

$^{68}\text{Ga}$ -Markierungsstrategien  
für nanodimensionale und polymere Systeme  
für die Positronen-Emissions-Tomographie

Dissertation

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Chemie

Am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Katharina Stockhofe  
geboren in Duisburg

Mainz, im Oktober 2016







## Zusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, das Stoffwechselprozesse im Körper abbildet. Mithilfe von PET kann es auf elegante Weise gelingen, Informationen über die Pharmakokinetik von polymeren und nanopartikulären Wirkstofftransportsystemen zu erhalten. Dabei ist eine zuverlässige und robuste Einführung des radioaktiven Nuklids entscheidend für den Erfolg. In der vorliegenden Arbeit wurde der Positronemitter  $^{68}\text{Ga}$  über verschiedene Strategien an Homopolymere, diverse anorganische Nanopartikel, sowie kernvernetzte Mizellen aus Blockcopolymeren angebunden.

Hierzu wurde u.A. die spannungsvermittelte Alkin-Azid Cycloaddition (SPAAC) verwendet, welche die Anwesenheit eines ringgespannten Alkins, sowie eines Azids erfordert und unter sehr milden Bedingungen stattfindet. Die für Radiometalle vielfach eingesetzten Chelatoren DOTA und NODA-GA, sowie DATA wurden so funktionalisiert, dass sie für diese Art der Ligation zugänglich wurden. Sie wurden in der Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}$ , sowie  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$  evaluiert. Die Chelatoren zeigten eine hervorragende Koordination des jeweiligen Radiometalls, wobei lediglich die azidierten Derivate eine hohe Stabilität des gebildeten Komplexes aufwiesen. Die mit Dibenzylcyclooctin (DBCO) funktionalisierten Chelatoren zeigten deutlich schlechtere Komplexstabilitäten, was der lipophilen und sterisch anspruchsvollen DBCO-Funktion zugeschrieben wird.

Polysarconsin-Homopolymere, welche entweder mit einem Azid oder DBCO endgruppenfunktionalisiert waren, wurden mittels SPAAC mit diesen Chelatoren radiomarkiert. Hierbei wurde untersucht, inwieweit die radiochemischen Ausbeuten beeinflusst werden, wenn die Radiomarkierung nach oder vor der Clickreaktion zwischen dem jeweiligen Chelator und dem Polymer stattfindet. Diese Reaktionen werden als direkte bzw. indirekte Radiomarkierung bezeichnet. Die indirekte Radiomarkierung stellt aufgrund der milderen Bedingungen eine äußerst effiziente und elegante Alternative zur direkten Radiomarkierung dar. NODA-GA-TEG-Azid und DOTA-TEG-Azid zeigten sehr gute Click- bzw. radiochemische Ausbeuten in der direkten, wie der indirekten Radiomarkierung.

Polymergecoatete Tantaloxid- und Eisenoxidnanopartikel wurden über Amidbindung mit den NHS-Estern oder *in situ* erzeugten Aktivestern von DOTA und NODA-GA funktionalisiert. Dabei konnten die Resultate der Kopplungsreaktion gesteigert werden, indem das Polymer mit dem entsprechenden Chelator funktionalisiert wurde, bevor es zum Coating der Partikel eingesetzt wurde. Azid-funktionalisierte Eisenoxidnanopartikel konnten erfolgreich mit  $^{68}\text{Ga}$  Bicyclo[6.1.0]non-4-in-DOTA in einer SPAAC radiomarkiert werden. Sie wurden in einer dynamischen  $\mu\text{PET}$ -Messung, sowie in *ex vivo*-Biodistributionsstudien mit gesunden Mäusen auf ihre Pharmakokinetik analysiert. Die etwa 130 nm großen Partikel zeigten dabei nach 60 min eine deutliche Anreicherung in Leber und Milz, sowie gute Blutretentionszeiten.

Mizellen aus PSar-PCys-Blockcopolymeren, welche mit einem NODA-GA-Liponamid kernvernetzt waren, wurden mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert und in ersten *in vivo*-Studien auf ihre Pharmakokinetik untersucht. Nach 60 min zeigten sie sehr gute Blutretentionszeiten.



## Abstract

Positron Emission Tomography (PET) is a non-invasive imaging technique that depicts metabolic processes in the body. With PET it becomes possible to get detailed information about the pharmacokinetics of polymeric and nanodimensional drug delivery systems, in a very elegant way. Therefore, it is absolutely necessary to have a reliable and robust technique to introduce the radioactive nuclide. In the presented work the positron emitting  $^{68}\text{Ga}$  was attached to homopolymers, various inorganic nanoparticles and core-crosslinked polymermicelles *via* different strategies.

One of the used techniques was strain promoted alkyne azide cycloaddition (SPAAC), for which the presence of a strained alkyne and an azide is required. The conditions for these reactions are very mild. To have suitable chelating agents for ligation *via* SPAAC, the chelators DOTA, NODA-GA and DATA were functionalized with either an azide or a strained cycloalkyne. The derivatized chelators were radiolabeled with  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{177}\text{Lu}$  and showed excellent complexation of the respective metal ions. The azide-functionalized chelators showed very good stabilities after complexation of the metal ions, in contrast to the dibenzylcyclooctyne (DBCO)-derivatized ones. The reason lies here in the lipophilic character of the DBCO, as well as in steric hindrances.

Polysarcosine homopolymers carrying either an azide or a DBCO as one of their terminal groups were radiolabeled *via* SPAAC with the chelators described above. The idea was to investigate the radiochemical yields after and before the clickreaction with the particular chelator has taken place. Those reactions are called "direct" and "indirect" radiolabeling. Due to the very mild conditions the indirect strategy is a good and elegant alternative to the direct one. NODA-GA-TEG-azide and DOTA-TEG-azide both showed very good results for the direct and the indirect radiolabeling strategy.

Polymercoated tantalum- and iron oxide nanoparticles were attached to chelators *via* amide bonding. Therefore the NHS-ester or an *in situ* generated active ester of DOTA or NODA-GA was used. It was possible to increase the coupling yields if the polymer was coupled to the chelator before it was used for coating. Azide-functionalized iron oxide nanoparticles were successfully coupled with [ $^{68}\text{Ga}$ ]bicyclo[6.1.0]non-4-yne-DOTA in a SPAAC and investigated in a dynamical  $\mu\text{PET}$ -measurement, as well as in *ex vivo*-biodistribution studies in healthy mice. The 130 nm sized particles accumulated in liver and spleen and showed good blood retention.

Micelles formed from PSar-PCys blockcopolymers were core-crosslinked with NODA-GA-liponamide. Radiolabeling with  $^{68}\text{Ga}$  followed. First *in vivo*-studies were performed and the micelles displayed excellent blood retention after 60 min.











# Inhalt

Zusammenfassung .....	5
Abstract .....	7
1 Einleitung .....	16
1.1 PET .....	16
1.1.1 Kernchemischer Hintergrund .....	17
1.1.2 Radionuklide für die PET .....	21
1.1.3 Radiochemie des Galliums-68 .....	23
1.1.4 Chelatoren für Gallium-68 .....	26
1.2 Ligationschemie .....	28
1.2.1 Amidbindungen .....	28
1.2.2 Click-Chemie .....	30
1.3 Nanopartikuläre und polymere Wirkstofftransportsysteme .....	32
1.3.1 Radioaktiv markierte Polymere und Nanopartikel in der PET .....	35
2 Problemstellung und Zielsetzung .....	38
3 Ergebnisse und Diskussion .....	42
3.1 Clickfähige Chelatorsysteme .....	42
3.1.1 Organische Synthesen .....	42
3.1.2 Radiochemische Experimente .....	61
3.2 Anorganische Nanopartikel .....	76
3.2.1 Organische Synthesen .....	77
3.2.2 Radiochemische Experimente .....	84
3.2.3 <i>in vivo</i> $\mu$ PET-Studien und <i>ex vivo</i> Biodistributionsstudien .....	95
3.3 PSar-basierte Polymere .....	97
3.3.1 Radiochemische Experimente .....	97
3.4 Kernvernetzte Mizellen .....	108
3.4.1 Organische Synthesen .....	108
3.4.2 Radiochemische Experimente .....	109
3.4.3 <i>in vivo</i> $\mu$ PET-Studien und <i>ex vivo</i> -Biodistributionsstudien .....	112
4 Zusammenfassung und Ausblick .....	116
5 Experimentalteil .....	120
5.1 Chemikalien, Messgeräte und Software .....	120
5.1.1 Chemikalien .....	120
5.1.2 Geräte und Software .....	120
5.2 Organische Synthesen .....	122

5.2.1	Synthese von clickfähigen Chelatorsystemen .....	122
5.2.2	Kopplung von DOTA- und NOTA-Derivaten an anorganische Nanopartikel .....	132
5.2.3	Synthese des Liponsäure-basierten NODA-GA .....	135
5.3	Radiochemische Experimente.....	135
5.3.1	Radiomarkierung der clickfähigen Chelatoren .....	135
5.3.2	Radiomarkierung der anorganischen Nanopartikel .....	140
5.3.3	Radiomarkierung der kernvernetzten Mizellen und des Vernetzers .....	140
5.4	Click-Experimente .....	140
5.4.1	Click-Reaktionen mit anorganischen Nanopartikeln .....	140
5.4.2	Click-Reaktionen mit PSar-Homopolymeren.....	141
5.5	<i>in vivo</i> Experimente .....	142
6	Anhang.....	144
6.1	Literaturverzeichnis .....	144
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	150
6.3	Abbildungsverzeichnis .....	153
6.4	Tabellenverzeichnis .....	158
6.5	Eidesstattliche Erklärung.....	163

---

# 1. Einleitung

## 1 Einleitung

Tumorerkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2013 starben 223842 Menschen in Deutschland an Krebs<sup>1</sup>. Eine frühzeitige und möglichst detaillierte Diagnose spielt dabei für die Heilungschancen eine ebenso zentrale Rolle wie eine gründliche Planung der Therapie und eine regelmäßige Überwachung des Therapieverlaufs. Auf dem Feld der Nanomedizin gab es in den letzten Jahren enorme Entwicklungen, vor allem, weil nanodimensionale Wirkstofftransportsysteme wie Polymere oder Nanopartikel interessante, vorteilhafte physikochemische Eigenschaften aufweisen<sup>2</sup>. Sie können zu therapeutischen und diagnostischen Zwecken in onkologischen und inflammatorischen Fragestellungen eingesetzt werden. Besonders charmant ist hierbei die Möglichkeit, Therapie und Diagnose (also auch die Überwachung des Therapieverlaufs) mit demselben Molekül durchführen zu können (Theranostik). Eine große Bandbreite an nanodimensionalen Wirkstofftransportsystemen wurde bereits entwickelt, von denen einige in der Klinik zur Anwendung kommen<sup>3</sup>. Viele Arbeitsgruppen arbeiten weltweit an der Weiterentwicklung dieser Substanzen, wobei die Forschungsschwerpunkte sehr verschieden sind. Sie reichen von der Synthese und Charakterisierung der Transportsysteme und dem Einschluss von Wirkstoffen über die Synthese und Anbindung von Targetingvektoren. Für die Entwicklung, die biologische und medizinische Evaluierung, aber auch für die spätere theranostische Anwendung von nanodimensionalen Transportsystemen spielen die bildgebenden Verfahren eine entscheidende Rolle<sup>4</sup>. Daher ist es von zentraler Bedeutung, die nanodimensionalen Strukturen für bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), aber vor allem auch für die molekulare Bildgebung wie Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Einzel-Photonen-Emissions-Computer-Tomographie (engl.: *Single Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) zugänglich zu machen.

### 1.1 PET

Es gibt eine Vielzahl bildgebender Verfahren (siehe Tabelle 1), die für die Diagnostik von Tumorerkrankungen verwendet werden. Ultraschall, Röntgen, CT und MRT gehören beispielsweise zu den Messmethoden, die Auskunft über die Morphologie des untersuchten Bereichs geben können, wohingegen SPECT und PET Verfahren sind, die Stoffwechselprozesse abbilden, also funktionelle Informationen liefern. Besonders aussagekräftige Daten erhält man aus der Kombinationen von morphologischen und funktionalen bildgebenden Messmethoden wie bei dem etablierten PET/CT oder beim neueren PET/MRT, welches Ende der 90er Jahre erstmals von Shao *et al.* vorgestellt wurde<sup>5</sup>.

Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich nicht nur in dem Sachverhalt, den sie abbilden, sondern u.a. auch in Sensitivität, zeitlicher und örtlicher Auflösung, sowie dem jeweils zugrundeliegenden physikalischen Phänomen.

CT basiert auf der unterschiedlichen Abschwächung von Röntgenstrahlung beim Durchdringen verschiedener Gewebe. Auf dem resultierenden Bild erscheint Gewebe, das die Strahlung stärker absorbieren kann (z.B. Knochen) hell, Gewebe, das wenig bis gar keine Röntgenstrahlung absorbiert, erscheint dagegen dunkel bis schwarz (z.B. die Lunge)<sup>6</sup>.

Bei MRT-Messungen wird im Körper selbst ein Signal erzeugt. Durch Magnetfelder und Radiowellen werden die Protonen im Körper resonant angeregt und induzieren ein Signal, welches in ein Bild

umgerechnet wird. Der entstehende Kontrast basiert vor allem auf den unterschiedlichen Relaxationszeiten der Protonen, abhängig von ihrer direkten molekularen Umgebung<sup>6,7</sup>. Man unterscheidet hierbei zwischen den  $T_1$ - und den  $T_2$ -Relaxationszeiten, wobei  $T_1$  angibt, wie schnell das Gewebe wieder erregt werden kann und  $T_2$  die Länge des Signals angibt. Je nach Wichtung wird im resultierenden Bild Flüssigkeit (wie z.B. Blut) dunkel ( $T_1$ -Wichtung) oder hell ( $T_2$ -Wichtung) dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht einiger bildgebender Verfahren<sup>6,8,9</sup>

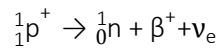
Verfahren	zeitliche Auflösung	Ortsauflösung (präklinisch)	Eindringtiefe	Sensitivität	zugrundeliegende Effekte
CT	min	50-200 $\mu\text{m}$	durchdringend	n.b.	Röntgenstrahlung
MRT	min-h	25-100 $\mu\text{m}$	durchdringend	$10^{-3}$ - $10^{-5}$ M	Magnetfeld
PET	s-min	1-2 mm ( $\leq 0,7$ mm)	durchdringend	$10^{-11}$ - $10^{-12}$ M	$\beta^+$ -Umwandlung
SPECT	min	1-2 mm ( $\leq 0,4$ mm)	durchdringend	$10^{-10}$ - $10^{-11}$ M	$\gamma$ -Umwandlung
US	s-min	10-100 $\mu\text{m}$ (oberflächlich) 1-2 mm (tieferliegend)	mm-cm	wenn Microbubbles genutzt werden: $\sim 10^{-12}$ M	hochfrequente Schallwellen

Bei Ultraschall (US) werden hochfrequente Schallwellen von einem Schallkopf ausgesandt, im Körper reflektiert und vom selben Schallkopf wieder detektiert. Diese Methode findet nicht nur in der Diagnose Anwendung, sondern auch in der Therapie<sup>6</sup>.

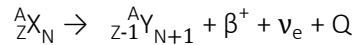
Anders als bei den drei bisher genannten Verfahren, ist bei SPECT und PET die Gabe von Radiopharmaka unerlässlich, deren Verteilung im Körper mithilfe geeigneter Detektoren verfolgt und abgebildet werden kann. Diese „Spurerzeuger“ (engl.: *Tracer*) werden dabei in so geringen Mengen appliziert, dass sie nicht in den Stoffwechsel eingreifen, sondern ihn lediglich abbilden. Dieses sogenannte Tracer-Prinzip geht auf den ungarischen Chemiker George de Hevesy zurück, der 1943 den Nobelpreis für seine Arbeit erhielt<sup>10</sup>.

### 1.1.1 Kernchemischer Hintergrund

Für die PET ist der Einsatz von Positronemittern vonnöten. Dies sind Radionuklide, deren Kerne protonenreich, bzw. neutronenarm sind. Auf der Karlsruher Nuklidkarte<sup>11</sup> sind sie rot eingefärbt und oberhalb der Linie der  $\beta$ -Stabilität zu finden. Der protonenreiche Atomkern gewinnt an Stabilität, indem in einem Proton (p) über die schwache Wechselwirkung ein *up*-Quark in ein *down*-Quark umgewandelt wird, wodurch wiederum das Proton in ein Neutron (n) umgewandelt wird. Das dabei entstehende Positron ( $\beta^+$  oder  $e^+$ ) und das Elektronneutrino ( $\nu_e$ ) verlassen den Kern und führen die freiwerdende Energie in Form von kinetischer Energie ab (siehe Abbildung 1). Der Tochterkern verbleibt in einem niedrigeren (stabileren) Energieniveau. Auf Ebene der Nukleonen ergibt sich folgende Gleichung:



Die Ordnungszahl Z verringert sich genau um eins, die Anzahl an Neutronen N nimmt um eins zu, folglich bleibt die Gesamtzahl der Nukleonen A (=Massenzahl) konstant. Q ist der Energiebetrag.



In nachstehender Abbildung ist der  $\beta^+$ -Zerfall schematisch dargestellt.

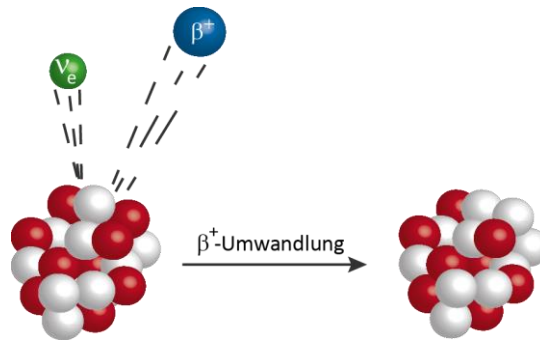


Abbildung 1: Schematische Darstellung (nicht maßstabsgetreu) der  $\beta^+$ -Umwandlung. Rote Kugeln stellen Protonen dar, weiße Kugeln stellen Neutronen dar, das Positron ist in blau dargestellt, das Elektroneutrino in grün.

Das gebildete Positron kann auf zwei verschiedene Arten vernichtet werden. Eine Möglichkeit ist, dass es beim Zusammentreffen mit einem Elektron der Umgebung vernichtet wird (Annihilation), wobei sog. Vernichtungsstrahlung auftritt. Man spricht hierbei von der Vernichtung des „freien“ Positrons<sup>12</sup>. Haben Elektron und Positron entgegengesetzte Spins (Singulett-Zustand), so werden zwei  $\gamma$ -Quanten in entgegengesetzte Richtung ( $180^\circ \pm 0,25^\circ$ )<sup>13</sup> ausgesandt, die jeweils eine Energie von 511 keV haben, was genau  $mc^2$  (mit  $m$  = Ruhemasse des Elektrons und  $c$  = Lichtgeschwindigkeit) entspricht. Dieser Zustand hat eine mittlere Lebensdauer ( $\tau$ ) von  $10^{-10}$  s. Sind die Spins von Positron und Elektron parallel ausgerichtet (Triplett-Zustand), so werden meistens drei  $\gamma$ -Quanten ausgesandt. Die Energie- und Winkelverteilung ist hierbei deutlich komplexer,  $\tau$  liegt im Bereich von  $10^{-7}$  s. Die relative Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Triplett- bzw. Singulett-Zustand liegt bei 3:1, das Verhältnis der Wirkungsquerschnitte  $\sigma$  für Zwei- zu Dreiquantenvernichtung liegt bei 1:372<sup>12</sup>. Dieses Verhältnis stammt aus einer Berechnung von Dirac, in die die mittlere Lebensdauer der beiden Zustände, bzw. deren Vernichtungskonstante  $\lambda$  und der Gesamtdrehimpuls  $J$  einfließen:

$$\frac{\sigma_{3\gamma}}{\sigma_{2\gamma}} = \frac{\lambda_{3\gamma}}{\lambda_{2\gamma}} \cdot \frac{2J_T+1}{2J_S+1} = \frac{1}{1115} \cdot 3 = \frac{1}{372}$$

Weniger als 5 % aller Positronen werden auf diesem Weg vernichtet, da die Wirkungsquerschnitte für die Energieübertragung auf Substratmoleküle durch für Ionisation oder Anregung deutlich größer sind, als der Wirkungsquerschnitt für die Vernichtung des freien Positrons<sup>12</sup>.

Die zweite Möglichkeit der Vernichtung besteht in der Bildung des Positroniums (Ps). Wenn das Positron auf seinem Weg durch die umgebende Materie ausreichend Energie abgegeben hat ohne dabei mit einem Elektron zu annihilieren, kommt es zur Ausbildung des Ps sobald dieses Positron auf ein Elektron trifft. Dies geschieht in einem Bereich von wenigen eV, dem sogenannten „Ore-Bereich“, welcher von der Bindungsenergie des Ps im Grundzustand (6,8 eV), der niedrigsten Anregungsenergie  $E_e$  der Substratmoleküle und dem Ionisationspotential  $V$  der Substratmoleküle eingegrenzt wird:

$$\Delta = E_e - (V - 6,8 \text{ eV})$$

Positronium ist ein dem Wasserstoffatom ähnlicher Zustand, bei dem sich Positron und Elektron umkreisen<sup>14</sup>. Auch hier gibt es zwei verschiedene Spinzustände, *ortho* (parallele Ausrichtung der Spins) und *para* (antiparallele Ausrichtung der Spins). Es ergibt sich wiederum ein Verhältnis von 3:1 für die Bildungswahrscheinlichkeit. Die Winkelverteilung und  $\gamma$ -Energie beträgt entsprechend  $180^\circ$  bzw.  $2 \cdot 511 \text{ keV}$  für den Zweikörperzerfall und ist für das *ortho*-Ps deutlich komplexer. Das für die PET relevante *para*-Ps wird zwar nur mit der Wahrscheinlichkeit von 25 % gebildet, jedoch kann sich das *ortho*-Ps aufgrund seiner längeren Lebensdauer ( $1,4 \cdot 10^{-7} \text{ s}$  im Gegensatz zu  $1,25 \cdot 10^{-10} \text{ s}$ ) in das *para*-Ps umwandeln, wenn paramagnetische Stoffe wie Sauerstoff anwesend sind. Das *ortho*-Ps kann auch unter der sog. „Pick-off“-Vernichtung nach einem Zweikörperzerfall vernichtet werden<sup>12</sup>. Wegen der sehr kurzen Lebensdauer des *para*-Ps ist eine Umwandlung in das *ortho*-Ps jedoch nicht möglich. Diese Sachverhalte führen dazu, dass das tatsächlich beobachtete Auftreten des für PET-Messungen relevanten Zweikörperzerfalls deutlich größer ist, als das theoretisch berechnete<sup>12</sup>.

Die im Winkel von  $180^\circ$  ausgesandten  $\gamma$ -Quanten werden dann von einem sogenannten PET-Scanner detektiert. Dieser besteht aus ringförmig angeordneten Szintillationsdetektoren mit dahinterliegenden Photomultipliern. Wenn die im  $180^\circ$ -Winkel ausgesandten  $\gamma$ -Quanten zeitgleich (d.h. innerhalb von  $6 \text{ ns}$ <sup>15</sup>) auf genau gegenüberliegende Detektoren treffen, spricht man von einer Koinzidenz, die dann von dem PET-Scanner detektiert wird (siehe Abbildung 2).

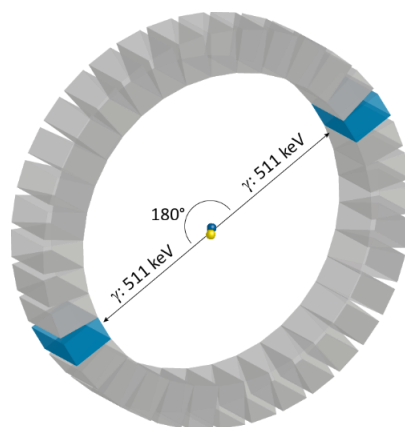


Abbildung 2: Koinzidenzmessung nach Annihilation eines Positron-Elektron-Paares (in blau-gelb dargestellt) bei PET

Die gedachte Linie zwischen den beiden  $\gamma$ -Quanten heißt „line of response“ (LOR). Auf ihr ist der Ort der Annihilation zu finden. Mit einer gewissen Unschärfe, die abhängig von der kinetischen Energie des Positrons ist, entspricht dieser Ort auch der Lokalisation des  $\beta^+$ -Emitters.

Neben den „wahren“, gewünschten Koinzidenzen, wie sie in Abbildung 2 dargestellt sind, registrieren die Detektoren auch  $\gamma$ -Quanten, die nicht aus solchen stammen, beziehungsweise es können auch Signale verloren gehen. In Abbildung 3 sind diese Fälle schematisch dargestellt.

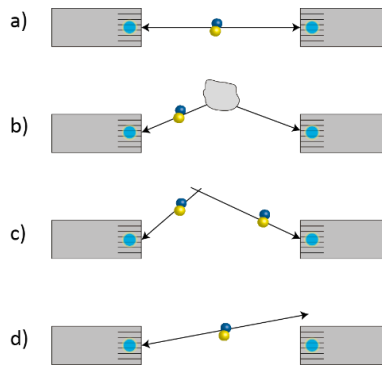


Abbildung 3: Koinzidenzen: a) Wahre Koinzidenz; b) gestreute Koinzidenz; c) zufällige Koinzidenz; d) Single

Ein  $\gamma$ -Quant kann beispielsweise gestreut werden, wodurch sich eine Richtungsänderung ergibt (b)). Die aus der Messung resultierende LOR ist folglich nicht zutreffend und es kommt zur Fehl-Lokalisation. Zwei  $\gamma$ -Quanten können zufällig zeitgleich auf gegenüberliegende Detektoren treffen, obwohl sie nicht aus derselben Annihilation stammen (c)). Dies führt ebenfalls zu einer Fehl-Lokalisation, die man „random“ nennt. Wird ein einzelnes  $\gamma$ -Quant registriert, so spricht man von einem „single“ (d)). Solche Fälle entstehen u.a., wenn das zweite Photon den Sichtbereich des Detektors verlässt oder im Patienten so stark gestreut wird, dass seine Energie nicht mehr ausreicht, um den Detektor auszulösen<sup>16</sup>. Diese Fälle müssen im Zuge der Rekonstruktion korrigiert beziehungsweise mit einberechnet werden.

Als Materialien für PET-Detektoren verwendet man üblicherweise Bismut-Germanat (BGO), Luthetium-ortho-Silikat (LSO), Gadoliniumsilikat (GSO) oder NaI(Tl)<sup>15,13</sup>. Bei der Wahl des Detektormaterials sind vor allem die Parameter der Lichtausbeute, Totzeit und Abklingzeit zu nennen. Je größer die Abklingzeit, desto größer ist auch das Koinzidenzfenster und damit die Anzahl der zufällig registrierten Koinzidenzen. Die Abklingzeit sollte also möglichst kurz sein. Ebenfalls sollte auch die Totzeit des Detektors kurz sein, sodass möglichst schnell nach dem Einfallen eines Photons ein nachfolgendes Photon registriert werden kann. Ist die Totzeit zu groß, kann der Detektor zwei kurz aufeinanderfolgende Koinzidenzen nicht registrieren. Die Lichtausbeute ist ein wichtiger Faktor für die Energie- und damit auch die Ortsauflösung des Detektors. Sie sollte möglichst groß sein, und ist abhängig von der im Kristall deponierten Energie. Von den oben genannten Materialien weist NaI(Tl) mit 41000 Photonen/MeV die beste Lichtausbeute auf, wohingegen GSO mit nur 8000 Photonen/MeV die niedrigste Lichtausbeute hat. Neben den bisher genannten limitierenden Faktoren für Detektormaterialien spielen weitere Parameter eine wichtige Rolle. Darunter sind die effektive Massenzahl des Detektormaterials  $Z_{\text{eff}}$ , sowie die Dichte und die Emissionswellenlänge der Szintillations-Photonen<sup>13</sup>.

Ein Teil der  $\gamma$ -Quanten wird bei jeder PET-Messung im Patienten selbst absorbiert und kann daher vom Detektor nicht registriert werden. Um diesen Effekt mit in die Rekonstruktion einbeziehen zu können, führt man neben der eigentlichen PET-Untersuchung (der Emissionsmessung) eine Transmissionsmessung durch. Hierbei kommt eine Photonen emittierende Quelle zum Einsatz (vgl. Abbildung 4).

Aus den gemessenen Ereignissen wird unter Berücksichtigung der genannten Korrekturen die Aktivitätsverteilung im Körper mit Hilfe von gefilterter Rückprojektion oder iterativen Verfahren berechnet. Hierbei wird die Transmissionsmessung als Schwächungsfaktor mit in die Radontransformation einbezogen<sup>15</sup>.

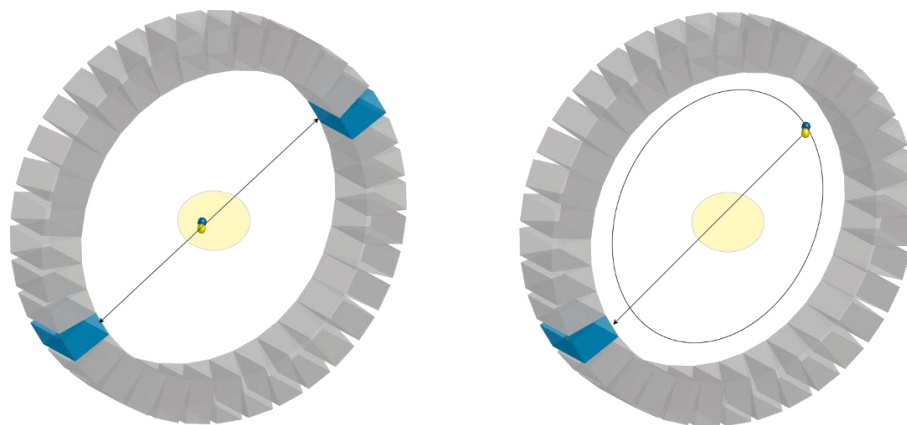


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Emissions- und Transmissionsmessung

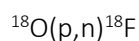
In den heutzutage „state-of-the-art“ PET/CT Hybridgeräten, wird die Schwächungskorrektur aus den Daten der CT-Messung errechnet. Die beim CT eingesetzte (rotierende) Röntgenquelle liefert mit der Röntgenstrahlung und dem gegenüberliegenden Röntgendetektor das ideale System für eine Transmissionsmessung. Die unterschiedlichen Energiebereiche von Röntgen- und Gammastrahlung werden rechnerisch korrigiert. Durch dieses Verfahren spart man in der Praxis enorm viel Zeit und Aufwand im Messprotokoll.

