compound with the iminium ion derived from *N,N'*-dibenzylethylenediamine and paraformaldehyde. Subsequently, catalytic hydrogenation led to simultaneous deprotection of the endocyclic amines and reduction of the nitro group to an exocyclic amine resulting in the desired precursor **6** (Scheme 1).



**Scheme 1:** Schematic overview of the synthesis of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA and Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS: (a) di-*tert*-butyl dicarbonate, Et<sub>3</sub>N, THF/H<sub>2</sub>O (1:1), 97%; (b) CH<sub>3</sub>I, NaH, DMF, 95%; (c) 4 M HCl in 1,4-dioxane, 100%; (d) succinic anhydride, 1,4-dioxane, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 94%; (e) 2-nitrocyclohexanone, Amberlyst® A21, paraformaldehyde, MeOH, 85%; (f) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, H<sub>2</sub>, MeOH; (g) DIPEA, HATU, DMF, 51%; (h) 1 M LiOH, 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (2:1), 78%; (i) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 26%; (j) *N*-benzylethylenediamine, HBTU, HOBT, DIPEA, MeCN, 92%; (k) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, 93%; (l) 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione, phosphate-buffer pH 7, 35%; (m) 1,4-phenylene diisocyanate, isopropanol/H<sub>2</sub>O (4:1), chloroform, Et<sub>3</sub>N, 28%.



The next step first includes the combination of this hybrid structure with three hydroxamic acid bearing sidechains **4** via amidation using HATU as conventional coupling reagent. The remaining methyl ester of compound **7** was subsequently cleaved via base-catalyzed hydrolysis to provide the aforementioned pentanoic acid linker. Finally, hydrogenolytic deprotection of **8** and purification via HPLC led to the novel bifunctional chelator Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> (**9**, Scheme 1) with a yield of 9% over all steps proceeding from *N,N'*-dibenzylethylenediamine.

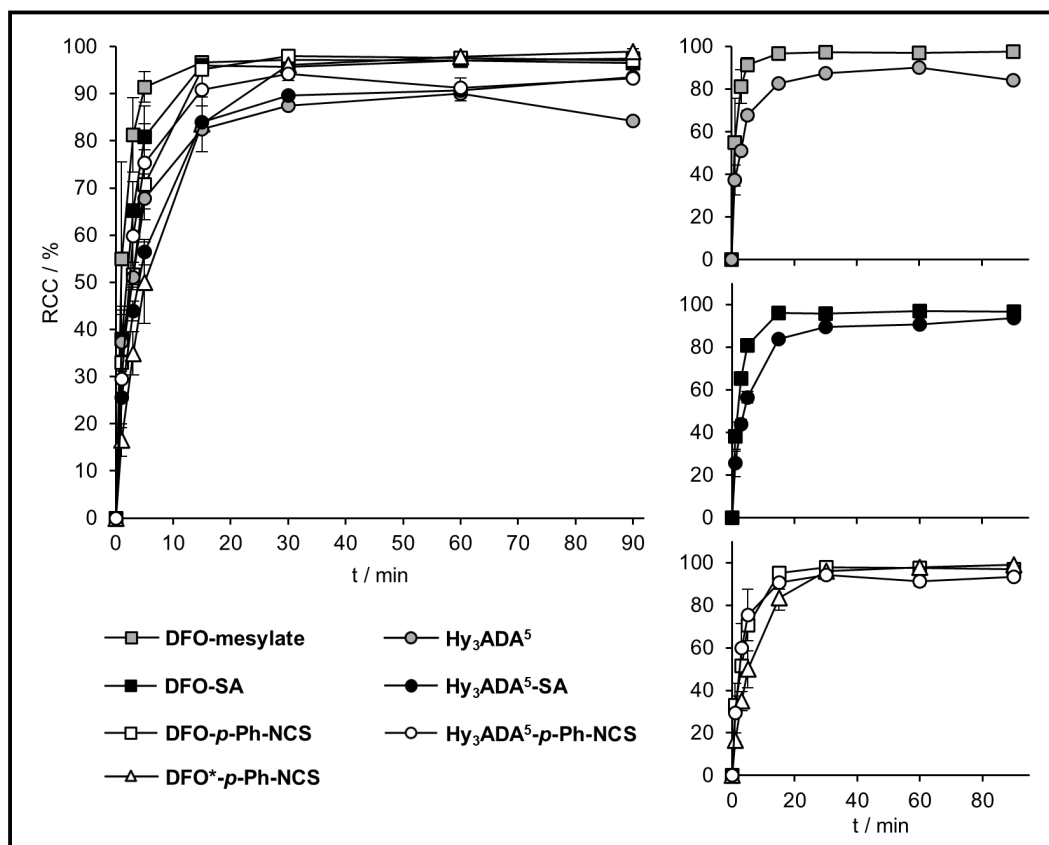
Starting from the benzyl-protected structure **8**, a further synthesis route was pursued to produce two additional bifunctional derivatives of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> that should simplify coupling chemistry in combination with amine bearing target vectors such as proteins. Therefore, mono-benzyl-protected ethylene diamine was coupled to the free carboxylic acid via amidation to yield compound **10**. Subsequent hydrogenolytic deprotection of all four protecting groups resulted in derivative **11** providing a terminal primary amine, which in turn was reacted with squaric acid diethyl ester at pH 7 in the next step to finally obtain the squaramide-derivative Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA **12**. To prevent formation of the corresponding diamide at more basic conditions, accurate pH control using a suitable buffer medium is required. In a further approach, 1,4-phenylene diisocyanate was coupled to the primary amine of **11** via formation of a stable thiourea bond to yield Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS **13**. In this case, formation of the chelator-dimer could also be completely avoided using a tenfold molar excess of diisocyanate linker and a two-phase solvent system. Both final structures Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA and Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS were purified via HPLC before antibody coupling and radiolabeling experiments resulting in overall yields of 10% and 8%, respectively. The rather moderate yields of the final synthesis steps of **9**, **12**, and **13** do not reflect low formation of the end products (as confirmed via reaction control), but are more attributed to a loss in the course of HPLC purification.

In addition to the commercially available deferoxamine derivatives DFO mesylate, DFO-*p*-Ph-NCS and DFO\*-*p*-Ph-NCS, the corresponding squaramide-analogue DFO-SA (**14**) was synthesized according to Rudd *et al.* starting from DFO mesylate and squaric acid diethyl ester [25]. After HPLC purification, the monoamide was obtained with a yield of 33%.

### **Radiolabeling of the stand-alone chelator derivatives of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> with zirconium-89 in comparison to corresponding deferoxamine systems**

Prior to protein conjugation, the novel Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> and its derivatives Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA and Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS were evaluated for their <sup>89</sup>Zr-labeling as stand-alone bifunctional chelators. Mild radiolabeling conditions were selected in accordance with conventional standard procedures for <sup>89</sup>Zr-labeling of deferoxamine-based radiotracers [53]. For comparison, DFO mesylate, DFO-SA, DFO-*p*-Ph-NCS and DFO\*-*p*-Ph-NCS served as reference being investigated under identical conditions (Fig. 3, Table S1). The hybrid systems based on 6-amino-1,4-diazepane generally indicated fast labeling kinetics leading to high radiochemical conversions. In detail, complexation of the radiometal via the basic structure Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> provided 67.7 ± 2.2% bound activity already after 5 min and culminated in a maximum yield of 90.1 ± 1.6% after 60 min. The squaramide-functionalized derivative Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA showed a slightly slower increase in bound activity, nevertheless reaching an even higher final radiochemical conversion of 93.6 ± 0.4% after 90 min. Thus, the squaramide moiety spaced by six methylene groups and one amide bond obviously neither has a significant positive nor negative influence on the <sup>89</sup>Zr-labeling properties of the actual chelator system at least under the conditions used herein. The *p*-

isothiocyanatophenyl-functionalized analogue  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -*p*-Ph-NCS revealed even slightly faster labeling kinetics compared to its parental system  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  ( $75.3 \pm 12.1\%$  after 5 min) as well as final results similar to  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -SA ( $93.3 \pm 0.2\%$  after 90 min).

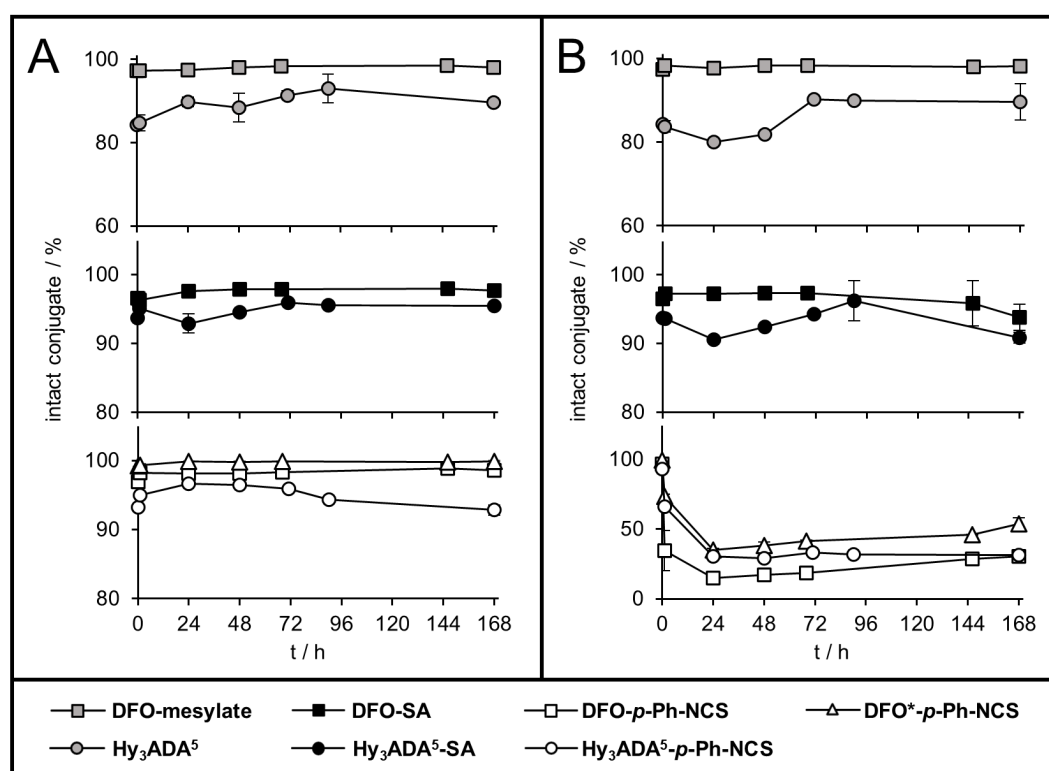


**Figure 3:** Radiolabeling efficiency of  $^{89}\text{Zr}$ - $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ ,  $^{89}\text{Zr}$ - $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -SA,  $^{89}\text{Zr}$ - $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -*p*-Ph-NCS,  $^{89}\text{Zr}$ -DFO,  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-SA,  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-*p*-Ph-NCS and  $^{89}\text{Zr}$ -DFO\*-*p*-Ph-NCS at room temperature using 20 nmol of the respective chelator and 10–12 MBq zirconium-89 in HEPES-buffer (pH 7), values displayed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

As expected, and confirming the typical behavior of linear, acyclic chelator systems,  $^{89}\text{Zr}$ -labeling of DFO mesylate, DFO-SA and DFO-*p*-Ph-NCS provided even slightly faster complexation with radiochemical conversions of approx. 95–97% already after 15 min without significant increase in the further course of the reaction. Apparently, both the squaramide and *p*-isothiocyanatophenyl moiety marginally affected the incorporation of the radiometal at the beginning of the reaction compared to non-functionalized deferoxamine but in the further progress almost identical radiochemical conversions were obtained. Formation of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO\*-*p*-Ph-NCS indicated slightly delayed complexation of the tetravalent radiometal with  $50.0 \pm 8.6\%$  after 5 min, which is presumably due to an enhanced steric demand caused by the extended chain length of the actual chelator. Nevertheless, based on the higher quantity of hydroxamate donors, DFO\*-*p*-Ph-NCS revealed excellent labeling properties with increasing duration up to almost quantitative conversion to the corresponding radioconjugate ( $98.9 \pm 0.6\%$  after 90 min). In summary, the *p*-isothiocyanatophenyl-functionalized version showed the best results of newly developed  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  derivatives, whereas DFO mesylate and DFO\*-*p*-Ph-NCS indicated the fastest labeling kinetics and the highest overall yields, respectively of all herein studied chelators.

## ***In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> and DFO derivatives**

The <sup>89</sup>Zr-labeled bifunctional chelators were investigated regarding their *in vitro* complex stability both in phosphate buffered saline representing the later formulation medium and in human serum at 37 °C over a period of 7 days (Fig. 4, Table S2, S3). This time interval is adequate to account for both the half-life of zirconium-89 and the typical pharmacokinetics of full-size antibodies and thus covers an appropriate immuno-PET imaging period. After 7 days, the basic chelator scaffold Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> provided a percentage of bound radiometal of 89.7 ± 0.4% and 89.7 ± 4.4% in PBS and human serum, respectively, which even exceeded the initial purity of 84.4%. In both media, small positive and negative fluctuations in the range between approx. 80 and 93% were observed throughout the measurement period, presumably due to further complexation, minimal release and recomplexation of the radiometal. Starting from a radiochemical purity of 93.8%, the squaramide-functionalized Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA revealed similarly high *in vitro* complex stability resulting in 95.5 ± 0.0% and 90.9 ± 0.5% after 7 days in PBS and human serum, respectively.



**Figure 4:** *In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> and DFO derivatives in PBS (A) and human serum (B) at 37 °C within 7 d: measured percentages of incorporated activity (radio-TLC) as a function of time starting from radiochemical purity at the end of labeling experiment, values displayed as mean ± SD (*n* = 3).

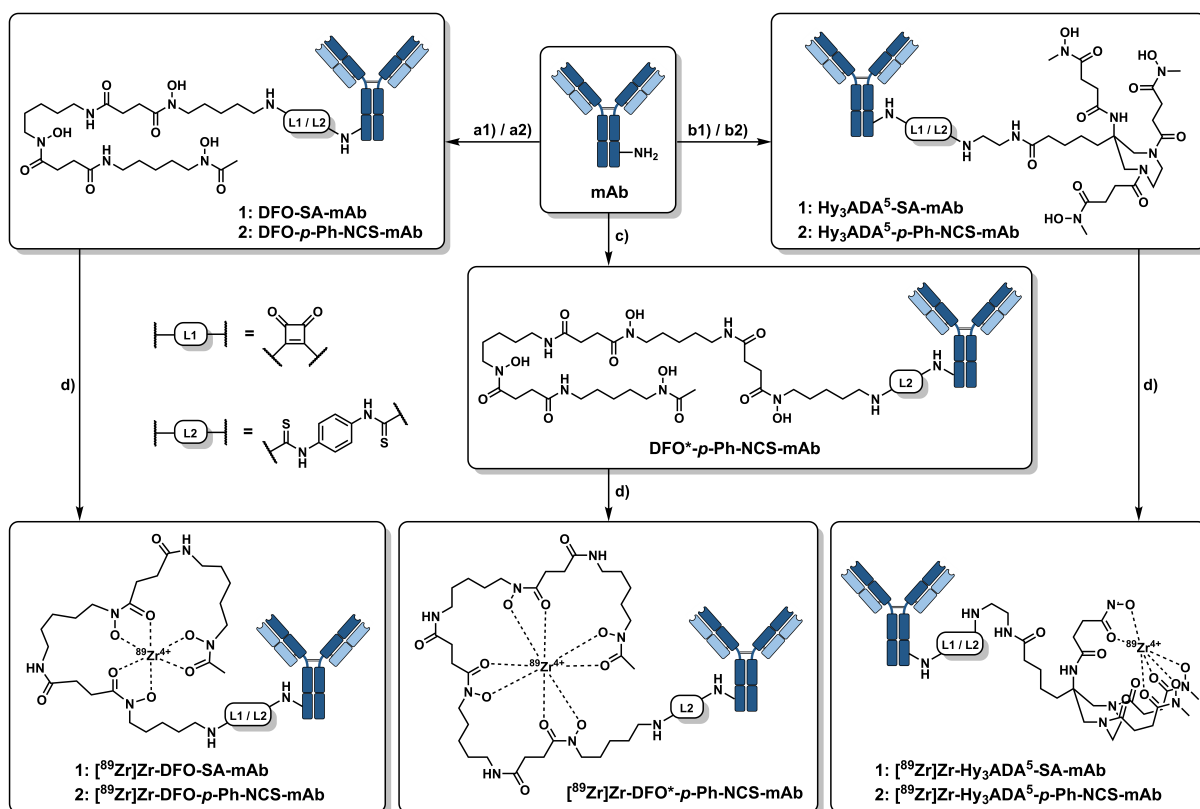
While almost no release of free radiometal could be observed for [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS in formulation medium within 7 days, the radiocomplex disclosed considerable instability only after a short incubation time in human serum. After 24 h, only 30.5 ± 0.7% bound activity, i.e. approx. 33% of the initial value (93.3%) was still present. Despite the fact that no further significant decrease was observed in the later course (31.1 ± 0.6% after 7 days), this represents a major difference compared to the other two Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> derivatives. The free *p*-isothiocyanatophenyl linker therefore apparently

affects the stability of the corresponding radiocomplex in combination with the components of human serum. Since isothiocyanates are also known to react under physiological conditions to form thiocarbamates, dithiocarbamates or thioureas, to some extent this effect is presumably related to the reaction of the free NCS-group with proteins or smaller serum components such as free amino acids [54]. Instead of a distinct small spot representing free uncomplexed  $^{89}\text{Zr}$ , in this case the radio-TLC results indicated a rather diffuse distribution of activity within a large range of approx.  $R_f = 0.4\text{--}1.0$ . Therefore, instability of the *p*-isothiocyanatophenyl-functionalized derivative may not or not only be based on a pure release of free radiometal, but also on alternatively occurring (decomposition) mechanisms leading to the formation of species with lower TLC-retention.

In PBS, the analogously investigated DFO derivatives also revealed very high *in vitro* stability over the entire experimental period without any exception (Fig. 4A). As expressed by almost unchanged values of approx. 97–100% intact conjugate, the  $^{89}\text{Zr}$ -complexes of non-functionalized deferoxamine (mesylate), DFO-SA, DFO-*p*-Ph-NCS and DFO\*-*p*-Ph-NCS indicated no measurable release of free radiometal within 7 days. In human serum,  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO remained completely stable, whereas the squaramide-functionalized  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO-SA initially showed the same behavior until day 3 before revealing a slight instability down to  $93.8 \pm 1.9\%$  incorporated activity within the following 4 days (Fig. 4B). Although this represents only a minor difference, improved stability due to the additional donor oxygens of the squaric acid moiety could therefore not be confirmed in this experiment, at least *in vitro*. Analogously to  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -*p*-Ph-NCS, both the *p*-isothiocyanatophenyl-derivatives of DFO and DFO\* indicated a significant collapse of *in vitro* stability in human serum. While  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr}$ -DFO\*-*p*-Ph-NCS still demonstrated  $73.2 \pm 1.6\%$  bound radiometal after 1 h, the corresponding value of the DFO-analogue dropped to only  $34.5 \pm 14.4\%$  within this short time. Both bifunctional chelator derivatives reached a minimum percentage of intact radioconjugate after 24 h accounting for  $14.9 \pm 1.8\%$  (DFO-*p*-Ph-NCS) and  $35.0 \pm 1.4\%$  (DFO\*-*p*-Ph-NCS). Even though the stability in human serum seems to be insufficiently low in both cases, the extended system DFO\* nevertheless provided improved results compared to its parental structure DFO. Underlining the already mentioned assumption, the free *p*-isothiocyanatophenyl moiety obviously led to significantly reduced *in vitro* stability of respectively  $^{89}\text{Zr}$ -labeled chelators in human serum.

### **Antibody coupling and radiolabeling of the resulting immunoconjugates**

The novel bifunctional derivatives  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -SA and  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -*p*-Ph-NCS were coupled to lysine side chains of the model protein bevacizumab via either pH dependent second amidation of the squaric acid monoamide or formation of a stable thiourea bond. The ratio of respectively conjugated chelators per protein (CAR) was determined using mass spectrometric analysis via MALDI-TOF (Fig. S2, Table 1).  $^{89}\text{Zr}$ -complexation kinetics were subsequently evaluated using the same conditions as for unbound chelators described in section 3.2. Again, squaramide-functionalized DFO-SA as well as DFO-*p*-Ph-NCS and DFO\*-*p*-Ph-NCS served as references being analogously coupled, purified, characterized and radiolabeled (Fig. 5).



**Figure 5:** Synthesis and  $^{89}\text{Zr}$ -labeling of the  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -, DFO- and DFO\*-functionalized antibody conjugates: (a1) 10 eq. DFO-SA, phosphate-buffer pH 9; (a2) 10 eq. DFO-*p*-Ph-NCS, PBS pH 9; (b1) 10 eq.  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -SA, phosphate-buffer pH 9; (b2) 10 eq.  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -*p*-Ph-NCS, PBS pH 9; (c) 10 eq. DFO\*-*p*-Ph-NCS, PBS pH 9; (d)  $^{89}\text{Zr}$ -oxalate, HEPES-buffer pH 7, room temperature.

Successful coupling of the corresponding chelator to the antibody could be confirmed for all investigated conjugates providing a shift to higher molecular weights in the MALDI-TOF mass spectrum compared to the non-functionalized protein (Fig. S2). Dividing the mass difference by the mass gain per conjugated chelator moiety respectively led to the calculated CAR values shown in Table 1. Hence, utilization of a tenfold molar excess of the chelator resulted in an average ratio of 2.68 for  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -SA-mAb, 1.03 for  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$ -*p*-Ph-NCS-mAb, 3.20 for DFO-SA-mAb, 1.94 for DFO-*p*-Ph-NCS-mAb and 0.87 for DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb.

Coupling via formation of squaric acid diamides thus generally tended to show a superior efficiency leading to higher numbers of protein-bound chelator moieties compared to the thiourea-based strategy. However, this may also be partly due to the different duration used for conjugation reactions. Furthermore, among all investigated conjugates, there is a trend of the CAR value to increase along with decreasing molecular weight of the bifunctional chelator, which is presumably due to a lower steric demand and therefore higher accessibility. Considering the fact that either lower or higher molar excesses of the chelator system were used, the herein obtained CAR values of the DFO- and DFO\*-functionalized immunoconjugates were comparable to those reported in the literature (DFO-SA: 20 eq., CAR = 3.4–4.5 [25]; DFO-*p*-Ph-NCS: 3 eq., CAR = 0.3–1.5 [15,24,25,53]; DFO\*-*p*-Ph-NCS: 3 eq., CAR = 0.6–0.8 [24]).

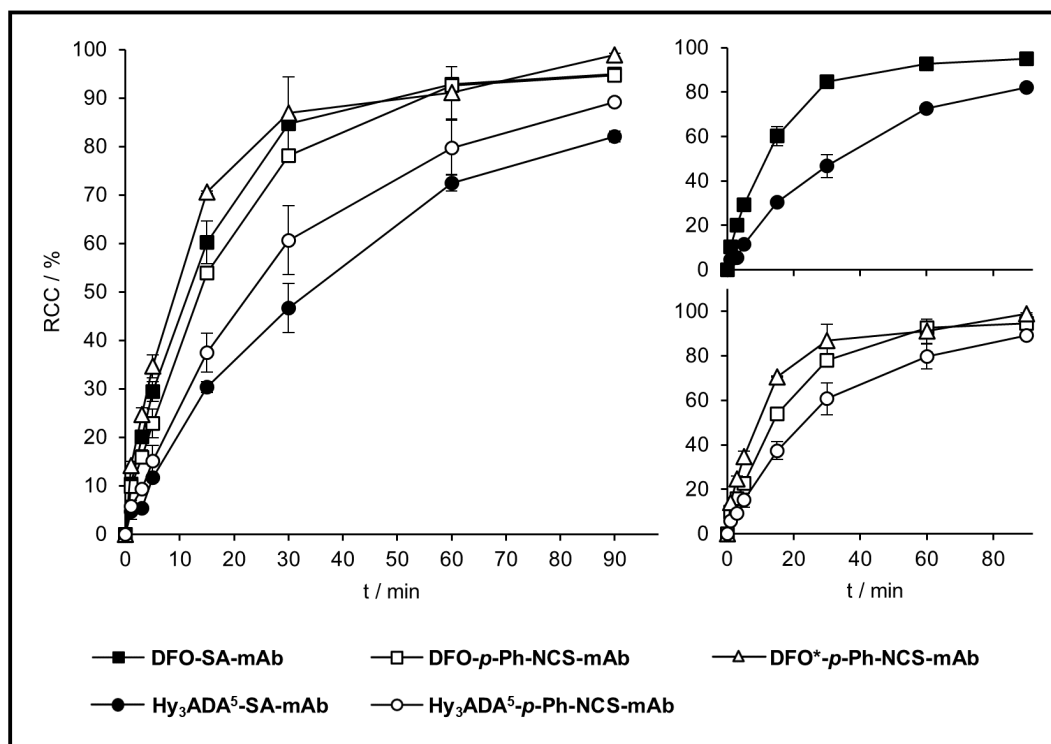
**Table 1:** Measured average molecular weights, mass shifts referenced to the unmodified antibody and calculated chelator-to-antibody ratios (CAR) of the Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-, DFO- and DFO\*-functionalized immunoconjugates.

Antibody / conjugate	Measured average mass (Da)	Mass shift (Da)	Mass gain per chelator (Da)	CAR
unmodified mAb	149192.73	–	–	–
Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> -SA-mAb	151130.69	1937.96	722.32	2.68
Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> - <i>p</i> -Ph-NCS-mAb	150054.99	862.26	836.33	1.03
DFO-SA-mAb	151236.22	2043.49	638.33	3.20
DFO- <i>p</i> -Ph-NCS-mAb	150648.78	1456.05	752.33	1.94
DFO*- <i>p</i> -Ph-NCS-mAb	150017.45	824.72	952.45	0.87

The Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA- and Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-modified immunoconjugates indicated promising <sup>89</sup>Zr-labeling results at mild conditions leading to high radiochemical conversions of 82.0 ± 1.1% and 89.2 ± 0.7%, respectively after 90 min (Fig. 6, Table S4). Here, the *p*-isothiocyanatophenyl-derivative showed not only a slightly better final result, but also consistently faster labeling kinetics as reflected by 60.7 ± 7.1% already after 30 min compared to 46.7 ± 5.1% obtained for the squaramide-analogue after the same duration. Similar to the observed behavior of the stand-alone chelators (3.2) and to the results reported by Chomet *et al.*, the additional donor atoms introduced by the squaric acid moiety therefore had no enhancing influence on the complexation properties of the actual chelator at least under the conditions used herein [27].

Using identical conditions, the linear analogues DFO-SA-mAb and DFO-*p*-Ph-NCS-mAb revealed even better <sup>89</sup>Zr-labeling properties providing fast and high yielding complexation of the radiometal. Initially, the squaramide coupled conjugate showed slightly faster labeling kinetics with radiochemical conversions of 60.2 ± 4.4% after 15 min compared to the formation of [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-mAb accounting for 53.9 ± 1.1%. Nevertheless, the values of both conjugates converged in the further course of the experiment, leading to almost identical results of approx. 95% after 90 min. As similarly observed in the case of unbound chelators described in section 3.2, the DFO\*-functionalized protein provided the highest radiochemical conversion of all investigated antibody conjugates up to 98.8 ± 0.4% after 90 min.

As expected, all investigated chelator derivatives showed slower labeling kinetics if bound to the antibody compared to their free, unbound version. On the one hand, this may be partly due to divergent effective concentrations of the corresponding complex-forming moiety within the labeling samples. While radiolabeling of the stand-alone chelators was performed using 20 nmol (26.7 μM) each, the actual amounts of their protein-bound analogues in the follow-up experiment accounted for 4.1–11.9 nmol (5.4–15.9 μM), as calculated from the used quantities of the immunoconjugates and corresponding CAR-values. On the other hand, the steric demand of the large biomolecule leads to reduced accessibility of the corresponding chelator presumably representing the main cause for an impaired complexation. [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb showed the most rapid formation as reflected by 70.6 ± 0.3% protein bound activity already after 15 min. Therefore, the complexation properties of the actual DFO\*-chelator are obviously less affected by the biomolecule compared to the other systems.

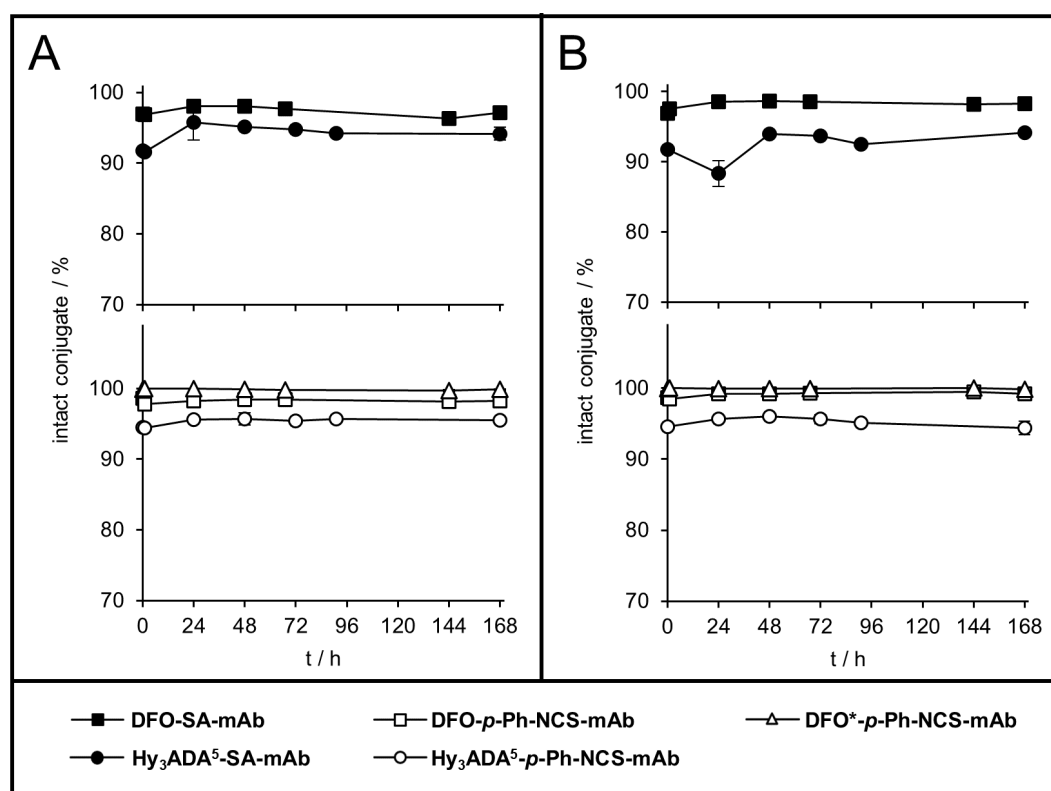


**Figure 6:** Radiolabeling efficiency of [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-p-Ph-NCS-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-p-Ph-NCS-mAb and [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-p-Ph-NCS-mAb at room temperature using 472–731 μg of immunoconjugate and 10–12 MBq zirconium-89 in HEPES-buffer (pH 7), values displayed as mean ± SD (n = 3).

In summary, the novel Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> chelator derivatives indicated slightly slower <sup>89</sup>Zr-complexation compared to the DFO and DFO\*-analogues, especially if coupled to the antibody (82–89% versus 95–99% RCC after 90 min). While the linear DFO contains a variety of freely rotatable C–C bonds, the cyclic and more rigid 1,4-diazepane backbone of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> leads to a more restricted flexibility of the hydroxamate donor groups. The hybrid system therefore provides a certain preorganized coordination geometry, which in turn requires less structural adjustments in the process of radiometal complexation. While formation of the [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-complex should thus be thermodynamically favorable, apparently, it is kinetically more hindered than complexation via DFO. Representing a key property of hybrid chelators, the activation energy of [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> is assumed to be higher than that based on linear systems but significantly lower than that of macrocyclic structures, due to the additional acyclic component. On the one hand, these characteristics ensure high yielding complexation of the radiometal already at room temperature, but may presumably also be responsible for the observed slightly slower labeling kinetics compared to linear DFO derivatives. In the case of antibody conjugates, the differences in radiolabeling efficiency were found to be more pronounced than those of the unbound chelators. Hence, the accessibility of the Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> system seems to be more affected by the additional steric demand of the large biomolecule than that of flexible DFO and DFO\*. Since the curves of both [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb and [<sup>89</sup>Zr]-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-p-Ph-NCS-mAb do not seem to have reached a maximum at the end of the labeling experiment, probably even higher yields could be achieved by further extending the incubation time or by using slightly elevated temperatures.

## ***In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>- and DFO-functionalized immunoconjugates**

Prior to evaluation of their *in vitro* complex stability, the radioimmunoconjugates were purified via second SEC to remove unbound zirconium-89 and small molecule components as well as to exchange the reaction medium to PBS (Fig. S1). All investigated protein-bound complexes, based on both Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> and DFO, indicated no significant release of radiometal in either formulation medium or human serum, at least within the 7-day time interval evaluated herein (Fig. 7, Table S5, S6). Starting from an initial radiochemical purity of 92%, even slightly increased values of 94.2 ± 2.5% and 94.1 ± 0.3% protein bound activity could be observed for [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb in PBS and human serum, respectively at the end of measurement. Presumably caused by further complexation, minor release and recomplexation, marginal fluctuations in the range of about 5–6% occurred in both media throughout the experiment. Investigating the thiourea-coupled analogue [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, no significant changes in the amount of incorporated activity neither positive nor negative could be observed over the entire period of 7 days in both media. Final values of 95.5 ± 0.1% (PBS) and 94.4 ± 1.0% (human serum) intact conjugate, based on an initial purity of 94.6%, could successfully confirm the high stability of the actual [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> complex already represented by aforementioned results.



**Figure 7:** *In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>- and DFO-functionalized immunoconjugates in PBS (A) and human serum (B) at 37 °C within 7 d: measured percentages of incorporated activity (radio-TLC) as a function of time starting from radiochemical purity after SEC, values displayed as mean ± SD (*n* = 3).



The DFO bearing references [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-SA-mAb and [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-mAb as well as the extended system [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb could be obtained with slightly higher radiochemical purities of 97–100% after SEC. Subsequent incubation at 37 °C in PBS and human serum over a period of 7 days nevertheless led to almost identical results representing a constantly stable complexation of the radiometal without exception. In both media, the percentages of protein bound activity remained almost unchanged (difference < 1.5%) for all three conjugates within the entire period.

At least under the conditions used herein, therefore neither significant advantages nor disadvantages of the different coupling strategies (SA, *p*-Ph-NCS) and actual chelator systems (Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, DFO, DFO\*) regarding *in vitro* complex stability could be observed, since all investigated conjugates provided excellent results.

## CONCLUSION

In the present study, we introduced the development and *in vitro* evaluation of novel bifunctional  $^{89}\text{Zr}$ -chelators based on the well-established hybrid 6-amino-1,4-diazepane backbone in combination with hydroxamic acid bearing sidechains. Both stand-alone and coupled to a model antibody, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> as well as two further derivatives being extended by either a squaramide or *p*-isothiocyanatophenyl moiety indicated fast and high yielding complexation of  $^{89}\text{Zr}$  (82–94% RCC) at mild conditions as well as high *in vitro* complex stability over a period of 7 days (release < 3%). Utilization of deferoxamine as linear gold standard for complexation of tetravalent zirconium-89 and its extended version DFO\* led to even slightly faster radiolabeling and similarly high *in vitro* complex stabilities of the corresponding analogues. A considerable instability of all *p*-isothiocyanatophenyl-functionalized derivatives in human serum only occurred using the chelator systems stand-alone, but not bound to an antibody. Since the frequently reported instability of the [ $^{89}\text{Zr}$ ]Zr-DFO complex appears to be a phenomenon mainly occurring in animal studies, the excellent properties of Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> described in this work are to be further investigated and compared in future *in vivo* studies. Nevertheless, this novel chelator represents a promising candidate for fast and stable radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 concerning immuno-PET applications.

## Acknowledgements

The authors would like to thank [REDACTED] for determination of protein concentrations and [REDACTED] for MALDI-TOF measurements. We are also very grateful to the Collaborative Research Center SFB 1066 of the German Research Foundation (DFG) for its support.

## Funding information

This work was funded in part by the Swiss National Science Foundation (grant Nr. SNSF 205321\_157216 to [REDACTED] and [REDACTED]).

## Competing interests

[REDACTED] and [REDACTED] are co-inventors on pending patent applications describing DFO\* and its derivatives. These patent applications are owned by the University of Zurich and the University of Basel. The patent owners have granted an exclusive license to the company ABX Advanced Biochemicals Compounds. The inventors are unrelated to this company.

## Ethical approval

Not applicable.

## REFERENCES

- [1] Zhang Y, Hong H, Cai W. PET tracers based on zirconium-89. *Curr Radiopharm* 2011;4:131–9.
- [2] Wei W, Rosenkrans ZT, Liu J, Huang G, Luo QY, Cai W. ImmunoPET: concept, design, and applications. *Chem Rev* 2020;120:3787–851.
- [3] Goldenberg DM, Sharkey RM. Novel radiolabeled antibody conjugates. *Oncogene* 2007;26:3734–44.
- [4] Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol* 2007;34:757–78.
- [5] Moek KL, Giesen D, Kok IC, de Groot DJA, Jalving M, Fehrmann RSN, et al. Theranostics using antibodies and antibody-related therapeutics. *J Nucl Med* 2017;58:835-90S.
- [6] Heskamp S, Raavé R, Boerman O, Rijpkema M, Goncalves V, Denat F. <sup>89</sup>Zr-Immuno-positron emission tomography in oncology: state-of-the-art <sup>89</sup>Zr radiochemistry. *Bioconjug Chem* 2017;28:2211–23.
- [7] Bhatt NB, Pandya DN, Wadas TJ. Recent advances in zirconium-89 chelator development. *Molecules* 2018;23.
- [8] van de Watering FCJJ, Rijpkema M, Perk L, Brinkmann U, Oyen WJGG, Boerman OC. Zirconium-89 labeled antibodies: a new tool for molecular imaging in cancer patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–13.
- [9] Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, Lewis JS. PET imaging with <sup>89</sup>Zr: from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol* 2013;40:3–14.
- [10] Wooten A, Madrid E, Schweitzer G, Lawrence L, Mebrahtu E, Lewis B, et al. Routine production of <sup>89</sup>Zr using an automated module. *Appl Sci* 2013;3:593–613.
- [11] Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Slump CH, Boerman OC, Oyen WJGG, et al. Image-quality assessment for several positron emitters using the NEMA NU 4-2008 standards in the siemens inveon small-animal PET scanner. *J Nucl Med* 2010;51:610–7.
- [12] Bé M-M, Chisté V, Dulieu C, Kellett MA, Mougeot X, Arinc A, et al. Table of radionuclides. vol. 8. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2016.
- [13] Dilworth JR, Pascu SI. The chemistry of PET imaging with zirconium-89. *Chem Soc Rev* 2018;47:2554–71.
- [14] Bailey DL, Townsend DW, Valk PE, Maisey MN, editors. *Positron Emission Tomography*. London: Springer-Verlag; 2005.
- [15] Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37:250–9.
- [16] Toporivska Y, Gumienna-Kontecka E. The solution thermodynamic stability of desferrioxamine B (DFO) with Zr(IV). *J Inorg Biochem* 2019;198:110753.
- [17] Holland JP, Divilov V, Bander NH, Smith-Jones PM, Larson SM, Lewis JS. <sup>89</sup>Zr-DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression *in vivo*. *J Nucl Med* 2010;51:1293–300.

- [18] Guérard F, Lee YS, Tripier R, Szajek LP, Deschamps JR, Brechbiel MW. Investigation of Zr(IV) and <sup>89</sup>Zr(IV) complexation with hydroxamates: progress towards designing a better chelator than desferrioxamine B for immuno-PET imaging. *Chem Commun* 2013;49:1002–4.
- [19] Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. *In vivo* biodistribution and accumulation of <sup>89</sup>Zr in mice. *Nucl Med Biol* 2011;38:675–81.
- [20] Heskamp S, Van Laarhoven HWM, Molkenboer-Kueneen JDM, Franssen GM, Versleijen-Jonkers YMH, Oyen WJG, et al. ImmunoSPECT and immunoPET of IGF-1R expression with the radiolabeled antibody R1507 in a triple-negative breast cancer model. *J Nucl Med* 2010;51:1565–72.
- [21] Perk LR, Visser GWM, Vosjan MJWD, Stigter-Van Walsum M, Tijink BM, Leemans CR, et al. <sup>89</sup>Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med* 2005;46:1898–906.
- [22] Laverman P, Van Der Geest T, Terry SYA, Gerrits D, Walgreen B, Helsen MM, et al. Immuno-PET and immuno-SPECT of rheumatoid arthritis with radiolabeled anti-fibroblast activation protein antibody correlates with severity of arthritis. *J Nucl Med* 2015;56:778–83.
- [23] Patra M, Bauman A, Mari C, Fischer CA, Häussinger D, Gasser G, et al. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem Commun* 2014;50:11523–5.
- [24] Vugts DJ, Klaver C, Sewing C, Poot AJ, Adamzek K, Huegli S, et al. Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO\*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for <sup>89</sup>Zr-immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44:286–95.
- [25] Rudd SE, Roselt P, Cullinane C, Hicks RJ, Donnelly PS. A desferrioxamine B squaramide ester for the incorporation of zirconium-89 into antibodies. *Chem Commun* 2016;52:11889–92.
- [26] Berg E, Gill H, Marik J, Ogasawara A, Williams S, van Dongen G, et al. Total-body PET and highly stable chelators together enable meaningful <sup>89</sup>Zr-antibody PET studies up to 30 days after injection. *J Nucl Med* 2020;61:453–60.
- [27] Chomet M, Schreurs M, Bolijn MJ, Verlaan M, Beaino W, Brown K, et al. Head-to-head comparison of DFO\* and DFO chelators: selection of the best candidate for clinical <sup>89</sup>Zr-immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021;48:694–707.
- [28] Boros E, Holland JP, Kenton N, Rotile N, Caravan P. Macrocyclic-based hydroxamate ligands for complexation and immunoconjugation of <sup>89</sup>Zirconium for Positron Emission Tomography (PET) imaging. *Chempluschem* 2016;81:274–81.
- [29] Raavé R, Sandker G, Adumeau P, Jacobsen CB, Mangin F, Meyer M, et al. Direct comparison of the *in vitro* and *in vivo* stability of DFO, DFO\* and DFOcyclo\* for <sup>89</sup>Zr-immunoPET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2019;46:1966–77.
- [30] Zhai C, Summer D, Rangger C, Franssen GM, Laverman P, Haas H, et al. Novel bifunctional cyclic chelator for <sup>89</sup>Zr labeling—radiolabeling and targeting properties of RGD conjugates. *Mol Pharm* 2015;12:2142–50.
- [31] Briand M, Aulsebrook ML, Mindt TL, Gasser G. A solid phase-assisted approach for the facile synthesis of a highly water-soluble zirconium-89 chelator for radiopharmaceutical development. *Dalt Trans* 2017;46:16387–9.

- [32] Brandt M, Cowell J, Aulsebrook ML, Gasser G, Mindt TL. Radiolabelling of the octadentate chelators DFO\* and oxoDFO\* with zirconium-89 and gallium-68. *JBIC J Biol Inorg Chem* 2020;25:789–96.
- [33] Deri MA, Ponnala S, Zeglis BM, Pohl G, Dannenberg JJ, Lewis JS, et al. Alternative chelator for <sup>89</sup>Zr radiopharmaceuticals: radiolabeling and evaluation of 3,4,3-(LI-1,2-HOPO). *J Med Chem* 2014;57:4849–60.
- [34] Deri MA, Ponnala S, Kozlowski P, Burton-Pye BP, Cicek HT, Hu C, et al. *P*-SCN-Bn-HOPO: a superior bifunctional chelator for <sup>89</sup>Zr immunoPET. *Bioconjug Chem* 2015;26:2579–91.
- [35] Tinianow JN, Pandya DN, Pailloux SL, Ogasawara A, Vanderbilt AN, Gill HS, et al. Evaluation of a 3-hydroxypyridin-2-one (2,3-HOPO) based macrocyclic chelator for <sup>89</sup>Zr<sup>4+</sup> and its use for immunoPET imaging of HER2 positive model of ovarian carcinoma in mice. *Theranostics* 2016;6:511–21.
- [36] Pandya DN, Pailloux S, Tatum D, Magda D, Wadas TJ. Di-macrocyclic terephthalamide ligands as chelators for the PET radionuclide zirconium-89. *Chem Commun* 2015;51:2301–3.
- [37] Pfister J, Summer D, Rangger C, Petrik M, von Guggenberg E, Minazzi P, et al. Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. *EJNMMI Res* 2015;5:74.
- [38] Baranyai Z, Uggeri F, Giovenzana GB, Bényei A, Brücher E, Aime S. Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids(III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. *Chem - A Eur J* 2009;15:1696–705.
- [39] Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type <sup>68</sup>Ga labelling of TOC at ambient temperature. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2017;1:4.
- [40] Sinnes J-P, Nagel J, Waldron BP, Maina T, Nock BA, Bergmann RK, et al. Instant kit preparation of <sup>68</sup>Ga-radiopharmaceuticals via the hybrid chelator DATA: clinical translation of [<sup>68</sup>Ga]Ga-DATA-TOC. *EJNMMI Res* 2019;9:48.
- [41] Farkas E, Nagel J, Waldron BP, Parker D, Tóth I, Brücher E, et al. Equilibrium, kinetic and structural properties of gallium(III) and some divalent metal complexes formed with the new DATA<sup>m</sup> and DATA<sup>5m</sup> ligands. *Chem - A Eur J* 2017;23:10358–71.
- [42] Nagy G, Szikra D, Trencsényi G, Fekete A, Garai I, Giani AM, et al. AAZTA: an ideal chelating agent for the development of <sup>44</sup>Sc PET imaging agents. *Angew Chemie Int Ed* 2017;56:2118–22.
- [43] Sinnes J, Nagel J, Rösch F. AAZTA<sup>5</sup>/AAZTA<sup>5</sup>-TOC: synthesis and radiochemical evaluation with <sup>68</sup>Ga, <sup>44</sup>Sc and <sup>177</sup>Lu. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2019;4:18.
- [44] Greifenstein L, Grus T, Nagel J, Sinnes JP, Rösch F. Synthesis and labeling of a squaric acid containing PSMA-inhibitor coupled to AAZTA<sup>5</sup> for versatile labeling with <sup>44</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga and <sup>177</sup>Lu. *Appl Radiat Isot* 2020;156:108867.
- [45] Greifenstein L, Späth D, Sinnes JP, Grus T, Rösch F. Mild and efficient <sup>64</sup>Cu labeling of perhydro-1,4-diazepine derivatives for potential use with large peptides, proteins and antibodies. *Radiochim Acta* 2020;108:555–63.
- [46] Seemann J, Waldron BP, Roesch F, Parker D. Approaching 'kit-type' labelling with <sup>68</sup>Ga: the DATA chelators. *ChemMedChem* 2015;10:1019–26.

- [47] Waldron BP, Parker D, Burchardt C, Yufit DS, Zimny M, Roesch F. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. *Chem Commun* 2013;49:579–81.
- [48] Parker D, Waldron BP. Conformational analysis and synthetic approaches to polydentate perhydro-diazepine ligands for the complexation of gallium(iii). *Org Biomol Chem* 2013;11:2827.
- [49] Parker D, Waldron BP, Yufit DS. Crystallographic and solution NMR structural analyses of four hexacoordinated gallium(iii) complexes based on ligands derived from 6-amino-perhydro-1,4-diazepine. *Dalt Trans* 2013;42:8001.
- [50] Wurm FR, Klok H-A. Be squared: expanding the horizon of squaric acid-mediated conjugations. *Chem Soc Rev* 2013;42:8220.
- [51] Tietze LF, Arlt M, Beller M, Glüsenkamp K, Jähde E, Rajewsky MF, et al. Squaric acid diethyl ester: a new coupling reagent for the formation of drug biopolymer conjugates. Synthesis of squaric acid ester amides and diamides. *Chem Ber* 1991;124:1215–21.
- [52] Olshvang E, Szebesczyk A, Kozłowski H, Hadar Y, Gumienna-Kontecka E, Shanzer A. Biomimetic ferrichrome: structural motifs for switching between narrow- and broad-spectrum activities in *P. putida* and *E. coli*. *Dalt Trans* 2015;44:20850–8.
- [53] Vosjan MJWD, Perk LR, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate *p*-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc* 2010;5:739–43.
- [54] Nakamura T, Abe-Kanoh N, Nakamura Y. Physiological relevance of covalent protein modification by dietary isothiocyanates. *J Clin Biochem Nutr* 2018;62:11–9.

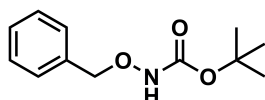
## SUPPORTING INFORMATION

### Methods

#### Synthesis of 4-((benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoic acid (**4**)

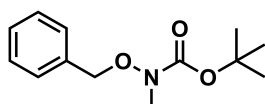
4-((Benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoic acid **4** was synthesized in four steps according to the literature [1] as follows.

#### *tert*-Butyl benzyloxycarbamate (**1**)



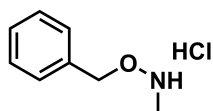
To a suspension of *O*-benzyloxyamine hydrochloride (2.45 g, 15.3 mmol) in THF/H<sub>2</sub>O (1:1, 14 mL) triethylamine (2.13 mL, 15.5 mmol) was added. While stirring, a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (3.35 g, 15.3 mmol) in THF (8 mL) was added dropwise and stirring of the mixture continued for 3 h at room temperature. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was suspended in ethyl acetate and washed twice with 0.5 M citric acid (15 mL) and once with water (15 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was crystallized from *n*-hexane to yield **1** (3.32 g, 14.9 mmol, 97%) as colorless, crystalline solid. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 7.47–7.30 (m, 5H); 7.11 (s, 1H); 4.86 (s, 2H); 1.48 (s, 9H). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 246.1 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>: 223.12.

#### *tert*-Butyl benzyloxy(methyl)carbamate (**2**)



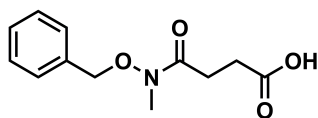
Sodium hydride (0.58 g, 24.2 mmol) was added in small portions to a solution of **1** (4.82 g, 21.6 mmol) in anhydrous DMF (31 mL) while stirring and the mixture was stirred for further 30 min at room temperature. Methyl iodide (1.5 mL, 24.1 mmol) was added dropwise under argon atmosphere and stirring continued overnight. After evaporation of the solvent under reduced pressure, the residue was suspended in water and extracted with *n*-hexane (3 × 15 mL). The combined organic extracts were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. **2** (4.89 g, 20.6 mmol, 95%) was obtained as yellowish oil. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 7.44–7.30 (m, 5H); 4.82 (s, 2H); 3.05 (s, 3H); 1.49 (s, 9H). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 260.1 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>: 237.14.

### O-Benzyl-N-methylhydroxylamine hydrochloride (**3**)



4 M HCl in 1,4-dioxane (15.5 mL, 62.0 mmol) was added slowly to **2** (4.89 g, 20.6 mmol) at 0 °C under argon atmosphere and the solution was stirred for 2 h at the same temperature. After allowing the mixture to warm to room temperature, stirring continued overnight. Evaporation of the solvent under reduced pressure yielded **3** (3.56 g, 20.5 mmol, 100%) as pale-yellow solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 7.49–7.33 (m, 5H); 5.30 (s, 2H); 2.97 (s, 3H). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 138.1 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ], calculated for  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$ : 137.08.

### 4-((Benzyloxy)(methyl)amino)-4-oxobutanoic acid (**4**)



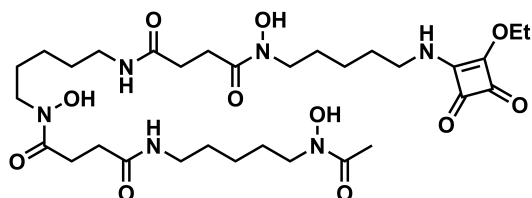
To a solution of **3** (1.00 g, 5.76 mmol) in 1,4-dioxane (12.5 mL) succinic anhydride (1.73 g, 17.3 mmol) was added while stirring. The pH was adjusted via addition of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.59 g, 11.5 mmol) and the mixture was stirred overnight at room temperature. After completion of the reaction the solution was poured into water and extracted with ethyl acetate ( $3 \times 15$  mL). The combined organic extracts were washed with 0.5 M citric acid, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified via column chromatography (dichloromethane/ethyl acetate 2:3,  $R_f = 0.30$ ) to yield **4** (1.29 g, 5.44 mmol, 94%) as white solid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 7.39 (m, 5H); 4.87 (s, 2H); 3.22 (s, 3H); 2.70 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H); 2.64 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz,  $\delta$  [ppm]): 177.8 (s); 173.6 (s); 134.3 (s); 129.3 (s); 129.1 (s); 128.8 (s); 76.3 (s); 33.6 (s); 28.7 (s); 27.1 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 238.1 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ], calculated for  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ : 237.10.



## Synthesis of DFO-SA (14)

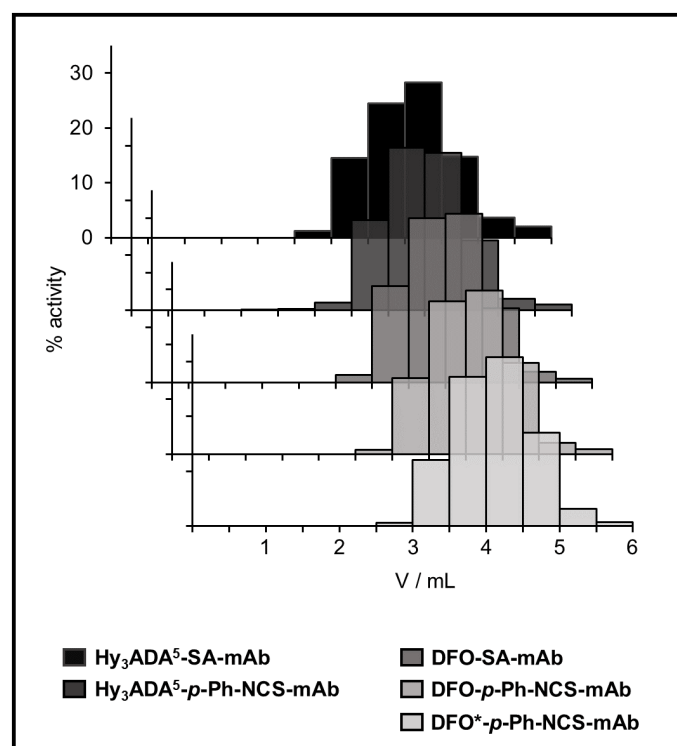
Deferoxamine squaramide ethyl ester **14** was synthesized according to the literature [2] as follows.

### Deferoxamine squaramide ethyl ester (14)

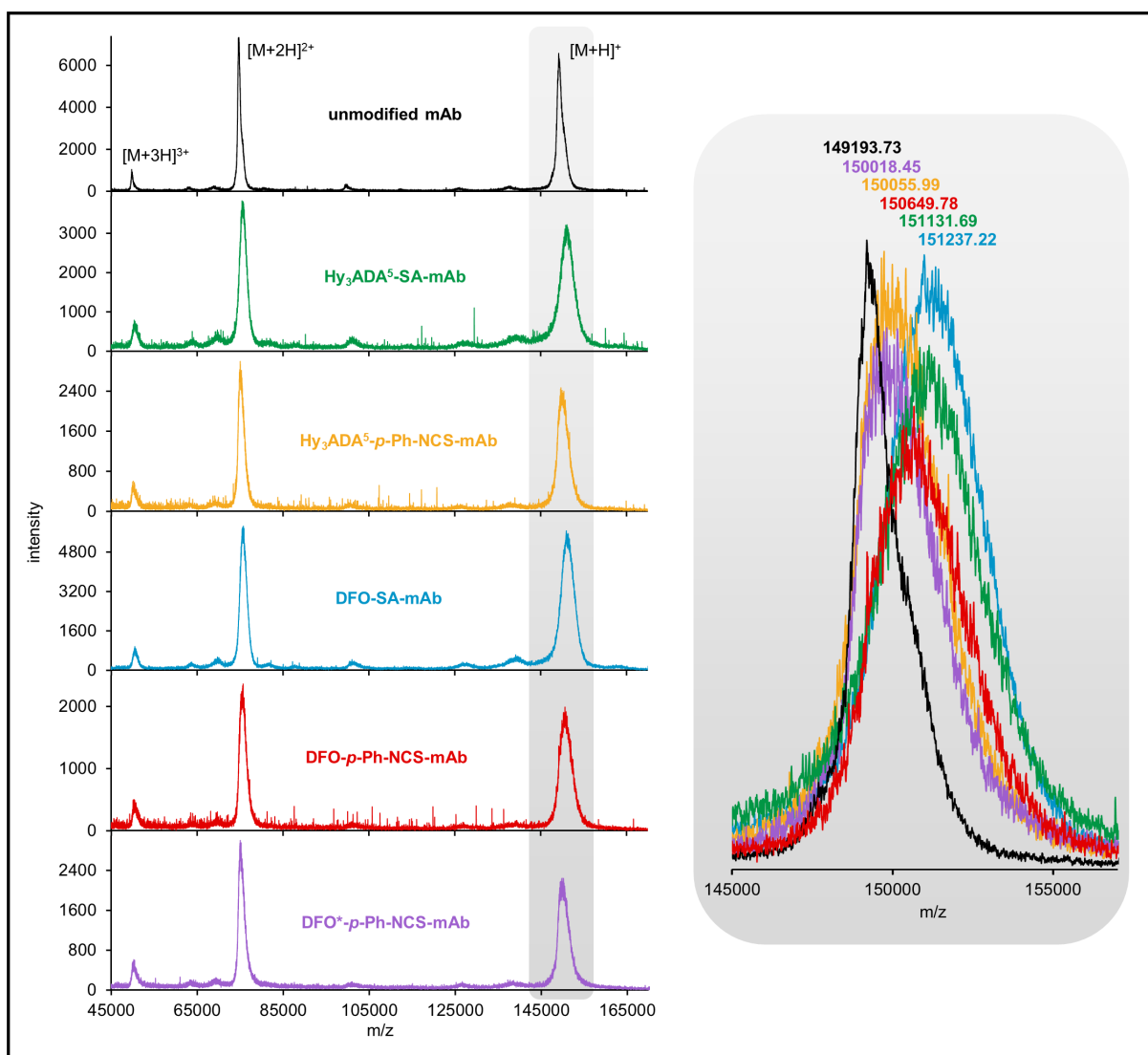


A solution of deferoxamine mesylate (25 mg, 38.1  $\mu\text{mol}$ ) and DIPEA (7.0  $\mu\text{L}$ , 41.2  $\mu\text{mol}$ ) in abs. ethanol (750  $\mu\text{L}$ ) was stirred for 1 h at 50  $^{\circ}\text{C}$ . 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (13.0  $\mu\text{L}$ , 88.8  $\mu\text{mol}$ ) dissolved in abs. ethanol (1170  $\mu\text{L}$ ) was added and stirring continued for 2 h at constant temperature. After completion of the reaction, the product was purified via HPLC (column: Phenomenex Synergi C18 semipreparative (250  $\times$  10 mm) 4  $\mu$ , flow rate: 5 mL/min, 20% to 25% MeCN + 0.1% TFA in 25 min,  $t_{\text{R}}$  = 14.4 min) yielding **14** (8.7 mg, 12.8  $\mu\text{mol}$ , 33%) as colorless powder. MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 685.4 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>: 684.37.

## Figures



**Figure S1:** Purification of the Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>- and DFO-functionalized immunoconjugates via size exclusion chromatography: eluograms displaying the distribution of radioactivity in consecutive fractions of 0.5 mL PBS.



**Figure S2:** MALDI-TOF mass spectra of the unmodified antibody and of the Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-, DFO- and DFO\*-functionalized immunoconjugates.

## Tables

### Radiolabeling efficiency and *in vitro* complex stability of the stand-alone chelator derivatives

**Table S1:** Radiolabeling efficiency of [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-SA, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS and [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS at room temperature using 20 nmol of the respective chelator and 10–12 MBq zirconium-89 in HEPES-buffer (pH 7), values expressed as mean ± SD (*n* = 3).

t / min	RCC / %						
	Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup>	Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> -SA	Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> - <i>p</i> -Ph-NCS	DFO (mesylate)	DFO-SA	DFO- <i>p</i> -Ph-NCS	DFO*- <i>p</i> -Ph-NCS
1	37.3 ± 6.9	25.6 ± 6.5	29.5 ± 13.7	55.0 ± 20.5	38.0 ± 6.9	33.0 ± 4.3	16.5 ± 3.4
3	51.1 ± 1.6	43.9 ± 2.1	59.9 ± 11.5	81.2 ± 7.9	65.2 ± 1.4	51.6 ± 2.6	34.9 ± 4.6
5	67.7 ± 2.2	56.4 ± 2.7	75.3 ± 12.1	91.4 ± 3.2	80.9 ± 2.8	70.7 ± 2.2	50.0 ± 8.6
15	82.5 ± 1.0	83.9 ± 0.5	90.8 ± 3.4	96.7 ± 0.6	96.0 ± 0.5	95.2 ± 0.9	83.5 ± 5.8
30	87.5 ± 0.8	89.6 ± 0.6	94.2 ± 1.4	97.2 ± 0.2	95.7 ± 0.9	98.0 ± 0.3	96.1 ± 1.5
60	90.1 ± 1.6	90.7 ± 0.4	91.2 ± 2.1	97.0 ± 0.2	97.0 ± 0.4	97.5 ± 0.1	97.9 ± 1.1
90	84.2 ± 0.7	93.6 ± 0.4	93.3 ± 0.2	97.5 ± 0.5	96.5 ± 0.8	97.0 ± 0.5	98.9 ± 0.6

**Table S2:** *In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-derivatives in PBS and human serum (HS) at 37 °C within 7 d, measured percentages of incorporated activity (radio-TLC) expressed as mean ± SD (*n* = 3).

t / h	intact conjugate / %					
	Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup>		Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> -SA		Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> - <i>p</i> -Ph-NCS	
	PBS	HS	PBS	HS	PBS	HS
0	84.4	84.4	93.8	93.8	93.3	93.3
1	84.8 ± 1.9	83.7 ± 1.4	95.1 ± 0.4	93.6 ± 0.5	95.0 ± 0.4	66.1 ± 3.7
24	89.8 ± 1.1	80.0 ± 0.9	92.9 ± 1.4	90.5 ± 0.3	96.6 ± 0.5	30.5 ± 0.7
48	88.5 ± 3.4	81.8 ± 0.4	94.5 ± 0.2	92.5 ± 0.4	96.4 ± 0.5	28.8 ± 0.3
71	91.4 ± 1.1	90.2 ± 0.1	95.9 ± 0.1	94.3 ± 0.1	95.9 ± 0.3	33.2 ± 0.3
90	93.0 ± 3.4	89.9 ± 0.6	95.5 ± 0.3	96.2 ± 2.9	94.3 ± 0.4	31.6 ± 1.5
168	89.7 ± 0.4	89.7 ± 4.4	95.5 ± 0.0	90.9 ± 0.8	92.8 ± 0.8	31.1 ± 0.6

**Table S3:** *In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled DFO-derivatives in PBS and human serum (HS) at 37 °C within 7 d, measured percentages of incorporated activity (radio-TLC) expressed as mean ± SD (*n* = 3).

t / h	intact conjugate / %							
	DFO (mesylate)		DFO-SA		DFO- <i>p</i> -Ph-NCS		DFO*- <i>p</i> -Ph-NCS	
	PBS	HS	PBS	HS	PBS	HS	PBS	HS
0	97.4	97.4	96.6	96.6	96.9	96.9	99.3	99.3
1	97.2 ± 1.4	98.3 ± 0.1	96.3 ± 1.1	97.3 ± 0.1	98.2 ± 0.3	34.5 ± 14.4	99.3 ± 0.3	73.2 ± 1.6
24	97.4 ± 0.2	97.6 ± 0.2	97.6 ± 0.1	97.3 ± 0.2	98.1 ± 0.3	14.9 ± 1.8	99.9 ± 0.0	35.0 ± 1.4
48	98.1 ± 1.1	98.3 ± 0.1	97.9 ± 0.2	97.4 ± 0.1	98.1 ± 0.3	17.4 ± 0.5	99.8 ± 0.1	38.1 ± 2.5
68	98.4 ± 0.2	98.3 ± 0.2	97.9 ± 0.2	97.4 ± 0.1	98.3 ± 0.8	18.4 ± 0.1	99.8 ± 0.1	41.5 ± 0.8
146	98.5 ± 0.3	98.1 ± 0.2	98.0 ± 0.1	95.9 ± 3.3	98.9 ± 0.4	28.6 ± 2.7	99.8 ± 0.1	46.0 ± 0.2
168	98.1 ± 0.8	98.1 ± 0.4	97.7 ± 0.2	93.8 ± 1.9	98.6 ± 0.5	30.4 ± 0.8	99.9 ± 0.1	53.7 ± 4.4

### Radiolabeling efficiency and *in vitro* complex stability of the Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>- and DFO-functionalized immunoconjugates

**Table S4:** Radiolabeling efficiency of [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-SA-mAb, [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO-*p*-Ph-NCS-mAb and [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb at room temperature using 472–731 µg of immunoconjugate and 10–12 MBq zirconium-89 in HEPES-buffer (pH 7), values expressed as mean ± SD (*n* = 3).

t / min	RCC / %				
	Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> -SA-mAb	Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> - <i>p</i> -Ph-NCS-mAb	DFO-SA-mAb	DFO- <i>p</i> -Ph-NCS-mAb	DFO*- <i>p</i> -Ph-NCS-mAb
1	4.7 ± 1.6	5.8 ± 1.2	10.3 ± 1.0	9.8 ± 0.4	14.2 ± 0.8
3	5.4 ± 0.7	9.2 ± 0.6	20.0 ± 1.1	15.9 ± 1.5	24.7 ± 1.4
5	11.6 ± 0.6	15.1 ± 3.2	29.4 ± 2.0	22.8 ± 3.0	34.7 ± 2.4
15	30.3 ± 1.1	37.4 ± 4.0	60.2 ± 4.4	53.9 ± 1.1	70.6 ± 0.3
30	46.7 ± 5.1	60.7 ± 7.1	84.7 ± 1.2	78.1 ± 0.4	86.9 ± 7.4
60	72.5 ± 1.8	79.7 ± 5.7	92.9 ± 0.5	92.5 ± 0.1	91.1 ± 5.4
90	82.0 ± 1.1	89.2 ± 0.7	95.0 ± 0.8	94.7 ± 0.5	98.8 ± 0.4

**Table S5:** *In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-functionalized immunoconjugates in PBS and human serum (HS) at 37 °C within 7 d, measured percentages of incorporated activity (radio-TLC) expressed as mean ± SD (*n* = 3).

t / h	intact conjugate / %			
	Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> -SA-mAb		Hy <sub>3</sub> ADA <sup>5</sup> - <i>p</i> -Ph-NCS-mAb	
	PBS	HS	PBS	HS
0	91.7	91.7	94.6	94.6
1	91.6 ± 0.5	–	94.4 ± 0.1	–
24	95.8 ± 2.5	88.3 ± 1.8	95.6 ± 0.3	95.6 ± 0.2
48	95.2 ± 0.3	94.0 ± 0.5	95.7 ± 0.9	96.0 ± 0.1
72	94.8 ± 0.3	93.7 ± 0.2	95.4 ± 0.3	95.7 ± 0.6
91	94.2 ± 0.4	92.5 ± 0.5	95.7 ± 0.3	95.2 ± 0.5
168	94.2 ± 0.9	94.1 ± 0.3	95.5 ± 0.1	94.4 ± 1.0

**Table S6:** *In vitro* complex stability of the <sup>89</sup>Zr-labeled DFO-functionalized immunoconjugates in PBS and human serum (HS) at 37 °C within 7 d, measured percentages of incorporated activity (radio-TLC) expressed as mean ± SD (*n* = 3).

t / h	intact conjugate / %					
	DFO-SA-mAb		DFO- <i>p</i> -Ph-NCS-mAb		DFO*- <i>p</i> -Ph-NCS-mAb	
	PBS	HS	PBS	HS	PBS	HS
0	97.0	97.0	98.6	98.6	99.9	99.9
1	96.9 ± 0.1	97.6 ± 0.2	97.8 ± 0.0	98.5 ± 0.3	100.0 ± 0.1	100.0 ± 0.0
24	98.1 ± 0.1	98.6 ± 0.0	98.3 ± 0.1	99.2 ± 0.1	100.0 ± 0.1	99.9 ± 0.1
48	98.1 ± 0.7	98.6 ± 0.2	98.4 ± 0.1	99.2 ± 0.2	99.9 ± 0.1	99.9 ± 0.1
67	97.7 ± 0.4	98.6 ± 0.1	98.5 ± 0.2	99.3 ± 0.1	99.8 ± 0.0	100.0 ± 0.1
144	96.4 ± 0.8	98.2 ± 0.3	98.2 ± 0.2	99.5 ± 0.2	99.7 ± 0.1	100.0 ± 0.0
168	97.1 ± 0.8	98.3 ± 0.3	98.3 ± 0.3	99.2 ± 0.1	99.9 ± 0.1	99.8 ± 0.1

## References

- [1] Olshvang E, Szabeszczuk A, Kozłowski H, Hadar Y, Gumienna-Kontecka E, Shanzer A. Biomimetic ferrichrome: structural motifs for switching between narrow- and broad-spectrum activities in *P. putida* and *E. coli*. *Dalt Trans* 2015;44:20850–8.
- [2] Rudd SE, Roselt P, Cullinane C, Hicks RJ, Donnelly PS. A desferrioxamine B squaramide ester for the incorporation of zirconium-89 into antibodies. *Chem Commun* 2016;52:11889–92.