### 1.1.2 Radionuklide für die PET

Bei der Wahl eines geeigneten Radionuklids müssen verschiedene Faktoren beachtet werden, von denen einige in Tabelle 2 aufgelistet sind. Ein sehr wichtiger Faktor ist hierbei die Halbwertszeit. Sie sollte dem biologischen Prozess, der abgebildet werden soll, angepasst sein. Beispielsweise eignet sich  $^{15}\text{O}$  mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von 2 min sehr gut als Perfusionstracer, der den Blutfluss und die Perfusion in den Organen sehr gut abbilden kann. Soll jedoch beispielsweise die langsame Anreicherung eines Antikörpers in einem Zielgewebe abgebildet werden, so ist ein Radionuklid mit einer längeren Halbwertszeit wie das  $^{90}\text{Nb}$ , dessen Halbwertszeit bei 14 h liegt, vonnöten. So wird gewährleistet, dass der langsame Prozess der Antikörperanreicherung über einen Zeitraum von Stunden bis hin zu Tagen abgebildet werden kann. Als Perfusionstracer hingegen wäre  $^{90}\text{Nb}$  weniger geeignet, da bedingt durch die lange Halbwertszeit die Strahlenbelastung für den Patienten enorm steigen würde.

Die Verfügbarkeit des Nuklids, welche in direktem Zusammenhang mit der Produktionsart steht, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen Zyklotron-produzierten und Generator-produzierten Radionukliden.

An einem Zyklotron wird das gewünschte Radionuklid durch Beschuss eines Targets mit geladenen Teilchen (Projektilen) erzeugt. Die Projektile sind in der Regel Protonen oder Deuteronen, welche auf einer spiralförmigen Bahn in einem Magnetfeld beschleunigt werden. In dem Target findet eine Kernreaktion statt, bei der das gewünschte Radionuklid gebildet wird. Ein prominentes Beispiel für diesen Prozess ist die Herstellung des  $^{18}\text{F}$ . Dabei wird ein Wassertarget, das mit  $^{18}\text{O}$  angereichert ist, eingesetzt. Es findet folgende Kernreaktion statt:



Dazu zwingend erforderlich ist der Besitz eines in Anschaffung und Unterhaltung sehr kostenintensiven Zyklotrons, oder zumindest die Ansässigkeit in seinem näheren Umfeld. Der Transport von

Radionukliden wie dem  $^{18}\text{F}$  ist durchaus üblich, die Halbwertszeit von 110 min schließt sehr weite Entfernungen jedoch aus.

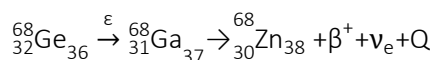
Eine Alternative zu Zyklotron-produzierten Radionukliden stellen Nuklide dar, die über einen Radionuklidgenerator zugänglich sind. Hierbei wird kein Beschuss mit einem Projektil benötigt, um das gewünschte Radionuklid zu erhalten. Vielmehr bedient man sich den Prinzipien von transienten und säkularen radioaktiven Gleichgewichten, bei denen ein langlebiges Mutternuklid sich in ein kurzlebigeres Tochternuklid umwandelt. Im Allgemeinen ist die Halbwertszeit des Tochternuklids länger als die der Mutter, weil der Tochterkern sich in einem niedrigeren/stabileren Zustand befindet. In Einzelfällen zeigen die Tochternuklide eine längere Halbwertszeit, meist aufgrund von Verletzungen von Auswahlregeln im Zerfallsprozess. Durch Separation der Tochter von der Mutter, welche festphasenfixiert ist, gelingt es bei Radionuklidgeneratoren auf elegante Weise, das gewünschte Radionuklid (Tochter) zu erhalten. Das prominenteste generatorproduzierte PET-Nuklid ist  $^{68}\text{Ga}$ , das im folgenden Abschnitt detaillierter beschrieben wird.

Table 2: Physikalische Eigenschaften einiger PET-Nuklide<sup>14,17-24</sup>

Radionuklid	$t_{1/2}$	Umwandlungsart (%)	Produktion Bsp. Route	$E_{\beta^+, \text{max}}$ (MeV)
$^{11}\text{C}$	20,36 min	$\beta^+$ (100)	Zyklotron $^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$	0,960
$^{13}\text{N}$	9,97 min	$\beta^+$ (100)	Zyklotron $^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N}$	1,190
$^{15}\text{O}$	2,037 min	$\beta^+$ (100)	Zyklotron $^{15}\text{N}(p, n)^{15}\text{O}$	1,720
$^{18}\text{F}$	109,6 min	$\beta^+$ (97) $\varepsilon$ (3)	Zyklotron $^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$	0,635
$^{44}\text{Sc}$	3,927 h	$\beta^+$ (94) $\varepsilon$ (6)	$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ - Generator	1,47
$^{64}\text{Cu}$	12,701 h	$\beta^+$ (17,8) $\beta^-$ (38,4) $\varepsilon$ (43,8)	Zyklotron $^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$	0,578
$^{68}\text{Ga}$	67,71 min	$\beta^+$ (89) $\varepsilon$ (11)	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ - Generator	1,899
$^{90}\text{Nb}$	14,6 h	$\beta^+$ (53) $\varepsilon$ (47)	Zyklotron $^{90}\text{Zr}(p, n)^{90}\text{Nb}$	1,500

### 1.1.3 Radiochemie des Galliums-68

$^{68}\text{Ga}$  ist das Tochternuklid von  $^{68}\text{Ge}$  und zerfällt weiter in das stabile  $^{68}\text{Zn}$ , entsprechend der Zerfallsgleichung:



In Abbildung 5 ist dieser Prozess auf der Karlsruher Nuklidkarte gezeigt.

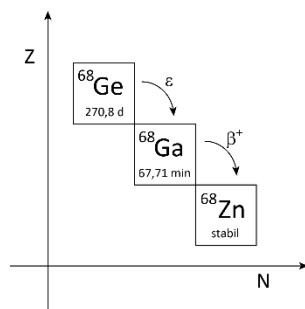


Abbildung 5: Ausschnitt aus der Karlsruher Nuklidkarte

Das  $^{68}\text{Ga}$  wird über einen Radionuklidgenerator gewonnen, kann jedoch auch am Zyklotron produziert werden, was allerdings deutlich aufwändiger und kostenintensiver ist.

Bekannt sind die  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren schon seit den 1960er Jahren<sup>25,26</sup>. Zu dieser Zeit sprachen Gleason *et al.* von der „Positronen-Kuh“<sup>25</sup> bzw. Greene *et al.* von der „verbesserten Positronen-Kuh“<sup>26</sup>, weil man das Gallium „abmelken“ könne, und es stets nachgebildet werde, wie die Milch bei einer Kuh.

Die Grundlage für Radionuklidgeneratoren wie den  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator bildet das Radiochemische Gleichgewicht. Zerfällt ein Mutternuklid (M) in ein Tochternuklid (T), ergibt sich die Anzahl der Atome der Tochter ( $N_T$ ) durch folgende Gleichung:

$$\frac{dN_T}{dt} = \lambda_M N_M - \lambda_T N_T,$$

wobei  $\lambda$  die Zerfallskonstante ist.

Die Lösung dieser Differentialgleichung ergibt für den Zeitpunkt  $t$

$$N_T = N_M^0 \frac{\lambda_M}{\lambda_T - \lambda_M} (e^{-\lambda_M t} - e^{-\lambda_T t}).$$

Man unterscheidet zwischen dem transienten Gleichgewicht (von lat. *transire*: Vorübergehen) und dem säkularen Gleichgewicht (von lat. *saeculum*: Jahrhundert). Um diese Unterscheidung vornehmen zu können, setzt man die Halbwertszeiten bzw. die Zerfallskonstanten von Mutter und Tochter ins Verhältnis. Bei

$$T_{1/2}(M) \geq 10 T_{1/2}(T)$$

spricht man von einem transienten Gleichgewicht und bei

$$T_{1/2}(M) \gg T_{1/2}(T)$$

spricht man von einem säkularen Gleichgewicht. Im Falle des  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators, bei dem das Verhältnis der Halbwertszeiten etwa 5700 beträgt, handelt es sich folglich um ein säkulares

Gleichgewicht. In diesem Fall nimmt man an, dass die Anzahl der Atome der Mutter ( $N_M$ ) konstant ist, bzw. dass der Zerfall des Mutternuklids vernachlässigbar ist. Es gilt

$$\frac{\lambda_M}{\lambda_T - \lambda_M} \approx \frac{\lambda_M}{\lambda_T}$$

und für große  $t$  gilt ebenfalls

$$e^{-\lambda_M t} - e^{-\lambda_T t} \approx e^{-\lambda_M t}.$$

Nach einer genügen langen Wartezeit erreicht folglich das Tochternuklid die Aktivität des Mutternuklids (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7). Mathematisch ausgedrückt ergibt sich Folgendes:

$$N_T = N_{M,0} \frac{\lambda_M}{\lambda_T} \Rightarrow \frac{N_T}{N_M} = \frac{\lambda_M}{\lambda_T} = \frac{t_{1/2}(T)}{t_{1/2}(M)} \Rightarrow A_M = A_T$$

Eine graphische Auftragung von den Aktivitäten gegen die Zeit ist in Abbildung 6 dargestellt.

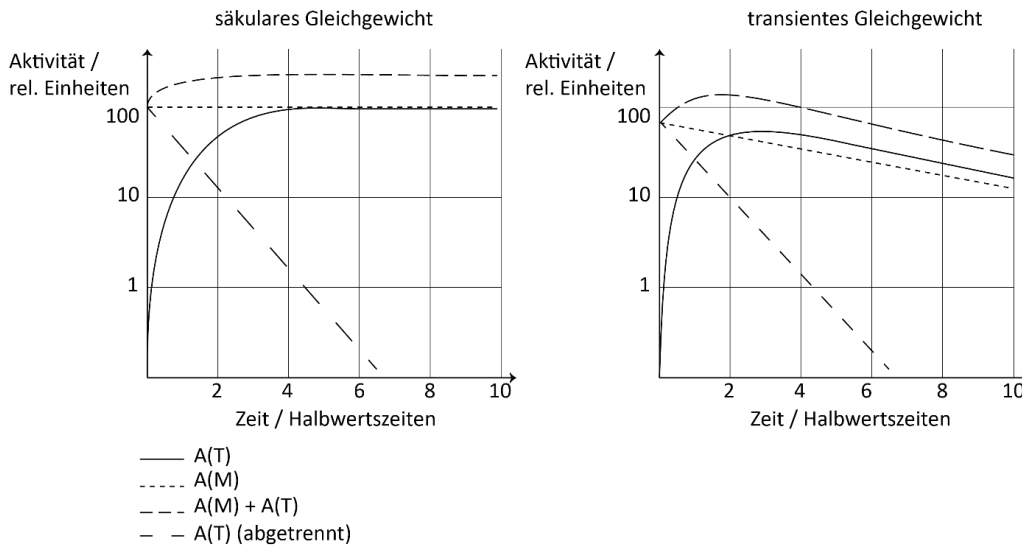


Abbildung 6: Radiochemische Gleichgewichte

Der Zustand des Gleichgewichts ist erreicht, wenn die Aktivitäten von Mutter und Tochter parallel verlaufen. Eine ideale Ausbeute an Tochternuklid ist nach ca. 3-4 Halbwertszeiten erreicht. In Abbildung 7 ist gezeigt, wie sich  $^{68}\text{Ga}$  nach den einzelnen Elutionen wieder anreichert.

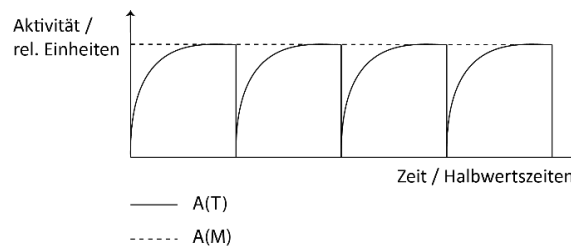


Abbildung 7: Anwachsen der Aktivität nach Elution

Die Abstände zwischen den Elutionsvorgängen sind durch die Bildungsrate und den Zerfall der Tochter vorgegeben. Nach etwa 3-4 Halbwertszeiten der Tochter ist ein für die Elution optimales Verhältnis zwischen Bildung und Zerfall erreicht (vgl. Abbildung 7). Eluiert man den Generator früher, so erhält

man weniger Aktivität. Eluiert man später, so ist die Verunreinigung durch das entstehende  $^{68}\text{Zn}$  „unnötig“ groß. Der  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator kann folglich mehrmals täglich eluiert werden.

Beim  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator ist das Mutternuklid  $^{68}\text{Ge}$  auf einer Matrix festphasenfixiert, die i.d.R. aus  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SnO}$  oder Polymeren besteht<sup>27</sup>. Zuvor wird das  $^{68}\text{Ge}$  über eine (p,2n)-Reaktion aus  $^{69}\text{Ga}$  gewonnen. Das festphasenfixierte Germanium wandelt sich über Elektroneneinfang mit einer Halbwertszeit von 270,95 d in  $^{68}\text{Ga}$  um. Dieses kann selektiv von seinem Mutternuklid abgetrennt werden, indem der Generator, abhängig von Hersteller und Säulenmaterial mit 0,05 N -0,1 N HCl gespült wird<sup>17</sup>. Dadurch verbleibt das Germanium auf der Matrix und das Gallium wird heruntergewaschen<sup>28</sup>.

Man erhält salzsaures  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  in einem Volumen von 5-10 mL, in dem jedoch neben  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  auch Verunreinigungen vorhanden sind. Hier ist vor allem das dreiwertige Eisen zu nennen, welches aus der HCl-Lösung (Eluent) stammt, und  $^{68}\text{Zn}$ , das stabile Tochternuklid des  $^{68}\text{Ga}$ . Es können auch Verunreinigungen durch die Generatormatrix auftreten, und es kommt immer zu einem geringen Durchbruch des Mutternuklids, welcher allerdings in der Regel unter 5 ‰ liegt<sup>28</sup>.

Die für die Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}$  verwendete Stoffmenge des Nuklids ist mit wenigen nmol-pmol sehr klein. Daher ist der Einfluss von Verunreinigungen auf die Markierungsreaktion besonders groß. Um die Markierungsausbeute und -reinheit zu optimieren, wird daher das Generatoreluat gereinigt. Dies kann sowohl über Fraktionierung, als auch über kationische oder anionische Postprocessings geschehen<sup>29</sup>. In dieser Arbeit wurde nur das kationische Aceton-Postprocessing angewendet (siehe Abbildung 8)

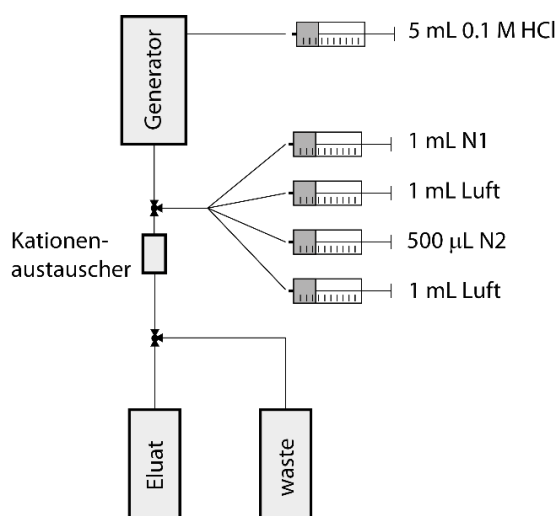


Abbildung 8: Elutionsschema eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators N1 = 80 % Aceton mit 0,15 M HCl; N2 = 97,6 % Aceton mit 0,05 M HCl

Dabei wird das Generatoreluat über einen Kationenaustauscher geführt. Auf diese Weise wird zum einen das relativ große Volumen verringert, und zum anderen können Fremdionen vom Gallium abgetrennt werden. Auf der Austauschermatrix werden alle in der Lösung enthaltenen Metallkationen fixiert. Im Anschluss daran wird mit einer Lösung aus 80 % Aceton mit 0,15 M HCl (N1) gewaschen. Dabei werden alle Fremdionen heruntergewaschen und nur das  $^{68}\text{Ga}$  bleibt auf dem Harz fixiert. Das  $^{68}\text{Ga}$  wird dann mit einer Lösung aus 97,6 % Aceton und 0,05 M HCl (N2) eluiert. So erhält man  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ -Lösung, welche sofort zur Markierung verwendet werden kann<sup>28</sup>.

### 1.1.4 Chelatoren für Gallium-68

Gallium zählt als Element aus der vierten Periode und 13. Gruppe im Periodensystem zu den Metallen. Seine häufigste Oxidationsstufe ist +III und es ist in dieser Form nach der Definition nach Pearson eine harte Lewis-Säure. Das macht es zu einem oxophilen Ion, das in Komplexen die bevorzugte Koordinationszahl 6 hat und daher oktaedrische Komplexe bildet<sup>30-32</sup>. Um metallische Radionuklide an Targetvektoren, Polymere oder ähnliches anzubinden, werden, anders als bei nicht-metallischen Nukliden, komplexbildende Chelatoren benötigt. Diese müssen eine funktionelle Gruppe tragen, mit der sie an den Targetingvektor binden können, und sie benötigen eine ausreichende Anzahl an Elektronenpaardonatoren, damit eine erfolgreiche und stabile Komplexierung des Radiometalls gewährleistet ist. Einen Chelator, der beide dieser Eigenschaften erfüllt, nennt man BFC: Bifunktionaler Chelator.

Bei der Wahl des passenden Chelators muss zum einen die Komplexbildungskonstante (kinetische Stabilität) berücksichtigt werden. Diese sollte so groß wie möglich sein, damit die Komplexierung schnell und vollständig abläuft. Ebenso wichtig ist es, dass der gebildete Komplex so stabil ist, dass das Gallium bei einer *in vivo*-Anwendung nicht freigesetzt und durch ein anderes Metallion ersetzt wird (thermodynamische Stabilität). Vor allem das  $\text{Fe}^{3+}$ , das im Körper ubiquitär vorhanden ist, stellt eine Konkurrenz zum  $\text{Ga}^{3+}$  dar, da beide einen sehr ähnlichen Ionenradius ( $r(\text{Ga}^{3+}) = 62 \text{ pm}$ , ( $\text{Fe}^{3+}) = 65 \text{ pm}$ ) haben. Die Ga-Chelator-Komplexe sollten also so stabil sein, dass das  $\text{Ga}^{3+}$  nicht von  $\text{Fe}^{3+}$  verdrängt oder von eisenbindenden Proteinen wie dem Transferrin herausgelöst werden kann (Transchelatierung).

BFCs können offenkettig oder makrozyklisch sein. Offenkettige Chelatoren haben den Vorteil einer schnellen Komplexierungschemie. Sie sind oft schon bei milden Temperaturen in der Lage, ein Metallion effizient und in kurzer Zeit zu binden, weisen aber in der Regel geringere Komplexstabilitäten auf, als makrozyklische Chelatoren<sup>33,34</sup>. Beispiele für offenkettige BFCs sind Ethylendiamin (en), Zitronensäure, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Desferoxamin (DFO), welche in Abbildung 9 gezeigt sind.

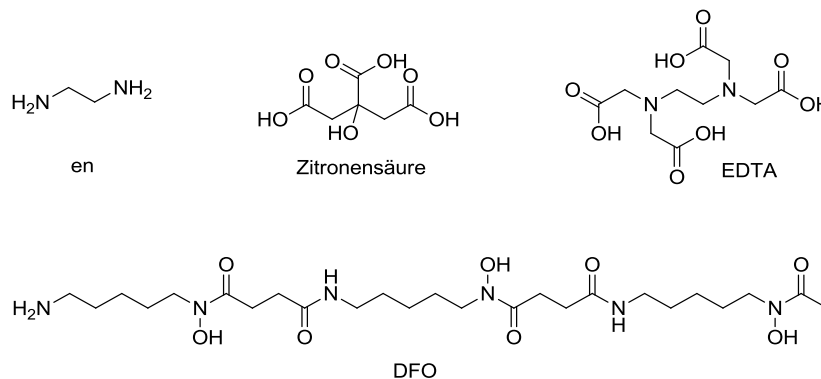


Abbildung 9: Einige offenkettige Chelatoren

Makrozyklische Chelatoren haben den Vorteil der größeren thermodynamischen Komplexstabilität, erfordern jedoch auch z.T. harschere Bedingungen zur Komplexbildung. Beispiele für solche Chelatoren sind 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan- $N,N',N'',N'''$ -tetraessigsäure (DOTA), 1,4,7-Triazacyclononan- $N,N',N''$ -triessigsäure (NOTA), sein bifunktionelles Derivat 1,4,7-Triazacyclononane- $N$ -glutarsäure- $N',N''$ -diessigsäure (NODA-GA), Triazacyclononanphosphinsäure (TRAP), 6-Amino-6-methylperhydro-1,4-diazepinetetraessigsäure (AAZTA), und 6-Amino-1,4-diazepineessigsäure (DATA) die in Abbildung 10 dargestellt sind.

DOTA ist von den hier gezeigten Chelatoren der Bekannteste und wird zur Komplexierung verschiedenster Metallionen verwendet. In der Regel wird eine der vier Essigsäuregruppen zur Anbindung an einen Targetvektor benötigt. Die übrigen sieben Elektronenpaardonatoren stehen für die Komplexbildung zur Verfügung. Dadurch ist DOTA sehr gut geeignet, zwei- und dreiwertige Metallionen zu binden, welche Koordinationszahlen von bis zu sieben erfordern (wie z.B.  $\text{Lu}^{3+}$ ). Im DOTA zeigt das  $\text{Ga}^{3+}$  eine verzerrt oktaedrische  $\text{N}_4\text{O}_2$ -Koordination<sup>32,35,36</sup>.

Ursprünglich wurde dieser Chelator für Gadolinium verwendet, das in oktaedrischer Umgebung einen Ionenradius von 0,94 Å hat<sup>37</sup> und bei MRT-Messungen als Kontrastmittel verwendet wird (→ Gadotersäure).  $\text{Ga}^{3+}$  hat einen Ionenradius von nur 0,76 Å<sup>38</sup>, weshalb es für den zwölfgliedrigen Makrozyklus DOTA etwas zu klein ist. Die Bildung des Ga-DOTA-Komplexes ist demnach erschwert, weshalb bei der Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}$  i.d.R. Temperaturen von über 90 °C verwendet werden. Die thermodynamische Stabilität dieser Komplexe ist jedoch so gut, dass DOTA aus der Galliumchemie nicht mehr wegzudenken ist ( $K = 26,05$ )<sup>36</sup>.

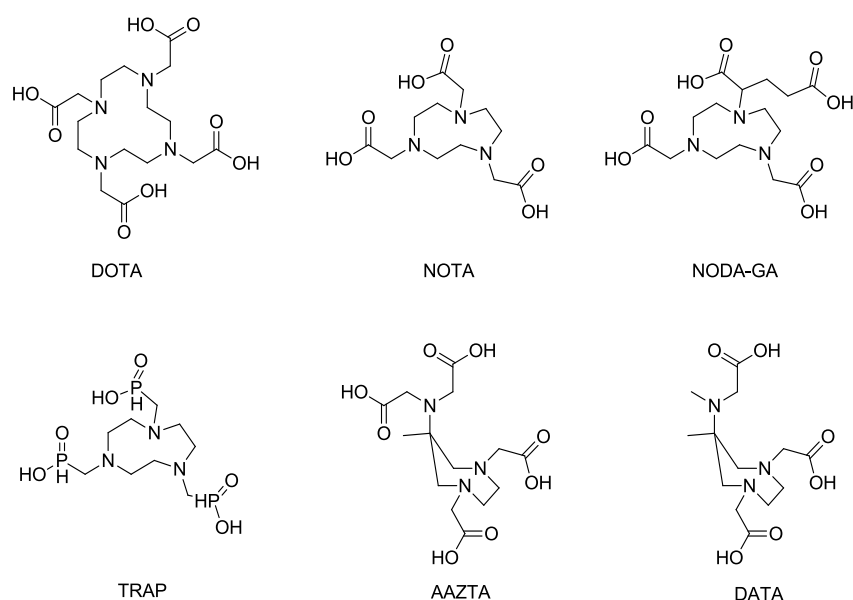


Abbildung 10: Einige makrozyklische Chelatoren

NOTA hat nur sechs Koordinationszentren, welche das Gallium ebenfalls verzerrt oktaedrisch komplexieren. Es resultiert eine  $\text{N}_3\text{O}_3$ -Koordination<sup>32</sup>. Die Komplexbildungseigenschaften für  $^{68}\text{Ga}$  sind hervorragend<sup>31,32,39-41</sup>, jedoch würde die Stabilität des gebildeten Komplexes deutlich abnehmen, wenn eine der koordinierenden Säuregruppen zum Anbinden an einen Targetingvektor verwendet würde. Daher wurde ein bifunktionelles Derivat des NOTA entwickelt, bei dem eine Glutarsäurefunktion eingeführt wurde. NODA-GA ist, genau wie NOTA in der Lage, das  $\text{Ga}^{3+}$  thermodynamisch und kinetisch stabil ( $K=29,60$ )<sup>42</sup> zu komplexieren und kann über den eingeführten Glutarsäurerest an einen Targetingvektor angebunden werden. Da das NOTA bzw. NODA-GA als Grundgerüst einen neungliedrigen Makrozyklus besitzen, sind diese beiden Chelatoren für das kleine  $\text{Ga}^{3+}$ -Ion, im Gegensatz zum zwölfgliedrigen DOTA besser geeignet. Dies zeigt sich neben der hervorragenden Stabilität der Komplexe (s.o.) auch in den Reaktionsbedingungen, die für die Komplexbildung erforderlich sind. Diese sind für NOTA und seine Derivate mit unter 50 °C deutlich milder als für DOTA-Derivate<sup>39,43</sup>. NOTA-Derivate eignen sich folglich mitunter besser zur Radiomarkierung von empfindlichen Substanzen. Ein Nachteil von NOTA ist eine Limitierung auf kleine Radioisotope wie die

des Ga, Sc und Cu, während wichtige therapeutische Radionuklide wie  $^{177}\text{Lu}$  oder  $^{90}\text{Y}$  nicht von NOTA komplexiert werden.

Werden noch mildere Markierungsbedingungen benötigt, so können AAZTA bzw. seine DATA-Derivate verwendet werden. Die ungewöhnliche Struktur mit zwei Stickstoffatomen im Diazepinring und einem exozyklischen Stickstoffatom vereint die Vorteile eines offenkettigen Chelators mit denen eines makrozyklischen. Die Bildung des Metall-Chelator-Komplexes ist aufgrund des flexiblen Gerüsts schon bei sehr milden (physiologischen) Temperaturen möglich<sup>44,45</sup>.

## 1.2 Ligationschemie

Um Targetingvektoren, Polymere, Nanopartikel oder Ähnliches für PET zugänglich zu machen, ist es wichtig, verlässliche und reproduzierbare Anbindungsmethoden zur Verfügung zu haben. Für die Radiometalle sind die bereits erwähnten BFCs das Mittel der Wahl, wobei die Art und Weise, wie der Chelator angebunden wird variieren kann.

### 1.2.1 Amidbindungen

Gerade wenn es um medizinische Fragestellungen geht, ist die Amidbindung interessant, da sie eine hohe *in vivo*-Stabilität aufweist. Sie wird aus einer Carbonsäure und einem Amin im neutralen bis basischen Milieu gebildet und auch als „Peptidbindung“ bezeichnet. I.d.R. verwendet man aufgrund der geringen Elektrophilie des Kohlenstoffs nicht die reine Carbonsäure, sondern einen (*in situ* hergestellten) Aktivester um den Carbonylkohlenstoff zu aktivieren. Häufig verwendete Aktivester sind beispielsweise NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) oder Pentafluorophenylester. Eine Besonderheit bei der Verwendung von Aktivestern ist deren Hydrolyseempfindlichkeit. NHS-Ester haben beispielsweise bei physiologischen pH-Werten (7,0-7,5) im wässrigen Medium eine Halbwertszeit von nur einigen Stunden, die mit steigendem pH-Wert weiter abnimmt. Die Reaktivität des Amins hingegen nimmt mit steigendem pH-Wert zu<sup>46,47</sup>. Die Hydrolyse des Esters führt zu freier Carbonsäure und *N*-Hydroxysuccinimid. Da die Carbonsäure jetzt nicht mehr aktiviert ist, kann es nicht mehr zur Bildung der Amidbindung kommen und die Ausbeute wird deutlich geschmälert.

Eine sehr beliebte Alternative zu den NHS-Estern ist die *in situ*-Bildung des Aktivesters aus der Carbonsäure und entsprechenden Kopplungsreagenzien, wie z.B. 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) oder sein Aza-Derivat *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU). Diese Kopplungsreagenzien reagieren unter Einfluss einer Base in aprotischen Lösungsmitteln mit der Carbonsäure. Es bildet sich einen intermediärer Aktivester, welcher mit dem Amin das Amid bilden kann. Der Mechanismus dieser Reaktion ist am Beispiel des HATU in Abbildung 11 dargestellt.

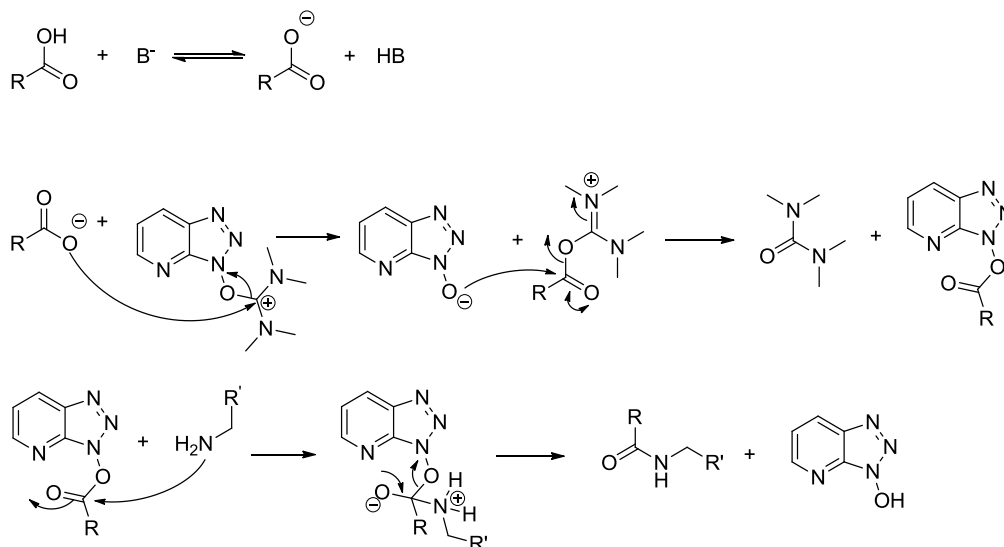


Abbildung 11: Mechanismus für die Knüpfung einer Amidbindung am Beispiel von HATU als Kopplungsreagenz

Die Reaktion ist hier am Beispiel der Uronium-Spezies des HATU (*O*-Form) gezeigt, sie kann aber ebenso mit der Guanidinium-Spezies (*N*-Form) stattfinden<sup>48</sup> (vgl. Abbildung 12).

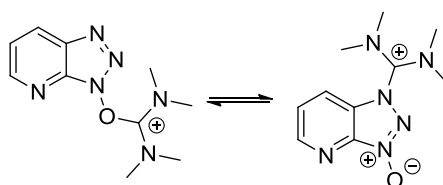


Abbildung 12: Gleichgewicht zwischen der Uronium-Spezies und der Guanidinium-Spezies des HATU

Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist das Gegenion des Uronium-Salzes nicht gezeigt, da es keinen Einfluss auf die Reaktion hat<sup>49</sup>. In einem vorgelagerten Schritt wird die Carbonsäure deprotoniert. Anschließend greift der negativ geladene Sauerstoff nukleophil am HATU an, wodurch sich der Aktivester und ein Harnstoffderivat bilden. Durch nukleophilen Angriff des Amins am Carbonylkohlenstoff des Aktivesters kommt es zur Bildung des Amids.

Eine ungewünschte Nebenreaktion bei dieser Art von Kopplungen ist die Reaktion des Uroniums mit dem Amin (vgl. Abbildung 13). Dadurch stehen sowohl Amin als auch HATU nicht weiter für die Bildung einer Amidbindung zur Verfügung.

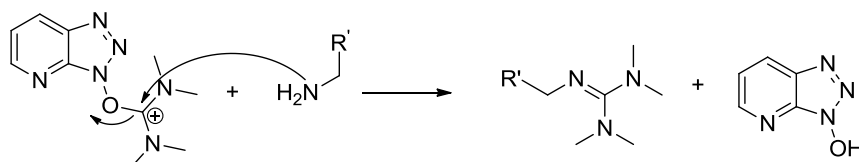


Abbildung 13: Nebenreaktion bei HATU-Kopplungen

Diese Nebenreaktion kann durch eine angepasste Reaktionsführung unterdrückt werden.

### 1.2.2 Click-Chemie

Eine weitere bioorthogonale Ligationsmöglichkeit ist die Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC von engl. *Cu-catalyzed alkyne azide cycloaddition*) nach Huisgen. Es handelt sich hierbei um eine [3+2]-Cycloaddition bzw. eine 1,3-dipolare Cycloaddition, für die Kolb, Finn und Sharpless 2001 den Begriff der „Click-Reaktion“ prägten. Als Click-Reaktionen werden im Allgemeinen Reaktionen bezeichnet, die schnell, selektiv und mit guten Ausbeuten ablaufen und immer eine gute thermodynamische Triebkraft haben<sup>50,51</sup>.

1,3-dipolare Cycloadditionen von Alkinen und Aziden werden oftmals unter Metallkatalyse durchgeführt, wobei der gängigste Katalysator Cu(I) ist. Da Kupfer zytotoxische Eigenschaften hat<sup>52</sup>, bieten Kupfer-freie Click-Reaktionen eine elegante Alternative. Dazu zählen neben der Tetrazin-Ligation (*retro-Diels-Alder*) unter anderem auch die „*strain promoted alkyne azide cycloaddition*“ (SPAAC), welche in dieser Arbeit eine zentrale Rolle spielt.

Zum Einsatz kommen hierbei gespannte cyclische Alkine. Die Ringspannung steigert die Reaktivität des Alkins, weshalb die Verwendung eines Katalysators nicht mehr erforderlich ist<sup>53,54</sup>. Damit die Alkine trotz Spannung ausreichend stabil sind und keine energetisch günstigere Konformation einnehmen können, verwendet man i.d.R. Strukturen wie das in Abbildung 14 dargestellte Dibenzylcyclooctin-Amin (DBCO-Amin) (in der Literatur auch manchmal als Azadibenzocyclooctin ADIBO zu finden), das 2010 von Kuzmin *et al.* beschrieben wurde<sup>55</sup>. Seine Struktur leitet sich von Dibenzocyclooctin ab, welches 1969 von Steitz *et al.* publiziert wurde<sup>56</sup>, und welches wiederum eine Weiterentwicklung des einfachen Cyclooctins (COT) darstellt. Unmodifiziertes COT ist das kleinste stabile Cycloalkin, welches, wie Wittig und Krebs 1961 beschrieben, „explosionsartig“ mit Phenylazid reagiert<sup>57,58</sup>.

Daran anknüpfend folgte eine Vielzahl an Derivatisierungen am einfachen COT. Das untenstehende DBCO beispielsweise enthält zwei aromatische Einheiten, die formal mit der Dreifachbindung konjugiert sind. Diese Benzoleinheiten tragen entscheidend zur Stabilität des COT bei, da sie verhindern, dass sich das sehr gespannte *cis*-Isomer in die günstigere *trans*-Konformation umwandelt<sup>56</sup>.

Es gibt auch Derivate des COT, bei denen in Nachbarschaft zur Acetyleneinheit elektronenziehende Gruppen (EWG von engl. *electron withdrawing group*) eingeführt werden. Dies geschieht vor allem, um die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Click-Reaktion zu steigern. Oft eingesetzte EWGs sind Halogene, von denen aufgrund seiner Größe vor allem das Fluor zum Einsatz kommt<sup>50,53</sup>.

Um die Hydrophilie des lipophilen DBCOs zu erhöhen, werden auch Ether-, Alkohol- oder Aminofunktion eingeführt, was zwei Vorteile mit sich bringt. Zum einen wird dadurch die vergleichsweise geringe Reaktivität während der Click-Reaktion erhöht, welche für unsubstituiertes DBCO bei  $0,05 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  liegt<sup>55</sup>. Zum anderen wird durch das Einführen eines Heteroatoms die weitere Derivatisierung deutlich vereinfacht.

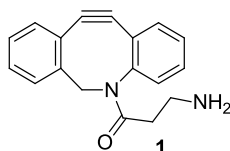


Abbildung 14: DBCO-Amin (**1**)

Das hier gezeigte DBCO-Derivat (**1**) mit der kurzen Alkylkette und dem Amin als terminale Funktion war Grundlage vieler Reaktionen dieser Arbeit. Als Dipol diente bei den durchgeführten Click-Reaktionen

immer eine Azid-Komponente. Ein allgemeines Reaktionsschema der SPAAC ist in Abbildung 15 gezeigt. Die Reaktionsbedingungen sind mit physiologischen Reaktionsmedien und Temperaturen sehr mild<sup>53,59</sup>.

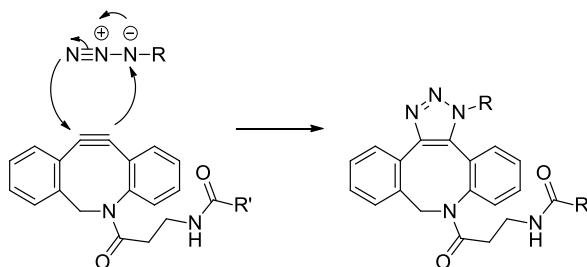


Abbildung 15: Allgemeiner Reaktionsmechanismus einer Kupfer-freien Click-Reaktion

Um die Aktivierungsenergie für die Clickreaktion herabzusetzen, wird bei CuAAC der Metallkatalysator verwendet. Das Cu(I)-Kation bildet mit dem Acetylen zunächst einen  $\pi$ -Komplex, woraufhin sich ein  $\sigma$ -gebundenes Kupferacetylid ausbildet. Durch die Koordination zwischen dem Metall und dem Alkin wird der pKs-Wert des Alkinprotons von ca. 25 auf ca. 10 gesenkt<sup>60</sup> und die Deprotonierung des Alkins wird ermöglicht. Es bildet sich ein weiterer  $\pi$ -Komplex mit einem zweiten Cu(I). Dies ist der eigentliche katalytisch aktive Komplex. Dieser koordiniert an seine  $\pi$ -Bindung reversibel das Azid, woraufhin sukzessive der Ringschluss stattfindet<sup>61</sup>. Abbildung 16 zeigt diesen Zyklus, wie ihn Worrell *et al.* 2013 beschrieben haben.

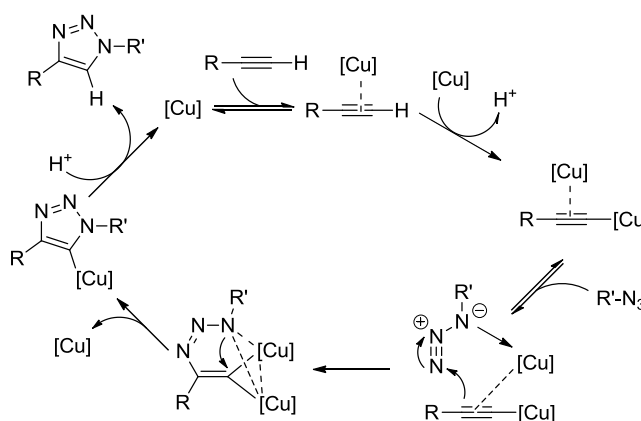


Abbildung 16: Mechanismus der CuAAC<sup>61,62</sup>

Der Mechanismus für die SPAAC verläuft deutlich anders. Da kein Metallkatalysator verwendet wird, muss die Aktivierungsenergie auf andere Art und Weise herabgesetzt werden. Ess *et al.* beschrieben 2008 die Bildung des bei der SPAAC auftretenden Übergangszustandes über die Verzerrung und Deformation des 1,3-Dipols und des Dipolarophils am Beispiel von Acetylen/Phenylazid und COT/Phenylazid<sup>54,63,64</sup>. Die Aktivierungsenergie ( $E_{Akt.}$ ) für die 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Acetylen und Phenylazid liegt bei 16,2 kcal/mol, bei der analogen Reaktion von COT mit Phenylazid hingegen nur bei 8,0 kcal/mol<sup>54</sup>. Sie setzt sich aus der Deformationsenergie ( $E_{Deform.}$ ), die aufgewandt werden muss, um die Bindungswinkel von Azid und Alkin zu verändern, und den Wechselwirkungsenergien ( $E_{Ww}$ ), die von der Deformationsenergie abgezogen werden, zusammen. Abbildung 17 veranschaulicht diesen Sachverhalt. Je größer die aufzuwendende Deformationsenergie für beide Komponenten ist, desto größer wird die Aktivierungsenergie für die Reaktion. Die Deformationsenergien liegen bei der SPAAC für Acetylen bzw. COT bei 6,0 kcal/mol bzw. 1,4 kcal/mol. Für die Deformation des Phenylazids müssen bei der Reaktion mit Acetylen 18,1 kcal/mol aufgewendet werden, bei der Reaktion mit COT hingegen nur 13,6 kcal/mol<sup>54</sup>.

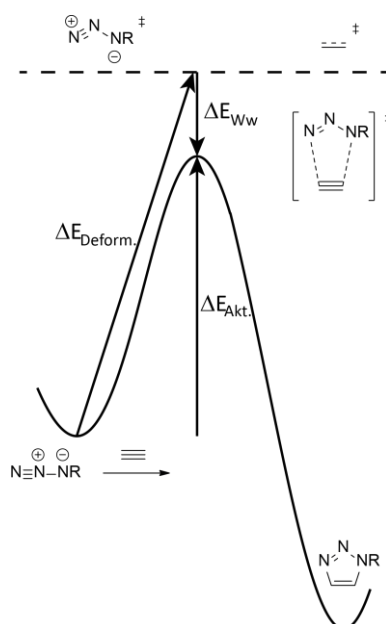


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen Aktivierungsenergie ( $E_{Akt.}$ ), Deformationsenergie ( $E_{Deform.}$ ) und Wechselwirkungsenergie ( $E_{WW}$ ) bei der SPAAC<sup>54</sup>

Beim Vergleich der beiden Übergangszustände (Acetylen/Phenylazid und COT/Phenylazid) bezüglich der Bindungslängen und -winkel und der Reaktionsgeschwindigkeit wurde deutlich, dass das lineare Acetylen langsamer mit dem Phenylazid reagiert, als das COT. Der N-N-N-Winkel des Azids beträgt vor der Clickreaktion  $173^\circ$ . Im Übergangszustand mit Acetylen wird er auf  $138^\circ$  verringert, wohingegen er bei COT nur auf  $143^\circ$  verringert wird, was sich in der kleineren Deformationsenergie ausdrückt. Die N-N- und C-N-Bindungslängen bei dem COT-Phenylazid-Übergangszustand sind etwas größer als bei dem Acetylen-Phenylazid-Übergangszustand. Dies erklärt, wie die SPAAC ohne Verwendung eines Metallkatalysators auskommt.

Clickreaktionen bieten eine elegante Möglichkeit zur Radiomarkierungen, gerade wenn ein sensibles (Bio)molekül markiert werden soll, das sich unter den notwendigen Markierungsbedingungen zersetzen würde. Für die Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}$  von DOTA-basierten Chelatoren werden i.d.R. pH-Werte im sauren Bereich und Temperaturen von über  $90^\circ\text{C}$  verwendet. Wird der Chelator vor der Radiomarkierung an eine clickfähige Struktur, wie das DBCO oder ein Azid, gekoppelt so kann es während der folgenden Radiomarkierung zur Zersetzung des (Bio)moleküls kommen. Wird jedoch zuerst die Radiomarkierung durchgeführt und anschließend der markierte Chelator mittels SPAAC an das sensible Molekül geclickt (pre-radiolabeling-Ansatz, vgl. hierzu auch Kapitel 1.3.1), so wird dieses Problem elegant umgangen.

### 1.3 Nanopartikuläre und polymere Wirkstofftransportsysteme

Krebs ist die weltweit zweithäufigste Todesursache<sup>65</sup>. Die üblichen Behandlungen sind je nach Möglichkeit die operative Entfernung des Tumors, Chemotherapie, Endoradiotherapie oder Bestrahlung. Oftmals findet man auch eine Kombination aus zwei oder mehr Behandlungsmethoden.

Die bei einer Chemotherapie verabreichten Wirkstoffe sind i.d.R. nicht spezifisch was den Wirkort betrifft. Es sind oftmals Zytostatika, die schnell proliferierende Zellen angreifen, wozu die Tumorzellen zählen. Es werden aber auch andere Zellen wie Schleimhaut- oder Haarwurzeln, sowie blutbildende

Zellen im Knochenmark angegriffen, weil sie sich ebenfalls schnell teilen. Daraus resultieren die zum Teil immensen Nebenwirkungen bei der klassischen Chemotherapie.

Es besteht die Möglichkeit, den Wirkstoff in einen Nanopartikel einzubinden, der zum einen die Blutzirkulationszeit erhöht und zum anderen zielgerichtet an bzw. in das tumoröse Gewebe einwandert und den Wirkstoff dort freisetzt. Dadurch verringern sich die Nebenwirkungen immens und der Wirkstoff wird nicht zum Großteil ausgeschieden, bevor er sein Zielgewebe erreicht hat. Das wiederum geht mit einer Steigerung der Effizienz einher. Geringere Dosen und leichter verträgliche Therapien sind die Vorteile bei dieser Herangehensweise.

Um einen Nanopartikel bzw. ein Polymer zielgerichtet an seinen Wirkort zu bringen, kann man sich die Prinzipien des aktiven bzw. des passiven Targetings zunutze machen.

Für das aktive Targeting wird an der Partikeloberfläche ein Targetingvektor angebunden. Dieser soll sicherstellen, dass der Partikel zielgerichtet zu dem entsprechenden Zielorgan wandert. Dieser Vektor kann sowohl eine niedermolekulare Verbindung wie z.B. Folsäure sein, als auch ein Antikörper oder ein Peptid. Dabei wird nicht immer zwingend der Tumor selbst adressiert, sondern z.B. auch Rezeptoren, welche aufgrund der gesteigerten Angiogenese auf den Endothelzellen der Tumor-Vaskulatur überexprimiert sind. So kann ein Nanopartikel bzw. ein Wirkstofftransportsystem in das Tumorendothel gelangen und dort seine Fracht freisetzen, was z.B. zur Anreicherung eines Chemotherapeutikums im Tumor führen kann<sup>66</sup>.

Das passive Targeting beruht auf der pathologischen Veränderung von tumorösem Gewebe. Gesundes Gewebe ist von der Blutbahn durch eine Endothelzellschicht getrennt. Die Endothelzellen sind durch *Tight Junctions* eng miteinander verknüpft, sodass Polymere und Nanopartikel die Endothelschicht nicht passieren können. Niedermolekulare Substanzen können aktiv oder passiv diese Zellbarriere durchqueren und so in das Gewebe eindringen. Dort werden sie durch die Lymphe wieder abgeführt. Aufgrund des enorm schnellen Wachstums von Tumoren weist die Endothelzellschicht Fenestrations auf, durch die Makromoleküle und Nanopartikel ungehindert in das tumoröse Gewebe eindringen können. Aufgrund der verminderten oder ganz fehlenden Lymphe werden sie nicht wieder abgeführt, sodass es zur Akkumulation kommt. Dieses Phänomen wird als EPR-Effekt bezeichnet (von engl. *enhanced permeability and retention*) und wurde 1986 von Matsumura und Maeda beschrieben<sup>67</sup>. In Abbildung 18 ist der EPR-Effekt schematisch dargestellt.

Partikel, die dem EPR-Effekt unterliegen, werden sich nicht in gesundem Gewebe anreichern können, weshalb eine Nanopartikel-basierte Therapie sehr viel schonender für die Patienten ist.

Die Ausprägung des EPR-Effekts ist stark von der Art des Tumors abhängig und kann sogar innerhalb von ein und demselben Tumor variieren. Hierfür können unterschiedliche die Durchblutung des Tumors, verschieden stark ausgeprägte Fenestrations, oder Unterschiede im zellulären oder interstitiellen Flüssigkeitsdruck verantwortlich sein<sup>66,68,69</sup>. Außerdem haben auch die biologischen und physikochemischen Eigenschaften des Polymers/ Nanopartikels einen Einfluss auf den EPR-Effekt. Hier sind z.B. die Ladung, die Größe und die Polarität der Oberfläche zu nennen.

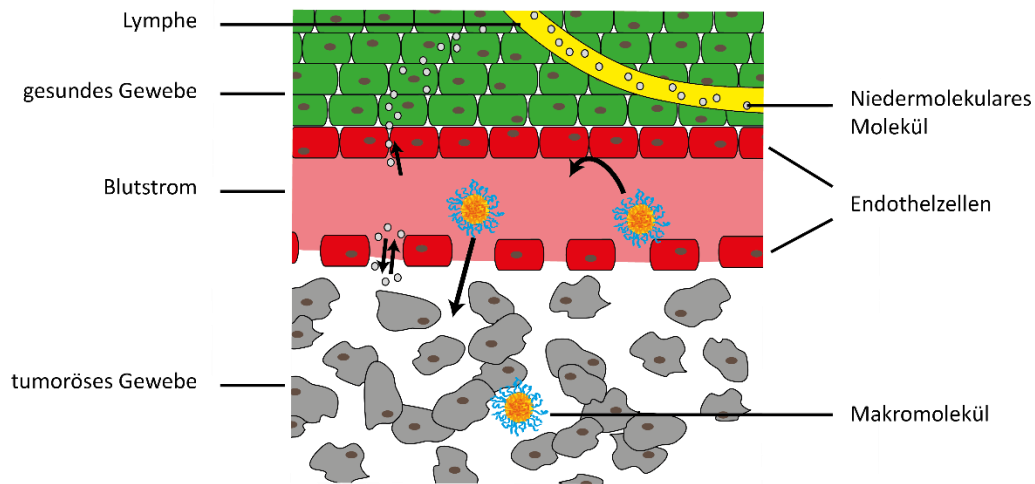


Abbildung 18: Schematische Darstellung des EPR-Effekts

Das passive Targeting ist eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches aktives Tumortargeting. Wenn ein mit Targetingvektor modifizierter Nanopartikel aufgrund des fehlenden EPR-Effekts den Tumor nicht erreichen kann, dann kann der Targetingvektor auch nicht an den Tumorzellen anbinden.

Sobald sich das Wirkstofftransportsystem im Tumorgewebe angereichert hat, soll es seinen Wirkstoff dort freisetzen. Dieser Prozess kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. So gibt es pH-labile Systeme, die im saureren Milieu des Tumors den Wirkstoff entlassen bzw. abspalten sollen, oder entsprechende redoxsensitive Systeme, die im hypoxischen Tumormilieu abspalten.

Wirkstofftransportsysteme können in Zusammensetzung, Geometrie und Architektur sehr vielfältig sein. In Abbildung 19 sind einige mögliche Wirkstofftransportsysteme aufgeführt: Homopolymere, Blockcopolymere, hyperverzweigte Polymere, Liposome, anorganische Kolloide, kernvernetzte und nicht vernetzte Mizellen, und organische Kolloide.

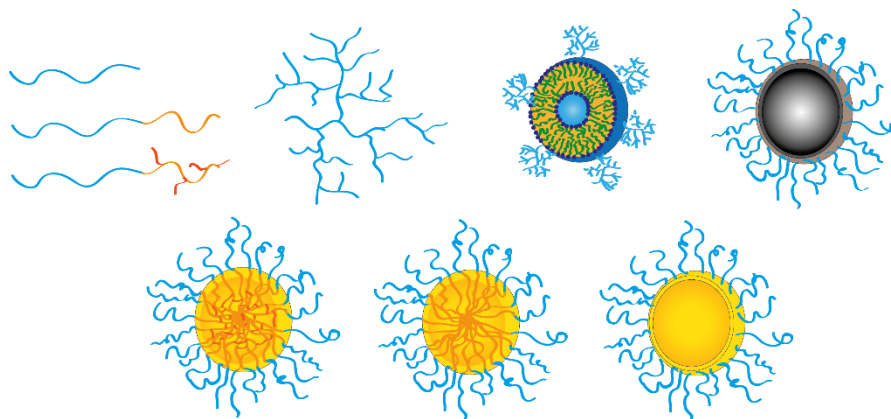


Abbildung 19: Übersicht über einige nanodimensionale Strukturen

Partikel und Polymere, wie sie hier gezeigt sind, werden i.d.R. im Körper durch das Mononukleäre Phagozytensystem (MPS) als Fremdstoffe erkannt und ausgeschieden. Eine entsprechende Funktionalisierung an der Oberfläche bzw. dem Rückgrad solcher Systeme kann nicht nur die Targetingeigenschaften der Partikel bzw. Polymere verbessern, sondern auch dazu führen, dass das MPS das Wirkstofftransportsystem nicht als körperfremden Stoff erkennt. Um diesen sog. *Stealth*-Effekt zu erhalten, wird oftmals eine PEGylierung der Oberfläche von Partikeln vorgenommen. Dadurch wird eine längere Verweildauer im Blut erreicht, sodass die Wahrscheinlichkeit, dass das Polymer/der Partikel das

Zielgewebe erreicht, steigt. Neuere Alternativen zu PEG sind Hydroxyethylstärke (HES) oder Polysarcosin-basierte Polymere, welche 2015 von Huesmann *et al.* mit PEG verglichen wurden<sup>70</sup>.

Die ersten therapeutischen Makromoleküle, für die Ende der 1980er Jahre eine Anreicherung im Tumor berichtet wurde, waren Albumin-bindende *Poly(styrol-co-maleinsäure)*-Derivate<sup>71,72</sup>. Heute befindet sich eine Vielzahl von Polymeren, Nanopartikel, Liposomen usw. in der klinischen Anwendung. Ein prominentes Beispiel für ein Wirkstofftransportsystem, das im Handel erhältlich ist, ist das Medikament Caelyx® (im US-Amerikanischen Raum Doxil®). Es handelt sich hierbei um ein Liposom, welches mit dem DNA-Interkalanz Doxorubicin beladen ist<sup>66,69</sup>. Daneben gibt es auch Antikörper-basierte Nanotherapeutika wie Zevalin oder Nanopartikel-basierte Therapeutika wie Abraxane<sup>66</sup>.

Bei der klassischen Chemotherapie hat sich in den letzten Jahren ein personalisierter Therapieansatz etabliert, welcher immer öfter auch bei nanomedizinischen Anwendungen gewünscht wird. Ein solcher Ansatz erfordert neben der eigentlichen Behandlung nicht nur ein Wissen über genetische Polymorphismen etc. des einzelnen Patienten, sondern auch bildgebende Verfahren zur Vorhersage und Überwachung der Therapie<sup>4,66</sup>. Modifikationen der Nanomaterialien, sowie der Wirkstoffe selbst mit bildgebenden Funktionalitäten wie PET-Nukliden bietet die Möglichkeit, vorherzusagen, wie erfolgreich sich das Nanomedikament am Zielort anreichert bzw. den Wirkstoff freisetzt. Diese Kombination aus Therapie und Diagnose bezeichnet man als Theranostik. Es handelt sich hierbei um eine sehr elegante Methode der personalisierten Medizin, da für die Bildgebung und die Therapie dasselbe Molekül zum Einsatz kommt. Veränderungen in der Biodistribution oder der Pharmakokinetik durch das Verändern des Moleküls werden vermieden.

### 1.3.1 Radioaktiv markierte Polymere und Nanopartikel in der PET

Es gibt eine Vielzahl von radiomarkierten Polymeren und Nanopartikeln, die durch das Anbringen eines Positronemitters für PET zugänglich gemacht wurden. Bei den organischen Radionukliden ist hierbei das <sup>18</sup>F das am häufigsten verwendete Nuklid. Es hat sehr gute physikalischen Eigenschaften (siehe Tabelle 2) und ermöglicht eine zielgerichtete Markierungsschemie über prosthetische Gruppen oder auch direkt.

Bei den metallischen Radionukliden ist <sup>64</sup>Cu das am häufigsten verwendete PET-Nuklid. Seine Halbwertszeit von 12,701 h macht es ideal für Studien zur Bioverteilung von Substanzen mit einer mittelschnellen bis relativ langsamen Pharmakokinetik<sup>22</sup>.

<sup>68</sup>Ga wurde bisher viel seltener für die Radiomarkierung von nanodimensionalen Materialien verwendet. Ein Grund hierfür ist sicherlich die deutlich kürzere Halbwertszeit. Dabei ist es aufgrund seiner enorm guten Verfügbarkeit durch den <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Radionuklidgenerator (vgl. Kapitel 1.1.3) eine charmante Alternative zu <sup>64</sup>Cu.

Im Allgemeinen kann man die Radiomarkierung von makromolekularen und nanopartikelären Substanzen mit Metallen in zwei Herangehensweisen einteilen. Lee *et al.* prägten in diesem Zusammenhang die Begriffe *pre-radiolabeling* und *post-radiolabeling*<sup>73</sup>, welche schematisch in Abbildung 20 dargestellt sind. Von post-radiolabeling spricht man, wenn zuerst ein BFC an das Polymer bzw. den Nanopartikel angebunden wird, und in einem nachgelagerten Schritt die Radiomarkierung des gesamten Konstrukts erfolgt. Vorteilhaft hierbei ist, dass die mitunter recht aufwändige Reinigung zur Entfernung von Kopplungsreagenzien und Nebenprodukten bereits vor der Radiomarkierung stattgefunden hat. Aufgrund der Halbwertszeit, aber auch der Dosis ist es wünschenswert, möglichst viele Arbeitsschritte inaktiv durchzuführen, was beim post-radiolabeling der Fall ist. Die Nachteile bei dieser Herangehensweise sind zum einen eine eventuelle unspezifische Anbindung des <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> an die Oberfläche des Polymers bzw. Nanopartikels. Ein weiterer Nachteil beim post-radiolabeling sind die zum

Teil sehr harschen Markierungsbedingungen. Gerade der häufige verwendete Chelator DOTA erfordert für eine optimale Komplexierung des  $^{68}\text{Ga}$  pH-Werte im Sauren sowie Temperaturen von ca.  $95\text{ }^\circ\text{C}$ <sup>32,36,39</sup>. Viele, gerade biologisch relevante makromolekulare Substanzen sind unter diesen Bedingungen nicht stabil oder verlieren ihre biologische Aktivität. Gerade in solchen Fällen ist das pre-radiolabeling sehr interessant. Hierbei wird zuerst der Chelator radiomarkiert und erst danach erfolgt eine Anbindung an das entsprechende Polymer, Nanopartikel bzw. Biomolekül. Die Herausforderung bei dieser Herangehensweise liegt darin, Ligationschemie zu verwenden, die ein schnelles und effizientes Anbinden des markierten BFC an das nanodimensionale Konstrukt erlaubt. Die Abtrennung von etwaigen Nebenprodukten oder Kopplungsreagenzien ist bei dieser Art der Radiomarkierung optimaler Weise nicht notwendig, da eine Ligationsart gewählt wird, bei der die Reaktionspartner nahezu vollständig umgesetzt werden.

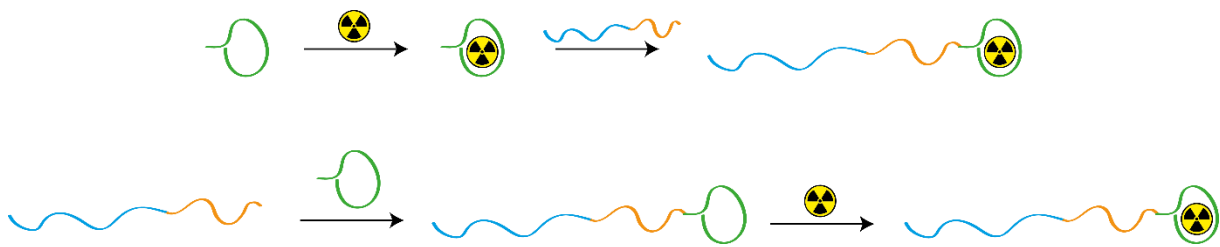


Abbildung 20: Pre- und Postradiolabeling

Es besteht natürlich auch die Möglichkeit einer Radiomarkierung mit metallischen Nukliden ohne die Verwendung von BFCs. Stelter *et al.* veröffentlichten 2010 eine sehr interessante Arbeit, in der sie den Effekt ausnutzten, dass primäre Amine dreiwertiges Gallium komplexieren können. Sie machten so aminosilanisierte superparamagnetische Eisenoxidpartikel für die duale Bildgebung (PET/MRT) zugänglich<sup>74</sup>.

Das Einführen von markierungsfähigen Strukturen an der Partikeloberfläche kann das *in vivo*-Verhalten eines Partikels beeinflussen. Um dieses Problem zu umgehen, stellten Pérez-Campaña *et al.* einen ungewöhnlichen Ansatz vor. Sie wollten  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Partikel *in vivo* untersuchen, ohne eine Polymeroberfläche o.Ä. einzuführen und bestrahlten darum mit  $^{18}\text{O}$  angereichertes  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , um durch eine (p,n)-Reaktion  $^{18}\text{F}$ -markierte Partikel zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, einen Chelator in den Kern eines Partikels oder einer Mizelle zu bringen und anschließend eine Radiomarkierung durchzuführen. Diese kann allerdings nur erfolgreich stattfinden, wenn das Radiometall durch die Korona des Partikels bis in seinen Kern vordringen kann. Die Oberfläche und somit auch die Eigenschaften des Partikels bleiben auch bei dieser Strategie der Radiomarkierung unverändert.