**5.3 Teilprojekt C: *AAZTA<sup>5</sup>-squaramide ester competing with DOTA-, DTPA- and CHX-A''-DTPA-analogues: promising tool for <sup>177</sup>Lu-labeling of monoclonal antibodies under mild conditions***





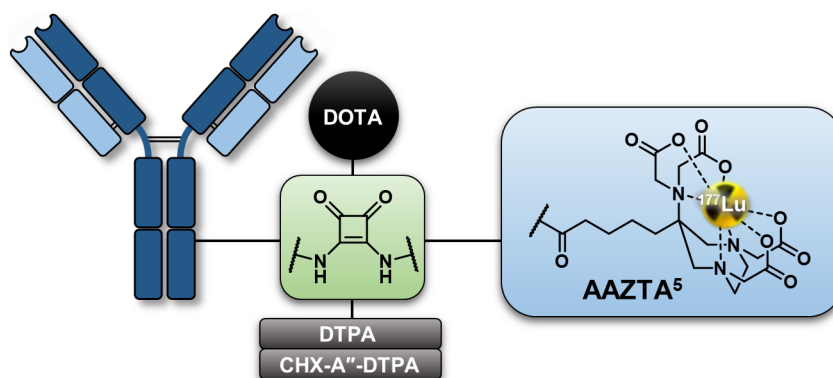
**AAZTA<sup>5</sup>-squaramide ester competing with DOTA-, DTPA- and CHX-A''-DTPA-analogues: promising tool for <sup>177</sup>Lu-labeling of monoclonal antibodies under mild conditions**

Benedikt Klasen<sup>1</sup>, 

*<sup>1</sup>Department of Chemistry – TRIGA site, Johannes Gutenberg University Mainz,  
Fritz-Strassmann Weg 2, D-55128 Mainz, Germany*

## ABSTRACT

**Background:** Combining the advantages of both cyclic and acyclic chelator systems, AAZTA (1,4-bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine) is well suited for complexation of various diagnostic and therapeutic radiometals such as gallium-68, scandium-44 and lutetium-177 under mild conditions. Due to its specificity for primary amines and pH dependent binding properties, squaric acid (SA) represents an excellent tool for selective coupling of the appropriate chelator to different target vectors. Therefore, the aim of this study was to evaluate radiolabeling properties of the novel bifunctional AAZTA<sup>5</sup>-SA being coupled to a model antibody (bevacizumab) in comparison to DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA using the therapeutic nuclide lutetium-177.



**Methods and Results:** As proof-of-concept, bevacizumab was first functionalized with AAZTA<sup>5</sup>-SA, DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA or CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA. After purification via fractionated size exclusion chromatography (SEC), the corresponding immunoconjugates were subsequently radiolabeled with lutetium-177 at pH 7 and room temperature (RT) as well as 37 °C. After 90 min, labeling of AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb resulted in almost quantitative radiochemical yields (RCY) of > 98% and > 99%, respectively. Formation of [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb indicated rapid labeling kinetics reaching similar yields at RT already after 30 min. Fast but incomplete radiolabeling of the CHX-A''-analogue could be observed with a yield of 74% after 10 min and no further significant increase. In contrast, <sup>177</sup>Lu-labeling of DOTA-SA-mAb showed negligible radiochemical yields of < 2% both at room temperature and 37 °C. *In vitro* complex stability measurements of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb at 37 °C indicated > 94% protein bound activity in human serum and > 92% in phosphate buffered saline (PBS), respectively within 15 days. [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb and [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb revealed similar to even slightly higher *in vitro* stability in both media.

**Conclusion:** Coupling of AAZTA<sup>5</sup>-SA to the monoclonal antibody bevacizumab allowed for <sup>177</sup>Lu-labeling with almost quantitative radiochemical yields both at room temperature and 37 °C. Within 15 days, the resulting radioconjugate indicated very high *in vitro* complex stability both in human serum and PBS. Therefore, AAZTA<sup>5</sup>-SA is a promising tool for <sup>177</sup>Lu-labeling of sensitive biomolecules such as antibodies for theranostic applications.

**Keywords:** AAZTA, DOTA, DTPA, Lutetium-177, Squaric Acid, Antibody

## BACKGROUND

The utilization of monoclonal antibodies (mAbs) or corresponding smaller protein fragments for immunotherapeutic strategies targeting cancer has gained increasing clinical importance and interest in recent years. Since the admission of the first antibody Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3) in 1986, more than 90 therapeutic monoclonal antibodies or antibody-based drugs have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) or the European Medicines Agency (EMA), about 55 of them in the last five years and 32 of them aiming for treatment of cancer [1–8].

In addition to the native therapeutic anti-cancer effects of unmodified mAbs, their highly selective binding can also be used to transport either diagnostically or therapeutically relevant radionuclides to a specific target. An essential factor in the selection of a suitable radionuclide is its half-life, which should match to the typically slow pharmacokinetics of intact antibodies. Although the utilization of such radioimmunoconjugates for diagnosis and treatment of cancer and other diseases represents a promising strategy, to date there is only a small number of actually clinically approved agents including  $^{99m}\text{Tc}$ - or  $^{111}\text{In}$ -labeled antibodies like Scintimun<sup>®</sup>, LeukoScan<sup>®</sup>, CEA-scan<sup>®</sup>, ProstaScint<sup>®</sup>, Verluma<sup>®</sup> and OncoScint<sup>®</sup> for SPECT imaging as well as the  $^{131}\text{I}$ - or  $^{90}\text{Y}$ -labeled conjugates Bexxar<sup>®</sup> and Zevalin<sup>®</sup> for radioimmunotherapy (RIT) [9–16].

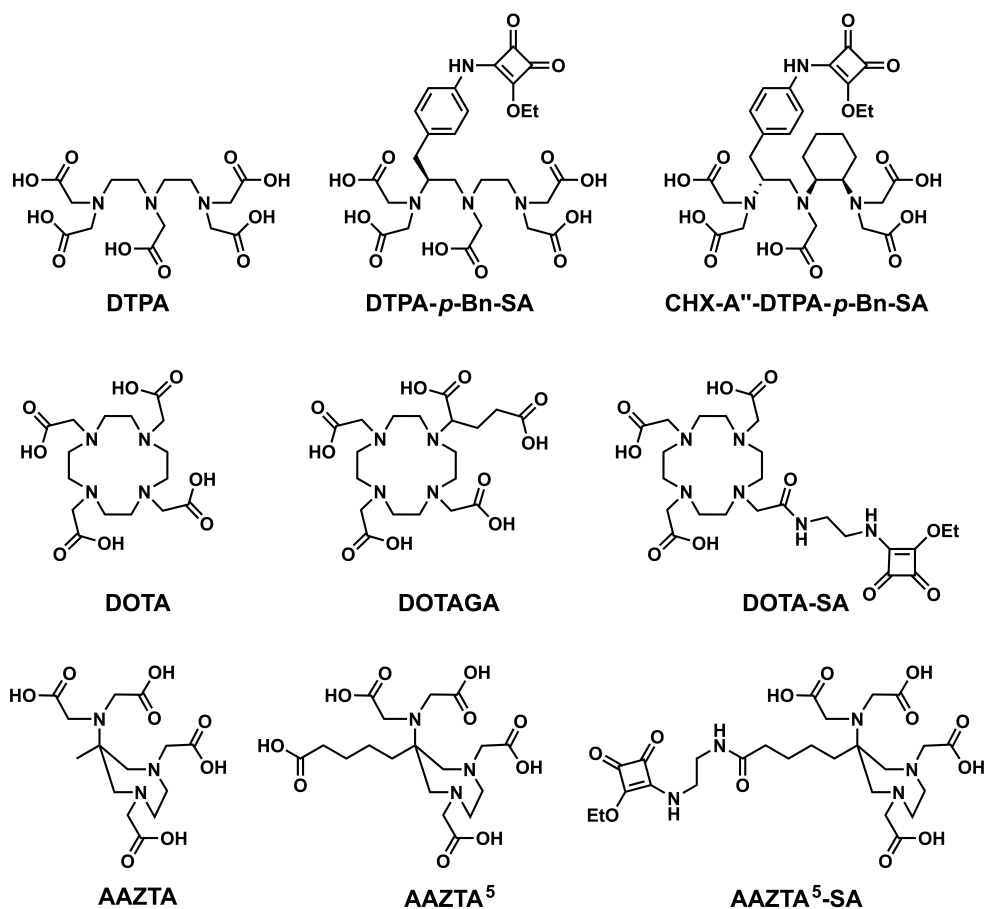
There are several therapeutic radionuclides that are used in combination with antibodies or being subject of recent investigations aiming for radioimmunotherapeutic applications including the  $\beta^-$ -emitters copper-67, yttrium-90, iodine-131 and lutetium-177 and  $\alpha$ -emitters bismuth-213 and actinium-225 [17–21]. Since it could be shown that smaller tumors and metastases are more accessible for radiolabeled antibodies than large ones and thus show a better response to this treatment, RIT is a promising tool especially for therapy of cancer even before tumors or lesions become detectable via imaging methods or in advanced stages of metastatic diseases [20,22]. In this case,  $\beta^-$ -emitting radionuclides with comparatively low  $\beta^-$ -energy are the best choice to minimize the damage to surrounding healthy tissue while destroying malignant cells in the target. Due to the fact that it can be directly covalently bound to the protein by iodination of tyrosine residues and due to its dual emission (most relevant maximum  $\beta^-$ -energy of 606 keV and primary  $\gamma$ -energy of 364 keV), iodine-131 is a candidate of great interest for both RIT and SPECT-imaging [18,19,23]. However, it could be shown, that the covalent bond between tyrosine residues and iodine provides insufficient stability leading to certain release of free iodine-131 or other proteolytic products even in the case of internalizing antigens [24,25]. Another frequently used radionuclide for RIT is yttrium-90, which decays exclusively (100%) via  $\beta^-$ -emission. With a maximum electron energy of 2.288 MeV this radiometal provides a comparatively long effective range and therefore the opportunity to penetrate larger solid tumors [23]. Compared to these isotopes, lutetium-177 has several advantages regarding radioimmunotherapeutic applications for treatment of more accessible smaller tumors. In contrast to yttrium-90, lutetium-177 offers significantly lower beta-particle energies ( $E_{\beta,\text{max}} = 498 \text{ keV}$ ) and compared to iodine-131 also the absence of high-energy gamma photons (iodine-131:  $E_{\gamma,\text{max}} = 723 \text{ keV}$ ; lutetium-177:  $E_{\gamma,\text{max}} = 208 \text{ keV}$ ). Furthermore, compared to yttrium-90 ( $t_{1/2} = 64.0 \text{ h}$ ), the physical half-life of lutetium-177 ( $t_{1/2} = 6.7 \text{ d}$ ) matches better the slow pharmacokinetics of full-size antibodies and is shorter than that of iodine-131 ( $t_{1/2} = 8.0 \text{ d}$ ) [20,26]. Lutetium-177 therefore provides excellent properties both for RIT and immuno-SPECT-imaging of small solid tumors or metastatic lesions even at an early stage of the disease. A number of  $^{177}\text{Lu}$ -labeled radiopharmaceuticals such as the somatostatin analogues [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTATOC/DOTATATE have already demonstrated the great potential of  $^{177}\text{Lu}$ -based endoradiotherapy

[27–30]. Nevertheless, both radiometals yttrium-90 and lutetium-177 are typical candidates for mAb-based applications.

In recent years, several chelator scaffolds have been evaluated for the complexation of lutetium-177 and yttrium-90 including linear systems like DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), CHX-A''-DTPA (cyclohexyldiethylenetriaminepentaacetic acid) and H<sub>4</sub>octapa (*N,N'*-bis(6-carboxy-2-pyridylmethyl)-ethylenediamine-*N,N'*-diacetic acid), as well as cyclic systems like DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), TETA (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid) and corresponding bifunctional derivatives (e.g. DOTAGA 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid), respectively [23,31–40]. As one of the first ever used complexing agents in radiochemistry, DTPA (and its various bifunctional derivatives) provides fast incorporation kinetics at mild conditions in combination with a variety of radiometals [31,33,41,42]. However, due to the acyclic structure, radiometal-DTPA complexes frequently show insufficient stability *in vivo*. Due to a more rigid backbone, complexes of the cyclohexyl derivative CHX-A''-DTPA exhibit higher kinetic inertness and thus improved *in vivo* stability, but simultaneously slightly impaired labeling kinetics compared to its parental system [34,35]. To date, DOTA still represents one of the most important and most commonly used chelator systems for radiolabeling of a wide spectrum of molecules, especially of small molecule target vectors, with radiometals such as indium-111, yttrium-86/90, actinium-225, scandium-44/47, gallium-67/68 and lutetium-177 [31,37,43–47]. In most cases, DOTA complexes with trivalent radiometals are characterized by very high stability, even after long retention times *in vivo*. However, due to its macrocyclic structure, DOTA-functionalized molecules typically require high temperatures up to 95 °C and slightly acidic pH for fast and successful radiolabeling with high radiochemical yields. Milder conditions usually lead to significantly reduced yields or to the necessity of much longer reaction times (up to hours) [23,48]. Endoradiotherapeutic applications for cancer treatment typically require high activities of lutetium-177 up to 6-8 GBq per dose [27,28]. To prevent or at least to reduce radiolytic degradation of important binding regions of an antibody at such high activity levels, the synthesis duration and the time between production and administration of the radiopharmaceutical needs to be minimized in conjunction with a sufficiently high *in vivo* stability [49]. Despite their advantages in either kinetic and thermodynamic stability or radiolabeling kinetics, DOTA and DTPA therefore represent rather inappropriate choices for fast and stable radiolabeling of temperature-sensitive biomolecules such as antibodies. As a result, preclinical and clinical applications of <sup>177</sup>Lu- or <sup>90</sup>Y-labeled mAbs are to date very limited due to either insufficient *in vivo* complex stability, poor radiochemical yields or very long reaction times at temperatures that maintain protein integrity. Though there are a few studies featuring DOTA- and DTPA-functionalized proteins [33,35,36,50–56], there is a great demand for suitable bifunctional chelator molecules, which ensure both rapid and complete radiolabeling at low temperatures as well as high *in vivo* complex stability. The linear, picolinic acid-based system H<sub>4</sub>octapa represents one successful approach that has been shown to mostly meet these requirements [32,40].

A further chelator system that has recently shown very promising results regarding the complexation of scandium, gallium and copper as well as lutetium and other lanthanides is AAZTA (1,4-bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine; Fig. 1) [31,57–62]. It was first introduced in 2004 by Aime *et al.* for complexation of Gd(III) as a potential innovative MRI contrast agent [63]. AAZTA consists of a 1,4-diazepane scaffold bearing one additional exocyclic nitrogen in 6-position. The three heteroatoms are functionalized with a total of four carboxylic acid groups leading to 7 donors of a N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> coordination structure. It therefore combines the advantages of both linear and

macrocyclic structures in one molecule providing fast complexation kinetics under mild conditions, high yields and promising complex stabilities [64]. Due to these excellent properties, AAZTA represents a promising tool for radiolabeling of monoclonal antibodies with lutetium-177 for RIT. Since 2008, various approaches have been pursued to develop bifunctional derivatives with different functional groups including hydroxides, amines, and carboxylic acids [60]. In 2012 Manzoni *et al.* introduced AAZTA<sup>5</sup> (1,4-bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-[pentanoic acid]perhydro-1,4-diazepine) as a derivative containing an additional carboxylic acid group spaced by four methylene entities (Fig. 1) [65].



**Figure 1:** Basic structures of DTPA, DOTA, DOTAGA, AAZTA and AAZTA<sup>5</sup> as well as the novel DTPA-*p*-Bn-SA, CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA, DOTA-SA and AAZTA<sup>5</sup>-SA.

In this study we wanted to evaluate the applicability of AAZTA<sup>5</sup> for radiolabeling of antibodies with lutetium-177 regarding radioimmunotherapy compared to DOTA as the gold standard for complexation of this radiometal as well as to two different DTPA derivatives. For this purpose, we first synthesized AAZTA<sup>5</sup> as recently reported by our group and extended the basic scaffold with an ethylenediamine unit [61]. In the next step, we introduced a squaric acid diethyl ester (SA(OEt)<sub>2</sub>) as linker entity via selective formation of a vinylogous monoamide (Fig. 1). SA(OEt)<sub>2</sub> provides various excellent properties for coupling of an appropriate chelator to different target vectors. On the one hand, it reacts selectively with primary amines which often avoids the necessity of protective group strategies and therefore simplifies the synthesis of the tracer or corresponding precursor. On the other

hand, it offers the possibility of a stepwise asymmetric and pH dependent amidation. In a first step, squaric acid diethyl ester can be coupled to the amine of a chelator moiety at pH 7 via monoamide formation and subsequently be isolated and stored. In a second step the resulting precursor can then be coupled at pH 9 to the primary amine of appropriate target vectors such as antibodies. This unique property is based on a change of aromaticity during the first reaction step [66,67]. Despite its advantages, the utilization of squaric acid as linker entity in radiopharmaceutical chemistry is still mostly uncommon and innovative. 2016, Rudd *et al.* introduced a deferoxamine squaramide ester for radiolabeling of mAbs with  $^{89}\text{Zr}$  for Immuno-PET imaging. They postulated a certain contribution of the two additional oxygen atoms of the squaramide moiety to the metal-coordination being probably responsible for an improved  $^{89}\text{Zr}$ -deferoxamine-complex stability [68].

As proof of concept, we used the commercially available monoclonal antibody bevacizumab (trade name Avastin<sup>®</sup>) which is applied for treatment of various types of cancer inhibiting the vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). Yet it was not our intention to refer to the pharmacology of bevacizumab, in our experiments it simply served as biomolecule with mAb profile. First, the protein was functionalized with AAZTA<sup>5</sup>-SA. Following optimized purification, the resulting conjugate was subsequently radiolabeled with lutetium-177 under mild conditions. For comparison, we analogously synthesized, purified and radiolabeled DOTA-SA-bevacizumab, DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab, with the latter two being used only in the final labeling approach as described hereafter. Prior to evaluation of the corresponding immunoconjugates, the unconjugated bifunctional chelators AAZTA<sup>5</sup>-SA, DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA were also radiolabeled and compared under the same conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### General

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Merck, VWR, TCI, Acros Organics, Fluka, AlfaAesar, Fisher Scientific, Chematech and Macrocyclics and used without further purification unless otherwise declared. For radiolabeling reactions trace metal-free substances were used. Column chromatography was performed using silica gel 60 (0.063–0.200 mm, Acros Organics) as stationary phase and the respectively specified solvents as mobile phase. NMR measurements were performed using a Bruker Avance III HD 400 (400 MHz) or Avance III 600 (600 MHz). Mass spectrometry was measured via Agilent Technologies 1220 Infinity LC system coupled to an Agilent Technologies 6130 Single Quadrupole LC/MS system. HPLC purification and analysis was performed using a Merck LaChrom system with Hitachi L7100 pump and L7400 UV-detector and the respectively mentioned column and conditions. Purification of the immunoconjugates was performed via fractionated SEC using PD-10 Desalting Columns (8.3 mL Sephadex™ G-25, GE Healthcare) and PBS as mobile phase. For radiolabeling experiments n.c.a. [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl (ITG, Garching, Germany) was used. Activity of the samples was measured using a PC-based dose calibrator (ISOMED 2010, Nuklear Medizintechnik Dresden GmbH). All radiochemical yields were determined by analyzing aliquots of the respective reaction solution via radio thin layer chromatography (radio-TLC, stationary phase: Merck Silica 60 F<sub>254</sub> TLC plates; mobile phase: 0.1 M citrate-buffer pH 4), image plate scanner (CR35-Bio, Elysia Raytest) and AIDA Image Analysis software (Elysia Raytest). Radiochemical purity was measured via radio-TLC and radio-SEC-HPLC monitoring (column: Phenomenex BioSep SEC-S 2000, mobile phase: 0.05 M phosphate-buffer pH 7, flow: 1 mL/min).

### Organic Synthesis

#### Synthesis of AAZTA<sup>5</sup>-SA

##### Methyl 5-(1,4-dibenzyl-6-nitro-1,4-diazepan-6-yl)pentanoate (1)

A mixture of 2-nitrocyclohexanone (2.00 g, 13.9 mmol), Amberlyst® A21 (1.05 g) and abs. methanol (35 mL) was stirred at 60 °C under reflux for 1 hour. *N,N'*-Dibenzylethylenediamine (3.36 g, 13.9 mmol) and paraformaldehyde (1.67 g, 55.5 mmol) were added to the solution. The resulting suspension was heated to 80 °C and stirred overnight. After completion of the reaction, the mixture was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After purification via column chromatography (cyclohexane/ethylacetate 9:1, R<sub>f</sub> = 0.27) product **1** was obtained as yellow oil (5.20 g, 11.8 mmol, 85%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 7.27 (m, 10H); 3.72 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H); 3.64 (s, 3H); 3.56 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H); 3.49 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H); 2.94 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H); 2.59 (m, 4H); 2.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H); 1.55 (m, 2H); 1.29 (m, 2H); 0.76 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 173.6 (s); 139.1 (s); 129.1 (s); 128.3 (s); 127.3 (s); 94.8 (s); 64.9 (s); 61.8 (s); 58.9 (s); 51.5 (s); 36.5 (s); 33.6 (s); 24.6 (s); 22.6 (s). MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 440.3 [*M* + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 439.25.

**Methyl 5-(6-(bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4-diazepan-6-yl)pentanoate (3)**

To a mixture of **1** (1.05 g, 2.39 mmol) and Pd(OH)<sub>2</sub>/C (0.62 g, 10 wt%) in abs. ethanol (20 mL) acetic acid (411 μL, 7.19 mmol) was added and the resulting solution was stirred at room temperature overnight under an atmosphere of hydrogen. After completion of the reaction, the mixture was filtered over Celite® and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The crude product **2** was used for the following reaction without further purification.

To a solution of **2** (2.39 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.32 g, 9.57 mmol) in abs. acetonitrile (30 mL) *tert*-butyl bromoacetate (1.41 mL, 9.57 mmol) and sodium iodide (0.80 g, 4.82 mmol) were added. The resulting mixture was stirred overnight at 40 °C. After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was subsequently purified via column chromatography (cyclohexane/ethylacetate 7:1, R<sub>f</sub> = 0.15) to yield product **3** as yellow oil (0.89 g, 1.30 mmol, 54%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 3.65 (s, 4H); 3.61 (s, 4H); 3.22 (s, 3H); 2.99 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.85–2.65 (m, 4H); 2.63 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H); 1.62–1.52 (m, 4H); 1.44 (s, 18H); 1.43 (s, 18H); 1.25 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 174.4 (s); 172.9 (s); 170.9 (s); 80.9 (s); 80.4 (s); 65.3 (s); 63.2 (s); 62.6 (s); 59.4 (s); 52.1 (s); 51.6 (s); 37.3 (s); 34.3 (s); 28.3 (s); 28.3 (s); 25.9 (s); 21.8 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 686.5 [M + H<sup>+</sup>], 708.4 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>35</sub>H<sub>63</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 685.45.

**5-(6-(Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4-diazepan-6-yl)pentanoic acid (4)**

To a solution of **3** (172 mg, 0.25 mmol) in 1,4-dioxane/water (2:1, 3 mL) a 1 M solution of LiOH (375 μL, 0.38 mmol) was added and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After completion of the reaction the solvent was evaporated under reduced pressure and 1 M NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) was added to the residue. The mixture was extracted with chloroform (5 × 5 mL) and the combined organic extracts were washed with water, dried over Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **4** was obtained as yellow oil without further purification (116 mg, 0.17 mmol, 69%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 3.60 (s, 4H); 3.23 (s, 4H); 3.00–2.97 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.88–2.60 (m, 6H); 2.36–2.32 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H); 1.64–1.52 (m, 4H); 1.43 (s, 18H); 1.42 (s, 18H); 1.24 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 178.9 (s); 172.9 (s); 170.9 (s); 81.0 (s); 80.5 (s); 65.1 (s); 63.1 (s); 59.4 (s); 52.2 (s); 34.2 (s); 29.8 (s); 28.3 (s); 28.2 (s); 25.6 (s); 22.8 (s); 21.9. MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 672.4 [M + H<sup>+</sup>], 694.5 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>34</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 671.44.

**6-(Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-6-(5-((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-diazepane (5)**

To a solution of **4** (75 mg, 0.11 mmol) in abs. acetonitrile (1 mL) HBTU (42 mg, 0.11 mmol), HOBT (45 mg, 0.33 mmol) and DIPEA (58 μL, 0.33 mmol) were added and the resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature. *N*-Boc-1,2-diaminoethane (35 μL, 0.22 mmol) was added and stirring was continued overnight. After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified via column chromatography (cyclohexane/ethylacetate 1:1, R<sub>f</sub> = 0.13). Product **5** was obtained as yellow oil (74.2 mg, 91 μmol, 82%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 6.34 (br, 1H); 5.26 (br, 1H); 3.60 (s, 4H); 3.38–3.34 (m, 2H); 3.26–3.24 (m, 2H); 3.21 (s, 4H); 2.96 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.75–2.73 (m, 2H); 2.66–2.63 (m, 2H); 2.59 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.19 (t, 2H);



1.62–1.53 (m, 4H); 1.43 (s, 18H); 1.42 (s, 27H); 1.28–1.20 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 174.4 (s); 173.3 (s); 172.8 (s); 165.9 (s); 82.9 (s); 82.8 (s); 63.4 (s); 62.5 (s); 62.1 (s); 55.5 (s); 54.5 (s); 47.1 (s); 40.8 (s); 39.9 (s); 35.6 (s); 29.8 (s); 28.5 (s); 28.3 (s); 28.1 (s); 27.9 (s); 26.2 (s); 23.4 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 814.6 [M + H<sup>+</sup>], 836.5 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>41</sub>H<sub>75</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>: 813.55.

### **6-(Bis(carboxymethyl)amino)-1,4-bis(carboxymethyl)-6-(5-((2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-diazepane (6)**

A solution of **5** (74.2 mg, 91 μmol) in dichloromethane/trifluoroacetic acid (1:1, 2 mL) was stirred for 3 h at room temperature. After complete deprotection, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in 0.5 M phosphate-buffer (pH 7, 4 mL). To the resulting solution 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (39 μL, 264 μmol) was added. The pH was adjusted to 7 with 1 M NaOH solution before stirring overnight at room temperature. After completion of the reaction, the product was purified via HPLC (column: Phenomenex Luna C18 semipreparative (250 × 10 mm) 10 μ, flow rate: 5 mL/min, 10% MeCN + 0.1% TFA, t<sub>R</sub> = 12.5 min) yielding **6** as colorless solid (16.2 mg, 26 μmol, 29%). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz, δ [ppm]): 4.75–4.67 (m, 2H); 3.88 (s, 2H); 3.76–3.66 (m, 8H); 3.59–3.44 (m, 8H); 3.40–3.38 (m, 2H); 2.20 (t, 2H); 1.52–1.45 (m, 4H); 1.43 (t, 3H); 1.30–1.21 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 100 MHz, δ [ppm]): 176.60 (s); 176.06 (s); 175.97 (s); 173.82 (s); 170.67 (s); 70.70 (s); 70.55 (s); 62.81 (s); 59.41 (s); 58.63 (s); 52.59 (s); 52.20 (s); 43.93 (s); 39.56 (s); 39.24 (s); 35.31 (s); 33.76 (s); 25.73 (s); 22.26 (s); 15.07 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 614.3 [M + H<sup>+</sup>], 636.3 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>: 613.26.

## **Synthesis of DOTA-SA**

### **2,2',2''-(10-(2-((2-Ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (7)**

A solution of tri-*tert*-butyl 2,2',2''-(10-(2-((2-aminoethyl)amino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (50 mg, 81 μmol) in dichloromethane/trifluoroacetic acid (1:1, 200 μL) was stirred overnight at room temperature. After complete deprotection the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in 0.5 M phosphate-buffer (pH 7, 1 mL). To the resulting solution 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (36 μL, 244 μmol) was added and the pH was adjusted to 7 with 1 M NaOH solution before stirring overnight at room temperature. After completion of the reaction the product was purified via HPLC (column: Phenomenex Gemini C18 semipreparative (250 × 10 mm) 5 μ, flow rate: 5 mL/min, 10% to 20% MeCN + 0.1% TFA in 20 min, t<sub>R</sub> = 11,6 min) yielding **7** as colorless solid (19.1 mg, 34 μmol, 41%). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 600 MHz, δ [ppm]): 4.64–4.53 (dq, 2H); 3.93–2.89 (m, 28H); 1.41–1.33 (m, 3H). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 571.3 [M + H<sup>+</sup>], 593.3 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: 570.26.

## Synthesis of DTPA-*p*-Bn-SA

### **(S)-2,2'-((2-((2-(Bis(carboxymethyl)amino)-3-(4-((2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)phenyl)propyl)(carboxymethyl)amino)ethyl)azanediyl)diacetic acid (8a)**

To a solution of (S)-2-(4-aminobenzyl)-diethylenetriamine pentaacetic acid tetrahydrochloride (56.6 mg, 88  $\mu$ mol) in 0.5 M phosphate-buffer (pH 7, 3 mL) 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (15  $\mu$ L, 101  $\mu$ mol) was added and the pH was adjusted to 7 with 1 M NaOH solution. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After completion of the reaction the product was purified via HPLC (column: Phenomenex Synergi C18 semipreparative (250  $\times$  10 mm) 10  $\mu$ , flow rate: 5 mL/min, 10% to 25% MeCN + 0.1% TFA in 20 min,  $t_R$  = 17.0 min) yielding **8a** as colorless solid (3.8 mg, 6  $\mu$ mol, 7%). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 623.2 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>: 622.21.

## Synthesis of CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA

### **2,2'-(((1S,2R)-2-(((R)-2-(bis(carboxymethyl)amino)-3-(4-((2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)phenyl)propyl)(carboxymethyl)amino)cyclohexyl)azanediyl)diacetic acid (8b)**

To a solution of [(R)-2-amino-3-(4-aminophenyl)propyl]-*trans*-(S,S)-cyclohexane-1,2-diamine-pentaacetic acid dihydrochloride dihydrate (50 mg, 76  $\mu$ mol) in 0.5 M phosphate-buffer (pH 7, 3 mL) 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (12  $\mu$ L, 81  $\mu$ mol) was added and the pH was adjusted to 7 with 1 M NaOH solution. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After completion of the reaction the product was purified via HPLC (column: Phenomenex Synergi C18 semipreparative (250  $\times$  10 mm) 10  $\mu$ , flow rate: 5 mL/min, 22% to 33% MeCN + 0.1% TFA in 20 min,  $t_R$  = 9.1 min) yielding **8b** as pale yellow solid (8.1 mg, 12  $\mu$ mol, 16%). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 677.3 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>: 676.26.

## Antibody coupling and radiolabeling with lutetium-177

### Synthesis and purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab

20–120  $\mu$ L of the bevacizumab solution (0.5–3.0 mg mAb, 3.4–20.1 nmol, 25 mg/mL, Avastin<sup>®</sup>, Roche) was diluted with 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-buffer (pH 9, 1 mL). A tenfold molar excess of AAZTA<sup>5</sup>-SA solution (21–123  $\mu$ L, 34–200 nmol, 1 mg/mL) was added and pH was adjusted to 9 with 1 M NaOH solution. The mixture was shaken overnight at room temperature via thermomixer. The resulting immunoconjugate was subsequently purified via fractionated SEC. In detail, the PD-10 column was first preconditioned with 20 mL PBS. The reaction mixture was then completely applied to the column and the flow-through was collected in the first fraction. Subsequently, a further 9 fractions of 0.5 mL PBS each were collected. In the first approach (3 mg initial amount of mAb), the protein containing fractions 6–8 were combined and homogenized before subsequent radiolabeling. In the second approach (0.5 mg initial amount of mAb), fractions 5 to 10 were used separately and radiolabeled individually. In the third approach (3.0 mg initial amount of mAb), fraction 6 was used separately for subsequent radiolabeling and fraction 7 was further purified via second SEC using the same procedure. The sixth and seventh fraction of the extended purification step were combined and homogenized before radiolabeling.

### **Synthesis and purification of DOTA-SA-bevacizumab**

120  $\mu$ L of the bevacizumab solution (3.0 mg mAb, 20.1 nmol, 25 mg/mL, Avastin<sup>®</sup>, Roche) was diluted with 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-buffer (pH 9, 1 mL). A tenfold molar excess of DOTA-SA solution (115  $\mu$ L, 202 nmol, 1 mg/mL) was added and pH was adjusted to 9 with 1 M NaOH solution. The mixture was shaken overnight at room temperature via thermomixer. The resulting immunoconjugate was subsequently purified via fractionated SEC using a PD-10 Desalting Column (8.3 mL Sephadex<sup>™</sup> G-25, GE Healthcare) and PBS as mobile phase. In detail, the column was first preconditioned with 20 mL PBS. The reaction mixture was then completely applied to the column and the flow-through was collected in the first fraction. Subsequently, a further 9 fractions with 0.5 mL PBS each were collected. In the first approach, the protein containing fractions 6–8 were combined and homogenized before subsequent radiolabeling. In a further approach, fraction 6 was used separately for subsequent radiolabeling and fraction 7 was further purified via second SEC using the same procedure. The sixth and seventh fraction of the extended purification step were combined and homogenized before radiolabeling.

### **Synthesis and purification of DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab**

120  $\mu$ L of the bevacizumab solution (3.0 mg mAb, 20.1 nmol, 25 mg/mL, Avastin<sup>®</sup>, Roche) was diluted with 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-buffer (pH 9, 1 mL). A tenfold molar excess of an aqueous solution of either DTPA-*p*-Bn-SA (125  $\mu$ L, 201 nmol, 1 mg/mL) or CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA (136  $\mu$ L, 201 nmol, 1 mg/mL) was added and pH was adjusted to 9 with 1 M NaOH solution. The mixture was shaken overnight at room temperature via thermomixer. The resulting immunoconjugate was subsequently purified via fractionated SEC using a PD-10 Desalting Column (8.3 mL Sephadex<sup>™</sup> G-25, GE Healthcare) and PBS as mobile phase. In detail, the column was first preconditioned with 20 mL PBS. The respective reaction mixture was then completely applied to the column and the flow-through was collected in the first fraction. Subsequently, a further 9 fractions with 0.5 mL PBS each were collected. Fraction 6 was used separately for subsequent radiolabeling and fraction 7 was further purified via second SEC using the same procedure. The sixth and seventh fraction of the extended purification step were combined and homogenized before radiolabeling.

### **Determination of the chelator-to-antibody ratio (CAR) of AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab, DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab**

A solution of either AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab (97–126 µg protein, 0.65–0.85 nmol), DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab (50–82 µg protein, 0.34–0.55 nmol) or CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab (45–51 µg protein, 0.30–0.34 nmol) in 450 µL PBS was added to a solution of a known molar excess of [<sup>nat</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O (2.5–10 nmol, 3–33 eq.) spiked with 1 MBq [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 550 µL 0.5 M HEPES-buffer (pH 7). The resulting mixture (1 mL) was shaken for 90 min at room temperature and 550 rpm via thermomixer. After completion of the reaction the percentage of protein-bound activity was determined via radio-TLC. The chelator-to-antibody ratio was calculated via:

$$\text{CAR} = \frac{\% \text{RCY}(\text{bound activity})}{100} \cdot \frac{n([\text{natLu}] \text{LuCl}_3)}{n(\text{mAb} - \text{conjugate})}$$

### **Radiolabeling of AAZTA<sup>5</sup>-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA with lutetium-177**

[<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> (48–51 MBq in 25 µL 0.04 M HCl) was diluted with 525 µL 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) and a solution of either AAZTA<sup>5</sup>-SA, DTPA-*p*-Bn-SA or CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA (10 nmol respectively) in PBS (450 µL) was added subsequently. The resulting mixture (1 mL) was shaken for 30 min at 550 rpm and either at room temperature or 37 °C via thermomixer. Radiolabeling efficiency was investigated at different times via radio-TLC.

### **Radiolabeling of DOTA-SA with lutetium-177**

[<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> (32–48 MBq in 5–25 µL 0.04 M HCl) was diluted with 525–545 µL of either 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) or 1 M ammonium acetate-buffer (pH 5.5) and a solution of DOTA-SA (10 nmol) in PBS (450 µL) was added subsequently. The resulting mixture (1 mL) was shaken for 30–60 min at 550 rpm and various temperatures (RT, 37 °C, 50 °C, 70 °C, 95 °C) via thermomixer. Radiolabeling efficiency was investigated at different times via radio-TLC.

### **Radiolabeling of AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab, DOTA-SA-bevacizumab, DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab with lutetium-177 and purification of the resulting radioimmunoconjugates**

[<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> (43–55 MBq in 14–50 µL 0.04 M HCl) was diluted with 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) to a total volume of 550 µL. Afterwards a solution of either AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab (125–900 µg, 0.8–6.0 nmol), DOTA-SA-bevacizumab (272–900 µg, 1.8–6.0 nmol), DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab (127–245 µg, 0.9–1.6 nmol) or CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab (77–439 µg, 0.5–2.9 nmol) in PBS (450 µL) was added and the mixture (1 mL) was shaken for 60–90 min at 550 rpm and either at room temperature or 37 °C via thermomixer. Radiolabeling efficiency was investigated at different times via radio-TLC. The resulting radioimmunoconjugates were subsequently purified via fractionated SEC using the same conditions as for purification prior to radiolabeling. The fractions containing the radiolabeled antibody were identified by measurement of activity and radiochemical purity was determined via radio-TLC and radio-SEC-HPLC before combination and homogenization.

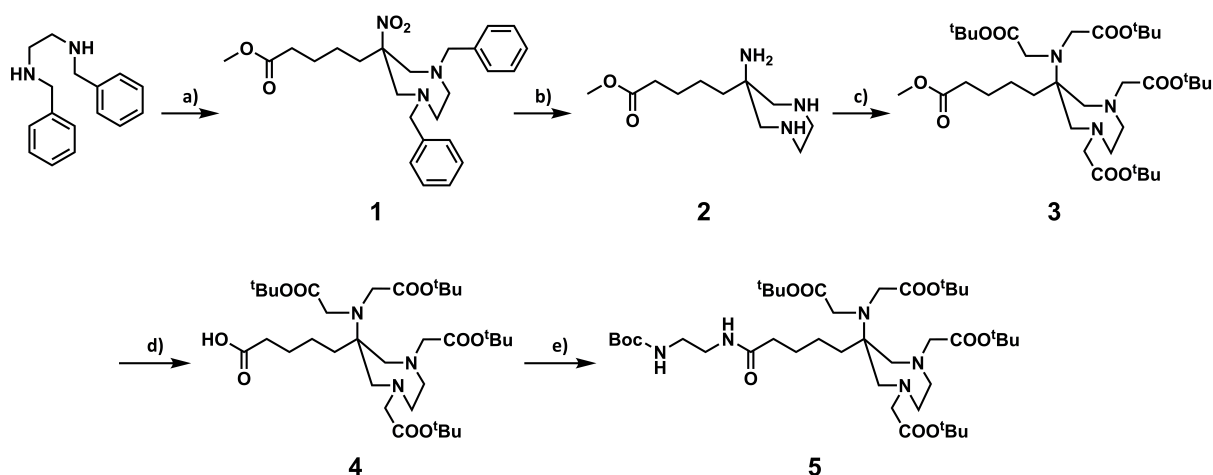
**Determination of *in vitro* complex stability of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab, [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab and [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab**

The purified radioimmunoconjugate [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab, [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab or [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab (in 220 μL PBS) was added to either 500 μL human serum or 500 μL PBS and the resulting mixtures were shaken via thermomixer at 37 °C and 550 rpm for 15 d. The proportion of the intact conjugate versus released radionuclide was determined via radio-TLC at various times.

## RESULTS AND DISCUSSION

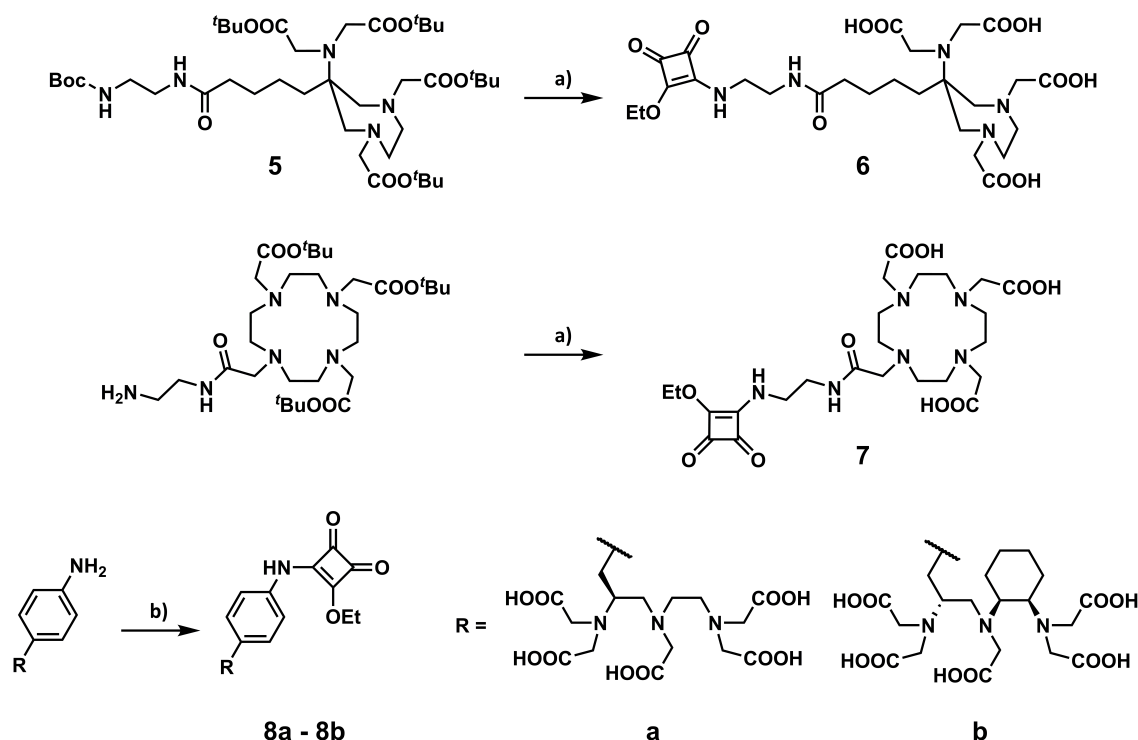
### Organic Synthesis

The *tert*-butyl-protected derivative of AAZTA<sup>5</sup> (**4**, Fig. 2) could be successfully synthesized with an overall yield of 32% within four steps according to the work recently published by our group [61]. The initial step first includes an *in situ* ring-opening reaction of 2-nitrocyclohexanone followed by formation of the diazepane scaffold via double Nitro-Mannich reaction of the resulting nucleophilic compound with *N,N'*-dibenzylethylenediamine and paraformaldehyde. In the next step the endocyclic amines were deprotected by hydrogenolysis and the nitro group was simultaneously reduced to an exocyclic amine. Without further purification, intermediate **2** was then directly processed with *tert*-butyl bromoacetate to yield the tetra alkylated product **3**. In order to obtain a free linkable carboxylic acid group, the corresponding methyl ester was finally cleaved with lithium hydroxide leading to the desired AAZTA<sup>5</sup>(*t*Bu)<sub>4</sub> (**4**). For later introduction of a squaramide as the actual linker structure, it was necessary to first implement a terminal amine. For this purpose, compound **5** was synthesized via amide coupling of *N*-Boc-ethylenediamine to the carboxylic acid functionality of product **4**.



**Figure 2:** Schematic overview of the synthesis of protected AAZTA<sup>5</sup> and AAZTA<sup>5</sup>-ethylenediamine: (a) 2-nitrocyclohexanone, Amberlyst® A21, paraformaldehyde, MeOH, 85%; (b) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>, EtOH; (c) *tert*-butyl bromoacetate, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, MeCN, 54%; (d) 1 M LiOH, 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (2:1), 69%; (e) *N*-Boc-ethylenediamine, HBTU, HOBT, DIPEA, MeCN, 82%.

Afterwards, all protective groups were deprotected with trifluoroacetic acid and finally squaric acid diethyl ester was coupled to the primary amine at pH 7 to yield the final product AAZTA<sup>5</sup>-SA (**6**, Fig. 3). A severe pH control is required to prevent double amidation of the squaric acid, which occurs at more basic conditions. Furthermore, for comparison of the different chelator systems, squaric acid diethyl ester was coupled analogously to previously deprotected commercially available DOTA(*t*Bu)<sub>3</sub>-ethylenediamine as well as to DTPA-*p*-Bn-NH<sub>2</sub> and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-NH<sub>2</sub>. The resulting bifunctional chelator systems **6**, **7**, **8a** and **8b** were purified via HPLC.

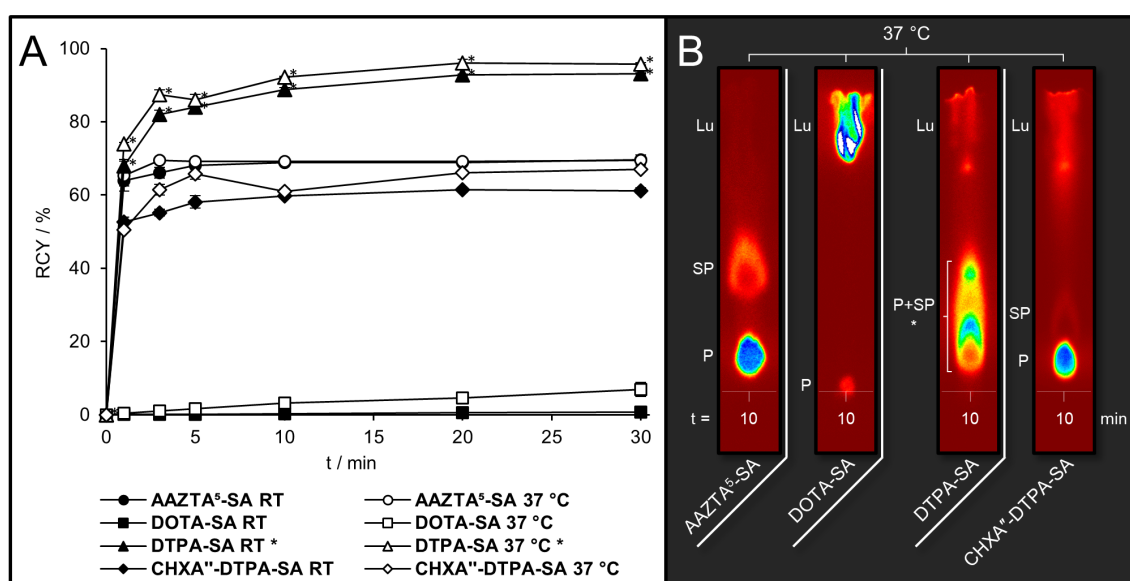


**Figure 3:** Coupling of squaric acid diethyl ester to AAZTA<sup>5</sup>-ethylenediamine, DOTA-ethylenediamine, DTPA-*p*-Bn-NH<sub>2</sub> and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-NH<sub>2</sub> to form the corresponding monoamides: (a) 1. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (1:1); 2. 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione, phosphate-buffer pH 7, 29%, 41%; (b) 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione, phosphate-buffer pH 7, 7%, 16%.

### Radiolabeling of AAZTA<sup>5</sup>-SA, DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA with lutetium-177

Prior to their conjugation to an antibody, AAZTA<sup>5</sup>-SA, DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA were evaluated for their radiolabeling properties with lutetium-177 as stand-alone bifunctional chelators. For this purpose, 10 nmol of the corresponding compound were incubated with [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in HEPES-buffer at pH 7 and either room temperature or 37 °C. The respective radiochemical yield was analyzed at different times over a period of 30 min via radio-TLC. DOTA-SA showed a negligibly low radiolabeling efficiency at room temperature (0.8 ± 0.1% RCY) and even at 37 °C only a slightly increased radiochemical yield could be obtained after 30 min (6.9 ± 1.9% RCY). In contrast, a significantly higher radiochemical yield could be observed for AAZTA<sup>5</sup>-SA at room temperature as well as at 37 °C after just 1 min. At room temperature, a value of 68.1 ± 1.0% was achieved after 5 min, which did not change considerably in the further process of the reaction (69.6 ± 1.4% after 30 min). At 37 °C this maximum (69.6 ± 0.6%) could already be reached after 3 min. As shown in Fig. 4B, analysis of the radio-TLC indicated the presence of another not further investigated radiolabeled species with a R<sub>f</sub> value of 0.4 besides the desired [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA at R<sub>f</sub> = 0.1. It may be assumed that this second species represents either a different protonation stage of the complex or a partially change in conformation or coordination geometry due to the influence of the squaramide linker. Since the ratio of these two species did not change significantly during the reaction, this led to a maximum result of approximately 70% instead of quantitative radiochemical yields, despite the fact that no unbound radiometal could be observed. <sup>177</sup>Lu-labeling of CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA revealed slightly lower radiochemical yields compared to the AAZTA<sup>5</sup> derivative both at room temperature (61.2 ± 0.8% after

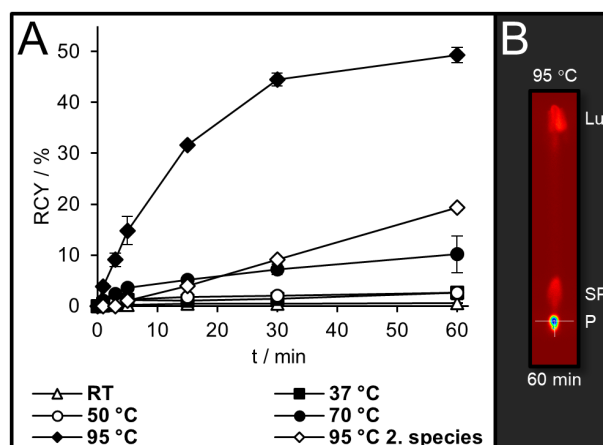
30 min) and at 37 °C ( $67.0 \pm 0.2\%$  after 30 min). Although the minor formation of a second radiolabeled species was also apparent in this case (1–2%), these results were mainly due to a considerable amount of unbound radiometal, which did not decrease significantly after 10 min. As shown in Fig. 4B, determination of the labeling efficiency of DTPA-*p*-Bn-SA via radio-TLC proved to be very difficult. Instead of one distinctly identifiable product signal, at least two radiolabeled non-separable species were detected in the range of  $R_f = 0.1$ – $0.5$ . In this case, the values shown in Fig. 4A represent the integral over this entire signal range resulting in high radiochemical yields of  $93.2 \pm 0.2\%$  at RT and  $95.8 \pm 0.3\%$  at 37 °C, respectively after 30 min. Via LC/MS analysis of the bifunctional compounds, it was verified that no initial impurity could be responsible for the formation of more than one radiolabeled product.



**Figure 4:** Evaluation of radiolabeling properties of AAZTA<sup>5</sup>-SA with lutetium-177 compared to DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA: radiolabeling kinetics of 10 nmol of each bifunctional chelator at room temperature and 37 °C,  $n = 3$ , values displayed as mean  $\pm$  SD (A); representative radio-TLC images (silica, 0.1 M citrate-buffer pH 4) of the formation of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA, [<sup>177</sup>Lu]Lu-DOTA-SA, [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA and [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA at 37 °C after 10 min (B); P = product, SP = sideproduct/second species, Lu = unbound lutetium-177; RCY-values of [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA represent the integral over signal range with  $R_f = 0.1$ – $0.5$  (indicated with asterisk).

For further analysis, radiolabeling of DOTA-SA was also performed using higher temperatures as well as slightly acidic pH (5.5). As shown in Fig. 5, at pH 7 (0.5 M HEPES) conditions up to 95 °C were necessary to produce acceptable radiochemical yields. Similar to the radiolabeling results of the AAZTA<sup>5</sup>-, DTPA- and CHX-A''-DTPA-analogues a second radiolabeled species could be observed with a proportion of approx. 20% after 60 min at 95 °C. Since all molecules have a squaramide ester as structural commonality, this might also be an indication for the influence of the squaric acid moiety on the formation of further species. Utilization of 1 M ammonium acetate-buffer (pH 5.5) as reaction medium led to significantly faster complexation kinetics and higher radiochemical yields at 95 °C. Already after 30 min almost no unbound radiometal could be observed. However, these conditions evidently also facilitated the formation of the second radiolabeled species, culminating in a proportion of approx. 45% after 60 min (Fig. S1).

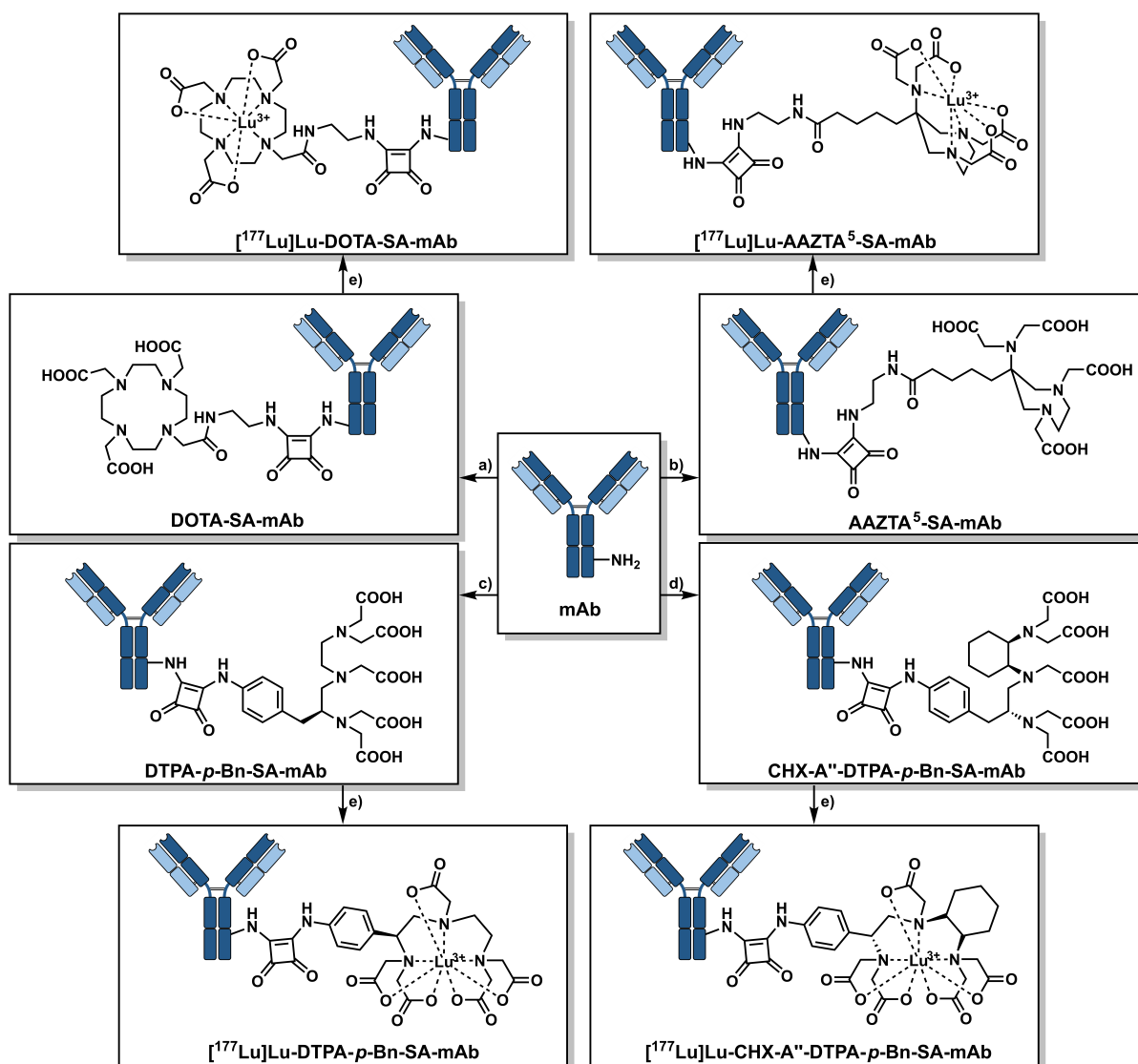




**Figure 5:** Radiolabeling results of  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-SA}$  in 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) using various temperatures,  $n = 3$ , values displayed as mean  $\pm$  SD (A); representative radio-TLC image of the results after 60 min at 95 °C (B); P = product, SP = sideproduct/second species, Lu = unbound lutetium-177.

### Antibody coupling and radiolabeling of the resulting immunoconjugates

To evaluate its applicability as a bifunctional chelator system for radiolabeling of temperature and pH sensitive biomolecules such as antibodies with the therapeutic nuclide lutetium-177, AAZTA<sup>5</sup>-SA was coupled to bevacizumab as model antibody (Fig. 6). For this purpose, the pH dependent second amidation of the squaric acid linker was used to form a stable bond between the remaining ethyl ester and lysine side chains of the protein. A tenfold molar excess of AAZTA<sup>5</sup>-SA resulted in a ratio of  $0.29 \pm 0.04$  bound chelator moieties per antibody. This value is sufficiently low to assume the affinity of the antibody not to be affected by the modification. To remove excess unbound chelator molecules from the reaction mixture, the resulting immunoconjugate was purified by fractionated size exclusion chromatography using a gel filtration column and PBS as eluent. Fractions of 0.5 mL each were collected and then the protein-containing fractions were used for subsequent  $^{177}\text{Lu}$ -labeling. Similarly, DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA were also coupled to bevacizumab and purified under the same conditions with the latter two resulting in  $5.38 \pm 2.69$  and  $6.06 \pm 2.46$  bound chelator moieties per protein. As described below, different radiolabeling approaches of the resulting mAb conjugates with  $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  in HEPES-buffer at pH 7 both at room temperature and at 37 °C were performed, whereas the two DTPA-containing conjugates were only introduced in the final experiment.

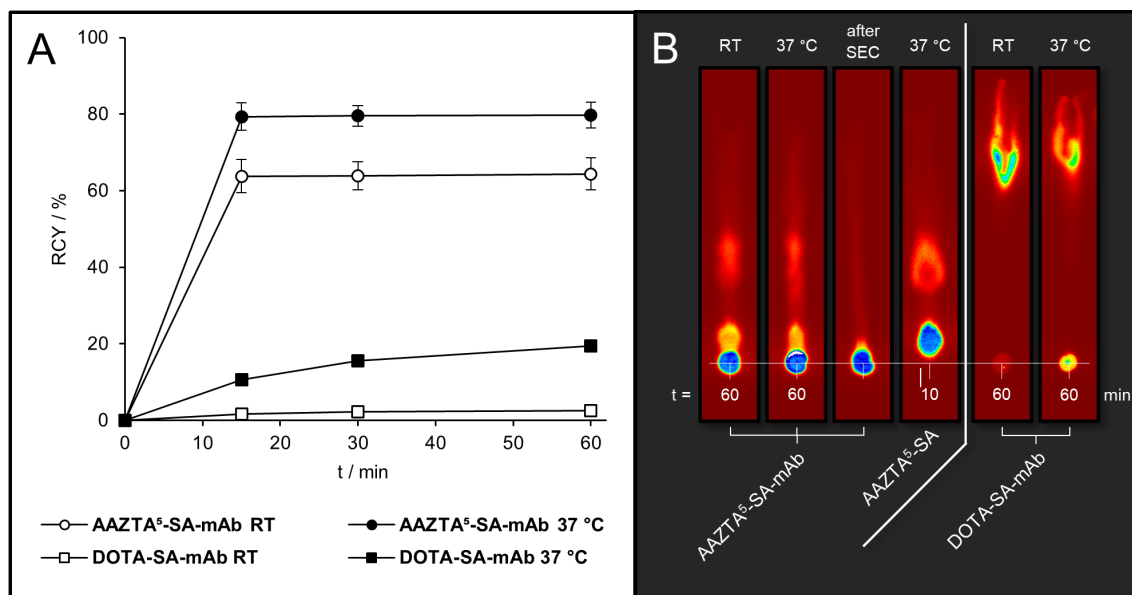


**Figure 6:** Synthesis and  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, DOTA-SA-mAb, DTPA-*p*-Bn-SA-mAb and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb: (a) 10 eq. DOTA-SA, phosphate-buffer pH 9; (b) 10 eq. AAZTA<sup>5</sup>-SA, phosphate-buffer pH 9; (c) 10 eq DTPA-*p*-Bn-SA, phosphate-buffer pH 9; (d) 10 eq. CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA, phosphate-buffer pH 9; (e)  $^{177}\text{Lu}$ LuCl<sub>3</sub>, HEPES-buffer pH 7, room temperature or 37 °C.

In the first experiment, featuring the combined SEC fractions 6–8,  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of the AAZTA<sup>5</sup>-functionalized antibody conjugate resulted in a radiochemical yield of  $63.8 \pm 4.3\%$  at room temperature and  $79.3 \pm 3.6\%$  at 37 °C, respectively. These values were already obtained at the first measured time point after 15 min and only a small increase could be observed in the further progress of the reaction ( $64.4 \pm 4.2\%$  and  $79.8 \pm 3.3\%$  after 60 min). In comparison,  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of the DOTA-functionalized analogue indicated a very low radiochemical yield of  $2.6 \pm 0.1\%$  at room temperature after 60 min. At 37 °C, however, the yield increased to  $19.5 \pm 1.0\%$  after the same duration. As expected, this value is significantly lower than that of  $^{177}\text{Lu}$ Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab, but nevertheless it exceeds the result of the labeling experiment of unbound DOTA-SA by a factor of almost three due to a higher concentration of the complex-forming moiety.

Analysis of the radio-TLC results of the AAZTA<sup>5</sup>-functionalized conjugate indicated the presence of a radiolabeled sideproduct at  $R_f = 0.1$  and at least one other impurity at  $R_f = 0.4$  besides the desired

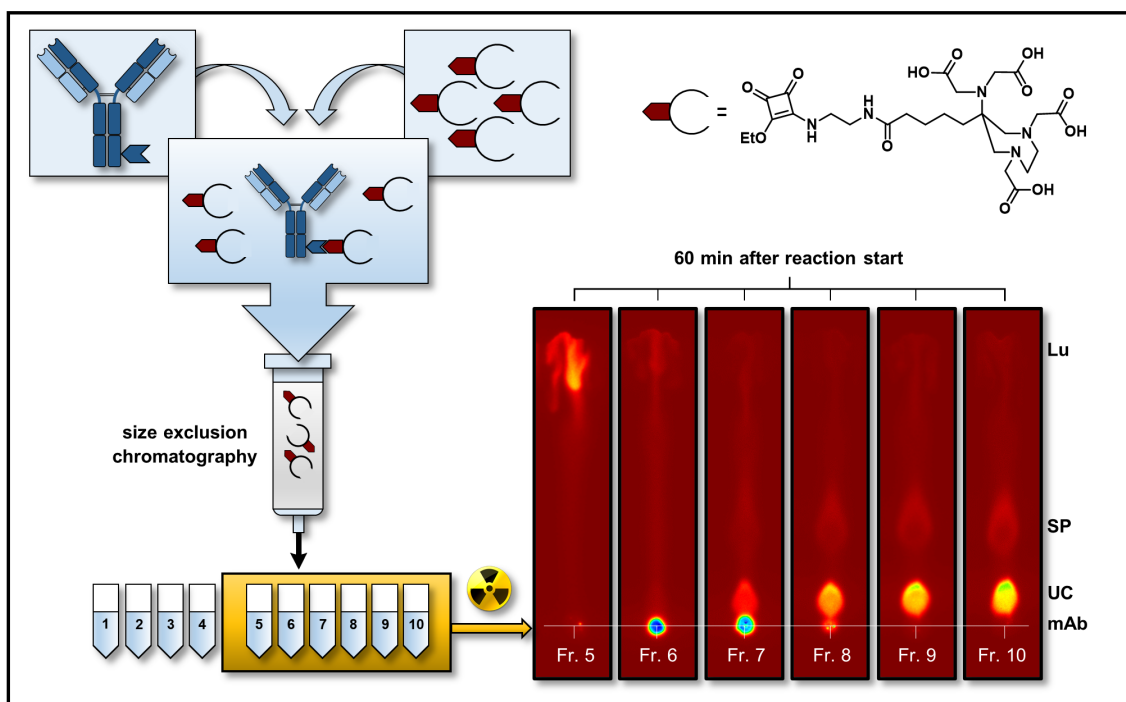
radioimmunoconjugate at  $R_f = 0$  (Fig. 7B). These species led to a decreased maximum radiochemical yield despite the absence of unbound lutetium-177 but could be removed via subsequent SEC-purification providing a radiochemical purity of > 99% and an apparent molar activity of 4.5 GBq/ $\mu\text{mol}$ .



**Figure 7:** Radiolabeling efficiency of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb and [<sup>177</sup>Lu]Lu-DOTA-SA-mAb at room temperature and 37 °C,  $n = 3$ , values displayed as mean  $\pm$  SD (A); representative radio-TLC images of the formation of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb and [<sup>177</sup>Lu]Lu-DOTA-SA-mAb after 60 min, unbound [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA for comparison and purity of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb after SEC (B).

Comparison of the obtained radio-TLC results of the AAZTA<sup>5</sup>-functionalized antibody with those of the unbound chelator led to the assumption that the previous SEC purification was insufficient (Fig. 7B). The  $R_f$  values of the present impurities match exactly with the  $R_f$  values of AAZTA<sup>5</sup>-SA and its second species (0.1 and 0.4).

For a more profound analysis, coupling of AAZTA<sup>5</sup>-SA to bevacizumab was repeated in a second approach. Instead of combining the protein-containing fractions 6 to 8 after SEC-purification, this time fractions 5 to 10 were used separately for subsequent <sup>177</sup>Lu-labeling. In this case, identical labeling conditions as previously described were chosen. As shown in Fig. 8, radiolabeling of fraction 5 resulted almost exclusively in free uncomplexed radiometal ( $R_f = 0.8-1.0$ ) indicating the absence of the AAZTA<sup>5</sup>-conjugated antibody as expected. Fraction 6, in contrast, showed a decreasing amount of free lutetium-177 and the desired radiolabeled product ( $R_f = 0$ ) with a progressively increasing radiochemical yield. <sup>177</sup>Lu-labeling of fraction 7 indicated the AAZTA<sup>5</sup>-functionalized protein being the main component with an additional impurity of non-separated AAZTA<sup>5</sup>-SA (approx. 28%). Furthermore, a small amount of the second species at  $R_f = 0.4$  was also detectable, confirming the presence of excess unbound chelator. Fraction 8 already consisted primarily of AAZTA<sup>5</sup>-SA and only a small amount represented the corresponding immunoconjugate. Finally, labeling of fractions 9 and 10 confirmed the exclusive presence of the unbound bifunctional chelator moiety with increasing elution volume.



**Figure 8:** Schematic overview and representative radio-TLC results of  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of individual fractions after SEC-purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab (60 min after reaction start); mAb = radiolabeled AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, UC = radiolabeled excess unbound AAZTA<sup>5</sup>-SA chelator, SP = radiolabeled side product/second species resulting from unbound chelator, Lu = free lutetium-177.

Separate radiolabeling of individual fractions after SEC-purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab could therefore confirm the assumption that the excess unbound chelator was not completely separated in the first approach. It could be shown that a certain breakthrough of AAZTA<sup>5</sup>-SA leads to contamination of the antibody-containing fractions even at lower elution volumes than expected.

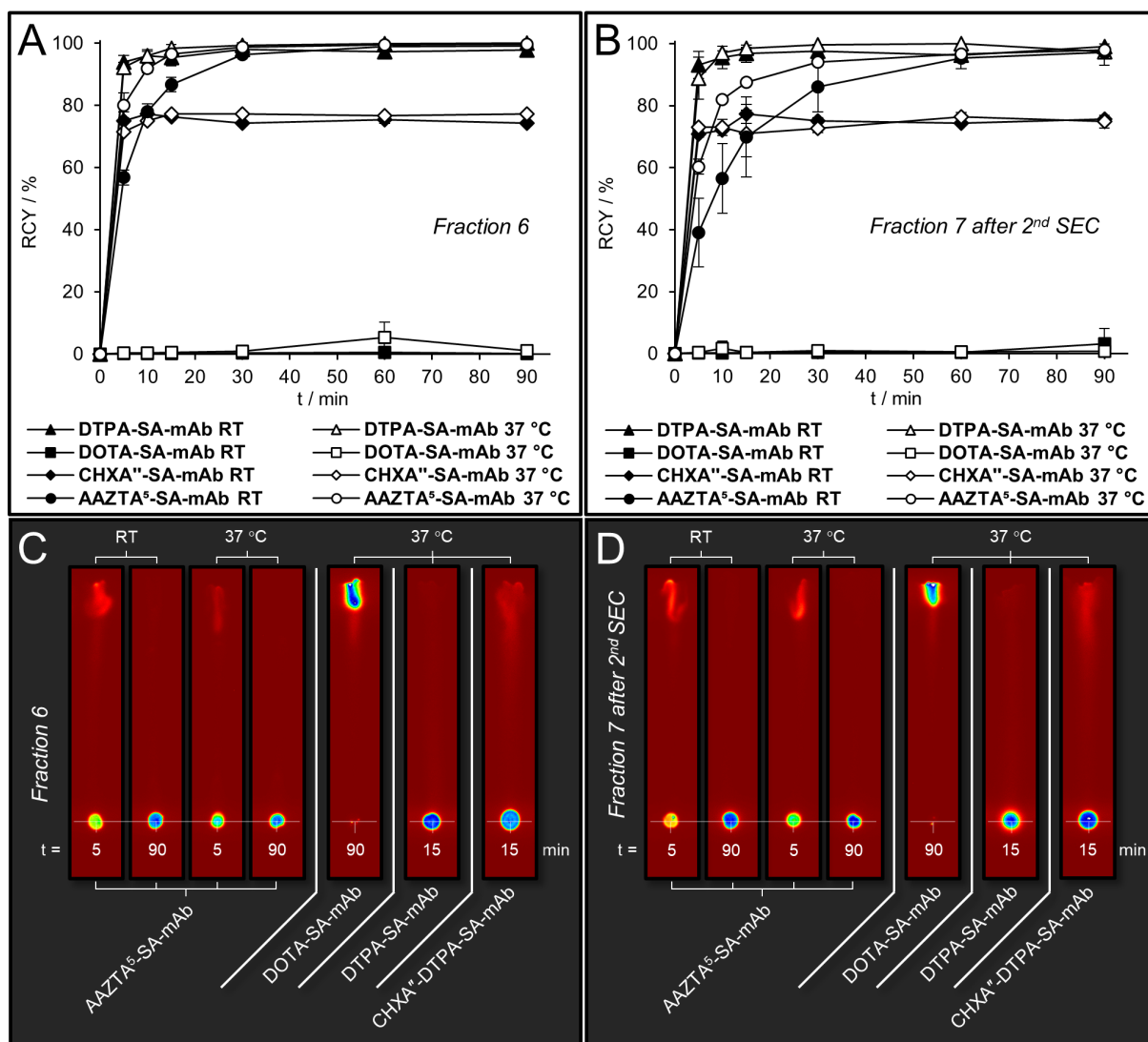
In order to optimize the purity of the protein solution used for labeling, a further approach for coupling of the bifunctional chelator system to the model antibody bevacizumab and purification was performed. Instead of combining the protein-containing fractions 6–8, this time only fraction 6, which provides the highest purity of modified antibody, was used for subsequent  $^{177}\text{Lu}$ -labeling at room temperature as well as at 37 °C. Fraction 7, which consists mainly of the required immunoconjugate with a certain impurity of excess unbound chelator (Fig. 8), was further purified via second SEC before radiolabeling. For comparison, antibody functionalization and this extended purification was analogously performed with DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA.  $^{177}\text{Lu}$ -labeling conditions were chosen according to the previously described experiments (Fig. 9).