Es wird erkennbar, dass auf dem Gebiet der nanodimensionalen Wirkstofftransportsysteme bislang eine Vielzahl von verschiedenen Systemen mit verschiedensten (PET)-Radionukliden markiert wurde. In einem Großteil der Ansätze wurde die Methode zur Markierung sowohl auf die Radionuklide als auch auf das nanodimensionale System individuell eingestellt. Gerade die Methodik des *pre-radiolabelings* bietet die Möglichkeit, letzteres zu umgehen, da sie eine vielseitig anwendbare Radiomarkierungsmethode für nanodimensionale Systeme darstellt. Die Verwendung einer effizienten und breit anwendbaren Ligationschemie in Kombination mit Derivaten des DOTA-Chelators könnte neue Strategien eröffnen, die auf eine Vielzahl von Systemen anwendbar sind und es zusätzlich erlauben, eine große Variation an Radiometallen einzusetzen.

---

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Nanodimensionale und polymere Materialien finden immer häufiger in medizinischen Fragestellungen Anwendung. Als Wirkstofftransportsysteme sind sie Gegenstand zahlreicher Publikationen. Sie können die Blutzirkulationszeit eines Wirkstoffs verlängern und den Wirkstoff vor dem körpereigenen Immunsystem abschirmen. Durch aktives oder passives Targeting sind solche Wirkstofftransportsysteme mitunter hervorragend für Tumortargeting geeignet.

Bei der Entwicklung neuer Wirkstofftransportsysteme ist es essenziell, möglichst detaillierte Informationen über ihr *in vivo*-Verhalten zu haben. Sind die Systeme zugänglich für Radiomarkierungen, so besteht die Möglichkeit, *in vivo*-PET-Messungen, sowie *ex vivo*-Biodistributionsstudien durchzuführen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, nanodimensionale und polymere Materialien für die Radiomarkierung mit Radiometallen, wie dem  $^{68}\text{Ga}$ , zugänglich zu machen und in *ex vivo*-Biodistributionsstudien, sowie  $\mu\text{PET}$ -Messungen zu evaluieren. Dazu sollten verschiedene Strategien verfolgt werden.

Ein Ansatz war spannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC, von engl.: *strain promoted alkyne azide cycloaddition*), welche in der  $^{18}\text{F}$ -Radiomarkierung bereits vielfach Anwendung findet<sup>75,76</sup>. Hierzu sollten Azid-funktionalisierte, sowie Dibenzylcyclooctin-(DBCO)-funktionalisierte Chelatoren synthetisiert und hinsichtlich ihrer Clickfähigkeit evaluiert werden. In diesem Teil der Arbeit sollte der von Lee *et al.* vorgestellte pre- und postlabeling-Ansatz<sup>73</sup> verfolgt werden. Die nanodimensionalen Strukturen sollten hierfür zum einen direkt radiomarkiert werden, also nachdem der Chelator angebunden worden war, und zum anderen indirekt. Dieser indirekte Ansatz orientiert sich am Konzept der prosthetischen Gruppen und Synthons, das bei  $^{18}\text{F}$ -Radiomarkierungen vielfach Verwendung findet. Der entsprechende Chelator sollte dabei radiomarkiert werden, und erst anschließend sollte die Clickreaktion mit der nanodimensionalen Struktur durchgeführt werden. Bei der Radiomarkierung von makrozyklischen Chelatoren, insbesondere von DOTA, sind sehr große Temperaturen und sehr niedrige pH-Werte erforderlich. Sensitive Moleküle zersetzen sich unter solchen Bedingungen leicht, weshalb hier die indirekte Radiomarkierung enorme Vorteile bietet, da die SPAAC unter sehr milden Bedingungen durchgeführt werden kann. Abbildung 21 zeigt schematisch am Beispiel von Blockcopolymeren die direkte und indirekte Radiomarkierung mittels SPAAC.

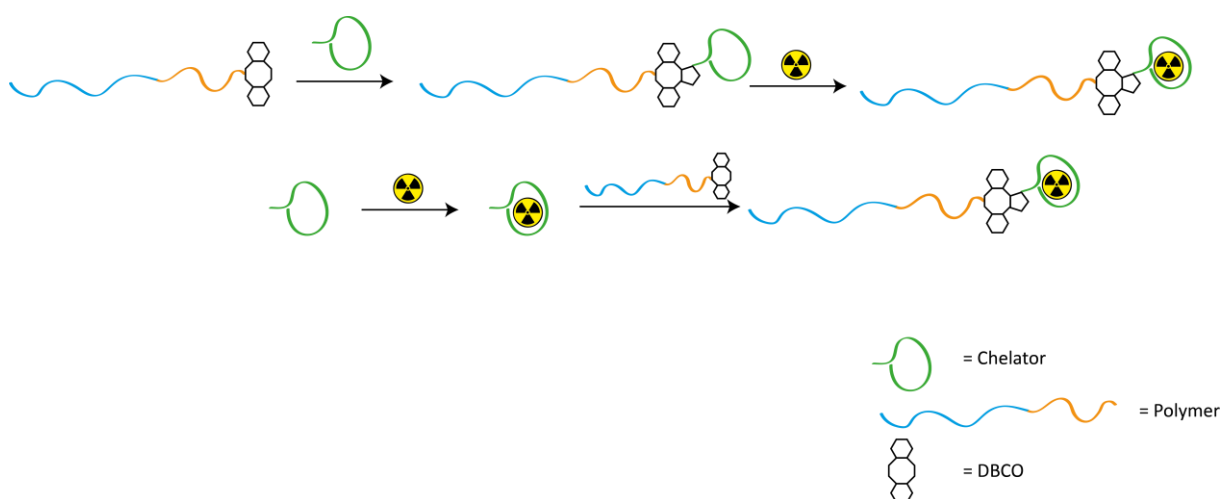


Abbildung 21: Direkte und indirekte Radiomarkierung mittels SPAAC am Beispiel von Blockcopolymeren

Ein zweiter Ansatz war die direkte Radiomarkierung von polymerumhüllten Eisenoxidnanopartikeln. Dazu sollten nasschemisch über Amidbindungen Chelatoren an die Partikeloberfläche angebunden werden. Es sollte untersucht werden, wie sich die Markierungseffizienzen verändern, wenn das Polymer

vor bzw. nach dem Coating der Partikel mit dem Chelator funktionalisiert wird. Zusätzlich sollten die für die SPAAC entwickelten Chelatoren an diesen Systemen getestet werden. Die unterschiedlichen Vorgehensweisen sind in Abbildung 22 gezeigt.

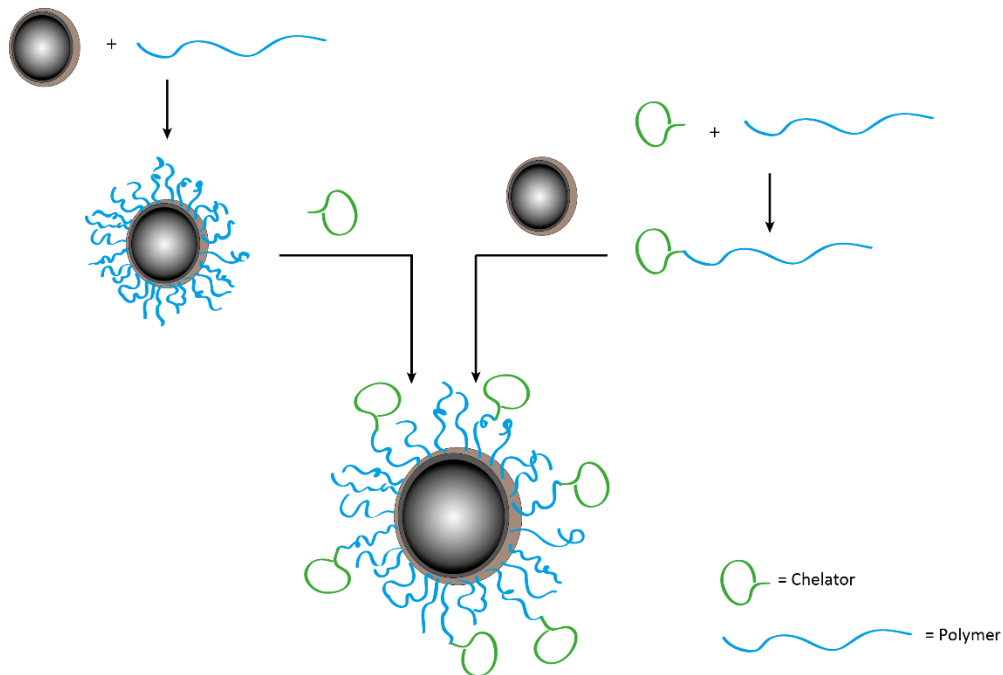


Abbildung 22: Strategien für die Chelator-Funktionalisierung von Eisenoxidnanopartikeln.

Für die Evaluierung des *in vivo*-Verhaltens von Nanopartikeln oder Polymeren wird die Markierung (in Form eines Radionuklids etc.) i.d.R. auf der Oberfläche dieser Systeme angebracht. Dadurch werden die Eigenschaften der Oberfläche, und damit auch potentiell die Pharmakokinetik dieser Systeme verändert. Ein interessanter Ansatz ist es darum, das Radiolabel im Kern eines Partikels einzuschließen, um die Oberfläche desselben nicht zu verändern. Diese Strategie sollte dazu verwendet werden, Polysarcosin-basierte kernvernetzte Mizellen, die im Kern mit Chelatoren funktionalisiert wurden, radioaktiv zu markieren und anschließend *in vivo* zu evaluieren. Dies veranschaulicht Abbildung 23.

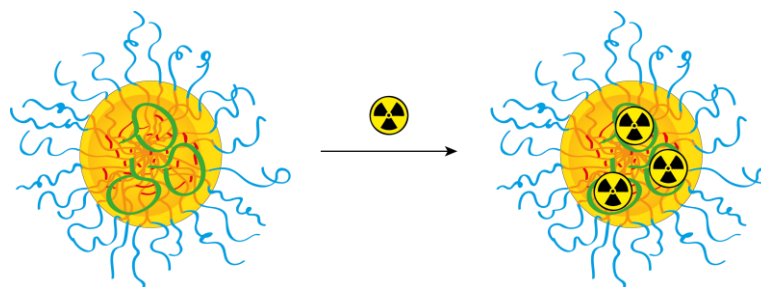


Abbildung 23: Radiomarkierung einer kernvernetzten Mizelle

---

---

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in vier Teile. Im ersten Teil wird die Synthese, Radiomarkierung und Evaluierung der clickfähigen Chelatoren beschrieben. Darauf folgen drei Kapitel, welche nach den zu markierenden nanodimensionalen Systemen sortiert sind. Das erste dieser Systeme sind anorganische Nanopartikel, welche über verschiedene Anbindungsstrategien an DOTA- und NODAGA-Derivate gekoppelt wurden. Danach werden Markierungsreaktionen mit Polysarcosin-Homopolymeren mittels SPAAC diskutiert. Das letzte Kapitel in diesem Ergebnisteil beschäftigt sich mit der Radiomarkierung kernvernetzter Mizellen.

#### 3.1 Clickfähige Chelatorsysteme

In diesem Kapitel wird die organische Synthese, Radiomarkierung und Evaluierung von Chelatoren diskutiert, die für die SPAAC zugänglich gemacht wurden. Es sollte hierbei vor allem untersucht werden, wie sich die DBCO-Einheit und die Azideinheit auf die kinetischen und thermodynamischen Stabilitäten der Radiometallkomplexe auswirken.

Das Kapitel gliedert sich in die organische Synthese und die Radiomarkierung der Chelatoren. Die Clickreaktionen mit den verschiedenen Polymeren und Nanopartikeln sind in den Kapiteln 3.2.2 und 3.3.1 beschrieben.

##### 3.1.1 Organische Synthesen

Nachfolgend wird die präparative Synthese der acht clickfähigen Chelatoren beschrieben. Die Vorgehensweise war jeweils identisch. Es wurde zunächst das dreifach *tert*-Butyl-geschützte Chelator-Grundgerüst über eine Amidbindung an die jeweilige clickfähige Struktur angebunden. Im Anschluss daran wurden die Schutzgruppen entfernt und es schloss sich die Radiomarkierung an. Die Synthesen sind im Detail in Kapitel 5.2.1 zu finden.

Zunächst werden die fünf DBCO-tragenden NODAGA-, DOTA- und DATA-Derivate beschrieben, woran sich die Synthese der drei entsprechenden azidierten Chelatoren anschließt.

##### NODAGA-DBCO (4)

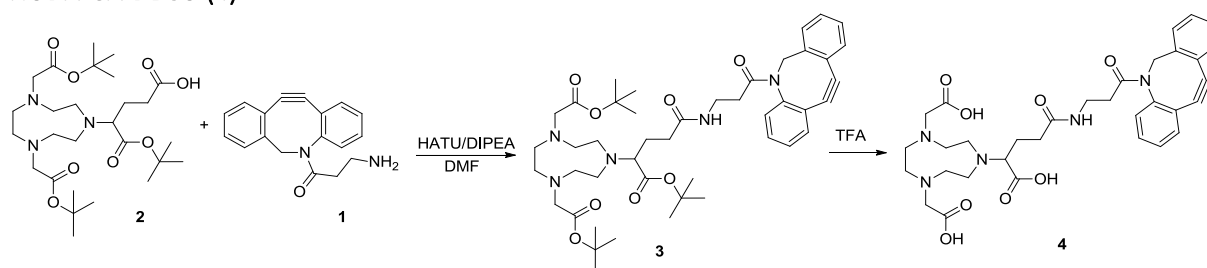


Abbildung 24: Darstellung von NODAGA-DBCO (4)

NODAGA-(*t*Bu)<sub>3</sub> (2) wurde in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorosphat (HATU) für 30 min inkubiert. Dibenzylcyclooctin-Amin (DBCO-Amin) (1) wurde in DMF gelöst, mit Diisopropylethylenamin (DIPEA) versehen und ebenfalls für 30 min inkubiert. Diese Mischung wurde zu der Lösung aus Säure und Kopplungsreagenz getropft. Nach beendeter Reaktion wurde mit Eiswasser gequenchet und das Lösungsmittel (LM) wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde unter starker Kühlung mit Trifluoressigsäure (TFA)

versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde vom LM befreit und der ölige Rückstand wurde über semipräparative *high performance liquid chromatography* (HPLC) gereinigt. Detailliertere Angaben zur Durchführung sind im Experimententeil zu finden (Kapitel 5.2.1).

Die Kopplungsreaktion zwischen dem primären Amin und der Carbonsäure war stets begleitet von der Bildung des Guanidinium-Nebenproduktes, das in Abbildung 13 gezeigt wird. Dadurch verringert sich die Ausbeute. Ein weiteres Problem ist die sehr gute UV-Absorption des Nebenproduktes, sowie die große Ionenausbeute, die es bei *liquid chromatography mass spectrometry* (LC/MS) Messungen zeigt. Insbesondere die gute UV-Absorption bei den verschiedensten Wellenlängen erwies sich bei der HPLC-Reinigung als hinderlich.

Um die Bildung des Guanidiniums zu unterdrücken wurden unterschiedliche Reaktionsführungen gewählt und miteinander verglichen. Dabei wurden Aceton, Acetonitril und DMF als aprotische Lösungsmittel verwendet, sowie verschiedene Reihenfolgen der Zugabe der Reaktanden gewählt. Aufgrund des Mechanismus der Kopplungsreaktion (vgl. hierzu auch Abbildung 11 und Abbildung 13) wurde zunächst davon ausgegangen, dass sich das Guanidinium weniger bevorzugt bildet, wenn das HATU bereits mit der deprotonierten Säure den Aktivester gebildet hat. Dazu wurde das HATU im entsprechenden Lösungsmittel gelöst, zu der Mischung aus Chelator und DIPEA getropft und für 2 h gerührt. Erst danach wurde das ebenfalls im entsprechenden Lösungsmittel gelöste DBCO-Amin sehr langsam zugetropft. Dies stimmt mit der üblichen in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise überein<sup>48,49,77,78</sup>. Hierbei zeigte sich jedoch unmittelbar nach der Zugabe desamins die Bildung des ungewünschten Nebenproduktes. Dabei war nicht ersichtlich, dass sich das Lösungsmittel signifikant auf den Verlauf der Reaktion auswirkt, da sich sowohl in DMF als auch in Aceton und Acetonitril das Guanidinium-Nebenprodukt sehr schnell bildete.

Es konnte gezeigt werden, dass deutlich weniger Nebenprodukt gebildet wurde, wenn das Kopplungsreagenz mit der Carbonsäure ohne die Anwesenheit der Base inkubiert wurde. Die Base wurde gemeinsam mit dem Amin der Mischung aus Carbonsäure und HATU zugetropft.

### DOTA-DBCO (7)

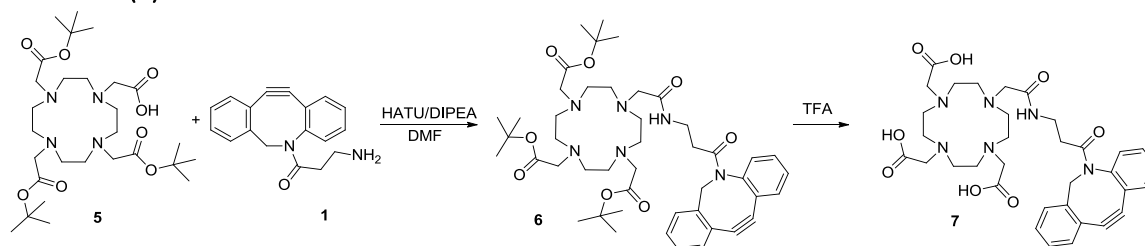


Abbildung 25: Darstellung von DOTA-DBCO (7)

DOTA-tris-(*t*-Bu) (5) wurde mit HATU in DMF vorgelegt und für 30 min inkubiert. Das DBCO-Amin (1) wurde in DMF gelöst, mit DIPEA versetzt und ebenfalls für 30 min inkubiert. Dieses Gemisch wurde der Lösung aus Chelator und Kopplungsreagenz sehr langsam zugetropft. Die Mischung wurde vom LM befreit und die *tert*-Butylgruppen wurden mit TFA entfernt. Die Reinigung erfolgte über semipräparative HPLC. Eine detaillierte Beschreibung der Synthese befindet sich in Abschnitt 5.2.1.

Auch bei dem DOTA-Derivat des DBCO wurde die Reaktionsführung sehr stark optimiert, da sich zunächst vermehrt das Guanidinium-Nebenprodukt bildete. Wie bereits weiter oben beschrieben, wurde davon ausgegangen, dass die Bildung dieses Nebenproduktes unterdrückt werden kann, wenn Base, Kopplungsreagenz und Amin nacheinander zugegeben werden, sodass zuerst die Aktivierung der Carbonsäure durch das HATU stattfinden kann. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Art der

Reaktionsführung nicht zielführend war, da sich bei dieser Reihenfolge sofort das Guanidinium-Nebenprodukt bildete, wenn das DBCO-Amin zugetropft wurde. Eine Variation der Lösungsmittel (Aceton, Dimethylsulfoxid (DMSO)), der Stöchiometrien, der Temperatur, der Base (Collidin, Triethylamin) und des Kopplungsreagenzes selbst (HBTU statt HATU) konnten keine Verbesserung erzielen. Es wurde auch untersucht, wie sich eine Verdünnung der Reaktionslösung auf die Bildung des Nebenprodukts auswirkte. Hierbei zeigte sich, dass dessen Bildung unabhängig von der Konzentration war. Um zu vermeiden, dass das DBCO-Amin in der Nebenreaktion zum Guanidinium wird, wurde untersucht, ob sich die Nebenreaktion unterdrücken lässt, indem das Amin in sehr kleinen Äquivalentschritten zugegeben wird. Hierzu wurde nach der Zugabe von je 0,03 eq. DBCO-Amin zu der aktivierten Carbonsäure eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Es zeigte sich keine wesentliche Verbesserung im Vergleich zu der vorherigen Reaktionsführung.

Erst die Änderung der Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien bewirkte, dass die Bildung des Nebenprodukts deutlich zurückging.

Neben der Zugabe des DBCO-Amins zu der Reaktionsmischung aus HATU, Carbonsäure und Base, wurde auch untersucht, ob die Reaktion besser verläuft, wenn man die Reihenfolge verändert, indem das DBCO-Amin vorgelegt wird, und die Lösung aus HATU, Carbonsäure und Base zugetropft wird. Diese Variante brachte ebenfalls keine Verbesserung der Ausbeuten.

Es zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Zugabe von Base und Amin zu Carbonsäure und HATU interessanterweise die Bildung des Nebenprodukts nicht so prominent war, wie bei den vorherigen Reaktionsführungen. Diese neue, optimierte Reaktionsführung wurde nachfolgend für die übrigen Kopplungsreaktionen angewendet.

Bei der Entschützung mit TFA wurde zunächst mit der reinen Säure bei RT gearbeitet. Dabei kam es zur Zersetzung des Edukts und des Produkts. Um die Bedingungen etwas milder zu halten, wurde ein Gemisch aus TFA/TIS/Wasser = 95:2,5:2,5 verwendet<sup>79</sup>. Hierbei konnten die drei *tert*-Butylgruppen jedoch nicht vollständig entfernt werden. Es zeigte sich, dass pure TFA bei sehr tiefen Temperaturen mild genug war, um eine Zersetzung des Moleküls zu verhindern, und stark genug, um alle Schutzgruppen zu entfernen.

Die Reinigung über HPLC erwies sich aufgrund des gebildeten Guanidinium-Nebenproduktes als erschwert. Mit einer Phenomenex® Luna, 5 u, C18, 110 Å, 250 x 10,00 mm, 5 Mikron gelang es nicht, dieses vom Produkt abzutrennen. Durch den Wechsel von Luna auf Gemini (Phenomenex® Gemini 5 u, C18, 110 Å, 250 x 10,00 mm, 5 Mikron) konnte das Guanidinium vom Produkt separiert werden. Die stationäre Phase der beiden HPLC-Säulen wird vom Hersteller als identisch angegeben. Es handelt sich jeweils um eine C18-Phase, welche mit Trimethylsilyl (TMS)-Gruppen gecapped ist. Die Unterschiede der beiden Säulen liegen in der Porengröße, im Kohlenstoffbeladungsgrad und der Größe der Oberfläche<sup>80</sup>. Die exakten Parameter der beiden Säulen sind einander in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Tabelle 3: Parameter der Phenomenex®-HPLC-Säulen Luna und Gemini<sup>80</sup>

	Luna	Gemini
Kohlenstoffbeladung (%)	17,5	14
Oberfläche (m <sup>2</sup> /g)	400	375
Porengröße (Å)	100	110

Die amphiphile Verbindung **7** lässt sich auf der Säule mit den größeren Poren, der kleineren Oberfläche und dem geringeren Beladungsgrad deutlich besser vom Nebenprodukt abtrennen. Dies kann an der geringen Lipophilie des Guanidinium-Kations liegen. Laut Hersteller ist die Luna-C18 für hydrophobere

Verbindungen besser geeignet als für hydrophile. Demzufolge ist eine erfolgreiche Separation auf der HPLC-Säule Gemini eher gewährleistet.

### NODA-GA-PEG<sub>4</sub>-DBCO (10)

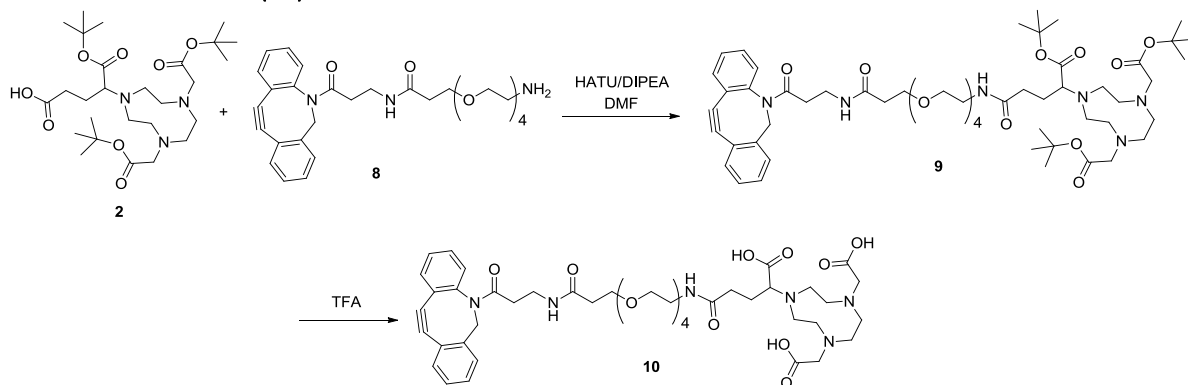


Abbildung 26: Darstellung von NODA-GA-PEG<sub>4</sub>-DBCO (10)

NODA-GA-(*t*Bu)<sub>3</sub> (2) wurde mit HATU in DMF vorgelegt und für 60 min gerührt. DBCO-PEG<sub>4</sub>-Amin (8) wurde mit DIPEA in DMF gelöst und ebenfalls für 60 min gerührt. Die Lösung aus DBCO-PEG<sub>4</sub>-Amin (8) und Base wurde der Lösung aus Chelator und HATU sehr langsam zugetropft. Nach Quenchen durch Wasserzugabe und Entfernen des LM wurde im Aceton/Stickstoffbad mit TFA entschützt. Das LM wurde entfernt und der Rückstand wurde über semipräparative HPLC gereinigt. Die detaillierte Synthesevorschrift ist in Kapitel 5.2.1 zu finden.

Diese Reaktion verlief analog zu den bereits beschriebenen Kopplungsreaktionen und wurde nicht weiter optimiert.

### DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO (12)

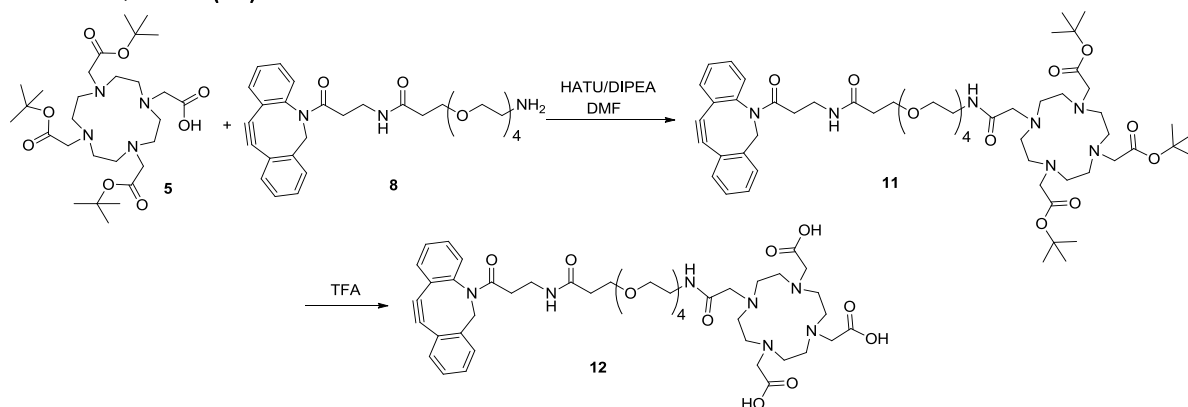


Abbildung 27: Darstellung von DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO (12)

Das um eine PEG<sub>4</sub>-Einheit verlängerte DBCO-Amin (8) wurde in DMF mit DIPEA gemischt und für 60 min bei 30 °C gerührt. Es wurde über 45 min zu einer Mischung aus der Carbonsäure (5) und HATU getropft, welche ebenfalls bei 30 °C gerührt worden war. Nach beendeter Reaktion wurde das LM entfernt und die *tert*-Butylester wurden mit TFA bei tiefen Temperaturen abgespalten. Die Reinigung erfolgte mit semipräparativer HPLC. Die Synthesevorschrift ist in Kapitel 5.2.1 beschrieben.

Die Reaktion verlief mit moderaten Ausbeuten und analog zu den bereits beschriebenen Kopplungsreaktionen.

Bei der Reinigung über semipräparative HPLC konnte beobachtet werden, dass ein isokratisches Laufmittelgemisch zu sehr breiten und zu „fronting“ und „tailing“ neigenden Signalen führte. Dies erschwerte das Sammeln der einzelnen Fraktionen, sodass ein sehr flacher Gradient anstelle des isokratischen Gemisches verwendet wurde (30-32 % MeCN in 20 min mit 0,1 % TFA). In Abbildung 28 sind die entsprechenden Chromatogramme dargestellt. Das Chromatogramm der isokratischen Methode (30 % MeCN mit 0,1 % TFA) ist in blau gezeigt, das Chromatogramm der Methode mit Gradient ist in grün dargestellt. Die Peaks, welche **12** zugeordnet werden konnten, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

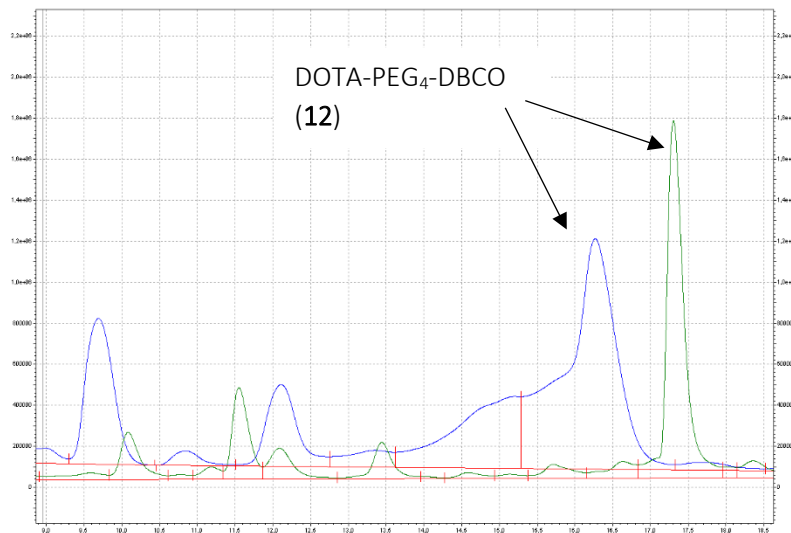


Abbildung 28: HPLC-Diagramme von DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO (**12**). Blau: Isokratisch 30 % B; Grün: Gradient 30-32 % B in 20 min

Es ist gut zu erkennen, dass sich die Form des Signals bei der Methode mit Gradient (grün) deutlich verbesserte. Auf diese Weise wurde die semipräparative Reinigung erleichtert.

Der Grund für die verbesserte Peakform ist der Acetonitrilanteil in der mobilen Phase. Der Analyt passiert die Säule, wobei seine Elutionsgeschwindigkeit mit steigendem Acetonitrilanteil zunimmt. In Abbildung 29 ist der Unterschied zwischen einer isokratischen (oben) und einer Gradientenmethode (unten) dargestellt.

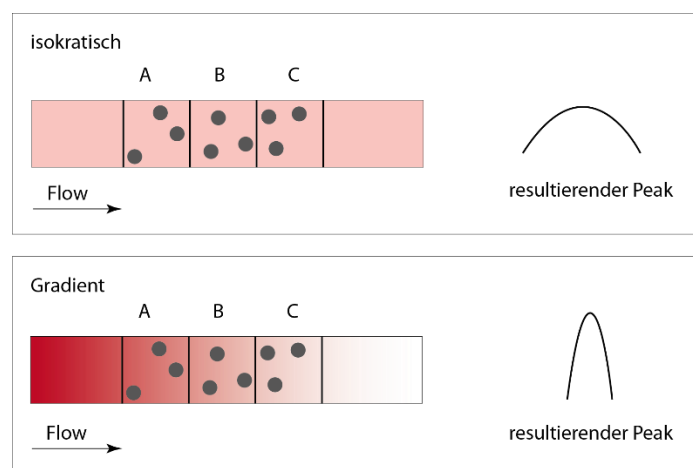


Abbildung 29: Schematische Gegenüberstellung einer isokratischen HPLC-Messung (oben) und einer HPLC-Messung mit Gradient (unten)

Der Farbverlauf stellt den Gradienten dar, wobei rot für einen höheren Anteil an Acetonitril und weiß für einen geringeren Anteil steht. Bei der HPLC-Säule sind drei Bereiche als A, B und C gekennzeichnet. Im oberen Teil des Bildes ist in allen drei Bereichen die Acetonitrilkonzentration gleich. Im unteren Teil erkennt man, dass in Bereich A am meisten Acetonitril im Laufmittel enthalten ist und in Bereich C am wenigsten. Im oberen Bild haben alle Moleküle des Analyten dieselbe Elutionsgeschwindigkeit, da sie sich alle im identischen Lösungsmittelgemisch befinden. Im unteren Bild haben die Analytmoleküle in Bereich A die höchste Elutionsgeschwindigkeit, wohingegen die Moleküle in Bereich C am langsamsten eluiert werden. Daraus resultiert ein deutlich schärferes Signal.

### NODA-GA-TEG-Azid (**15**)

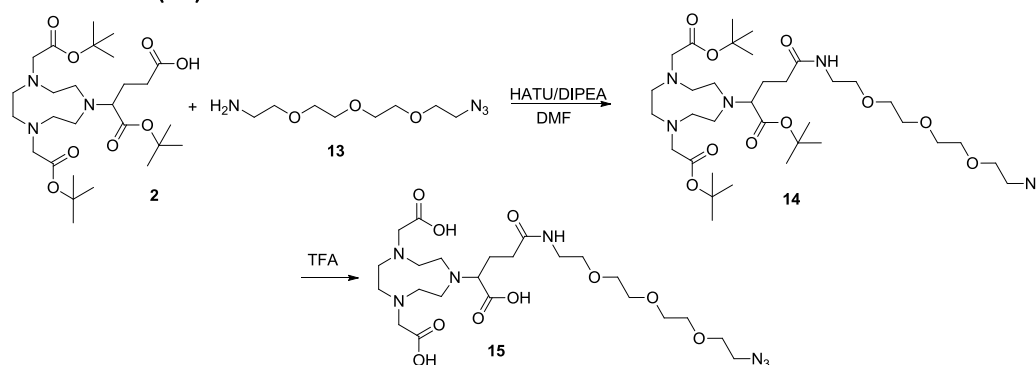


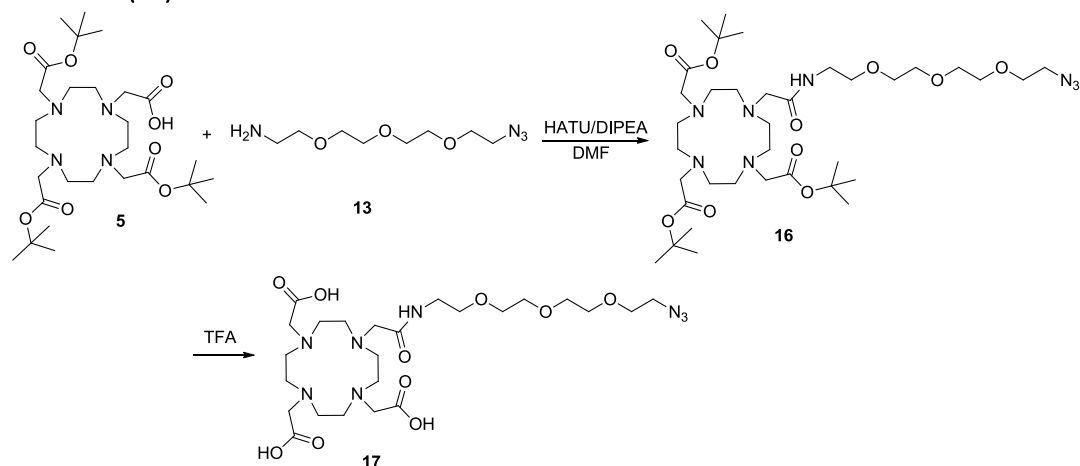
Abbildung 30: Darstellung von NODA-GA-TEG-Azid (**15**)

NODA-GA-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (**2**) wurde mit HATU in DMF gelöst und für 30 min inkubiert. 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (**13**) und DIPEA wurden ebenfalls in DMF gelöst und der Mischung aus **2** und Kopplungsreagenz sehr langsam zugegeben. Die Entschützung der Säuregruppen erfolgte bei tiefen Temperaturen mit TFA. Das LM wurde entfernt und der Rückstand wurde über semipräparative HPLC gereinigt. Die detaillierte Vorschrift ist in Abschnitt 5.2.1 zu finden.

Bei diesem clickfähigen Chelator war der Einfluss des Acetonitrilanteils im HPLC-Laufmittel auf das Guanidinium-Nebenprodukt und auf das Produkt sehr unterschiedlich. Es gelang zunächst nicht, das Produkt vom Guanidinium-Nebenprodukt abzutrennen, da beide Peaks überlagerten. Bei einer Veränderung in der Zusammensetzung der mobilen Phase veränderte sich die Elutionsgeschwindigkeit der verschiedenen Analyten unterschiedlich stark. Da das Guanidinium-Nebenprodukt keine sehr reproduzierbaren Retentionszeiten aufwies, wurde eine andere stationäre Phase gewählt (Synergi MAX-RP statt Gemini). Die deutlich größere Oberfläche und die leicht veränderte Matrix (C12 statt C18) erzeugten reproduzierbarere Retentionszeiten und ermöglichten eine gute Separation von Produkt und Guanidinium-Nebenprodukt. In Tabelle 4 sind die unterschiedlichen Parameter der beiden HPLC-Säulen aufgelistet.

Tabelle 4: Parameter der Phenomenex®-HPLC-Säulen Gemini und Synergi MAX-RP<sup>80</sup>

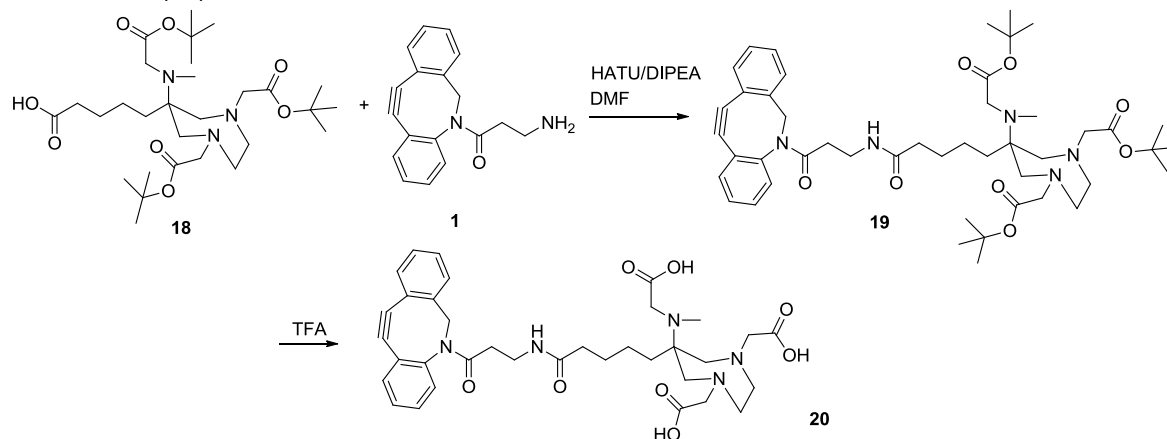
	Gemini	Synergi MAX-RP
Kohlenstoffbeladung (%)	14	17
Oberfläche (m <sup>2</sup> /g)	375	475
Porengröße (Å)	110	80

DOTA-TEG-Azid (**17**)Abbildung 31: Darstellung von DOTA-TEG-Azid (**17**)

Der dreifach *tert*-Butyl geschützte Chelator (**5**) wurde in DMF mit DIPEA an der vierten Carbonsäure deprotoniert. HATU und 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin wurden in DMF gemischt und sehr langsam der Reaktionsmischung zugetropft. Nach beendeter Reaktion wurde mit Wasser gequench und das LM wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das zurückbleibende braune Öl wurde bei tiefen Temperaturen mit TFA zur Entschützung der Carbonsäuren versetzt und langsam auf RT erwärmt. Die Lösung wurde mit Wasser verdünnt und am Lyophilisator getrocknet. Die Reinigung erfolgte über semipräparative HPLC. Weitere Details sind im Experimentalteil (Kapitel 5.2.1) beschrieben.

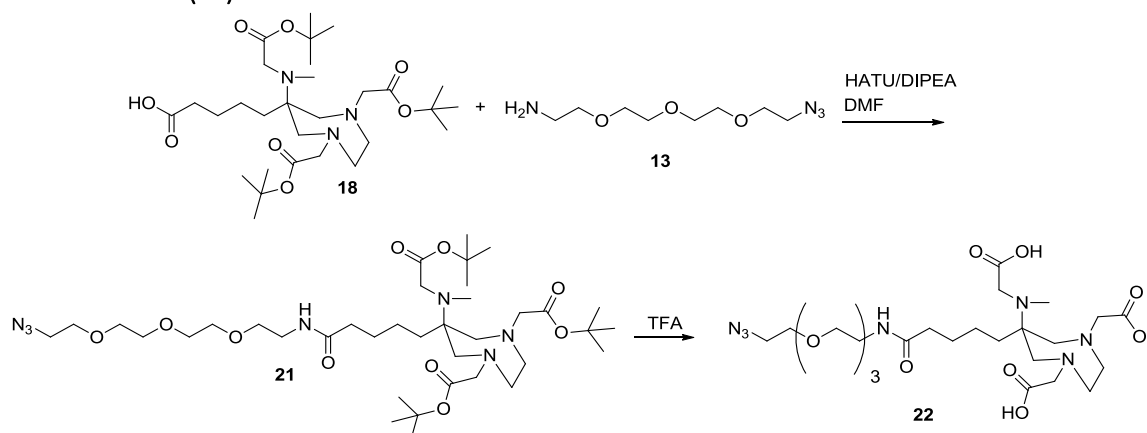
Da bei dieser Struktur, wie auch bei **15** keine aromatischen Funktionen vorhanden sind, wurde die HPLC-Messung bei einer Wellenlänge von 220 nm durchgeführt (bei den DBCO-enthaltenden Molekülen wurde hingegen 254 nm als Wellenlänge verwendet). Da bei 220 nm viel mehr Bindungen absorbieren als bei 254 nm, war eine Vielzahl von Signalen im Chromatogramm sichtbar, welche zum Teil so stark absorbierten, dass sie außerhalb des Maximalbereichs des UV-Detektors lagen. Dabei ist besonders das sehr UV-aktive Guanidinium-Nebenprodukt zu nennen. **17** hingegen absorbiert nicht sehr stark. Dadurch wurde die Abtrennung des Produktpeaks aus der Reaktionslösung erschwert. Weiterhin überlagerten einige der Fremdsignale mit dem Signal, das dem Produkt zugeordnet wurde. Dadurch waren auch nach der HPLC-Reinigung noch Verunreinigungen im Produkt enthalten. Um eine ausreichende Reinheit des Produkts zu gewährleisten, wurden verschiedene Variationen in der Laufmittelzusammensetzung vorgenommen. Neben Acetonitril/Wasser/TFA wurde auch das Laufmittelsystem Methanol/Wasser/TFA verwendet. Es wurde jeweils sowohl 0,1 % TFA als auch 0,2 % TFA zugesetzt. Es zeigte sich allerdings, dass die einzelnen im Chromatogramm sichtbaren Signale sehr unterschiedlich auf die verschiedenen Laufmittelzusammensetzungen reagierten. Dies äußerte sich in verschieden starker Änderung der Retentionszeiten, welche teilweise sehr markant war, da sogar die Reihenfolge der eluierenden Substanzen variierte. Demzufolge wechselwirken die in der Probe enthaltenden Substanzen sehr unterschiedlich mit der Oberfläche des Säulenmaterials, sowie der mobilen Phase.

Durch die Überlagerung eines Fremdsignals mit dem Produktsignal, die sich nicht vollständig vermeiden ließ, wurden neben den sauberen Produktfraktionen auch Mischfraktionen erhalten. Mit der Zusammensetzung 15-20 % Acetonitril + 0,1 % TFA in 20 min und einer Phenomenex® Synergi, 4 u, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 mikron konnte die Anzahl dieser Mischfraktionen minimiert, jedoch nicht vollständig reduziert werden.

DATA<sup>5m</sup>-DBCO (20)Abbildung 32: Darstellung von DATA<sup>5m</sup>-DBCO (20)

DATA<sup>5m</sup>-<sup>t</sup>Bu<sub>3</sub> (**18**) wurde in DMF vorgelegt und mit HATU versetzt. Nach 30 min wurde ein Gemisch aus DIPEA und **1** zugegeben und es wurde bei RT gerührt, bis die Reaktion abgeschlossen war. Nach Entfernen des DMF wurde der Rückstand bei -35 °C mit TFA versetzt und es wurde bis auf RT aufgetaut. Die Reinigung des fertigen Produkts (**20**) erfolgte über semipräparative HPLC.

Die Reaktion wurde in sehr kleinem Maßstab als „*proof-of-concept*“ durchgeführt und nicht weiter optimiert. Sie wird detaillierter im Experimententeil (Kapitel 5.2.1) beschrieben.

DATA<sup>5m</sup>-TEG-Azid (22)Abbildung 33: Darstellung von DATA<sup>5m</sup>-TEG-Azid (22)

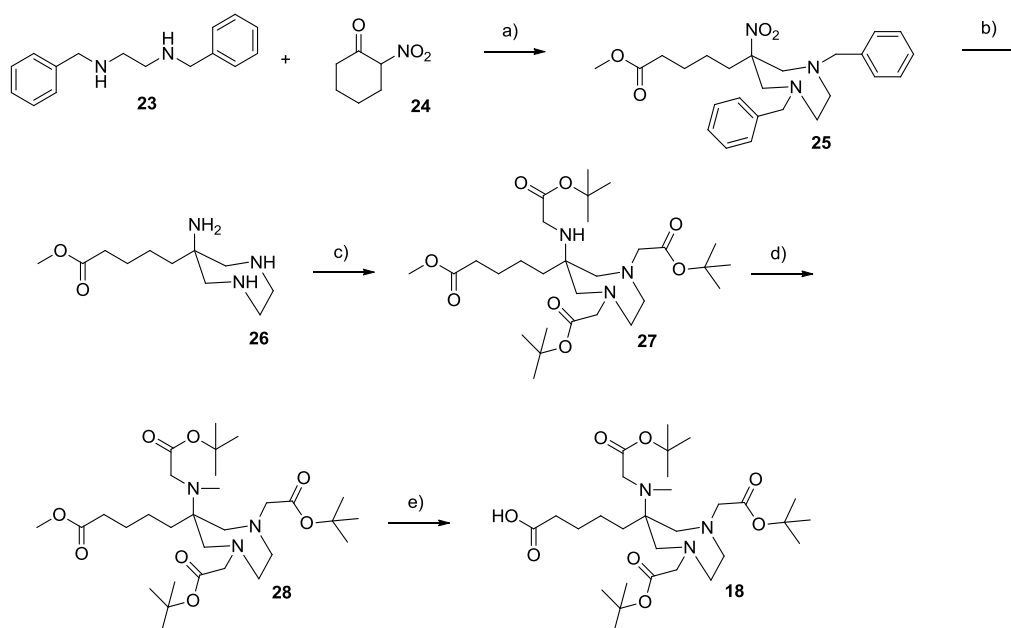
DATA<sup>5m</sup>-<sup>t</sup>Bu<sub>3</sub> (**18**) wurde in DMF gelöst und mit DIPEA und HATU gerührt. **13** wurde in DMF gelöst und der Reaktionsmischung über 30 min zugetropft. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand bei -35 °C mit TFA entschützt. Die Reinigung des Chelators (**22**) wurde über semipräparative HPLC durchgeführt.

Die Reaktion wurde in sehr kleinem Maßstab als „*proof-of-concept*“ durchgeführt und nicht weiter optimiert. Im Experimententeil (Abschnitt 5.2.1) ist sie genauer beschrieben.

**DATA<sup>5m</sup>-Synthese (Route A)**

Im folgenden Abschnitt wird die Synthese des dreifach *tert*-Butyl-geschützte DATA<sup>5m</sup> beschrieben. Dieses wurde über zwei verschiedene Syntheserouten dargestellt, wobei die beiden Synthesewege miteinander verglichen werden sollten.

Zunächst wird die fünfstufige Synthese des DATA<sup>5m</sup>-Grundgerüsts gezeigt, welche angelehnt an die 2013 von Parker *et al.* bzw. 2015 von Seemann *et al.*<sup>44,81</sup> beschriebene Synthese durchgeführt wurde und die im Überblick in Abbildung 34 gezeigt ist. Die detaillierteren Reaktionsvorschriften sind in Abschnitt 5.2.1 zu finden.



- a) Paraformaldehyd, A21, MeOH, 60 °C  
 b) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, H<sub>2</sub> (1 bar), EtOH, RT  
 c) *tert*-Butylbromoacetat, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN, RT  
 d) Formalinlösung, NaBH<sub>4</sub>, HOAc, RT  
 e) MeOH/LiOH, RT

Abbildung 34: Syntheseroute A des dreifach *tert*-Butyl-geschützten DATA<sup>5m</sup> (**18**)

In der ersten Stufe wird in einer doppelten Mannichreaktion ausgehend von 2-Nitrocyclohexanon (**24**), *N,N'*-Dibenzylethylendiamin (**23**) und Paraformaldehyd unter basischen Bedingungen der Ringschluss zum 1,4-Diazepan-Grundgerüst (**25**) durchgeführt. Die Benzylgruppen werden in der folgenden Stufe hydrogenolytisch entfernt. Gleichzeitig wird dabei die Nitrogruppe zum primären Amin reduziert, sodass **26** gebildet wird. Es folgt eine Alkylierung, bei der drei *tert*-Butyl-geschützte Essigsäurefunktionen eingeführt werden. In der anschließenden reduktiven Aminierung wird das sekundäre, exozyklische Amin methyliert. Der letzte Schritt in der Synthese ist die basische Hydrolyse des Methylesters zu **18**.

Das DATA<sup>5m</sup> wurde mit dem Methylester und den *tert*-Butylestern als orthogonalen Schutzgruppen synthetisiert. Dadurch ist es möglich, an der Pentansäure Kopplungen mit Aminen durchzuführen, ohne dass es unerwünschte Nebenreaktionen an einer oder mehreren der Essigsäurereste gibt.

Nachfolgend werden die einzelnen Stufen der Synthese erläutert.

**Di-*tert*-butyl-2,2'-(6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (25)**

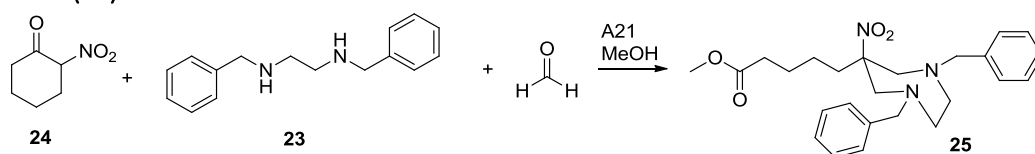


Abbildung 35: Darstellung von Di-*tert*-butyl-2,2'-(6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (25)

Für die Reaktion zum 1,4-Diazepan-Grundkörper wurde 2-Nitrocyclohexanon in Methanol mit Amberlyst A21 versetzt und für 90 min erhitzt. Es wurden Paraformaldehyd und *N,N'*-Dibenzylethylendiamin zugegeben und es wurde über Nacht zum Rückfluss erhitzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel. Auf diese Weise konnte sowohl das Produkt (25) als auch das Zwischenprodukt (29) isoliert werden. Letzteres konnte durch erneute Zugabe von *N,N'*-Dibenzylethylendiamin und Paraformaldehyd weiter zum Produkt umgesetzt werden.

In Abbildung 36 ist der Mechanismus dieser Reaktion dargestellt.

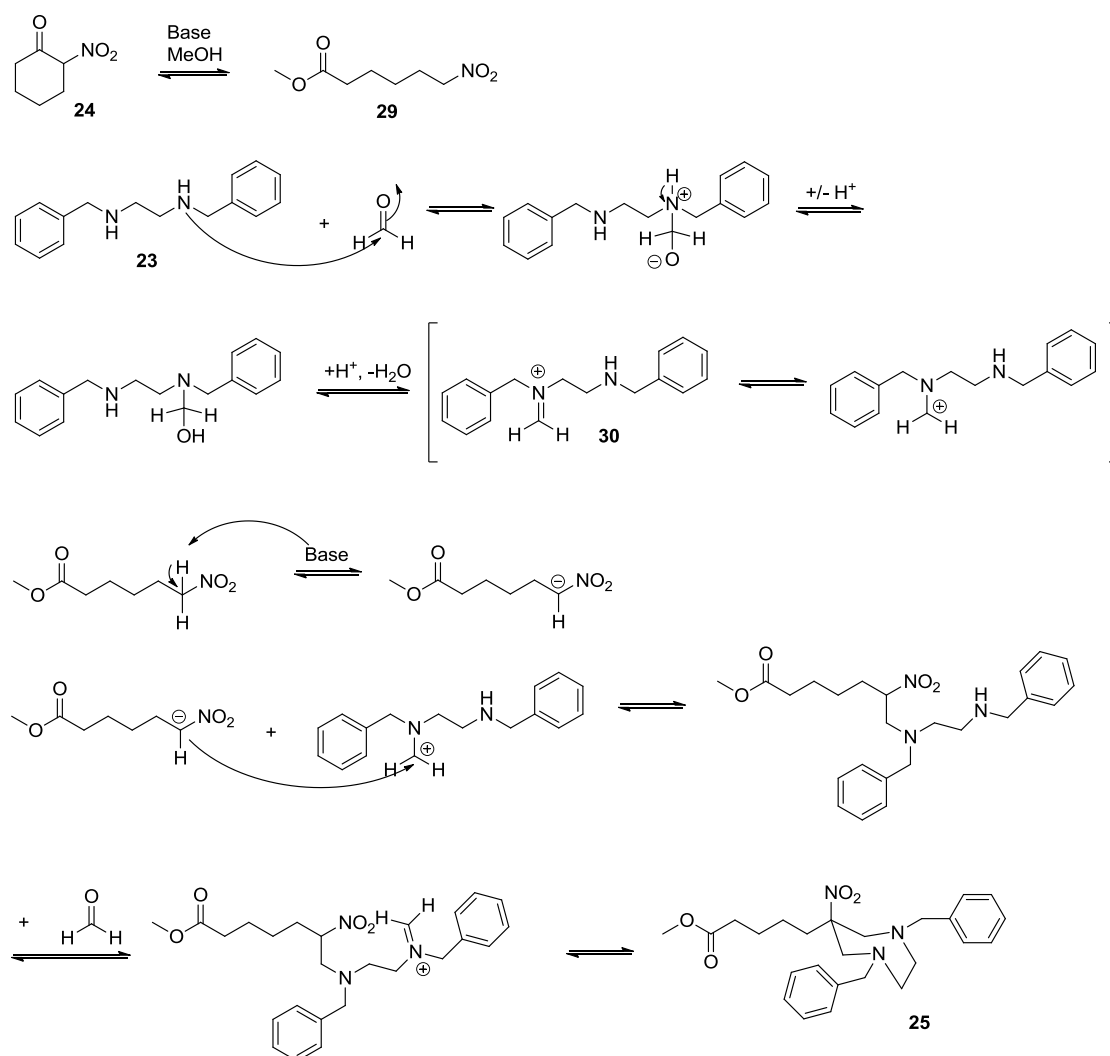


Abbildung 36: Mechanismus der doppelten Mannichreaktion

Im ersten Schritt öffnet das *in situ* gebildete Methanolat-Anion den sechsgliedrigen Ring des Nitrocyclohexanons, sodass (29) gebildet wird. Anschließend entsteht in einer Mannichreaktion das

Iminiumion (**30**), welches mit dem zur Nitrogruppe  $\alpha$ -ständigen Kohlenstoff reagiert. Durch die Nitrogruppe sind seine Protonen stärker azide und lassen sich von einer Base leicht abspalten. In einer zweiten Mannichreaktion wiederholen sich die Iminiumion-Bildung und der Angriff durch den zur Nitrogruppe  $\alpha$ -ständigen, deprotonierten Kohlenstoff, sodass es zur Ausbildung des siebengliedrigen 1,4-Diazepan-Gerüsts kommt.

Die Base Amberlyst A21 wurde von Ballini *et al.* bereits 1992 zur Spaltung von 2-Nitrocycloalkanonen verwendet<sup>82</sup>. Es handelt sich dabei um eine Festphasen-Base, bei der makroporöse Styrol-basierte Partikel mit Alkylaminen auf der Oberfläche funktionalisiert wurden. Die Partikelgröße beträgt laut Hersteller etwa 490-690  $\mu\text{m}$ , weshalb die Base während der Aufarbeitung sehr einfach durch Filtration aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann.

Das Produkt konnte auf einer Kieselgelsäule sehr gut von Verunreinigungen getrennt werden.

Diese Reaktion verlief reproduzierbar und mit guten Ausbeuten von ca. 70 % und wurde daher nicht weiter optimiert.

#### 5-(6-amino-1,4-diazepan-6-yl)pentansäuremethylester (**26**)

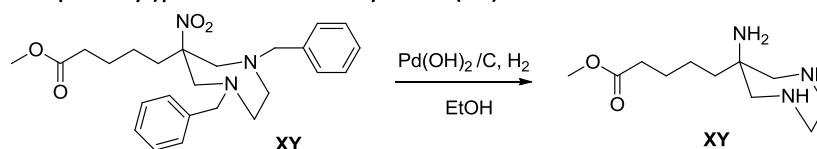


Abbildung 37: Darstellung von 5-(6-amino-1,4-diazepan-6-yl)pentansäuremethylester (**26**)

Für die Abspaltung der Benzylschutzgruppen und die gleichzeitige Reduktion der Nitrogruppe zum primären Amin wurde das Edukt in Ethanol gelöst und mit Essigsäure und Palladiumhydroxid auf Aktivkohle versetzt. Unter Wasserstoffatmosphäre wurde für 19 h hydriert, wobei die Reaktionskontrolle mittels DC und LC/MS erfolgte. Nach beendeter Reaktion wurde mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  neutralisiert, der Katalysator entfernt und es wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Bei dieser Reaktion stellte sich heraus, dass die Ansatzgröße sehr wichtig für den Erfolg der Hydrierung ist. Ansätze, bei denen mehr als 200 mg Edukt verwendet wurden, zeigten bei der Reaktionskontrolle immer eine Stagnation im Reaktionsverlauf. Auch eine Variation von Lösungsmittel, Katalysator und Zeit konnten dieses Phänomen nicht unterdrücken. Es wurde auch die Menge an eingesetztem Katalysator vergrößert, sodass teilweise äquimolare Verhältnisse vorlagen, was jedoch ebenfalls nicht zielführend war.

Eine Erklärung hierfür ist, dass es sich bei dieser Reaktion um eine heterogene Reaktion handelt. Das Edukt und das Produkt sind in der flüssigen Phase gelöst, der Katalysator stellt eine feste Phase dar und das hydrierende und reduzierende Gas ist die dritte Phase. Demzufolge sind eine möglichst große Oberfläche und eine sehr gute Durchmischung essenziell für den Erfolg der Reaktion. Je mehr Substanz eingesetzt wird, desto mehr Lösungsmittel wird benötigt und je größer das Volumen der Reaktionsmischung ist, desto kleiner wird das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Des Weiteren erschwert ein vergrößertes Volumen die Durchmischung der Phasen, weshalb die Reaktion langsamer voranschreitet bzw. stagnieren kann ( $\rightarrow$  Stoßwahrscheinlichkeit).

Als Lösungsmittel wurde Ethanol verwendet, da bei der Verwendung von Methanol methylierte Nebenprodukte auftraten. Aufgrund der geringeren Reaktivität des Ethanols treten Ethylierungen als Nebenreaktion bei der Hydrierung deutlich seltener auf.

Der Umsatz bei dieser Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Die Reaktion wurde abgebrochen, sobald kein Edukt mehr erkennbar war. Da die Reaktionsmischung vor der folgenden Alkylierung nicht gereinigt wurde, erfolgte keine Bestimmung der Ausbeute. Bei der Berechnung des folgenden Ansatzes wurde von einem 100 %igen Umsatz ausgegangen.

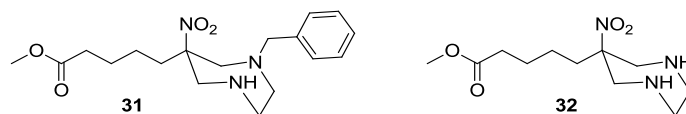


Abbildung 38: Nebenprodukte bei der Hydrierungsreaktion von 25

Die im folgenden Abschnitt erläuterte Alkylierung zeigte das Auftreten einiger Nebenprodukte aus dieser Hydrierungsreaktion (vgl. Abbildung 38). So konnte nachgewiesen werden, dass die Benzylgruppen schneller bzw. einfacher abgespalten werden, als dass die Nitrogruppe zum Amin reduziert wird.

#### Di-*tert*-butyl-2,2'-(6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (27)

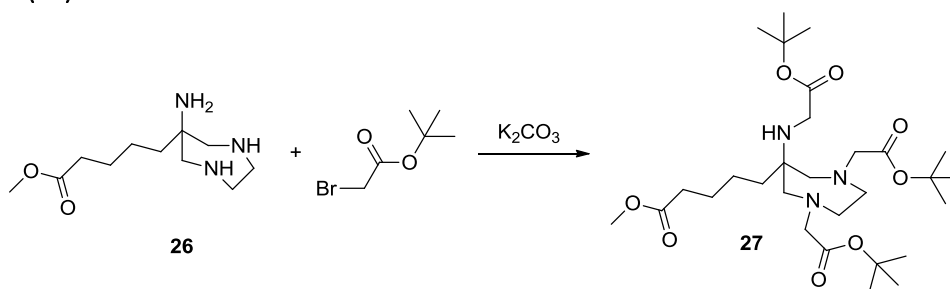


Abbildung 39: Darstellung von Di-*tert*-butyl-2,2'-(6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (27)

Für diese Alkylierungsreaktion wurden das Edukt, die Base und *tert*-Butylbromoacetat in Acetonitril gelöst und bei RT gerührt. Es wurde säulenchromatographisch gereinigt und das Produkt wurde in moderaten Ausbeuten erhalten.