Radiolabeling of the 6<sup>th</sup> fraction after SEC-purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb (175–457 µg protein) resulted after 90 min in almost quantitative radiochemical yields of  $99.2 \pm 0.3\%$  at room temperature and  $99.7 \pm 0.1\%$  at 37 °C, respectively. Already after 10 min at 37 °C a radiochemical yield of  $92.0 \pm 1.5\%$  could be obtained. As expected, slightly slower reaction kinetics was observed at room temperature ( $86.7 \pm 2.3\%$  after 15 min). However, these results indicate again a very fast complexation of lutetium-177 at mild temperatures and a neutral pH value by the AAZTA<sup>5</sup>-SA moiety. The twice-purified fraction 7 (199–419 µg protein after second SEC) showed also comparable outcomes of  $97.3 \pm 1.8\%$  at room temperature and  $97.9 \pm 0.1\%$  after 90 min at 37 °C, respectively using analogous labeling conditions.

In comparison,  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of both fraction 6 (278–382  $\mu\text{g}$  protein) and the twice-purified fraction 7 (272–273  $\mu\text{g}$  protein after second SEC) of the DOTA-functionalized immunoconjugate provided only negligible complexation rates at room temperature and 37  $^{\circ}\text{C}$ , confirming the unique advantages of AAZTA<sup>5</sup>-SA. Here, the obtained results (< 2% RCY at 37  $^{\circ}\text{C}$ ) differ considerably from the first radio-labeling approach of the DOTA-functionalized antibody (19.5  $\pm$  1.0%). This can be explained by different concentrations of the modified protein in the individual experiments. While in the first labeling approach 900  $\mu\text{g}$  of the radioimmunoconjugate were used in each case, the optimized purification and separation of the fractions in the last approach led to a lower amount per labeling experiment (272–382  $\mu\text{g}$ ) at constant volume. These generally low radiochemical yields are not only based on the mild temperatures but presumably also due to the neutral pH used herein in contrast to the improved results of similar DOTA-functionalized conjugates reported in the literature. As already mentioned, utilization of a slightly acidic buffer (pH 5.5) for  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of unbound DOTA-SA led to significantly improved complexation in combination with elevated temperatures (Fig. S1).

Compared to AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb (0.29  $\pm$  0.04), coupling of the linear chelator systems DTPA-*p*-Bn-SA and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA to the antibody led to significantly higher chelator-to-antibody ratios of 5.4  $\pm$  2.7 and 6.1  $\pm$  2.5, respectively. One possible reason relates to the different steric demands of the various chelator systems. Due to the free rotatability of their CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> bonds, the two linear DTPA systems provide a significantly more flexible backbone and thus ensure simplified alignment with the surface structure of the large biomolecule. In contrast, the more rigid 1,4-diazepane backbone of AAZTA<sup>5</sup> causes the arrangement of the four carboxyl groups to be more or less fixed. As described by Parker *et al.*, the seven-membered cycle is able to change its conformation via ring flip, but this is mainly observed at low pH values and small substituents in the 6-position adjacent to the exocyclic nitrogen [69]. However, since both antibody conjugation and radiolabeling were performed at neutral to slightly basic pH and the longer linker chain is expected to preferentially occupy the equatorial position, this structural flexibility presumably plays a minor role in the case of AAZTA<sup>5</sup>-SA. Therefore, the steric demand of the AAZTA unit is probably much higher and conjugation to the antibody may be hampered. Additionally, the carboxyl moieties are able to form hydrogen bonds to the functional groups of the protein thus leading to a certain preconjugation, which in turn may enhance squaramide proximity in the case of the DTPA systems due to flexibility, one further functional group and a shorter linker chain. In contrast, this effect is probably less strong in the case of AAZTA<sup>5</sup>-SA and may even lead to reduced accessibility for the formation of the corresponding squaric acid diamide due to the rigidity of the chelator and the longer linker chain.

As expected using a linear chelator system,  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of both fraction 6 (196–245  $\mu\text{g}$  protein) and the twice purified fraction 7 (127–142  $\mu\text{g}$  protein after second SEC) of DTPA-*p*-Bn-SA-mAb indicated very fast complexation kinetics at RT as well as 37  $^{\circ}\text{C}$ . High radiochemical yields of 94.0  $\pm$  2.1% (Fr. 6) and 93.2  $\pm$  4.5% (Fr. 7) were obtained already after 5 min at room temperature. After 30 min almost quantitative formation of the corresponding radioimmunoconjugate was achieved both at room temperature and 37  $^{\circ}\text{C}$  amounting 98.0  $\pm$  1.0% (Fr. 6, RT), 97.6  $\pm$  2.1% (Fr. 7, RT), 99.4  $\pm$  0.9% (Fr. 6, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) and 99.7  $\pm$  0.1% (Fr. 7, 37  $^{\circ}\text{C}$ ), respectively. After SEC purification, [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb was obtained with a radiochemical purity of > 99% and an apparent molar activity of 24.2 GBq/ $\mu\text{mol}$ .



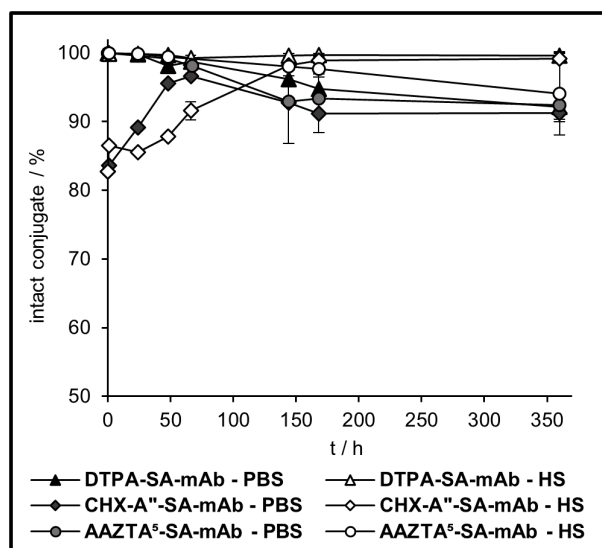
**Figure 9:** <sup>177</sup>Lu-labeling results after optimized SEC-purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, DOTA-SA-mAb, DTPA-*p*-Bn-SA-mAb and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb: radiolabeling efficiency ( $n = 3$ ) and representative radio-TLC results of the 6<sup>th</sup> SEC-fraction (A,C) and the twice SEC-purified fraction 7 (B,D), values displayed as mean  $\pm$  SD.

Finally, <sup>177</sup>Lu-labeling of the CHX-A''-DTPA-functionalized immunoconjugate led to comparable results to the radiolabeling experiment of unbound CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA. Both fraction 6 (139–439  $\mu$ g protein) and the twice purified fraction 7 (77–278  $\mu$ g protein) provided incomplete complexation of the radiometal resulting in significantly lower radiochemical yields compared to the AAZTA<sup>5</sup>- and DTPA-analogue at both temperatures. Initially, a rapid formation of the radiolabeled immunoconjugate could be observed yielding  $75.0 \pm 2.9\%$  (Fr. 6) and  $70.9 \pm 1.0\%$  (Fr. 7) at room temperature as well as  $71.6 \pm 0.3\%$  (Fr. 6) and  $73.0 \pm 0.5\%$  (Fr. 7) at 37 °C, respectively after 5 min. However, no or only a slight increase in radiochemical yields was found at both temperatures for both fractions in the further course of the reaction resulting in  $74.4 \pm 0.5\%$  (Fr. 6, RT),  $75.7 \pm 0.2\%$  (Fr. 7, RT),  $77.4 \pm 0.4\%$  (Fr. 6, 37 °C) and  $74.9 \pm 2.0\%$  (Fr. 7, 37 °C), respectively. After subsequent SEC purification, [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb was obtained with an apparent molar activity of 35.5 GBq/ $\mu$ mol and a radiochemical purity of  $82.8 \pm 0.8\%$  (determined via radio-TLC), which could not be further improved. As already mentioned, the lower labeling efficiency compared to the DTPA-functionalized protein is assumed to be due to the more rigid cyclohexyl backbone. Reaching a maximum result of approx. 74%

after 10 min, which could not be further increased, represents a clear disadvantage compared to the AAZTA<sup>5</sup>-analogue, which exhibited quantitative complexation throughout the reaction using the described mild radiolabeling conditions.

### ***In vitro* complex stability of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-bevacizumab, [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab and [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-bevacizumab**

The protein-bound <sup>177</sup>Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-complex indicated very high *in vitro* stability both in human serum and PBS over a period of at least 15 days. The complex remained completely stable (> 99%) within the first 48 h and in the following days only a minor amount of released radiometal could be observed resulting in 94.1 ± 6.0% and 92.4 ± 2.1% intact conjugate in human serum and PBS, respectively after more than two weeks. The <sup>177</sup>Lu-labeled DTPA-functionalized immunoconjugate provided similar results in PBS, as it remained stable within 24 h (> 99%) and showed only a slight instability in the further progress of the experiment with 92.2 ± 0.6% intact conjugate after 15 days. In human serum [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb revealed only a negligible amount of released radiometal over the entire duration (> 99% intact conjugate after 15 d). As already mentioned, TLC-determined radiochemical purity of [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb after SEC amounted approx. 83% (82.8 ± 0.4%). In the process of *in vitro* stability experiments, the proportion of protein-bound lutetium-177 continued to increase slowly both in human serum and PBS, i.e. the remaining unbound radiometal was apparently further complexed. While the value increased steadily in human serum up to 99.2 ± 0.7% after 15 days, in PBS a maximum of 96.6 ± 0.4 was reached after 3 days and a slight instability was observed afterwards leading to 91.2 ± 1.3% intact conjugate (Fig. 10). Apparently, both the DTPA- and CHX-A''-DTPA-functionalized proteins indicate high complex stability in combination with lutetium-177 *in vitro*. Possibly a significant difference in stability between AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb and the analogues bearing the linear chelator systems will become apparent in future *in vivo* experiments.



**Figure 10:** *In vitro* complex stability of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb and CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb in human serum and PBS within 15 d, *n* = 3: measured percentages of protein bound activity (radio-TLC) as a function of time starting from radiochemical purity after SEC purification, values displayed as mean ± SD.

## CONCLUSION

In the present study a novel AAZTA<sup>5</sup> squaramide ester was synthesized, evaluated and compared to DOTA-, DTPA- and CHX-A''-DTPA-functionalized analogues regarding its applicability as bifunctional chelator for radiolabeling of sensitive biomolecules such as antibodies with the theranostic radiometal lutetium-177 under mild conditions. Prior to evaluation of the corresponding immunoconjugates, the stand-alone bifunctional chelators were radiolabeled with lutetium-177 at neutral pH and both at room temperature and 37 °C. While labeling of DOTA-SA resulted in negligibly low yields even at slightly elevated temperatures (approx. 7% after 30 min), [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA achieved almost 70% RCY already after 3 min at room temperature. Radiolabeling of DTPA-*p*-Bn-SA revealed fast and high yielding complexation kinetics, however, the value of approx. 93% RCY after 30 min at RT represents the sum of at least two inseparable radiolabeled species. Formation of the more rigid [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA resulted in slightly lower radiochemical yields compared to the AAZTA<sup>5</sup> derivative (approx. 67% after 30 min at 37 °C).

SEC-purification and <sup>177</sup>Lu-labeling of the antibody-coupled AAZTA<sup>5</sup>-SA was evaluated and optimized within three approaches. In the first approach, radiolabeling of the combined protein-containing volumes already produced a radiochemical yield of > 63% at room temperature and > 79% at 37 °C after a short reaction time (15 min). The DOTA analogue, as expected, showed significantly lower complexation rates resulting in maximum 19.5% RCY after 60 min at 37 °C. Analysis of the radio-TLC results indicated the presence of a certain residue of unbound AAZTA<sup>5</sup>-SA leading to a radiolabeled sideproduct and therefore to reduced radiochemical yields of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb.

Thus, in a second approach the individual fractions after SEC-purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb were radiolabeled with lutetium-177 separately. It could be confirmed that with increasing elution volume a certain amount of excess unbound chelator is already present in the protein-containing fractions.

Hence, in a further approach, SEC-purification of the AAZTA<sup>5</sup>-modified protein was optimized via separate use of the pure immunoconjugate-fraction and via repeated SEC of the fraction containing a certain amount of excess unbound chelator. Successful separation of AAZTA<sup>5</sup>-SA could subsequently be confirmed via significantly improved <sup>177</sup>Lu-labeling and purity of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb already after short reaction times of 10–15 min (> 90% at 37 °C and > 85% at room temperature, respectively). After approx. 30 min almost quantitative yields could be achieved for both temperatures. In contrast, the analogously purified DOTA-conjugate provided only negligibly low complexation rates at both temperatures underlining its disadvantages over the AAZTA<sup>5</sup> system. Formation of [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-SA-mAb indicated fast radiolabeling kinetics both at RT and 37 °C providing yields of 93–94% already after a short time and quantitative complexation in the further progress of the reaction. The CHX-A''-DTPA-functionalized analogue showed fast but incomplete <sup>177</sup>Lu-labeling reaching a maximum radiochemical yield of approx. 74% after 10 min. The protein-bound AAZTA<sup>5</sup>-SA therefore offers clear advantages not only over DOTA-SA-mAb but also over the CHX-A''-DTPA-functionalized analogue, despite a significantly lower number of bound chelator moieties per protein and even though it did not show as fast radiolabeling kinetics as DTPA-*p*-Bn-SA-mAb.

While these labeling studies successfully verified the potency of the AAZTA<sup>5</sup>-SA moiety for fast and almost quantitative <sup>177</sup>Lu-coordination, the *in vitro* stability of the protein bound complex was investigated as second aspect. Indeed, [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb appeared to be very stable both in human serum and PBS at 37 °C over a long period of more than two weeks (> 94% and > 92%, respec-



tively). During the same period [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb and [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-CHX-A"-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb provided similar to even slightly higher stability in both media.

The results of this study show the high potential of the novel AAZTA<sup>5</sup> squaramide ester as bifunctional chelator system for mild radiolabeling of sensitive target vectors such as antibodies with lutetium-177. It therefore represents a promising tool for formation of radioimmunoconjugates that can be used for diagnostic and therapeutic applications as well as for simultaneous imaging of the therapeutic progress. Furthermore, we expect these properties to be also transferable to applications with various other target vectors, e.g. those based on small molecules, peptides or polymeric structures.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank [REDACTED] for measurements of protein concentrations and ITG (Garching, Germany) for the provision of n.c.a. lutetium-177. The authors are also very grateful to the Collaborative Research Center SFB 1066 of the German Research Foundation (DFG) for its support.

## **Funding information**

No specific funding was received.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Ethical approval**

Not applicable.

## REFERENCES

- [1] Cai HH. Risk evaluation and mitigation strategy for approved therapeutic antibodies. *MOJ Immunol* 2014;1.
- [2] Cai HH. Therapeutic monoclonal antibodies approved by FDA in 2015. *MOJ Immunol* 2016;3.
- [3] Cai HH. Therapeutic monoclonal antibodies approved by FDA in 2016. *MOJ Immunol* 2017;5.
- [4] Cai HH. Therapeutic monoclonal antibodies approved by FDA in 2017. *MOJ Immunol* 2018;6.
- [5] Mullard A. 2018 FDA drug approvals. *Nat Rev* 2019;18:85–9.
- [6] Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep* 2018;45:2935–40.
- [7] Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *MAbs* 2020;12.
- [8] Abramowicz D, Schandene L, Goldman M, Crusiaux A, Vereerstraeten P, De Pauw L, et al. Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1989;47:606–8.
- [9] Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol* 2007;34:757–78.
- [10] Richter WS, Ivancevic V, Meller J, Lang O, Le Guludec D, Szilvazi I, et al. <sup>99m</sup>Tc-besilesomab (Scintimun®) in peripheral osteomyelitis: comparison with <sup>99m</sup>Tc-labelled white blood cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:899–910.
- [11] Bohdiewicz PJ. Indium-111 satumomab pentetide: The first FDA-approved monoclonal antibody for tumor imaging. *J Nucl Med Technol* 1998;26:155–63.
- [12] Quigley A-M, Gnanasegaran G, Buscombe JR, Hilson AJW. Technetium-99m-labelled sulesomab (LeukoScan) in the evaluation of soft tissue infections. *Med Princ Pract* 2008;17:447–52.
- [13] Moffat FL, Pinsky CM, Hammershaimb L, Petrelli NJ, Patt YZ, Whaley FS, et al. Clinical utility of external immunoscintigraphy with the IMMU-4 technetium-99m Fab' antibody fragment in patients undergoing surgery for carcinoma of the colon and rectum: results of a pivotal, phase III trial. *J Clin Oncol* 1996;14:2295–305.
- [14] Taneja SS. ProstaScint(R) scan: contemporary use in clinical practice. *Rev Urol* 2004;6:S19-28.
- [15] Rizvi T, Deng C, Rehm P. Indium-111 capromab pentetide (ProstaScint®) demonstrates renal cell carcinoma and aortocaval nodal metastases from prostate adenocarcinoma. *World J Nucl Med* 2015;14:209.
- [16] Breitz HB, Tyler A, Bjorn MJ, Lesley T, Weiden PL. Clinical experience with Tc-99m nofetumomab merpentan (Verluma) radioimmunoscintigraphy. *Clin Nucl Med* 1997;22:615–20.
- [17] Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy* 2011;3:349–70.
- [18] Kawashima H. Radioimmunotherapy: a specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies. *Sci World J* 2014;2014:1–10.
- [19] Yeong C, Cheng M, Ng K. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *J Zhejiang Univ Sci B* 2014;15:845–63.

- [20] Barbet J, Bardiès M, Bourgeois M, Chatal J-F, Chérel M, Davodeau F, et al. Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. In: Chames P, editor. *Methods Mol. Biol.*, vol. 907. 2nd ed., Springer; 2012, p. 681–97.
- [21] Moek KL, Giesen D, Kok IC, de Groot DJA, Jalving M, Fehrmann RSN, et al. Theranostics using antibodies and antibody-related therapeutics. *J Nucl Med* 2017;58:835-90S.
- [22] Barbet J, Chatal J-F, Kraeber-Bodéré F. Les anticorps radiomarqués pour le traitement des cancers. *Médecine/Sciences* 2009;25:1039–45.
- [23] Boros E, Holland JP. Chemical aspects of metal ion chelation in the synthesis and application antibody-based radiotracers. *J Label Compd Radiopharm* 2018;61:652–71.
- [24] Repetto-Llamazares A, Abbas N, Bruland ØS, Dahle J, Larsen RH. Advantage of lutetium-177 versus radioiodine immunoconjugate in targeted radionuclide therapy of B-cell tumors. *Anticancer Res* 2014;34:3263–9.
- [25] Stein R, Govindan S V., Mattes MJ, Chen S, Reed L, Newsome G, et al. Improved iodine radiolabels for monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* 2003;63:111–8.
- [26] Dash A, Pillai MRA, Knapp FF. Production of <sup>177</sup>Lu for targeted radionuclide therapy: available options. *Nucl Med Mol Imaging* (2010) 2015;49:85–107.
- [27] Forrer F, Uusijärvi H, Storch D, Maecke HR, Mueller-Brand J. Treatment with <sup>177</sup>Lu-DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with <sup>90</sup>Y-DOTATOC. *J Nucl Med* 2005;46:1310–6.
- [28] Demirci E, Kabasakal L, Toklu T, Ocak M, Şahin OE, Alan-Selcuk N, et al. <sup>177</sup>Lu-DOTATATE therapy in patients with neuroendocrine tumours including high-grade (WHO G3) neuroendocrine tumours: response to treatment and long-term survival update. *Nucl Med Commun* 2018;39:789–96.
- [29] Kasi PM, Sharma A, Jain MK. Expanding the indication for novel theranostic <sup>177</sup>Lu-Dotatate peptide receptor radionuclide therapy: proof-of-concept of PRRT in Merkel cell cancer. *Case Rep Oncol* 2019;12:98–103.
- [30] Bodei L, Kidd M, Prasad V, Modlin IM. Peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumors. *Front Horm Res* 2015;44:198–215.
- [31] Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 2014;43:260–90.
- [32] Price EW, Edwards KJ, Carnazza KE, Carlin SD, Zeglis BM, Adam MJ, et al. A comparative evaluation of the chelators H<sub>4</sub>octapa and CHX-A''-DTPA with the therapeutic radiometal <sup>90</sup>Y. *Nucl Med Biol* 2016;43:566–76.
- [33] Koppe MJ, Bleichrodt RP, Soede AC, Verhofstad AA, Goldenberg DM, Oyen WJG, et al. Biodistribution and therapeutic efficacy of <sup>125/131</sup>I-, <sup>186</sup>Re-, <sup>88/90</sup>Y-, or <sup>177</sup>Lu-labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin. *J Nucl Med* 2004;45:1224–32.
- [34] Stimmel JB, Kull FC. Samarium-153 and Lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. *Nucl Med Biol* 1998;25:117–25.
- [35] Milenic DE, Garmestani K, Chappell LL, Dadachova E, Yordanov A, Ma D, et al. *In vivo* comparison of macrocyclic and acyclic ligands for radiolabeling of monoclonal antibodies with <sup>177</sup>Lu for radioimmunotherapeutic applications. *Nucl Med Biol* 2002;29:431–42.

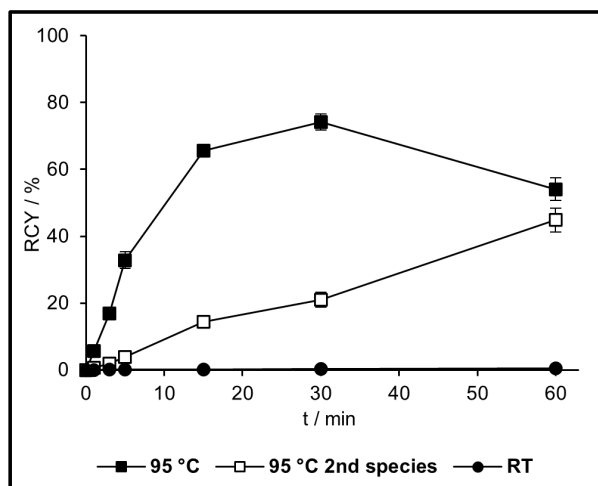
- [36] Hens M, Vaidyanathan G, Zhao XG, Bigner DD, Zalutsky MR. Anti-EGFRvIII monoclonal antibody armed with  $^{177}\text{Lu}$ : *in vivo* comparison of macrocyclic and acyclic ligands. *Nucl Med Biol* 2010;37:741–50.
- [37] Breeman WAP, De Jong M, Visser TJ, Erion JL, Krenning EP. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$  at high specific activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:917–20.
- [38] Tóth E, Brücher E. Stability constants of the lanthanide(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane- $N,N',N'',N'''$ -tetraacetate complexes. *Inorganica Chim Acta* 1994;221:165–7.
- [39] Kodama M, Koike T, Mahatma AB, Kimura E. Thermodynamic and kinetic studies of lanthanide complexes of 1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadecane- $N,N',N'',N''',N''''$ -pentaacetic acid and 1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecane- $N,N',N'',N''',N''''$ -hexaacetic acid. *Inorg Chem* 1991;30:1270–3.
- [40] Price EW, Zeglis BM, Cawthray JF, Ramogida CF, Ramos N, Lewis JS, et al.  $\text{H}_4\text{octa}$ -trastuzumab: versatile acyclic chelate system for  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$  imaging and therapy. *J Am Chem Soc* 2013;135:12707–21.
- [41] Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Brechbiel MW, Wu C, Pai LH, et al. Comparative biodistribution of indium- and yttrium-labeled B3 monoclonal antibody conjugated to either 2-(*p*-SCN-Bz)-6-methyl-DTPA (1 B4M-DTPA) or 2-(*p*-SCN-Bz)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (2B-DOTA). *Eur J Nucl Med* 1994;21:640–6.
- [42] Blower PJ, Lewis JS, Zweit J. Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Nucl Med Biol* 1996;23:957–80.
- [43] Clarke ET, Martell AE. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles. *Inorganica Chim Acta* 1991;190:37–46.
- [44] Liu S, Pietryka J, Ellars CE, Edwards DS. Comparison of yttrium and indium complexes of DOTA-BA and DOTA-MBA: models for  $^{90}\text{Y}$ - and  $^{111}\text{In}$ -labeled DOTA-biomolecule conjugates. *Bioconjug Chem* 2002;13:902–13.
- [45] Stimmel JB, Stockstill ME, Kull FC. Yttrium-90 chelation properties of tetraazatetraacetic acid macrocycles, diethylenetriaminepentaacetic acid analogs, and a novel terpyridine acyclic chelator. *Bioconjug Chem* 1995;6:219–25.
- [46] Broan CJ, Cox JPL, Craig AS, Katakly R, Parker D, Harrison A, et al. Structure and solution stability of indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononanetriacetate and of yttrium complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetraacetate and related ligands: kinetically stable complexes for use in imaging and radioimmunotherapy. X-ray molecular structure of the indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1991;53:87–99.
- [47] Ballangrud ÅM, Yang WH, Palm S, Enmon R, Borchardt PE, Pellegrini VA, et al. Alpha-particle emitting atomic generator (actinium-225)-labeled trastuzumab (Herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:4489–97.
- [48] Banerjee S, Pillai MRA, Knapp FF. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chem Rev* 2015;115:2934–74.
- [49] Garrison WM. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev* 1987;87:381–98.

- [51] Hermanto S, Haryuni RD, Ramli M, Mutalib A, Hudiyo S. Synthesis and stability test of radioimmunoconjugate  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-F(ab')<sub>2</sub>-trastuzumab for theranostic agent of HER2 positive breast cancer. *J Radiat Res Appl Sci* 2016;9:441–8.
- [52] Fortin MA, Orlova A, Malmström PU, Tolmachev V. Labelling chemistry and characterization of [ $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ ]-DOTA-Z<sub>HER2:342</sub>-3 affibody molecule, a candidate agent for locoregional treatment of urinary bladder carcinoma. *Int J Mol Med* 2007;19:285–91.
- [53] Orlova A, Jonsson A, Rosik D, Lundqvist H, Lindborg M, Abrahmsen L, et al. Site-specific radiometal labeling and improved biodistribution using ABY-027, a novel HER2-targeting affibody molecule-albumin-binding domain fusion protein. *J Nucl Med* 2013;54:961–8.
- [54] Thakral P, Singla S, Yadav MP, Vasisht A, Sharma A, Gupta SK, et al. An approach for conjugation of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-SCN-rituximab (Biosim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non Hodgkins lymphoma patients. *Indian J Med Res* 2014;139:544–54.
- [55] Wojdowska W, Karczmarczyk U, Maurin M, Garnuszek P, Mikolajczak R. Standardization of procedures for the preparation of  $^{177}\text{Lu}$ - and  $^{90}\text{Y}$ -labeled DOTA-rituximab based on the freeze-dried kit formulation. *Curr Radiopharm* 2015;8:62–8.
- [56] Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Johari Daha F. Synthesis and biodistribution studies of  $^{177}\text{Lu}$ -trastuzumab as a therapeutic agent in the breast cancer mice model. *J Label Compd Radiopharm* 2010;53:575–9.
- [57] Pfister J, Summer D, Rangger C, Petrik M, von Guggenberg E, Minazzi P, et al. Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. *EJNMMI Res* 2015;5:74.
- [58] Baranyai Z, Uggeri F, Giovenzana GB, Bényei A, Brücher E, Aime S. Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids(III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. *Chem - A Eur J* 2009;15:1696–705.
- [59] Nagy G, Szikra D, Trencsényi G, Fekete A, Garai I, Giani AM, et al. AAZTA: an ideal chelating agent for the development of  $^{44}\text{Sc}$  PET imaging agents. *Angew Chemie Int Ed* 2017;56:2118–22.
- [60] Lattuada L, Barge A, Cravotto G, Giovenzana GB, Teid L, Tei L. The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem Soc Rev* 2011;40:3019–49.
- [61] Sinnes J, Nagel J, Rösch F. AAZTA<sup>5</sup>/AAZTA<sup>5</sup>-TOC: synthesis and radiochemical evaluation with  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{177}\text{Lu}$ . *EJNMMI Radiopharm Chem* 2019;4:18.
- [62] Greifenstein L, Grus T, Nagel J, Sinnes JP, Rösch F. Synthesis and labeling of a squaric acid containing PSMA-inhibitor coupled to AAZTA<sup>5</sup> for versatile labeling with  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{177}\text{Lu}$ . *Appl Radiat Isot* 2020;156:108867.
- [63] Aime S, Calabi L, Cavallotti C, Gianolio E, Giovenzana GB, Losi P, et al. [Gd-AAZTA]: a new structural entry for an improved generation of MRI contrast agents. *Inorg Chem* 2004;43:7588–90.
- [64] Waldron BP, Parker D, Burchardt C, Yufit DS, Zimny M, Roesch F. Structure and stability of hexadentate complexes of ligands based on AAZTA for efficient PET labelling with gallium-68. *Chem Commun* 2013;49:579–81.
- [65] Manzoni L, Belvisi L, Arosio D, Bartolomeo MP, Bianchi A, Brioschi C, et al. Synthesis of Gd and  $^{68}\text{Ga}$  complexes in conjugation with a conformationally optimized RGD sequence as potential MRI and PET tumor-imaging probes. *ChemMedChem* 2012;7:1084–93.

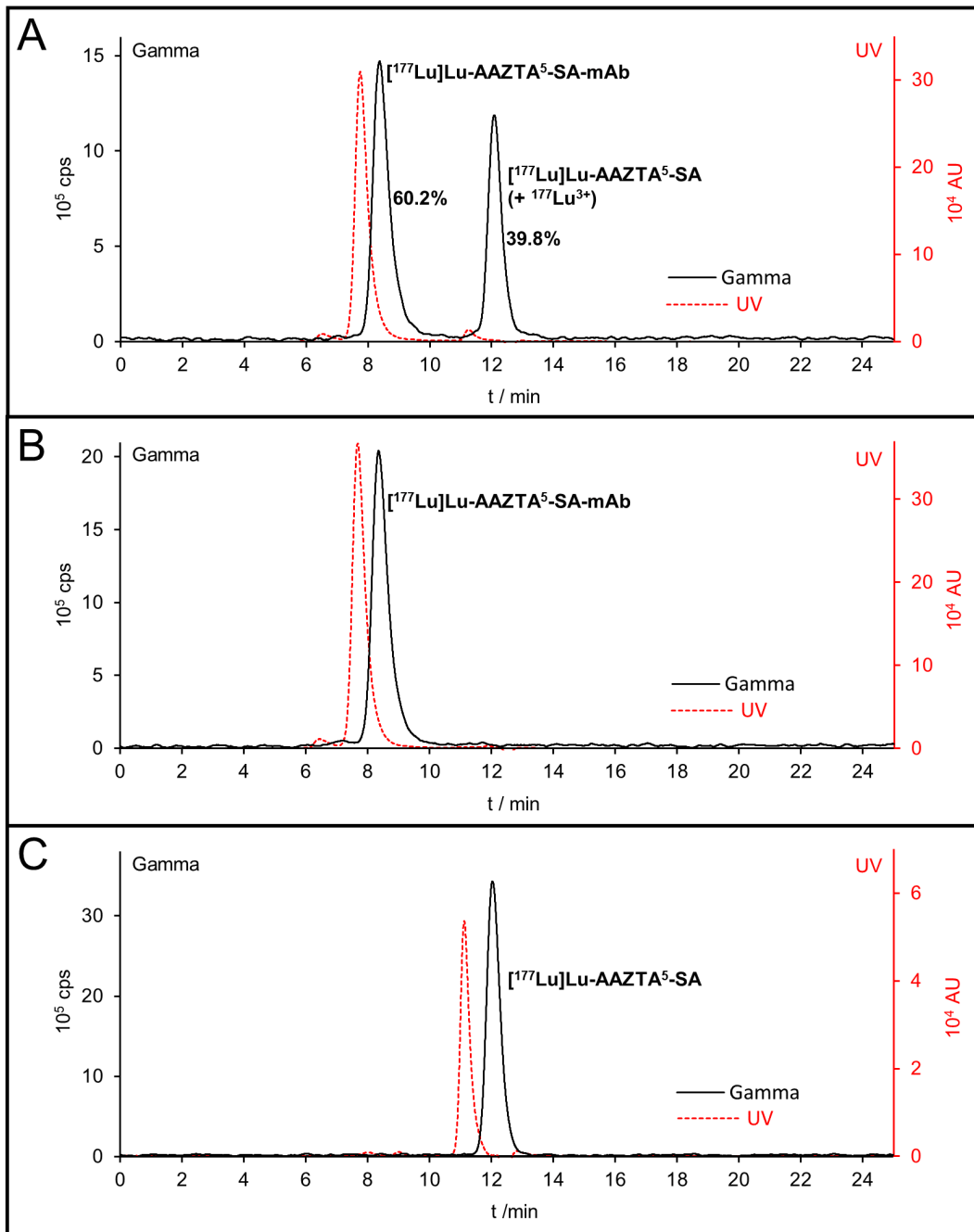
- [66] Wurm FR, Klok H-A. Be squared: expanding the horizon of squaric acid-mediated conjugations. *Chem Soc Rev* 2013;42:8220.
- [67] Tietze LF, Arlt M, Beller M, Glüsenkamp K, Jähde E, Rajewsky MF, et al. Squaric acid diethyl ester: a new coupling reagent for the formation of drug biopolymer conjugates. Synthesis of squaric acid ester amides and diamides. *Chem Ber* 1991;124:1215–21.
- [68] Rudd SE, Roselt P, Cullinane C, Hicks RJ, Donnelly PS. A desferrioxamine B squaramide ester for the incorporation of zirconium-89 into antibodies. *Chem Commun* 2016;52:11889–92.
- [69] Parker D, Waldron BP. Conformational analysis and synthetic approaches to polydentate perhydro-diazepine ligands for the complexation of gallium(III). *Org Biomol Chem* 2013;11:2827.

## SUPPORTING INFORMATION

### Figures

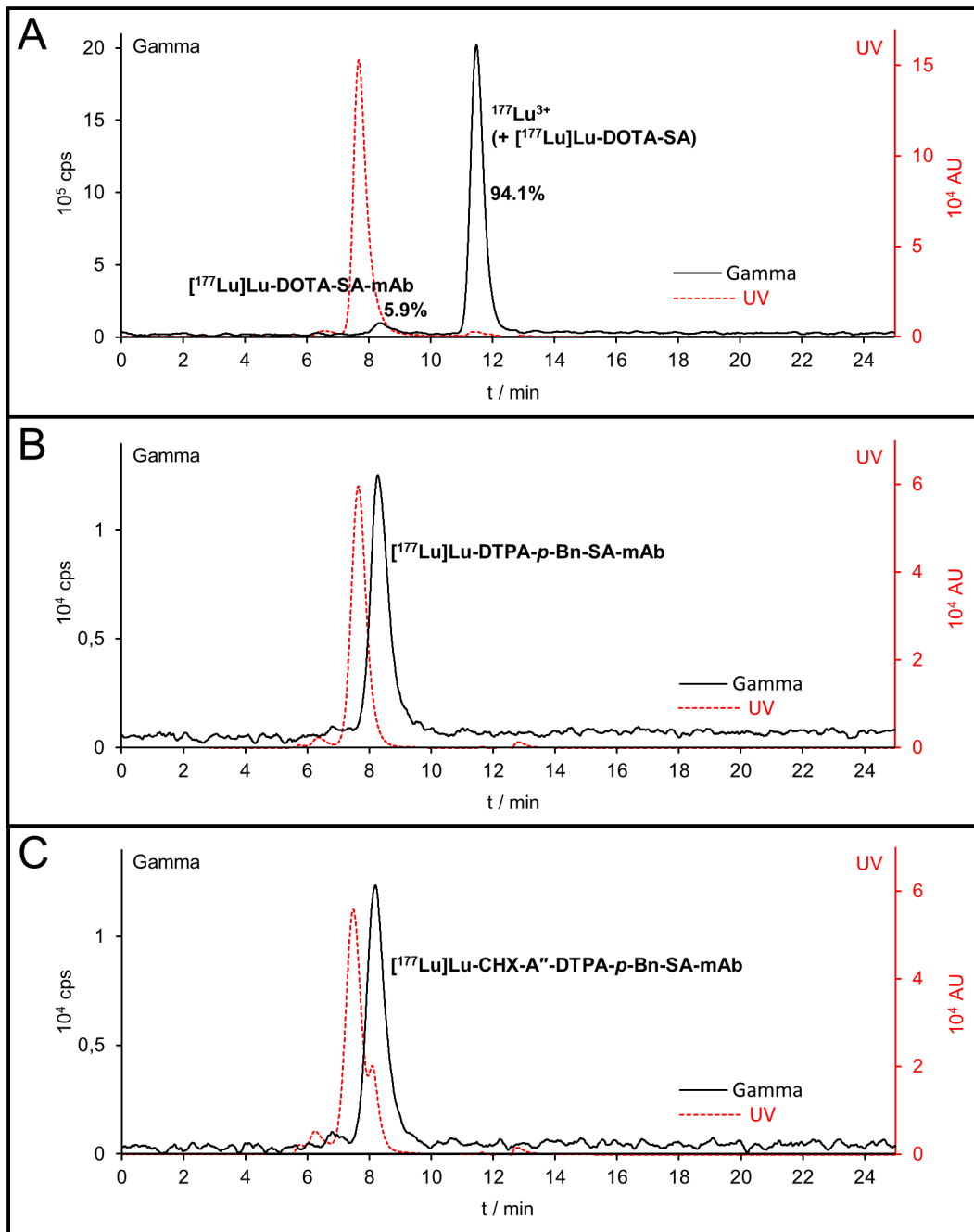


**Figure S1:** Radiolabeling results of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTA-SA in 1 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ -buffer (pH 5.5) at room temperature and 95 °C,  $n = 3$ , values displayed as mean  $\pm$  SD.



**Figure S2:** SEC-HPLC chromatograms displaying the results of the first labeling approach of  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-AAZTA}^5\text{-SA-mAb}$  prior (A) and after (B) SEC-purification as well as of unbound  $^{177}\text{Lu}$ -labeled AAZTA<sup>5</sup>-SA chelator (C), shift between UV (280 nm) and radio signals is due to the dead volume between the two consecutive measurements.





**Figure S3:** SEC-HPLC chromatograms displaying the results of the first labeling approach of  $^{177}\text{Lu}$ )Lu-DOTA-SA-mAb (A) as well as of SEC-purified  $^{177}\text{Lu}$ )Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb (B) and  $^{177}\text{Lu}$ )Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb (C), shift between UV (280 nm) and radio signals is due to the dead volume between the two consecutive measurements.

### 5.3.1 Ergänzende Ergebnisse zu Teilprojekt C

In Teilprojekt C wurden die hergestellten Immunkonjugate AAZTA<sup>5</sup>-SA-Bevacizumab, DTPA-*p*-Bn-SA-Bevacizumab und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-Bevacizumab hinsichtlich der Anzahl gebundener Chelatoreinheiten pro Antikörper (CAR) mittels Isotopenverdünnungsanalyse (IVA) untersucht. Hierfür wurden Lösungen der Immunkonjugate mit einem variierenden, exakt bekannten molaren Überschuss von natürlichem Lutetium(III) ([<sup>nat</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O), „gespiked“ mit 1 MBq [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub>, inkubiert. Für die Komplexierung wurden die gleichen Reaktionsbedingungen gewählt wie bei den eigentlichen Markierungsexperimenten mit <sup>177</sup>Lu (pH 7, Raumtemperatur, 90 min). Nach Abschluss der Reaktion wurde der Anteil Protein-gebundener Aktivität und damit auch gleichzeitig der Anteil des komplexierten <sup>nat</sup>Lu jeweils mittels Radio-TLC bestimmt. Der CAR-Wert wurde anschließend folgendermaßen berechnet:

$$CAR^{IVA} = \frac{\%RCU \text{ (gebundene Aktivität)}}{100} \cdot \frac{n([\text{natLu}]LuCl_3)}{n(\text{mAb-Konjugat})}$$

Für AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb wurde eine Anzahl von 0,29 ± 0,04 durchschnittlich pro Protein gebundener Chelatoreinheiten bestimmt. Dieser Wert ist einerseits niedrig genug, um davon auszugehen, dass die Affinität des Antikörpers durch die Modifikation nicht signifikant beeinträchtigt wird. Wie die exzellenten Ergebnisse von Teilprojekt C (Kapitel 5.3) zeigen, ist die Anzahl andererseits jedoch ausreichend um eine nahezu quantitative <sup>177</sup>Lu-Markierung bei milden Bedingungen selbst unter Verwendung vergleichsweise geringer Mengen des Immunkonjugats zu gewährleisten. Für die Konjugate DTPA-*p*-Bn-SA-mAb und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb wurden trotz identischer Kopplungsstrategie und Bedingungen deutlich höhere Werte von 5,38 ± 2,69 bzw. 6,06 ± 2,46 erhalten. Diese große Differenz lässt sich zwar teilweise durch Unterschiede in der sterischen Anforderung, Flexibilität und Zugänglichkeit zwischen den linearen DTPA-Derivaten und dem starrereren AAZTA<sup>5</sup>-SA-System erklären (vgl. Kapitel 5.3). Dennoch scheint der CAR-Wert von AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb viel niedriger zu sein als erwartet, insbesondere im Hinblick auf den großen molaren Überschuss des Chelators (10 Äquivalente) bei der Konjugation. Aufgrund seiner mangelnden Fähigkeit, ausreichend hohe Mengen des Lutetiums bei den hier verwendeten Bedingungen zu komplexieren, konnte für das ebenfalls untersuchte, Protein-gebundene DOTA-SA außerdem kein CAR-Wert mittels IVA bestimmt werden.

Aufgrund dessen wurden sämtliche Chelator-Bevacizumab-Konjugate zur weiteren Analyse bzw. zur Überprüfung der erhaltenen Werte erneut auf identische Weise hergestellt und mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch untersucht. Hierfür wurden die Lösungen der aufgereinigten Immunkonjugate zunächst entsalzt, lyophilisiert und anschließend mit Acetonitril/Wasser (1:1) + 0,1 % TFA versetzt. Die erhaltene Mischung wurde zusammen mit Sinapinsäure-basierter Matrixlösung auf die MALDI-Zielplatte aufgetragen, an der Luft getrocknet und im linear-positiven Modus analysiert. Zum Vergleich wurde unmodifiziertes Bevacizumab analog vorbereitet und vermessen. Die erhaltenen Molekulargewichte wurden verwendet um die durchschnittliche Anzahl konjugierter Chelatoreinheiten pro Antikörper folgendermaßen zu berechnen:

$$CAR^{MS} = \frac{MW_{\text{Konj}} - MW_{\text{mAb}}}{MW_{\text{Chel}}}$$

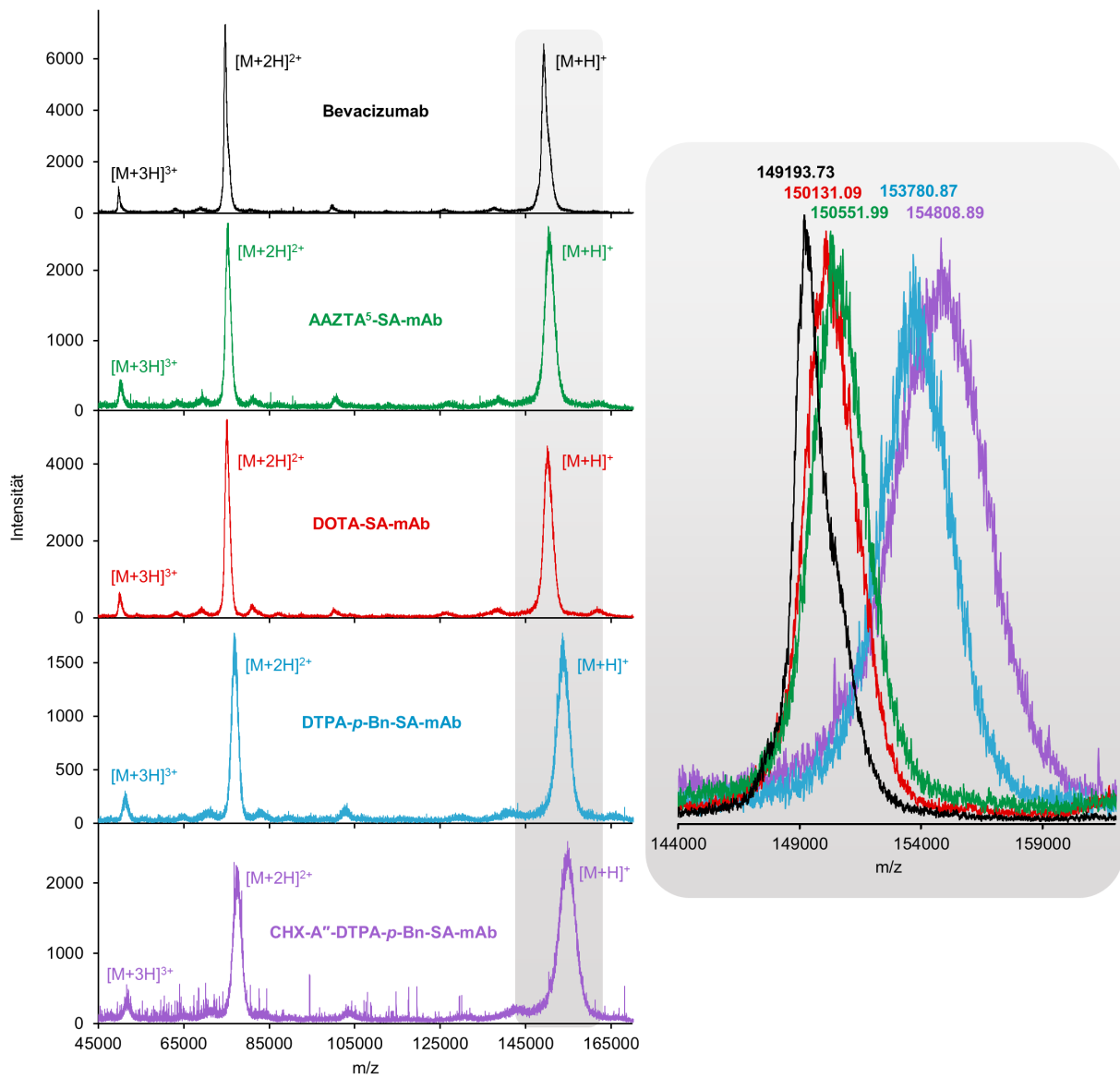
mit  $MW_{\text{Konj}}$  = durchschnittliches Molekulargewicht des entsprechenden Immunkonjugats,  $MW_{\text{mAb}}$  = gemessenes Molekulargewicht von unmodifiziertem Bevacizumab,  $MW_{\text{Chel}}$  = Massenzunahme pro konjugierter Chelatoreinheit.

Abbildung 37 zeigt die erhaltenen Massenspektren und einen vergrößerten Ausschnitt des relevanten Massenbereichs von AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, DOTA-SA-mAb, DTPA-*p*-Bn-SA-mAb, CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb sowie des unmodifizierten Antikörpers. In Tabelle 4 sind außerdem die berechneten CAR-Werte ( $\text{CAR}^{\text{MS}}$ ) aufgelistet und den zuvor ermittelten Werten ( $\text{CAR}^{\text{IVA}}$ ) gegenübergestellt.

**Tabelle 4:** Gemessene durchschnittliche Molekulargewichte, Differenzen zum unmodifizierten Antikörper und berechnete Chelator-zu-Antikörper Verhältnisse ( $\text{CAR}^{\text{MS}}$ ) von AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, DOTA-SA-mAb, DTPA-*p*-Bn-SA-mAb und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb. Zum Vergleich sind außerdem die mittels Isotopenverdünnungsanalyse bestimmten CAR-Werte ( $\text{CAR}^{\text{IVA}}$ ) aufgeführt.

Antikörper / Konjugat	Gemessene Masse (Da)	Differenz (Da)	Zunahme pro Chelator (Da)	$\text{CAR}^{\text{MS}}$	$\text{CAR}^{\text{IVA}}$
Bevacizumab	149192,73	–	–	–	–
AAZTA <sup>5</sup> -SA-mAb	150550,99	1358,26	567,22	2,39	0,29 ± 0,04
DOTA-SA-mAb	150130,09	937,36	524,22	1,79	–
DTPA- <i>p</i> -Bn-SA-mAb	153779,87	4587,14	576,17	7,96	5,38 ± 2,69
CHX-A''-DTPA- <i>p</i> -Bn-SA-mAb	154807,89	5615,16	630,22	8,91	6,06 ± 2,46

Die massenspektrometrisch ermittelte Anzahl pro Antikörper gebundener AAZTA<sup>5</sup>-SA Einheiten ist mit 2,39 signifikant höher (ca. um den Faktor 8) als der zuvor mittels IVA erhaltene Wert. Auch im Falle der DTPA- bzw. CHX-A''-DTPA-funktionalisierten Immunkonjugate wurde mit 7,96 bzw. 8,91 ein höherer CAR-Wert erhalten. DOTA-SA-mAb zeigte mit 1,79 die niedrigste Anzahl gebundener Chelatoreinheiten. Insgesamt konnte also (insbesondere bei AAZTA<sup>5</sup>-SA) eine große Abweichung zwischen beiden unterschiedlichen Bestimmungsmethoden beobachtet werden. Für die MALDI-TOF Messung wurde jeweils ein neuer Ansatz zur Konjugation des entsprechenden Chelators an das Protein durchgeführt. Eine gewisse Beeinflussung der Ergebnisse durch die Reproduzierbarkeit dieser Kopplungsreaktion ist daher zwar nicht ganz auszuschließen, da in allen Fällen jedoch eine ähnliche Erhöhung des Werts um ca. 2–3 Einheiten zu beobachten war, basiert die Abweichung vermutlich eher auf einer systematischen Ungenauigkeit einer der beiden Methoden. In Anbetracht der zur Konjugation eingesetzten Menge des AAZTA<sup>5</sup>-SA-Chelators entspricht der Wert von 2,39 deutlich mehr den Erwartungen. Die massenspektrometrisch ermittelten CAR-Werte aller untersuchten Immunkonjugate liegen zudem in der gleichen Größenordnung. Im folgenden Teilprojekt D wurde der (TA)MUC1-spezifische Antikörper GGSK-1/30 auf gleiche Weise mit AAZTA<sup>5</sup>-SA funktionalisiert und mittels MALDI-TOF massenspektrometrisch untersucht. Es konnte eine nahezu identische Anzahl Protein-gebundener Chelatoreinheiten von durchschnittlich 2,44 erhalten werden, was demnach auf eine hohe Reproduzierbarkeit der Quadratsäure-basierten Kopplungsstrategie schließen lässt. Außerdem konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass diese Anzahl keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Antikörpers hat.



**Abbildung 37:** MALDI-TOF Massenspektren von unmodifiziertem Bevacizumab, AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, DOTA-SA-mAb, DTPA-p-Bn-SA-mAb und CHX-A''-DTPA-p-Bn-SA-mAb.

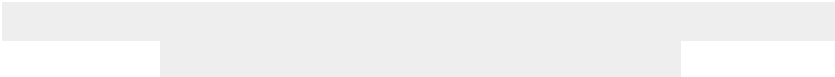
**5.4 Teilprojekt D: *<sup>177</sup>Lu-labeling, in vitro and in vivo evaluation of a highly potential, AAZTA<sup>5</sup>-squaramide functionalized anti-hu(TA)MUC1 antibody: a promising approach for radioimmunotherapy of breast cancer***



**<sup>177</sup>Lu-labeling, *in vitro* and *in vivo* evaluation of a highly potential, AAZTA<sup>5</sup>-squaramide functionalized anti-hu(TA)MUC1 antibody: a promising approach for radioimmunotherapy of breast cancer**

Benedikt Klasen<sup>1\*</sup>, 

<sup>1</sup>*Department of Chemistry – TRIGA site, Johannes Gutenberg University Mainz, Fritz-Strassmann Weg 2, D-55128 Mainz, Germany*



*\*equal contribution*

*<sup>§</sup>joint senior authorship*

## ABSTRACT

**Introduction:** Breast cancer has recently become the most frequent type of cancer worldwide and still represents one of the most common causes of death among women. Tumor-associated mucin1 ((TA)MUC1) is expressed on more than 90% of all breast tumors and differs strongly from mucin1 on healthy epithelial cells thus representing a promising target for innovative diagnostic and therapeutic concepts. We herein present the preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of a novel radio-immunoconjugate based on the (TA)MUC1-specific monoclonal antibody GGSK-1/30 being functionalized with AAZTA<sup>5</sup>-squaramide and radiolabeled with the therapeutic radionuclide lutetium-177.

**Methods:** A squaramide-functionalized derivative of AAZTA<sup>5</sup> was synthesized, coupled to the GGSK-1/30 antibody and subsequently radiolabeled with lutetium-177 at mild temperatures and neutral pH. The resulting [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 was investigated *in vitro* regarding complex stability and binding to murine and human cancer cells of different (TA)MUC1 expression. Furthermore, the radio-immunoconjugate was administered to mice bearing either PyMTxhuMUC1 or PyMT tumors and *ex vivo* biodistribution was determined at different times post injection.

**Results:** <sup>177</sup>Lu-labeling of AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 at mild conditions led to radiochemical conversions (RCC) of up to > 86% and the resulting radioimmunoconjugate could be obtained with radiochemical purities of > 95% and apparent molar activities of 4–29 GBq/μmol. While [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 revealed very high *in vitro* complex stability in formulation medium still accounting for > 92% protein-bound activity after 14 days, a small but steady release of the radiometal was observed in human serum. The radioimmunoconjugate showed distinct binding to both human T47D carcinoma cells and self-generated transgenic murine PyMTxhuMUC1 breast cancer cells with maximum values of approx. 38% and 34% bound activity, respectively. *Ex vivo* biodistribution in PyMTxhuMUC1 tumor bearing mice indicated extraordinarily high and increasing tumor accumulation accounting for > 40% ID/g and > 80% ID/g after 24 h and 7 days, respectively. Significantly lower uptake in PyMT tumors confirmed the high specificity of the conjugate to hu(TA)MUC1.

**Conclusion:** Providing high yielding and sufficiently stable <sup>177</sup>Lu-labeling at mild conditions, distinct *in vitro* binding to (TA)MUC1 expressing cells as well as highly selective tumor accumulation *in vivo*, [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 represents a promising tool for future radioimmunotherapeutic treatment of breast cancer.

**Keywords:** Lutetium-177, MUC1, Breast cancer, Radioimmunotherapy, Antibody, AAZTA



## BACKGROUND

Accounting for 11.7% of newly diagnosed incidences, female breast cancer has recently become the most common type of cancer worldwide and still represents one of the most common causes of death among women [1]. The disease is typically detected either in early stages via routine X-ray (mammography) or ultrasound (mammasonography) screening, or in progressed stages by palpation of malignant lumps in the breast [2]. For a more precise diagnosis, prognosis and classification in possible therapeutic options, breast tissue is resected via biopsy or surgery and analyzed immunohistochemically (IHC) for the expression of various tumor-associated markers. Typical and well-established IHC markers for breast cancer subtyping are estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [3–5]. Depending on the presence of these biomarkers, breast tumors are categorized into the following four basic subgroups: [HR<sup>+</sup>/HER2<sup>+</sup>], [HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>], [HR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>] and [HR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>] with ER and PR being grouped together as hormone receptors (HR) and HR<sup>+</sup> representing positivity of at least one of ER and PR. HR negative tumors, especially [HR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>], also named triple negative breast cancer (TNBC), typically provide the worst prognosis due to poor differentiation, high aggressiveness and less therapy options [3,5]. However, the varying occurrence of these and other characteristics amongst patients causes this disease to be very heterogenous and classification to be often very difficult. Treatment of non-metastatic breast cancer usually includes surgical resection of malignant tissue and possibly affected lymph nodes in combination with post-operative radiation and neoadjuvant (pre-operative) and/or adjuvant (post-operative) systemic therapy. Depending on the tumor subtype, either endocrine, antibody-based or chemotherapeutic treatment or combinations thereof are used as standard options [6]. The estrogen receptor modulator tamoxifen and aromatase inhibitors such as anastrozole, exemestane and letrozole represent typical endocrine therapeutics for (neo-)adjuvant treatment of [HR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>] tumors [6–10]. Representing one of the greatest developments in breast cancer management, the monoclonal antibody trastuzumab targets the extracellular domain of HER2 and is effectively used for treatment of tumors amplifying or overexpressing this oncogene [6,11–14]. Despite many known side effects and risks, chemotherapy including typical cytotoxic agents such as docetaxel, cyclophosphamide, adriamycin, paclitaxel or carboplatin remains an important and most frequently used systemic treatment option for basically all types of breast cancer and to date still represents the single effective and approved option for nonmetastatic triple negative tumors [6,15–19].

Due to the heterogeneous distribution of these biomarkers among all breast cancer cases, prognosis and assessment of the therapeutic success of different treatment options often lacks accuracy and reliability. Therefore, current research has been concerned for many years with the discovery and development of additional breast cancer-related structures, that not only ensure more precise prediction of responsiveness to available therapeutic opportunities, but also represent potential targets for innovative therapy concepts. Tumor-associated mucin1 ((TA)MUC1) is a promising marker being able to meet these requirements and thus to address a still great clinical demand concerning breast cancer management [20–27]. This antigen is expressed on more than 90% of all breast tumors and even 94% of triple negative cases show (TA)MUC1 positivity, in contrast to the complete absence of the standardly used receptors ER, PR and HER2 [28,29]. Due to both a reduced  $\beta$ -1,6-*N*-acetylglucosaminetransferase and enhanced sialyltransferase in malignant cells, (TA)MUC1 shows an aberrant glycosylation pattern leading to a more accessible peptide backbone and therefore strongly differing from densely glycosylated MUC1 expressed by healthy epithelial cells [20,26,30,31]. Synthesis of a specific human (TA)MUC1 (hu(TA)MUC1) tandem-repeat glycopeptide that corresponds to the

glycan pattern of the tumor-associated antigen and subsequent coupling to tetanus toxoid (TTox) as immune-stimulating carrier led to a highly potential antitumor vaccine [20,21]. Immunization of BALB/c mice using this vaccine resulted in a strong T cell-mediated response that induced high levels of glycopeptide-specific IgG1 antibodies, of which the mAb GGSK-1/30 showed high specificity to hu(TA)MUC1 on breast cancer cells and extensive selectivity versus normally glycosylated huMUC1 on healthy cells. Regarding affinity to human T47D cancer cells, GGSK-1/30 even outperformed the commercially available anti-MUC1 antibodies SM3 and HMFG1 [20].

Besides the native therapeutic anti-cancer effects of unmodified monoclonal antibodies, e. g. induction of apoptosis, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or blocking of either tumor cell proliferation or immune inhibition, their highly selective binding can also be used to transport either conventional chemotherapeutic drugs or both diagnostically and therapeutically relevant radionuclides to the specific target [32–34]. To evaluate its pharmacokinetics as well as applicability as diagnostic tool for immuno-PET imaging of breast cancer, *in vivo* studies of the novel, <sup>89</sup>Zr-labeled GGSK-1/30 antibody in mice bearing hu(TA)MUC1 expressing PyMTxhuMUC1 tumors were recently performed by our group [26]. Very promising results featuring high and specific target accumulation in combination with distinct tumor-to-non-target contrast could be obtained confirming its extraordinary potential.

Application of monoclonal antibodies being labeled with either  $\beta^-$  or  $\alpha$ -emitting radionuclides represents a promising strategy for targeted therapy of cancer [35–38]. In this case, the therapeutically relevant nuclide is transported to and accumulated in the target by means of highly specific binding of the protein to tumor cells expressing the corresponding receptor or antigen. Depending on antibody-selectivity and physical decay properties of the radionuclide, the malignant tissue can thus be partly or completely destroyed via ionizing radiation and tumor cell proliferation is inhibited while surrounding healthy tissue remains mostly spared. Prominent radionuclides being used or at least under investigation for radioimmunotherapy (RIT) are the  $\beta^-$ -emitters yttrium-90, iodine-131, copper-67, and lutetium-177 as well as the  $\alpha$ -emitters bismuth-213 and actinium-225 [35–40]. While short-range  $\alpha$ -radiation has a higher cytotoxicity due to a significantly higher linear energy transfer (LET), some  $\beta^-$ -emitters offer the additional advantage of potentially being traceable via SPECT imaging for dosimetry and monitoring of the therapeutic progress [41–44]. Lutetium-177 provides excellent properties for radioimmunotherapeutic applications. Its sufficiently long physical half-life of 6.7 d considers the pharmacokinetics and therefore the slow accumulation and long residence of intact mAbs in the target tissue. Furthermore, lutetium-177 provides low-energy beta-particles of  $E_{\beta, \max} = 498$  keV and lacks of high-energy gamma photons ( $E_{\gamma, \max} = 208$  keV) making it particularly suitable for treatment of both small solid tumors, even in the early stages of the disease, as well as of metastatic lesions, while maintaining a minimal dose to healthy tissue [37,45]. Applications of the <sup>177</sup>Lu-labeled somatostatine analogues DOTATOC and DOTATATE in treatment of metastatic neuroendocrine cancer have already shown good therapeutic efficacy and therefore confirmed the high endoradiotherapeutic potential of this radiometal [46–49].

Combining the advantages of both cyclic and acyclic chelator structures, AAZTA (1,4-bis(carboxymethyl)-6-[bis(carboxymethyl)]amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine) as well as its bifunctional derivative AAZTA<sup>5</sup> have recently demonstrated promising radiolabeling properties in combination with the radiometals scandium-44, gallium-68, copper-64 and lutetium-177 [50–57]. Its hybrid structure containing of a 1,4-diazepane backbone, one exocyclic nitrogen in 6-position and four carboxylic acid substituents typically provides fast and high yielding complexation at mild conditions as well as high

complex stability. Bifunctionality of AAZTA<sup>5</sup> is given by means of an additional pentanoic acid sidechain in 6-position adjacent to the exocyclic nitrogen. In our preliminary work we investigated the applicability of AAZTA<sup>5</sup> being coupled to a model antibody (bevacizumab) via squaramide (SA) for <sup>177</sup>Lu-labeling of sensitive biomolecules at mild conditions. The excellent potential of this system could be confirmed via quantitative radiolabeling at room temperature and neutral pH after short reaction times as well as high *in vitro* complex stability [58].

The squaric acid moiety offers several beneficial properties such as selectivity for primary amines and stepwise asymmetric and pH-dependent amidation leading to significantly simplified synthesis of respectively functionalized chelator systems as well as straightforward coupling to amine-bearing biomolecules such as antibodies [59,60]. Despite these advantages, using squaramide-containing linkers in radiopharmaceutical chemistry represents a still unconventional but innovative strategy. Nevertheless, our group recently published very promising results featuring squaramide coupled chelator-small-molecule systems [57,61,62].

In this proof-of-concept study we aimed for <sup>177</sup>Lu-labeling of the GSK-1/30 mAb and *in vitro* and *in vivo* evaluation of the resulting radioimmunoconjugate representing a potential tool for future RIT of hu(TA)MUC1 expressing breast cancer. Therefore, we synthesized a squaramide-functionalized derivative of AAZTA<sup>5</sup> (AAZTA<sup>5</sup>-SA) and subsequently coupling to lysine sidechains of the protein was achieved via formation of the corresponding squaric acid diamide. The resulting conjugate was radiolabeled with lutetium-177 at mild conditions and investigated *in vitro* for complex stability and for binding to self-generated transgenic murine PyMTxhuMUC1 breast cancer cells, human T47D carcinoma cells and murine PyMT tumor cells. Pharmacokinetics and *in vivo* binding properties were evaluated via administration of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GSK-1/30 to PyMTxhuMUC1 tumor bearing mice and determination of *ex vivo* biodistribution at different times post injection. PyMT tumor bearing animals without hu(TA)MUC1 expression served as control.

## MATERIALS AND METHODS

### General

All nonradioactive chemicals, substances and cell media were purchased from Sigma-Aldrich, Merck, VWR, TCI, Acros Organics, Fluka, AlfaAesar, Fisher Scientific and Lonza and used without further purification unless otherwise declared. For radiolabeling reactions trace metal-free substances were used. Column chromatography was performed using silica gel 60 (0.063–0.200 mm, Acros Organics) as stationary phase and the respectively specified solvents as mobile phase. NMR measurements were performed using a Bruker Avance III HD 400 (400 MHz) or Avance III 600 (600 MHz). Mass spectrometry was measured via Agilent Technologies 1220 Infinity LC system coupled to an Agilent Technologies 6130 Single Quadrupole LC/MS system. HPLC purification and analysis was performed using a Merck LaChrom system with Hitachi L7100 pump and L7400 UV-detector and the respectively mentioned column and conditions. Purification of the immunoconjugates was performed via fractionated size exclusion chromatography (SEC) using PD-10 Desalting Columns (8.3 mL Sephadex™ G-25, GE Healthcare). Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry was measured in linear positive mode via Bruker autoflex® maX MALDI-TOF/TOF system and analyzed via Bruker flexAnalysis software. For radiolabeling experiments n.c.a. [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl (ITG, Garching, Germany) was used. Radioactivity of the samples was measured using a PC-based dose calibrator (ISOMED 2010, Nuklear Medizintechnik Dresden GmbH). Radiochemical conversions (RCC) were determined via radio thin layer chromatography (radio-TLC, stationary phase: Merck Silica 60 F<sub>254</sub> TLC plates; mobile phase: 0.1 M citrate-buffer pH 4), image plate scanner (CR35-Bio, Elysia Raytest) and AIDA Image Analysis software (Elysia Raytest). Radiochemical purity was measured via radio-TLC and radio-SEC-HPLC monitoring (column: Phenomenex BioSep SEC-S 2000, mobile phase: 0.05 M phosphate-buffer pH 7, flow: 1 mL/min).

### Organic Synthesis

#### Methyl 5-(1,4-dibenzyl-6-nitro-1,4-diazepan-6-yl)pentanoate (**1**)

A mixture of 2-nitrocyclohexanone (2.00 g, 13.9 mmol), Amberlyst® A21 (1.05 g) and abs. methanol (35 mL) was stirred at 60 °C under reflux for 1 hour. *N,N'*-Dibenzylethylenediamine (3.36 g, 13.9 mmol) and paraformaldehyde (1.67 g, 55.5 mmol) were added to the solution. The resulting suspension was heated to 80 °C and stirred overnight. After completion of the reaction, the mixture was filtered and the filtrate was evaporated under reduced pressure. After purification via column chromatography (cyclohexane/ethylacetate 9:1, R<sub>f</sub> = 0.27) product **1** was obtained as yellow oil (5.20 g, 11.8 mmol, 85%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 7.27 (m, 10H); 3.72 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H); 3.64 (s, 3H); 3.56 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H); 3.49 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H); 2.94 (d, *J* = 14.2 Hz, 2H); 2.59 (m, 4H); 2.09 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H); 1.55 (m, 2H); 1.29 (m, 2H); 0.76 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 173.6 (s); 139.1 (s); 129.1 (s); 128.3 (s); 127.3 (s); 94.8 (s); 64.9 (s); 61.8 (s); 58.9 (s); 51.5 (s); 36.5 (s); 33.6 (s); 24.6 (s); 22.6 (s). MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 440.3 [*M* + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 439.25.

### **Methyl 5-(6-(bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4-diazepan-6-yl)pentanoate (3)**

To a mixture of **1** (1.05 g, 2.39 mmol) and Pd(OH)<sub>2</sub>/C (0.62 g, 10 wt%) in abs. ethanol (20 mL) acetic acid (411 μL, 7.19 mmol) was added and the resulting solution was stirred at room temperature overnight under an atmosphere of hydrogen. After completion of the reaction, the mixture was filtered over Celite® and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The crude product **2** was used for the following reaction without further purification.

To a solution of **2** (2.39 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.32 g, 9.57 mmol) in abs. acetonitrile (30 mL) *tert*-butyl bromoacetate (1.41 mL, 9.57 mmol) and sodium iodide (0.80 g, 4.82 mmol) were added. The resulting mixture was stirred overnight at 40 °C. After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was subsequently purified via column chromatography (cyclohexane/ethylacetate 7:1, R<sub>f</sub> = 0.15) to yield product **3** as yellow oil (0.89 g, 1.30 mmol, 54%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 3.65 (s, 4H); 3.61 (s, 4H); 3.22 (s, 3H); 2.99 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.85–2.65 (m, 4H); 2.63 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.31 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H); 1.62–1.52 (m, 4H); 1.44 (s, 18H); 1.43 (s, 18H); 1.25 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 174.4 (s); 172.9 (s); 170.9 (s); 80.9 (s); 80.4 (s); 65.3 (s); 63.2 (s); 62.6 (s); 59.4 (s); 52.1 (s); 51.6 (s); 37.3 (s); 34.3 (s); 28.3 (s); 28.3 (s); 25.9 (s); 21.8 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 686.5 [M + H<sup>+</sup>], 708.4 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>35</sub>H<sub>63</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 685.45.

### **5-(6-(Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4-diazepan-6-yl)pentanoic acid (4)**

To a solution of **3** (172 mg, 0.25 mmol) in 1,4-dioxane/water (2:1, 3 mL) a 1 M solution of LiOH (375 μL, 0.38 mmol) was added and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. After completion of the reaction the solvent was evaporated under reduced pressure and 1 M NaHCO<sub>3</sub> (10 mL) was added to the residue. The mixture was extracted with chloroform (5 × 5 mL) and the combined organic extracts were washed with water, dried over Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. Product **4** was obtained as yellow oil without further purification (116 mg, 0.17 mmol, 69%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 3.60 (s, 4H); 3.23 (s, 4H); 3.00–2.97 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.88–2.60 (m, 6H); 2.36–2.32 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H); 1.64–1.52 (m, 4H); 1.43 (s, 18H); 1.42 (s, 18H); 1.24 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 178.9 (s); 172.9 (s); 170.9 (s); 81.0 (s); 80.5 (s); 65.1 (s); 63.1 (s); 59.4 (s); 52.2 (s); 34.2 (s); 29.8 (s); 28.3 (s); 28.2 (s); 25.6 (s); 22.8 (s); 21.9. MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 672.4 [M + H<sup>+</sup>], 694.5 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>34</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 671.44.

### **6-(Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-6-(5-((2-(*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-diazepane (5)**

To a solution of **4** (75 mg, 0.11 mmol) in abs. acetonitrile (1 mL) HBTU (42 mg, 0.11 mmol), HOBT (45 mg, 0.33 mmol) and DIPEA (58 μL, 0.33 mmol) were added and the resulting mixture was stirred for 1 h at room temperature. *N*-Boc-1,2-diaminoethane (35 μL, 0.22 mmol) was added and stirring was continued overnight. After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified via column chromatography (cyclohexane/ethylacetate 1:1, R<sub>f</sub> = 0.13). Product **5** was obtained as yellow oil (74.2 mg, 91 μmol, 82%). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 6.34 (br, 1H); 5.26 (br, 1H); 3.60 (s, 4H); 3.38–3.34 (m, 2H); 3.26–3.24 (m, 2H); 3.21 (s, 4H); 2.96 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.75–2.73 (m, 2H); 2.66–2.63 (m, 2H); 2.59 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H); 2.19 (t, 2H);

1.62–1.53 (m, 4H); 1.43 (s, 18H); 1.42 (s, 27H); 1.28–1.20 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ [ppm]): 174.4 (s); 173.3 (s); 172.8 (s); 165.9 (s); 82.9 (s); 82.8 (s); 63.4 (s); 62.5 (s); 62.1 (s); 55.5 (s); 54.5 (s); 47.1 (s); 40.8 (s); 39.9 (s); 35.6 (s); 29.8 (s); 28.5 (s); 28.3 (s); 28.1 (s); 27.9 (s); 26.2 (s); 23.4 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 814.6 [M + H<sup>+</sup>], 836.5 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>41</sub>H<sub>75</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>: 813.55.

### **6-(Bis(carboxymethyl)amino)-1,4-bis(carboxymethyl)-6-(5-((2-((2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)ethyl)amino)-5-oxopentyl)-1,4-diazepane (6)**

A solution of **5** (74.2 mg, 91 μmol) in dichloromethane/trifluoroacetic acid (1:1, 2 mL) was stirred for 3 h at room temperature. After complete deprotection, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in 0.5 M phosphate buffer (pH 7, 4 mL). To the resulting solution 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (39 μL, 264 μmol) was added. The pH was adjusted to 7 with 1 M NaOH solution before stirring overnight at room temperature. After completion of the reaction, the product was purified via HPLC (column: Phenomenex Luna C18 semipreparative (250 × 10 mm) 10 μ, flow rate: 5 mL/min, 10% MeCN + 0.1% TFA, t<sub>R</sub> = 12.5 min) yielding **6** as colorless solid (16.2 mg, 26 μmol, 29%). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz, δ [ppm]): 4.75–4.67 (m, 2H); 3.88 (s, 2H); 3.76–3.66 (m, 8H); 3.59–3.44 (m, 8H); 3.40–3.38 (m, 2H); 2.20 (t, 2H); 1.52–1.45 (m, 4H); 1.43 (t, 3H); 1.30–1.21 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 100 MHz, δ [ppm]): 176.60 (s); 176.06 (s); 175.97 (s); 173.82 (s); 170.67 (s); 70.70 (s); 70.55 (s); 62.81 (s); 59.41 (s); 58.63 (s); 52.59 (s); 52.20 (s); 43.93 (s); 39.56 (s); 39.24 (s); 35.31 (s); 33.76 (s); 25.73 (s); 22.26 (s); 15.07 (s). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 614.3 [M + H<sup>+</sup>], 636.3 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>: 613.26.

### **Generation and purification of monoclonal antibody GGSK-1/30**

The anti-hu(TA)MUC1 IgG1 antibody GGSK-1/30 was generated as already published via vaccination of BALB/c mice with a huMUC1 peptide sequence of the VNTR region coupled to TTox [20,21,26]. Purification was performed using Protein G as well as SEC (PD-10 column).

### **Cell culture**

Tumor tissues were extracted from autochthonous tumors of female PyMTxhuMUC1 mice and female PyMT mice to obtain tumor cell lines. The tissues were digested using collagenase A (Roche) and RQ1 DNase (Promega) and cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, PAN Biotech) containing 5% FBS (Gibco), 1% L-glutamin (Carl Roth) and 1% sodium pyruvate (Serva). Stable PyMTxhuMUC1 tumor cells, expressing hu(TA)MUC1 and PyMT tumor cells that do not express hu(TA)MUC1 could be harvested after 7 weeks. T47D human breast cancer cells (ATCC, HTB-133™, Maryland, USA), that served as control for *in vitro* binding studies of <sup>177</sup>Lu-labeled GGSK-1/30, were grown in IMDM containing 10% FBS, 1% L-glutamin and 1% sodium pyruvate. Cell maintenance was performed as indicated in Clonetics™ Normal Human Mammary Epithelial Cell Systems user instructions by Lonza. All cell lines were incubated at 37 °C under humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. For cell dissociation during passaging 0.05% Trypsin/EDTA solution (Gibco) was applied.

## Antibody coupling and characterization of the resulting immunoconjugate

### Synthesis and purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30

333  $\mu$ L of GGSK-1/30 solution (3.0 mg mAb, 20.0 nmol, 9.0 mg/mL in PBS) was diluted with 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-buffer (pH 9, 1 mL). A tenfold molar excess of AAZTA<sup>5</sup>-SA solution (123  $\mu$ L, 200 nmol, 1 mg/mL) was added and pH was adjusted to 9 with 1 M NaOH solution. The mixture was shaken overnight at room temperature via thermomixer. The resulting immunoconjugate was subsequently purified via SEC using a PD-10 column and PBS as eluent. The protein containing fractions were combined and homogenized.

### Determination of chelator-to-antibody ratio (CAR) using MALDI-TOF mass spectrometry

Solutions of unmodified GGSK-1/30 mAb and of the SEC-purified immunoconjugate AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 were desalted via PD-10 column and lyophilized. Subsequently, a 1:1 solution of acetonitrile and water containing 0.1% TFA was added. The samples were mixed with a matrix solution of sinapinic acid on the target plate, air dried and MALDI-TOF mass spectrometry was measured using linear positive mode. The obtained molecular weights were used to determine the average number of conjugated chelator moieties per protein as follows:

$$\text{CAR} = \frac{\text{MW}_{\text{conj}} - \text{MW}_{\text{mAb}}}{\text{MW}_{\text{chel}}}$$

with  $\text{MW}_{\text{conj}}$  = measured average molecular weight of the immunoconjugate,  $\text{MW}_{\text{mAb}}$  = measured average molecular weight of unmodified mAb and  $\text{MW}_{\text{chel}}$  = mass gain per conjugated chelator moiety.

### Binding verification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 to tumor cells via FACS

Binding of the AAZTA<sup>5</sup>-SA-functionalized GGSK-1/30 and of unmodified mAb to hu(TA)MUC1 expressing PyMTxhuMUC1 tumor cells was analyzed via fluorescence-activated cell sorting (FACS) as follows:  $2 \times 10^5$  tumor cells were incubated with a solution of either mAb or mAb-conjugate (1  $\mu$ g/ml in PBS) for 20 min at 4 °C. The cells were washed two times with 150  $\mu$ L PBS and incubated for 15 min at 4 °C with a secondary antibody goat- $\alpha$ -mouse-IgG Alexa Fluor 488 (dilution 1:1000 in PBS) in combination with a fixable viability dye eFluor780 (dilution 1:1000 in PBS) to exclude false positive dead cells. Tumor cells were washed twice with 150  $\mu$ L PBS followed by FACS analysis using a BD Biosciences FACSVerse device.

### Radiolabeling of AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 with lutetium-177 and purification

[<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> (48–202 MBq in 25–30  $\mu$ L 0.04 M HCl) was diluted with 0.5 M HEPES-buffer (pH 7) to a total volume of 550  $\mu$ L. Afterwards a solution of AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 (409–1900  $\mu$ g, 2.7–12.7 nmol) in PBS (450  $\mu$ L) was added and the mixture (1 mL) was shaken for 90 min at room temperature or 37 °C and 550 rpm via thermomixer. Radiolabeling efficiency was investigated at different times via radio-TLC (<sup>177</sup>Lu-labeled mAb:  $R_f$  = 0; free lutetium-177:  $R_f$  = 0.65–1.0). The resulting radioimmunoconjugate [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 was subsequently purified via fractionated SEC using a PD-10 column

and 0.9% NaCl solution as eluent. The fractions containing the radiolabeled antibody were identified by measurement of activity and radiochemical purity was determined via radio-TLC and radio-SEC-HPLC before combination and homogenization.

### **Determination of *in vitro* complex stability of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30**

The purified radioimmunoconjugate [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 (in 230 μL PBS) was added to either 500 μL human serum or 500 μL 0.9% NaCl solution and the resulting mixtures were shaken via thermomixer at 37 °C and 500 rpm for 14 d. The proportion of the intact conjugate versus released radionuclide was determined via radio-TLC at various times.

### **Investigation of *in vitro* cell binding of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30**

*In vitro* cell binding was investigated similarly to the method already described using the <sup>89</sup>Zr-labeled antibody [26]. 3.5 × 10<sup>5</sup> cells of either PyMTxhuMUC1, PyMT or T47D were incubated with different concentrations (0.25–2 mg/mL) of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in 200 μL PBS for 30 min at 37 °C. The samples were centrifuged and the supernatant was removed. Subsequently, the cells were washed twice with 200 μL PBS and the washing solutions were combined with the initial supernatant. Radioactivity of the cells and the supernatant was measured using a gamma counter (PerkinElmer Wizard<sup>2</sup>). The percentage of bound radioimmunoconjugate was calculated via:

$$\text{binding (\%)} = \frac{\text{cpm}_{\text{cells}}}{\text{cpm}_{\text{cells}} + \text{cpm}_{\text{supernatant}}} \cdot 100$$

### **Animal housing**

6 weeks old C57BL/6N female mice (ordered from Charles River Laboratories) were housed and maintained in microisolator cages under specific pathogen-free conditions at the animal facility of Johannes Gutenberg-University (Mainz, Germany) following relevant federal laws and institutionally approved protocols. Study permission was obtained from the Landesuntersuchungsamt Koblenz (23 177-07/G 19-1-029).

### **Inoculation of tumor cells**

For *in vivo* studies, tumor cells, either 5 × 10<sup>5</sup> PyMTxhuMUC1 or 2 × 10<sup>5</sup> PyMT, were injected subcutaneously (s.c.) in the right flank of 6 weeks old female C57BL/6N mice and tumor growth was examined every 3 days.



## Determination of the biodistribution of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in tumor bearing mice

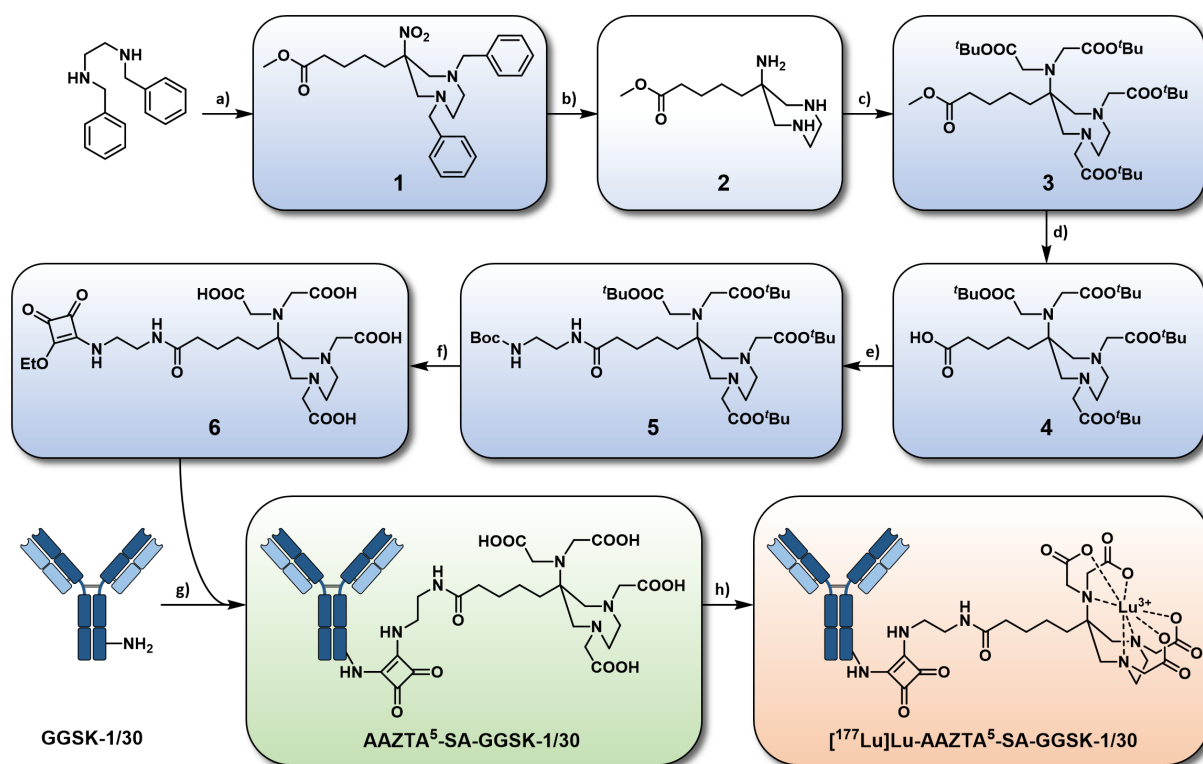
20 d after inoculation of the tumor cells, at average tumor sizes of 15 mm<sup>2</sup> (PyMTxhuMUC1) and 68 mm<sup>2</sup> (PyMT), the mice were anesthetized via inhalation of vaporized isoflurane (2 vol%) and subsequently 3.9 ± 0.2 MBq (56.3 ± 2.5 µg) of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in 50 µL 0.9% NaCl solution were injected intraperitoneal (i.p.). 24 h, 48 h, 72 h (PyMTxhuMUC1, PyMT) and 168 h (PyMTxhuMUC1) post injection, the animals were sacrificed and dissected. Solid tumor, blood and different non-target organs and tissues were weighed and the respective accumulated activity was measured via gamma counter (PerkinElmer Wizard<sup>2</sup>). Percentages of injected dose per gram (% ID/g) as well as standardized uptake values (SUV) were calculated for each tissue as follows.

$$\% \text{ ID/g} = \frac{A_{\text{tissue}}}{m_{\text{tissue}} \cdot A_{\text{total}}} \cdot 100 \qquad \text{SUV} = \frac{A_{\text{tissue}} \cdot m_{\text{total}}}{m_{\text{tissue}} \cdot A_{\text{total}}}$$

With  $A_{\text{tissue}}$  = decay-corrected activity of the respective organ/tissue,  $A_{\text{total}}$  = total injected activity,  $m_{\text{tissue}}$  = mass of the respective organ/tissue,  $m_{\text{total}}$  = total body weight of the animal.

## RESULTS AND DISCUSSION

As already described in detail, AAZTA<sup>5</sup> provides excellent properties for fast and stable complexation of several radiometals under mild conditions. Squaric acid represents an innovative linker moiety that ensures both simplified synthesis of the respective bifunctional chelator system and straightforward antibody coupling. Therefore, the first part of this study included preparative organic synthesis of AAZTA<sup>5</sup>-SA (Fig. 1). The *tert*-butyl-protected basic scaffold **4** was synthesized in four steps according to the procedure recently published by our group [55]. In the next step, the free pentanoic acid moiety was extended by a Boc-protected ethylenediamine via amide coupling yielding compound **5**. Finally, after cleavage of all protective groups using TFA, reaction of the terminal amine with squaric acid diethyl ester at pH 7 led to the corresponding squaric acid monoamide **6**. After purification via semi-preparative HPLC, the desired product AAZTA<sup>5</sup>-SA was obtained with a yield of 8% over all steps.

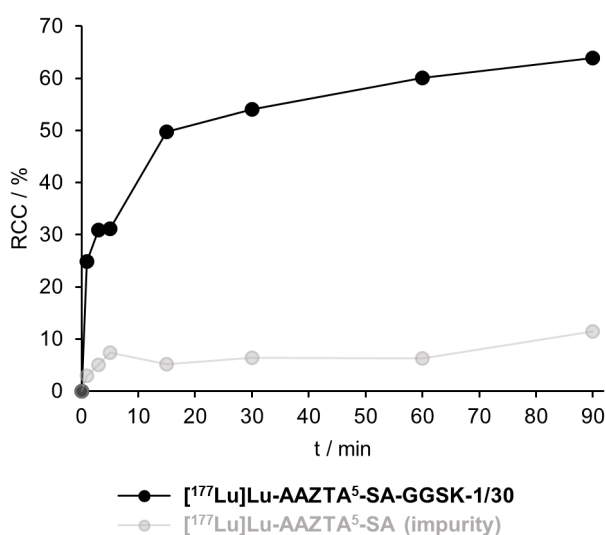


**Figure 1:** Synthesis of AAZTA<sup>5</sup>-SA, coupling to GGSK-1/30 antibody and subsequent <sup>177</sup>Lu-labeling: (a) 2-nitrocyclohexanone, Amberlyst® A21, paraformaldehyde, MeOH, 85%; (b) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>, EtOH; (c) *tert*-butyl bromoacetate, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KI, MeCN, 54%; (d) 1 M LiOH, 1,4-dioxane/H<sub>2</sub>O (2:1), 69%; (e) *N*-Boc-ethylenediamine, HBTU, HOBt, DIPEA, MeCN, 82%; (f) 1. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (1:1); 2. 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione, phosphate buffer pH 7, 29%; (g) 10 eq. AAZTA<sup>5</sup>-SA, phosphate-buffer pH 9; (h) [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub>, HEPES-buffer pH 7, room temperature or 37 °C.

Conjugation to the anti-hu(TA)MUC1 antibody GGSK-1/30 was performed using a tenfold molar excess of AAZTA<sup>5</sup>-SA at pH 9 via amide coupling to lysine sidechains of the protein leading to the corresponding squaric acid diamide (Fig. 1). To remove excess unbound chelator molecules, the resulting immunoconjugate was purified via SEC prior to further characterization and radiolabeling. The ratio of conjugated chelator moieties per antibody (CAR) was determined via MALDI-TOF mass spectrometric analysis resulting in an average value of 2.44 (Fig. S1). Within the study featuring the

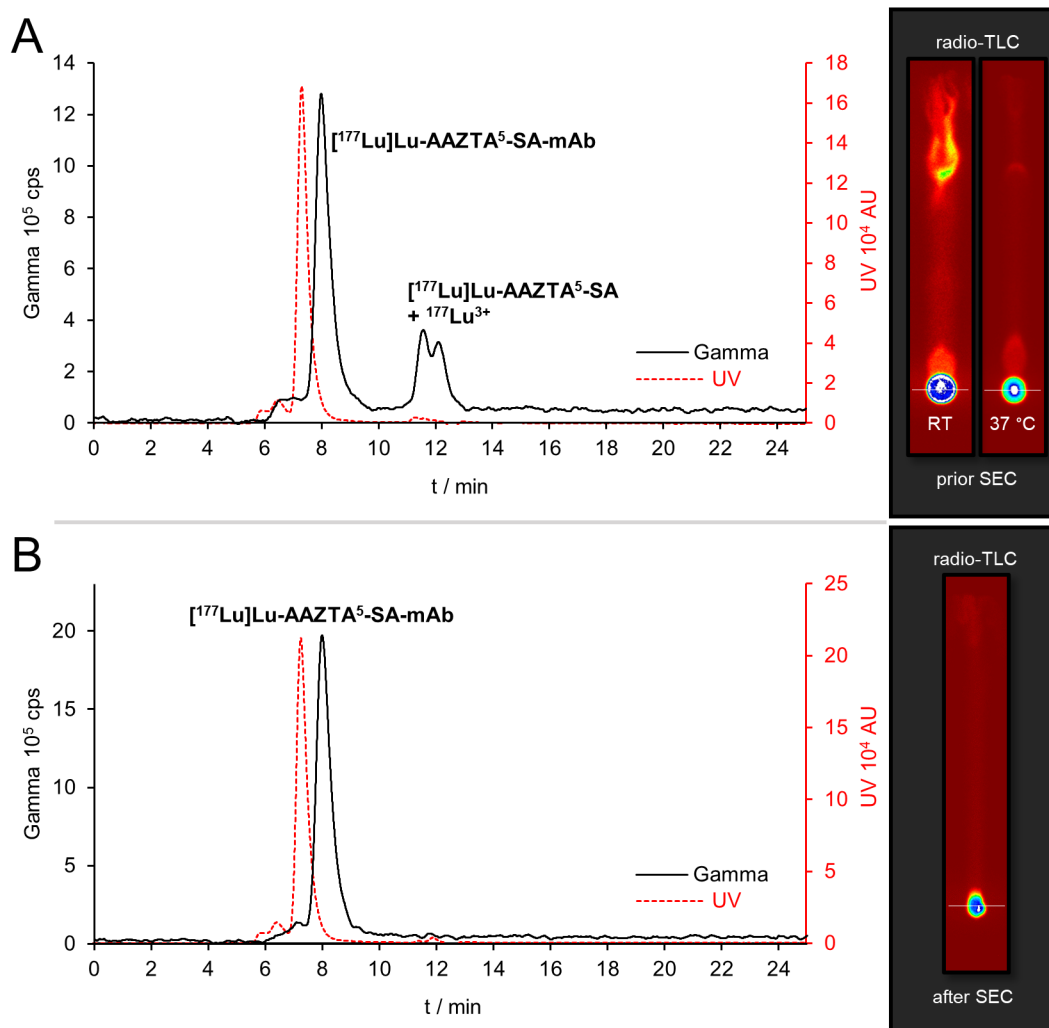
$^{89}\text{Zr}$ -labeled GGSK-1/30 antibody it could be shown, that approx. four bound DFO-*p*-Ph-NCS chelators had no negative influence on antigen-binding properties [26]. Therefore, the herein obtained amount of bound AAZTA<sup>5</sup>-SA moieties per protein is likewise sufficiently low to assume the antibody affinity not to be impaired. Indeed, this assumption could be confirmed via *in vitro* cell binding and subsequent FACS analysis (Fig. S2). Compared to the unmodified GGSK-1/30, the AAZTA<sup>5</sup>-SA-functionalized mAb showed no significantly affected binding to PyMTxhuMUC1 tumor cells.

For investigation of radiolabeling kinetics, the mAb-conjugate AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 was reacted with lutetium-177 in HEPES-buffer (pH 7) at room temperature and radiochemical conversions were determined via radio-TLC at various times (Fig. 2). These mild, protein-sparing conditions have already demonstrated excellent labeling results using other AAZTA<sup>5</sup>-functionalized antibodies in our previous approaches. Successful formation of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 resulted in a radiochemical conversion of 63.9% after 90 min. After only 15 min, almost 50% of the activity was already bound to the protein.



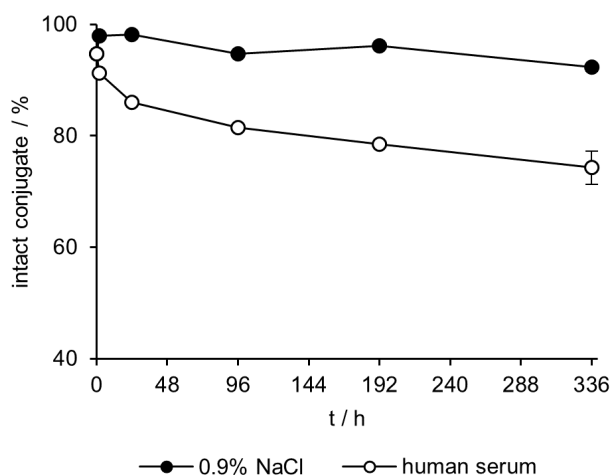
**Figure 2:** Radiolabeling efficiency of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30: <sup>177</sup>Lu-complexation kinetics using 48 MBq [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> and 900 μg AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in HEPES-buffer (pH 7) at room temperature as determined via radio-TLC. Radiochemical conversions of the desired <sup>177</sup>Lu-mAb (black) were affected by a radiolabeled impurity resulting from residual unbound chelator (grey).

Besides the desired radioimmunoconjugate ( $R_f = 0$ ), detailed analysis of the radio-TLC results revealed a further radiolabeled species with a  $R_f$  value of 0.05–0.2 and RCC up to 11.5% typically representing <sup>177</sup>Lu-labeled residual unbound AAZTA<sup>5</sup>-SA, that was apparently not completely separated via SEC prior to radiolabeling. This impurity may be responsible for slightly impaired yields of the radiolabeled antibody but could be entirely removed via post-labeling SEC purification (Fig. 3, S3). Utilization of marginally elevated temperatures (37 °C) led to improved radiochemical conversions of > 86% after 90 min due to faster and almost complete complexation of the free radiometal (<sup>177</sup>Lu<sup>3+</sup>;  $R_f = 0.65$ –1.0). Nevertheless, summarized for all labeling approaches, [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 could be obtained with a radiochemical purity of  $95.9 \pm 2.2\%$  and apparent molar activities of 4.1–29.4 GBq/μmol. Successful purification was additionally confirmed via size exclusion HPLC monitoring before and after SEC (Fig. 3, <sup>177</sup>Lu-mAb:  $t_R = 8.0$  min).



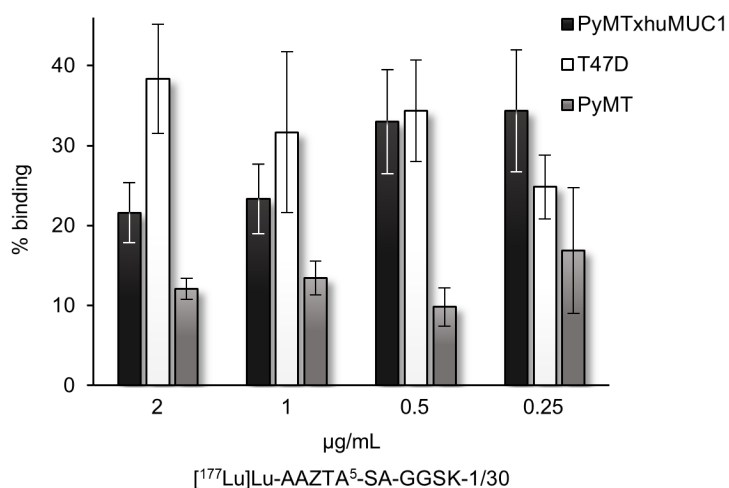
**Figure 3:** Representative SEC-HPLC chromatograms of  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-AAZTA}^5\text{-SA-GGSK-1/30}$  using a Phenomenex BioSep SEC-S 2000 column (Phenomenex) and 1 mL/min 0.05 M phosphate-buffer (pH 7) as mobile phase prior (A) and after (B) SEC-purification as well as corresponding radio-TLC images ( $^{177}\text{Lu}$ -labeled mAb:  $R_f = 0$ ,  $^{177}\text{Lu}$ -labeled residual AAZTA<sup>5</sup>-SA:  $R_f = 0.05\text{--}0.2$ , free lutetium-177:  $R_f = 0.65\text{--}1.0$ ). The shift between UV (280 nm) and radio signals is due to the dead volume between the two consecutive measurements.

The *in vitro* stability of the protein-bound  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-AAZTA}^5\text{-SA}$  complex was investigated in human serum and formulation medium over 14 days (Fig. 4). In 0.9% NaCl solution only minor changes in the amount of incorporated activity could be observed within the whole period. Starting from an initial radiochemical purity of 94.8%, even a slightly increased value of  $98.0 \pm 0.2\%$ , i.e. ongoing complexation was found after two hours. Within the first 24 h, the radioconjugate showed no release of free radiometal and within the following 13 days only a negligibly low instability led to  $92.3 \pm 0.8\%$  intact conjugate at the end of the experiment. In human serum the protein-bound complex showed slightly lower stability. Over the entire period, a small but steady release of free lutetium-177 could be observed. Nevertheless, after 4 days, i.e. within a typical time frame for circulation and target-accumulation of full-size antibodies, the percentage of bound activity was still  $86.1 \pm 0.6\%$ . Moreover, even after a long period of 14 days, a significant proportion of the activity ( $74.3 \pm 3.0\%$ ) still remained incorporated.



**Figure 4:** *In vitro* complex stability of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in human serum and 0.9% NaCl solution at 37 °C over a period of 14 d with values displayed as mean  $\pm$  SD showing the percentage of intact conjugate at different times as determined via radio-TLC.

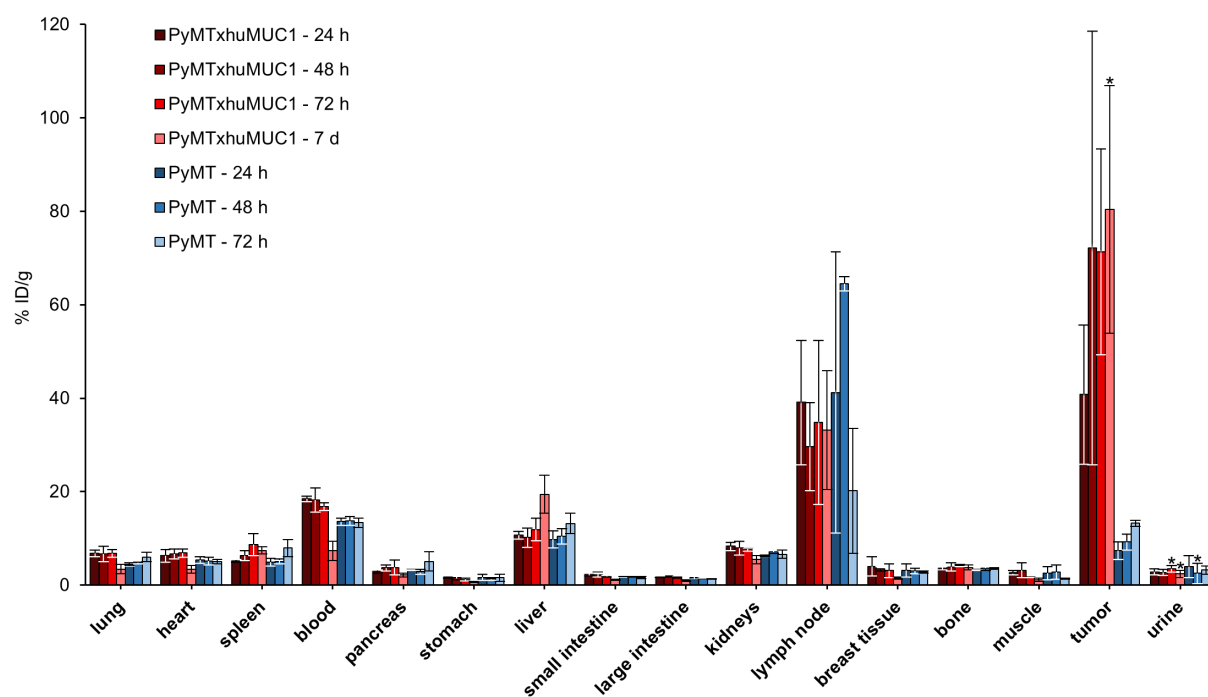
*In vitro* cell binding of the  $^{177}\text{Lu}$ -labeled immunoconjugate AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 to tumor cells was evaluated similarly to the already published work concerning the PET-relevant,  $^{89}\text{Zr}$ -labeled analogue (Fig. 5)[26]. Therefore, self-generated transgenic murine PyMTxhuMUC1 breast tumor cells and human carcinoma T47D cells were incubated with different concentrations of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30. Murine mammary PyMT tumor cells served as control without hu(TA)MUC1 expression. The radioimmunoconjugate showed distinct binding to hu(TA)MUC1 expressing PyMTxhuMUC1 cells with a maximum value of  $34.3 \pm 7.6\%$  bound activity using an antibody concentration of 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . However, with increasing concentration of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 a decreased binding could be observed down to  $21.6 \pm 3.7\%$ . This behavior might be due to a limited amount of aberrant glycosylated hu(TA)MUC1 antigens expressed by the cells, leading to possible saturation at higher concentrations and thus to a higher proportion of unbound activity in the supernatant. An even higher binding could be observed to T47D cells resulting in a maximum percentage of  $38.4 \pm 6.8\%$  using 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  radiolabeled antibody. In contrast to PyMTxhuMUC1 cells, this value decreased with lower concentrations down to  $24.8 \pm 4.0\%$  at 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  indicating T47D cells to exhibit higher expression of hu(TA)MUC1. However, within the corresponding error interval, similar binding results were obtained for 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with  $31.7 \pm 10.0\%$  and  $34.3 \pm 6.4\%$ , respectively. Contrary to the expectation, a certain non-specific *in vitro* binding to PyMT cells, which do not express hu(TA)MUC1, was measured with a maximum result of  $16.9 \pm 7.9\%$  bound activity using 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of radiolabeled GGSK-1/30. Nevertheless, binding to PyMT in general was significantly lower than that to PyMTxhuMUC1 and T47D but clearly exceeded the results previously obtained for the  $^{89}\text{Zr}$ -labeled analogue [26]. Since higher values were measured not only for unspecific but also specific hu(TA)MUC1-binding within the experiments presented herein, this behavior is presumably due to the larger amount of used cells and the higher antibody concentrations compared to the previously obtained results.



**Figure 5:** *In vitro* cell binding of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 to hu(TA)MUC1 expressing tumor cells in dependence on mAb-concentration after incubation for 30 min at 37 °C. PyMT cells served as negative control without expression of hu(TA)MUC1. Values are displayed as mean ± SD (n = 3).

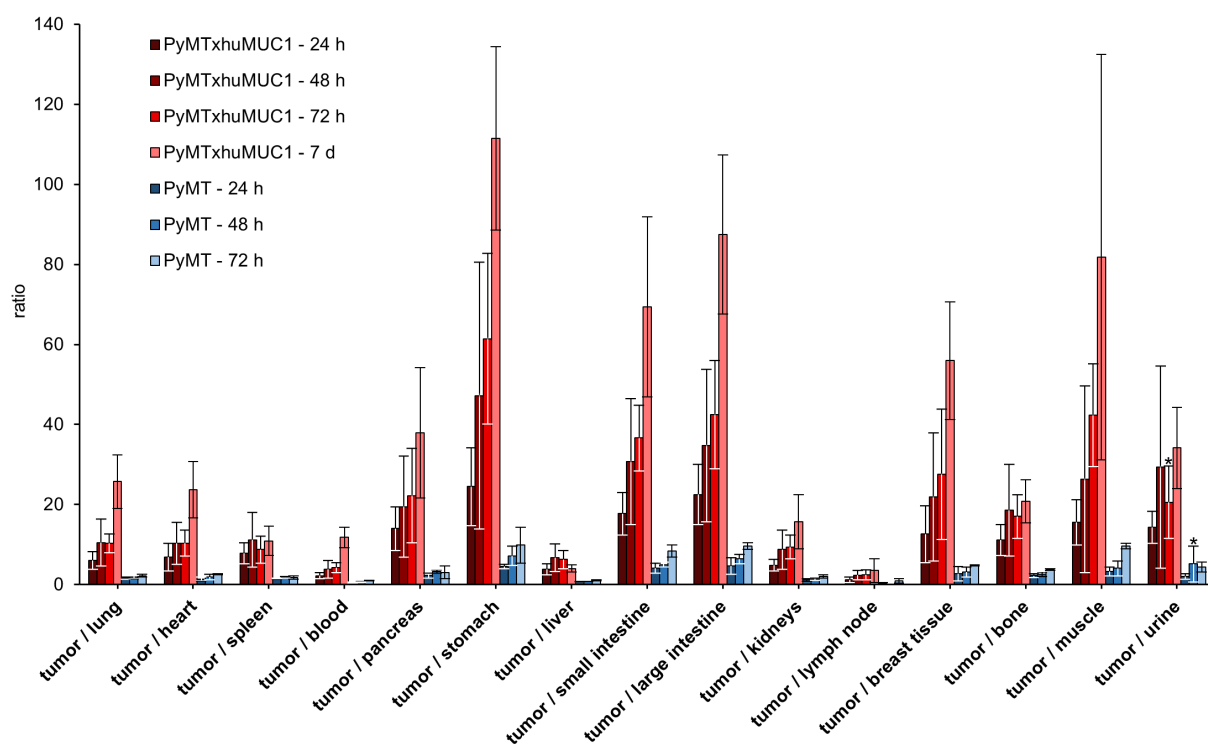
As proof-of-concept, *ex vivo* biodistribution studies of the <sup>177</sup>Lu-labeled GGSK-1/30 antibody were performed to investigate its binding to hu(TA)MUC1 expressing tumors and therefore to evaluate its applicability for future radioimmunotherapeutic treatment of breast cancer. Therefore 3.9 ± 0.2 MBq (56.3 ± 2.5 µg) of the radioimmunoconjugate were injected in either PyMTxhuMUC1 or PyMT tumor bearing C57BL/6N mice and *ex vivo* biodistribution was determined via measurement of accumulated activity in the tumor and non-target tissues and organs at various times (24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i., Fig. 6, S4, Table S1, S2). Within the 20 days between inoculation of tumor cells and injection of the radiolabeled antibody, a strongly divergent tumor growth was observed between the PyMTxhuMUC1 and PyMT animals. The very rapid progression of the disease in the control group compared to a slow growth of the PyMTxhuMUC1 tumors resulted in an approx. 27-fold larger average mass (PyMT: 282 ± 122 mg; PyMTxhuMUC1: 10.4 ± 8.7 mg) and a significantly more developed vasculature of the PyMT tumors. As a result, one group of PyMT tumor-bearing mice had to be euthanized prematurely and the latest biodistribution value 7 days p.i. could unfortunately only be determined in the PyMTxhuMUC1 group. [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 showed distinct target-affinity and impressive accumulation in hu(TA)MUC1 expressing tumor tissue with 40.8 ± 14.9% ID/g already 24 h p.i. The tumor uptake even further increased to 71–72% ID/g after 48 h and 72 h, respectively and reached a high maximum of 80.4 ± 26.5% ID/g within the following 4 days. Accordingly, the amount of still circulating radiolabeled antibody in the blood decreased from 18.5 ± 0.6% ID/g after 24 h to 7.3 ± 2.1% ID/g at the end of the experiment leading to a high tumor-to-blood ratio of 11.8 ± 2.6 (Fig. 7, Table S3). In contrast, significantly lower accumulation in PyMT tumors could be observed with a maximum uptake of 13.2 ± 0.7% ID/g 72 h p.i., despite a much larger tumor volume and considerably more extensive vascularization, confirming the high specificity for hu(TA)MUC1. Increasing accumulation of radioimmunoconjugate in the liver was found up to 19.4 ± 4.1% ID/g in the PyMTxhuMUC1 group and 13.2 ± 2.2% ID/g in PyMT tumor-bearing animals after 7 d and 72 h, respectively, indicating a predominantly hepatobiliary excretion. This tends to be in accordance with the previous work, although the <sup>89</sup>Zr-labeled analogue showed an even higher uptake of 22% ID/g already after 24 h [26]. Hepatic uptake represents a well-known issue not only of other (radiolabeled) MUC1-specific antibodies such

as PR81, C595, HMFG1 and HMFG2 but also of full-size mAbs in general [63–68]. Therefore, with regard to future radioimmunotherapeutic applications, the liver presumably represents the dose-limiting organ. Nevertheless, accumulation in PyMTxhuMUC1 tumors exceeded the liver uptake by a factor of 4–7 at each time point. Additionally, both groups showed an elevated uptake of activity in the lymph nodes (LN) with  $39.1 \pm 13.3\%$  ID/g (PyMTxhuMUC1) and  $41.2 \pm 30.1\%$  ID/g (PyMT) after 24 h. In PyMTxhuMUC1 animals this value slightly decreased down to  $33.2 \pm 12.8\%$  ID/g during the following 6 days. In the PyMT group an initial increase to  $64.5 \pm 1.6\%$  ID/g was observed followed by a significant decrease down to  $20.2 \pm 13.4\%$  ID/g after 72 h. By invading surrounding lymph vessels, cancer cells migrate to adjacent lymph nodes and form a colonized tumor, leading their way to other organs [69]. Especially in breast cancer, regional LNs are frequently the first site of metastasis [70]. This effect may be responsible for the increased LN uptake in PyMTxhuMUC1 tumor bearing animals. However, the unspecific accumulation in the LN of the control group seems to be only insufficiently explained by this assumption. Since a low but still existing uptake of radioimmunoconjugate was also observed in PyMT tumors, the significantly faster disease progression in this group may also partly account for a comparatively high LN accumulation.



**Figure 6:** *Ex vivo* biodistribution 24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i. of  $3.9 \pm 0.2$  MBq ( $56.3 \pm 2.5$   $\mu$ g)  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-AAZTA}^5\text{-SA-GGSK-1/30}$  in PyMTxhuMUC1 and PyMT tumor bearing, 9 weeks old female C57BL/6N mice. Percentages of injected dose per gram (% ID/g) are displayed as mean  $\pm$  SD (PyMTxhuMUC1:  $n = 5$ ; PyMT:  $n = 2$  (24 h p.i.),  $n = 3$  (48 h, 72 h p.i.)). Values indicated with an asterisk represent a sample size of  $n = 1$ , because one animal of the respective group had no measurable tumor or no urine.

Within both groups, [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 showed an overall low unspecific uptake of < 9% ID/g in other non-target organs like lung, heart, pancreas, stomach and intestines with the spleen and kidneys providing the highest values of  $8.7 \pm 2.4\%$  ID/g (72 h p.i.) and  $8.3 \pm 0.9\%$  ID/g (24 h p.i.), respectively. Accordingly, high tumor-to-non-target ratios ranging from  $10.9 \pm 3.6$  (tumor/spleen) and  $15.7 \pm 6.7$  (tumor/kidneys) up to  $111.5 \pm 22.9$  (tumor/stomach) were obtained after 7 d (Fig. 7). In several organs (especially lung and heart), a more or less distinctly reduced uptake was observed between day 3 and day 7, possibly partially due to residual activity in the blood within the organs which cleared over time. Bone uptake plays a critical role in endoradiotherapeutic applications, as the extent of bone marrow suppression often represents the dose-limiting toxicity [71]. Even though lutetium-177 constitutes a much lower hazard to bone marrow than other radionuclides due to its low  $\beta^-$ -energy and the associated shorter particle-range (compared to e.g. yttrium-90), it is nevertheless worth mentioning, that only a low accumulation of activity in bone tissue was observed within our experiments (< 5% ID/g). Correspondingly, our results indicate increasing and generally high tumor-to-bone ratios of  $11.2 \pm 3.9$  (24 h p.i.) up to  $20.8 \pm 5.4$  (7 d p.i.). Since free lutetium-177, either as a result of metabolic degradation of the radiopharmaceutical or previously released, is typically excreted or delivered to the bones, these results therefore indicate high *in vivo* stability of both the [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA complex and the entire radioimmunoconjugate [71].



**Figure 7:** Uptake ratios of tumor-to-non-target tissue 24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i. of  $3.9 \pm 0.2$  MBq ( $56.3 \pm 2.5$   $\mu\text{g}$ ) [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1 and PyMT tumor bearing, 9 weeks old female C57BL/6N mice. Values are displayed as mean  $\pm$  SD (PyMTxhuMUC1:  $n = 5$  (24 h, 48 h, 72 h p.i.),  $n = 4$  (7 d p.i.); PyMT:  $n = 2$  (24 h p.i.),  $n = 3$  (48 h, 72 h p.i.)). Values indicated with an asterisk represent a sample size of  $n = 1$ , because one animal of the respective group had no measurable urine.



As represented by relatively large error intervals, the accumulation in PyMTxhuMUC1-tumors was generally very high but nevertheless comparatively inconsistent within each group. For example, tumor uptake of the 24 h group ( $n = 5$ ) included values of 21.7–61.0% ID/g. On the one hand, these variations may be due to the small size of the tumors, leading to a distinct influence of potential measurement inaccuracies on the obtained %ID/g values, especially in the determination of weight. On the other hand, a weakly and among the animals inhomogeneously developed vasculature may be responsible for differently strong supply of the radioimmunoconjugate to the target tissue. For a more profound analysis and for more accurate results, future follow-up experiments should focus on the use of animals with a more advanced progression of the disease, i.e. after prolonged tumor growth. In this context, considering the different growth between PyMTxhuMUC1- and PyMT-tumors may also lead to more comparable results. Nevertheless, the results of this first proof-of-concept study clearly demonstrate the high potential of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 for future treatment of hu(TA)MUC1 expressing breast cancer.

## CONCLUSION

Within the present study the hu(TA)MUC1 specific immunoconjugate AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 was prepared, <sup>177</sup>Lu-labeled and evaluated *in vitro* and *in vivo*. The affinity of the antibody to hu(TA)MUC1 expressing tumor cells remained unaffected by the conjugation of approx. 2.4 chelator moieties per protein. Successful formation of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 led to radiochemical conversions of approx. 64% and > 86% after 90 min at room temperature and 37 °C, respectively. After post-labeling SEC purification, the desired radioimmunoconjugate was obtained with radiochemical purities of > 95% and apparent molar activities of approx. 4–29 GBq/μmol. The protein-bound [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-complex revealed very high *in vitro* stability in formulation medium and a small but steady release of free lutetium-177 in human serum over a period of 14 days. The radioimmunoconjugate showed distinct *in vitro* binding to both human T47D carcinoma cells and self-generated transgenic murine PyMTxhuMUC1 breast cancer cells with maximum values of approx. 38% and 34% bound activity, respectively. As proof-of-concept the <sup>177</sup>Lu-labeled GGSK-1/30 antibody was administered to PyMTxhuMUC1 tumor bearing mice and *ex vivo* biodistribution was determined at different times to evaluate its pharmacokinetics and binding to hu(TA)MUC1 expressing tumors. The radioimmunoconjugate showed extraordinarily high accumulation in the tumor accounting for > 40% ID/g already after 24 h with a further increase up to > 80% ID/g within the following 6 days. In contrast, significantly lower uptake of maximum approx. 13% ID/g in PyMT tumors could be observed confirming the high specificity of the GGSK-1/30 mAb to hu(TA)MUC1. An increasing accumulation of the activity in the liver up to 19% ID/g indicated a predominantly hepatobiliary excretion and presumably causes this organ to be dose-limiting. Except a considerably high uptake in lymph nodes, overall low unspecific binding (< 9% ID/g) to other non-target organs and tissues like lung, heart, spleen, kidneys, pancreas, stomach, intestines and bones led to impressively high and increasing tumor-to-non-target ratios.

Although a strongly divergent tumor growth between the PyMTxhuMUC1 and PyMT animals resulted in a substantial difference in tumor size at the time of radioconjugate injection, the outcomes of the present study clearly demonstrate the high potential of [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 for future radioimmunotherapeutic treatment of hu(TA)MUC1 expressing breast cancer.

For a more in-depth analysis, next follow-up experiments should implement investigations regarding dosimetry and actual therapeutic efficacy, i.e. influence of the <sup>177</sup>Lu-labeled mAb on tumor growth and size as well as on survival.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank [REDACTED] for MALDI-TOF measurements, [REDACTED] for assistance with injection of tumor cells and ITG (Garching, Germany) for the provision of n.c.a. lutetium-177. The authors are also very grateful to the Collaborative Research Center SFB 1066 of the German Research Foundation (DFG) for its support.

## **Competing interests**

[REDACTED] is inventor on a pending patent application describing the anti-(TA)MUC1 antibody GGSK-1/30 (patent No.: 18163057.5-1120).

## **Ethical approval**

All experiments were performed following international, national and institutional guidelines for the care and use of animals. Study permission was obtained from the Landesuntersuchungsamt Koblenz (23 177-07/G 19-1-029).

## REFERENCES

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
- [2] Wöckel A, Albert U-S, Janni W, Scharl A, Kreienberg R, Stüber T. The screening, diagnosis, treatment, and follow-up of breast cancer. *Dtsch Aerzteblatt Online* 2018;115:316–23.
- [3] Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J Cancer* 2016;7:1281–94.
- [4] Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006;49:22–34.
- [5] Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:293–308.
- [6] Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment. *JAMA* 2019;321:288.
- [7] Abe O, Abe R, Enomoto K, Kikuchi K, Koyama H, Masuda H, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011;378:771–84.
- [8] Bradley R, Burrett J, Clarke M, Davies C, Duane F, Evans V, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet* 2015;386:1341–52.
- [9] Group TB 1-98 C. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med* 2009;361:766–76.
- [10] Pagni O, Regan MM, Walley BA, Fleming GF, Colleoni M, Láng I, et al. Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 2014;371:107–18.
- [11] Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659–72.
- [12] Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673–84.
- [13] Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011;365:1273–83.
- [14] Earl HM, Hiller L, Vallier A-L, Loi S, McAdam K, Hughes-Davies L, et al. 6 versus 12 months of adjuvant trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (PERSEPHONE): 4-year disease-free survival results of a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2019;393:2599–612.
- [15] Albain K, Anderson S, Arriagada R, Barlow W, Bergh J, Bliss J, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2012;379:432–44.
- [16] Blum JL, Flynn PJ, Yothers G, Asmar L, Geyer CE, Jacobs SA, et al. Anthracyclines in early breast cancer: the ABC trials—USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). *J Clin Oncol* 2017;35:2647–55.

- [17] Jones S, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Blum JL, Vukelja SJ, McIntyre KJ, et al. Docetaxel with cyclophosphamide is associated with an overall survival benefit compared with doxorubicin and cyclophosphamide: 7-year follow-up of US oncology research trial 9735. *J Clin Oncol* 2009;27:1177–83.
- [18] Loibl S, Weber KE, Timms KM, Elkin EP, Hahnen E, Fasching PA, et al. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response—final results from GeparSixto. *Ann Oncol* 2018;29:2341–7.
- [19] Sparano JA, Wang M, Martino S, Jones V, Perez EA, Saphner T, et al. Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1663–71.
- [20] Palitzsch B, Gaidzik N, Stergiou N, Stahn S, Hartmann S, Gerlitzki B, et al. A synthetic glycopeptide vaccine for the induction of a monoclonal antibody that differentiates between normal and tumor mammary cells and enables the diagnosis of human pancreatic cancer. *Angew Chemie Int Ed* 2016;55:2894–8.
- [21] Gaidzik N, Kaiser A, Kowalczyk D, Westerlind U, Gerlitzki B, Sinn HP, et al. Synthetic antitumor vaccines containing MUC1 glycopeptides with two immunodominant domains-induction of a strong immune response against breast tumor tissues. *Angew Chemie Int Ed* 2011;50:9977–81.
- [22] Kaiser A, Gaidzik N, Westerlind U, Kowalczyk D, Hobel A, Schmitt E, et al. A synthetic vaccine consisting of a tumor-associated sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1 tandem-repeat glycopeptide and tetanus toxoid: induction of a strong and highly selective immune response. *Angew Chemie Int Ed* 2009;48:7551–5.
- [23] Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 2014;20:332–42.
- [24] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Miles D., Dalziel M. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1999;1455:301–13.
- [25] Hanisch F-G. O-Glycosylation of the mucin type. *Biol Chem* 2001;382:143–9.
- [26] Stergiou N, Nagel J, Pektor S, Heimes AS, Jäkel J, Brenner W, et al. Evaluation of a novel monoclonal antibody against tumor-associated MUC1 for diagnosis and prognosis of breast cancer. *Int J Med Sci* 2019;16:1188–98.
- [27] Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004;4:45–60.
- [28] Miller-Kleinhenz JM, Bozeman EN, Yang L. Targeted nanoparticles for image-guided treatment of triple-negative breast cancer: clinical significance and technological advances. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* 2015;7:797–816.
- [29] Siroy A, Abdul-Karim FW, Miedler J, Fong N, Fu P, Gilmore H, et al. MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Hum Pathol* 2013;44:2159–66.
- [30] Brockhausen I, Yang J-M, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 1995;233:607–17.
- [31] Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem* 1990;265:15286–93.
- [32] Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010;10:317–27.

- [33] Adler MJ, Dimitrov DS. Therapeutic antibodies against cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2012;26:447–81.
- [34] Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep* 2018;45:2935–40.
- [35] Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy* 2011;3:349–70.
- [36] Kawashima H. Radioimmunotherapy: a specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies. *Sci World J* 2014;2014:1–10.
- [37] Barbet J, Bardiès M, Bourgeois M, Chatal J-F, Chérel M, Davodeau F, et al. Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. In: Chames P, editor. *Methods Mol. Biol.*, vol. 907. 2nd ed., Springer; 2012, p. 681–97.
- [38] Moek KL, Giesen D, Kok IC, de Groot DJA, Jalving M, Fehrmann RSN, et al. Theranostics using antibodies and antibody-related therapeutics. *J Nucl Med* 2017;58:835-90S.
- [39] Yeong C, Cheng M, Ng K. Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects. *J Zhejiang Univ Sci B* 2014;15:845–63.
- [40] Karagiannis TC. Comparison of different classes of radionuclides for potential use in radioimmunotherapy. *Hell J Nucl Med* 2007;10:82–8.
- [41] Lassmann M, Eberlein U. Targeted alpha-particle therapy: imaging, dosimetry, and radiation protection. *Ann ICRP* 2018;47:187–95.
- [42] Behr TM, Béhé M, Stabin MG, Wehrmann E, Apostolidis C, Molinet R, et al. High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of <sup>213</sup>Bi- versus <sup>90</sup>Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res* 1999;59:2635–43.
- [43] Liu Z, Ma T, Liu H, Jin Z, Sun X, Zhao H, et al. <sup>177</sup>Lu-labeled antibodies for EGFR-targeted SPECT/CT imaging and radioimmunotherapy in a preclinical head and neck carcinoma model. *Mol Pharm* 2014;11:800–7.
- [44] Dewaraja YK, Wilderman SJ, Koral KF, Kaminski MS, Avram AM. Use of integrated SPECT/CT imaging for tumor dosimetry in I-131 radioimmunotherapy: a pilot patient study. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:417–26.
- [45] Dash A, Pillai MRA, Knapp FF. Production of <sup>177</sup>Lu for targeted radionuclide therapy: available options. *Nucl Med Mol Imaging (2010)* 2015;49:85–107.
- [46] Forrer F, Uusijärvi H, Storch D, Maecke HR, Mueller-Brand J. Treatment with <sup>177</sup>Lu-DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with <sup>90</sup>Y-DOTATOC. *J Nucl Med* 2005;46:1310–6.
- [47] Demirci E, Kabasakal L, Toklu T, Ocak M, Şahin OE, Alan-Selcuk N, et al. <sup>177</sup>Lu-DOTATATE therapy in patients with neuroendocrine tumours including high-grade (WHO G3) neuroendocrine tumours: response to treatment and long-term survival update. *Nucl Med Commun* 2018;39:789–96.
- [48] Kasi PM, Sharma A, Jain MK. Expanding the indication for novel theranostic <sup>177</sup>Lu-Dotatate peptide receptor radionuclide therapy: proof-of-concept of PRRT in Merkel cell cancer. *Case Rep Oncol* 2019;12:98–103.
- [49] Bodei L, Kidd M, Prasad V, Modlin IM. Peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumors. *Front Horm Res* 2015;44:198–215.

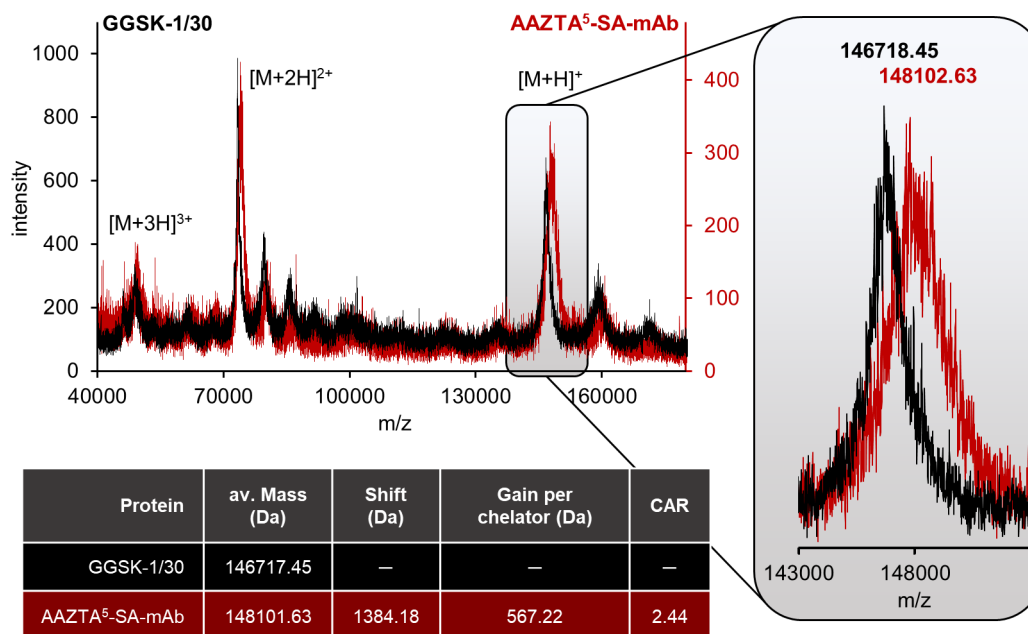
- [50] Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 2014;43:260–90.
- [51] Pfister J, Summer D, Rangger C, Petrik M, von Guggenberg E, Minazzi P, et al. Influence of a novel, versatile bifunctional chelator on theranostic properties of a minigastrin analogue. *EJNMMI Res* 2015;5:74.
- [52] Baranyai Z, Uggeri F, Giovenzana GB, Bényei A, Brücher E, Aime S. Equilibrium and kinetic properties of the lanthanoids(III) and various divalent metal complexes of the heptadentate ligand AAZTA. *Chem - A Eur J* 2009;15:1696–705.
- [53] Nagy G, Szikra D, Trencsényi G, Fekete A, Garai I, Giani AM, et al. AAZTA: an ideal chelating agent for the development of <sup>44</sup>Sc PET imaging agents. *Angew Chemie Int Ed* 2017;56:2118–22.
- [54] Lattuada L, Barge A, Cravotto G, Giovenzana GB, Teid L, Tei L. The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem Soc Rev* 2011;40:3019–49.
- [55] Sinnes J, Nagel J, Rösch F. AAZTA<sup>5</sup>/AAZTA<sup>5</sup>-TOC: synthesis and radiochemical evaluation with <sup>68</sup>Ga, <sup>44</sup>Sc and <sup>177</sup>Lu. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2019;4:18.
- [56] Greifenstein L, Späth D, Sinnes JP, Grus T, Rösch F. Mild and efficient <sup>64</sup>Cu labeling of perhydro-1,4-diazepine derivatives for potential use with large peptides, proteins and antibodies. *Radiochim Acta* 2020;108:555–63.
- [57] Greifenstein L, Grus T, Nagel J, Sinnes JP, Rösch F. Synthesis and labeling of a squaric acid containing PSMA-inhibitor coupled to AAZTA<sup>5</sup> for versatile labeling with <sup>44</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga and <sup>177</sup>Lu. *Appl Radiat Isot* 2020;156:108867.
- [58] Klasen B, Moon ES, Rösch F. AAZTA<sup>5</sup>-squaramide ester competing with DOTA-, DTPA- and CHX-A"-DTPA-analogues: promising tool for <sup>177</sup>Lu-labeling of monoclonal antibodies under mild conditions. *Nucl Med Biol* 2021;96–97:80–93.
- [59] Wurm FR, Klok H-A. Be squared: expanding the horizon of squaric acid-mediated conjugations. *Chem Soc Rev* 2013;42:8220.
- [60] Tietze LF, Arlt M, Beller M, Glüsenkamp K, Jähde E, Rajewsky MF, et al. Squaric acid diethyl ester: a new coupling reagent for the formation of drug biopolymer conjugates. Synthesis of squaric acid ester amides and diamides. *Chem Ber* 1991;124:1215–21.
- [61] Moon ES, Elvas F, Vliegen G, De Lombaerde S, Vangestel C, De Bruycker S, et al. Targeting fibroblast activation protein (FAP): next generation PET radiotracers using squaramide coupled bifunctional DOTA and DATA<sup>5m</sup> chelators. *EJNMMI Radiopharm Chem* 2020;5:19.
- [62] Greifenstein L, Engelbogen N, Lahnif H, Sinnes J, Bergmann R, Bachmann M, et al. Synthesis, labeling and preclinical evaluation of a squaric acid containing PSMA inhibitor labeled with <sup>68</sup>Ga: a comparison with PSMA-11 and PSMA-617. *ChemMedChem* 2020;15:695–704.
- [63] Maleki F, Rezazadeh F, Varmira K. MUC1-targeted radiopharmaceuticals in cancer imaging and therapy. *Mol Pharm* 2021;18:1842–61.
- [64] Epenetos AA, Snook D, Durbin H, Johnson PM, Taylor-Papadimitriou J. Limitations of radiolabeled monoclonal antibodies for localization of human neoplasms. *Cancer Res* 1986;46:3183–91.
- [65] Boyle CC, Paine AJ, Mather SJ. The mechanism of hepatic uptake of a radiolabelled monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1992;50:912–7.

- [66] Simms MS, Murray A, Denton G, Scholfield DP, Price MR, Perkins AC, et al. Production and characterisation of a C595 antibody-<sup>99m</sup>Tc conjugate for immunoscintigraphy of bladder cancer. *Urol Res* 2001;29:13–9.
- [67] Mohammadnejad J, Rasaei MJ, Babaei MH, Paknejad M, Hasan ZM, Salouti M, et al. Radioimmunotherapy of MCF7 breast cancer cell line with <sup>131</sup>I-PR81 monoclonal antibody against MUC1: comparison of direct and indirect radioiodination methods. *Hum Antibodies* 2010;19:15–25.
- [68] Salouti M, Babaei MH, Rajabi H, Rasaei M javad. Preparation and biological evaluation of <sup>177</sup>Lu conjugated PR81 for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol* 2011;38:849–55.
- [69] Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2009;1796:293–308.
- [70] Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Kouhashi R, Yabumoto A, et al. Prediction of sentinel lymph node metastasis using the platelet-to-lymphocyte ratio in T1 breast cancer. *Anticancer Res* 2020;40:2343–9.
- [71] Banerjee S, Pillai MRA, Knapp FF. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chem Rev* 2015;115:2934–74.

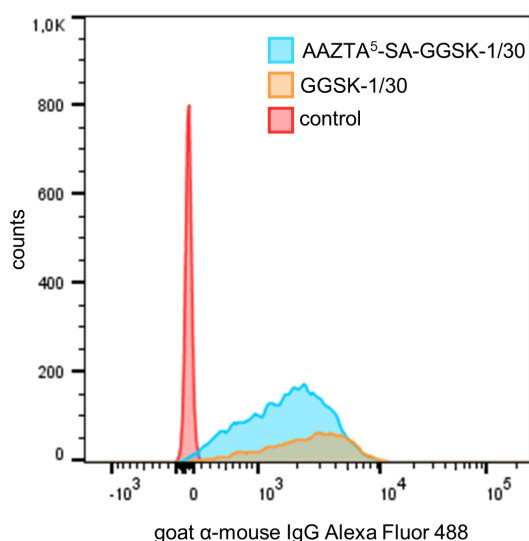


## SUPPORTING INFORMATION

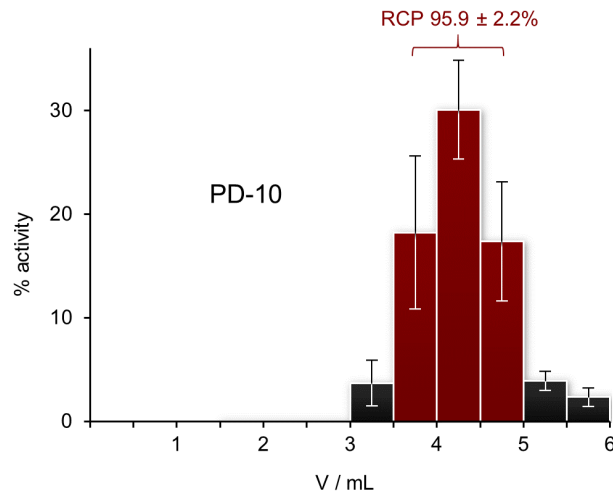
### Figures



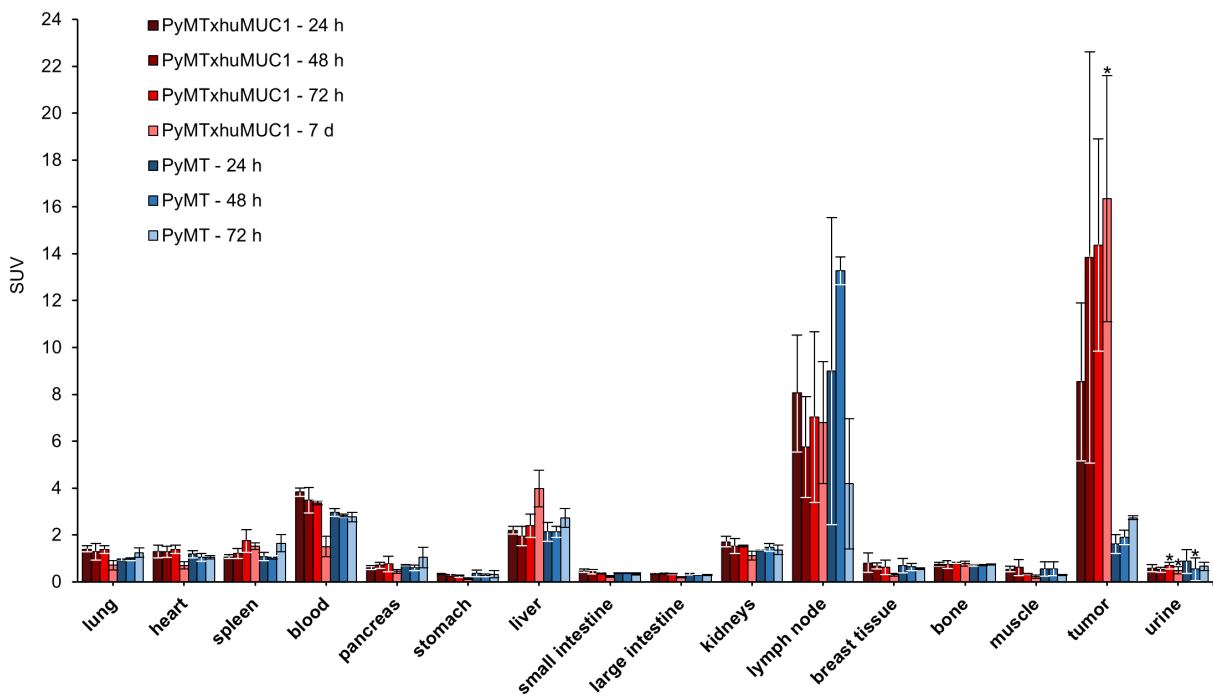
**Figure S1:** MALDI-TOF mass spectra of unmodified GGSK-1/30 mAb and of the corresponding AAZTA<sup>5</sup>-functionalized immunoconjugate. The measured average molecular weights were used to calculate the chelator-to-antibody ratio (CAR) via division of the respective mass shift by the mass gain per conjugated chelator.



**Figure S2:** FACS histogram showing the *in vitro* binding of AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 (1  $\mu$ g/mL, blue) to murine, hu(TA)MUC1 expressing PyMTxhuMUC1 tumor cells ( $2 \times 10^5$ ) in comparison to the unmodified mAb (1  $\mu$ g/mL, orange). For indication, the fluorescence labeled secondary antibody goat- $\alpha$ -mouse-IgG Alexa Fluor 488 was used. Unspecific binding of the secondary antibody to untreated tumor cells served as control (red).



**Figure S3:** Activity distribution as a function of PD-10 elution volume during SEC purification of AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 with values displayed as mean ± SD ( $n = 5$ ).



**Figure S4:** Ex vivo biodistribution 24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i. of 3.9 ± 0.2 MBq (56.3 ± 2.5 µg) [177Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1 and PyMT tumor bearing, 9 weeks old female C57BL/6N mice. Standardized uptake values (SUV) are displayed as mean ± SD (PyMTxhuMUC1:  $n = 5$ ; PyMT:  $n = 2$  (24 h p.i.),  $n = 3$  (48 h, 72 h p.i.)). Values indicated with an asterisk represent a sample size of  $n - 1$ , because one animal of the respective group had no measurable tumor or no urine.

## Tables

**Table S1:** *Ex vivo* biodistribution values (mean  $\pm$  SD % ID/g) 24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i. of  $3.9 \pm 0.2$  MBq ( $56.3 \pm 2.5$   $\mu$ g) [ $^{177}$ Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1 and PyMT tumor bearing, 9 weeks old female C57BL/6N mice. Values indicated with an asterisk represent a sample size of  $n - 1$ , because one animal of the respective group had no measurable tumor or no urine.