Der Mechanismus dieser Reaktion ist eine einfache Substitutionsreaktion, bei der das Bromid des *tert*-Butylbromoacetats die Abgangsgruppe darstellt. Als Base wurde das anorganische  $K_2CO_3$  gewählt, da es sich aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Acetonitril während der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches sehr leicht entfernen lässt.

Das primäre exozyklische Amin sollte nur zum sekundären Amin umgesetzt werden, weshalb zunächst exakt 3 eq. des Alkylierungsreagenzes zugegeben wurden. Massenspektrometrische Analysen zeigten jedoch, dass diese Menge nicht ausreichend war, da die Umsetzung nicht vollständig verlief. Um eine mehrfache Alkylierung des exozyklischen Amins zu vermeiden, wurde der Reaktionsmischung in sehr kleinen Schritten von maximal 0,6 eq. zusätzliches Alkylierungsreagenz beigemischt. Erneute massenspektrometrische Kontrollen erfolgten nach jeweils 1,5 zugegebenen Äquivalenten.

Die mehrfache Alkylierung konnte jedoch nicht vollständig verhindert werden, weshalb die Ausbeute mit etwa 25 % nur moderat ausfiel. Zusätzlich konnte massenspektrometrisch die Bildung einiger Nebenprodukte nachgewiesen werden. Diese resultieren aus nicht vollständig umgesetzten Nebenprodukten aus der vorangegangenen Hydrierungsreaktion. Sie sind in Abbildung 40 gezeigt.

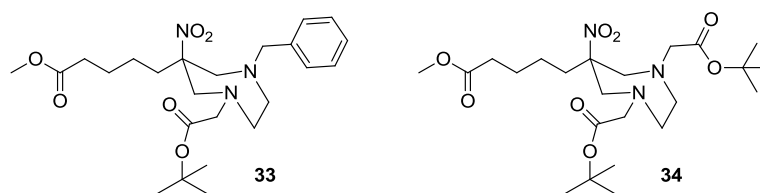


Abbildung 40: Nebenprodukte bei der Alkylierungsreaktion von **26**

**34** konnte säulenchromatographisch isoliert werden und sollte gemeinsam mit dem Produkt aus der Mannichreaktion der alternativen Route (siehe unten) mit Raney-Nickel zum Amin reduziert werden.

**Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (**28**)**

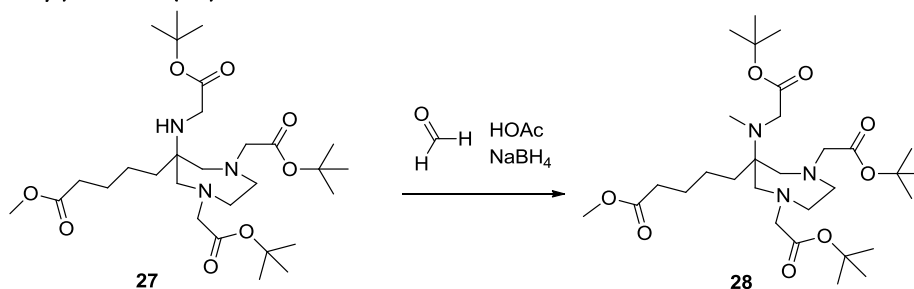


Abbildung 41: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (**28**)

Die Methylierung des sekundären, exozyklischenamins erfolgte über eine reduktive Aminierung (vgl. Abbildung 42). Hierzu wurde das **27** mit Formalinlösung vorgelegt, sodass sich das Iminiumion (**35**) ausbilden konnte. Die Zugabe von NaBH<sub>4</sub> und Essigsäure führte schließlich zum gewünschten Produkt (**28**) in quantitativen Ausbeuten.

Da die Reaktion verlässlich sehr gute Ausbeuten lieferte, wurde sie nicht weiter optimiert.

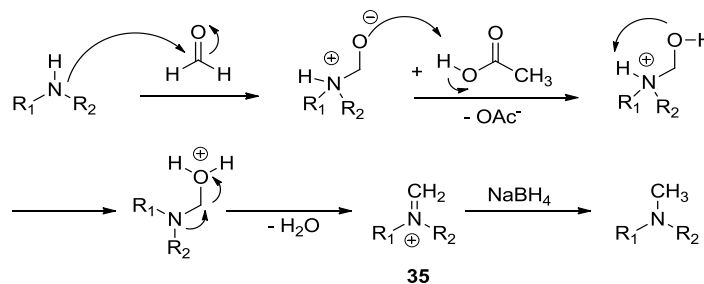


Abbildung 42: Mechanismus der reduktiven Aminierung

5-(1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-1,4-diazepan-6-yl)pentansäure (**18**)

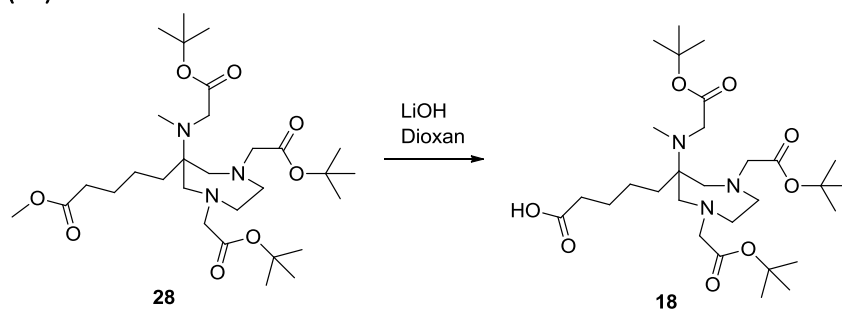


Abbildung 43: Darstellung von 5-(1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-1,4-diazepan-6-yl)pentansäure (**18**)

Die letzte Stufe der DATA<sup>5m</sup>-Synthese war die Entschützung des Methylesters. Dazu wurde **28** in eine Mischung aus Dioxan und einer 1 M LiOH-Lösung im Verhältnis 2:1 gegeben. Es wurden zunächst 1,5 eq. LiOH verwendet. In drei Schritten zu je 0,5 eq. wurde langsam weiteres LiOH zugegeben. Die Entschützung erfolgte bewusst sehr langsam, um die Abspaltung von *tert*-Butylgruppen zu vermeiden. Diese war massenspektrometrisch sehr gut zu beobachten, wenn die Zugabe des LiOH zu schnell erfolgte.

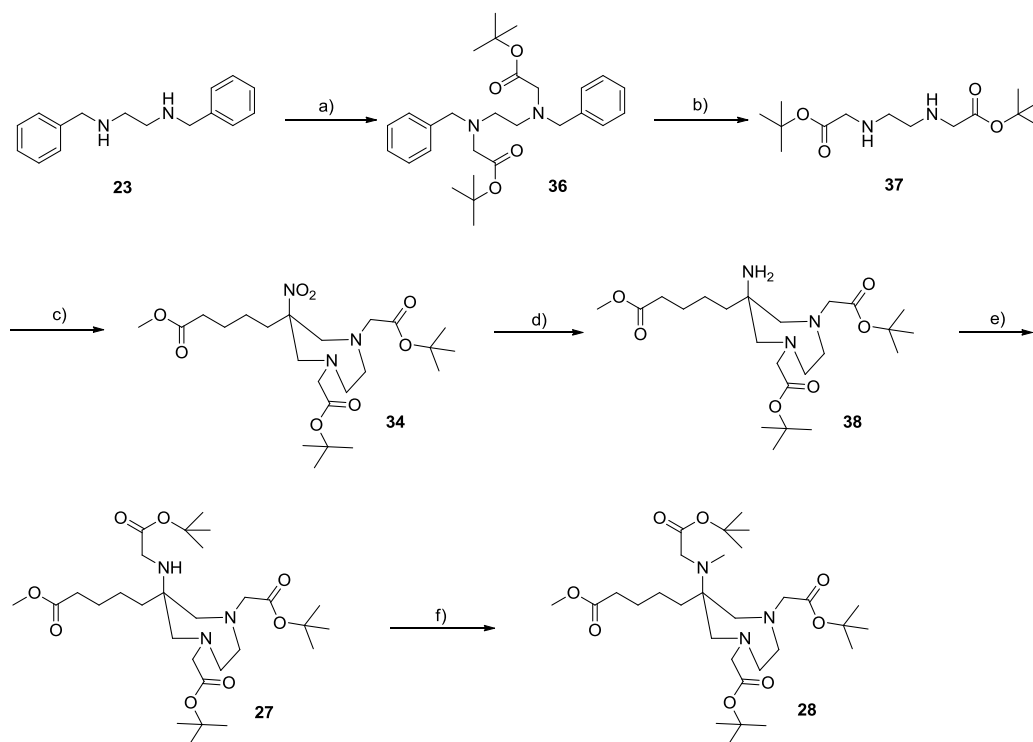
Die Ausbeuten bei dieser Reaktion waren moderat, was der teilweisen Entschützung der *tert*-Butylgruppen geschuldet ist. Diese ließ sich nicht vollständig unterdrücken, obwohl mit LiOH in Dioxan bereits sehr milde Bedingungen gewählt wurden. Bei Zugabe von weniger LiOH waren die *tert*-Butylgruppen stabil, jedoch wurden die Methylgruppen in diesem Fall nicht vollständig abgespalten. Die Schmälerung der Ausbeute durch eine teilweise Entschützung der *tert*-Butylester wurde dem unvollständigen Reaktionsablauf vorgezogen.

### DATA<sup>5m</sup>-Synthese (Route B)

Da es bei der oben beschriebenen DATA<sup>5m</sup>-Syntheseroute A einige Schwierigkeiten gab, welche besonders bei der Hydrierung und der Alkylierung auftraten, wurde eine alternative Syntheseroute B untersucht, welche auf Vorarbeiten von Philipp Spang und Johannes Nagel (Arbeitsgruppe Prof. F. Rösch, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) beruht. Sie ist in Abbildung 44 dargestellt.

Bei dieser Synthese sollte die Alkylierung der sekundären Amine und des exozyklischen Amins in zwei getrennten Schritten erfolgen. Dazu wurde zunächst das Benzyl-geschützte Ethylendiamin (**23**) mit *tert*-Butylbromoacetat in einer Substitution und einer folgenden Hydrierungsreaktion zu (**37**) umgeschützt, bevor die doppelte Mannichreaktion zum 1,4-Diazepan-Grundgerüst (**34**) durchgeführt wurde. Die Nitrogruppe wurde reduziert und es erfolgte die Alkylierung mit *tert*-Butylbromoacetat, sowie die reduktive Aminierung des exozyklischen Amins.

Diese Synthese wurde nur in sehr geringen Ansatzgrößen, als eine Art „*proof-of-concept*“, durchgeführt. Daher fehlt eine vollständige NMR-Analytik zu einigen Produkten. Auf den folgenden Seiten wird die Synthese genauer erläutert.



- a) *tert*-Butylbromoacetat,  $K_2CO_3$ , MeCN, RT  
 b)  $Pd(OH)_2/C$ ,  $H_2$  (1 bar), EtOH, HOAc, RT  
 c) Paraformaldehyd, Amberlyst A21, Nitrocyclohexanon, MeOH, 60 °C  
 d) Raney-Nickel,  $H_2$  (1 bar), HOAc, EtOH, RT  
 e) *tert*-Butylbromoacetat,  $K_2CO_3$ , MeCN, RT  
 f) Formalinlösung,  $NaBH_4$ , HOAc, RT

Abbildung 44: Alternative Syntheseroute B zum DATA<sup>5m</sup>

### Di-*tert*-butyl-*N,N'*-dibenzylethylendiamin-*N,N'*-diacetat (36)

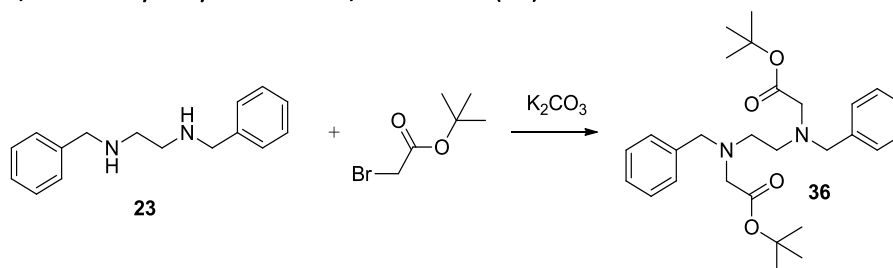
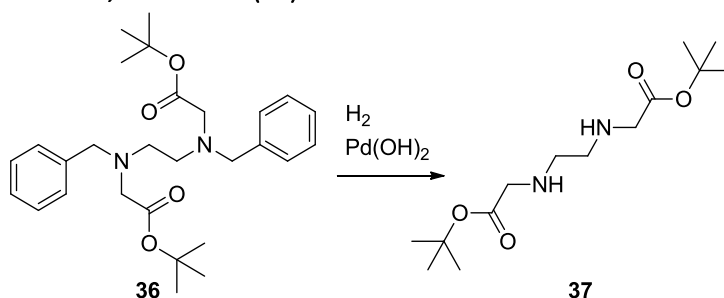


Abbildung 45: Darstellung von Di-*tert*-butyl-*N,N'*-dibenzylethylendiamin-*N,N'*-diacetat (36)

Für die Alkylierung des Diamins wurden Edukt, Alkylierungsreagenz und Base in Acetonitril gemischt. Die Reaktionskontrolle erfolgte via DC und massenspektrometrisch. Nach beendeter Reaktion und Filtration wurde das Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Als Base wurde das anorganische  $K_2CO_3$  gewählt, da es eine geringe Löslichkeit in Acetonitril hat, und daher nach abgeschlossener Reaktion sehr einfach entfernt werden kann.

Die Synthese verlief problemlos und wurde daher nicht weiter optimiert.

Di-tert-butyl-ethylendiamin-*N,N'*-diacetat (**37**)Abbildung 46: Darstellung von Di-tert-butyl-ethylendiamin-*N,N'*-diacetat (**37**)

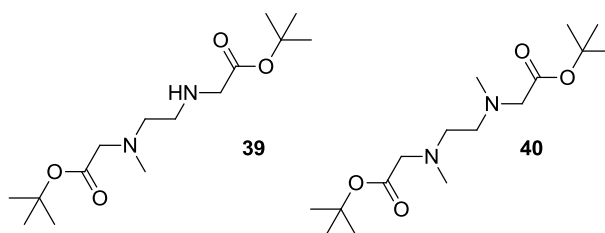
Für die hydrogenolytische Entfernung der Benzylschutzgruppen wurde das Edukt in Ethanol gelöst und mit Pd(OH)<sub>2</sub> und Essigsäure versetzt. Es wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre von 1 bar hydriert. Nach beendeter Reaktion wurde der Katalysator entfernt und es wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Bei dieser Reaktion wurden die Bedingungen mehrfach variiert, da die Umsetzung nicht sehr schnell und vollständig verlief. Es wurden verschiedene Lösungsmittel und Katalysatoren verwendet. Tabelle 5 fasst die untersuchten Reaktionsbedingungen zusammen.

Tabelle 5: Variationen der Reaktionsbedingungen bei der Hydrierung von **36**

Lösungsmittel	Katalysator	alkylierte Nebenprodukte
Methanol	Pd(OH) <sub>2</sub>	ja
Ethanol	Pd(OH) <sub>2</sub>	nein
Ethanol	Pd/C	nein

Alle hier aufgeführten Bedingungen lieferten das gewünschte Produkt. Bei der Verwendung von Methanol als Lösungsmittel verlief die Abspaltung der Schutzgruppen wesentlich schneller als bei Ethanol, jedoch traten methylierte Nebenprodukte auf (vgl. Abbildung 47). Wurde Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt, entstanden keine alkylierten Nebenprodukte.

Abbildung 47: Nebenprodukte bei der Hydrierung in Methanol von **36**

Der Vergleich zwischen den beiden Katalysatoren Pd(OH)<sub>2</sub> und Pd/C ergab keinen signifikanten Unterschied.

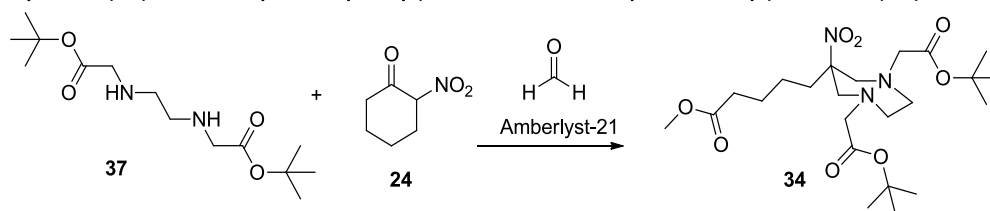
**Di-tert-butyl-2,2'-(6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-6-nitro-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (34)**

Abbildung 48: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-6-nitro-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (34)

Die doppelte Mannichreaktion wurde analog zu der bereits Beschrieben durchgeführt. Es wurde zunächst das Nitrocyclohexanon mit Methanol und Amerlyst A21 vorgelegt, sodass die Ringöffnung des zyklischen Ketons stattfinden konnte. Im Anschluss daran wurden **37** und Paraformaldehyd zugegeben, sodass das Diazepan-Grundgerüst (**34**) gebildet wurde.

Die Ausbeuten der Reaktion waren moderat, jedoch konnte das **34** in sehr guter Reinheit erhalten werden. Da wie bereits erwähnt, die alternative Syntheseroute nur ein „proof-of-concept“ sein sollte, wurde die Reaktion nicht weiter optimiert.

Bei dieser Reaktion konnte das Zwischenprodukt aus der Ringöffnungsreaktion, der 6-Nitrohexasäuremethylester (**29**), isoliert werden. Dieser wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$  identifiziert und anschließend weiter zum Diazepan umgesetzt.

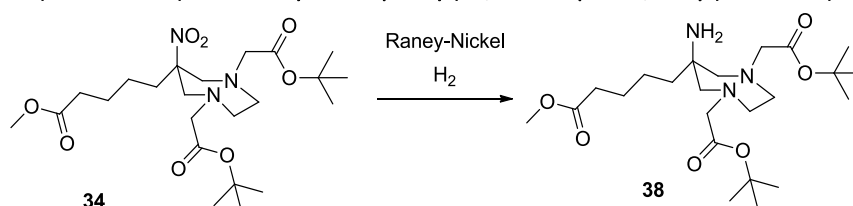
**Di-tert-butyl-2,2'-(6-amino-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (38)**

Abbildung 49: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-amino-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (38)

Die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin wurde mit Raney-Nickel und Essigsäure in Ethanol bei einem Partialdruck von 1 bar durchgeführt.

Es wurden verschiedene Katalysatoren, Lösungsmittel und Drücke miteinander verglichen, wobei sich herausstellte, dass die oben genannte Variante die verlässlichste war. Die verschiedenen untersuchten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Im Vergleich zu der Hydrierung von **25** (Route A) war die Umsetzung bei dieser Variante deutlich schlechter. Demzufolge brachte die alternative Syntheseroute bei der ohnehin schon problematischen Hydrierung keine Erleichterung.

In purem Methanol wurden bei der bereits beschriebenen Hydrierungsreaktion von **25** und **36** methylierte Nebenprodukte gefunden. Daher wurde bei der hier gezeigten Reaktion auf dieses Lösungsmittel verzichtet und stattdessen das weniger reaktive Ethanol verwendet. Da die Reaktion in purem Ethanol jedoch nicht vollständig verlief, wurden dem Ethanol wenige Anteile Methanol zugesetzt. Hier zeigte sich jedoch sehr schnell die Bildung der methylierten Spezies, weshalb diese Variation der Reaktionsführung nicht weiter verfolgt wurde.

Tabelle 6: Variationen der Reaktionsbedingungen bei der Reduktion von **34**

Lösungsmittel	Katalysator	p(H <sub>2</sub> )
Ethanol/Methanol 98/2	Pd(OH) <sub>2</sub>	1 bar
Ethanol/Methanol 100/0	Pd(OH) <sub>2</sub>	10 bar
Ethanol/Methanol 100/0	Raney-Nickel	1 bar
Ethanol/Methanol 100/0	Raney-Nickel	10 bar
Ethanol/Methanol 95/5	Raney-Nickel	1 bar
Ethanol/Methanol 95/5	Raney-Nickel	10 bar

**Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (**27**)**

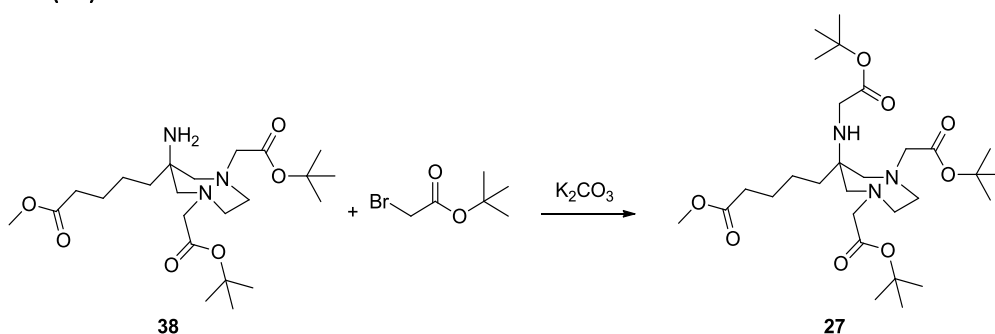


Abbildung 50: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (**27**)

Die Alkylierung des primären exozyklischen Amins wurde, wie die vorigen Alkylierungen, mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> als Base und *tert*-Butylbromoacetat in Acetonitril durchgeführt. Der Vorteil der anorganischen Base liegt hierbei vor allem darin, dass sie sich später durch Filtration einfach entfernen lässt, da ihre Löslichkeit in Acetonitril sehr gering ist.

Trotz genauer Einhaltung der Stöchiometrie konnte eine doppelte Alkylierung des primären Amins nicht verhindert werden. Dies kann man mit der vergrößerten Nucleophilie des sekundären Amins im Vergleich zum primären Amin erklären<sup>83-85</sup>. So entstand ein Produktgemisch aus verschiedenfach alkylierten Aminen.

Von dieser Stufe an erfolgte die Reaktion analog zu der bereits beschriebenen ursprünglichen Syntheseroute. Es schloss sich die Methylierung des exozyklischen Amins *via* reduktiver Aminierung an, sowie die Entschützung des Methylesters **28**.

Die alternative Syntheseroute B brachte gegenüber Route A nicht die erhofften Vorteile. In der nachfolgenden Tabelle 7 ist für die Mannichreaktion, die Reduktion bzw. Hydrierung und die Alkylierung des Diazepan-Gerüsts zusammengefasst, welche der jeweiligen Routen die besseren Resultate erzielte.

Tabelle 7: Vergleich der unterschiedlichen Syntheserouten für die Darstellung von DATA<sup>5m</sup> (**18**)

Reaktion	Bevorzugter Syntheseweg
Mannich-Reaktion	Route A
Reduktion/Hydrogenolyse	Route A
Alkylierung mit <i>tert</i> -Butylbromoacetat	sowohl Route A als auch Route B

Der Ringschluss zum Diazepan während der Mannichreaktion verlief bei Route A mit deutlich besseren Ausbeuten als bei Route B.

Die Reduktion der Nitrogruppe zum primären Amin verlief bei Route A wesentlich besser als bei Route B, in der dieser Schritt getrennt von der Abspaltung der Benzylgruppen durchgeführt wurde. Die *tert*-Butyl-geschützten Essigsäuregruppen scheinen die Reaktion negativ zu beeinflussen. Dabei spielt vermutlich die sterische Abschirmung der Nitrogruppe eine entscheidende Rolle. Bei Route A werden die Benzylgruppen bei der Hydrogenolyse abgespalten, bevor die Nitrogruppe reduziert wird. Dadurch ist jene für den Katalysator und den Wasserstoff sehr viel besser zugänglich, als bei Route B, bei der sich zwei *tert*-Butyl-geschützte Essigsäuren an den Aminen befinden.

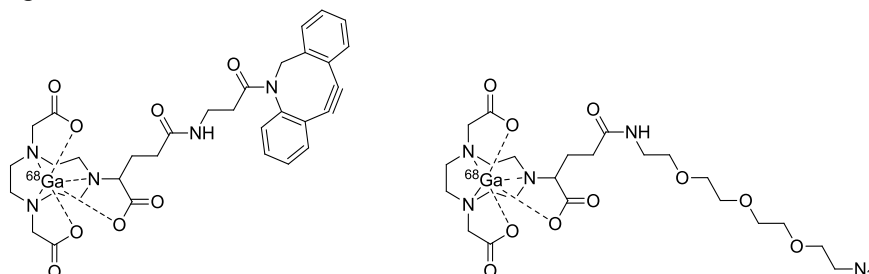
Auch die Alkylierung mit *tert*-Butylbromoacetat ließ sich durch das Aufteilen in zwei verschiedene Stufen nicht verbessern. Die einfache Alkylierung des primären, exocyclischenamins stellte sich auch bei Route B als große Herausforderung heraus, da sich das doppelt alkylierte Nebenprodukt bildete.

Da die neue Syntheseroute keine Verbesserung mit sich brachte, wurde das DATA<sup>5m</sup> für diese Arbeit ausschließlich über die alte Syntheseroute A dargestellt.

### 3.1.2 Radiochemische Experimente

Im nachfolgenden Kapitel wird die Radiomarkierung der clickfähigen Chelatoren mit  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$  diskutiert. Die Clickreaktionen mit den Chelatoren werden in den Kapiteln 3.2.2 und 3.3.1 beschrieben.

#### Radiomarkierung der NODA-GA-Derivate mit $^{68}\text{Ga}$



Die Radiomarkierung der NODA-GA-Derivate **4** und **15** wurde bei 45 °C in 0,2 M Natriumacetat-Puffer durchgeführt. Der pH-Wert des Puffers betrug vor der Zugabe der  $\text{N}_2$ -Lösung 4,5. Eine detailliertere Beschreibung der Durchführung der radiochemischen Experimente ist in Kapitel 5.3.1 zu finden.

Zunächst wurde in Kinetikstudien untersucht, ob die TEG-Azid-Einheit bzw. das DBCO das Markierungsverhalten der Chelatoren beeinflussen. In Abbildung 51 ist dieses Ergebnis dargestellt. Es ist jeweils die radiochemische Ausbeute (RCA) gegen die Zeit aufgetragen.

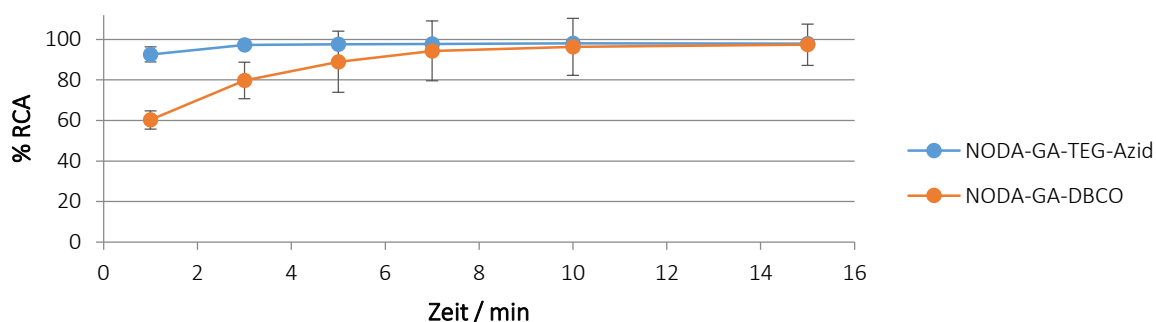


Abbildung 51: Kinetiken der NODA-GA-Derivate bei der Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$

Die beiden hier abgebildeten NODA-GA-Derivate unterscheiden sich recht deutlich in ihrer Markierungskinetik. Das Azido-Derivat komplexiert das Radiometall schneller als das DBCO-Derivat. Jedoch komplexieren beide Derivate das Radiometall nach 15 min Reaktionszeit mit über 90 % Ausbeute. Die verzögerte Kinetik des DBCO-Derivates wird mit der Größe und Hydrophobizität der DBCO-Funktionalität begründet, wodurch allein die Löslichkeit des Chelators stark verändert wurde.

Bei beiden Derivaten war die Markierungseffizienz stark abhängig von der eingesetzten Menge an Vorläufer. Diese Abhängigkeit wurde besonders deutlich, wenn Aktivitäten  $>80$  MBq verwendet wurden. Bei niedrigeren Aktivitäten konnten für 5, 10, 15 und 30 nmol kaum Unterschiede in der Ausbeute bzw. Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden. In Abbildung 52 ist dieser Sachverhalt exemplarisch am Azido-Derivat (**15**) gezeigt. Es wurde jeweils 1 mL NaOAc-Puffer (0,2 M, pH = 4,5) und eine Temperatur von 45 °C verwendet.

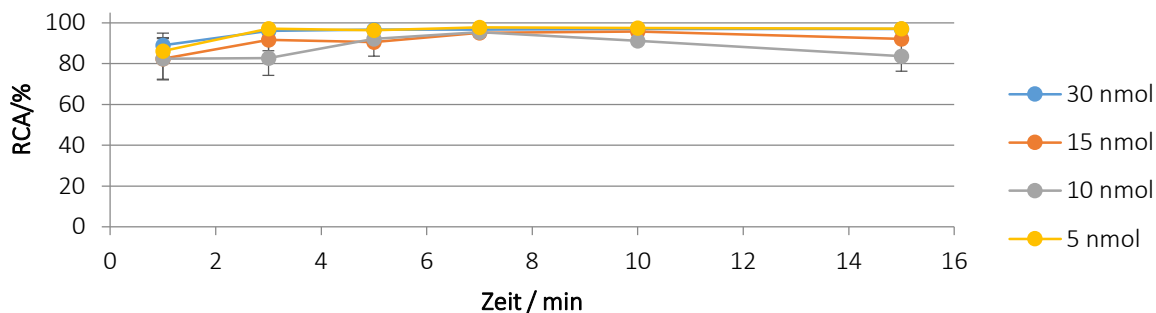


Abbildung 52: Einfluss verschiedener Stoffmengen von NODA-GA-TEG-Azid bei A = 50 MBq auf die Markierungsausbeute

Bei Erhöhung der Aktivitäten zeigte sich jedoch ein signifikanter Rückgang der Ausbeuten. Bei 200 MBq  $^{68}\text{Ga}$  zeigten 5 nmol des Azido-Derivates bei 45 °C nach 15 min nur noch eine RCA von 21 %. Erst eine deutliche Erhöhung der Temperatur auf 95 °C konnte die Ausbeuten auf das gewünschte Niveau anheben. Dies ist in Abbildung 53 gezeigt.