% ID/g	PyMTxhuMUC1				PyMT		
	24 h (n = 5)	48 h (n = 5)	72 h (n = 5)	7 d (n = 5)	24 h (n = 2)	48 h (n = 3)	72 h (n = 3)
lung	6.81 $\pm$ 0.67	6.66 $\pm$ 1.63	6.81 $\pm$ 0.82	3.43 $\pm$ 0.99	4.44 $\pm$ 0.40	4.74 $\pm$ 0.14	6.03 $\pm$ 1.01
heart	6.30 $\pm$ 1.34	6.72 $\pm$ 1.04	6.89 $\pm$ 0.89	3.42 $\pm$ 0.82	5.44 $\pm$ 0.70	5.11 $\pm$ 0.83	5.07 $\pm$ 0.46
spleen	5.20 $\pm$ 0.34	6.33 $\pm$ 1.07	8.69 $\pm$ 2.40	7.41 $\pm$ 0.75	4.94 $\pm$ 0.82	5.07 $\pm$ 0.55	7.94 $\pm$ 1.80
blood	18.45 $\pm$ 0.67	18.19 $\pm$ 2.60	16.80 $\pm$ 0.84	7.33 $\pm$ 2.08	13.57 $\pm$ 0.74	13.73 $\pm$ 0.97	13.37 $\pm$ 0.98
pancreas	2.96 $\pm$ 0.35	3.69 $\pm$ 0.65	3.79 $\pm$ 1.62	2.17 $\pm$ 0.40	3.26 $\pm$ 0.12	2.88 $\pm$ 0.50	5.03 $\pm$ 2.06
stomach	1.71 $\pm$ 0.23	1.64 $\pm$ 0.53	1.20 $\pm$ 0.26	0.65 $\pm$ 0.15	1.66 $\pm$ 0.61	1.34 $\pm$ 0.32	1.57 $\pm$ 0.78
liver	10.68 $\pm$ 0.78	10.20 $\pm$ 2.07	11.91 $\pm$ 2.45	19.43 $\pm$ 4.09	9.79 $\pm$ 1.83	10.45 $\pm$ 1.63	13.20 $\pm$ 2.17
s. intestine	2.30 $\pm$ 0.32	2.25 $\pm$ 0.54	1.92 $\pm$ 0.19	1.13 $\pm$ 0.16	1.79 $\pm$ 0.08	1.85 $\pm$ 0.18	1.61 $\pm$ 0.24
l. intestine	1.80 $\pm$ 0.16	2.00 $\pm$ 0.27	1.69 $\pm$ 0.18	0.94 $\pm$ 0.15	1.65 $\pm$ 0.34	1.45 $\pm$ 0.10	1.38 $\pm$ 0.06
kidneys	8.27 $\pm$ 0.90	7.96 $\pm$ 1.49	7.60 $\pm$ 0.31	5.46 $\pm$ 0.89	6.29 $\pm$ 0.20	7.14 $\pm$ 0.29	6.58 $\pm$ 0.87
lymph node	39.08 $\pm$ 13.27	29.66 $\pm$ 9.46	34.80 $\pm$ 17.53	33.15 $\pm$ 12.75	41.24 $\pm$ 30.05	64.49 $\pm$ 1.55	20.20 $\pm$ 13.39
breast tissue	4.00 $\pm$ 2.09	3.50 $\pm$ 0.48	3.10 $\pm$ 1.43	1.49 $\pm$ 0.25	3.15 $\pm$ 1.41	3.06 $\pm$ 0.60	2.76 $\pm$ 0.23
bone	3.64 $\pm$ 0.36	3.87 $\pm$ 0.90	4.19 $\pm$ 0.26	3.79 $\pm$ 0.53	3.24 $\pm$ 0.14	3.65 $\pm$ 0.47	3.56 $\pm$ 0.14
muscle	2.66 $\pm$ 0.49	3.19 $\pm$ 1.57	1.68 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.35	2.52 $\pm$ 1.43	2.75 $\pm$ 1.55	1.38 $\pm$ 0.15
tumor	40.77 $\pm$ 14.86	72.21 $\pm$ 46.42	71.35 $\pm$ 22.04	80.39 $\pm$ 26.49*	7.38 $\pm$ 1.86	9.23 $\pm$ 1.70	13.24 $\pm$ 0.65
urine	2.85 $\pm$ 0.65	2.73 $\pm$ 0.70	3.52 $\pm$ 0.67*	2.38 $\pm$ 0.73*	4.03 $\pm$ 2.35	2.52 $\pm$ 2.14*	3.22 $\pm$ 0.91

**Table S2:** *Ex vivo* biodistribution values (mean  $\pm$  SD SUV) 24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i. of  $3.9 \pm 0.2$  MBq ( $56.3 \pm 2.5$   $\mu$ g) [ $^{177}$ Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1 and PyMT tumor bearing, 9 weeks old female C57BL/6N mice. Values indicated with an asterisk represent a sample size of  $n - 1$ , because one animal of the respective group had no measurable tumor or no urine.

SUV organ/tissue	PyMTxhuMUC1				PyMT		
	24 h (n = 5)	48 h (n = 5)	72 h (n = 5)	7 d (n = 5)	24 h (n = 2)	48 h (n = 3)	72 h (n = 3)
lung	1.41 $\pm$ 0.14	1.28 $\pm$ 0.36	1.37 $\pm$ 0.16	0.71 $\pm$ 0.21	0.97 $\pm$ 0.09	0.98 $\pm$ 0.06	1.25 $\pm$ 0.21
heart	1.31 $\pm$ 0.27	1.29 $\pm$ 0.24	1.39 $\pm$ 0.18	0.70 $\pm$ 0.16	1.19 $\pm$ 0.15	1.05 $\pm$ 0.17	1.05 $\pm$ 0.08
spleen	1.08 $\pm$ 0.08	1.21 $\pm$ 0.21	1.75 $\pm$ 0.48	1.52 $\pm$ 0.14	1.08 $\pm$ 0.18	1.04 $\pm$ 0.07	1.64 $\pm$ 0.36
blood	3.83 $\pm$ 0.17	3.48 $\pm$ 0.55	3.38 $\pm$ 0.09	1.51 $\pm$ 0.44	2.96 $\pm$ 0.16	2.82 $\pm$ 0.06	2.77 $\pm$ 0.21
pancreas	0.61 $\pm$ 0.08	0.71 $\pm$ 0.13	0.76 $\pm$ 0.33	0.44 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.03	0.59 $\pm$ 0.11	1.04 $\pm$ 0.44
stomach	0.35 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.07	0.24 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.13	0.28 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.16
liver	2.22 $\pm$ 0.16	1.95 $\pm$ 0.42	2.40 $\pm$ 0.49	3.99 $\pm$ 0.78	2.13 $\pm$ 0.40	2.14 $\pm$ 0.24	2.73 $\pm$ 0.41
s. intestine	0.48 $\pm$ 0.07	0.43 $\pm$ 0.10	0.39 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.05
l. intestine	0.37 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.02
kidneys	1.72 $\pm$ 0.22	1.52 $\pm$ 0.32	1.53 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.19	1.37 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.16	1.36 $\pm$ 0.21
lymph node	8.04 $\pm$ 2.49	5.76 $\pm$ 2.15	7.03 $\pm$ 3.65	6.80 $\pm$ 2.60	8.99 $\pm$ 6.55	13.27 $\pm$ 0.58	4.19 $\pm$ 2.78
breast tissue	0.82 $\pm$ 0.40	0.67 $\pm$ 0.13	0.63 $\pm$ 0.31	0.31 $\pm$ 0.06	0.69 $\pm$ 0.31	0.63 $\pm$ 0.16	0.57 $\pm$ 0.04
bone	0.76 $\pm$ 0.08	0.74 $\pm$ 0.16	0.84 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.06	0.74 $\pm$ 0.03
muscle	0.55 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.34	0.34 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.31	0.56 $\pm$ 0.29	0.29 $\pm$ 0.03
tumor	8.53 $\pm$ 3.37	13.84 $\pm$ 8.77	14.37 $\pm$ 4.53	16.35 $\pm$ 5.25*	1.61 $\pm$ 0.41	1.90 $\pm$ 0.31	2.74 $\pm$ 0.08
urine	0.59 $\pm$ 0.15	0.52 $\pm$ 0.11	0.70 $\pm$ 0.14*	0.49 $\pm$ 0.16*	0.88 $\pm$ 0.51	0.54 $\pm$ 0.49*	0.66 $\pm$ 0.18

**Table S3:** Uptake ratios (mean  $\pm$  SD) of tumor-to-non-target tissue 24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i. of  $3.9 \pm 0.2$  MBq ( $56.3 \pm 2.5$   $\mu$ g) [ $^{177}$ Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1 and PyMT tumor bearing, 9 weeks old female C57BL/6N mice. Values indicated with an asterisk represent a sample size of  $n - 1$ , because one animal of the respective group had no measurable urine.

tumor-to-organ/tissue ratio	PyMTxhuMUC1				PyMT		
	24 h (n = 5)	48 h (n = 5)	72 h (n = 5)	7 d (n = 4)	24 h (n = 2)	48 h (n = 3)	72 h (n = 3)
lung	6.04 $\pm$ 2.18	10.52 $\pm$ 5.89	10.34 $\pm$ 2.31	25.71 $\pm$ 6.68	1.65 $\pm$ 0.27	1.95 $\pm$ 0.41	2.24 $\pm$ 0.38
heart	6.88 $\pm$ 3.45	10.29 $\pm$ 5.21	10.37 $\pm$ 3.28	23.65 $\pm$ 7.05	1.39 $\pm$ 0.52	1.87 $\pm$ 0.65	2.62 $\pm$ 0.13
spleen	7.79 $\pm$ 2.63	11.17 $\pm$ 6.82	8.75 $\pm$ 3.41	10.91 $\pm$ 3.62	1.48 $\pm$ 0.13	1.81 $\pm$ 0.17	1.73 $\pm$ 0.42
blood	2.21 $\pm$ 0.78	3.83 $\pm$ 2.16	4.24 $\pm$ 1.29	11.83 $\pm$ 2.55	0.54 $\pm$ 0.11	0.67 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.09
pancreas	13.98 $\pm$ 5.44	19.47 $\pm$ 12.62	22.21 $\pm$ 11.78	37.90 $\pm$ 16.31	2.27 $\pm$ 0.65	3.22 $\pm$ 0.41	3.05 $\pm$ 1.54
stomach	24.48 $\pm$ 9.72	47.22 $\pm$ 33.37	61.41 $\pm$ 21.34	111.51 $\pm$ 22.92	4.55 $\pm$ 0.54	7.19 $\pm$ 2.40	9.84 $\pm$ 4.47
liver	3.81 $\pm$ 1.36	6.74 $\pm$ 3.41	6.25 $\pm$ 2.32	4.03 $\pm$ 0.96	0.75 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.08	1.02 $\pm$ 0.13
s. intestine	17.71 $\pm$ 5.35	30.75 $\pm$ 15.69	36.61 $\pm$ 8.15	69.33 $\pm$ 22.50	4.14 $\pm$ 1.23	4.98 $\pm$ 0.60	8.34 $\pm$ 1.55
l. intestine	22.51 $\pm$ 7.54	34.69 $\pm$ 19.04	42.46 $\pm$ 13.57	87.52 $\pm$ 19.87	4.68 $\pm$ 2.08	6.39 $\pm$ 1.13	9.63 $\pm$ 0.89
kidneys	4.86 $\pm$ 1.41	8.75 $\pm$ 4.92	9.41 $\pm$ 2.96	15.73 $\pm$ 6.74	1.18 $\pm$ 0.33	1.30 $\pm$ 0.28	2.04 $\pm$ 0.38
lymph node	1.21 $\pm$ 0.75	2.34 $\pm$ 1.14	2.46 $\pm$ 1.21	3.53 $\pm$ 2.99	0.27 $\pm$ 0.24	0.14 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.56
breast tissue	12.62 $\pm$ 7.09	21.87 $\pm$ 16.01	27.59 $\pm$ 16.30	55.96 $\pm$ 14.71	2.75 $\pm$ 1.83	3.18 $\pm$ 1.24	4.81 $\pm$ 0.17
bone	11.18 $\pm$ 3.85	18.60 $\pm$ 11.45	17.04 $\pm$ 5.42	20.76 $\pm$ 5.38	2.27 $\pm$ 0.48	2.56 $\pm$ 0.59	3.72 $\pm$ 0.18
muscle	15.56 $\pm$ 5.61	26.31 $\pm$ 23.36	42.33 $\pm$ 12.88	81.77 $\pm$ 50.66	3.24 $\pm$ 1.10	4.06 $\pm$ 1.91	9.63 $\pm$ 0.75
urine	14.28 $\pm$ 3.98	29.39 $\pm$ 25.22	20.59 $\pm$ 9.07*	34.14 $\pm$ 10.13	2.05 $\pm$ 0.73	5.17 $\pm$ 4.46*	4.35 $\pm$ 1.26



**5.5 Teilprojekt E: *<sup>18</sup>F-labeled, PSMA-specific liposomes: promising and PET-traceable tool for future targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer***





**<sup>18</sup>F-labeled, PSMA-specific liposomes: promising and PET-traceable tool for future targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer**

[redacted], Benedikt Klasen<sup>2\*</sup>, [redacted]

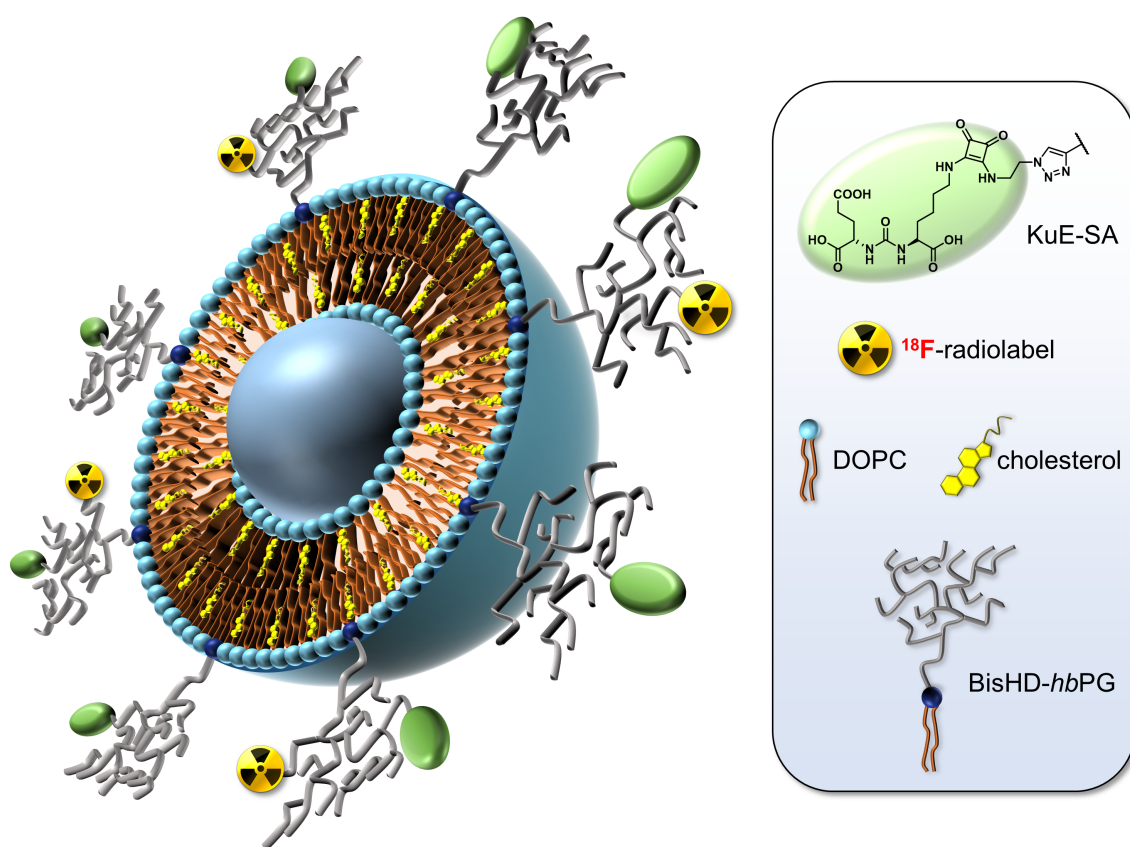
[redacted]  
[redacted]

<sup>2</sup>*Department of Chemistry – TRIGA site, Johannes Gutenberg University Mainz,  
Fritz-Strassmann Weg 2, D-55128 Mainz, Germany*

*\*equal contribution*

## ABSTRACT

Inhibitors of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) belong to one of the most important substance classes in nuclear medicine. L-Lysine-urea-L-glutamate (KuE) represents a key motif in recent diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals targeting the PSMA. Multifunctional polyether structures play a crucial role in shielding liposomes from degradation in the blood stream due to their stealth effect. In this work alkyne-functionalized hyperbranched polyglycerols (*hbPG*) with a long hydrophobic alkyl chain anchor (BisHD) were synthesized and consecutively modified with an azide-bearing, squaramide coupled PSMA inhibitor (KuE-SA-azide) via Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC). Subsequent radiolabeling via similar reaction of [ $^{18}\text{F}$ ]-TEG-azide with residual alkyne groups followed by liposomal preparation led to a promising system for future targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer that can be pre-evaluated *in vitro* and *in vivo* via positron emission tomography (PET).



## INTRODUCTION

Among men, prostate cancer is the most common cancer in industrialized countries and the fifth leading cause of cancer death worldwide [1,2]. However, with early detection, there are good treatment options leading to a five-year survival rate of more than 90% [2,3]. The prostate-specific membrane antigen (PSMA) is associated with the diagnosis of prostate cancer. This membrane-bound glycoprotein belongs to the group of carboxypeptidases, which cleaves off C-terminal glutamate and for example catalyzes the hydrolysis of *N*-acetylaspartyl-glutamate to *N*-acetylaspartate. It is rarely found in healthy tissues but shows overexpression in prostate cancer cells [4,5]. For this reason, a variety of radiopharmaceutical drugs based on longer peptides, antibodies and small molecules targeting PSMA have been used for the diagnosis and treatment of prostate cancer [6,7]. These compounds have similar structures to *N*-acetylaspartyl-glutamate with a C-terminal glutamate to address the glutamate recognition domain of PSMA [8]. Furthermore, the glutamate moiety must be attached to another non-cleavable group to prevent cleavage by PSMA *in vivo*. The presence of an aromatic moiety in the linker region significantly improves the affinity of the radiopharmaceutical by addressing an aromatic binding moiety in the binding pocket of the PSMA [9]. A variety of PSMA inhibitors are urea-based, such as the most important PSMA radiopharmaceuticals PSMA-11 and PSMA-617 [8,10,11]. The lead structure of these molecules is a L-lysine-urea-L-glutamate (KuE) motif that resembles the structure of *N*-acetylaspartyl-glutamate and is not cleavable by PSMA.

The use of squaric acid diethyl ester (3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione, SADE) as coupling reagent provides a unique strategy for conjugation of target vectors, linker units and other molecules. It is already widely used in the coupling of biomolecules for preparation of e.g. carbohydrate- or protein-polymer-conjugates [12].

The application of SADE simplifies the synthetic process. For example, no protective groups or further coupling reagents are required. There are also no by-products that need to be removed.

The two ester groups react selectively with amines under mild conditions [13]. The amidation can be carried out asymmetrically via pH control, since formation of the monoamide in the first step leads to reduced reactivity. By increasing the pH value, deprotonation occurs, whereby the aromatic stabilization of the monoamide is lost and the second amidation can take place [14–16]. This prevents dimerization and enables asymmetric amidation with high selectivity and high yields.

Squaric acid shows a high acidity ( $pK_{a1} = 0.5\text{--}1.2$ ;  $pK_{a2} = 2.2\text{--}3.5$ ) and due to Hückel rule ( $[4n + 2]$   $\pi$ -electrons,  $n = 0$ ) for aromatic systems, it represents an aromatic unit [17,18]. In PSMA-specific radiopharmaceuticals, squaric acid thus provides a moiety that interacts with the aromatic binding site in the binding pocket leading to increased affinity [19,20].

The problem with small molecules, however, is their rapid excretion by the kidney and the associated short retention in the blood. In order to increase the circulation time, a variety of approaches have been pursued in recent decades [21,22]. One possible approach is to use drug delivery systems such as liposomes [23,24]. Liposomes are vesicular structures that mimic a biomembrane. They typically consist of amphiphilic phospholipids and are often additionally stabilized using cholesterol. The problem with these systems is that they are easily recognized by macrophages of the mononuclear phagocyte system (MPS) due to their size, which leads to increased uptake in the liver and spleen [23,25,26]. To increase the circulation time in the blood, the stealth effect of PEGylated systems is used. Polyethylene glycol chains are attached to the surface of the liposomes to shield them from

macrophages [27,28]. PEG has been the "gold standard" for creating stealth liposomes for years [29]. In recent years, however, antibody-mediated immune responses have been increasingly observed [30]. In addition, functional groups for further functionalization are missing because methoxy-PEG (mPEG) is commonly used. A promising alternative is the highly biocompatible and water-soluble hyperbranched polyglycerol (*hbPG*) [31]. Hyperbranched polyglycerol has a large number of hydroxyl groups, which allows functionalization with targeting vectors or ligands and radiolabels for actively targeted drug delivery [32]. Wagener *et al.* investigated and compared liposome shielding *in vivo* via PET using  $^{18}\text{F}$ -labeled, linear and hyperbranched polyether lipids. They observed comparably high stability and prolonged blood circulation of all investigated structures with differences in spleen accumulation mainly due to the different liposomal sizes [33]. Furthermore, very recently, they analogously prepared and investigated either fluorescence- or radiolabeled liposomes being functionalized with trimannose moieties for active targeting of dendritic cells (DCs). Compared to non-functionalized liposomes, the trimannosylated analogues provided significantly increased uptake in the spleen and liver, presumably due to the presence of DCs [34]. Hofmann *et al.* introduced different strategies to synthesize a variety of linear-hyperbranched polyether lipids. For this purpose, cholesterol or dialkyl-based anchors with different chain length are directly used as initiators in an anionic ring opening polymerization (AROP) of various epoxide monomers. This procedure enables a variety of polyether architectures with an adjustable number of hydroxyl groups [35]. Furthermore, a study showed the stability of liposomes depending on the used anchor structure. Anchor structures with an alkyl chain between 18–20 methylene units showed an inherently higher stability of the liposomal membrane compared to cholesterol [36].

The cyclotron-produced positron-emitter fluorine-18 provides several advantageous properties for radiolabeling and *in vivo* evaluation of liposomal structures via PET. Although it belongs to the shorter-lived radionuclides, its half-life of 109.7 min is longer than that of many other commonly used PET-isotopes (such as  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ) allowing for more time-consuming synthesis and making it suitable not only for imaging of small molecules but also larger systems with prolonged circulation such as peptides, polymers and liposomes [37,38]. Furthermore, the almost exclusive  $\beta^+$ -decay (96.9%) of fluorine-18 produces low energy positrons ( $E_{\beta^+, \text{max}} = 634 \text{ keV}$ ) ensuring a high spatial PET-resolution [39]. In contrast to radiometals, fluorine-18 is typically covalently bound to the respective molecule. Therefore, utilization of larger chelating structures that may impair liposome preparation or affect the shielding properties of the liposomal surface, is not required. Application of a structurally compliant,  $^{18}\text{F}$ -labeled synthon such as the frequently used 1-azido-2-(2-(2- $^{18}\text{F}$ fluoroethoxy)ethoxy)ethane ( $^{18}\text{F}$ -TEG- $\text{N}_3$ ) enables indirect radiolabeling of the hyperbranched polyether construct without significantly affecting its chemical and biological properties [33,34,40,41].

In the present study the initial steps included synthesis of both an alkyne-functionalized hyperbranched polyglycerol with a long hydrophobic alkyl chain anchor and an azide-bearing, squaramide coupled KuE-derivative. In the next step the corresponding KuE-functionalized polyether lipid was formed via CuAAC. Subsequently, the previously synthesized precursor 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl-*p*-toluenesulfonate (Ts-TEG- $\text{N}_3$ ) was  $^{18}\text{F}$ -labeled using a custom-built semiautomatic modular system. A second copper(I)-catalyzed click-reaction between the resulting  $^{18}\text{F}$ -TEG- $\text{N}_3$  and residual alkyne groups of the polyether led to the desired radiolabeled lipid. In the final step, the corresponding liposomes were prepared via thin film hydration method using DOPC and cholesterol as additives and liposomal size was adjusted by repeated extrusion. SEC purification finally resulted in

<sup>18</sup>F-labeled, KuE-functionalized, *hb*PG-shielded liposomes representing a promising system for future drug delivery in the treatment of prostate cancer that can be traced and pre-evaluated *in vivo* via PET.

## EXPERIMENTAL PART

### Terminology

The amphiphilic block copolymer based on the hydrophobic initiator 1,2-bis-*n*-hexadecyl glyceryl ether (BisHD-OH) and the monomer ethoxyethyl glycidyl ether (EEGE) to synthesize the protected macro-initiator is named BisHD-P(EEGE). After cleavage of the acetal protecting groups the resulting linear poly(glycerol) (*lin*PG) is named BisHD-*lin*PG. After the slow monomer addition (SMA) with the monomer glycidol, the resulting hyperbranched polyglycerol (*hb*PG) polymer is named BisHD-*hb*PG. The precursor 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl-*p*-toluenesulfonate is named Ts-TEG-N<sub>3</sub> and the <sup>18</sup>F-labeled click-synthon 1-azido-2-(2-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethoxy)ethoxy)ethane is named [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub>. The PSMA-inhibitor 2-(3-(5-amino-1-carboxy-pentyl)ureido)pentanedioic acid (L-lysine-urea-L-glutamate) is named KuE and its azide-bearing, squaramide coupled derivative is named KuE-SA-N<sub>3</sub>. The KuE-SA-functionalized BisHD-*hb*PG is named either BisHD-*hb*PG-KuE-SA or KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hb*PG.

### Instrumentation and Materials

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz) and 2D spectra were recorded on a Bruker Avance III HD 300 (5 mm BBFO-Probe Z-gradient and ATM). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) and 2D spectra were measured on a Bruker Avance II 400 MHz (5 mm BBFO-Probe Z-gradient and ATM, SampleXPress 60 auto sampler). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz), <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz) and 2D spectra were measured on a Bruker Avance III 600 MHz (5 mm TCI-CryoProbe Z-gradient and ATM, SampleXPress lite 16 sampler). The chemical shifts were internally referred to residual proton signals of the deuterated solvent. The NMR spectra were analyzed via MestReNova v11.0 software.

Mass spectrometry was measured via Agilent Technologies 1220 Infinity LC system coupled to an Agilent Technologies 6130 Single Quadrupole LC/MS system. HPLC purification and analysis was performed using a Merck LaChrom system with Hitachi L7100 pump and L7400 UV-detector and the respectively mentioned column and conditions. Spin Filtration was carried out using Pall Microsep Advance centrifugal filters (MWCO = 1000 g/mol).

Size exclusion chromatography (SEC) for the synthesized polymers was performed at 50 °C in *N,N*-dimethylformamide (with 1 g/L lithium bromide added) as eluent on an Agilent 1100 Series equipped with Polymer Standards Service (PSS) HEMA columns with 300/100/40 Å porosity and a RI detector. The determination of the molecular weights was determined by a calibration with poly(ethylene glycol) standards by PSS.

During radiosynthesis, activity of the samples was measured using a PC-based dose calibrator (ISOMED 2010, Nuklear Medizintechnik Dresden GmbH). Radio thin layer chromatography (radio-TLC) was performed using Merck Silica 60 F<sub>254</sub> TLC plates and ethylacetate:hexane (1:1) as mobile phase. Radio-TLC results were analyzed via image plate scanner (CR35-Bio, Elysia Raytest) and AIDA Image Analysis software (Elysia Raytest).

Dynamic light scattering (DLS) was measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS. The cell holder was equipped with a Peltier-controlled thermostat. The samples were prepared with a concentration of 1 µL per 1 mL of PBS-buffer solution from Sigma Aldrich (dilution 1:1000) and measured at a laser

wavelength of 633 nm and a scattering angle of 173°. All samples were measured at a constant temperature of 25 °C. Measurements were performed in disposable polystyrene cuvettes from the company Brand. The analysis was carried out using Malvern Zetasizer Software 7.11 from Macromedia.

All solvents and reagents were purchased generally from the suppliers Acros Organics, Tokyo Chemical Industry (TCI), Sigma-Aldrich, Fluka, Fisher Scientific, Alfa Aesar, IRIS Biotech and VWR and were used as received unless otherwise stated. Deuterated solvents were purchased from Deutero GmbH. Dialysis membranes (regenerated cellulose, MWCO = 500 g/mol and MWCO = 1000 g/mol) were purchased from Orange Scientific. EEGE was synthesized according to literature [42]. Glycidol was stirred over CaH<sub>2</sub> and freshly distilled before use. Dry *N*-methylpyrrolidone (NMP) was stored over molecular sieve before use.

Aqueous [<sup>18</sup>F]fluoride was produced via proton-irradiation of enriched [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O using a PETtrace 700S cyclotron (GE Healthcare).

## Synthesis procedure

### Synthesis of the hydrophobic alkyl chain anchor (BisHD-OH)

BisHD-OH was synthesized as described in literature [43]. More details are provided in the supporting information (Scheme S1, Fig. S1).

### Synthesis of BisHD-*lin*PG macroinitiator

The synthesis was carried out according to literature [44] and is described for BisHD-*lin*PG<sub>22</sub> as a representative example.

1,2-Bis-*n*-hexadecyl glyceryl ether (BisHD-OH) (2.00 g, 3.70 mmol, 1 eq.) and CsOH monohydrate (0.56 mg, 3.33 mmol, 0.9 eq.) was placed in a dry Schlenk flask and dissolved in benzene (10 mL). The solution was stirred at 60 °C for at least 30 min and dried in vacuo overnight to remove moisture. Dry dioxane (50 mL) was added and after 20 min EEGE (11.89 g, 81.34 mmol, 12.01 mL, 22 eq.) via syringe. The solution was stirred at 80 °C for 6 d. The solvent was removed in vacuo. The polymer was dissolved again in methanol (50 mL) and 4 g of an acidic ion exchange resin (Dowex 50WX8) was added to the polymer solution to cleave the acetal protecting groups of BisHD-P(EEGE). The solution was stirred and heated to 50 °C overnight. Afterwards, the resin was removed by filtration and the solvent was removed partly in vacuo. The crude polymer was precipitated twice in cold diethyl ether. The resulting block copolymer was dried in vacuo. The polymer was isolated as a brownish resin in a yield of 90%. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz, δ [ppm]): 4.78–4.25 (m, 15H, OH); 3.67–3.13 (m, 123H, CH<sub>2</sub>-O and CH<sub>2</sub>-CH-O); 1.48–1.43 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); 1.35–1.05 (m, 52H, CH<sub>2</sub>); 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>).

## Synthesis of BisHD-*hbPG*

The synthesis was carried out according to literature [44]. Hypergrafting of glycidol is described for the macroinitiator BisHD-*linPG*<sub>22</sub> as a representative example.

The macroinitiator BisHD-*linPG*<sub>22</sub> (0.20 g, 0.10 mmol, 1 eq.) was placed in a Schlenk flask, dissolved in benzene (3 mL) and dried in vacuo overnight. BisHD-*linPG*<sub>22</sub> was again dissolved in benzene (2 mL) and CsOH monohydrate (33.58 mg, 0.20 mmol, 2 eq., equates to a degree of deprotonation of 10% of hydroxyl groups) was added. The solution was stirred at 60 °C for at least 1 hour and dried in vacuo overnight to remove moisture. The macroinitiator was dissolved in *N*-methylpyrrolidone (NMP) (1 mL) and a solution of glycidol (0.59 mg, 7.90 mmol, 0.51 mL, 40 eq.) (5%) in NMP was added to the initiator solution over a time period of 16 h (0.5 mL/h) at 100 °C. The solution was stirred for additional 2 h to ensure complete conversion of glycidol. Subsequently, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was dialyzed for 16 h against methanol (MWCO = 1000 g/mol). The solvent was removed under reduced pressure and the product was dried in vacuo. The polymer was isolated in a yield of 60%. <sup>1</sup>H-NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 6.58–5.80 (m, 74H, OH); 4.44–3.45 (m, 380H, CH<sub>2</sub>-O and CH<sub>2</sub>-CH-O); 1.73–1.60 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); 1.44–1.20 (m, 52H, CH<sub>2</sub>); 0.88 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>).

## Functionalization of BisHD-*hbPG* with propargyl bromide

The functionalization is described for BisHD-*hbPG*<sub>74</sub> as representative example.

BisHD-*hbPG*<sub>74</sub> (0.70 g, 0.12 mmol, 1 eq.) was placed in a Schlenk flask and dissolved in dimethylformamide (DMF) (15 mL). The solution was cooled to 0 °C and sodium hydride (19.6 mg, 0.82 mmol, 7 eq.) was added. The solution was stirred for 1 h at 0 °C to ensure complete deprotonation. Subsequently, propargyl bromide (0.52 mL, 0.46 mmol, 4 eq.) (80 wt% in toluene) was added and the mixture was allowed to slowly reach room temperature. The solution was stirred at room temperature for 2 d. Afterwards, water (2 mL) was added and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dialyzed against methanol (MWCO = 500 g/mol) for 24 h. The solvent was removed under reduced pressure and the product was dried in vacuo overnight. The alkyne-functionalized polymer was isolated in a yield of 75%. <sup>1</sup>H-NMR (pyridine-*d*<sub>5</sub>, 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 6.61–5.86 (s, 67H, OH); 4.73–4.49 (s, 4H, OCH<sub>2</sub>-CCH); 4.46–3.48 (m, 383H, CH<sub>2</sub>-O and CH<sub>2</sub>-CH-O); 1.74–1.60 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O); 1.49–1.17 (s, 52H, CH<sub>2</sub>); 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>).

## Synthesis of KuE-SA-N<sub>3</sub>

Synthesis of the squaramide functionalized PSMA inhibitor KuE-SA was carried out according to the already published procedure [20] as follows.

### 2-(3-(5-Amino-1-carboxy-pentyl)ureido)pentanedioic acid (L-lysine-urea-L-glutamate, KuE)

H-Glu(*t*Bu)-O*t*Bu (0.9 g, 3 mmol) and DIPEA (2 mL, 12 mmol) were dissolved in dry dichloromethane (150 mL). The solution was cooled to 0 °C and triphosgene (300 mg, 1 mmol) was added over a period of 4 h. The solution was then stirred for 1 h at room temperature. The H-Lys(Boc)-2CT-polystyrene solid phase (0.78 mmol/g, 390 mg, 0.3 mmol) was added to the reaction solution and stirred for additional 16 h at room temperature. The solid phase was filtered and washed with dichloromethane. The product was cleaved from the solid phase with TFA (3 × 7 mL, 10 min, RT) and purified by



semipreparative HPLC (column: Phenomenex Luna C18 (250 × 10 mm) 10 μ, flow rate: 5 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeCN + 0.1% TFA, 0–5% MeCN in 20 min, *t<sub>R</sub>* = 9.0 min). KuE was obtained as a colorless oil (67.9 mg, 0.21 mmol, 71%). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz, δ [ppm]): 4.22 (ddd, *J* = 12.4 Hz, 9.0 Hz, 5.0 Hz, 2H, HOOC-CH-NH-CO); 2.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.50 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.16 (dtd, *J* = 14.9 Hz, 7.5 Hz, 5.1 Hz, 1H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.00–1.76 (m, 2H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.76–1.60 (m, 3H, NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.55–1.22 (m, 2H, NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 320.1 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: 319.14.

### **2-(3-(1-Carboxy-5-((2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)pentyl)ureido)-pentanedioic acid (KuE-SA)**

KuE (10 mg, 31.3 μmol) was dissolved in 0.5 M phosphate-buffer (pH 7; 250 μL). To this solution 3,4-diethoxycyclobut-3-ene-1,2-dione (5.3 mg, 4.6 μL, 31.3 μmol) was added. The pH was adjusted to 7 using 1 M NaOH. The solution was shaken for 16 h. The product KuE-SA was purified by semipreparative HPLC (column: Phenomenex Luna C18 (250 × 10 mm) 10 μ, flow rate: 5 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeCN + 0.1% TFA, 12–30% MeCN in 20 min, *t<sub>R</sub>* = 10.0 min) and obtained as a colorless solid (27.8 mg, 62.7 μmol, 23%). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz, δ [ppm]): 4.75–4.65 (m, 2H, HOOC-CH-NH-CO); 4.30–4.12 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3.59 (dt, *J* = 23.5 Hz, 6.6 Hz, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 3.48 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, NH-CH<sub>2</sub>); 2.49 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.16 (dtd, *J* = 15.3 Hz, 7.4 Hz, 5.2 Hz, 1H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.04–1.90 (m, 1H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.86–1.75 (m, 2H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.73–1.46 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.41 (dt, *J* = 7.1 Hz, 3.6 Hz, 5H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 300 MHz δ [ppm]): 188.86 (NH-C-CO); 182.94 (O-C-CO); 177.13 (HOOC-CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-COOH); 176.95 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 176.05 (NH-C=C-O); 173.15 (NH-C=C-O); 159.08 (NH-CO-NH); 70.41 (O-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 52.91 (HOOC-CH-NH (Lys)); 52.48 (HOOC-CH-NH (Glu)); 44.03 ((NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)); 30.26 (NH-CH<sub>2</sub>); 29.91 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 28.86 (NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 26.15 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 21.59 (NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 14.95 (O-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>). MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 444.2 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 443.15.

### **2-Azidoethylamine**

2-Bromoethylamine hydrobromide (1 g, 4.9 mmol) and sodium azide (952 mg, 14.6 mmol) were dissolved in water (15 mL) and stirred overnight at 75 °C. The reaction mixture was cooled to 0 °C and potassium hydroxide (1.2 g, 21.4 mmol) was added. The product was extracted from the aqueous solution with diethyl ether (3 × 20 mL). The organic layer was evaporated under reduced pressure and 2-azidoethylamine was obtained as colorless oil (372 mg, 4.3 mmol, 87%). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ [ppm]): 3.37 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2.92–2.84 (m, 2H, N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.42 (s, 2H, NH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ [ppm]): 54.50 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 41.47 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>). MS ESI<sup>+</sup> (*m/z*): found 87.1 [M + H<sup>+</sup>], calculated for C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>: 86.06.

### **2-(3-(5-((2-Azidoethyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)-1-carboxypentyl)ureido)-pentanedioic acid (KuE-SA-N<sub>3</sub>)**

2-Azidoethylamine (40 mg, 0.46 μmol) and KuE-SA (6 mg, 13.5 μmol) were dissolved in 0.5 M phosphate-buffer (pH 9, 300 μL) and the pH was re-adjusted to 9 with 1 M NaOH solution. The reaction mixture was shaken overnight and the product (6 mg, 12.4 μmol, 92%) was obtained as a colorless oil after semipreparative HPLC purification (column: Phenomenex Luna C18 (250 × 10 mm) 10 μ, flow

rate: 5 mL/min, H<sub>2</sub>O/MeCN + 0.1% TFA, 10–40% MeCN in 20 min,  $t_R$  = 8.2 min). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz  $\delta$  [ppm]): 4.25 (dd,  $J$  = 9.1 Hz, 5.1 Hz, 1H, HOOC-CH-Glu); 4.19 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 4.9 Hz, 1H, HOOC-CH-Lys); 3.55–3.49 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 3.17 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 2.50 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, HOOC-CH<sub>2</sub>); 2.17 (dq,  $J$  = 12.5 Hz, 7.3 Hz, 1H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2.00–1.89 (m, 1H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.85 (p,  $J$  = 7.9 Hz, 7.2 Hz, 1H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.73 (dt,  $J$  = 13.7 Hz, 6.9 Hz, 1H, HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.64 (p,  $J$  = 7.3 Hz, 6.4 Hz, 2H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.45 (q,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 177.26 (SA-C=O); 176.86 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 176.10 (2C, HOOC-CH); 159.15 (NH-CO-NH); 117.66 (NH-C-C-NH); 114.80 (NH-C-C-NH); 53.06 (HOOC-CH-Lys); 52.47 (HOOC-CH-Glu); 51.45 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 43.50 (NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 30.37 (NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>); 29.87 (HOOC-CH<sub>2</sub>); 29.36 (NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 26.07 (HOOC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 21.62 (NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>). MS ESI<sup>+</sup> (m/z): found 484.4 [M + H<sup>+</sup>], 506.2 [M + Na<sup>+</sup>], calculated for C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>: 483.17.

### Synthesis of KuE-SA-triazolyl-BisHD-hbPG

KuE-SA-functionalization of BisHD-hbPG via CuAAC was performed according to a modified protocol by Yamamoto *et al.* [45]. The synthesis is described for KuE-SA-triazolyl-BisHD-hbPG<sub>74</sub> as representative example.

Alkyne-BisHD-hbPG<sub>74</sub> (23 mg, 3.8  $\mu$ mol, ca. 7 alkyne groups per polymer) was dissolved in PBS (1 mL). KuE-SA-N<sub>3</sub> (4.6 mg, 9.5  $\mu$ mol) in PBS (1 mL), DMSO (36  $\mu$ L) and PMDETA (1  $\mu$ L, 3.8  $\mu$ mol) were added. The mixture was heated to 45 °C and CuBr (5.4  $\mu$ L of a 1 mg/mL solution in DMSO; 5.4  $\mu$ g, 0.038  $\mu$ mol) was added and stirred at 45 °C and under argon atmosphere for 16 h. Purification was carried out by spin filtration. The solution was transferred into a centrifuge tube (Pall Microsep Advance 1K) and centrifuged for 30 min (4696 g). The concentrate was dissolved in water (1 mL) and centrifuged again for 15 min (4696 g). This washing step was repeated 7 times. In the last step the concentrate was centrifuged (4696 g) for 1 h. Lyophilisation gave the product as brownish solid (24.2 mg).

### Synthesis of the precursor Ts-TEG-N<sub>3</sub>

2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethyl-*p*-toluenesulfonate (Ts-TEG-N<sub>3</sub>) was synthesized as described in the literature [40].

### Radiosynthesis of [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub>

Radiolabeling of the precursor Ts-TEG-N<sub>3</sub> and subsequent purification to produce 1-azido-2-(2-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethoxy)ethoxy)ethane [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub> was performed via semiautomatic custom modular system using cyclotron-produced [<sup>18</sup>F]fluoride according to the procedure already reported in literature [40].

[<sup>18</sup>F]fluoride was first trapped on a preconditioned (10 mL 1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution, 10 mL Milli-Q water, 20 mL air) Sep-Pak QMA light cartridge (Waters) and subsequently eluted into a reaction vial using a mixture of 1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (15  $\mu$ L, 15  $\mu$ mol), Kryptofix® 222 (15 mg, 40  $\mu$ mol) and acetonitrile (1 mL). Azeotropic removal of residual water was achieved via evaporation of the solvent under reduced pressure and helium flow at 80 °C. After cooling to 40 °C, a solution of Ts-TEG-N<sub>3</sub> (10.0 mg, 30.4  $\mu$ mol) in acetonitrile (1 mL) was added and the reaction vial was heated to 90 °C for 10 min. After completion of the radiolabeling reaction, the mixture was cooled down again to 40 °C and MeCN/H<sub>2</sub>O

(1:1, 1 mL) was added. The resulting solution of crude compound was subsequently purified via semipreparative HPLC (column: Phenomenex Luna C18 (250 × 10 mm) 10 μ, flow rate: 3 mL/min, MeCN/H<sub>2</sub>O 1:1, t<sub>r</sub> = 8.0 min). The collected product fraction was diluted by Milli-Q water (35 mL) and passed through a preconditioned (10 mL acetonitrile, 10 mL Milli-Q water, 20 mL air) Lichrolut EN cartridge (Merck). Subsequently, the cartridge was dried with a stream of helium and eluted with anhydrous diethylether (1.5 mL) into a vial equipped with a stirring bar and a septum. Evaporation of the solvent under reduced pressure and helium flow (10 mL/min) at 40 °C led to the product ([<sup>18</sup>F]-TEG-N<sub>3</sub>) with a decay corrected radiochemical yield of 53%.

### Synthesis of ([<sup>18</sup>F]F-TEG-triazolyl)(KuE-SA-triazolyl)-BisHD-*hbPG*

<sup>18</sup>F-labeling of the KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hbPG* via CuAAC was performed similarly to a method already published [33]. The synthesis is described for ([<sup>18</sup>F]F-TEG-triazolyl)(KuE-SA-triazolyl)-BisHD-*hbPG*<sub>63</sub> as representative example.

In detail, a solution of KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hbPG*<sub>63</sub> (3.1 mg, 0.56 μmol) in 1 mL PBS was added to a vial containing a layer of [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub> and a stirring bar. Successively, DMSO (12.5 μL), 1 M CuSO<sub>4</sub> solution (15 μL, 15 μmol) and 2.4 M sodium ascorbate in PBS (25 μL, 60 μmol) were added and the resulting mixture was heated to 70 °C for 15 min while stirring. Completion of the reaction was confirmed via radio-TLC (radiolabeled product: R<sub>f</sub> = 0, [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub>: R<sub>f</sub> = 0.8–0.9). Subsequently, the solution was passed through preconditioned (0.8 mL 1 M HCl, 5 mL H<sub>2</sub>O, 0.8 mL 1 M NaOH, 5 mL H<sub>2</sub>O, 10 mL air) Chelex 100 chelating resin (600 mg, Bio-Rad) to remove catalytic copper. The cartridge was flushed with 1.5 mL abs. ethanol and the eluate was combined with the first aqueous flow-through yielding a solution of purified, <sup>18</sup>F-labeled polyether lipid with a decay corrected radiochemical yield of 73%.

### Synthesis of [<sup>18</sup>F]F-TEG-triazolyl-BisHD-*hbPG*

<sup>18</sup>F-labeling of the non-KuE-functionalized, alkyne-bearing BisHD-*hbPG* (3.5 mg, 0.65 μmol) was accomplished via CuAAC analogously to the synthesis of ([<sup>18</sup>F]F-TEG-triazolyl)(KuE-SA-triazolyl)-BisHD-*hbPG* resulting in a decay-corrected radiochemical yield of 81%.

### Liposome formation

<sup>18</sup>F-labeled, KuE-functionalized liposomes were prepared via thin film hydration and automatic extrusion similar to the method already published in literature [33,34].

1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC, 241 μL, 20 mg/mL in ethanol, 6.13 μmol, 55 mol%) and cholesterol (246 μL, 7 mg/mL in ethanol, 4.46 μmol, 40 mol%) were added to the obtained aqueous-ethanolic solution of the <sup>18</sup>F-labeled polyether lipid ([<sup>18</sup>F]F-TEG-triazolyl)(KuE-SA-triazolyl)-BisHD-*hbPG* (0.56 μmol, 5 mol%). The solvents were removed under reduced pressure via rotary evaporator providing a thin oily layer. Addition of 0.8 mL PBS and subsequent ultrasonication for 10 min at 50 °C led to a turbid yellow suspension. To obtain uniform liposomes of small size, the suspension was extruded automatically through polycarbonate membranes of different pore sizes (400 nm, 100 nm and 50 nm, 21 times each) via custom-built extrusion device equipped with a

LiposoFast extruder unit (AVESTIN Europe GmbH). In order to separate smaller components and structures, the resulting liposomes were finally purified via fractionated size exclusion chromatography (SEC) using Sephacryl S-400 HR resin (Cytiva, 4 mL in a 6 mL SPE tube) and PBS as mobile phase (0.5 mL per fraction). The radiolabeled, KuE-functionalized liposomes eluted in fractions 3–5 as a slightly turbid suspension with a decay-corrected radiochemical yield of 25%.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Polymer synthesis and characterization

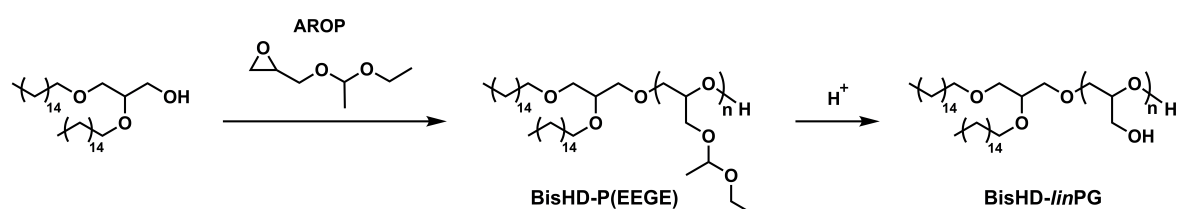
The amphiphilic block copolymer BisHD-*hbPG* was synthesized in a multi-step procedure.

#### Synthesis of the hydrophobic BisHD-OH anchor

The hydrophobic anchor structure BisHD-OH was synthesized as initiator for the AROP of epoxides. The initiator was prepared in a straightforward two-step synthesis based on a procedure of Stauch *et al.*, performing a Williamson etherification and using 1-*O*-benzyl glycerol and hexadecyl bromide, followed by hydrogenation to remove the benzyl protecting group [43]. In the past, two other hydrophobic anchors 1,2-bis-*n*-icosanyl glyceryl ether (BisID-OH) with longer and 1,2-bis-*n*-octadecyl glyceryl ether (BisOD-OH) with shorter alkyl chain lengths of the anchor structures were also used for the AROP [44]. In a study of Gleue *et al.*, the influence of the length of the amphiphilic anchors on the stability of the liposome membrane and the exchange between liposome membrane and cell membrane was investigated [36]. Due to the good stability of BisHD-OH, this anchor was used as an initiator for our structures.

#### Synthesis of BisHD-*linPG* macroinitiator

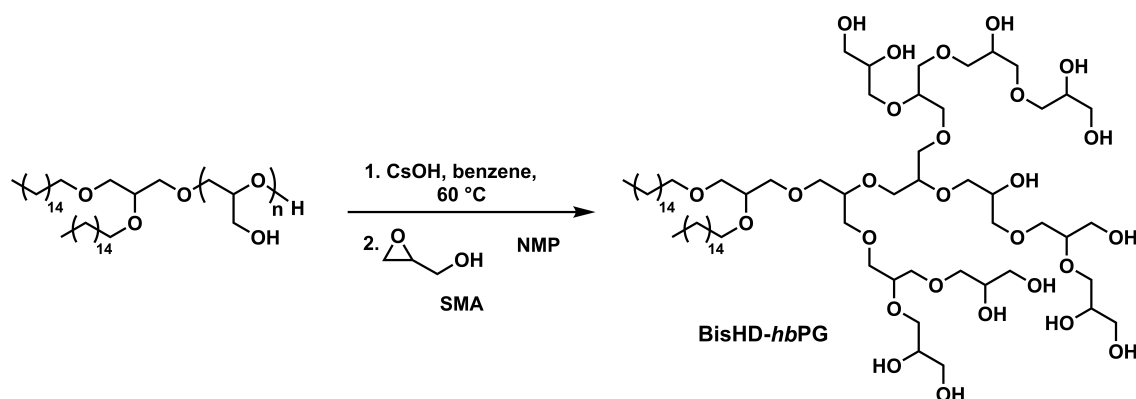
In the first reaction step a BisHD-P(EEGE) precursor polymer was synthesized via AROP with ethoxy ethyl glycidyl ether (EEGE). For the polymerization of EEGE the BisHD-OH was first deprotonated with cesium hydroxide monohydrate and dried in vacuo overnight to remove any moisture. Cesium hydroxide monohydrate was used as base for the deprotonation to ensure a good reactivity for the polymerization due to the formation of a dissociated ion pair [46,47]. The resulting initiator salt was dissolved in dioxane and the AROP of EEGE was performed under slightly reduced pressure and at elevated temperatures (80 °C) for 6 days. High temperatures were necessary to enable a polymerization clearly above the melting point of the initiator and to increase the overall reactivity. The polymerization of EEGE leads to linear structures (PEEGE) with acetal-protected hydroxyl groups, which can be released upon acidic treatment according to literature [48]. The resulting linear polyglycerol (BisHD-*linPG*) structure exhibits numerous hydroxyl groups and can therefore be used as a macroinitiator to prepare the hyperbranched polyglycerol (*hbPG*) block (Scheme 1).



**Scheme 1:** Synthesis route for the macroinitiator BisHD-P(EEGE) and cleavage of the protecting acetal groups resulting in BisHD-*linPG*.

## Synthesis of BisHD-*hb*PG

BisHD-*lin*PG was used for “hypergrafting” of glycidol via slow monomer addition (SMA) technique to obtain the BisHD-*hb*PG polyether lipids. For the synthesis, the free hydroxyl groups of the BisHD-*lin*PG macroinitiator were deprotonated using cesium hydroxide monohydrate and dried overnight to remove any moisture. The initiator salt was dissolved in *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) to guarantee a good solubility of the macroinitiator and the resulting BisHD-*hb*PG. The monomer glycidol was added via SMA approach over a time period of 16 h to obtain well-defined BisHD-*hb*PG (Scheme 2).



**Scheme 2:** Synthesis route for BisHD-*hb*PG via SMA of glycidol.

The key characterization data of BisHD-P(EEGE), BisHD-*lin*PG and BisHD-*hb*PG are summarized in Table 1.

**Table 1:** Characterization data of the precursor BisHD-P(EEGE), the macroinitiator BisHD-*lin*PG and the block copolymer BisHD-*hb*PG.

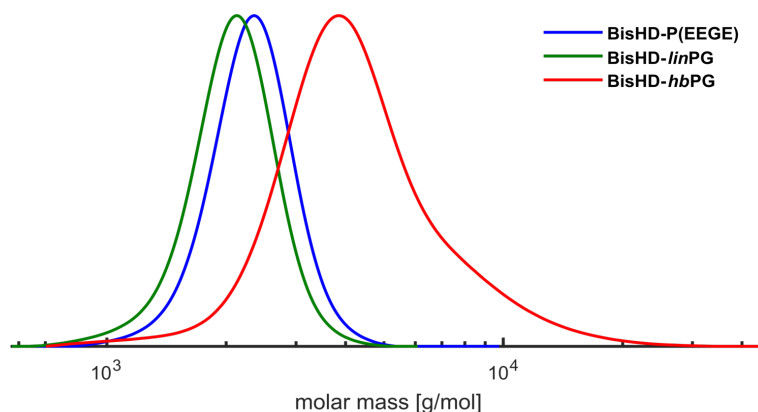
Sample	$M_n^{\text{NMR}^a}$ (g/mol)	$M_n^{\text{SEC}^b}$ (g/mol)	$\mathcal{D}^b$
BisHD-P(EEGE) <sub>22</sub>	3750	2230	1.06
BisHD- <i>lin</i> PG <sub>22</sub>	2170	1990	1.07
BisHD- <i>hb</i> PG <sub>74</sub>	6010	3830	1.26

<sup>a</sup> obtained from <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy

<sup>b</sup> determined via SEC (RI, DMF, PEG standards)

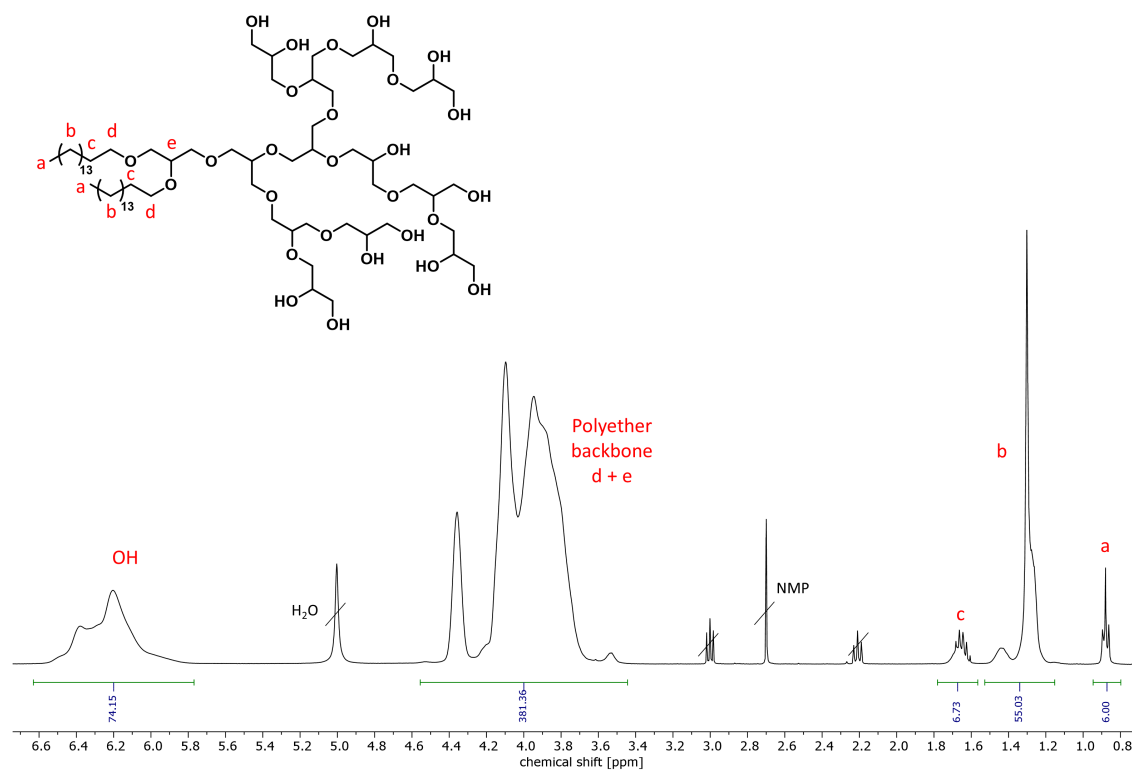
AROP of BisHD and EEGE yielded the macroinitiator BisHD-P(EEGE), which was obtained with 22 EEGE units and a molecular weight ( $M_n$ ) of 3750 g/mol with a low dispersity ( $\mathcal{D} = 1.06$ ). The BisHD-*lin*PG had a lower molecular weight of 2170 g/mol, because of the acidic cleavage of the acetal groups. After the SMA with glycidol the BisHD-*hb*PG was obtained with 74 glycidol units and a molecular weight of 6010 g/mol. The dispersity ( $\mathcal{D} = 1.26$ ) is quite good for this kind of “hypergrafting” reaction. The molecular weights determined via SEC are deviating from the results determined via <sup>1</sup>H NMR, due to the applied PEG standards in the calibration and the varying hydrodynamic volume ( $V_h$ ), especially for the BisHD-*hb*PG polymer compared to PEG.

An overlay of the monomodal SEC traces of the precursor BisHD-P(EEGE), the macroinitiator BisHD-*lin*PG and the amphiphilic block copolymer BisHD-*hb*PG is shown in Fig. 1. An expected slight shift to a lower molecular weight is observed between the SEC trace before (blue) and after (green) cleavage of the protecting groups. Furthermore, a shift to a higher molecular weight due to the changing  $V_h$  of the hyperbranched block copolymer can be observed (red).



**Figure 1:** SEC traces (RI detector, DMF, PEG standards) of the precursor BisHD-P(EEGE), the macroinitiator BisHD-*lin*PG and the block copolymer BisHD-*hb*PG.

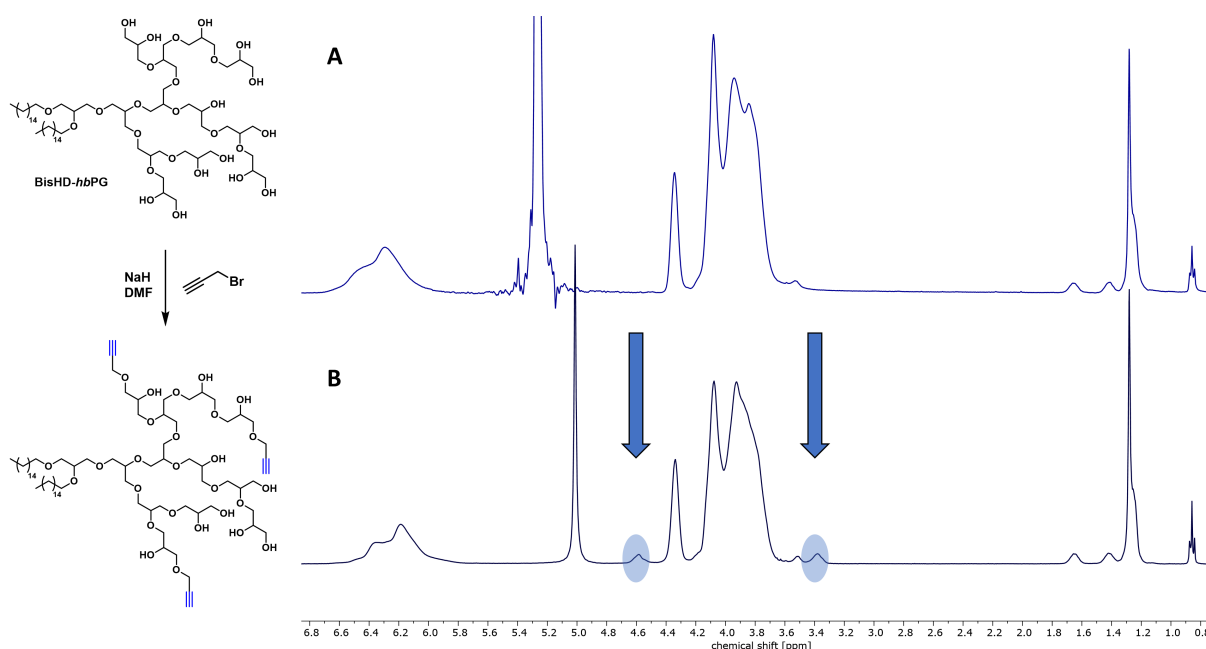
The  $^1\text{H-NMR}$  spectra of BisHD-P(EEGE) and BisHD-*lin*PG after the deprotection are shown in Fig. S2 and Fig. S3. The acetal protecting groups could be completely cleaved off. The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of BisHD-*hb*PG<sub>74</sub> is shown in Fig. 2 with assigned signals.



**Figure 2:**  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (400 MHz, pyridine- $d_5$ ) of BisHD-*hb*PG<sub>74</sub> (entry 3, Table 1).

## Post-polymerization modification

The amphiphilic BisHD-*hb*PG block copolymer was functionalized with propargyl bromide to attach alkyne moieties. The alkyne groups enable a copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC) with azide-bearing molecules. This reaction is known from literature and was adapted for the synthesized amphiphilic block copolymer [40]. For the functionalization, the hydroxyl groups of BisHD-*hb*PG were deprotonated using sodium hydride (NaH). The degree of functionalization was controlled via the amount of applied propargyl bromide. The successful functionalization was proven via NMR spectroscopy. The characteristic resonances for the propargyl group could be assigned via  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (Fig. 3) and  $(^1\text{H},^{13}\text{C})$ -HSQC-NMR spectrum (Fig. S6). The number of alkyne groups cannot be accurately determined by integrating the signals in the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum. The characteristic NMR signals of the alkyne group are strongly broadened in deuterated pyridine. However, from the decrease in the number of protons of the hydroxyl group from 74 to 67 protons, it can be concluded that an average of 7 alkyne groups per polymer are bound for further functionalization.



**Figure 3:**  $^1\text{H}$ -NMR spectra (400 MHz, pyridine- $d_5$ ) of BisHD-*hb*PG $_{74}$  (A) and BisHD-*hb*PG $_{74}$ -alkyne (B). The appearing signals for the propargyl group are emphasized in blue.

In Table 2 the characteristics of BisHD-*hb*PG before and after functionalization with propargyl bromide are summarized.

**Table 2:** Characterization data of BisHD-*hb*PG and BisHD-*hb*PG-alkyne.

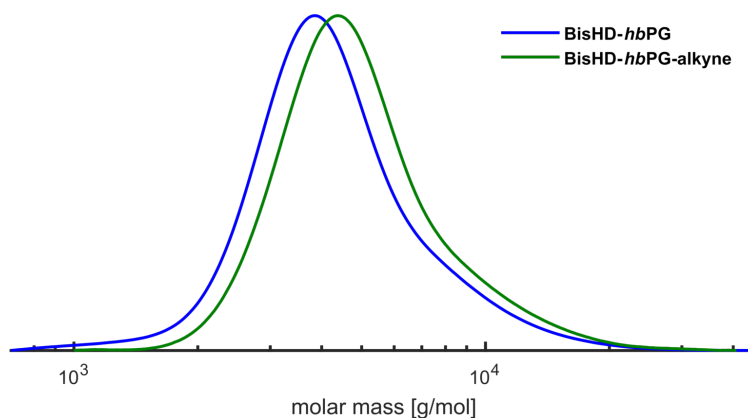
Sample	$M_n^{\text{NMR}^a}$ (g/mol)	$M_n^{\text{SEC}^b}$ (g/mol)	$D^b$	Alkyne moieties <sup>b</sup>
BisHD- <i>hb</i> PG $_{74}$	6010	3830	1.26	
BisHD- <i>hb</i> PG $_{74}$ -alkyne	6500	4470	1.22	7

<sup>a</sup> obtained from  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy

<sup>b</sup> determined via SEC (RI, DMF, PEG standards)



SEC measurements reveal moderate size distribution for the functionalized BisHD-*hb*PG-alkyne polymer. Moreover, the successful attachment of alkyne moieties to BisHD-*hb*PG is proven due to the shift of the SEC trace to lower elution volume translating to higher molecular weight (Fig. 4). Polydispersity decreases minimally after functionalization due to purification by dialysis.



**Figure 4:** SEC traces (RI detector, DMF, PEG standards) of BisHD-*hb*PG before (blue) and after (green) functionalization with propargyl bromide.

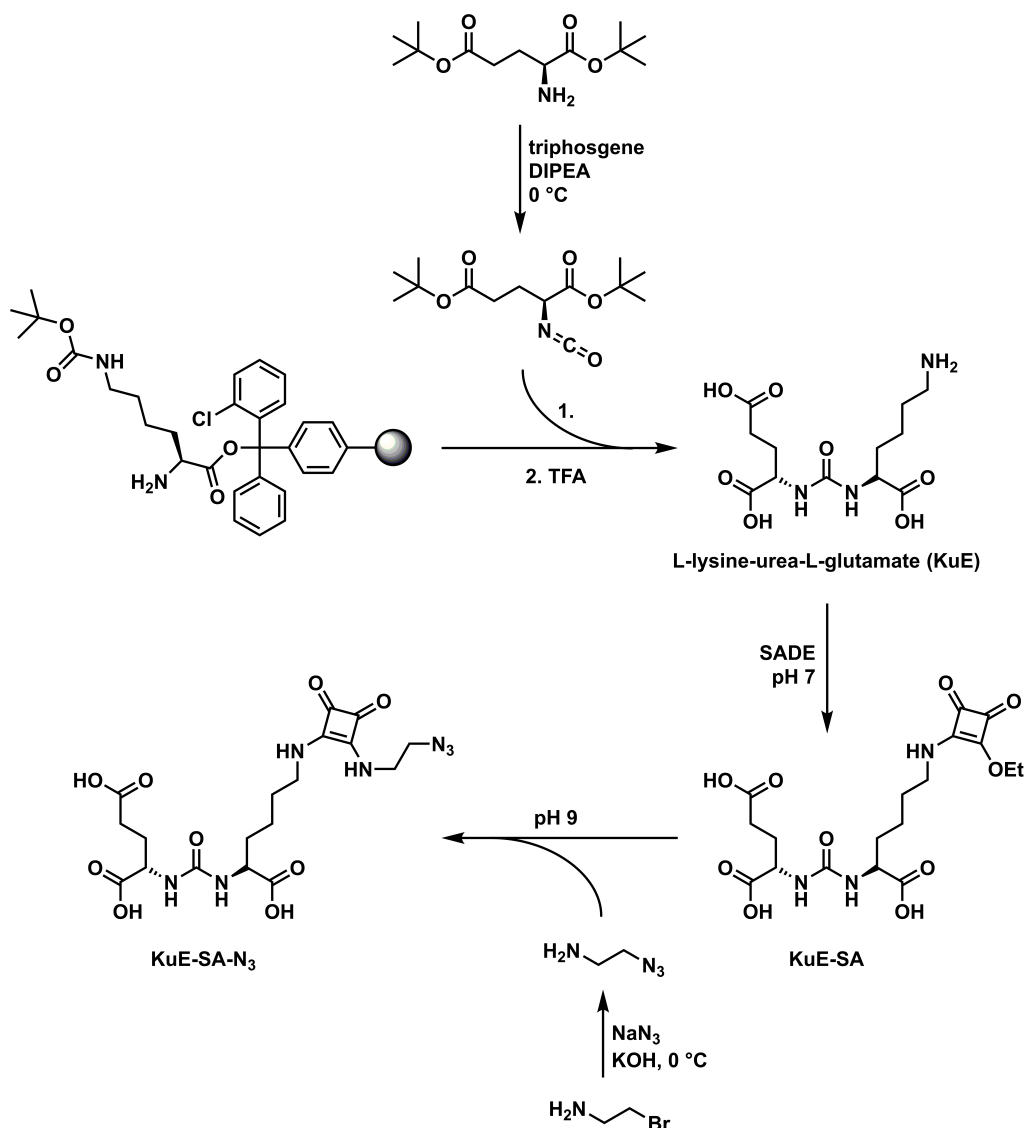
## Synthesis of the PSMA inhibitor and functionalization of the hyperbranched polyether lipid

### Synthesis of the azide-functionalized PSMA inhibitor KuE-SA-N<sub>3</sub>

Synthesis of the actual PSMA inhibitor L-lysine-urea-L-glutamate (KuE) was adopted from the procedure described by Greifenstein *et al* [20]. In the first step, slow addition of triphosgene to a cooled solution of twice *tert*-butyl-protected L-glutamic acid and DIPEA led to the corresponding isocyanate, which was directly reacted with *Nε*-Boc-protected L-lysine bound to a chlorotriptyl polystyrene resin (Scheme 3). Nucleophilic attack of the partially positively charged isocyanate-carbon by the  $\alpha$ -nitrogen of lysine resulted in the solid phase-bound, urea coupled and protected amino acids. Simultaneous cleavage and deprotection using TFA followed by HPLC purification finally provided the desired product KuE with a yield of 71%.

Subsequently, the squaric acid moiety was introduced using SADE at pH 7 via formation of the corresponding monoamide (Scheme 3). In this step, a severe pH control using a buffered medium is required to prevent further amidation and therefore KuE-dimerization, which occurs at more basic conditions. The HPLC-purified KuE-SA was obtained with a yield of 23%. The rather moderate yield does not reflect low formation of the product (as confirmed via LC/MS), but is mainly attributed to a loss during HPLC purification.

The next step finally included azide-functionalization via second amidation of the squaric acid monoamide at pH 9 using 2-azidoethylamine (Scheme 3). The azide-bearing precursor was previously synthesized starting from 2-bromoethylamine hydrobromide by means of sodium azide and potassium hydroxide. After HPLC purification, the desired clickable PSMA inhibitor KuE-SA-N<sub>3</sub> was finally obtained with a yield of 86%.



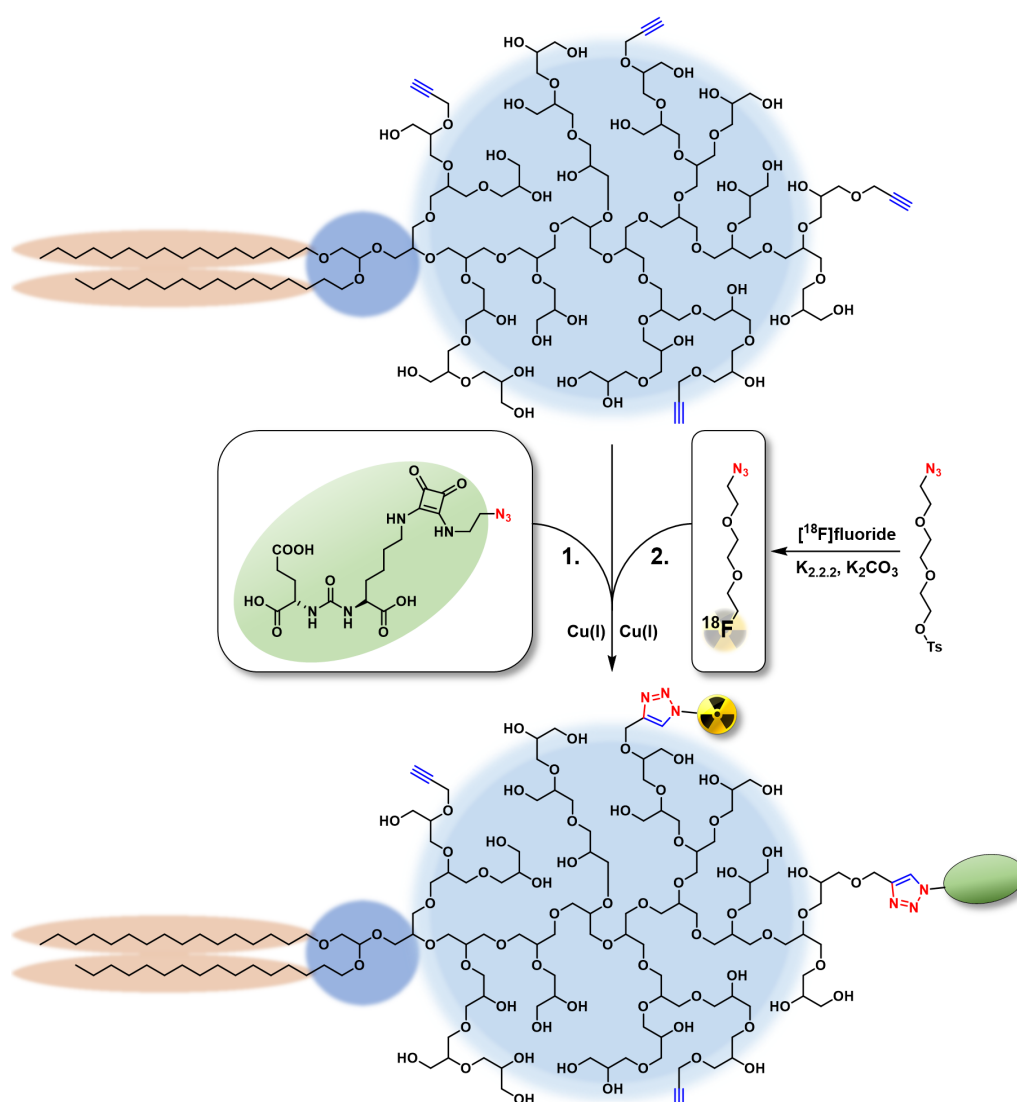
**Scheme 3:** Synthesis of the PSMA inhibitor L-lysine-urea-L-glutamate (KuE) and subsequent azide-functionalization via formation of the corresponding squaric acid diamide.

### KuE-SA-functionalization of alkyne-bearing BisHD-*hb*PG

In order to ensure specific binding to PSMA expressing cancer of the later prepared liposomal system, the alkyne-bearing hyperbranched polyether lipid was functionalized with KuE-SA via CuAAC, also named click-reaction (Scheme 4). This modification was achieved similarly to the method Wagener *et al.* used for preparation of trimannosylated lipids [34]. Therefore, BisHD-*hb*PG-alkyne was reacted with the previously synthesized KuE-SA-N<sub>3</sub> using copper(I) bromide and PMDETA as base. According to the mechanism proposed by Worrel *et al.*, a catalytically active complex containing of a  $\sigma$ -bound copper acetylide being additionally supplemented by a second  $\pi$ -bound copper atom, is formed *in situ* [34]. The base PMDETA is added to promote the formation of the copper acetylide [49]. Subsequent coordination of the azide leads to the formation of a six-membered metallacycle, which in turn is then converted to the triazolyl-connected product through ring contraction and protonolytic cleavage of the catalyst. To ensure sufficient functionalization of the polyether lipid with the PSMA inhibitor on the one hand and to leave binding sites unoccupied for subsequent radiolabeling on the other hand,

2.5 equivalents KuE-SA-N<sub>3</sub> were used. Purification of the product for removal of small reaction components and unbound reactant was achieved via spin filtration (MWCO = 1000 g/mol).

To verify the successful binding of KuE-SA-N<sub>3</sub> to the polymer using CuAAC, NMR spectra were prepared. In the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra, only very weak characteristic signals could be detected. Reasons for this are on the one hand the large molecular weight of the polymer compared to the molecular weight of the attached group, many signals overlap with the signals of the polymer and the deuterated solvent pyridine has an additional strong shielding effect. However, by (<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C)-HSQC analysis, the successful binding could be confirmed. The spectra can be taken from the supporting information (Fig. S14–S18). Furthermore, a decrease in the protons of the alkyne groups on the polymer was observed and the KuE-SA functionalized liposomes showed fluorescence in the DLS later on, further confirming the successful functionalization.



**Scheme 4:** Consecutive KuE-SA-functionalization and <sup>18</sup>F-labeling of the alkyne-bearing hyperbranched polyether lipid BisHD-hbPG using CuAAC.

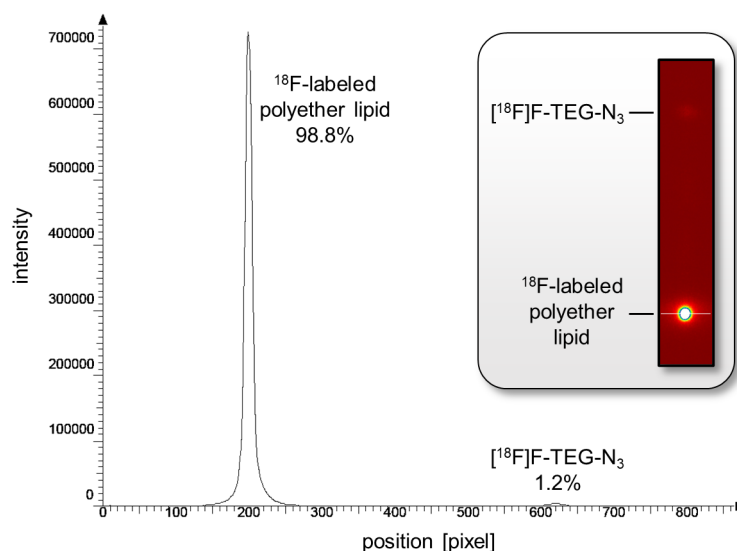
## Radiosynthesis

### <sup>18</sup>F-labeling of the click-synthon

Radiosynthesis first included nucleophilic <sup>18</sup>F-labeling of the previously synthesized click-synthon Ts-TEG-N<sub>3</sub> according to the procedure of previous reports [33,34,40]. In this step a semiautomatic custom-built modular system was used significantly simplifying and accelerating the synthesis and minimizing radiation exposure to the experimentalist. Cyclotron-produced [<sup>18</sup>F]fluoride was first separated from target [<sup>18</sup>O]water via trapping on a quaternary methyl ammonium (QMA) anion exchange cartridge and subsequently eluted using a mixture of aqueous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Kryptofix<sup>®</sup> 222 (K<sub>2.2.2</sub>) and acetonitrile. The aminopolyether Kryptofix<sup>®</sup> 222 serves as phase transfer catalysator enhancing fluoride nucleophilicity and solubility in organic solvents via complexation of the potassium counter ion [50,51]. Since hydrated [<sup>18</sup>F]fluoride is strongly inactivated for nucleophilic reactions, complete removal of residual water plays a crucial role and was realized via azeotropic evaporation of the solvent. Nucleophilic substitution of the added precursor Ts-TEG-N<sub>3</sub> was achieved within 10 min at 90 °C. Further processing of the crude product consecutively included HPLC purification, dilution, polymer-based solid phase extraction using diethylether as eluent and evaporation of the solvent. The whole procedure lasted 100 min and therefore slightly less than one half-life of the radionuclide. The <sup>18</sup>F-labeled click synthon [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub> was obtained with a decay corrected radiochemical yield of 53%.

### <sup>18</sup>F-labeling of the KuE-SA-functionalized polyether lipid

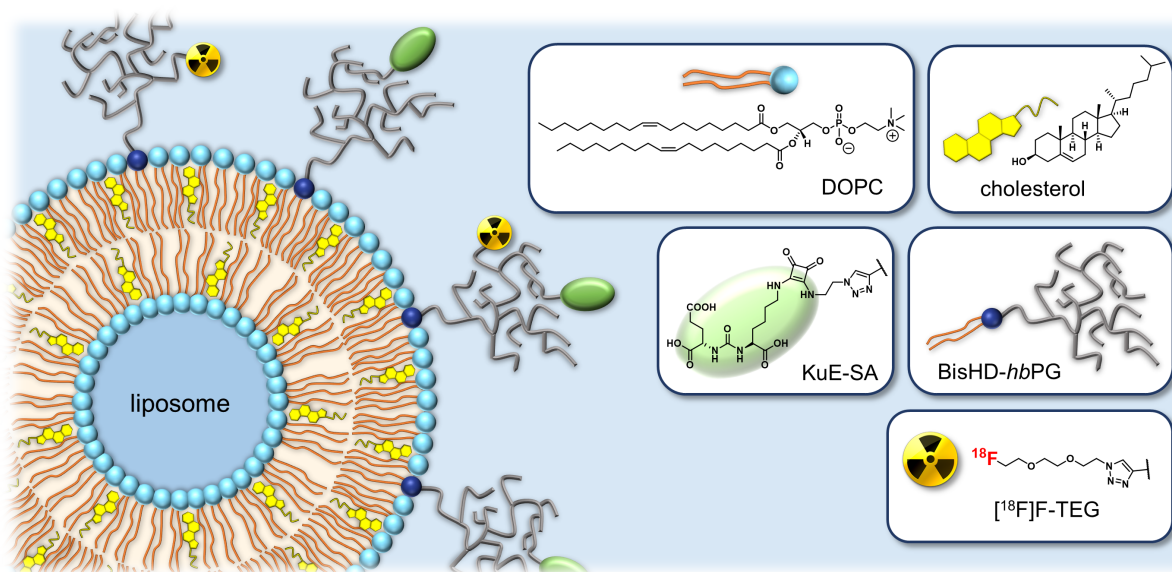
As shown in Scheme 4, residual unoccupied alkyne groups were used for radiolabeling of the KuE-SA-functionalized BisHD-*hb*PG via repeated CuAAC using previously synthesized [<sup>18</sup>F]F-TEG-N<sub>3</sub>. Therefore, the polyether lipid was combined with the radiolabeled synthon and the click reaction was initiated via addition of copper(II) sulfate and sodium ascorbate. In this case, an elevated temperature of 70 °C was used to accelerate the conversion of reactants. As determined via radio-TLC (Fig. 5), completion of the reaction could be confirmed already after 15 min as indicated by almost quantitative radiochemical conversion (98.8%). To separate cytotoxic copper, the reaction mixture was subsequently passed through a Chelex 100 chelating resin. A distinct blue layer at the very top of the cartridge indicated successful removal of the catalytic metal ion. Furthermore, Wagener *et al.* confirmed the efficiency of this method via the absence of precipitated copper sulfide after addition of sodium sulfide to the purified solution [33]. For maximum product recovery, the resin was additionally flushed with ethanol resulting in an aqueous-ethanolic solution of radiolabeled polyether lipid. In the case of BisHD-*hb*PG-KuE-SA, total duration of this synthesis step accounted for 32 min and the <sup>18</sup>F-labeled analogue could be obtained with a decay corrected radiochemical yield of 73%. For comparison, non-KuE-modified BisHD-*hb*PG was radiolabeled analogously (81% RCY, 45 min).



**Figure 5:** Radio-TLC image and corresponding TLC chromatogram showing the  $^{18}\text{F}$ -labeling (CuAAC) results of ([ $^{18}\text{F}$ ]F-TEG-triazolyl)(KuE-SA-triazolyl)-BisHD-*hb*PG after 15 min at 70 °C (solid phase: silica gel, mobile phase: ethylacetate:hexane 1:1;  $^{18}\text{F}$ -labeled polyether lipid:  $R_f = 0$ , [ $^{18}\text{F}$ ]F-TEG- $\text{N}_3$ :  $R_f = 0.8\text{--}0.9$ ). The chromatogram position of 200 pixels indicates the TLC-baseline.

## Liposome formation and characterization

As already mentioned, liposomes are typically prepared using amphiphilic phospholipids containing of a hydrophilic “head” and two hydrophobic “tails”. Upon contact with polar solvents (e.g. water), these molecules spontaneously arrange themselves to form mono- and bilayers as well as spheric structures such as micelles or vesicular liposomes. In this study we used DOPC as structure-defining component. This zwitterionic phospholipid has a low gel-fluid phase transition temperature of approx. -22 °C and therefore enables preparation of fluid-state liposomes at room temperature [52,53]. For further stabilization, we additionally used cholesterol, which occupies free space of the bilayer and therefore decreases the flexibility and mobility of surrounding fluid-phase lipids leading to an increased mechanical rigidity, decreased water permeability and reduced aggregation-tendency of the liposomal system (Fig. 6) [54–58]. Ethanolic solutions of these two components (55 mol% DOPC, 40 mol% cholesterol) were blended with the previously  $^{18}\text{F}$ -labeled, KuE-functionalized BisHD-*hb*PG (5 mol%) and liposome preparation via thin film hydration was achieved according to the procedure described by Wagener *et al.* [33,34]. Therefore, removal of the solvents under reduced pressure using a rotary evaporator led to a thin oily layer of the different constituents. Subsequently, large multilamellar vesicles of heterogeneous size distribution were formed via hydration using PBS and ultrasonication. In order to obtain small uniform unilamellar liposomes, the suspension was extruded repeatedly through polycarbonate membranes of different pore sizes (400, 100 and 50 nm) using a custom-built automatic extrusion device. In contrast to manually driven extrusion, the applied device ensures constant speed and pressure leading to reproducible and narrow size distribution while minimizing the radiation exposure to the experimentalist [33]. Removal of smaller components like unassembled lipids and micelles was achieved via fractionated SEC (Fig. S19) resulting in a purified suspension of  $^{18}\text{F}$ -labeled, KuE-functionalized and *hb*PG-shielded liposomes with a decay corrected radiochemical yield of 25%. Duration of the entire procedure accounted for 82 min. For comparison,  $^{18}\text{F}$ -labeled but non-KuE-functionalized liposomes were prepared analogously (14% RCY, 75 min).



**Figure 6:** Schematic cross-section displaying the structure of the  $^{18}\text{F}$ -labeled, KuE-SA-functionalized and *hbPG*-shielded liposomes.

After complete decay of the activity, the size of both KuE-SA-bearing and non-KuE-functionalized liposomes was measured via DLS (Table S1, Fig. S20, S22). The BisHD-*hbPG*-alkyne liposomes indicated a diameter of 157.5 nm, for the analogous KuE-SA-bearing liposomes a higher value of 199.1 nm was measured. Since preparation, processing and extrusion was carried out analogously for both systems, the difference in size is presumably based on an increased steric demand due to KuE-SA-functionalization of the polyether lipid. Additionally, it may also be partly influenced by the measurement itself, as the sample of functionalized liposomes exhibits fluorescence, which may distort the DLS-results. The liposomal size plays a crucial role for the pharmacological behavior *in vivo*. Ideally, the hydrodynamic diameter should on the one hand be large enough to prevent interaction with hepatocytes and thus filtration through the liver, which occurs up to a particle size of 50–100 nm [59]. On the other hand, it should not exceed 300 nm to avoid an increased accumulation in the spleen [60]. Furthermore, (non-functionalized) liposomes with sizes ranging from 100 to 200 nm were reported to take advantage of tumor permeability most effectively resulting in optimal target uptake [59,61]. The dimensions of both liposomal systems described herein meet these requirements and were comparable to the values of similar vesicles reported in the literature [34]. The liposomes containing KuE-SA-functionalized BisHD-*hbPG* therefore represent promising tools for targeted drug delivery in the treatment of PSMA expressing prostate cancer. Furthermore, utilization of the  $^{18}\text{F}$ -labeled vesicles should ensure *in vivo* evaluation of the pharmacokinetics via PET in future follow-up studies.

## CONCLUSION

In this study, the synthesis of an alkyne-functionalized hyperbranched polyglycerol with a long hydrophobic alkyl chain anchor (BisHD-*hb*PG) via AROP on the one hand and of a squaramide coupled PSMA inhibitor (KuE-SA) on the other hand is described. To combine these two structures, Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) was used. For this purpose, BisHD-*hb*PG was functionalized with alkyne groups and the PSMA inhibitor was modified with an azide group. In a second CuAAC the BisHD-*hb*PG-KuE-SA polymers were radiolabeled with a previously synthesized, <sup>18</sup>F-labeled precursor. To obtain PSMA-specific drug delivery systems with a prolonged circulation behavior in the blood stream, liposomes were formed via thin film hydration method. The syntheses and radiolabeling were straightforward and achieved high yields. By combining the KuE-SA functionalized liposomes and the radiolabeling with fluorine-18, a promising system for future targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer was introduced. This enables prostate cancer-targeted delivery of liposome-entrapped therapeutics and pre-evaluation of liposome behavior *in vitro* and *in vivo* via PET.

## Acknowledgements

We thank [REDACTED] for technical assistance, [REDACTED] for SEC measurements, [REDACTED] and [REDACTED] for production and provision of fluorine-18. [REDACTED] and B. Klasen thank the DFG in the context of the SFB 1066 for financial support. [REDACTED] thanks the MPG (Max Planck Graduate Center) for financial support.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## REFERENCES

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87–108.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
- [3] Rawla P. Epidemiology of prostate cancer. *World J Oncol* 2019;10:63–89.
- [4] Perner S, Hofer MD, Kim R, Shah RB, Li H, Möller P, et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol* 2007;38:696–701.
- [5] Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD, Cordon-Cardo C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res* 1997;3:81–5.
- [6] Okarvi SM. Recent developments of prostate-specific membrane antigen (PSMA)-specific radiopharmaceuticals for precise imaging and therapy of prostate cancer: an overview. *Clin Transl Imaging* 2019;7:189–208.
- [7] Wester H-J, Schottelius M. PSMA-targeted radiopharmaceuticals for imaging and therapy. *Semin Nucl Med* 2019;49:302–12.
- [8] Pillai MRA, Nanabala R, Joy A, Sasikumar A, (Russ) Knapp FF. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. *Nucl Med Biol* 2016;43:692–720.
- [9] Kopka K, Benešová M, Bařinka C, Haberkorn U, Babich J. Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers. *J Nucl Med* 2017;58:175–265.
- [10] Benešová M, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Afshar-Oromieh A, Kratochwil C, Mier W, et al. Preclinical evaluation of a tailor-made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med* 2015;56:914–20.
- [11] Kozikowski AP, Zhang J, Nan F, Petukhov PA, Grajkowska E, Wroblewski JT, et al. Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents. *J Med Chem* 2004;47:1729–38.
- [12] Wurm FR, Klok H-A. Be squared: expanding the horizon of squaric acid-mediated conjugations. *Chem Soc Rev* 2013;42:8220.
- [13] Tietze LF, Arlt M, Beller M, Glüsenkamp K, Jähde E, Rajewsky MF, et al. Squaric acid diethyl ester: a new coupling reagent for the formation of drug biopolymer conjugates. Synthesis of squaric acid ester amides and diamides. *Chem Ber* 1991;124:1215–21.
- [14] Dingels C, Wurm F, Wagner M, Klok H-A, Frey H. Squaric acid mediated chemoselective PEGylation of proteins: reactivity of single-step-activated  $\alpha$ -amino poly(ethylene glycol)s. *Chem - A Eur J* 2012;18:16828–35.
- [15] Quiñonero D, Frontera A, Ballester P, Deyà PM. A theoretical study of aromaticity in squaramide and oxocarbons. *Tetrahedron Lett* 2000;41:2001–5.
- [16] Prohens R, Portell A, Font-Bardia M, Bauzá A, Frontera A. Experimental and theoretical study of aromaticity effects in the solid state architecture on squaric acid derivatives. *Cryst Growth Des* 2014;14:2578–87.



- [17] Semmingsen D. The structure of squaric acid (3,4-dihydroxy-3-cyclobutene-1,2-dione). *Tetrahedron Lett* 1973;14:807–8.
- [18] West R, Powell DL. New aromatic anions. III. Molecular orbital calculations on oxygenated anions. *J Am Chem Soc* 1963;85:2577–9.
- [19] Zhang AX, Murelli RP, Barinka C, Michel J, Cocleaza A, Jorgensen WL, et al. A remote arene-binding site on prostate specific membrane antigen revealed by antibody-recruiting small molecules. *J Am Chem Soc* 2010;132:12711–6.
- [20] Greifenstein L, Engelbogen N, Lahnif H, Sinnes J, Bergmann R, Bachmann M, et al. Synthesis, labeling and preclinical evaluation of a squaric acid containing PSMA inhibitor labeled with <sup>68</sup>Ga: a comparison with PSMA-11 and PSMA-617. *ChemMedChem* 2020;15:695–704.
- [21] Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release* 2015;200:138–57.
- [22] Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer* 2017;17:20–37.
- [23] Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:36–48.
- [24] Pattni BS, Chupin V V., Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery. *Chem Rev* 2015;115:10938–66.
- [25] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 2013;8:102.
- [26] Ishida T, Harashima H, Kiwada H. Liposome clearance. *Biosci Rep* 2002;22:197–224.
- [27] Herzberger J, Niederer K, Pohlit H, Seiwert J, Worm M, Wurm FR, et al. Polymerization of ethylene oxide, propylene oxide, and other alkylene oxides: synthesis, novel polymer architectures, and bioconjugation. *Chem Rev* 2016;116:2170–243.
- [28] Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today* 2005;10:1451–8.
- [29] Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* 2006;1:297–315.
- [30] Huckaby JT, Jacobs TM, Li Z, Perna RJ, Wang A, Nicely NI, et al. Structure of an anti-PEG antibody reveals an open ring that captures highly flexible PEG polymers. *Commun Chem* 2020;3:124.
- [31] Wilms D, Stiriba S-E, Frey H. Hyperbranched polyglycerols: from the controlled synthesis of biocompatible polyether polyols to multipurpose applications. *Acc Chem Res* 2010;43:129–41.
- [32] Kasza G, Kali G, Domján A, Pethő L, Szarka G, Iván B. Synthesis of well-defined phthalimide monofunctional hyperbranched polyglycerols and its transformation to various conjugation relevant functionalities. *Macromolecules* 2017;50:3078–88.
- [33] Wagener K, Worm M, Pektor S, Schinnerer M, Thiermann R, Miederer M, et al. Comparison of linear and hyperbranched polyether lipids for liposome shielding by <sup>18</sup>F-radiolabeling and positron emission tomography. *Biomacromolecules* 2018;19:2506–16.
- [34] Wagener K, Bros M, Krumb M, Langhanki J, Pektor S, Worm M, et al. Targeting of immune cells with trimannosylated liposomes. *Adv Ther* 2020;3:1900185.

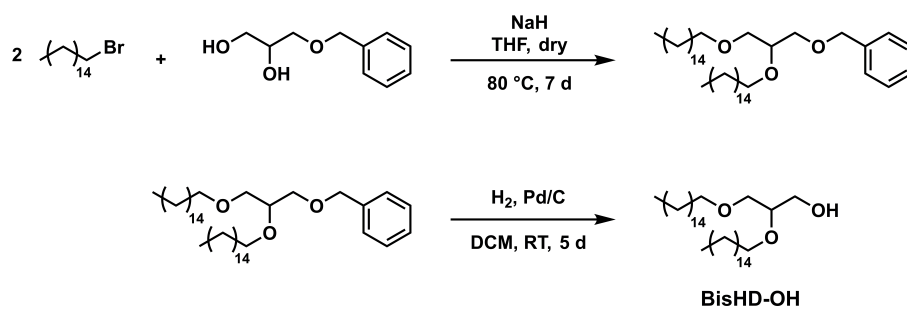
- [35] Hofmann AM, Wurm F, Hühn E, Nawroth T, Langguth P, Frey H. Hyperbranched polyglycerol-based lipids via oxyanionic polymerization: toward multifunctional stealth liposomes. *Biomacromolecules* 2010;11:568–74.
- [36] Gleue L, Schupp J, Zimmer N, Becker E, Frey H, Tuettenberg A, et al. Stability of alkyl chain-mediated lipid anchoring in liposomal membranes. *Cells* 2020;9:2213.
- [37] Jacobson O, Kiesewetter DO, Chen X. Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconj Chem* 2015;26:1–18.
- [38] Cole E, Stewart M, Littich R, Hoareau R, Scott P. Radiosyntheses using fluorine-18: the art and science of late stage fluorination. *Curr Top Med Chem* 2014;14:875–900.
- [39] Bé M-M, Chisté V, Dulieu D, Browne E, Chevchev V, Kuzmenko N, et al. Table of radionuclides. vol. 1. Bureau International Des Poids Et Mesures; 2004.
- [40] Reibel AT, Müller SS, Pektor S, Bausbacher N, Miederer M, Frey H, et al. Fate of linear and branched polyether-lipids *in vivo* in comparison to their liposomal formulations by  $^{18}\text{F}$ -radiolabeling and positron emission tomography. *Biomacromolecules* 2015;16:842–51.
- [41] Kettenbach K, Schieferstein H, Ross TL.  $^{18}\text{F}$ -labeling using click cycloadditions. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–16.
- [42] Fitton AO, Hill J, Jane DE, Millar R. Synthesis of simple oxetanes carrying reactive 2-substituents. *Synthesis (Stuttg)* 1987;1987:1140–2.
- [43] Stauch O, Uhlmann T, Fröhlich M, Thomann R, El-Badry M, Kim Y-K, et al. Mimicking a cytoskeleton by coupling poly(*N*-isopropylacrylamide) to the inner leaflet of liposomal membranes: effects of photopolymerization on vesicle shape and polymer architecture. *Biomacromolecules* 2002;3:324–32.
- [44] Hofmann AM, Wurm F, Frey H. Rapid access to polyfunctional lipids with complex architecture via oxyanionic ring-opening polymerization. *Macromolecules* 2011;44:4648–57.
- [45] Yamamoto S, Nakahama S, Yamaguchi K. A heterobifunctional linker bearing azide-reactive alkyne and thiol-reactive maleimide connected with *N*-(2-nitrobenzyl)imide to synthesize photocleavable diblock copolymers. *Chem Lett* 2013;42:791–3.
- [46] Brocas A-L, Mantzaridis C, Tunc D, Carlotti S. Polyether synthesis: from activated or metal-free anionic ring-opening polymerization of epoxides to functionalization. *Prog Polym Sci* 2013;38:845–73.
- [47] Penczek S, Cypryk M, Duda A, Kubisa P, Slomkowski S. Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers. *Prog Polym Sci* 2007;32:247–82.
- [48] Schömer M, Frey H. Water-soluble “poly(propylene oxide)” by random copolymerization of propylene oxide with a protected glycidol monomer. *Macromolecules* 2012;45:3039–46.
- [49] Binder WH, Sachsenhofer R. ‘Click’ chemistry in polymer and materials science. *Macromol Rapid Commun* 2007;28:15–54.
- [50] Lu S, Lepore SD, Li SY, Mondal D, Cohn PC, Bhunia AK, et al. Nucleophile assisting leaving groups: a strategy for aliphatic  $^{18}\text{F}$ -fluorination. *J Org Chem* 2009;74:5290–6.
- [51] Stewart MN, Hockley BG, Scott PJH. Green approaches to late-stage fluorination: radiosyntheses of  $^{18}\text{F}$ -labelled radiopharmaceuticals in ethanol and water. *Chem Commun* 2015;51:14805–8.

- [52] Ladbroke BD, Chapman D. Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes a review and summary of some recent studies. *Chem Phys Lipids* 1969;3:304–56.
- [53] Siwak DR, Tari AM, Lopez-Berestein G. Liposomal antisense oligonucleotides for cancer therapy. *Methods Enzymol.*, vol. 387, 2004, p. 241–53.
- [54] Corvera E, Mouritsen OG, Singer MA, Zuckermann MJ. The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1992;1107:261–70.
- [55] Needham D, Nunn RS. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys J* 1990;58:997–1009.
- [56] Demel RA, De Kruffyff B. The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr* 1976;457:109–32.
- [57] Virden JW, Berg JC. Sodium chloride-induced aggregation of dipalmitoylphosphatidylglycerol small unilamellar vesicles with varying amounts of incorporated cholesterol. *Langmuir* 1992;8:1532–7.
- [58] Bhattacharya S, Haldar S. Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Biochim Biophys Acta - Biomembr - Biomembr* 2000;1467:39–53.
- [59] Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li S-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release* 2013;172:782–94.
- [60] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001;53:283–318.
- [61] Liu D, Mori A, Huang L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1992;1104:95–101.

## SUPPORTING INFORMATION

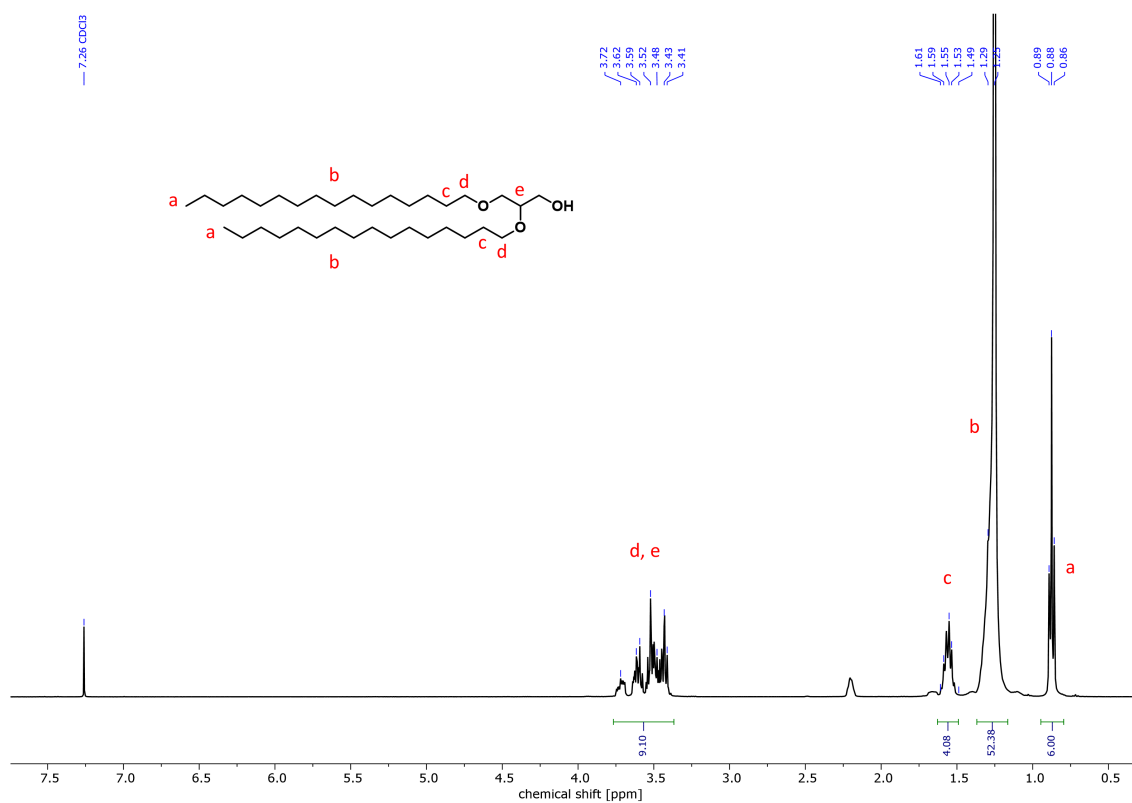
### Synthesis of the hydrophobic anchor structure

#### Synthesis of BisHD-OH



**Scheme S1:** Synthesis route of the hydrophobic anchor structure.

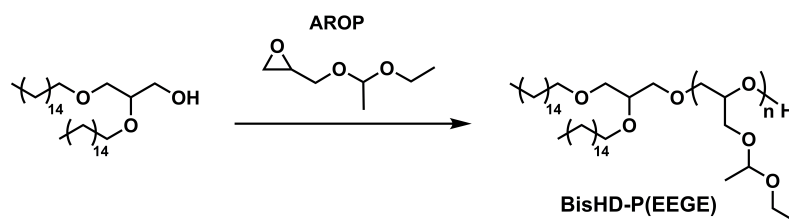
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$  [ppm]): 3.72–3.41 (m, 9H,  $\text{CH}_2\text{-O}$  and  $\text{CH}_2\text{-CH-O}$ ); 1.61–1.49 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ); 1.25 (s, 52H,  $\text{CH}_2$ ); 0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ).



**Figure S1:**  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) of BisHD-OH.

## Polymer synthesis and characterization

### Synthesis of BisHD-*lin*PG macroinitiator



Scheme S2: Synthesis route of BisHD-P(EEGE).

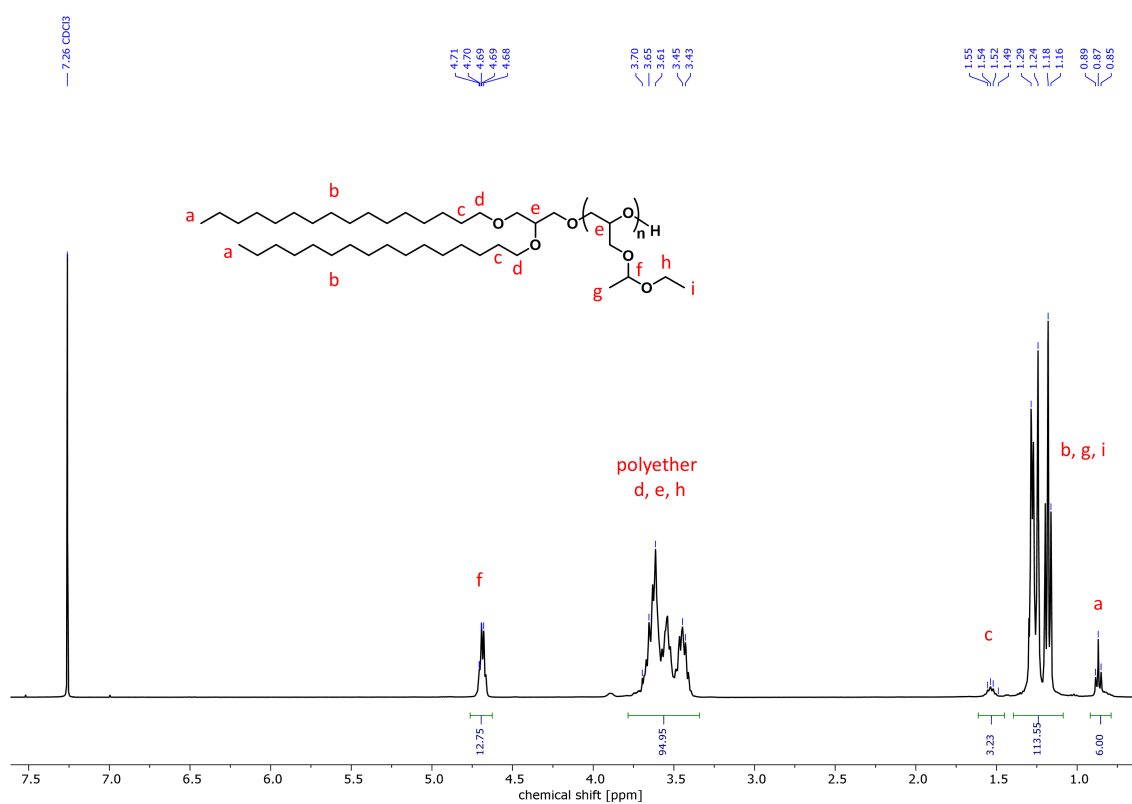
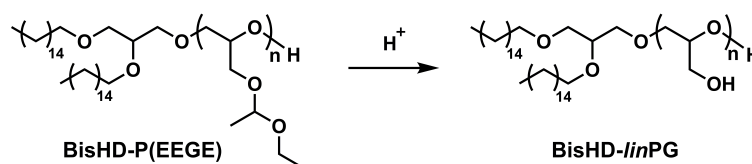


Figure S2: <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of BisHD-P(EEGE).



Scheme S3: Synthesis route of the macroinitiator BisHD-*lin*PG.

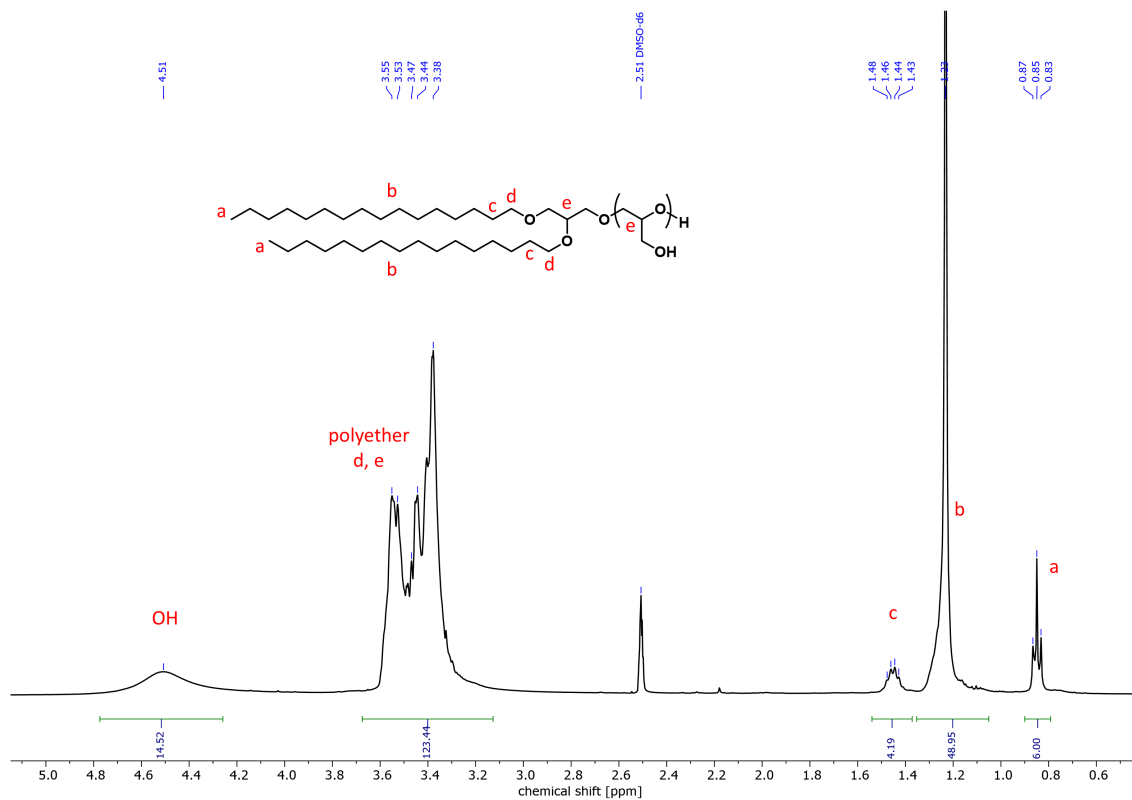
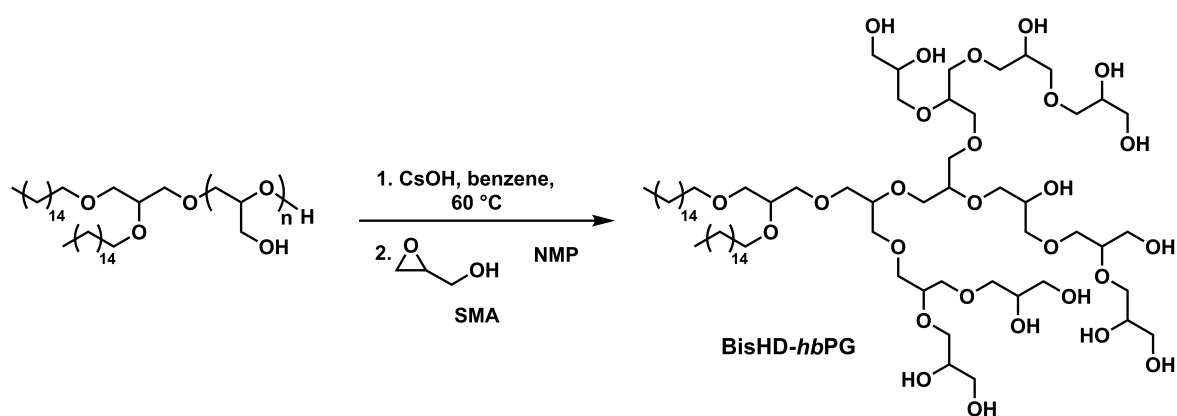


Figure S3: <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) of BisHD-linPG.

### Synthesis of BisHD-hbPG



Scheme S4: Synthesis route of BisHD-hbPG.

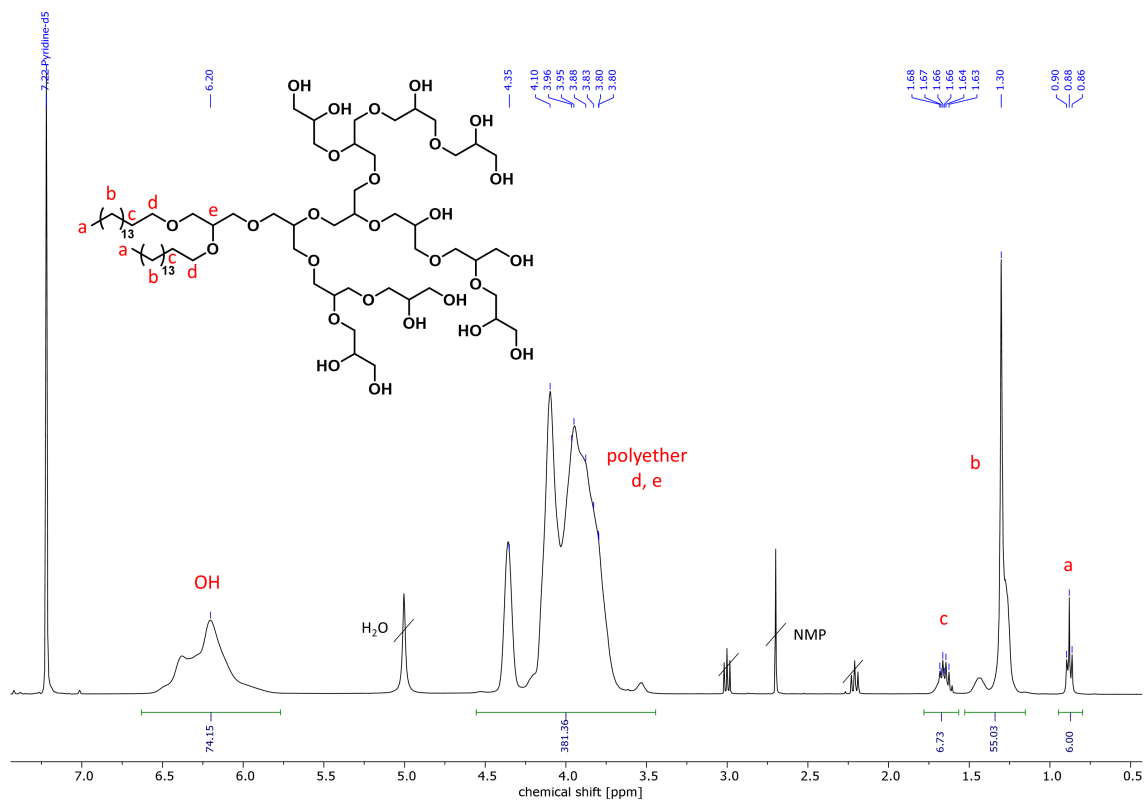
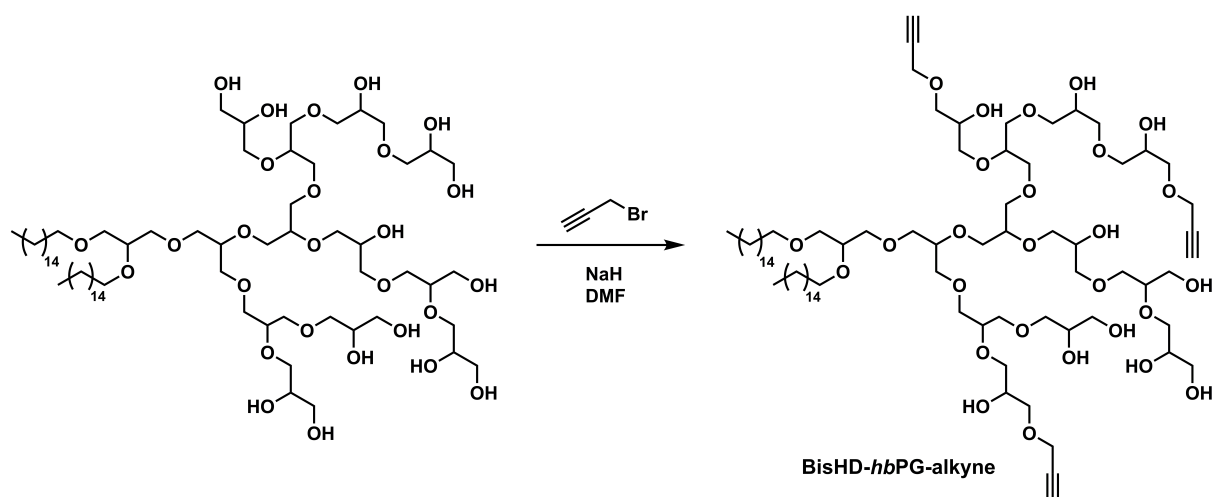


Figure S4:  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (400 MHz, pyridine- $d_5$ ) of BisHD-*hbPG*.

### Synthesis of BisHD-*hbPG*-alkyne



Scheme S5: Synthesis route of BisHD-*hbPG*-alkyne.

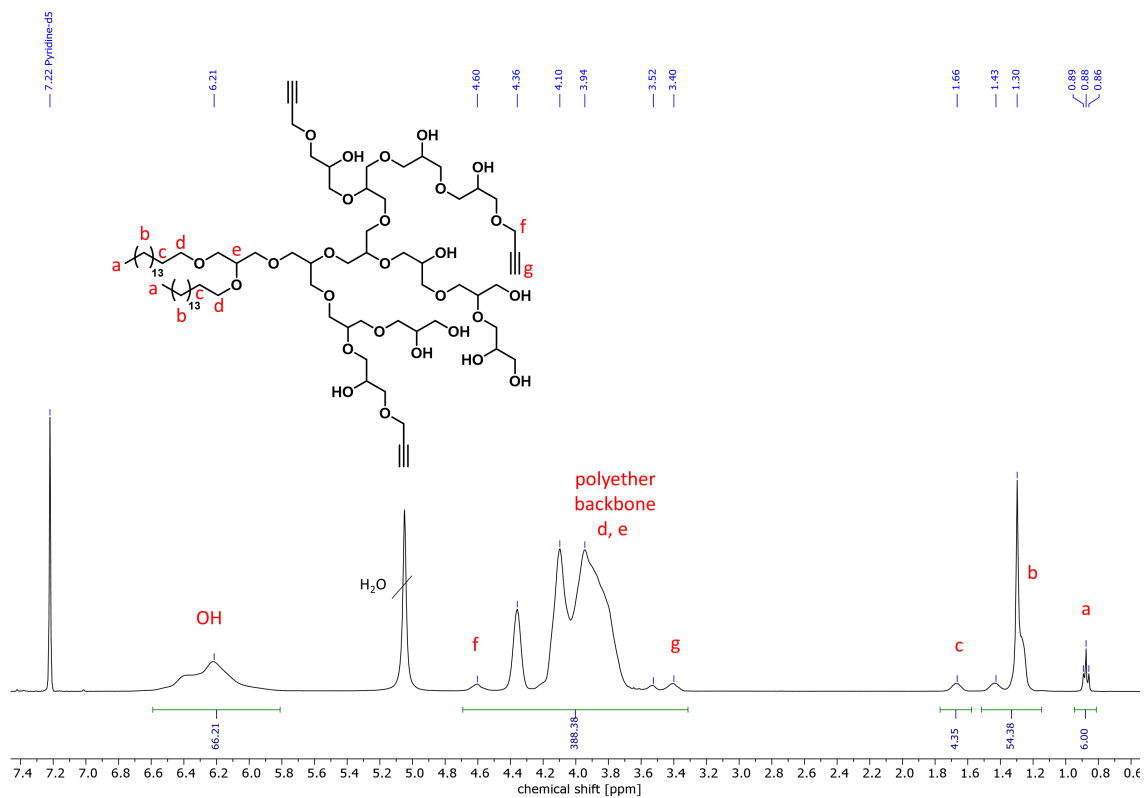


Figure S5:  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (400 MHz, pyridine- $d_5$ ) of BisHD-*hb*PG-alkyne.

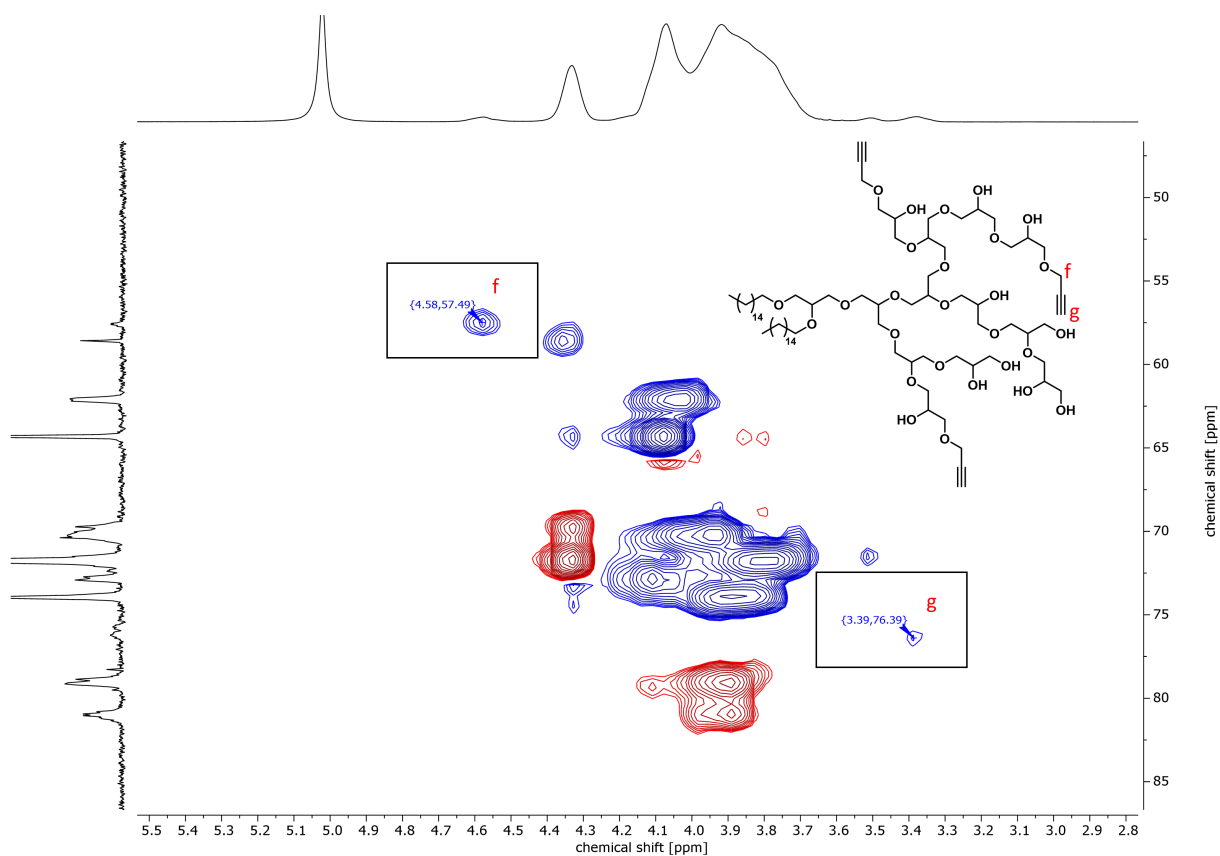
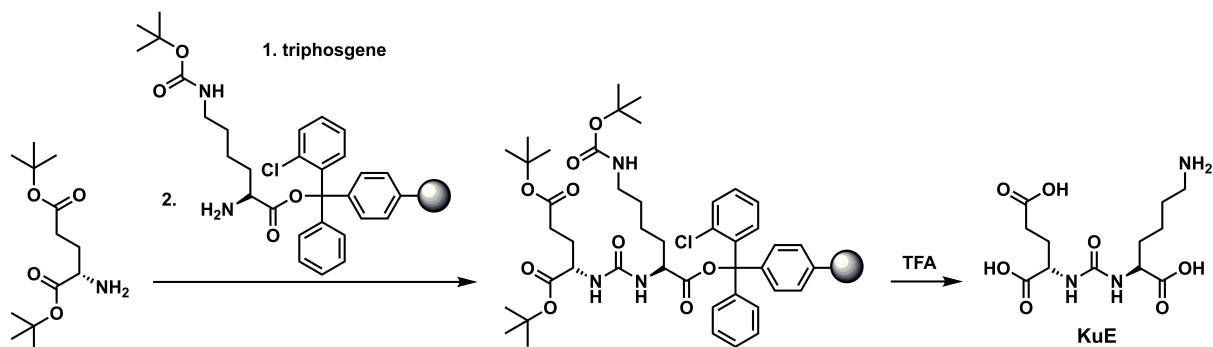


Figure S6:  $(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -HSQC-NMR spectrum (400 MHz, pyridine- $d_5$ ) of BisHD-*hb*PG-alkyne.



## Synthesis of KuE-SA-N<sub>3</sub>

### 2-(3-(5-Amino-1-carboxy-pentyl)ureido)pentanedioic acid (L-lysine-urea-L-glutamate, KuE)



Scheme S6: Synthesis route of KuE.

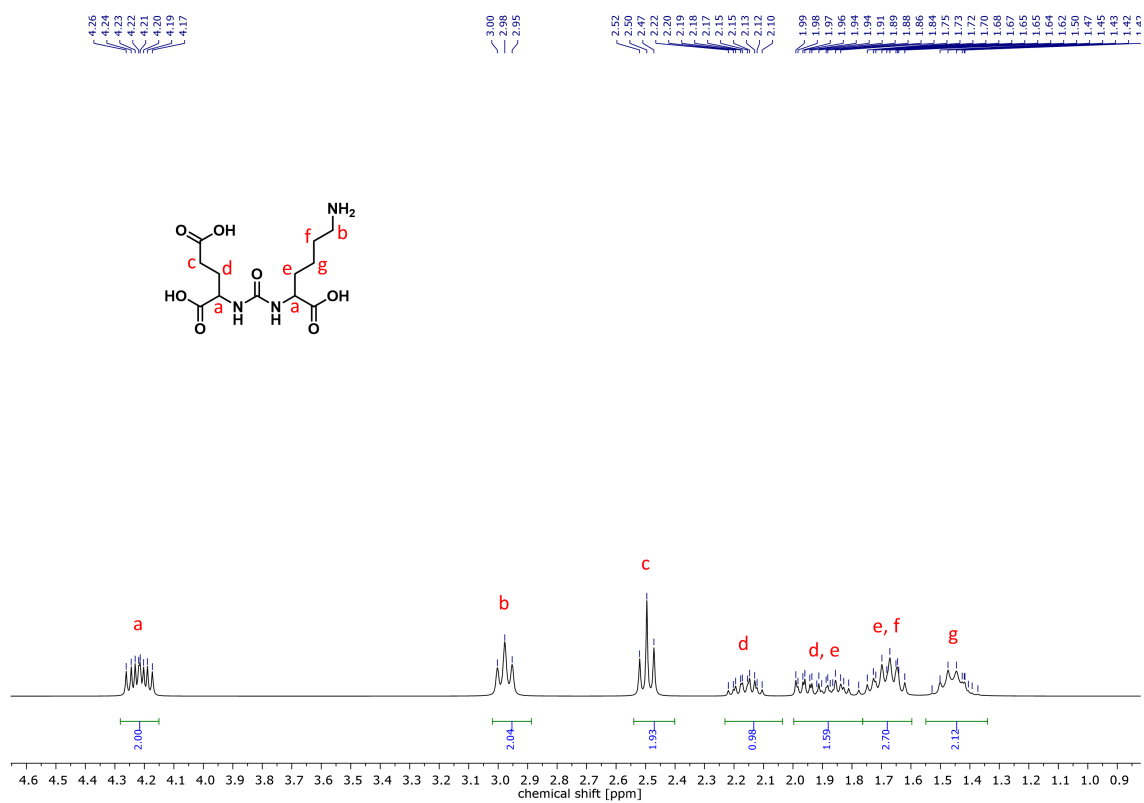
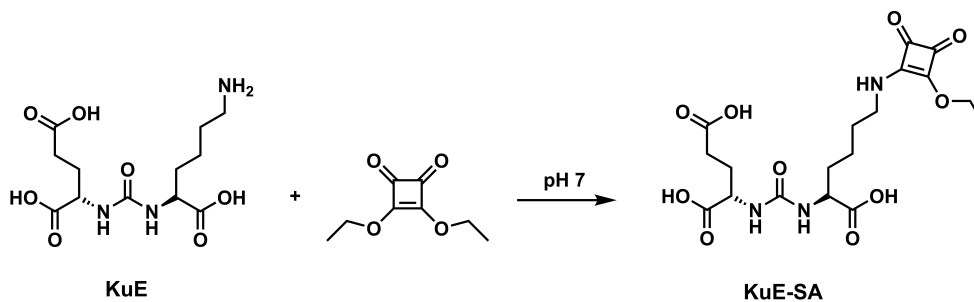
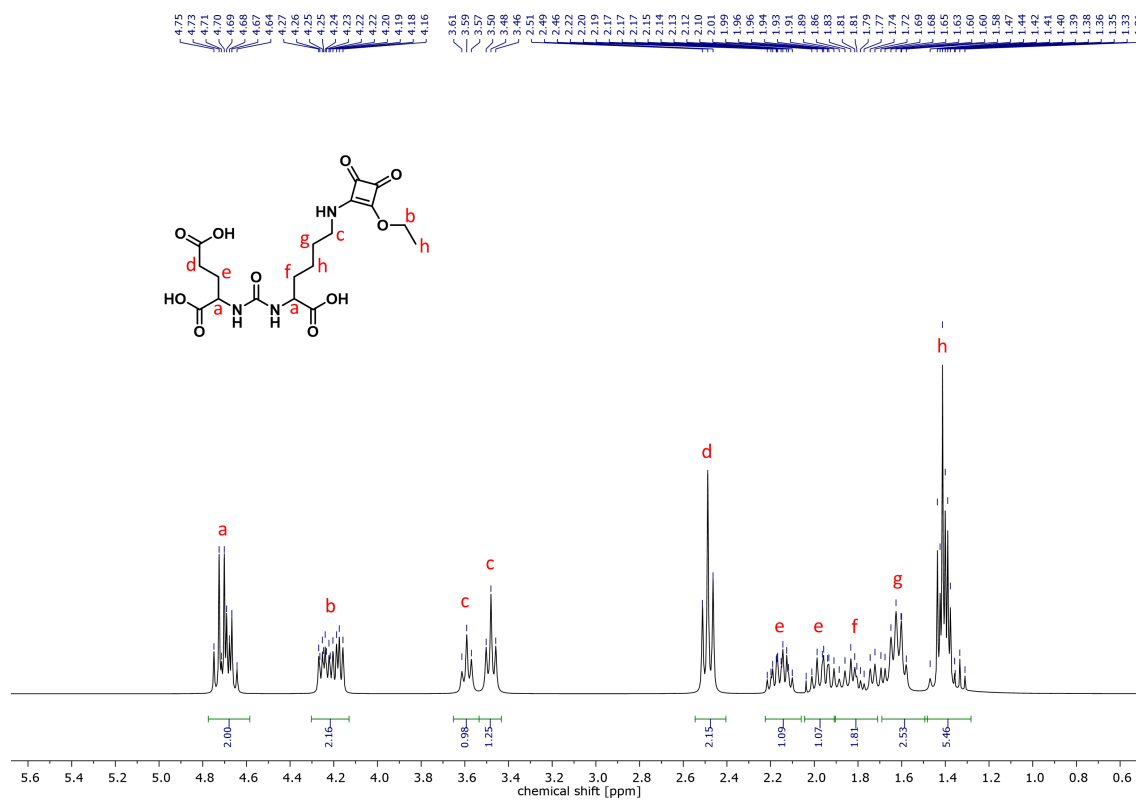


Figure S7: <sup>1</sup>H-NMR spectrum (300 MHz, D<sub>2</sub>O) of KuE.

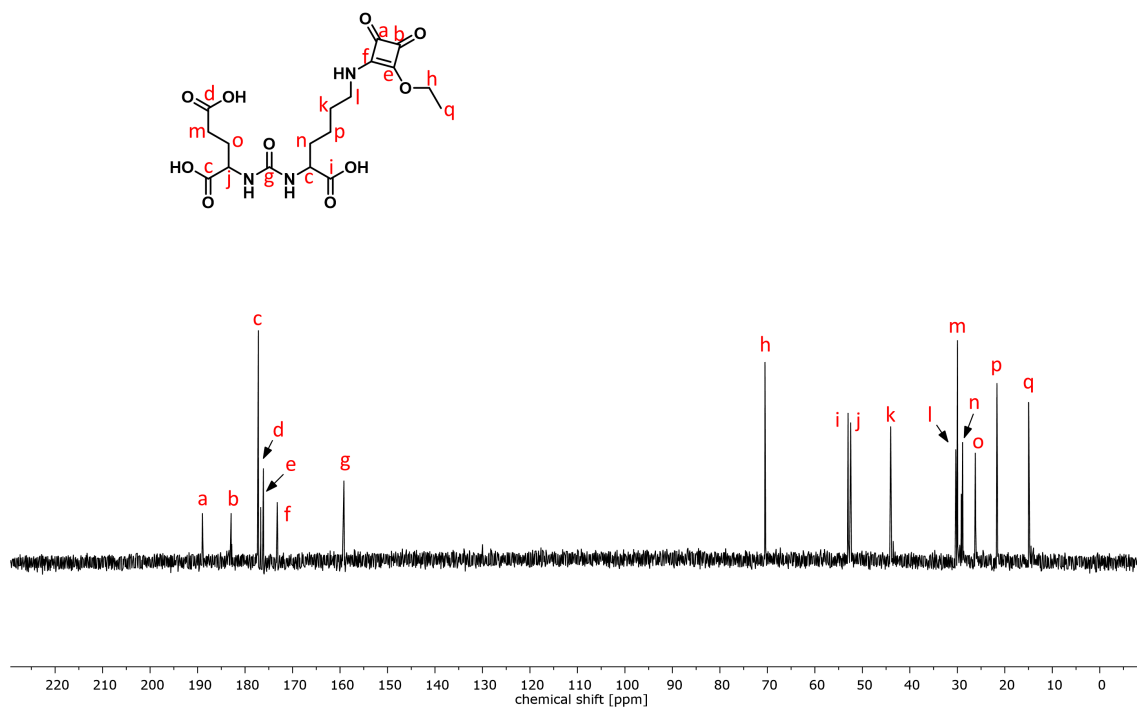
**2-(3-(1-Carboxy-5-((2-ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)pentyl)ureido)-pentanedioic acid (KuE-SA)**



**Scheme S7:** Synthesis route of KuE-SA.

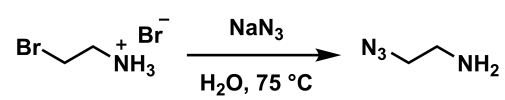


**Figure S8:** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (300 MHz, D<sub>2</sub>O) of KuE-SA.



**Figure S9:** <sup>13</sup>C-NMR spectrum (300 MHz, D<sub>2</sub>O) of KuE-SA.

## 2-Azidoethylamine



**Scheme S8:** Synthesis route of 2-azidoethylamine.

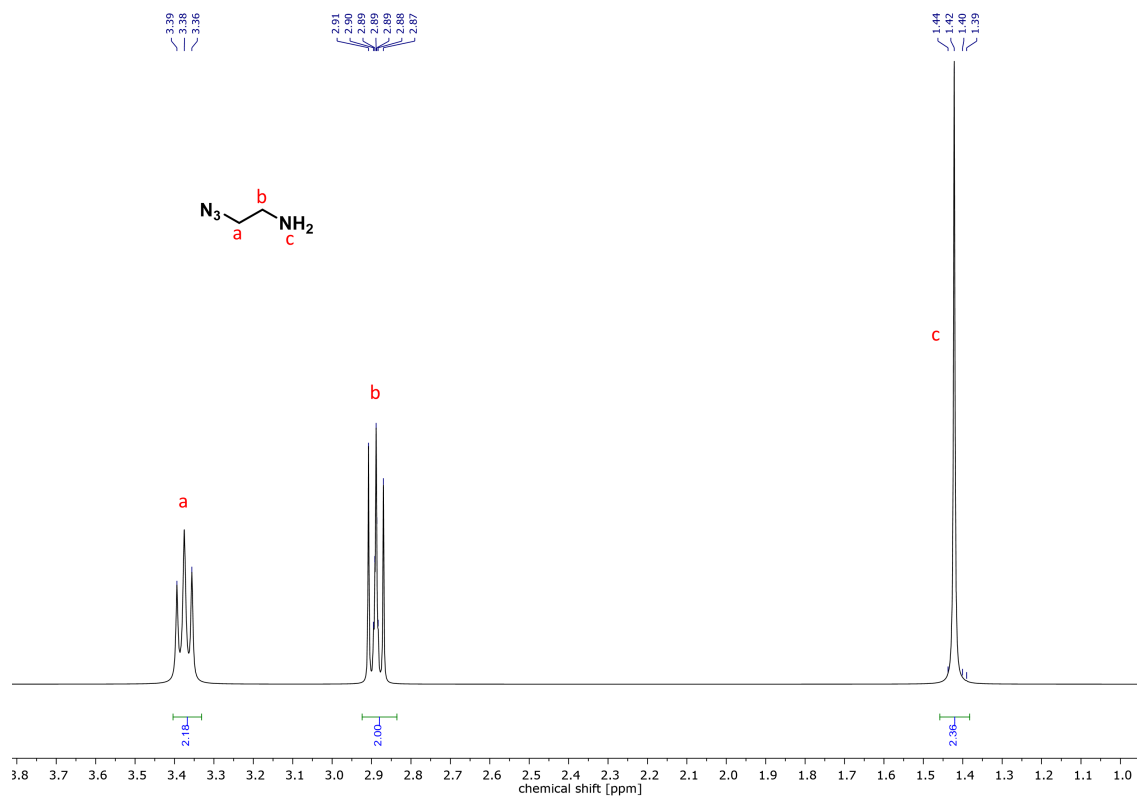


Figure S10: <sup>1</sup>H-NMR spectrum (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of 2-azidoethylamine.

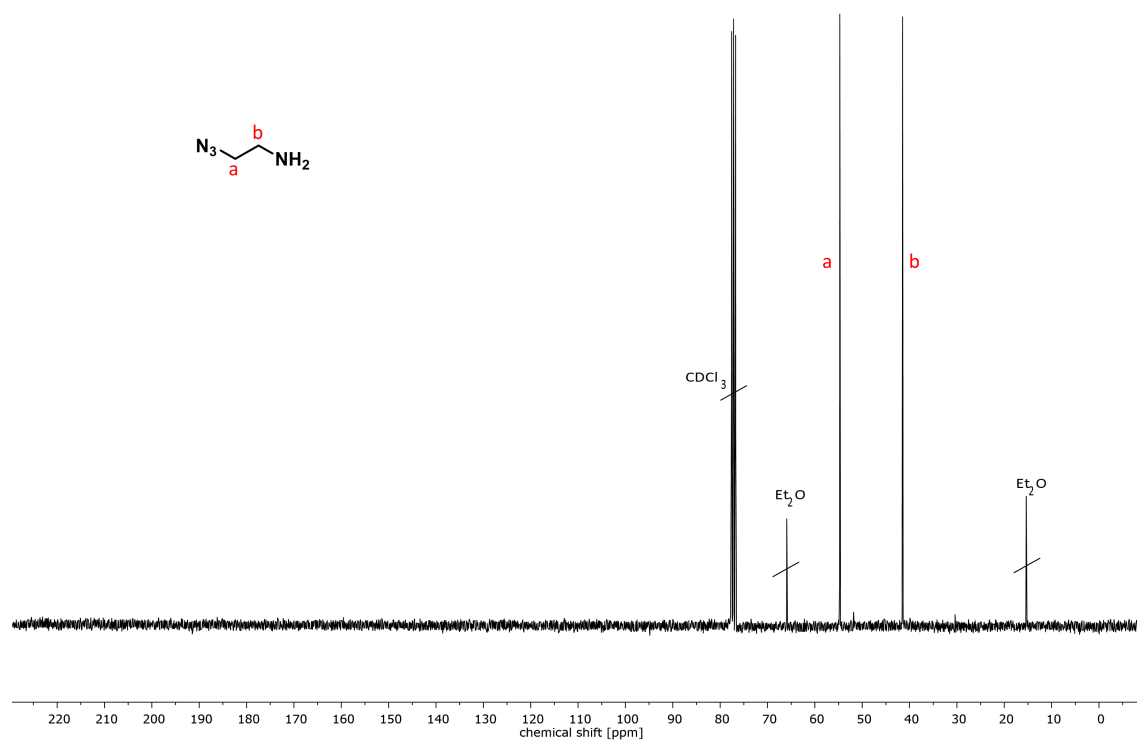
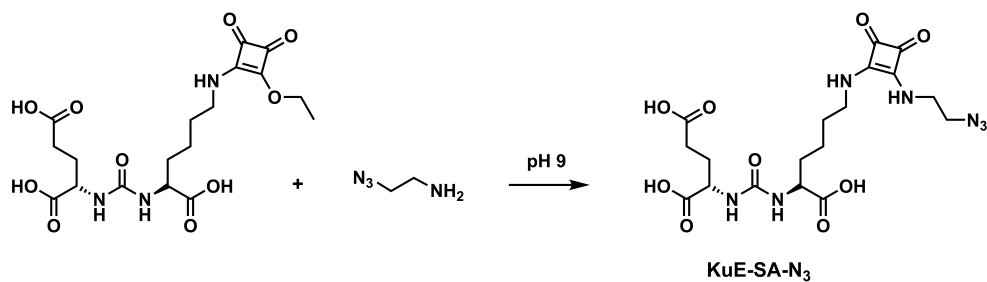
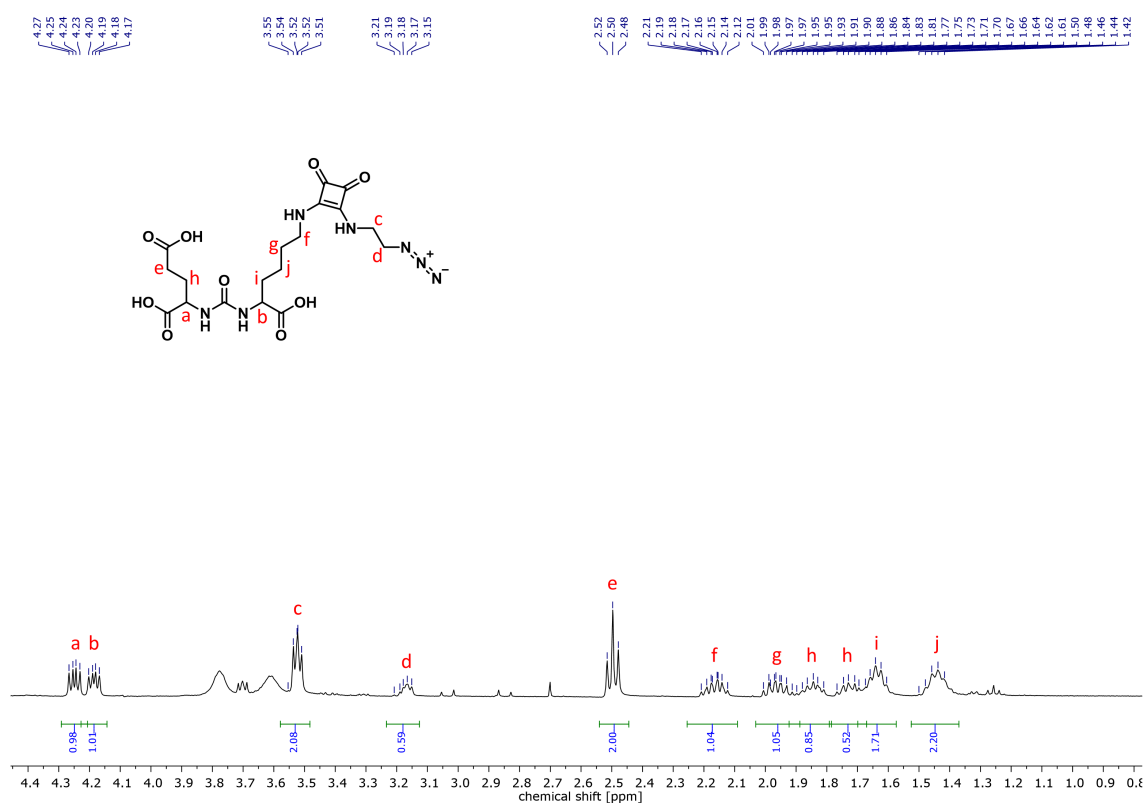


Figure S11: <sup>13</sup>C-NMR spectrum (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) of 2-azidoethylamine.