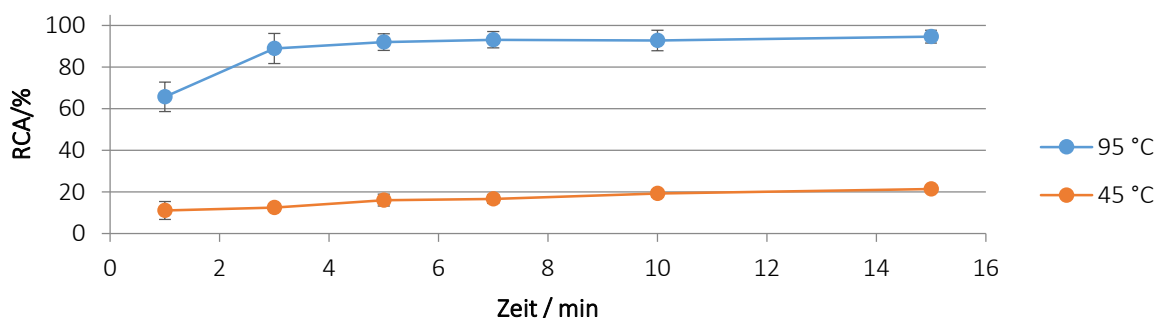


Abbildung 53: Einfluss verschiedener Temperaturen auf die RCA bei der Radiomarkierung von NODA-GA-TEG-Azid

Die schlechteren Ausbeuten bei größeren Aktivitäten lassen sich bei Betrachtung der Verhältnisse von Vorläufer zu Aktivität erklären. Bei der Verwendung von 5 nmol Vorläufer und 50 MBq  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , was einer Stoffmenge von 0,487 pmol Gallium entspricht, wird der Vorläufer im mehr als 10200-fachen Überschuss eingesetzt. Verwendet man statt 50 MBq die 4-fache Menge an  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , was einer Stoffmenge von 1,946 pmol entspricht, so liegt der Vorläufer nur noch im 2500-fachen Überschuss vor. Bei Radiomarkierungen sind Reaktionen pseudo erster Ordnung wünschenswert<sup>86</sup>, d.h., Reaktionen, bei denen die eine Komponente in so großem Überschuss vorliegt, dass ihre Konzentration im Reaktionsverlauf als konstant betrachtet werden kann. In diesem Fall gilt für die Konzentrationen des Radiometalls M, des Chelators C und des gebildeten Komplexes CM:

$$[\text{C}] \gg [\text{M}], \text{ sodass}$$

$$[\text{C}]_0 - [\text{CM}] \approx [\text{C}]_0$$

Für die hier beschriebene Radiomarkierung ist der 2500-fache Überschuss offenbar nicht ausreichend, um einen Verlauf pseudo erster Ordnung zu erzeugen.

Die clickfähigen NODA-GA-Derivate wurden entwickelt, um besonders milde Markierungsbedingungen sicherstellen zu können. Sie zeigen bei niedrigeren Temperaturen ein sehr viel besseres Markierungsverhalten als die entsprechenden DOTA-Derivate. Gerade für den Postlabeling-Ansatz ist es essenziell, Markierungsbedingungen zu wählen, unter denen das Polymer bzw. der Nanopartikel stabil bleiben und die Komplexbildung des Metalls dennoch gewährleistet ist. Demzufolge wurde auf die

Erhöhung der Temperatur bei dieser Radiomarkierung verzichtet, da sich vergleichbar gute Ausbeuten bei Erhöhung der Vorläufermenge einstellen.

Aufbauend auf diesem Resultat wurden sämtliche Radiomarkierungen der NODA-GA-Derivate mit 30 nmol Vorläufer durchgeführt, unabhängig von der Menge an eingesetzter Aktivität.

Um eventuell unkomplexiertes Gallium von der Reaktionsmischung abzutrennen, und um den Puffer zu entfernen, wurde die Lösung über eine Festphasenkartusche gereinigt. Für das lipophilere DBCO-Derivat wurde hierzu eine C8-Kartusche verwendet, für das TEG-Azid-Derivat eine C18-Kartusche, auf der sich der hydrophilere Chelator besser fixieren ließ. Die Wiederfindungsraten waren mit 84 % für NODA-GA-DBCO bzw. 90 % für NODA-GA-TEG-Azid sehr gut (vgl. hierzu auch Tabelle 11).

In Abbildung 54 ist das HPLC-Diagramm für  $[^{68}\text{Ga}]\text{NODA-GA-TEG-Azid}$  abgebildet, wie es aus der beschriebenen Kartuschenabtrennung erhalten wurde.

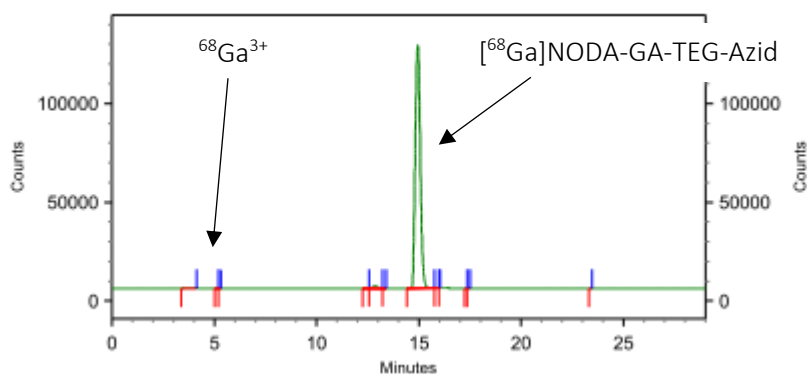


Abbildung 54: Radio-HPLC-Diagramm von  $[^{68}\text{Ga}]\text{NODA-GA-Azid}$  nach Kartuschenabtrennung

Der einzige Radiopeak erscheint bei 15 min. Bei 4 min, wo unkomplexiertes  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  zu erwarten ist, ist kein Ausschlag des Radiodetektors zu verzeichnen. Es ist folglich gelungen, das Produkt zu isolieren. Ebenso verhält es sich beim NODA-GA-DBCO-Derivat.

### Stabilitätstest der $[^{68}\text{Ga}]\text{NODA-GA-Komplexe}$

Die NODA-GA-Derivate wurden hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht. Dazu wurden jeweils 50  $\mu\text{L}$  der nach der Kartuschenreinigung erhaltenen Lösung in je 500  $\mu\text{L}$  Humanserum (HS), isotonische NaCl-Lösung und DTPA-Lösung gegeben. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Aliquots aus den jeweiligen Lösungen entnommen und mittels komplementärer Radio-DC oder Radio-HPLC analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 gezeigt. Es wird deutlich, dass das azidierte NODA-GA-Derivat unter allen getesteten Bedingungen sehr stabil ist. Die sehr kleinen Fehlerbalken für dieses Experiment mit  $n=3$  bestätigen das. Anders verhält es sich bei dem DBCO-Derivat. Dies erscheint in HS über 120 min zwar stabil, zeigt jedoch sowohl in NaCl-Lösung als auch in DTPA-Lösung verhältnismäßig geringe Stabilitäten. Hierbei ist besonders interessant, dass jeweils eine leichte Rekomplexierung des Radiometalls aufzutreten scheint. Allerdings sind die Fehlerbalken bei der DTPA-Lösung und besonders der Kochsalzlösung verhältnismäßig groß, sodass im Rahmen der Fehler nicht davon ausgegangen werden kann, dass das Radiometall wieder in den Komplex eingeschlossen wird. Dies wäre zudem sehr unwahrscheinlich, denn die Bedingungen, insbesondere der pH-Wert, während der Stabilitätstest sind nicht vergleichbar mit denen, welche während der Radiomarkierung vorliegen.

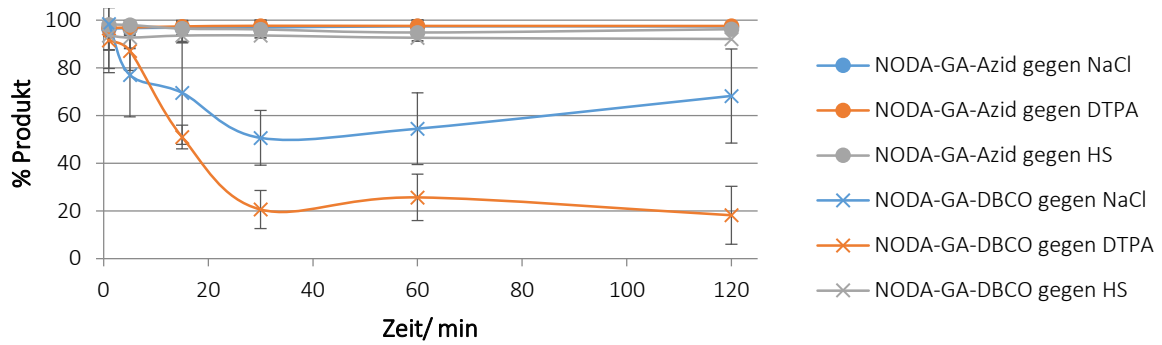


Abbildung 55: Stabilitätstest der  $[^{68}\text{Ga}]$ NODA-GA-Derivate in verschiedenen Medien bei 37 °C

Um die zum Teil recht großen Fehlerbalken zu erklären, können die HPLC-Diagramme zu Hilfe genommen werden, welche in den nachfolgenden Abbildungen gezeigt sind.

Interessanterweise zeigt das DBCO-Derivat in der NaCl-Lösung nicht nur eine Zunahme an freiem Gallium, sondern auch eine Zersetzung des Produkts (siehe Abbildung 56).

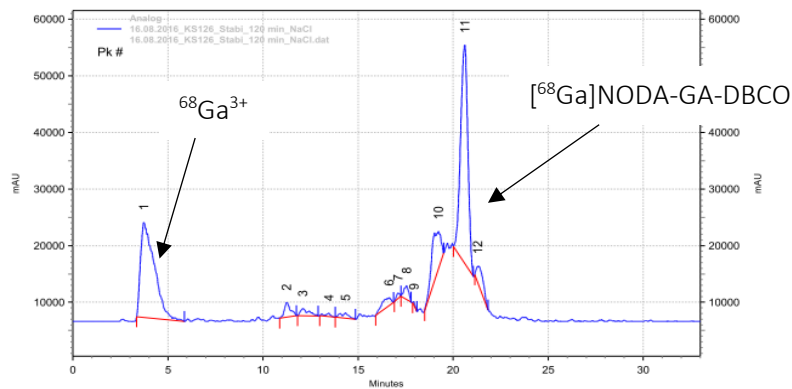


Abbildung 56: Radio-HPLC von  $[^{68}\text{Ga}]$ NODA-GA-DBCO in NaCl-Lösung nach 120 min bei 37 °C

Laut HPLC sind nur noch 41,33 % des Radiometalls in dem gewünschten Komplex eingeschlossen, wohingegen 34,56 % freies Gallium vorliegen. Die übrigen 24,11 % an Radioaktivität sind auf Zersetzungsprodukte verteilt, welche in dem HPLC-Diagramm deutlich zu sehen sind.

Solche Zersetzungsprodukte sind bei dem Transchelatierungsexperiment mit DTPA nicht aufgetreten. Hier sieht man sehr deutlich, dass das Radiometall durch das DTPA aus dem NODA-GA-DBCO-Komplex herausgelöst wird.

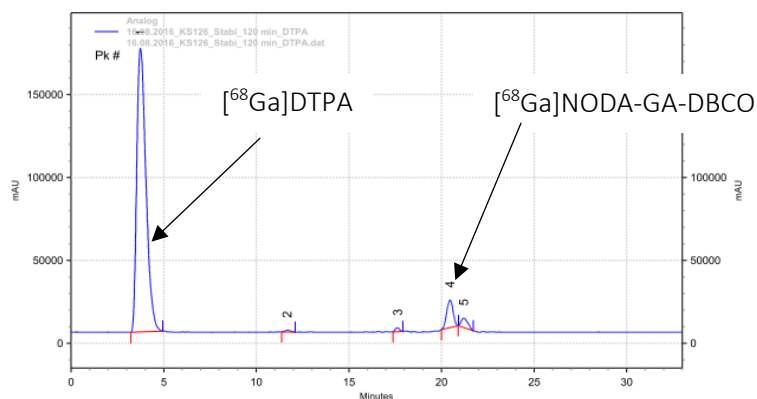


Abbildung 57: Radio-HPLC von  $[^{68}\text{Ga}]$ NODA-GA-DBCO in DTPA-Lösung nach 120 min bei 37 °C

Zum Vergleich wurde eine 0,01 M DTPA-Lösung mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert und unter denselben Bedingungen über Radio-HPLC analysiert. Die Retentionszeit des  $^{68}\text{Ga}$ ]DTPA betrug unter den gewählten Bedingungen (20-50 % MeCN, 0,1 % TFA in 20 min, 1 mL) 3,74 min und unterschied sich somit sehr deutlich von der des  $^{68}\text{Ga}$ ]NODA-GA-DBCO (20,46 min).

Die prozentualen Anteile von Produkt und DTPA-Komplex in der Radio-HPLC unterscheiden sich relativ deutlich von denen, welche aus den DC-Experimenten erhalten wurden, was ein Grund für die teilweise sehr großen Fehlerbalken ist. Diesen Sachverhalt kann man jedoch recht einfach erklären. Bei den Radio-DCs wird jeweils ein Laufmittel verwendet, bei welchem das freie Gallium auf der Basislinie verbleibt (1 M Ammoniumacetat-Lösung/Methanol im Verhältnis 1:1) und eines, bei welchem das freie Gallium an der Laufmittelfront zu sehen ist (0,1 M Citratpuffer, pH=4). Treten neben dem erwarteten Produkt-Signal noch weitere Signale auf, oder laufen mehrere Signale sehr dicht beieinander, so wird bei der DC die Interpretation relativ schwierig. Bei einer HPLC-Messung hingegen kann man die verschiedenen Signale viel deutlicher voneinander unterscheiden. Betrachtet man Abbildung 58, wird dieses Problem sehr deutlich. Zu sehen ist eine Ammoniumacetat/Methanol-DC des Transchelationsexperiments mit DTPA nach 120 min.

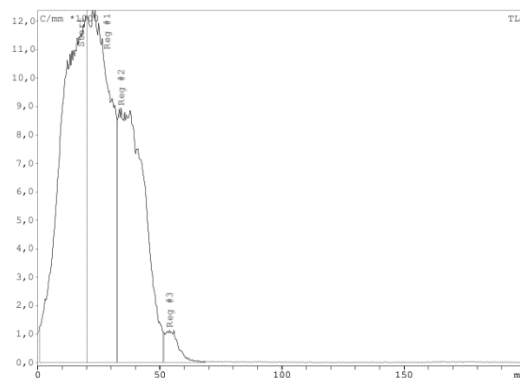


Abbildung 58: Ammoniumacetat/Methanol-DC der Transchelation von  $^{68}\text{Ga}$ ]NODA-GA-DBCO mit DTPA nach 120 min

Es fällt hier schwer, definierte Signale zu unterscheiden, da über die Aktivität über gesamte DC-Spur (0-65,5 mm) verteilt ist. Bei 10 mm wurde freies Gallium bzw. der  $^{68}\text{Ga}$ ]DTPA-Komplex erwartet und bei 35 mm wurde der  $^{68}\text{Ga}$ ]NODA-GA-DBCO-Komplex erwartet. Man kann bei dieser DC keine eindeutige quantitative Aussage darüber treffen, wie das Verhältnis von  $^{68}\text{Ga}$ ]NODA-GA-DBCO-Komplex zu  $^{68}\text{Ga}$ ]DTPA ist. Jedoch kann man qualitativ beurteilen, dass mehr als eine radioaktive Spezies vorhanden ist, was die Instabilität des untersuchten Komplexes nahelegt. Um eindeutige Aussagen treffen zu können, wurde bei jedem Experiment neben den komplementären DCs auch HPLC durchgeführt. Es wurde der Mittelwert aus den HPLC- und DC-Messungen gebildet, wobei jeweils eine Mehrfachbestimmung vorgenommen wurde.

Die Tatsache, dass  $^{68}\text{Ga}$ ]NODA-GA-DBCO in HS stabil erscheint, sich jedoch in isotonischer Kochsalzlösung zersetzt, lässt sich damit erklären, dass eine Zersetzung bzw. Dekomplexierung nur in einem solchen Maße stattgefunden haben kann, dass sie auf der DC nicht auffällig war. Da in Humanserum Komponenten wie Albumin enthalten sind, welche aufgrund ihres hohen Molekulargewichts die hier verwendete C18-HPLC-Säule nicht passieren können, wurde von den Serumstabilitätsproben keine Radio-HPLC angefertigt. Die Stabilität im Humanserum kann demzufolge nur auf Dekomplexierung des Radiometalls bezogen werden. Sollte das Radiometall nicht frei in Lösung, sondern gebunden an Proteine oder andere Bestandteile vorliegen, oder sollte der radiomarkierte Chelator sich zersetzen, würde dies auf einer DC eventuell nicht auffallen, sondern als vermeintliches Produkt identifiziert werden.

Die Daten für das azidierte NODA-GA-Derivat waren bei DC und HPLC übereinstimmend und zeigten, dass sowohl in HS, als auch in DTPA- und NaCl-Lösung keinerlei Verlust des Radiometalls zu beobachten war. Die HPLC-Diagramme für beide Lösungen sind in Abbildung 59 dargestellt.

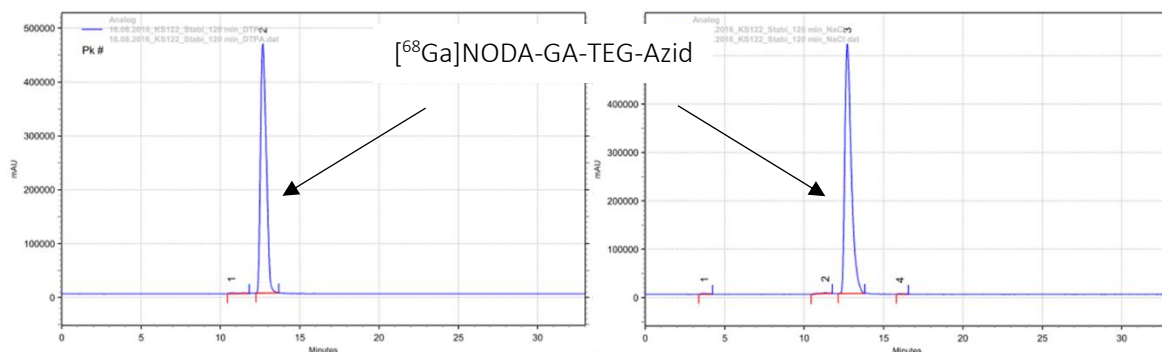
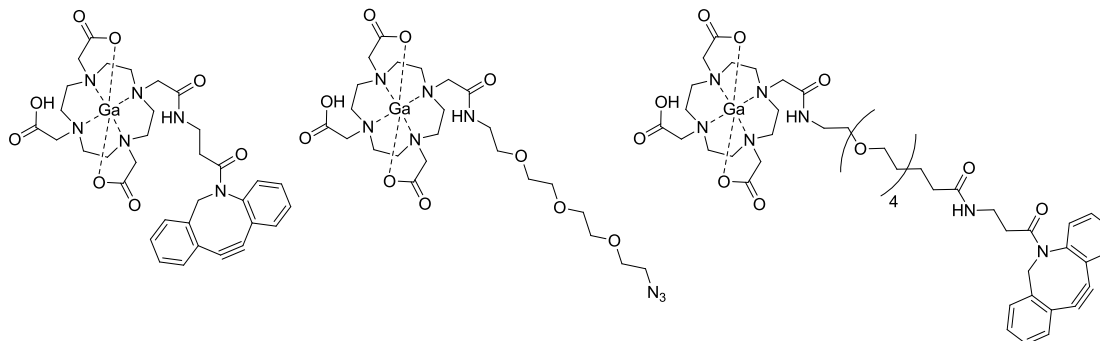


Abbildung 59: Radio-HPLCs von  $[^{68}\text{Ga}]\text{NODA-GA-TEG-Azid}$  in DTPA-Lösung (links) und NaCl-Lösung (rechts) nach 120 min

Zusammenfassend kann man sagen, dass die neu eingeführten Funktionalitäten die Radiomarkierung der NODA-GA-Chelatoren nicht wesentlich beeinträchtigen. Jedoch zeigte nur das azidierte Derivat ausgezeichnete Stabilitäten in den verschiedenen Medien, wohingegen das DBCO-Derivat Dekomplexierung und sogar teilweise Zersetzung zeigte.

### Radiomarkierung der DOTA-Derivate mit $^{68}\text{Ga}$



Zunächst wurde das Markierungsverhalten der DOTA-Derivate untersucht, um zu testen, wie sich die neu eingeführten Funktionen auf die Komplexbildung des Radiometalls auswirken. Dazu wurden 30 nmol des Vorläufers in 1 mL Natriumacetatpuffer bei 95 °C mit der vom Aceton befreiten N2-Lösung inkubiert. Die Ausbeuten wurden jeweils mit Radio-HPLC und komplementärer Radio-DC bestimmt. In Abbildung 60 sind die Kinetiken für die drei Derivate gezeigt.

Wie aus der Auftragung ersichtlich wird, zeigen alle DOTA-Derivate nach 15 min eine hervorragende Inkorporation des Radiometalls. Das Azido-Derivat hat die schnellste Kinetik, wohingegen das DBCO-PEG<sub>4</sub>-Derivat die langsamste Komplexbildung zeigt. Dies wird mit dem amphiphilen Charakter des Moleküls, sowie der Anwesenheit der Ethylenglykolkette erklärt. Da Gallium(III) eine harte Lewisäure und dadurch recht oxophil ist, kann es gut mit den Sauerstoffatomen der Oligoethylenglykoleinheit wechselwirken, bevor es von dem Makrozyklus stabil komplexiert werden kann. Dadurch ergibt sich die leichte Verzögerung bei der Komplexbildung.

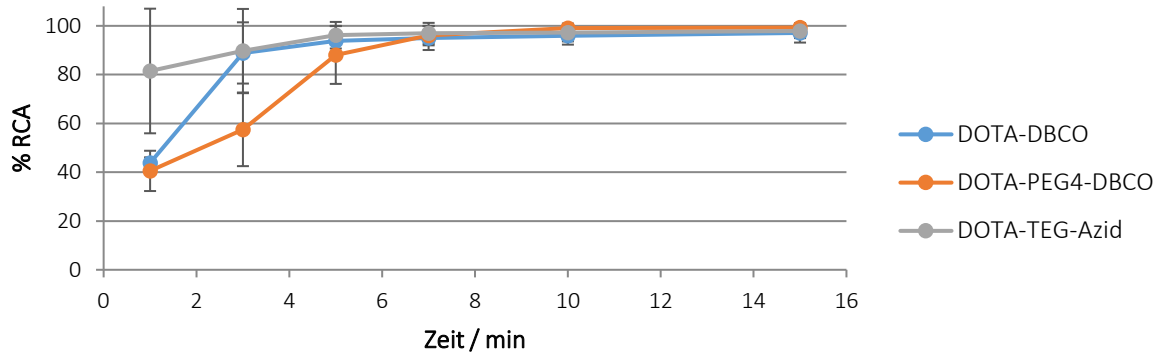


Abbildung 60: Kinetiken von DOTA-DBCO, DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO und DOTA-TEG-Azid bei der Radiomarkierung mit <sup>68</sup>Ga

In Abbildung 61 ist ein HPLC-Diagramm von DOTA-DBCO nach 15 min Reaktionszeit dargestellt. Es sind zwei Radiopeaks zu erkennen, welche freiem <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> (3,75 min) und dem markierten Produkt (13,25 min) zugeordnet werden konnten. Die Abtrennung von solch unkomplexiertem Gallium erfolgte über eine Festphasenkartusche, auf der das Galliumkation keine Retention hat, der Komplex jedoch fixiert wird. Dieser konnte mit Ethanol oder Aceton eluiert werden, welche sich im Anschluss daran schnell und einfach entfernen ließen.

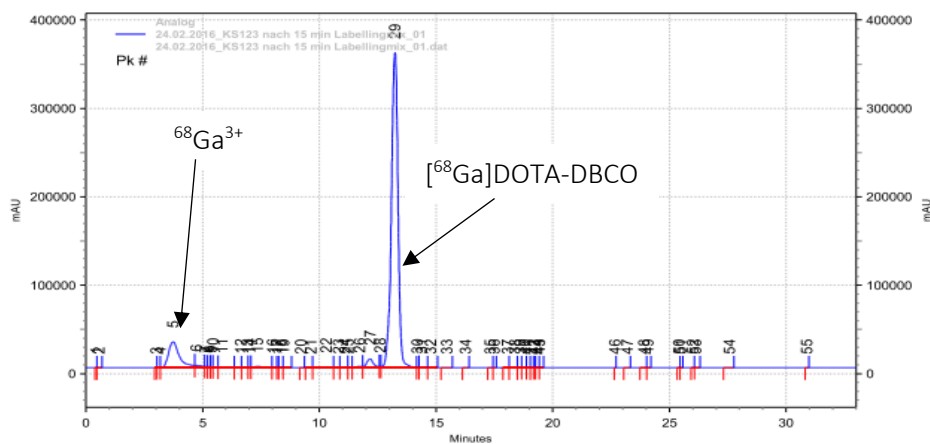


Abbildung 61: Radio-HPLC von [<sup>68</sup>Ga]DOTA-DBCO nach 15 min Reaktionszeit

Die folgende Abbildung 62 zeigt das Radio-HPLC-Diagramm von DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO nach 15 min Reaktionszeit und anschließender Kartuschenreinigung. Das unkomplexierte <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> konnte bis auf 3,13 % erfolgreich abgetrennt werden. In Nachbarschaft zu dem Produktpeak sind zwei sehr kleine Signale zu erkennen, die in Summe allerdings nur 5,65 % der gesamten Aktivität darstellen, weshalb sie vernachlässigt wurden. DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO hat mit 17,39 min aufgrund der stärkeren Wechselwirkung mit der stationären Phase eine längere Retentionszeit auf der HPLC-Säule als DOTA-DBCO.

Die Kartuschenreinigung erfolgte bei den beiden DBCO-Derivaten über eine C8-light-Kartusche und bei DOTA-TEG-Azid über eine C18-light-Kartusche. Für das Azido-Derivat und DOTA-DBCO waren die Wiederfindungsraten mit jeweils 76 % gut, das DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO hingegen zeigte mit nur 35 % moderate Wiederfindungsraten. Das Problem lag hierbei darin, dass das Molekül nach der Fixation auf einer C18-Phase nicht mehr eluiert werden konnte. Auf der C8-Phase hingegen war es nicht möglich, mehr als 50 % des Radiokomplexes zu fixieren.

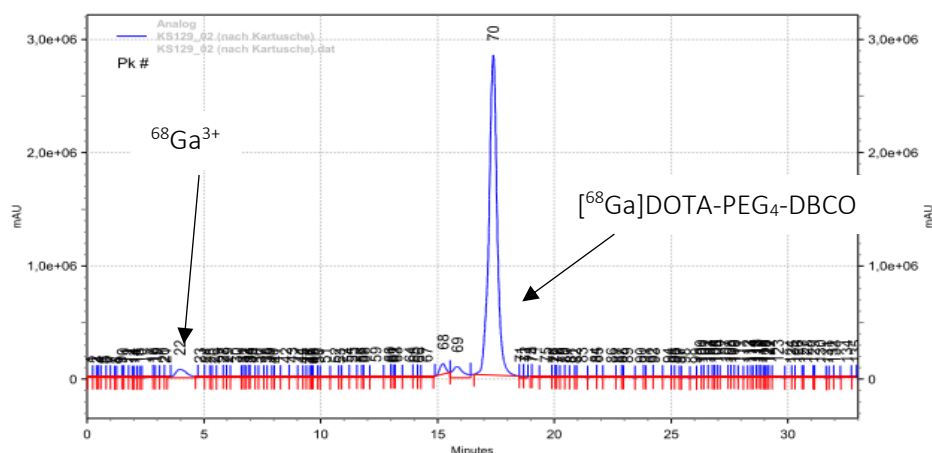


Abbildung 62: Radio-HPLC von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-PEG}_4\text{-DBCO}$  nach 15 min Reaktionszeit und Kartuschenabtrennung

Wie schon bei den NODA-GA-Derivaten, wurde auch hier festgestellt, dass die eingesetzte Menge an Vorläufer bei höheren Aktivitäten für die Ausbeute entscheidend war. Bei Aktivitäten von etwa 50 MBq waren keine Unterschiede in den Ausbeuten zu erkennen, wohingegen bei Aktivitäten >150 MBq eine Stoffmenge von 15 nmol Chelator nicht mehr ausreichend war, um RCAs von >40 % zu erreichen. Abbildung 63 zeigt exemplarisch für alle DOTA-Derivate am Beispiel des DOTA-DBCO eine Studie zum Einfluss der eingesetzten Stoffmenge auf die Ausbeuten bei der Radiomarkierung. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine Verdopplung von 15 nmol auf 30 nmol die Markierungseffizienz erheblich verbessert. Darauf aufbauend wurden alle folgenden Radiomarkierungen mit 30 nmol durchgeführt, um eine gleichbleibend gute RCA sicherzustellen.

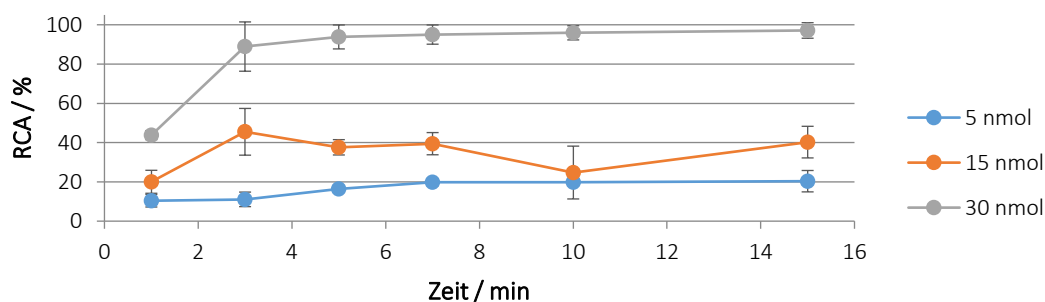


Abbildung 63: Einfluss der Stoffmenge des Vorläufers auf die Kinetik und RCA von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$

Die Begründung für dieses Resultat liegt, wie auch bei den NODA-GA-Derivaten, in der Veränderung der Reaktionskinetik durch die Vergrößerung des Überschusses der einen Komponente. Im Falle von 30 nmol eingesetzten Vorläufers kann die Reaktion nach pseudo erster Ordnung ablaufen, im Falle von 15 nmol Chelator reicht der Überschuss hierfür nicht aus, was sich in mäßig guten Ausbeuten niederschlägt.

Aus der Betrachtung der Kinetik-Studien geht hervor, dass sowohl beide DBCO-Einheiten als auch das Tetraethylglycol-Azid die Radiomarkierung nicht stören. Die drei Derivate liefern nach 15 min Reaktionszeit ausgezeichnete Ausbeuten.