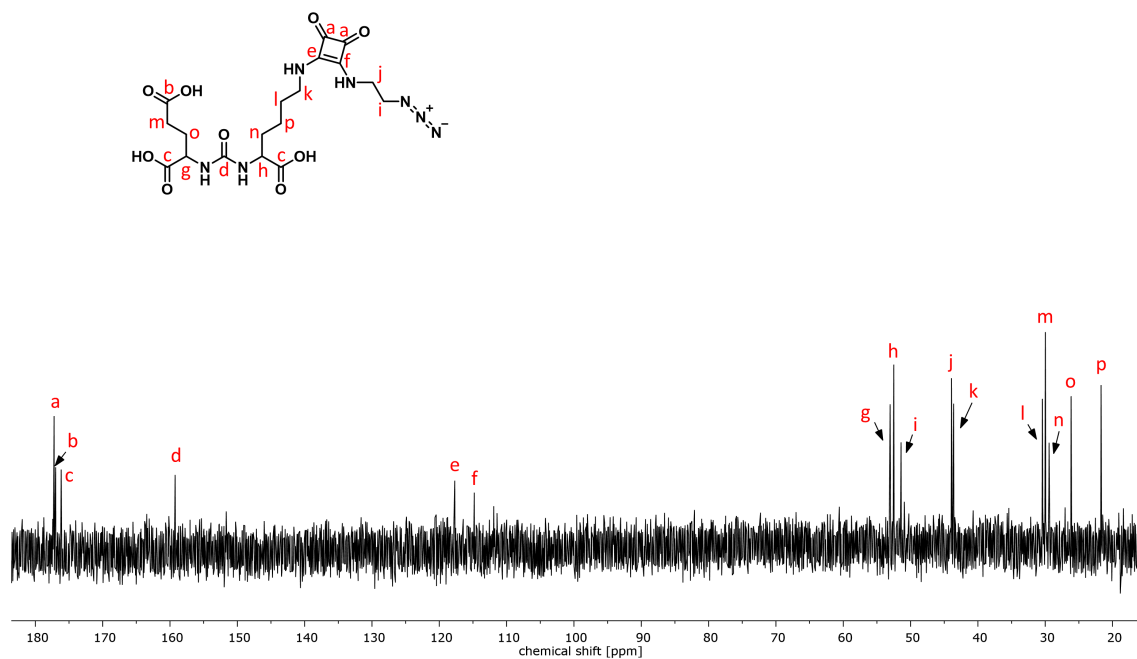
**2-(3-(5-((2-Azidoethyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)-1-carboxypentyl)ureido)pentanedioic acid (KuE-SA-N<sub>3</sub>)**



**Scheme S9:** Synthesis route of KuE-SA-N<sub>3</sub>.

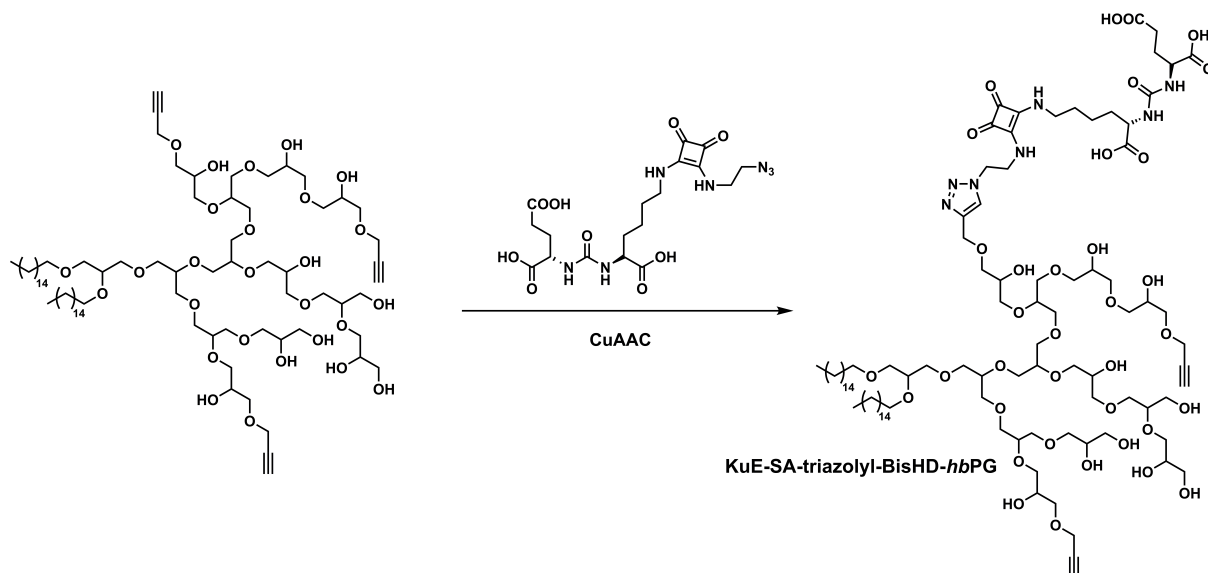


**Figure S12:** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (400 MHz, D<sub>2</sub>O) of KuE-SA-N<sub>3</sub>.

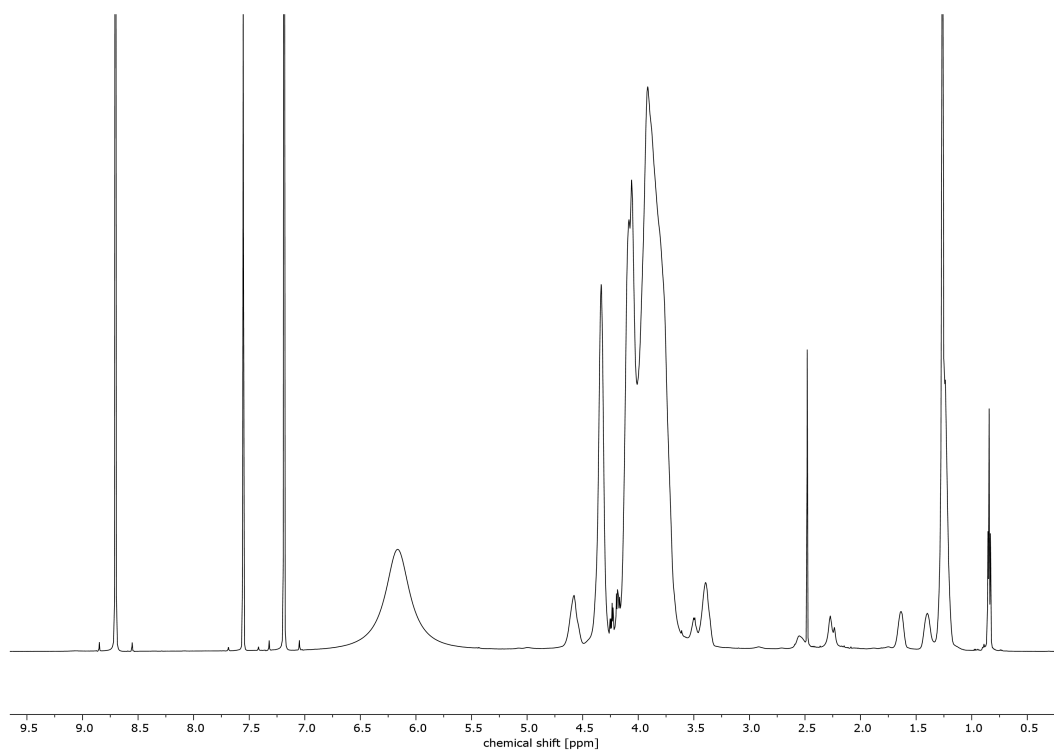


**Figure S13:**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) of KuE-SA- $\text{N}_3$ .

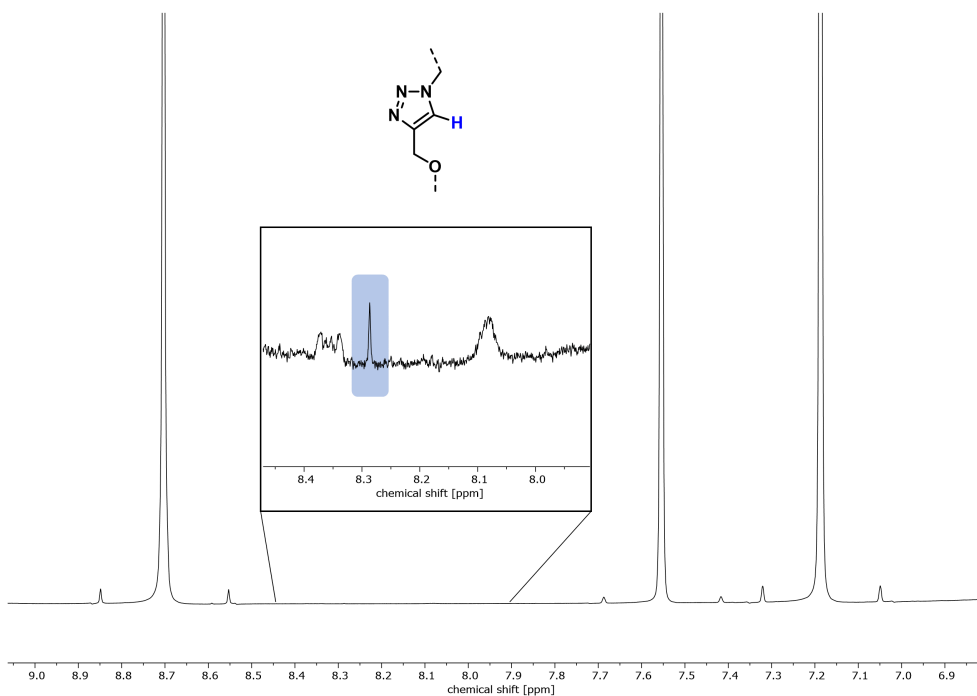
### Synthesis of KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hb*PG



**Scheme S10:** Synthesis route of KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hb*PG.



**Figure S14:** <sup>1</sup>H-NMR spectrum (600 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) of KuE-SA-triazolyl-BisHD-hbPG.



**Figure S15:** Zoom-in <sup>1</sup>H-NMR spectrum (600 MHz, pyridine-d<sub>5</sub>) of KuE-SA-triazolyl-BisHD-hbPG.

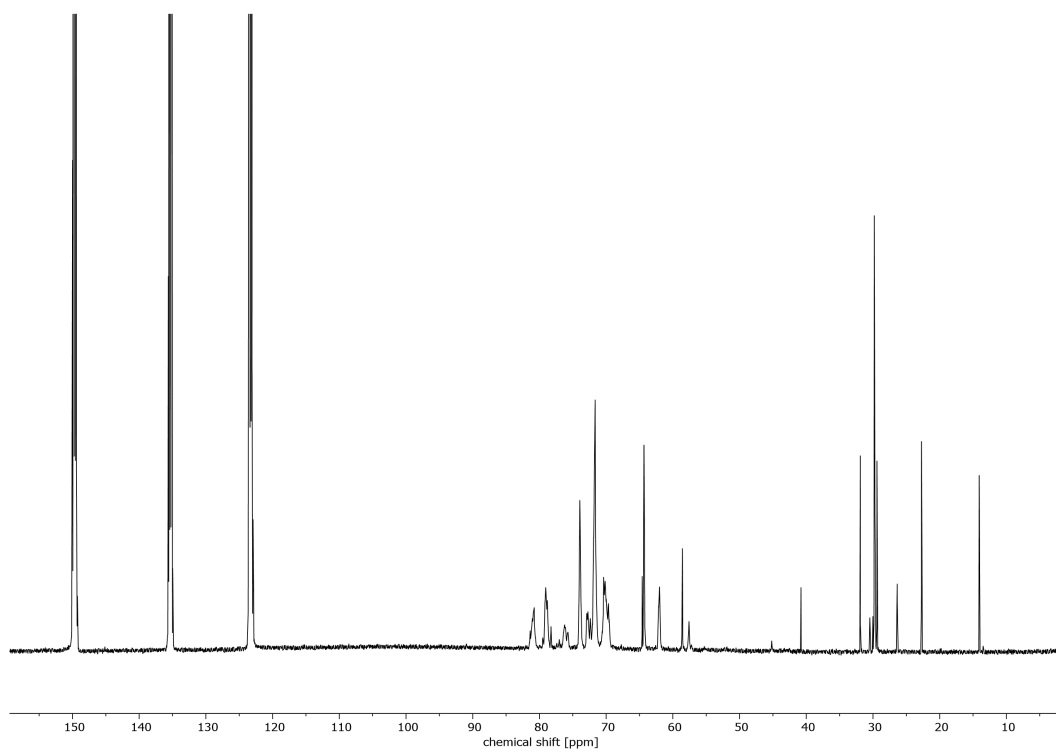


Figure S16:  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (151 MHz, pyridine- $d_5$ ) of KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hbPG*.

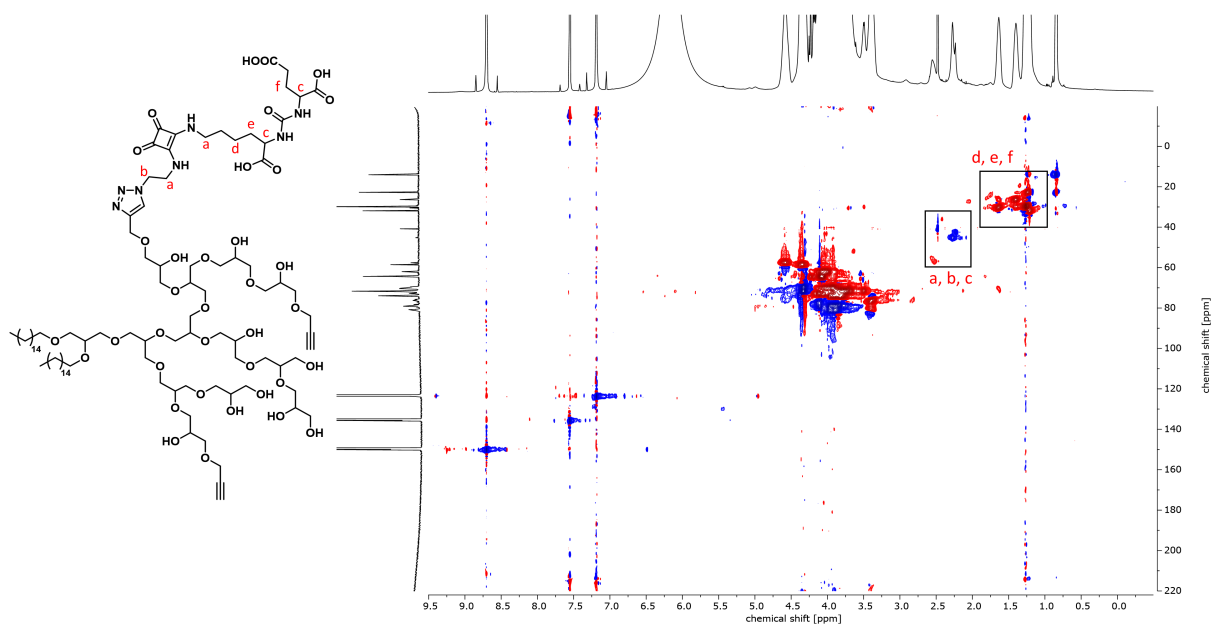
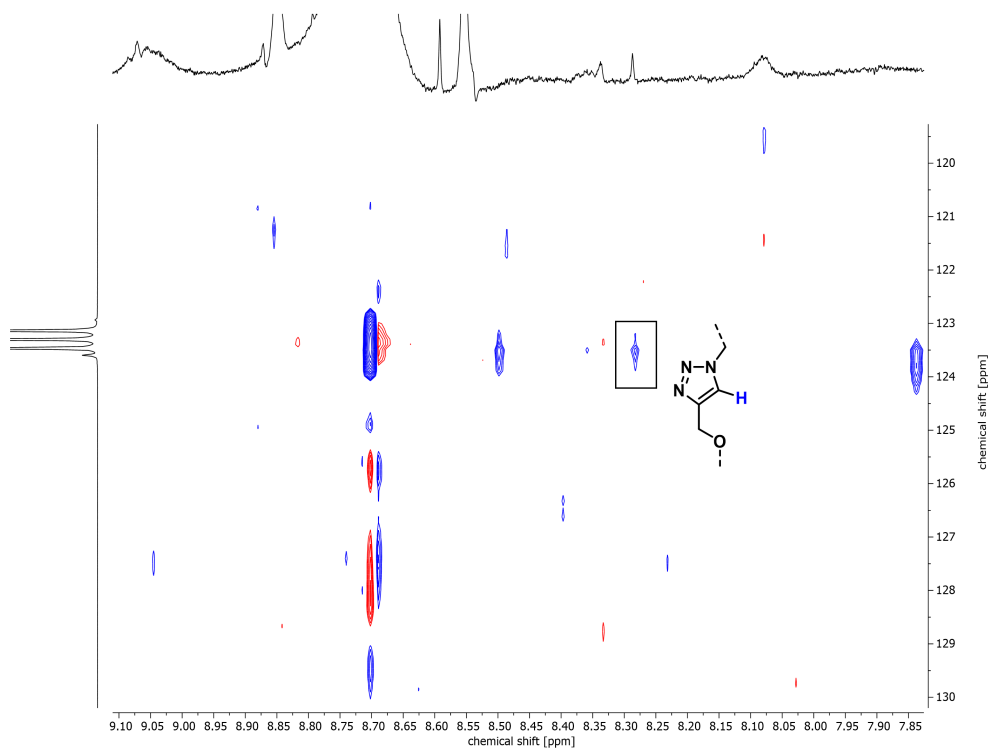


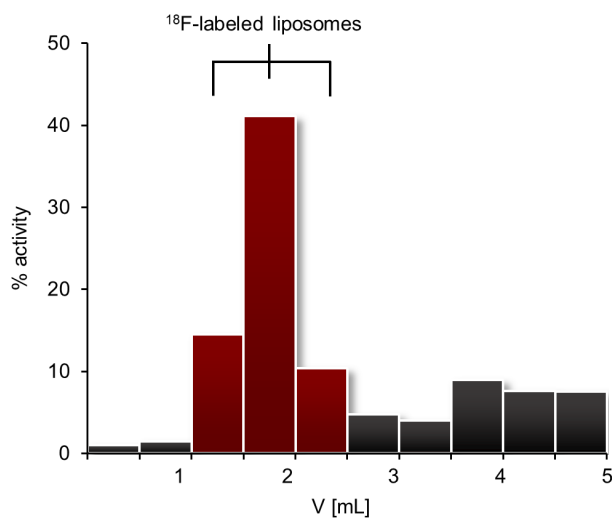
Figure S17:  $(^1\text{H}, ^{13}\text{C})$ -HSQC-NMR spectrum (600 MHz, pyridine- $d_5$ ) of KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hbPG*.





**Figure S18:** Zoom-in ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-HSQC-NMR spectrum (600 MHz, pyridine- $d_5$ ) of KuE-SA-triazolyl-BisHD-*hbPG*.

### SEC purification of the $^{18}\text{F}$ -labeled BisHD-*hbPG*-KuE-SA liposomes



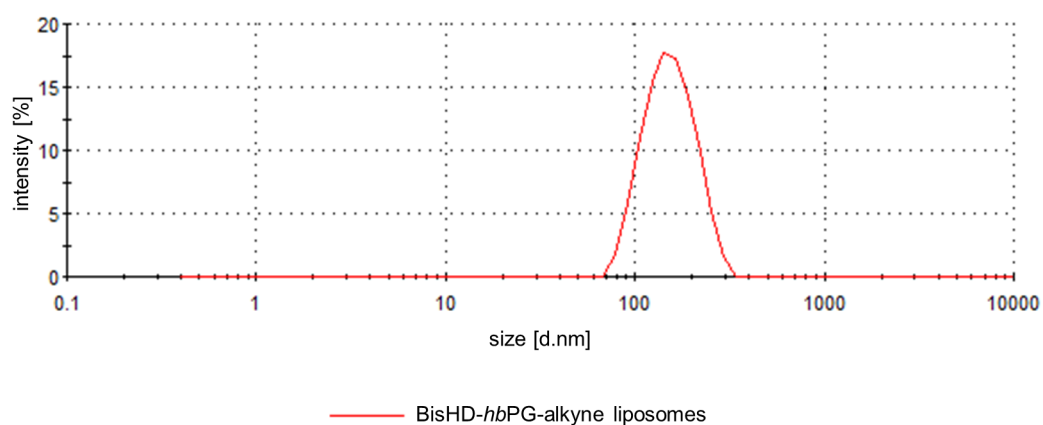
**Figure S19:** SEC elugram displaying the distribution of radioactivity in consecutive fractions of 0.5 mL PBS during purification of  $^{18}\text{F}$ -labeled BisHD-*hbPG*-KuE-SA liposomes.

## DLS measurement

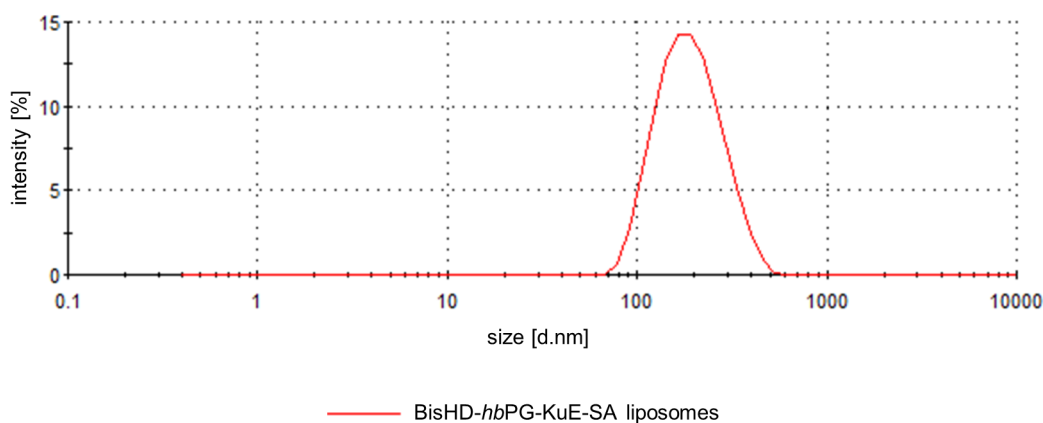
**Table S1:** DLS measurement data of the liposomes containing either BisHD-*hb*PG-alkyne or BisHD-*hb*PG-KuE-SA.

Sample	Z-Average <sup>a</sup> (d.nm)	Size <sup>a</sup> (d.nm)	Intensity <sup>a</sup> (%)	PDI <sup>a</sup>
BisHD- <i>hb</i> PG-alkyne liposomes	144.9	157.5	100	0.071
BisHD- <i>hb</i> PG-KuE-SA liposomes	167.4	199.1	100	0.206

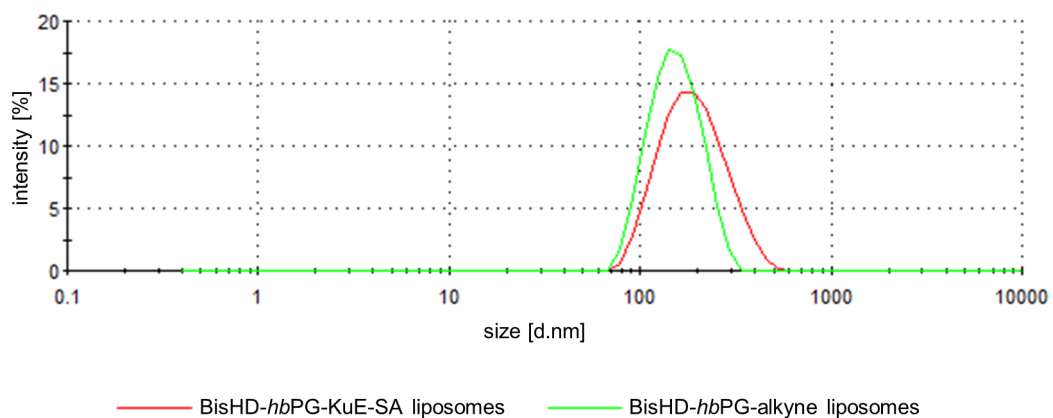
<sup>a</sup> determined by DLS via Zetasizer



**Figure S20:** DLS measurement of the liposomes containing BisHD-*hb*PG-alkyne.



**Figure S21:** DLS measurement of the liposomes containing BisHD-*hb*PG-KuE-SA.



**Figure S22:** Overlay of the DLS measurements of the liposomes containing either BisHD-*hbPG*-alkyne (green) or BisHD-*hbPG*-KuE-SA (red).



## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Folgenden sind die Ergebnisse und kurzen Ausblicke der in dieser Arbeit behandelten Teilprojekte A–E zusammengefasst.

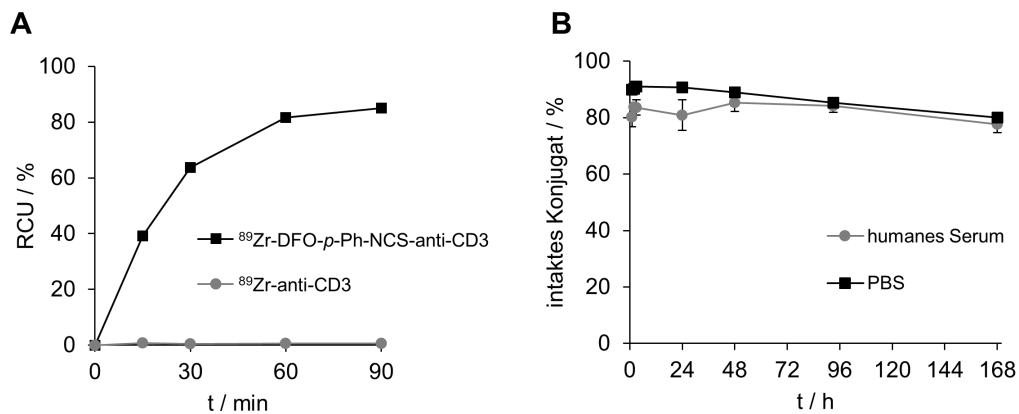
### **Teilprojekt A:**

Die Transplantation von allogenen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) stellt eine effektive kurative Therapiemöglichkeit zur Behandlung hämatologischer Malignome wie z. B. Leukämie oder von Autoimmunerkrankungen dar. T-Zellen innerhalb des Transplantats spielen dabei eine entscheidende Rolle. Sie erleichtern beispielsweise das Einschleusen blutbildender Zellen, beschleunigen die Immunrekonstitution und sind wichtig für die immunologische Tumorkontrolle [1]. Andererseits sind sie jedoch auch für das häufige Auftreten der sogenannten „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD) verantwortlich [1,2]. Hierbei interagieren diese T-Lymphozyten kurz nach der Transplantation mit aktivierten APCs des Empfängers, was anschließend zur Differenzierung in Effektor-Zellen, Produktion von Zytokinen und Rekrutierung weiterer Effektor-Zellen führt. Die Folge sind unmittelbare Organschädigungen typischerweise der Leber, des Gastrointestinaltraktes sowie der Haut [1,3–6]. Eine frühzeitige Diagnose der Erkrankung ist daher von essentieller Bedeutung, stellt jedoch nach wie vor eine große Herausforderung dar. Ein vielversprechender Ansatz zur Lösung dieser Problematik besteht in der Immuno-PET/MRT Bildgebung unter Verwendung von Biomarkern, die mit der Induktion und Progression der GvHD assoziiert sind. Die Applikation entsprechend radiomarkierter, spezifischer Antikörper kann die Darstellung der biologischen Verteilung von Spender-T-Zellen bei der Entwicklung einer GvHD ermöglichen und somit zur frühzeitigen Diagnose und Einschätzung des Krankheitsstadiums dienen, noch bevor klinische Anzeichen bemerkbar sind. Des Weiteren können somit auch verschiedene Arten der Erkrankung unterschieden und mögliche Behandlungsoptionen entsprechend ausgewählt werden.

Im Rahmen des Teilprojekts A „*Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD*“ sollte das diagnostische Potential der Immuno-PET/MRT Bildgebung zur Darstellung humaner T-Zellen sowie deren Migration bei der Entwicklung einer GvHD innerhalb eines humanisierten Mausmodells untersucht werden. Durch Verwendung eines radiomarkierten, CD3-spezifischen Antikörpers sollte somit die Kinetik T-Zell vermittelter Entzündungen sowie der immunsuppressive, therapeutische Einfluss von  $T_{reg}$  anhand PET/MRT Messungen visualisiert und mit klinischen Symptomen, histologischen bzw. zytologischen Befunden und den Ergebnissen von *ex vivo*-Biodistributionsstudien verglichen werden.

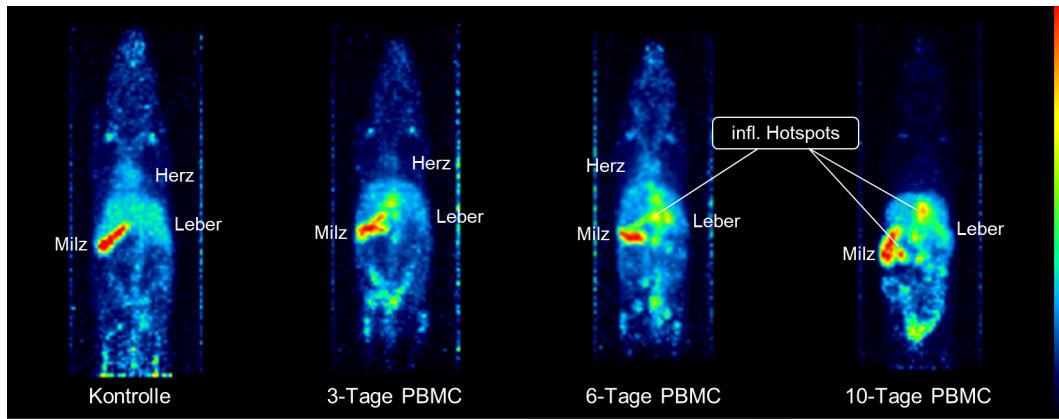
Hierfür wurde der kommerziell erhältliche, CD3-spezifische Antikörper Muromonab-CD3 (anti-human CD3 mAb) zunächst mit DFO-*p*-Ph-NCS funktionalisiert und aufgereinigt. Die Messung der Proliferation von T-Zellen, welche durch die Bindung des erhaltenen Immunkonjugats aktiviert wurden, konnte zeigen, dass die Funktionalisierung durch den DFO-Chelator keinen oder nur geringen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Antikörpers hat. Bei der anschließenden Radiomarkierung mit dem Positronemitter  $^{89}\text{Zr}$  unter milden Bedingungen wurde nach 90 min ein radiochemischer Umsatz (RCU) von bis zu 85 % erreicht (Abbildung 38A) und nach Aufreinigung konnte  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-}p\text{-Ph-NCS-anti-human CD3 mAb}$  mit radiochemischen Reinheiten von > 93 % und scheinbar-molaren Aktivitäten von 87–131 GBq/ $\mu\text{mol}$  erhalten werden. Bei Messungen der *in vitro*-Komplexstabilität zeigte das Radioimmunkonjugat nach sieben Tagen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und humanem Serum

noch einen Anteil von >80 % bzw. >78 % Protein-gebundener Aktivität (Abbildung 38B). Diese geringfügige Dissoziation ist vermutlich auf eine bekannte, leichte Instabilität des  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-Komplexes zurückzuführen, welche insbesondere bei präklinischen *in vivo*-Studien oftmals zu einer Freisetzung des osteophilen Radiometalls und Anreicherung im Knochengewebe führt (vgl. Kapitel 2.2.1, 2.4.1).



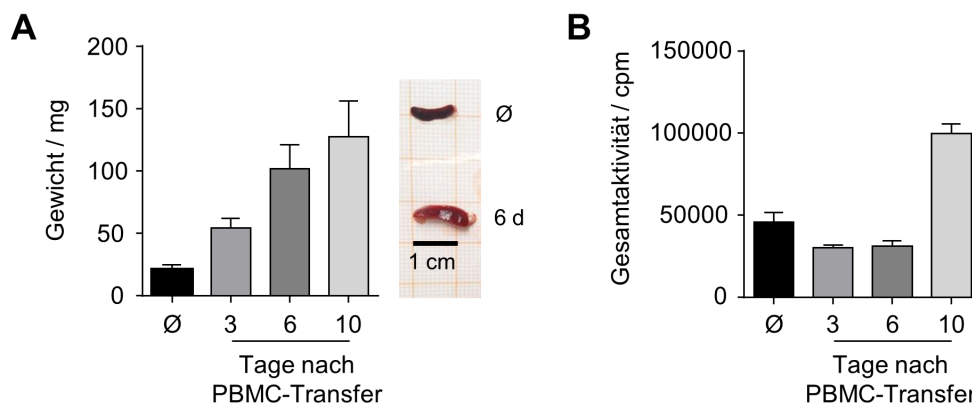
**Abbildung 38:** Markierungseffizienz von  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-*p*-Ph-NCS-anti-CD3 mAb über einen Zeitraum von 90 min bei 37 °C in HEPES-Puffer (pH 7), unmodifizierter anti-CD3 mAb diente als Negativkontrolle (A). *In vitro*-Komplexstabilität des Radioimmunkonjugats über einen Zeitraum von 7 d in PBS und humanem Serum bei 37 °C (B).

Die humanisierte Maus gilt als bewährtes Modell zur Untersuchung der GvHD im menschlichen Kontext. Beim Transfer humaner mononukleärer Blutzellen (PBMC) in immundefiziente Mäuse reagieren humane T-Zellen des Transplantats auf xenogene Wirtsantigene und vermitteln somit die Entwicklung einer GvHD. Diese Mäuse zeigen in der Folge typische GvHD-Symptome wie Dermatitis, Colitis und Hepatitis [7,8]. Innerhalb dieser Studie wurden demnach zunächst humane PBMC in immundefiziente Mäuse zur Induktion einer GvHD injiziert. Zur Untersuchung unterschiedlicher Stadien der Erkrankung wurde der  $^{89}\text{Zr}$ -markierte anti-CD3 mAb anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 6 und 10 Tage) nach PBMC-Transfer appliziert und innerhalb der darauffolgenden 7 Tage PET/MRT Messungen durchgeführt. Bereits 24 h nach der Injektion des Antikörpers konnte in allen drei PBMC-Gruppen eine deutliche Anreicherung in Milz, Leber und Darm beobachtet werden. Insbesondere bei den 10-Tage Tieren aber auch schon 6 und 3 Tage nach PBMC-Transfer konnten mit Hilfe des CD3-spezifischen Radioimmunkonjugats deutliche „inflammatorische Hotspots“ im Bereich der Portalvene der Leber und im Darm visualisiert werden. Abbildung 39 zeigt ausgewählte PET-Aufnahmen der PBMC-behandelten Tiere sowie der Kontrollgruppe 48 h nach der Injektion des  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörpers.



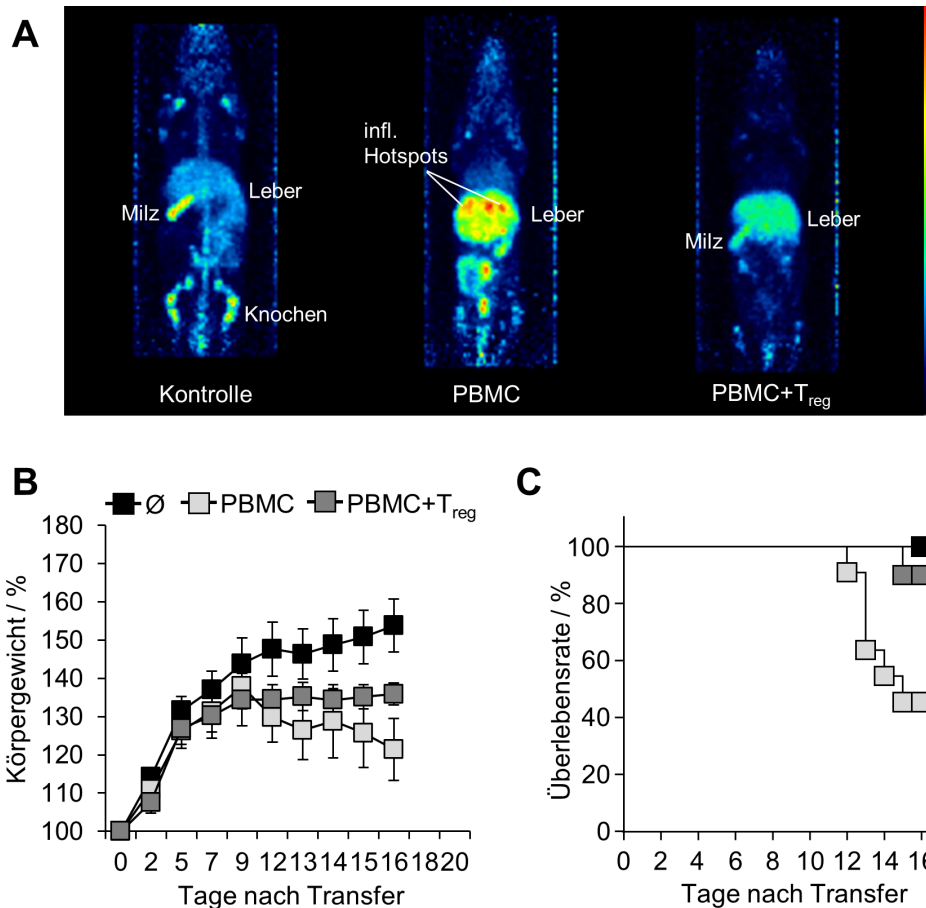
**Abbildung 39:** Repräsentative PET-Aufnahmen (koronale MIP) 48 h nach Injektion von  $[^{89}\text{Zr}]\text{Zr-DFO-p-Ph-NCS-anti-CD3}$  mAb in GvHD-Mäuse 3, 6 oder 10 Tage nach PBMC-Transfer sowie in unbehandelte Kontrolltiere.

Unmittelbar nach GvHD Induktion in den humanisierten Mäusen werden T-Zellen aktiviert und breiten sich in die Milz aus. Die Folge ist eine signifikante Vergrößerung des Organs, welche im Rahmen dieser Studie eindeutig beobachtet werden konnte. Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren ( $\emptyset$ ) zeigte sich bereits in der 3-Tage PBMC Gruppe eine deutliche Volumen- und Gewichtszunahme der Milz. In der 10-Tage Gruppe wies das betroffene Organ ein fast 6-fach höheres Gewicht auf (Abbildung 40A). Die bereits anhand der PET-Aufnahmen deutlich sichtbare Anreicherung des  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörpers in diesem Organ wurde durch *ex vivo*-Biodistributionsdaten bestätigt. Insbesondere die 10-Tage Tiere zeigten eine sehr hohe aufgenommene Gesamtaktivität, die mit der Größe des Organs und dem Anteil CD3-positiver T-Zellen korreliert (Abbildung 40B). Ein hoher Milz-Uptake des Radioimmunkonjugats konnte jedoch auch in unbehandelten Kontrolltieren beobachtet werden, was vermutlich auf die Wechselwirkung zwischen dem murinen Fc-Teil des Antikörpers und dem Fc-Rezeptor verschiedener Zellen in der Milz zurückzuführen ist. Durch dieses unspezifische Untergrundsignal ist die tatsächliche CD3-spezifische Akkumulation in den GvHD-Gruppen daher nur eingeschränkt quantifizierbar.



**Abbildung 40:** Gewicht (A) und aufgenommene Gesamtaktivität (B) der Milz der PBMC-behandelten Tiere sowie der Kontrollgruppe 7 d nach Injektion des  $^{89}\text{Zr}$ -markierten anti-CD3 mAb. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

Ein moderner zellbasierter Ansatz zur Behandlung und Prävention von GvHD-Symptomen besteht in der Verwendung regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ), welche in der Lage sind, die Immuntoleranz des Empfängerorganismus aufrechtzuerhalten und somit starke Immunantworten zu vermeiden [9–12].



**Abbildung 41:** Repräsentative PET-Aufnahmen (koronale MIP) 24 h nach Injektion von  $[^{89}\text{Zr}]\text{-DFO-p-Ph-NCS-anti-CD3}$  mAb in GvHD-Mäuse 19 Tage nach Transfer von entweder PBMC oder PBMC +  $T_{reg}$  sowie in unbehandelte Kontrolltiere (A). Entwicklung des Körpergewichts (B) und Überlebensrate (C) der unterschiedlichen Gruppen.

In einem weiteren Experiment sollte das Potential der CD3-basierten Immuno-PET zur Darstellung des präventiven Einflusses adoptiv transferierter  $T_{reg}$  anhand des humanisierten Mausmodells untersucht werden. Hierfür wurde die Entwicklung einer GvHD in immundefizienten Mäusen erneut durch Injektion humaner PBMC induziert. Bei einer zweiten Gruppe erfolgte zusätzlich die Applikation zuvor aktivierter  $T_{reg}$ . 19 Tage später wurde allen Tieren  $^{89}\text{Zr}$ -markierter anti-CD3 mAb verabreicht und PET/MRT Messungen durchgeführt. Wie bereits im vorausgegangenen Experiment konnte bei den Tieren mit ausschließlicher PBMC-Transfer eine sehr hohe und heterogene Akkumulation des CD3-spezifischen Antikörpers in der Leber insbesondere in der Nähe der hepatischen Portalvene in Form inflammatorischer Hotspots beobachtet werden. Die Tiere mit zusätzlicher  $T_{reg}$ -Behandlung zeigten hingegen eine deutlich geringere und homogenere Aufnahme der Aktivität mit verminderter Bildung von Hotspots (Abbildung 41A). Diese Ergebnisse waren im Einklang mit den beobachteten klinischen Symptomen und *ex vivo*-Untersuchungen. GvHD-Tiere ohne  $T_{reg}$ -Behandlung zeigten beispielsweise einen signifikanten Verlust des Körpergewichts von ca. 30 % und eine verringerte Überlebensrate im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 41B, C). Durch den Einfluss regulatorischer T-



Zellen konnte die Gewichtsabnahme reduziert bzw. verhindert und somit die Überlebensrate erhöht werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Teilprojekt die Verteilung CD3-positiver T-Zellen innerhalb eines humanisierten Mausmodells bei der Entwicklung einer GvHD erfolgreich mittels  $^{89}\text{Zr}$ -basierter Immuno-PET/MRT visualisiert werden. Insbesondere in Milz und Leber wurde eine schnelle und massive Infiltration humaner T-Zellen bereits in frühen Stadien der Erkrankung beobachtet. Anhand des radiomarkierten, CD3-spezifischen Antikörpers konnte zudem eine eindeutige Reduktion der T-Zellen in GvHD-relevanten Organen durch den präventiven Einfluss zusätzlich verabreichter  $T_{\text{reg}}$  dargestellt werden. Insgesamt korrelierten die erhaltenen PET/MRT-Aufnahmen stark mit der klinischen Symptomatik sowie mit Ergebnissen der *ex vivo*-Analysen. Die CD3-basierte Immuno-PET/MRT Bildgebung stellt daher eine vielversprechende Strategie einerseits zur frühzeitigen Diagnose der GvHD und andererseits zur Überprüfung des therapeutischen Erfolgs dar.

Die Anreicherung des Radioimmunkonjugats in der Milz der unbehandelten Kontrolltiere lässt vermuten, dass der Milz-Uptake auch bei den PBMC-behandelten Tieren nicht ausschließlich auf eine spezifische Adressierung CD3-positiver T-Zellen zurückzuführen ist. Die Milz der verwendeten immundefizienten Mäuse enthält dendritische Zellen, Granulozyten und Makrophagen, welche eine hohe Expression von Fc-Rezeptoren aufweisen und somit an den murinen Fc-Teil des anti-CD3 mAb binden können [13]. Um diese Einschränkung zu umgehen, könnten zukünftige Folgeversuche beispielsweise die Verwendung CD3-spezifischer Fab-Fragmente oder eine vorausgehende *in vivo*-Blockierung der Fc-Rezeptoren beinhalten.

Der in dieser „*Proof-of-Concept*“-Studie verwendete Antikörper Muromonab-CD3 ist vollständig murinen Ursprungs, d. h. er weist eine hohe Immunogenität im menschlichen Körper auf (vgl. Kapitel 2.5, 2.5.1). Für weiterführende klinische Studien bietet es sich daher an, humanisierte oder vollständig humane, CD3-spezifische Proteine wie z. B. Teplizumab oder Foralumab zu verwenden, um die Produktion von menschlichen anti-Maus Antikörpern und ungewünschte Nebenreaktionen zu vermeiden.

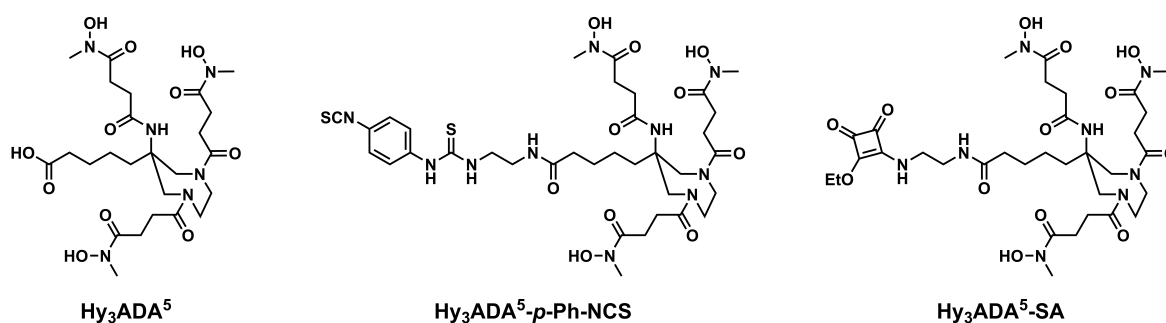
Die PET/MRT-Aufnahmen sowie *ex vivo*-Biodistributionsstudien zeigten bei nahezu allen untersuchten Tieren eine zeitlich ansteigende, geringe aber deutlich messbare Akkumulation der Aktivität im Knochengewebe. So ist beispielsweise bei den unbehandelten Kontrolltieren des zweiten Experiments bereits 24 h nach Injektion des  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörpers ein deutliches Signal im Oberschenkelknochen und in der Schulter zu erkennen (Abbildung 41A). Wie bereits mehrfach beschrieben (vgl. Kapitel 2.2.1, 2.4.1) basiert dieses Phänomen vermutlich auf einer gewissen *in vivo*-Instabilität des Zr-DFO-Komplexes. In zukünftigen Studien könnten daher verbesserte bzw. neuartige Chelatorderivate wie das DFO\* oder das in Teilprojekt B entwickelte  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  verwendet werden.

### **Teilprojekt B:**

Aufgrund seiner exzellenten physikalischen Zerfallseigenschaften ist das Positron-emittierende Radiometall Zirkonium-89 besonders für die Radiomarkierung von Antikörpern geeignet und hat daher in den vergangenen Jahren zunehmend an Interesse und Bedeutung für Immuno-PET Anwendungen gewonnen (vgl. Kapitel 2.2.1) [14,15].

Als Gold-Standard für die Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}$  gilt der offenkettige, hexadentate Chelator DFO [14–16]. Obwohl das Hydroxamat-basierte System in präklinischen und klinischen Anwendungen nahezu ausschließlich verwendet wird, stellt es bekanntermaßen nicht die ideale Lösung dar (vgl. Kapitel 2.2.1, 2.4.1). Wie auch in Teilprojekt A beobachtet, zeigen  $^{89}\text{Zr}$ -markierte, DFO-funktionalisierte Proteine insbesondere in präklinischen Studien oftmals eine gewisse *in vivo*-Instabilität und Freisetzung des osteophilen Radiometalls, erkennbar durch eine ungewünschte Anreicherung der Aktivität im Knochengewebe [14,17]. In den vergangenen Jahren wurden daher zahlreiche Ansätze verfolgt, neue, verbesserte Chelatorstrukturen für  $^{89}\text{Zr}$  zu entwickeln [14,16]. Das bekannteste Beispiel, welches bereits vielversprechende Ergebnisse lieferte, ist das um eine Hydroxamateinheit erweiterte Derivat DFO\* [18,19].

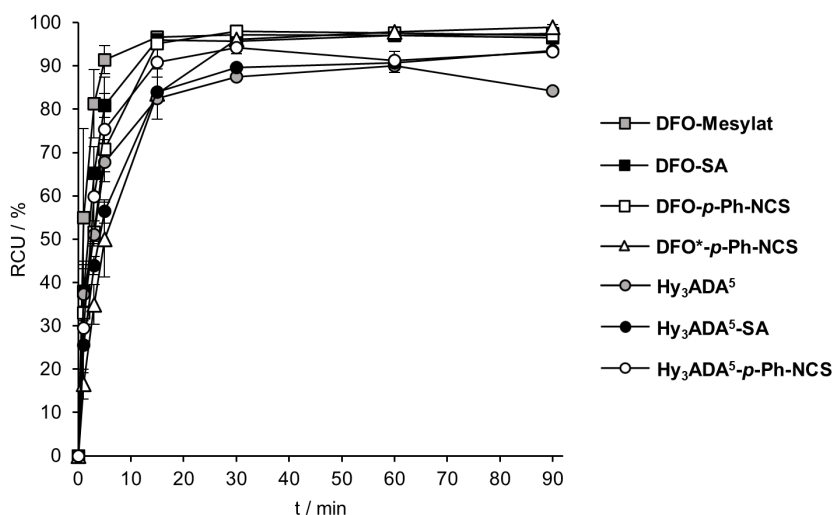
Im Rahmen des Teilprojekts B „*Development and in vitro evaluation of new bifunctional  $^{89}\text{Zr}$ -chelators based on the 6-amino-1,4-diazepane scaffold for immuno-PET applications*“ wurden neue bifunktionelle Chelatorderivate für eine schnelle und stabile Komplexierung von  $^{89}\text{Zr}$  unter milden Bedingungen entwickelt. Als Grundgerüst wurde hierbei 6-Amino-1,4-diazepan gewählt. Dieses System beinhaltet sowohl zyklische als auch azyklische Strukturelemente und erlangte in den vergangenen Jahren bereits als Teil der Carboxyl-basierten Hybridchelatoren AAZTA<sup>5</sup> und DATA<sup>5m</sup> Bedeutung (vgl. Kapitel 2.4.3). Nach dem Vorbild von DFO sollte das Grundgerüst schließlich mit drei Hydroxamat-tragenden Seitenketten funktionalisiert werden und analog zu AAZTA<sup>5</sup> und DATA<sup>5m</sup> einen zusätzlichen Pentansäure-Linker enthalten. Die daraus folgende, als Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> bezeichnete Grundstruktur wurde zudem um zwei weitere Derivate ergänzt, die die Anbindung an Amin-tragende Biomoleküle wie Antikörper erleichtern. Hierfür wurde das System einerseits zusätzlich um eine *p*-Isothiocyanatophenyl- und andererseits um eine Quadratsäureamideinheit (SA) erweitert (Abbildung 42). Die erhaltenen Derivate sollten anschließend mit  $^{89}\text{Zr}$  hinsichtlich ihrer Markierungseigenschaften unter milden Bedingungen sowie ihrer *in vitro*-Komplexstabilitäten sowohl als freie Moleküle, als auch gebunden an einen Modellantikörper (Bevacizumab) untersucht werden. Als Referenzsysteme dienten analog funktionalisierte Derivate des DFO und DFO\* sowie deren entsprechende Immunkonjugate.



**Abbildung 42:** Strukturen der in Teilprojekt B neu entwickelten, bifunktionellen  $^{89}\text{Zr}$ -Chelatorderivate Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS und Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA.

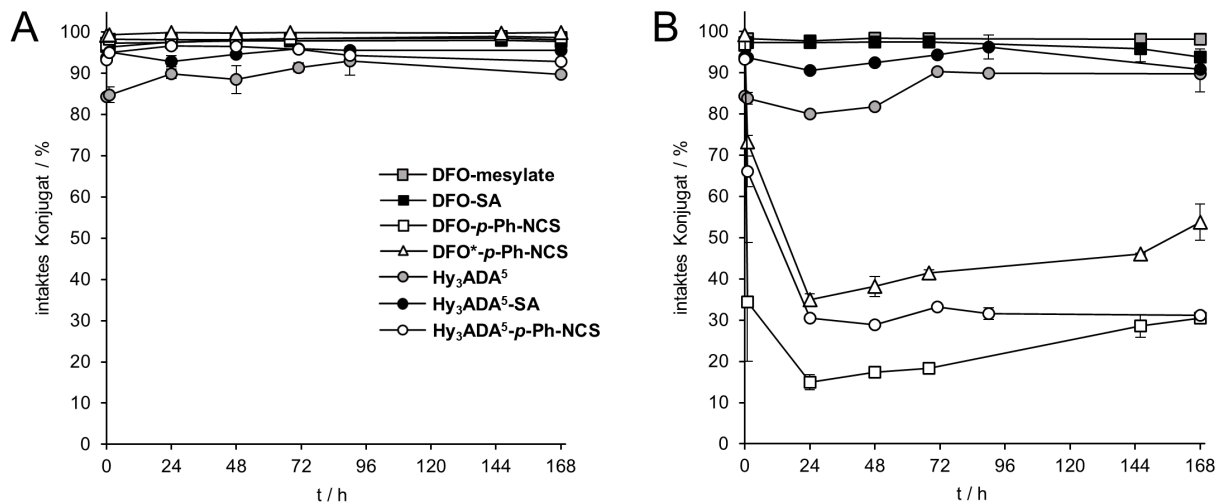
Die Grundstruktur Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> sowie die erweiterten Derivate Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS und Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA konnten erfolgreich in 9 bzw. 11 präparativen Stufen synthetisiert werden. Bei der  $^{89}\text{Zr}$ -Markierung der freien, ungebundenen Chelatoren bei pH 7 und Raumtemperatur zeigten die Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-Derivate eine schnelle Komplexierung mit einer radiochemischen Umsetzung von 83–92 % bereits nach 15 min und maximalen Ergebnissen von 90–94 % (Abbildung 43). Wie für lineare, azyklische Chelatoren zu

erwarten war, führte die  $^{89}\text{Zr}$ -Markierung von DFO und den entsprechenden bifunktionellen Derivaten DFO-*p*-Ph-NCS und DFO-SA zu einer geringfügig schnelleren Komplexierung mit radiochemischen Umsätzen von ca. 95–97 % bereits nach 15 min. Das erweiterte System DFO\*-*p*-Ph-NCS zeigte im Vergleich zunächst eine leicht verzögerte Markierungskinetik die jedoch letztendlich in nahezu quantitativer Bildung des entsprechenden Radiokonjugats resultierte.



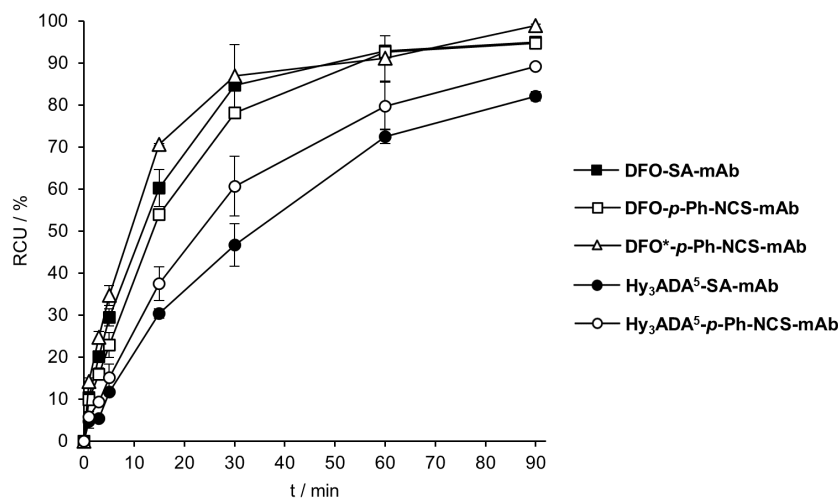
**Abbildung 43:** Markierungseffizienz der neuen, ungebundenen Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-Chelator-derivate sowie entsprechender DFO- und DFO\*-Referenzstrukturen in HEPES-Puffer (pH 7) bei Raumtemperatur unter Verwendung von 20 nmol des jeweiligen Chelators und 10–12 MBq Zirkonium-89. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

Die erhaltenen Radiokonjugate wurden anschließend hinsichtlich ihrer *in vitro*-Komplexstabilität in PBS und humanem Serum über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. In PBS zeigten alle untersuchten Komplexe, sowohl auf Basis von Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> als auch DFO/DFO\* sehr hohe Stabilitäten mit nahezu keiner messbaren Freisetzung des Radiometalls über den gesamten Zeitraum (Abbildung 44A). Ähnliche Eigenschaften konnten auch in humanem Serum für die Grundstrukturen Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> und DFO sowie deren Quadratsäureamid-Derivate beobachtet werden. Die *p*-Isothiocyanatophenyl-funktionalisierten Analoga Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-*p*-Ph-NCS, DFO-*p*-Ph-NCS und DFO\*-*p*-Ph-NCS zeigten in diesem Medium hingegen bereits nach kurzer Inkubationszeit eine erhebliche Instabilität (Abbildung 44B). Da Isothiocyanate bekanntlich auch unter physiologischen Bedingungen Reaktionen zur Bildung von Thio-carbamat, Dithiocarbamat oder Thioharnstoffen eingehen können, ist dieser Effekt vermutlich zu einem gewissen Anteil auf die Interaktion der freien NCS-Gruppe mit Proteinen oder kleineren Serumbestandteilen wie Aminosäuren zurückzuführen [20]. Die beobachtete Instabilität beruht daher möglicherweise nicht oder nicht nur auf einer reinen Freisetzung des Radiometalls, sondern auch auf alternativen Mechanismen, die zur Bildung von anderen radiomarkierten Spezies führen.



**Abbildung 44:** *In vitro*-Komplexstabilität der <sup>89</sup>Zr-markierten Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>- und DFO-Derivate in PBS (A) und humanem Serum (B) bei 37 °C innerhalb von 7 d: prozentualer Anteil inkorporierter Aktivität als Funktion der Zeit ausgehend von der radiochemischen Reinheit am Ende des Markierungsexperiments. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, n = 3.

Um ihr tatsächliches Potential zur <sup>89</sup>Zr-Markierung monoklonaler Antikörper für zukünftige Immuno-PET Anwendungen zu evaluieren, wurden die neuen bifunktionellen Derivate Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA und Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-p-Ph-NCS an freie Amine des Modellantikörpers Bevacizumab unter Bildung einer stabilen Thioharnstoff- oder Quadratsäureamidbindung gebunden. Als Referenz dienten die analog gekoppelten Immunkonjugate der azyklischen Derivate DFO-SA, DFO-p-Ph-NCS und DFO\*-p-Ph-NCS.



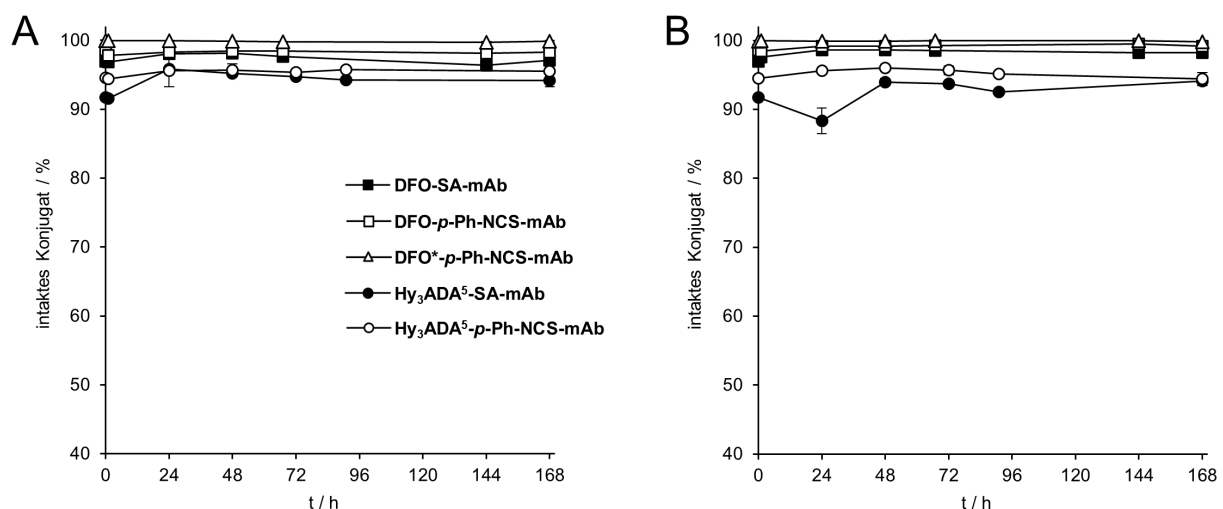
**Abbildung 45:** Markierungseffizienz der Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-, DFO- und DFO\*-funktionalisierten Immunkonjugate in HEPES-Puffer (pH 7) bei Raumtemperatur unter Verwendung von 10–12 MBq Zirkonium-89. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, n = 3.

Bei der <sup>89</sup>Zr-Markierung unter milden Bedingungen konnten mit den Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-funktionalisierten Immunkonjugaten sehr vielversprechende Ergebnisse erzielt werden, wobei [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-p-Ph-NCS-mAb nach 90 min radiochemische Umsätze von > 89 % erreichte und damit die Bildung von [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb um ca. 7 % übertraf (Abbildung 45). Das *p*-Isothiocyanatophenyl-Derivat zeichnete sich dabei nicht nur durch ein besseres Endergebnis, sondern auch durch eine schnellere

Markierungskinetik über den gesamten Zeitraum aus. Die Deferoxamin-funktionalisierten Analoga zeigten unter den gleichen Bedingungen eine noch schnellere Komplexierung, was sich in 78–85 % gebundener Aktivität nach 30 min und ca. 95 % am Ende der Messung widerspiegelte. Die Bildung von [<sup>89</sup>Zr]Zr-DFO\*-*p*-Ph-NCS-mAb zeigte die schnellste Inkorporation des Radiometalls aller untersuchten Konjugate und resultierte letztendlich in nahezu quantitativem RCU (ca. 99 %).

Die erhaltenen, aufgereinigten Radioimmunkonjugate wurden schließlich ebenfalls hinsichtlich ihrer *in vitro*-Komplexstabilität in PBS und humanem Serum über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht. In beiden Medien zeigten sämtliche Protein-gebundenen Radiokomplexe, sowohl auf Basis von Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> als auch DFO und DFO\* keinerlei signifikante Freisetzung des osteophilen Radiometalls innerhalb des gesamten Messzeitraums (Abbildung 46). Im Falle des [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-SA-mAb konnten lediglich geringfügige Schwankungen des Anteils Protein-gebundener Aktivität im Bereich von 5–6 %, vermutlich aufgrund von Komplexierung, geringer Freisetzung und erneuter Rekomblexierung beobachtet werden.

Zumindest unter den hier verwendeten Bedingungen zeigten sich daher weder signifikante Vor- noch Nachteile der verschiedenen Kopplungsstrategien (SA, *p*-Ph-NCS) und Chelatorsysteme (Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>, DFO, DFO\*) bezüglich der *in vitro*-Stabilität, da alle untersuchten Konjugate exzellente Ergebnisse lieferten.



**Abbildung 46:** *In vitro*-Komplexstabilität der <sup>89</sup>Zr-markierten, Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>- und DFO-funktionalisierten Immunkonjugate in PBS (A) und humanem Serum (B) bei 37 °C innerhalb von 7 d: prozentualer Anteil inkorporierter Aktivität als Funktion der Zeit ausgehend von der radiochemischen Reinheit nach SEC-Aufreinigung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, n = 3.

Innerhalb dieses Teilprojekts konnten demnach innovative bifunktionelle <sup>89</sup>Zr-Chelatorderivate auf Basis des etablierten 6-Amino-1,4-diazepan Rückgrats in Kombination mit Hydroxamat-tragenden Seitenketten entwickelt und *in vitro* evaluiert werden. Sowohl als eigenständige Chelatoren als auch gebunden an einen Antikörper zeigten Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup> und dessen *p*-Isothiocyanatophenyl- und Quadratsäureamid-funktionalisierte Varianten eine schnelle und hochwirksame Komplexierung von <sup>89</sup>Zr unter milden Bedingungen (82–94 % RCU) sowie ausgezeichnete *in vitro*-Komplexstabilitäten (< 3 % Dissoziation). Verglichen mit azyklischen DFO- bzw. DFO\*-Derivaten konnten insbesondere in Protein-gebundener Form jedoch leicht langsamere Markierungskinetiken beobachtet werden. Die Bildung des [<sup>89</sup>Zr]Zr-Hy<sub>3</sub>ADA<sup>5</sup>-Komplexes ist aufgrund des starrereren Grundgerüsts kinetisch offenbar

etwas stärker gehindert als die entsprechende Komplexbildung durch das lineare, flexible DFO. Die erhebliche Instabilität *p*-Ph-NCS-funktionalisierter Derivate trat nur in ungebundener Form und nicht bei entsprechenden Immunkonjugaten auf.

Da die häufig berichtete Instabilität des Zr-DFO-Komplexes hauptsächlich in präklinischen Tierversuchen auftritt, sollen die in dieser Arbeit beschriebenen, ausgezeichneten Eigenschaften von  $\text{Hy}_3\text{ADA}^5$  in weiterführenden *in vivo*-Studien beispielsweise anhand eines etablierten Tiermodells weiter untersucht und verglichen werden [14,15]. Nichtsdestotrotz stellt es einen vielversprechenden Ansatz für die schnelle und stabile Radiomarkierung monoklonaler Antikörper mit Zirkonium-89 für zukünftige Immuno-PET Anwendungen dar.

### **Teilprojekt C:**

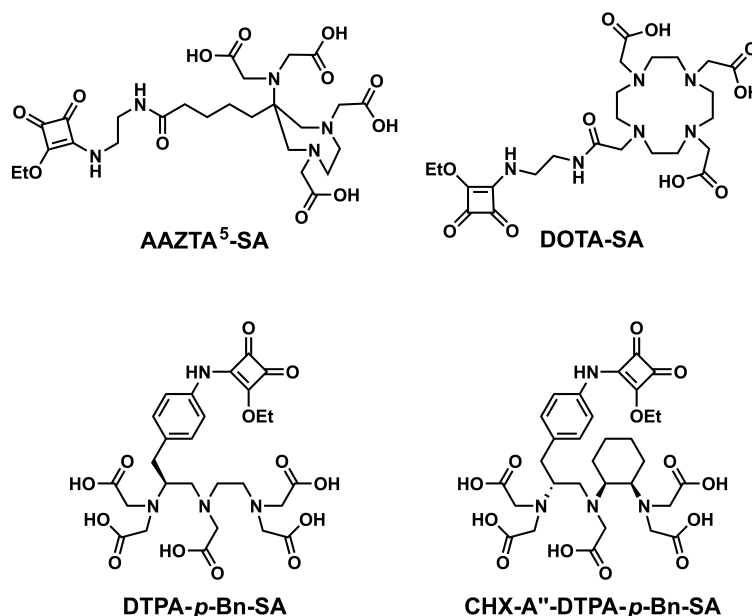
Aufgrund seiner langen Halbwertszeit und niedrigenergetischen  $\beta^-$ -Emission bietet das Radiometall Lutetium-177 exzellente Eigenschaften für radioimmuntherapeutische Anwendungen, insbesondere bei der Behandlung kleiner solider Tumore und Metastasen (vgl. Kapitel 2.3.1) [21,22].

Zur Komplexbildung des trivalenten Lanthanoids fanden bzw. finden vor allem die Chelatoren DOTA und DTPA Anwendung. DTPA bietet typischerweise bereits bei Raumtemperatur sehr schnelle Markierungskinetiken mit einer Vielzahl von Radionukliden. Aufgrund seiner azyklischen Struktur zeigen Radiometall-DTPA-Komplexe jedoch häufig nur eine unzureichende Stabilität unter physiologischen Bedingungen [23,24]. Durch sein starrereres Rückgrat weist das Cyclohexyl-Derivat CHX-A''-DTPA eine höhere kinetische Inertheit und somit verbesserte Komplexstabilität, allerdings gleichzeitig auch eine leicht eingebüßte Markierungsgeschwindigkeit auf (vgl. Kapitel 2.4.1) [23,25]. Das makrozyklische DOTA bildet mit vielen Radiometallen thermodynamisch äußerst stabile und kinetisch inerte Verbindungen (vgl. Kapitel 2.4.2) [23,26]. Für eine hocheffiziente Radiomarkierung benötigen DOTA-funktionalisierte Moleküle jedoch typischerweise hohe Reaktionstemperaturen von bis zu 95 °C oder deutlich längere Reaktionszeiten (bis zu mehrere Stunden) [21,27]. Trotz ihrer Vorteile hinsichtlich Markierungskinetik oder Komplexstabilität sind DOTA und DTPA daher eher ungeeignet für eine schnelle und stabile  $^{177}\text{Lu}$ -Markierung von temperaturempfindlichen Biomolekülen wie Antikörpern.

Der Hybridchelator AAZTA bzw. sein bifunktionelles Derivat AAZTA<sup>5</sup> besteht aus einem zyklischen 1,4-Diazepan Gerüst und einem zusätzlichen exozyklischen Stickstoffsubstituenten in 6-Position. Zusammen mit vier Carbonsäuregruppen weist der Chelator demnach eine heptadentate  $\text{N}_3\text{O}_4$ -Koordinationsstruktur auf und kombiniert die Vorteile sowohl linearer als auch makrozyklischer Systeme innerhalb eines Moleküls (vgl. Kapitel 2.4.3). AAZTA zeichnet sich daher durch schnelle Markierungskinetiken unter milden Bedingungen sowie hohe radiochemische Ausbeuten und hohe Komplexstabilitäten beispielsweise in Kombination mit  $^{44}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  oder  $^{177}\text{Lu}$  aus [28–30]. Aufgrund dieser Eigenschaften stellt es ein vielversprechendes Mittel für die  $^{177}\text{Lu}$ -basierte RIT dar.

Im Rahmen des Teilprojekts C „AAZTA<sup>5</sup>-squaramide ester competing with DOTA-, DTPA- and CHX-A''-DTPA-analogues: promising tool for  $^{177}\text{Lu}$ -labeling of monoclonal antibodies under mild conditions“ sollte das Potential von AAZTA<sup>5</sup> für die  $^{177}\text{Lu}$ -Markierung monoklonaler Antikörper für zukünftige radioimmuntherapeutische Anwendungen untersucht werden. Aufgrund der bereits genannten vorteilhaften Eigenschaften Quadratsäure-basierter Kopplungsstrategien (vgl. Kapitel 2.4.4) wurde hierfür zunächst ein Quadratsäureamid-funktionalisiertes Derivat des Hybridchelators hergestellt. Das

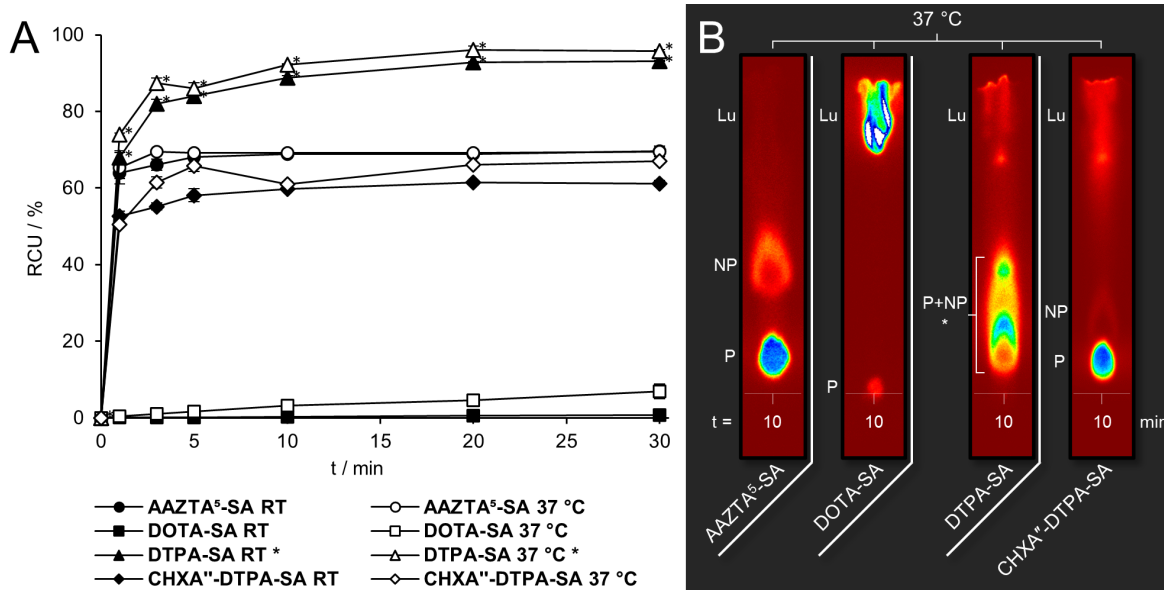
erhaltene AAZTA<sup>5</sup>-SA wurde sowohl in freier, unabhängiger Form als auch gebunden an den Modellantikörper Bevacizumab hinsichtlich seiner <sup>177</sup>Lu-Markierungseigenschaften bei milden Bedingungen sowie seiner *in vitro*-Komplexstabilität untersucht. Zum Vergleich wurden außerdem SA-Derivate der Chelatoren DOTA, DTPA und CHX-A''-DTPA hergestellt sowie analog konjugiert und evaluiert (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Strukturen der in Teilprojekt C evaluierten Chelatorderivate AAZTA<sup>5</sup>-SA, DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA.

AAZTA<sup>5</sup>-SA konnte erfolgreich in sechs präparativen Syntheseschritten hergestellt werden. DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA wurden jeweils durch eine einstufige Quadratsäureamid-Kopplung ausgehend von kommerziell erhältlichen Vorläufern synthetisiert.

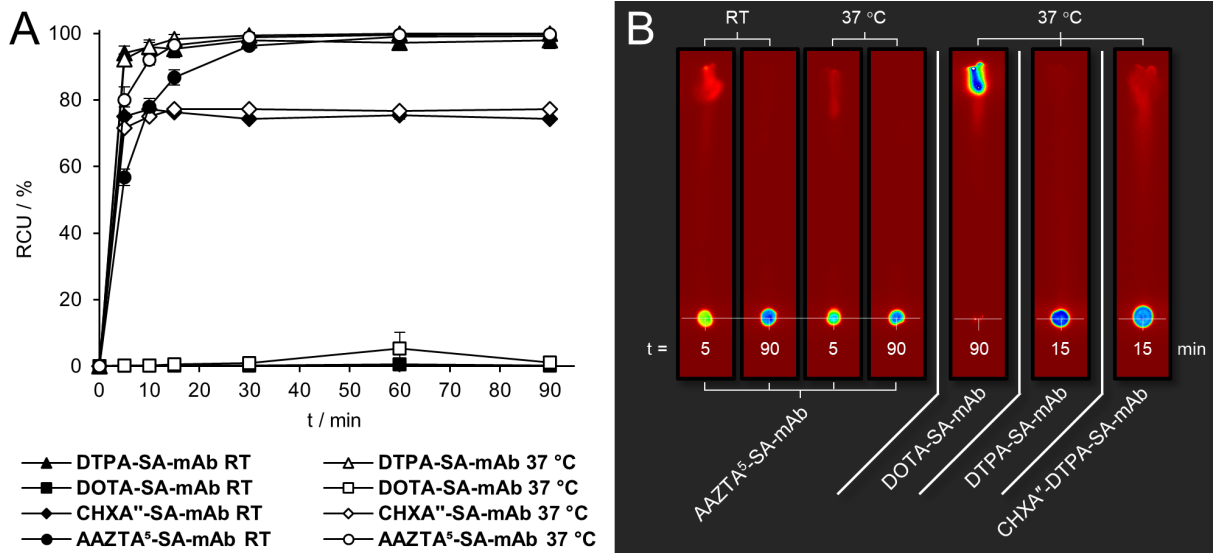
Bei der anschließenden <sup>177</sup>Lu-Markierung der freien Chelatoren unter milden Bedingungen (pH 7, Raumtemperatur oder 37 °C) zeigte AAZTA<sup>5</sup>-SA bereits nach 3–5 min einen hohen radiochemischen Umsatz von ca. 70 %, der jedoch im weiteren Verlauf der Reaktion nicht mehr signifikant weiter anstieg. Als Ursache hierfür konnte eine weitere, nicht näher analysierte, radiomarkierte Spezies identifiziert werden, die möglicherweise im Zusammenhang mit unterschiedlichen Protonierungsstufen oder Koordinationsgeometrien durch den Einfluss des Quadratsäure-Linkers steht (Abbildung 48B). DOTA-SA zeigte hingegen eine deutlich geringere Inkorporation des Radiometalls mit einem maximalen RCU von ca. 7 % nach 30 min bei 37 °C. Bei der Radiomarkierung des DTPA-Analogons konnte eine schnelle und ergiebige Komplexierung beobachtet werden, wobei die angegebenen Werte (93–96 % nach 30 min) die Summe von mindestens zwei untrennbaren radiomarkierten Spezies darstellen. Die Bildung des starrereren [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA führte im Vergleich zum AAZTA<sup>5</sup>-Derivat zu einem etwas geringeren radiochemischen Umsatz (ca. 67 % nach 30 min bei 37 °C).



**Abbildung 48:** <sup>177</sup>Lu-Markierungseffizienz von AAZTA<sup>5</sup>-SA, DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA in HEPES-Puffer (pH 7) bei Raumtemperatur und 37 °C unter Verwendung von 10 nmol des jeweiligen Chelators und 48–51 MBq Lutetium-177. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, *n* = 3 (A). Repräsentative Radio-TLC Ergebnisse (Silica, 0,1 M Citrat-Puffer pH 4) nach 10 min bei 37 °C (B); P = Produkt, NP = Nebenprodukt/zweite Spezies, Lu = ungebundenes Lutetium-177; Die RCU-Werte von [<sup>177</sup>Lu]-DTPA-*p*-Bn-SA repräsentieren das Integral über den Signalbereich mit *R<sub>f</sub>* = 0,1–0,5 (mit Asterisk gekennzeichnet).

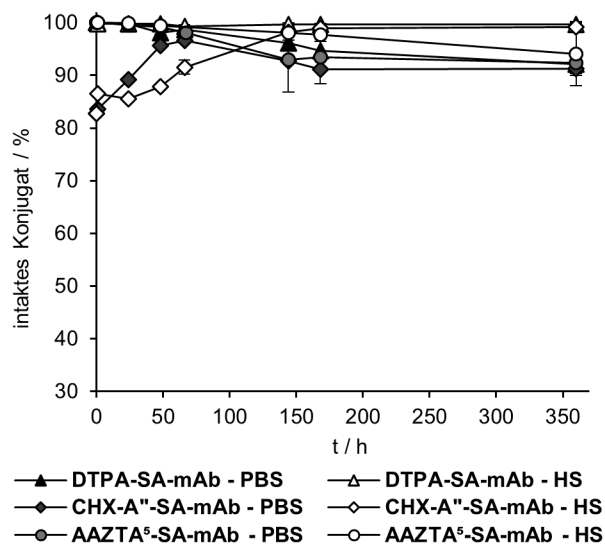
Um seine Anwendbarkeit für die <sup>177</sup>Lu-Markierung temperatur- und pH-sensibler Biomoleküle wie Antikörper zu evaluieren, wurde AAZTA<sup>5</sup>-SA anschließend an den Modellantikörper Bevacizumab unter Bildung des entsprechenden Quadratsäurediamids gebunden. Zur Entfernung überschüssiger, ungebundener Chelatoreinheiten wurde das Radioimmunkonjugat mittels optimierter Größenausschlusschromatographie (SEC) aufgereinigt und anschließend bei Raumtemperatur und 37 °C sowie neutralem pH-Wert mit <sup>177</sup>Lu radiomarkiert. Analog dazu wurden zudem die entsprechenden Immunkonjugate der Vergleichssysteme DOTA-SA, DTPA-*p*-Bn-SA und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA hergestellt, aufgereinigt und radiochemisch untersucht. AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb zeigte bereits nach 10–15 min einen sehr hohen radiochemischen Umsatz von > 90 % bei 37 °C bzw. > 85 % bei Raumtemperatur. Nach ca. 30 min konnte bei beiden Temperaturen schließlich eine nahezu quantitative Komplexierung des Radiometalls erreicht werden (Abbildung 49). Ähnlich wie in freier, ungebundener Form zeigte DOTA-SA auch konjugiert an den Antikörper nur einen vernachlässigbar geringen radiochemischen Umsatz bei beiden Temperaturen (< 2 %) und offenbarte damit eindeutige Nachteile gegenüber AAZTA<sup>5</sup>, zumindest unter den hier verwendeten Bedingungen. Die Bildung von [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-SA-mAb zeichnete sich bereits bei Raumtemperatur mit > 93 % RCU nach 5 min durch eine sehr schnelle Markierungskinetik aus und erreichte im weiteren Verlauf ebenfalls eine nahezu quantitative Inkorporation des Radiometalls. Das CHX-A''-DTPA-funktionalisierte Analogon zeigte eine zwar schnelle aber unvollständige <sup>177</sup>Lu-Markierung mit einem maximalen radiochemischen Umsatz von ca. 74 % nach 10 min. Das Protein-gebundene AAZTA<sup>5</sup>-SA bietet daher klare Vorteile nicht nur gegenüber DOTA-SA-mAb sondern auch gegenüber dem CHX-A''-DTPA-funktionalisierten Immunkonjugat, zeigte jedoch eine leicht langsamere Markierungskinetik als DTPA-*p*-Bn-SA-mAb.





**Abbildung 49:** <sup>177</sup>Lu-Markierungseffizienz von AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, DOTA-SA-mAb, DTPA-*p*-Bn-SA-mAb und CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb in HEPES-Puffer (pH 7) bei Raumtemperatur und 37 °C unter Verwendung von 43–51 MBq Lutetium-177. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, *n* = 3 (A). Repräsentative Radio-TLC Ergebnisse (Silica, 0,1 M Citrat-Puffer pH 4) nach 5, 15 und 90 min (B).

Während diese Markierungsstudien das exzellente Potential des AAZTA<sup>5</sup>-SA Chelators für eine schnelle und nahezu quantitative <sup>177</sup>Lu-Koordination erfolgreich nachweisen konnten, wurde die *in vitro*-Stabilität des Protein-gebundenen Komplexes als weiterer Aspekt untersucht. Sowohl in humanem Serum als auch in PBS zeigte [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb über einen langen Zeitraum von mehr als zwei Wochen eine sehr hohe Komplexstabilität von > 94 % bzw. > 92 % intaktem Radiokonjugat (Abbildung 50). Eine ähnliche oder sogar leicht höhere Stabilität konnte über die gleiche Zeitspanne für die DTPA- und CHX-A''-DTPA-basierten Radioimmunkonjugate beobachtet werden.



**Abbildung 50:** *In vitro*-Komplexstabilität von [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-mAb, [<sup>177</sup>Lu]Lu-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb und [<sup>177</sup>Lu]Lu-CHX-A''-DTPA-*p*-Bn-SA-mAb in humanem Serum und PBS über einen Zeitraum von 15 d: prozentualer Anteil inkorporierter Aktivität als Funktion der Zeit ausgehend von der radiochemischen Reinheit nach SEC-Aufreinigung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD, *n* = 3.

Innerhalb dieses Teilprojekts konnte das Quadratsäureamid-funktionalisierte Derivat AAZTA<sup>5</sup>-SA demnach erfolgreich synthetisiert und hinsichtlich seiner <sup>177</sup>Lu-Komplexierung bei milden Bedingungen evaluiert und mit DOTA-, DTPA- und CHX-A''-DTPA-Analoga verglichen werden. Konjugiert an einen Antikörper zeigte AAZTA<sup>5</sup>-SA bereits bei Raumtemperatur ausgezeichnete Markierungseigenschaften sowie eine hohe Komplexstabilität über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen. Das bifunktionelle Chelatorsystem stellt daher ein vielversprechendes Mittel zur Bildung <sup>177</sup>Lu-markierter Immunkonjugate für die Radioimmuntherapie und möglicherweise auch für die Immuno-SPECT Bildgebung dar.

Um die Eigenschaften des Protein-gebundenen [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-Komplexes, insbesondere eventuelle Stabilitätsvorteile gegenüber den linearen Chelatorsystemen unter physiologischen Bedingungen näher zu untersuchen, sollen weiterführende Vergleichsstudien *in vivo* beispielsweise anhand eines etablierten Tiermodells durchgeführt werden. In Teilprojekt D wurde bereits erstmals ein AAZTA<sup>5</sup>-SA-funktionalisierter, <sup>177</sup>Lu-markierter monoklonaler Antikörper präklinisch in tumortragenden Tieren evaluiert.

#### **Teilprojekt D:**

Weiblicher Brustkrebs stellt mittlerweile die häufigste Krebsart überhaupt und nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen bei Frauen dar [31]. Die Diagnose, Prognose und Klassifizierung zur Auswahl möglicher Behandlungsoptionen erfolgt dabei in der Regel anhand immunhistochemischer Analyse der Expression unterschiedlicher tumorassoziierter Marker wie ER, PR, und HER2 [32]. Aufgrund der heterogenen Verteilung dieser konventionellen Biomarker unter allen Brustkrebsfällen gestaltet sich die eindeutige Kategorisierung und Prognose oftmals jedoch schwierig und ist daher häufig mit einer unzureichenden Genauigkeit und Zuverlässigkeit verbunden [33].

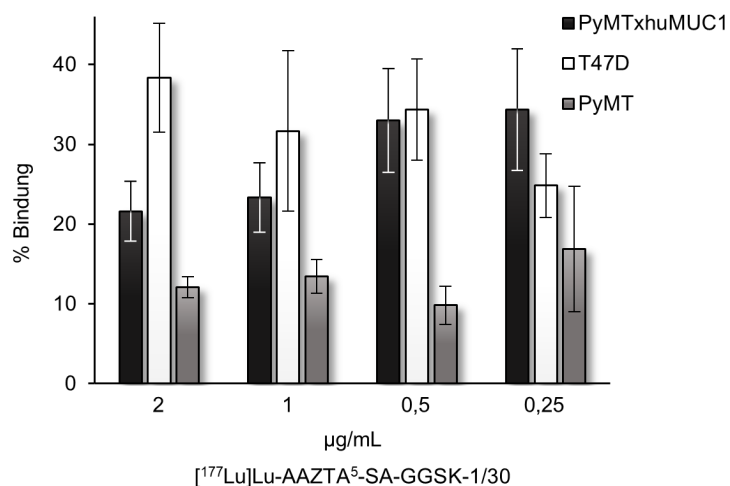
Das tumorassozierte Glykoprotein (TA)MUC1 wird von mehr als 90 % aller Mammakarzinome und sogar mehr als 94 % aller triple-negativen Tumore exprimiert und stellt somit ein vielversprechendes Ziel für innovative Diagnostik- und Therapiekonzepte dar [34–36]. Im Gegensatz zu dicht glykosyliertem MUC1 auf gesunden Epithelzellen zeigt das Antigen ein aberrantes Glykosylierungsmuster mit einem teilweise offenliegenden Peptidrückgrat und ist somit zugänglich für Antikörper und andere Bestandteile des Immunsystems [37,38]. Der monoklonale Antikörper GGSK-1/30 bindet einerseits hochspezifisch an hu(TA)MUC1 und zeichnet sich andererseits durch eine hohe Selektivität gegenüber normal glykosyliertem, physiologischem MUC1 aus (vgl. Kapitel 2.5.3) [38]. Durch Applikation des <sup>89</sup>Zr-markierten Immunkonjugats in tumortragenden Mäusen konnte dessen Pharmakokinetik und Potential für die diagnostische Immuno-PET Bildgebung von Brustkrebs bereits erfolgreich evaluiert werden [33].

Im Rahmen des Teilprojekts D „<sup>177</sup>Lu-labeling, *in vitro* and *in vivo* evaluation of a highly potential, AAZTA<sup>5</sup>-squaramide functionalized anti-hu(TA)MUC1 antibody: a promising approach for radioimmunotherapy of breast cancer“ sollte der Antikörper GGSK-1/30 nun zunächst mit Lutetium-177 radiomarkiert und das resultierende Radioimmunkonjugat *in vitro* und *in vivo* hinsichtlich seines Potentials für zukünftige radioimmuntherapeutische Anwendungen untersucht werden. Für eine effiziente und stabile Komplexierung des Radiometalls unter milden Bedingungen wurde der bifunktionelle Hybridchelator AAZTA<sup>5</sup>-SA basierend auf den exzellenten Ergebnissen aus Teilprojekt C verwendet. Unter Bildung einer Quadratsäurediamid-Verknüpfung wurde der Komplexbildner an

Lysin-Seitenketten des Proteins gebunden und das erhaltene Konjugat schließlich mittels SEC aufgereinigt. Durch Bindung an hu(TA)MUC1-exprimierende PyMTxhuMUC1-Tumorzellen und anschließende Analyse mittels Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die Funktionalisierung mit durchschnittlich ca. 2,4 Chelatereinheiten pro Protein keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Antikörpers hat.

Nach  $^{177}\text{Lu}$ -Markierung unter milden Bedingungen und anschließender Aufreinigung konnte  $^{177}\text{Lu}$ -AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 mit radiochemischen Reinheiten von > 95 % und scheinbar-molaren Aktivitäten von 4–29 GBq/ $\mu\text{mol}$  erhalten werden. Während das Radioimmunkonjugat in isotonischer Kochsalzlösung über einen Zeitraum von zwei Wochen eine hohe Komplexstabilität von > 92 % intaktem Konjugat zeigte, konnte in humanem Serum über den gleichen Zeitraum eine zwar geringe aber stetige Freisetzung des Radiometalls beobachtet werden. Dennoch betrug der Anteil Protein-gebundener Aktivität nach vier Tagen, d. h. nach einer typischen Zeitspanne für Zirkulation und Zielakkumulation vollständiger Antikörper, immer noch > 86 %.

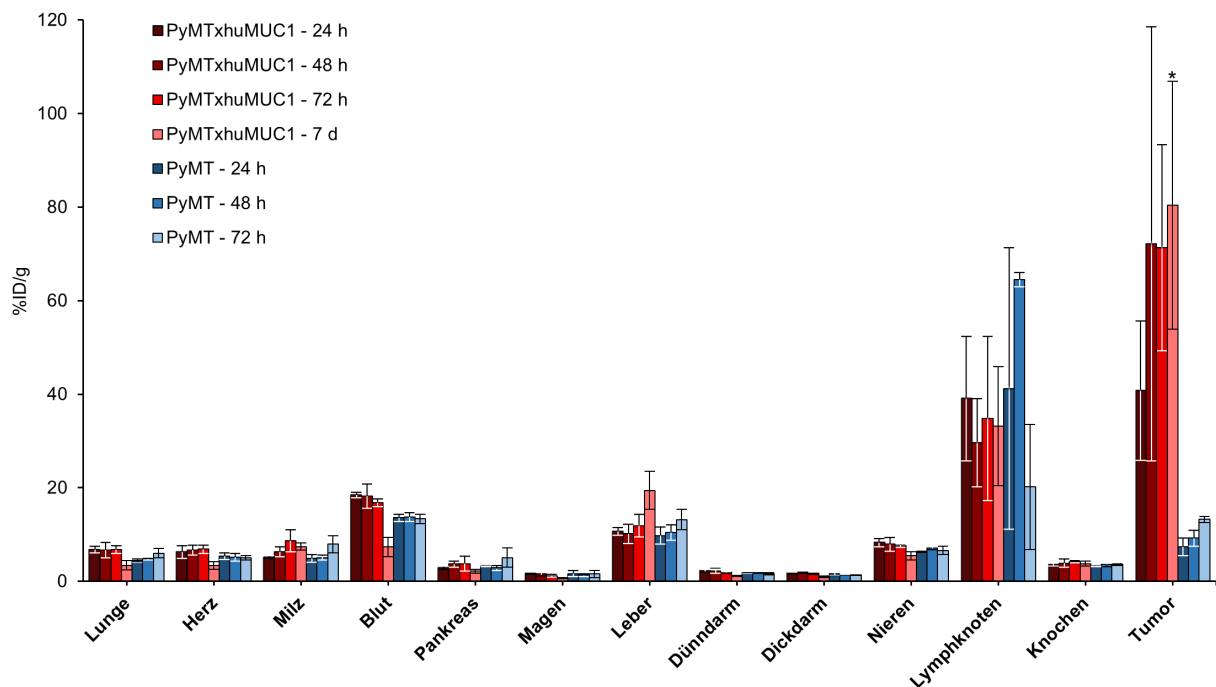
Zur Untersuchung der *in vitro*-Zellbindung wurden transgene murine PyMTxhuMUC1-Brustkrebszellen sowie humane T47D-Karzinomzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $^{177}\text{Lu}$ -AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 inkubiert. Murine PyMT-Brusttumorzellen ohne Expression von hu(TA)MUC1 dienten als Negativkontrolle. Das Radioimmunkonjugat zeigte eine deutliche Bindung zu hu(TA)MUC1-exprimierenden PyMTxhuMUC1- und T47D-Zellen mit einem Maximalwert von ca. 34 % bzw. 38 % gebundener Aktivität (Abbildung 51). Beim Vergleich beider Zelllinien konnte ein abweichendes konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten beobachtet werden, was möglicherweise eine unterschiedlich starke Expression des Antigens widerspiegelt. Entgegen der Erwartung zeigte sich zudem auch eine gewisse unspezifische „Bindung“ bzw. Adsorption des radiomarkierten Antikörpers an PyMT-Zellen (max. ca. 17 %).



**Abbildung 51:** *In vitro*-Zellbindung von  $^{177}\text{Lu}$ -AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 zu hu(TA)MUC1-exprimierenden Tumorzellen in Abhängigkeit der mAb-Konzentration nach Inkubation für 30 min bei 37 °C. PyMT-Zellen dienten als Negativkontrolle ohne Expression von hu(TA)MUC1. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

Zur Evaluierung seiner Pharmakokinetik und *in vivo*-Bindungseigenschaften zu hu(TA)MUC1-exprimierenden Tumoren wurde der  $^{177}\text{Lu}$ -markierte GGSK-1/30 Antikörper anschließend PyMTxhuMUC1-tumortragenden Mäusen verabreicht und *ex vivo*-Biodistributionsstudien zu unterschiedlichen Zeit-

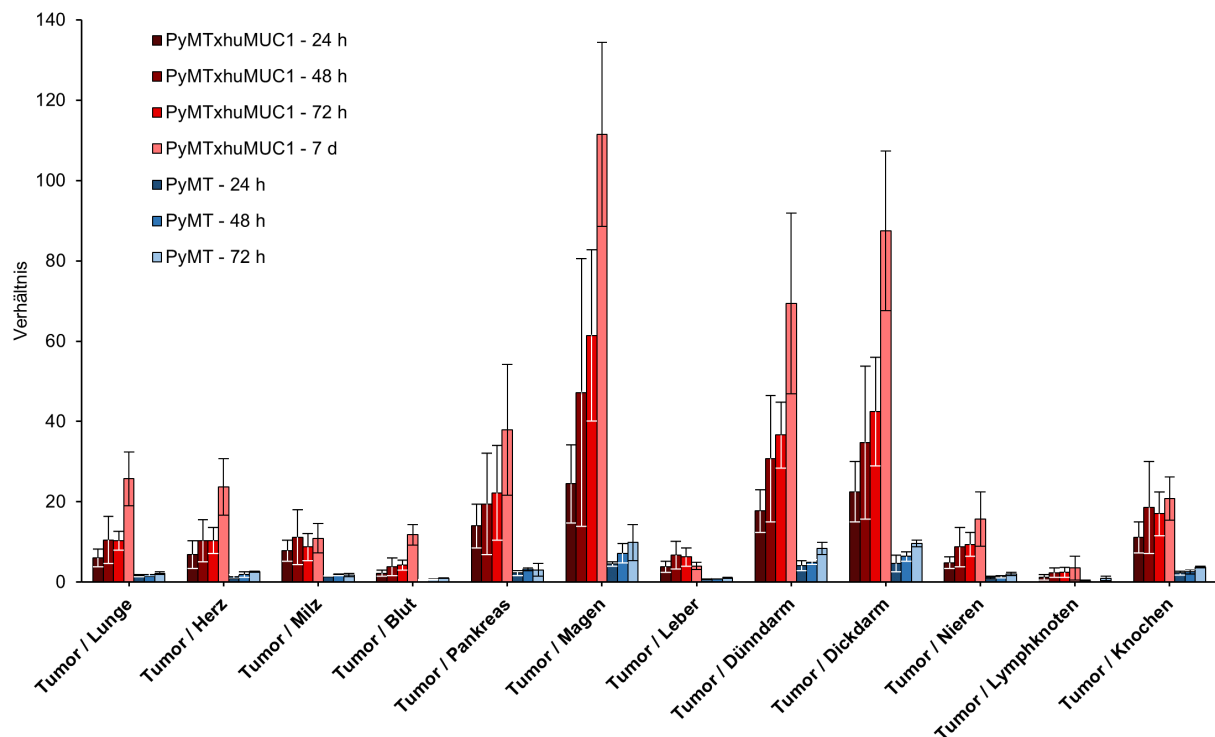
punkten nach der Injektion durchgeführt (Abbildung 52). Als Negativkontrolle ohne Expression der Zielstruktur dienten Tiere mit PyMT-Tumoren.  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-AAZTA}^5\text{-SA-GGSK-1/30}$  zeigte eine deutliche Zielaffinität und sehr hohe Akkumulation in hu(TA)MUC1-exprimierendem Tumorgewebe mit ca. 41 %ID/g bereits 24 h nach Injektion. Die Anreicherung im Zielgewebe stieg in den folgenden sechs Tagen auf einen Maximalwert von > 80 %ID/g an. Dementsprechend sank die Menge des weiterhin im Blut zirkulierenden Radioimmunkonjugats sukzessive von ca. 19 %ID/g nach 24 h auf ca. 7 %ID/g, was zu einem hohen Tumor-zu-Blut-Verhältnis von ca. 12 führte (Abbildung 53). Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant geringere Akkumulation der Aktivität in PyMT-Tumoren von maximal 13 %ID/g 72 h nach Injektion des Antikörpers beobachtet werden. Eine zunehmende Anreicherung der Aktivität in der Leber bis hin zu 19 %ID/g deutet auf eine vorwiegend hepatobiliäre Ausscheidung des radiomarkierten Antikörpers hin und ist für weiterführenden Studien bzw. künftige therapeutische Anwendungen vermutlich als dosislimitierender Faktor zu berücksichtigen.



**Abbildung 52:** *Ex vivo*-Biodistribution 24 h, 48 h, 72 h und 7 d p.i. von  $3,9 \pm 0,2$  MBq ( $56,3 \pm 2,5$   $\mu\text{g}$ )  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-AAZTA}^5\text{-SA-GGSK-1/30}$  in PyMTxhuMUC1- und PyMT-tumortragende, 9 Wochen alte, weibliche C57BL/6N Mäuse. Die prozentualen Anteile der injizierten Dosis pro Gramm (%ID/g) sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD (PyMTxhuMUC1:  $n = 5$ ; PyMT:  $n = 2$  (24 h p.i.),  $n = 3$  (48 h, 72 h p.i.)). Der mit Asterisk gekennzeichnete Wert entspricht einer Gruppengröße von  $n = 1$ , da ein Tier der entsprechenden Gruppe keinen messbaren Tumor besaß.

Abgesehen von einer ebenfalls hohen Anreicherung in den Lymphknoten (max. 65 %ID/g bei PyMT-Tieren) konnte in beiden Gruppen insgesamt ein geringer unspezifischer Uptake von < 9 %ID/g in anderen Nicht-Ziel-Organen wie Lunge, Herz, Pankreas, Magen, Nieren und Milz beobachtet werden. Dementsprechend ergaben sich nach sieben Tagen für PyMTxhuMUC1-tumortragende Tiere sehr hohe Tumor-zu-Organ-Verhältnisse im Bereich von etwa 11 (Tumor/Milz) bis ca. 112 (Tumor/Magen). Die Anreicherung der Aktivität im Knochengewebe spielt bei endoradiotherapeutischen Anwendungen oftmals eine entscheidende und dosislimitierende Rolle [21]. Im Rahmen dieser Experimente konnte mit < 5 %ID/g eine durchweg sehr geringe Akkumulation im Knochen festgestellt werden. Da freigesetztes  $^{177}\text{Lu}$  typischerweise entweder direkt ausgeschieden wird oder sich im Knochengewebe

anlagert, deuten diese Ergebnisse auf eine hohe *in vivo*-Stabilität sowohl des [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-Komplexes als auch des gesamten Radioimmunkonjugats hin.



**Abbildung 53:** Verhältnisse der Anreicherung in Tumor und Nicht-Zielgewebe 24 h, 48 h, 72 h and 7 d p.i. von  $3.9 \pm 0.2$  MBq ( $56.3 \pm 2.5$   $\mu$ g) [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 in PyMTxhuMUC1- und PyMT-tumortragende, 9 Wochen alte, weibliche C57BL/6N Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD (PyMTxhuMUC1:  $n = 5$  (24 h, 48 h, 72 h p.i.),  $n = 4$  (7 d p.i.); PyMT:  $n = 2$  (24 h p.i.),  $n = 3$  (48 h, 72 h p.i.)).

Innerhalb dieses Teilprojekts konnte der (TA)MUC1-spezifische monoklonale Antikörper GGSK-1/30 erfolgreich mit AAZTA<sup>5</sup>-SA funktionalisiert und mit <sup>177</sup>Lu unter milden Bedingungen radiomarkiert werden. Das erhaltene Radioimmunkonjugat zeigte sowohl eine deutliche Bindung zu hu(TA)MUC1-exprimierenden Tumorzellen *in vitro* als auch eine außerordentlich hohe und spezifische Akkumulation in entsprechendem Tumorgewebe *in vivo*.

Im Zeitraum zwischen Injektion der Tumorzellen und des radioaktiv markierten Antikörpers wurde ein stark unterschiedliches Tumorwachstum zwischen den PyMTxhuMUC1- und PyMT-Tieren beobachtet. Durch das sehr viel schnellere Fortschreiten der Erkrankung in der Kontrollgruppe besaßen die PyMT-Tumore bei der Injektion des Radioimmunkonjugats eine signifikant höhere Masse. Die Berücksichtigung dieses unterschiedlich schnellen Wachstums bzw. die Verwendung von Tieren mit einem ähnlichen Fortschritt der Erkrankung könnte in weiterführenden Studien möglicherweise noch genauere und vergleichbarere Ergebnisse liefern. Nichtsdestotrotz zeigen die vielversprechenden Resultate dieser ersten „*Proof-of-Concept*“-Studie das hohe Potential von [<sup>177</sup>Lu]Lu-AAZTA<sup>5</sup>-SA-GGSK-1/30 für die zukünftige RIT von hu(TA)MUC1-exprimierendem Brustkrebs.

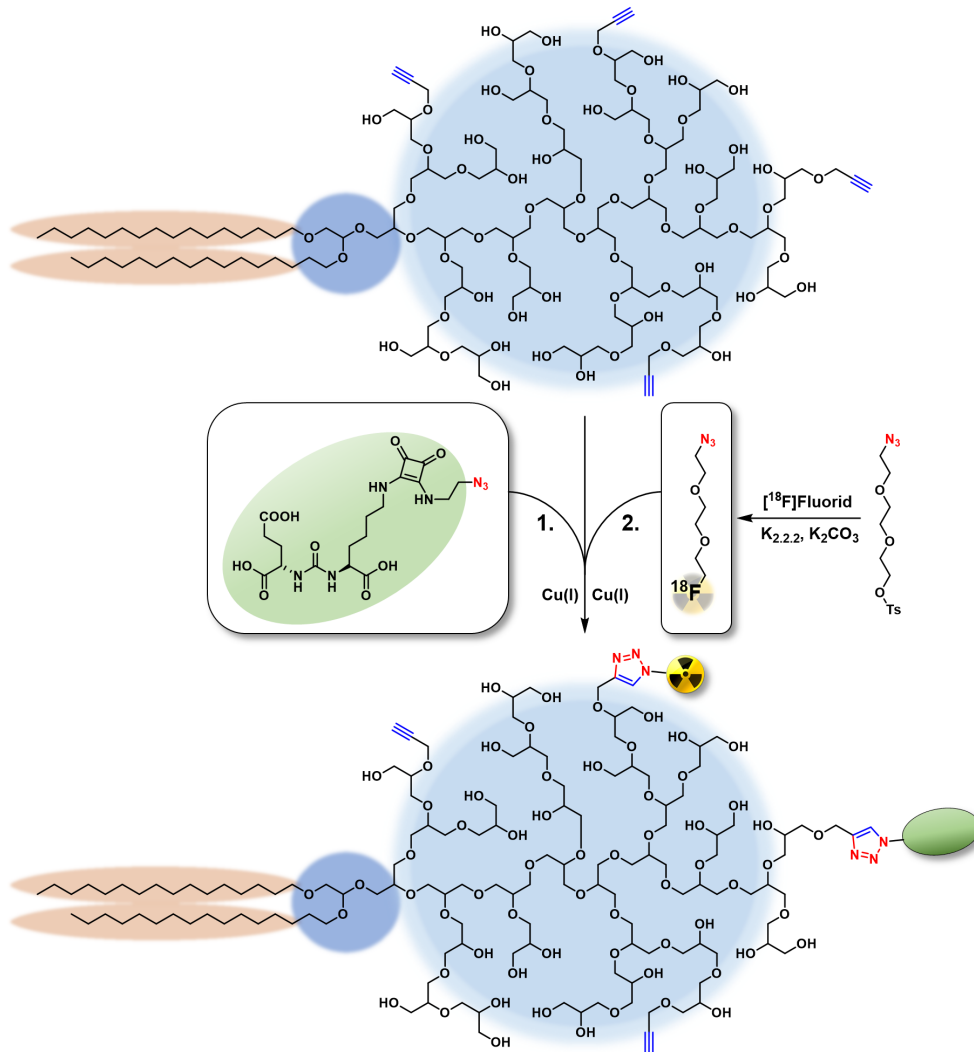
In kommenden Folgeexperimenten sollen Untersuchungen zur Dosimetrie und zur tatsächlichen therapeutischen Wirksamkeit, d. h. zum Einfluss des <sup>177</sup>Lu-markierten mAb auf Tumorwachstum und -größe sowie auf die Überlebensrate der Tiere durchgeführt werden.

### **Teilprojekt E:**

Prostatakrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Männern in industrialisierten Ländern und die fünfthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [31,39]. Das membrangebundene Glykoprotein PSMA ist in gesundem Gewebe eher selten zu finden, wird jedoch von Prostatakrebszellen überexprimiert und steht damit in engem Zusammenhang mit der Diagnose von Prostatakarzinomen [40]. Als Carboxypeptidase katalysiert PSMA die Hydrolyse von *N*-Acetyl-Aspartyl-Glutamat (NAAG) zu *N*-Acetyl-Aspartat. Viele bekannte PSMA-Inhibitoren basieren daher auf Strukturen, die NAAG ähneln und somit spezifisch an das Antigen binden [41]. Typischerweise beinhalten diese eine Harnstoffgebundene Glutamateinheit, die die entsprechende Bindungsstelle des PSMA adressiert, jedoch nicht enzymatisch gespalten werden kann. Die Systeme PSMA-11 und PSMA-617 enthalten beispielsweise ein L-Lysin-Urea-L-Glutamat (KuE) Bindungsmotiv und werden erfolgreich zur nuklearmedizinischen Diagnose und Therapie von Prostatakrebs und Metastasen in Kombination mit  $^{68}\text{Ga}$  und  $^{177}\text{Lu}$  verwendet [40,42].

Viele klassische Krebstherapeutika besitzen eine geringe Verweilzeit im Organismus, schlechte Bioverfügbarkeit und unspezifische, systemische Toxizität [43,44]. Zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften dieser Wirkstoffe wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkstofftransportsysteme (DDS) entwickelt und untersucht (vgl. Kapitel 2.6) [45]. Liposome gehören zu den ersten und bis heute bedeutendsten DDS. Diese sphärischen Vesikel bestehen hauptsächlich aus entsprechend angeordneten Phospholipiden und ermöglichen den Einschluss und Transport sowohl von hydrophilen als auch hydrophoben Substanzen (vgl. Kapitel 2.6.1) [46]. Um vom Organismus nicht als körperfremd erkannt zu werden, besitzen sogenannte Stealth-Liposome eine zusätzliche, sterisch anspruchsvolle Modifikation der Oberfläche beispielsweise auf Basis von PEG oder hyperverzweigtem Polyglycerol (*hbPG*) [46,47]. Durch den Einschluss eines Wirkstoffes in solche Systeme lässt sich dessen Zirkulationszeit und Anreicherung im Zielgewebe signifikant erhöhen und somit die nötige Dosis und Toxizität für gesundes Gewebe verringern. Während die Akkumulation der Nanopartikel im Tumor einerseits auch auf passivem Wege (EPR-Effekt) stattfinden kann, ist durch zusätzliche Funktionalisierung mit einem entsprechendem Targetvektor zudem die aktive Adressierung bestimmter Zielstrukturen möglich [43,44].

In Teilprojekt E „ *$^{18}\text{F}$ -labeled, PSMA-specific liposomes: promising and PET-traceable tool for future targeted drug delivery in the treatment of prostate cancer*“ sollten PSMA-spezifische Stealth-Liposome für den zukünftigen, zielgerichteten Wirkstofftransport bei der Behandlung von Prostatakrebs hergestellt werden. Hierfür wurde zunächst ein Azid-tragendes, Quadratsäure-gekoppeltes KuE-Derivat (KuE-SA-N<sub>3</sub>) mittels CuAAC an ein Alkin-funktionalisiertes Polyetherlipid, bestehend aus *hbPG* und zwei hydrophoben Hexadecylketten, gebunden (Abbildung 54). Zur Verknüpfung von KuE und Azid-Gruppe wurde die SA-basierte Kopplungsstrategie nicht nur aufgrund ihrer bereits erwähnten präparativen Vorteile gewählt (vgl. Kapitel 2.4.4). Die Quadratsäureeinheit in der Linkerstruktur ist zudem möglicherweise in der Lage, mit der aromatischen Bindungsstelle des PSMA-Enzyms zu interagieren und folglich die Affinität des Targetvektors zu erhöhen [42,48]. Die erfolgreiche KuE-SA-Funktionalisierung des Polyetherlipids konnte mittels zweidimensionaler ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )-HSQC-NMR-Spektroskopie bestätigt werden.



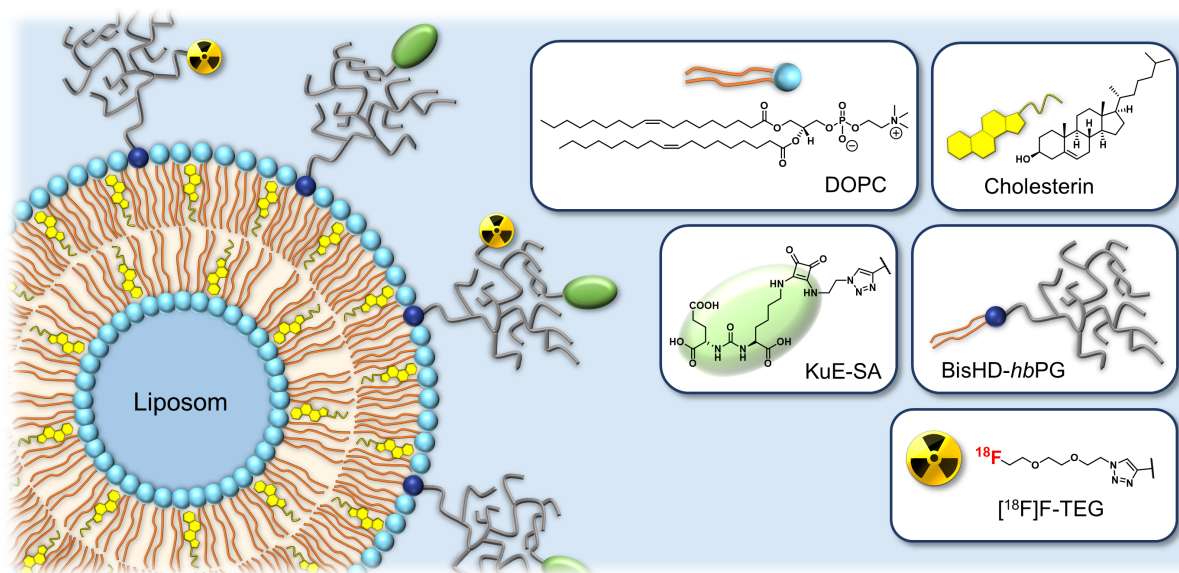
**Abbildung 54:** Sukzessive CuE-SA-Funktionalisierung und  $^{18}\text{F}$ -Markierung des Alkin-tragenden, hypervernetzten Polyetherlipids BisHD-*hbPG* mittels CuAAC.

Um die späteren Liposome für weiterführende *in vivo*-Evaluierungen mittels PET zugänglich zu machen und möglicherweise eine Visualisierung bei künftiger therapeutischer Anwendung zu ermöglichen, sollte das erhaltene Polyetherlipid zusätzlich mit  $^{18}\text{F}$  radiomarkiert werden. Hierfür wurde zunächst das tosylierte Click-Synthon Ts-TEG- $\text{N}_3$  nukleophil mit  $^{18}\text{F}$  Fluorid unter Verwendung typischer Reaktionsbedingungen und Substanzen (Acetonitril, Kaliumcarbonat, Kryptofix® 222, 90 °C) markiert (vgl. Kapitel 2.2.2.1). Nach HPLC-Aufreinigung konnte  $^{18}\text{F}$ -TEG- $\text{N}_3$  mit einer zerfallskorrigierten radiochemischen Ausbeute (RCA) von 53 % erhalten werden. Aufgrund seiner ähnlichen Oligoether-Struktur ermöglicht dieser Markierungsvorläufer die indirekte  $^{18}\text{F}$ -Markierung des Alkin-funktionalisierten Polyglycerols, ohne dessen chemische und biologische Eigenschaften signifikant zu verändern [49].

Im nächsten Schritt wurden verbliebene, freie Alkine des CuE-SA-funktionalisierten BisHD-*hbPG* für die Radiomarkierung mit  $^{18}\text{F}$ -TEG- $\text{N}_3$  genutzt. Analog zur Anbindung des PSMA-Inhibitors erfolgte die Markierung durch Kupfer(I)-katalysierte Click-Reaktion (Abbildung 54). Bereits nach 15 min konnte ein nahezu quantitativer radiochemischer Umsatz (ca. 99 %) beobachtet werden. Das zytotoxische Kupfer wurde anschließend mit Hilfe eines Chelatbildner-Harzes wieder abgetrennt und das  $^{18}\text{F}$ -markierte Polyetherlipid konnte schließlich mit einer zerfallskorrigierten radiochemischen Ausbeute von 73 %

erhalten werden. Auf identische Weise wurde zum Vergleich außerdem nicht-KuE-modifiziertes BisHD-*hbPG* radiomarkiert (81 % RCA).

Ausgehend vom KuE-SA-funktionalisierten,  $^{18}\text{F}$ -markierten Polyetherlipid sollten anschließend zielgerichtete, PET-visualisierbare und sterisch abgeschirmte Liposome hergestellt werden (Abbildung 55). Als strukturgebende Komponente wurde hierbei DOPC (55 mol%) verwendet. Das zwitterionische Phospholipid besitzt eine niedrige Phasenübergangstemperatur (ca.  $-22\text{ }^\circ\text{C}$ ) und ermöglicht somit bei Raumtemperatur die Bildung von Flüssigphasen-Liposomen (vgl. Kapitel 2.6.1) [50]. Zur weiteren Stabilisierung wurde dem Lipidgemisch zusätzlich Cholesterin (40 mol%) zugesetzt und anschließend mittels Dünnschicht-Hydratationstechnik multilamellare Vesikel mit heterogener Größenverteilung hergestellt. Um kleine unilamellare Liposome zu erhalten, wurde die Suspension wiederholt durch Polycarbonat-Membranen unterschiedlicher Porengröße extrudiert und schließlich mittels SEC aufgereinigt. Die  $^{18}\text{F}$ -markierten, KuE-SA-funktionalisierten Liposome konnten mit einer zerfallskorrigierten radiochemischen Ausbeute von 25 % erhalten werden. Analog dazu wurden zudem  $^{18}\text{F}$ -markierte Liposome ohne KuE-Modifikation hergestellt (14 % RCA).



**Abbildung 55:** Schematischer Querschnitt zur Darstellung der Struktur der  $^{18}\text{F}$ -markierten, KuE-SA-funktionalisierten und *hbPG*-abgeschirmten Liposome.

Nach vollständigem Abklingen der Aktivität wurde die Größe der KuE-SA-tragenden und nicht-KuE-funktionalisierten Liposome mittels DLS bestimmt. Sie spielt eine bedeutende Rolle für das pharmakologische Verhalten *in vivo* und sollte idealerweise im Bereich von 100–200 nm liegen, um die größenabhängige Anreicherung in Leber und Milz zu vermeiden und möglichst effektiv von der Permeabilität des Tumorgewebes zu profitieren [51–53]. Während die BisHD-*hbPG*-Alkin Liposome einen Durchmesser von ca. 156 nm aufwiesen, konnte für die KuE-SA-funktionalisierten Analoga ein höherer Wert von 199 nm ermittelt werden. Die Dimensionen beider liposomaler Systeme erfüllen demnach die Anforderungen für eine lange Zirkulationszeit und effektive Tumoranreicherung.



Die im Rahmen dieses Teilprojekts erfolgreich hergestellten  $^{18}\text{F}$ -markierten, KuE-SA-funktionalisierten Stealth-Liposome stellen demnach vielversprechende Mittel für den zielgerichteten Wirkstofftransport bei der Behandlung von PSMA-exprimierendem Prostatakrebs dar.

In weiterführenden Studien soll dieses System erstmals *in vivo* in tumortragenden Mäusen hinsichtlich seiner Pharmakokinetik und Bindungseigenschaften zu PSMA-exprimierendem Zielgewebe untersucht werden. Durch die Markierung mit  $^{18}\text{F}$  lässt sich die Verteilung im Organismus über einen Zeitraum von mehreren Stunden mittels PET und *ex vivo*-Aktivitätsmessungen visualisieren und quantifizieren. Bei erfolgreichen Ergebnissen können sich Experimente zur Inkorporation möglicher Wirkstoffen wie z. B. Docetaxel und zur tatsächlichen therapeutischen Wirksamkeit anschließen [54].

## Referenzen

- [1] Stelljes M, Hermann S, Albring J, Köhler G, Löffler M, Franzius C, et al. Clinical molecular imaging in intestinal graft-versus-host disease: mapping of disease activity, prediction, and monitoring of treatment efficiency by positron emission tomography. *Blood* 2008;111:2909–18.
- [2] Ferrara JLM, Levine JE. Graft-versus-host disease in the 21st century: new perspectives on an old problem. *Semin Hematol* 2006;43:1–2.
- [3] Fowler DH, Breglio J, Nagel G, Eckhaus MA, Gress RE. Allospecific CD8<sup>+</sup> Tc1 and Tc2 populations in graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease. *J Immunol* 1996;157:4811–21.
- [4] Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007;109:1756–64.
- [5] Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, Murphy WJ, Blazar BR, Serody JS. Effector CD4<sup>+</sup> T cells, the cytokines they generate, and GvHD: something old and something new. *Blood* 2011;117:3268–76.
- [6] Antin J, Ferrara J. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992;80:2964–8.
- [7] Becker C, Taube C, Bopp T, Becker C, Michel K, Kubach J, et al. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood* 2009;114:1263–9.
- [8] Hahn SA, Stahl HF, Becker C, Correll A, Schneider F-J, Tuettenberg A, et al. Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2013;122:1182–91.
- [9] Beres AJ, Drobyski WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol* 2013;4:1–9.
- [10] Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493–9.
- [11] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144–50.

- [12] Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903–11.
- [13] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012;119:5640–9.
- [14] Heskamp S, Raavé R, Boerman O, Rijpkema M, Goncalves V, Denat F. <sup>89</sup>Zr-Immuno-positron emission tomography in oncology: state-of-the-art <sup>89</sup>Zr radiochemistry. *Bioconjug Chem* 2017;28:2211–23.
- [15] Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, Lewis JS. PET imaging with <sup>89</sup>Zr: from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol* 2013;40:3–14.
- [16] Bhatt NB, Pandya DN, Wadas TJ. Recent advances in zirconium-89 chelator development. *Molecules* 2018;23.
- [17] Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. *In vivo* biodistribution and accumulation of <sup>89</sup>Zr in mice. *Nucl Med Biol* 2011;38:675–81.
- [18] Patra M, Bauman A, Mari C, Fischer CA, Blacque O, Häussinger D, et al. An octadentate bifunctional chelating agent for the development of stable zirconium-89 based molecular imaging probes. *Chem Commun* 2014;50:11523–5.
- [19] Vugts DJ, Klaver C, Sewing C, Poot AJ, Adamzek K, Huegli S, et al. Comparison of the octadentate bifunctional chelator DFO\*-pPhe-NCS and the clinically used hexadentate bifunctional chelator DFO-pPhe-NCS for <sup>89</sup>Zr-immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017;44:286–95.
- [20] Nakamura T, Abe-Kanoh N, Nakamura Y. Physiological relevance of covalent protein modification by dietary isothiocyanates. *J Clin Biochem Nutr* 2018;62:11–9.
- [21] Banerjee S, Pillai MRA, Knapp FF. Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chem Rev* 2015;115:2934–74.
- [22] Barbet J, Bardiès M, Bourgeois M, Chatal J-F, Chérel M, Davodeau F, et al. Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. In: Chames P, editor. *Methods Mol. Biol.*, vol. 907. 2nd ed., Springer; 2012, p. 681–97.
- [23] Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev* 2014;43:260–90.
- [24] Okoye NC, Baumeister JE, Najafi Khosroshahi F, Hennkens HM, Jurisson SS. Chelators and metal complex stability for radiopharmaceutical applications. *Radiochim Acta* 2019;107:1087–120.
- [25] Milenic DE, Garmestani K, Chappell LL, Dadachova E, Yordanov A, Ma D, et al. *In vivo* comparison of macrocyclic and acyclic ligands for radiolabeling of monoclonal antibodies with <sup>177</sup>Lu for radioimmunotherapeutic applications. *Nucl Med Biol* 2002;29:431–42.
- [26] Lattuada L, Barge A, Cravotto G, Giovenzana GB, Tei L. The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem Soc Rev* 2011;40:3019.
- [27] Boros E, Holland JP. Chemical aspects of metal ion chelation in the synthesis and application antibody-based radiotracers. *J Label Compd Radiopharm* 2018;61:652–71.
- [28] Greifenstein L, Grus T, Nagel J, Sinnes JP, Rösch F. Synthesis and labeling of a squaric acid containing PSMA-inhibitor coupled to AAZTA<sup>5</sup> for versatile labeling with <sup>44</sup>Sc, <sup>64</sup>Cu, <sup>68</sup>Ga and <sup>177</sup>Lu. *Appl Radiat Isot* 2020;156:108867.

- [29] Nagy G, Szikra D, Trencsényi G, Fekete A, Garai I, Giani AM, et al. AAZTA: an ideal chelating agent for the development of  $^{44}\text{Sc}$  PET imaging agents. *Angew Chemie Int Ed* 2017;56:2118–22.
- [30] Sinnes J, Nagel J, Rösch F. AAZTA<sup>5</sup>/AAZTA<sup>5</sup>-TOC: synthesis and radiochemical evaluation with  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{177}\text{Lu}$ . *EJNMMI Radiopharm Chem* 2019;4:18.
- [31] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
- [32] Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J Cancer* 2016;7:1281–94.
- [33] Stergiou N, Nagel J, Pektor S, Heimes AS, Jäkel J, Brenner W, et al. Evaluation of a novel monoclonal antibody against tumor-associated MUC1 for diagnosis and prognosis of breast cancer. *Int J Med Sci* 2019;16:1188–98.
- [34] Miller-Kleinhenz JM, Bozeman EN, Yang L. Targeted nanoparticles for image-guided treatment of triple-negative breast cancer: clinical significance and technological advances. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* 2015;7:797–816.
- [35] Siroy A, Abdul-Karim FW, Miedler J, Fong N, Fu P, Gilmore H, et al. MUC1 is expressed at high frequency in early-stage basal-like triple-negative breast cancer. *Hum Pathol* 2013;44:2159–66.
- [36] Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 2014;20:332–42.
- [37] Brockhausen I, Yang J-M, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 1995;233:607–17.
- [38] Palitzsch B, Gaidzik N, Stergiou N, Stahn S, Hartmann S, Gerlitzki B, et al. A synthetic glycopeptide vaccine for the induction of a monoclonal antibody that differentiates between normal and tumor mammary cells and enables the diagnosis of human pancreatic cancer. *Angew Chemie Int Ed* 2016;55:2894–8.
- [39] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87–108.
- [40] Okarvi SM. Recent developments of prostate-specific membrane antigen (PSMA)-specific radiopharmaceuticals for precise imaging and therapy of prostate cancer: an overview. *Clin Transl Imaging* 2019;7:189–208.
- [41] Pillai MRA, Nanabala R, Joy A, Sasikumar A, (Russ) Knapp FF. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. *Nucl Med Biol* 2016;43:692–720.
- [42] Kopka K, Benešová M, Bařinka C, Haberkorn U, Babich J. Glu-ureido-based inhibitors of prostate-specific membrane antigen: lessons learned during the development of a novel class of low-molecular-weight theranostic radiotracers. *J Nucl Med* 2017;58:17S-26S.
- [43] Yan L, Shen J, Wang J, Yang X, Dong S, Lu S. Nanoparticle-based drug delivery system: a patient-friendly chemotherapy for oncology. *Dose-Response* 2020;18:155932582093616.
- [44] Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett* 2010;10:3223–30.

- [45] Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology* 2018;16:71.
- [46] Beltrán-Gracia E, López-Camacho A, Higuera-Ciapara I, Velázquez-Fernández JB, Vallejo-Cardona AA. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnol* 2019;10:11.
- [47] Hofmann AM, Wurm F, Hühn E, Nawroth T, Langguth P, Frey H. Hyperbranched polyglycerol-based lipids via oxyanionic polymerization: toward multifunctional stealth liposomes. *Biomacromolecules* 2010;11:568–74.
- [48] Greifenstein L, Engelbogen N, Lahnif H, Sinnes J, Bergmann R, Bachmann M, et al. Synthesis, labeling and preclinical evaluation of a squaric acid containing PSMA inhibitor labeled with <sup>68</sup>Ga: a comparison with PSMA-11 and PSMA-617. *ChemMedChem* 2020;15:695–704.
- [49] Reibel AT, Müller SS, Pektor S, Bausbacher N, Miederer M, Frey H, et al. Fate of linear and branched polyether-lipids *in vivo* in comparison to their liposomal formulations by <sup>18</sup>F-radiolabeling and positron emission tomography. *Biomacromolecules* 2015;16:842–51.
- [50] Siwak DR, Tari AM, Lopez-Berestein G. Liposomal antisense oligonucleotides for cancer therapy. *Methods Enzymol.*, vol. 387, 2004, p. 241–53.
- [51] Ernsting MJ, Murakami M, Roy A, Li S-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J Control Release* 2013;172:782–94.
- [52] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001;53:283–318.
- [53] Liu D, Mori A, Huang L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1992;1104:95–101.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

1B4M-DTPA	2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-6-methyldiethylen-triaminpentaessigsäure
AAZTA	1,4-Bis(carboxymethyl)-6-(bis(carboxymethyl))amino-6-methylperhydro-1,4-diazepin
AAZTA <sup>5</sup>	1,4-Bis(carboxymethyl)-6-(bis(carboxymethyl))amino-6-pentansäure-perhydro-1,4-diazepine
ACK	Ammoniumchlorid-Kalium
ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat ( <i>antibody-drug-conjugate</i> )
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ( <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> )
aH SCT	autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation ( <i>autologous hematopoietic stem cell transplantation</i> )
APC	antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
AROP	anionische Ringöffnungspolymerisation ( <i>anionic ring opening polymerization</i> )
BFC	bifunktionaler Chelator
BGO	Bismutgermanat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl Schutzgruppe
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl Schutzgruppe
c.a.	geträgert ( <i>carrier-added</i> )
CAR	Chelator-zu-Antikörper Verhältnis ( <i>chelator-to-antibody ratio</i> )
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
CHX-A''-DTPA	Cyclohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure
cpm	Counts pro Minute
CT	Computertomographie
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
DAB	Diaminobenzidin
DATA <sup>m</sup>	1,4-Bis(carboxymethyl)-6-((carboxymethyl)methylamino)-6-methylperhydro-1,4-diazepine
DATA <sup>5m</sup>	1,4-Bis(carboxymethyl)-6-((carboxymethyl)methylamino)-6-pentansäure-perhydro-1,4-diazepine
DATATOC	DATA-(Tyr <sup>3</sup> )-Octreotid
DBCO	Dibenzylcyclooctin
DC	dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DDS	Wirkstofftransportsystem ( <i>drug delivery system</i> )
DFO	Deferoxamin
DFO*	Deferoxamin*
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DiAmSar	3,6,10,13,16,19-Hexazabicyclo[6.6.6]icosan-1,8-diamin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin

DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTAGA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1-glutarsäure-4,7,10-triessigsäure
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-trimethylammoniumpropan
DOTATATE	DOTA-(Tyr <sup>3</sup> )-Octreotat
DOTATOC	DOTA-(Tyr <sup>3</sup> )-Octreotid
DOTMA	1,2-Di- <i>O</i> -octadecenyl-3-trimethylammoniumpropan
DSB	Doppelstrangbruch
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSPE	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DSS	Dextran Natriumsulfat ( <i>dextran sodium sulfate</i> )
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EC	Elektroneneinfang ( <i>electron capture</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEGE	Ethoxyethylglycidylether
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur ( <i>European Medicines Agency</i> )
EPR	erhöhte Permeabilität und Retention ( <i>enhanced permeability and retention</i> )
ER	Östrogenrezeptor ( <i>estrogen receptor</i> )
ESI	Elektrosprayionisation
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOH	Ethanol
Fab	antigenbindendes Fragment ( <i>fragment antigen binding</i> )
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FBS	fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
Fc	kristallisierbares Fragment ( <i>fragment crystallizable</i> )
FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel ( <i>U.S. Food and Drug Administration</i> )
FDG	Fluordeoxyglucose
FET	<i>O</i> -(2-Fluorethyl)-L-Tyrosin
FETos	Fluorethyltosylat
FOV	Sichtfeld ( <i>field of view</i> )

FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Fusarinin C
GIT	Gastrointestinaltrakt
gp140	HIV-1 Hüllenglykoprotein 140
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GvHD	Spender-gegen-Empfänger-Reaktion ( <i>graft-versus-host disease</i> )
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorphosphat
<i>hb</i>	hyperverzweigt ( <i>hyperbranched</i> )
HBED	<i>N,N'</i> -Bis(2-hydroxybenzyl)ethylendiamin- <i>N,N'</i> -diessigsäure
HBED-CC	<i>N,N'</i> -Bis(2-hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl)ethylendiamin- <i>N,N'</i> -diessigsäure
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HD	Hexadecyl
H <sub>2</sub> dedpa	1,2-Bis((carboxypyridin-2-yl)methylamino)ethan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 ( <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
H <sub>4</sub> octapa	<i>N,N'</i> -Bis(6-carboxy-2-pyridylmethyl)ethylendiamin- <i>N,N'</i> -diessigsäure
HOPO	Hydroxypyridinon
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HR	Hormonrezeptor
HS	humanes Serum
HSAB	harte und weiche Säuren und Basen ( <i>hard and soft acids and bases</i> )
HSC	hämatopoetische Stammzellen ( <i>hematopoietic stem cells</i> )
HSQC	heteronukleare Einzelquantenkohärenz ( <i>heteronuclear single quantum coherence</i> )
hu	human
ID	injizierte Dosis ( <i>injected dose</i> )
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVA	Isotopenverdünnungsanalyse
KuE	L-Lysin-Urea-L-Glutamat
LC	Flüssigchromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
LET	linearer Energietransfer

LN	Lymphknoten ( <i>lymph node</i> )
LOR	Koinzidenzlinie ( <i>line of response</i> )
LSO	Lutetiumoxyorthosilikat
LYSO	Lutetiumyttriumoxyorthosilikat
mAb	monoklonaler Antikörper ( <i>monoclonal antibody</i> )
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
mCRPC	metastasierter, kastrationsresistenter Prostatakrebs ( <i>metastatic castration-resistant prostate cancer</i> )
MDS	mehrfach beschädigte Stelle ( <i>multiply damaged site</i> )
MEC	minimale effektive Konzentration ( <i>minimum effective concentration</i> )
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MIP	Maximumintensitätsprojektion
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
mRCC	metastasiertes Nierenzellkarzinom ( <i>metastatic renal cell carcinoma</i> )
MRI	Magnetresonanztomographie ( <i>magnetic resonance imaging</i> )
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MTC	minimale toxische Konzentration ( <i>minimum toxic concentration</i> )
MUC1	Mucin1
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
MWCO	Ausschlussgrenze des Molekulargewichts ( <i>molecular weight cut-off</i> )
NAAG	<i>N</i> -Acetyl-Aspartyl-Glutamat
n.c.a	trägerfrei ( <i>no-carrier-added</i> )
NETA	4-(2-(Bis(carboxymethylamino)-ethyl)-7-carboxymethyl-1,4,7-triazolan-1-yl)essigsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimidester
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NODAGA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure
NSG	NOD Scid Gamma
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDI	Polydispersitätsindex
PD-1	Programmierter-Zelltod-Protein 1 ( <i>programmed cell death protein 1</i> )



PD-L1	Programmierter-Zelltod-Ligand 1 ( <i>programmed cell death ligand 1</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PG	Polyglycerol
pHPMA	Poly( <i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methacrylamid)
p.i.	nach Injektion ( <i>post injection</i> )
PMDETA	<i>N,N,N',N'',N''</i> -Pentamethyldiethylentriamin
PR	Progesteronrezeptor
PRRT	Peptidrezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie
Ps	Positronium
PSMA	prostataspezifisches Membranantigen
PyMT	<i>polyoma virus middle T antigen</i>
QMA	quaternäres Methylammonium
RCA	radiochemische Ausbeute
RCC	radiochemischer Umsatz ( <i>radiochemical conversion</i> )
RCP	radiochemische Reinheit ( <i>radiochemical purity</i> )
RCU	radiochemischer Umsatz
RCY	radiochemische Ausbeute ( <i>radiochemical yield</i> )
RES	retikuloendotheliales System
RI	Brechungsindex ( <i>refractive index</i> )
RIT	Radioimmuntherapie
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROI	Bereich von Interesse ( <i>region of interest</i> )
RT	Raumtemperatur
SA	Quadratsäure(amid) ( <i>squaric acid, squaramide</i> )
SADE	Quadratsäurediethylester ( <i>squaric acid diethyl ester</i> )
Sar	Sarcophagin
SarAr	1- <i>N</i> -(4-Aminobenzyl)-3,6,10,13,16,19-Hexazabicyclo[6.6.6]icosan-1,8-diamin
s.c.	subkutan
scFv	variables Einzelketten-Fragment ( <i>single chain variable fragment</i> )
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEC	Größenausschlusschromatographie ( <i>size exclusion chromatography</i> )
SEM	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>standard error of the mean</i> )
SMA	langsame Monomerzugabe ( <i>slow monomer addition</i> )

SPAAC	spannungsvermittelte Azid-Alkin-Cycloaddition ( <i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i> )
SPE	Festphasenextraktion ( <i>solid phase extraction</i> )
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie ( <i>single photon emission computed tomography</i> )
SSB	Einzelstrangbruch ( <i>single-strand break</i> )
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> )
SUV	standardisierter Aufnahmewert ( <i>standardized uptake value</i> )
TA	tumorassoziiert
TAFC	Triacetylfusarinin C
TAM	Terephthalamid
T <sub>c</sub>	zytotoxische T-Zelle ( <i>cytotoxic T cell</i> )
TCO	<i>trans</i> -Cycloocten
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
Tdr	radiomarkiertes Thymidin
TE	Echozeit ( <i>echo time</i> )
TEG	Triethylenglycol
TETA	1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure
TFA	Trifluoressigsäure ( <i>trifluoroacetic acid</i> )
TFP	Tetrafluorophenylester
T <sub>h</sub>	T-Helferzelle
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Dünnschichtchromatographie ( <i>thin layer chromatography</i> )
TNBC	triple-negativer Brustkrebs ( <i>triple-negative breast cancer</i> )
TOF	Flugzeit ( <i>time of flight</i> )
TR	Repetitionszeit ( <i>repetition time</i> )
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
Ts	<i>p</i> -Toluolsulfonat, Tosylat
TTox	Tetanustoxoid
Tz	Tetrazin
VEGF-A	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A ( <i>vascular endothelial growth factor A</i> )
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>

## 8. Liste der Publikationen

***“Development and in vitro evaluation of new bifunctional <sup>89</sup>Zr-chelators based on the 6-amino-1,4-diazepane scaffold for immuno-PET applications”***

B. Klasen, [REDACTED]

*Nucl Med Biol* 2021;102–103:12–23.

***“Squaric acid-based radiopharmaceuticals for tumor imaging and therapy”***

[REDACTED], B. Klasen, [REDACTED]

*Bioconjug Chem* 2021;32:1223–31.

***“AAZTA<sup>5</sup>-squaramide ester competing with DOTA-, DTPA- and CHX-A”-DTPA-analogues: promising tool for <sup>177</sup>Lu-labeling of monoclonal antibodies under mild conditions”***

B. Klasen, [REDACTED]

*Nucl Med Biol* 2021;96–97:80–93.

***“Targeting fibroblast activation protein (FAP): next generation PET radiotracers using squaramide coupled bifunctional DOTA and DATA<sup>5m</sup> chelators”***

[REDACTED] B. Klasen, [REDACTED]

*EJNMMI Radiopharm Chem* 2020;5:19.

***“Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD”***

[REDACTED], B. Klasen, [REDACTED]

*Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2020;47:1314–25.

***“<sup>68</sup>Ga[Ga]-, <sup>111</sup>In[In]-oxine: a novel strategy of in situ radiolabeling of HPMA-based micelles”***

[REDACTED], B. Klasen, [REDACTED]

*Am J Nucl Med Mol Imaging* 2019;9:67–83.



**Danksagung**

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

## Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von \_\_\_\_\_ in der Zeit vom 03.04.2017 bis zum 30.07.2021 am Institut für Kernchemie (Department Chemie) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Benedikt Klasen





**Curriculum Vitae**

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

---

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

---

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

---

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]