### Stabilitätstest der $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-Komplexe}$

Stabilitätsstudien in HS und isotonischer NaCl, sowie Transchelatierungsexperimente mit DTPA-Lösung ergaben, dass DOTA-TEG-Azid auch nach 120 min noch etwa 90 % der Aktivität gebunden hatte. Dies ist

der Auftragung in Abbildung 64 zu entnehmen. Die sehr kleinen Fehlerindikatoren bestätigen die gute Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse.

Wie schon bei  $[^{68}\text{Ga}]\text{NODA-GA-DBCO}$  ist auch die Stabilität des  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  besonders in der DTPA-Lösung weniger gut. Interessant ist auch hier wieder die vermeintlich gute Stabilität des Komplexes in HS. Da die DTPA- und NaCl-Proben jeweils zusätzlich zu den komplementären DCs mittels Radio-HPLC analysiert wurden, die HS-Proben jedoch nicht (s.o.), kann unter Umständen eine Dekomplexierung oder Zersetzung des Produkts im HS nicht auffallen.

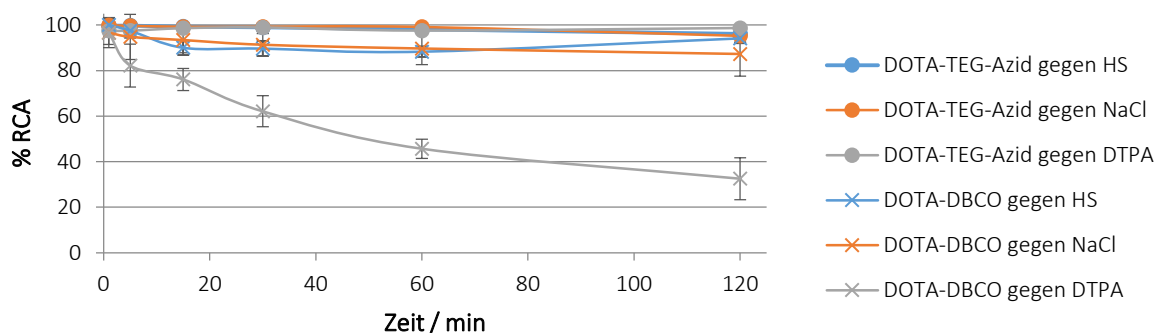


Abbildung 64: Stabilitätstest von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-TEG-Azid}$  und  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  in verschiedenen Medien bei 37 °C

In Abbildung 65 ist das Radio-HPLC-Diagramm von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-TEG-Azid}$  gezeigt, welches nach erfolgreicher Kartuschenabtrennung in eine DTPA-Lösung eingebracht wurde. Es konnte kaum Transchelatierung beobachtet werden. Zur Kontrolle wurde eine 0,01 M DTPA-Lösung mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert und unter denselben Bedingungen über Radio-HPLC analysiert. Die Retention des  $[^{68}\text{Ga}]\text{DTPA}$ -Komplexes beträgt unter den gewählten Bedingungen 4,26 min (10-70 % MeCN, 0,1 % TFA in 20 min, 1 mL). Daher lässt sich  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-TEG-Azid}$  sehr gut von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DTPA}$  unterscheiden. Nach 120 min waren 92 % der Aktivität in dem  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-TEG-Azid}$ -Komplex gebunden, 5 % entfielen auf das  $[^{68}\text{Ga}]\text{DTPA}$ . Die übrigen 3 % des  $^{68}\text{Ga}$  wurden in dem Signal bei 12,31 min gefunden. Aufgrund der geringen Menge wurde dieses Signal vernachlässigt.

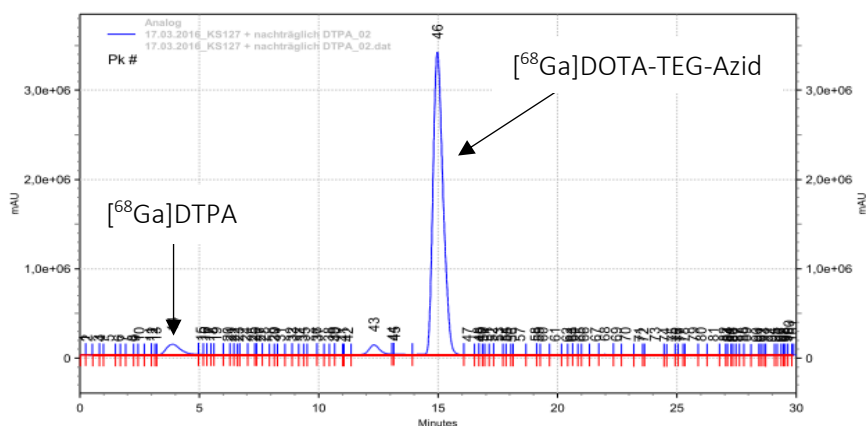


Abbildung 65: Radio-HPLC von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-TEG-Azid}$  nach 120 min bei 37 °C in DTPA-Lösung

Da DOTA-DBCO z.T. bei Temperaturen  $>37$  °C geklickt wurde (vgl. Kapitel 3.2.2 und 3.3), wurden die Stabilitätstests für dieses Derivat, sowie für DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO zusätzlich bei 70 °C durchgeführt. Als Medium wurde hierbei PBS-Puffer verwendet, da dieser das Lösungsmittel der Click-Reaktion war.

In Abbildung 66 ist das Radio-HPLC-Diagramm von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  nach 40 min bei 70 °C in PBS-Puffer gezeigt.

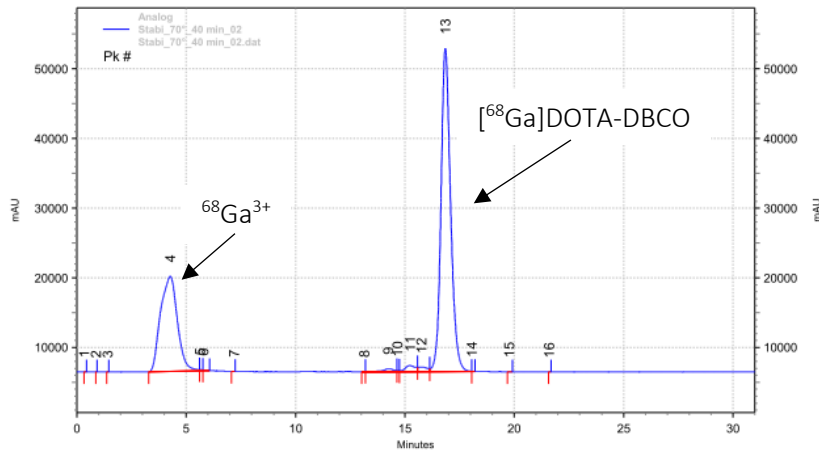


Abbildung 66: Radio-HPLC von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  nach 40 min bei 70 °C in PBS-Puffer

In dieser sehr kurzen Zeitspanne von nicht einmal einer Halbwertszeit sind nur noch 65 % der Aktivität in dem gewünschten Komplex gebunden. Nach 90 min (vgl. Abbildung 67) werden nur noch weniger als 40 % des Radiometalls von dem Makrozyklus komplexiert.

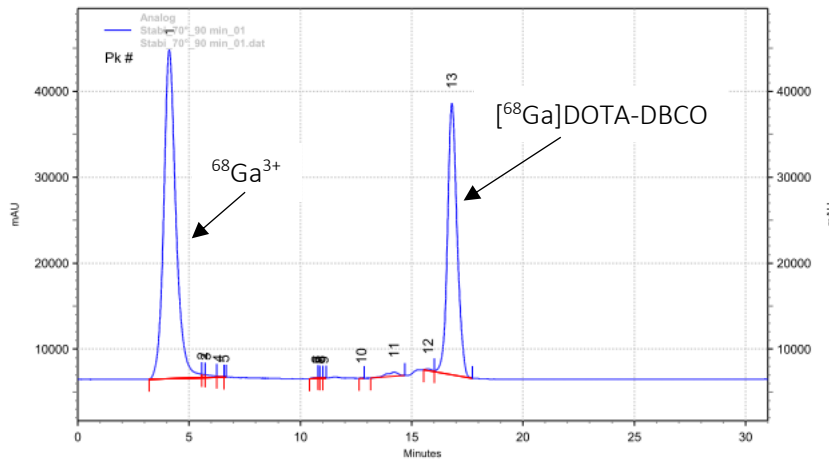


Abbildung 67: Radio-HPLC von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  nach 90 min bei 70 °C in PBS-Puffer

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei 55 °C gemacht werden, wobei hier die Verdrängung des Metalls aus dem Komplex nur 30 % nach 90 min betrug. Auch in anderen Medien (DTPA-Lösung, s.o.), sowie während der eigentlichen Clickreaktion (vgl. Kapitel 3.2.2 und 3.3) konnte stets nach einer gewissen Zeit die Freisetzung von Gallium aus dem Komplex beobachtet werden. Dies trat bei beiden DBCO-Derivaten auf, unabhängig davon, ob NODA-GA oder DOTA das Grundgerüst darstellten. Die azidierten Chelatoren zeigten jedoch keinerlei Transchelatierung oder anderweitige Freisetzung des Radiometalls. Da die Versuchsdurchführungen jeweils identisch waren, wurde ein systematischer Fehler (z.B. durch Eisenkontaminationen in einer der Lösungen) ausgeschlossen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Transchelatierung sogar verstärkt dann auftrat, wenn ein Clickpartner in der Reaktionslösung anwesend war. Dies war unabhängig von der Größe der clickfähigen Komponente. Verglichen wurden die Azid-funktionalisierten anorganischen Nanopartikel (vgl. Abschnitt 3.2.2), Polysarcosin-Homopolymere mit Azid als Endgruppe (vgl. Abschnitt 3.3.1) und einfaches  $\text{NaN}_3$ . Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei clickfähigen Systemen.

Abbildung 68 zeigt dieses Phänomen am Beispiel des Natriumazids nach 30 min.

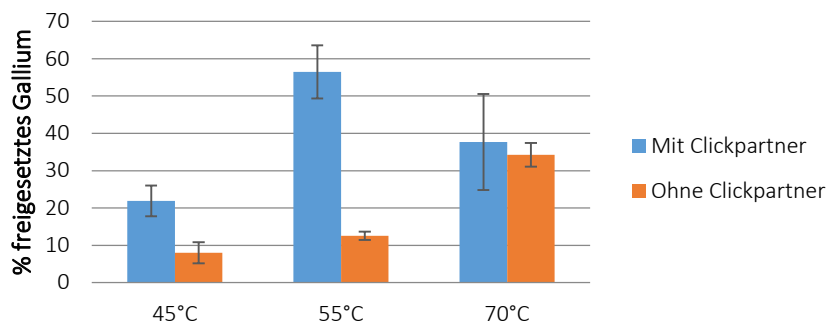


Abbildung 68: Freisetzung von  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  aus  $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-DBCO bei 45 °C, 55 °C und 70 °C in PBS-Puffer bzw. in PBS-Puffer mit  $\text{NaN}_3$  nach 30 min

Es fallen signifikante Unterschiede bei der Menge an freigesetztem Gallium auf. Bei den Proben ohne  $\text{NaN}_3$  wird erwartungsgemäß bei 70 °C das meiste Gallium aus dem Komplex herausgelöst. Bei den Proben mit  $\text{NaN}_3$  wird der Unterschied zwischen 55 °C und 70 °C im Rahmen der Fehler deutlich geringer. Vergleicht man die einzelnen Lösungen bei den jeweiligen Temperaturen, so fällt auf, dass der Unterschied zwischen der Probe mit Azid-Komponente und der Probe ohne Azid-Komponente bei 55 °C am größten ist. Bei 45 °C ist die Freisetzung des Metalls aus dem Komplex ohne das Einwirken des Azids so gering, dass die Zugabe von  $\text{NaN}_3$  recht deutlich ins Gewicht fällt. Bei 70 °C findet die Dekomplexierung bereits ohne  $\text{NaN}_3$ -Anwesenheit in so großem Ausmaß statt, dass sich die Zugabe der clickfähigen Komponente nicht mehr so stark auf die Freisetzung des Metalls auswirkt.

Da die Temperatur und die Clickreaktion einen sehr großen Einfluss auf die Stabilität des Radiometallkomplexes haben, kann das Gallium im DOTA-DBCO bzw. NODA-GA-DBCO nicht so stabil koordiniert sein, wie in unmodifiziertem DOTA bzw. NODA-GA. Die Tatsache, dass während der Clickreaktion verstärkt die Freisetzung von Gallium beobachtet werden kann, selbst dann wenn die Temperatur nicht erhöht wurde, kann verschiedene Ursachen haben.

In nicht-derivatisiertem DOTA hat Gallium eine  $\text{N}_4\text{O}_2$ -Koordination, wobei das Gallium verzerrt oktaedrisch von den vier Aminengruppen des Makrozyklus und zwei der vier Carbonsäuren umgeben ist. Hierzu wurden 2006 von Viola *et al.*<sup>35,87</sup> und 2008 von Maecke *et al.*<sup>88</sup> Komplexstrukturen veröffentlicht, welche dies belegen. In Abbildung 69 ist die Struktur, die Viola *et al.* veröffentlicht haben, gezeigt.

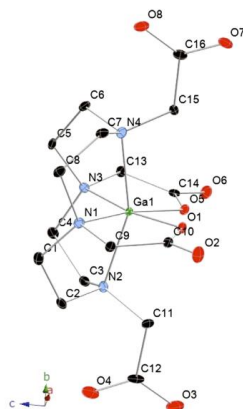


Abbildung 69: Struktur des  $[\text{Ga}(\text{HDOTA})\cdot 5,5 \text{H}_2\text{O}]$ -Komplexes. Wassermoleküle und Protonen sind der Übersicht halber nicht dargestellt<sup>35,87</sup>.

Es ist möglich, dass die recht große und hydrophobe DBCO-Struktur die vollständige und korrekte Komplexierung des Galliums behindert, sodass nicht alle dafür vorgesehenen Amine und Carbonsäuren

das Metallkation koordinieren können. Es resultiert eine unvollständige oder eine für das Gallium ungünstige Koordination, was jedoch zunächst auf der Radio-HPLC bzw. –DC nicht sichtbar ist. Dort wird der Anschein erweckt, die Reaktion sei zufriedenstellend abgelaufen. Während der Stabilitätstests allerdings wird das unzureichend gebundene Gallium frei, und erscheint auch auf der Radio-DC bzw. Radio-HPLC.

Es ist allerdings auch möglich, dass die DBCO-Einheit nicht nur die Koordination durch den Liganden behindert, sondern selbst an der Komplexbildung beteiligt ist. Die Koordination von d-Metallen durch Acetylene ist literaturbekannt<sup>89–93</sup>, und wurde von Ryu *et al.* 2004 bei Clickreaktionen als hinderlich beschrieben<sup>94</sup>. Sollte das Gallium mit dem DBCO eine solche koordinative Bindung eingehen, wäre es durchaus möglich, dass diese durch Änderungen in der Konformation des DBCOs während der Clickreaktion gebrochen würde, was die Stabilität des Komplexes beeinträchtigen würde. Da während der Clickreaktion andere Bedingungen herrschen als während der eigentlichen Radiomarkierung (pH-Wert, Temperatur), ist es möglich, dass das  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Ion nun nicht mehr vollständig durch den Chelator gebunden werden kann. Die Freisetzung des Metallkations wäre die Folge.

Da die lipophile und sterisch recht anspruchsvolle DBCO-Einheit eine stabile Komplexbildung des  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  verhindert, wurde ein DBCO-Derivat synthetisiert, bei welchem sich statt des Ethylen-Linkers zwischen dem DBCO und dem Chelator ein PEG<sub>4</sub>-Linker befindet. Es sollte ein größerer Abstand zwischen der komplexbildenden Einheit und dem DBCO entstehen, damit die Bildung des Komplexes vollständig und ungehindert stattfinden kann. Dieses Konzept der „Linker“ (oder „Spacer“) findet sehr oft Anwendung, wobei Linker oftmals dazu verwendet werden, die Pharmakokinetik des Targetingvektors nicht durch das Chelatorgerüst zu beeinträchtigen<sup>32</sup>. Allerdings bewirkt der Linker gleichzeitig auch, dass die komplexbildenden Eigenschaften des Chelators unverändert bleiben.

Die Radiomarkierung dieses Derivats wurde bereits erläutert.

[ $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO wurde ebenfalls bei 70 °C in PBS-Puffer auf seine Stabilität untersucht. Das HPLC-Diagramm für diesen Test ist in folgender Abbildung 70 gezeigt. Man sieht nach 90 min nur noch 7,29 % der Aktivität gebunden in dem Komplex vorliegen. Es bilden sich zwei radioaktive Spezies, die sehr ähnliche Retentionszeiten (3,32 min und 3,79 min) aufweisen und nicht näher evaluiert wurden.

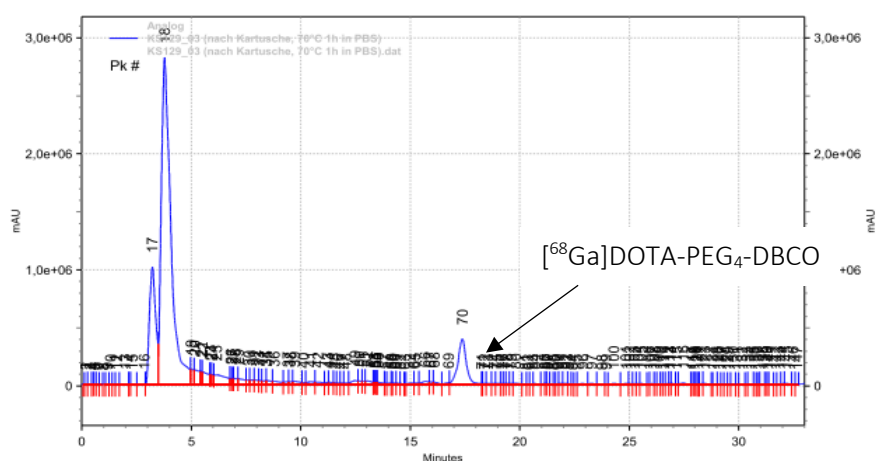


Abbildung 70: Radio-HPLC von DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO nach Kartuschenabtrennung und 90 min bei 70 °C in PBS-Puffer

Der neue Linker bewirkt demzufolge keine Verbesserung der Komplexbildung, sondern vergrößert die Labilität der Gallium-Koordination. Dies kann an der Oligoethylenglykol-Struktur liegen. Da Gallium oxophil ist, kann es durch die PEG<sub>4</sub>-Einheit des Linkers koordiniert werden, weshalb es nicht mehr für eine Koordination durch den Makrozyklus zur Verfügung steht. Da die Komplexbildung durch die vier

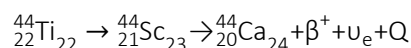
Sauerstoffatome des Linkers nicht der für das Gallium optimalen oktaedrischen entspricht, ist sie weniger stabil, was sich sehr deutlich in den Resultaten der Stabilitätstest widerspiegelt.

Auf Grundlage dieses Resultats wurde die Evaluierung dieses Derivates beendet. Es wurden keine Click-Reaktionen durchgeführt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die DOTA-Derivate sich hervorragend mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkieren lassen. Jedoch zeigen die DBCO-Derivate eine unerwünschte Freisetzung des Radiometalls. Das azidierte DOTA hingegen ist unter allen getesteten Bedingungen äußerst stabil.

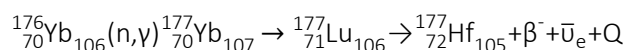
### Radiomarkierungen mit längerlebigen Nukliden

Da die Halbwertszeit des  $^{68}\text{Ga}$  mit 67,7 min längere Reaktionszeiten mit diesem Nuklid ausschließt, wurden neben Radiomarkierungen mit  $^{68}\text{Ga}$  auch Radiomarkierungen mit  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$  durchgeführt.  $^{44}\text{Sc}$  hat eine Halbwertszeit von 3,97 h<sup>95</sup>, und ist somit sehr gut dafür geeignet, nach der eigentlichen Markierungsreaktion weitere Reaktionen anzuschließen. Es ist als Tochter des  $^{44}\text{Ti}$  aus dem  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generator verfügbar, wie er 2010 von Filosofov *et al.* vorgestellt wurde<sup>96</sup> und eignet sich mit einem Ionenradius von 88,5 pm<sup>97</sup> sehr gut für DOTA-basierte Chelatoren.  $^{44}\text{Sc}$  zerfällt zum stabilen  $^{44}\text{Ca}$ , wie die untenstehende Gleichung verdeutlicht.



Seine  $\beta_{\text{max}}$ -Energie von 1,47 MeV ist etwas niedriger als die des  $^{68}\text{Ga}$ , und mit 94 %  $\beta^+$ -Anteil ist  $^{44}\text{Sc}$  ein ideales PET-Nuklid. Das Mutternuklid  $^{44}\text{Ti}$  wird aus  $^{45}\text{Sc}$  über eine (2p,n)-Kernreaktion hergestellt.

$^{177}\text{Lu}$  ist ein  $\beta^-$ -Emitter, und damit ein Therapienuklid. Es hat eine Halbwertszeit von 6,7 d und emittiert  $\gamma$ -Strahlung mit einer Energie von u.A. 112,9 keV und 208,4 keV<sup>14,22</sup>. Dadurch ist es für SPECT zugänglich. Es gibt zwei verschiedene Produktionsrouten für dieses Isotop. Es kann über eine (n, $\gamma$ )-Kernreaktion aus  $^{176}\text{Lu}$  hergestellt werden oder es kann *no carrier added* (n.c.a.) von  $^{177}\text{Yb}$  abgetrennt werden, welches in einer Kernreaktion hergestellt wird. Wie aus folgender Gleichung zu entnehmen ist, ist das Zerfallsprodukt des  $^{177}\text{Lu}$  ist das  $^{177}\text{Hf}$ .



Diese Route wurde 2000 von Lebedev *et al.* vorgestellt und erweist sich als elegante Alternative zu der Herstellung am Reaktor, da deutlich höhere spezifische Aktivitäten erreicht werden können<sup>98</sup>.

Lutetium als 14. Element der Lanthanide weist eine abgeschlossene f-Schale auf, hat die bevorzugte Oxidationsstufe +3 und hat einen Ionenradius von 89,1 pm<sup>97,99</sup>. Daher ist es für Komplexierungen durch den Makrozyklus DOTA sehr gut geeignet.

Es sollte untersucht werden, wie sich die clickfähigen Chelatoren bei der Radiomarkierung mit  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$  verhalten. Außerdem sollten die sich anschließenden Clickreaktionen mit längeren Reaktionszeiten durchgeführt werden, als es mit  $^{68}\text{Ga}$  möglich war. Die Resultate aus den Clickreaktionen werden in Kapitel 3.3 diskutiert.

Die Radiomarkierungen mit  $^{44}\text{Sc}$  wurden mit 30 nmol DOTA-DBCO bzw. 30 nmol DOTA-TEG-Azid in 1 mL Ammoniumacetatpuffer (0,25 M; pH = 4,0) bei 95 °C durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels Radio-DC analysiert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 71 dargestellt.

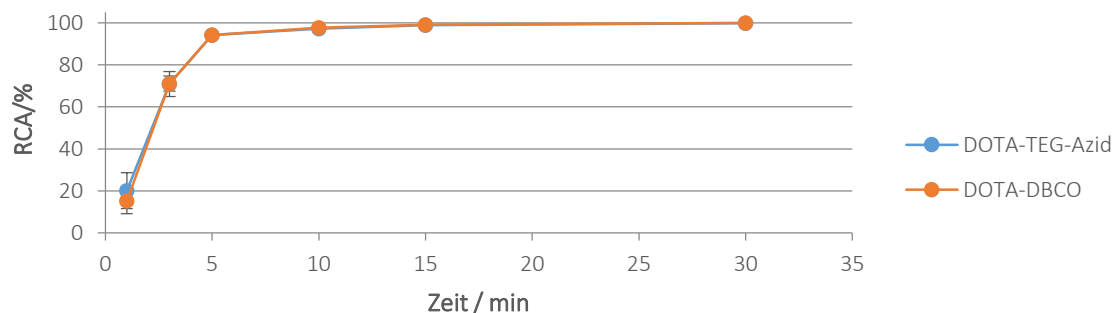


Abbildung 71: Kinetikstudie für die Radiomarkierung von DOTA-DBCO und DOTA-TEG-Azid mit <sup>44</sup>Sc

Die Radiomarkierung verlief sehr schnell und war nach 15 min bereits quantitativ. Dabei unterscheiden sich die beiden DOTA-Derivate in ihrem Markierungsverhalten nahezu gar nicht. Die sehr kleinen Fehlerbalken bestätigen die gute Reproduzierbarkeit dieser Reaktion.

Für die Radiomarkierung der DOTA-Derivate mit <sup>177</sup>Lu wurden jeweils 30 nmol Vorläufer in 1 mL Natriumacetat-Puffer (0,2 M; pH=4,5) vorgelegt und es wurden 92-97 MBq <sup>177</sup>Lu<sup>3+</sup> zugegeben und bei 95 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels Radio-DC analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 72 gezeigt.

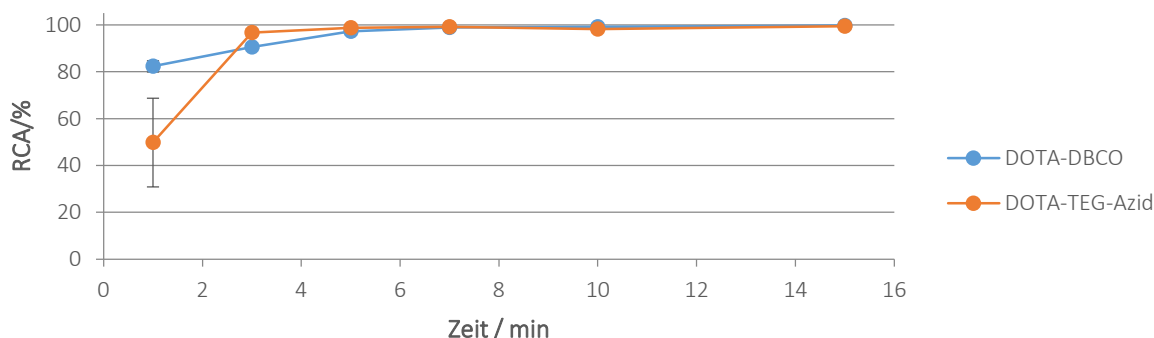


Abbildung 72: Kinetik der Radiomarkierung von DOTA-DBCO und DOTA-TEG-Azid mit <sup>177</sup>Lu

Die zwei DOTA-Derivate zeigen nach 15 min Reaktionszeit quantitative Markierungseffizienzen. Dabei komplexiert das Azido-Derivat das Radiometall langsamer, jedoch nicht weniger effizient als das DBCO-Derivat. Abgesehen von dem relativ großen Fehler bei dem 1 min-Wert sind die anderen Fehlerindikatoren sehr klein, was die gute Reproduzierbarkeit dieser Radiomarkierungen unterstreicht.

In Abbildung 73 sind die Ergebnisse der Markierungskinetiken für DOTA-DBCO und DOTA-TEG-Azid mit allen drei Radiometallen zusammengefasst. Die Radiomarkierungen mit <sup>44</sup>Sc sind am langsamsten, was jedoch nach 7 min nicht mehr ins Gewicht fällt.

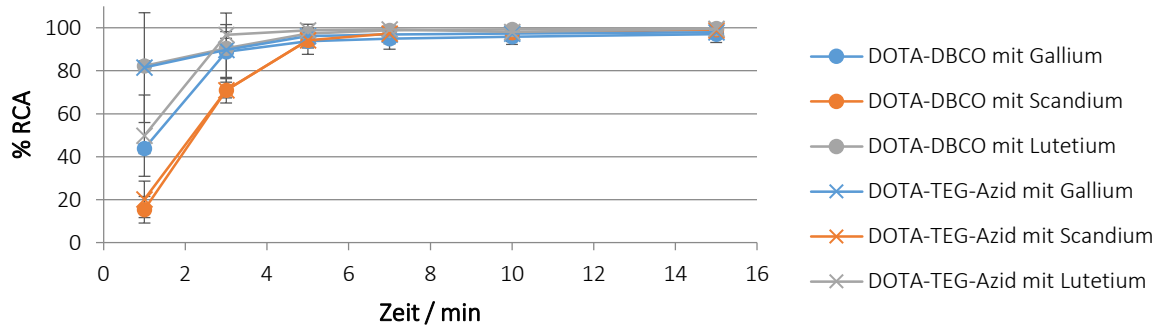


Abbildung 73: Vergleich der Kinetiken von DOTA-DBCO und DOTA-TEG-Azid mit  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  und  $^{177}\text{Lu}$

Alle hier verwendeten Radionuklide liefern sehr gute und vielversprechende Ergebnisse bei der Komplexierung mit den DOTA-Derivaten.

### 3.2 Anorganische Nanopartikel

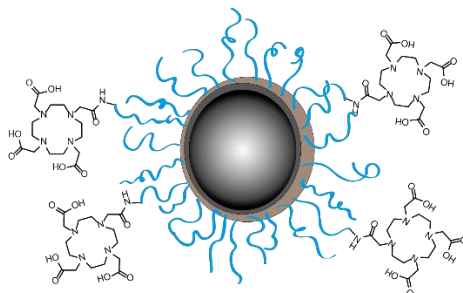


Abbildung 74: Vereinfachte schematische Darstellung eines Eisenoxidpartikels mit Polymerhülle und angebundenem DOTA

Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Funktionalisierung, Radiomarkierung und Evaluierung von verschiedenen anorganischen Nanopartikeln. Es wurden unterschiedliche Strategien und Reaktionsarten zur Anbindung von DOTA und NODA-GA an die Partikeloberfläche miteinander verglichen. Dabei wurde unter anderem untersucht, ob es bezüglich der Ausbeuten und Reinheiten eine bevorzugte Reihenfolge von Partikelcoating und Kopplung des Chelators an das Coating-Polymer gibt. Es wurden Variationen der Spacerlängen bei Kopplung über Amidbindung angewendet und die clickfähigen Chelatoren (vgl. Abschnitt 3.1) wurden auf ihre Anwendung hin getestet.

Die Partikel bestehen jeweils aus einem anorganischen Kern und einer Polymerhülle. Diese ist für die Wasserlöslichkeit der Systeme sehr wichtig und erleichtert die Derivatisierung mit den komplexbildenden Strukturen. Es wurden  $\text{TaO}_x$ -,  $\text{Fe}/\text{Fe}_x\text{O}$ -, und  $\text{FePt}@/\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Partikel verwendet, die von der Arbeitsgruppe Prof. W. Tremel (Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert und charakterisiert worden waren. Als Polymerhülle wurden für die  $\text{TaO}_x$ -Partikel silanisierte PEG-Derivate verwendet und für die eisenbasierten Nanopartikel wurden Catechol-funktionalisierte PEG-Derivate verwendet (siehe Abbildung 75). Die Polymere trugen jeweils primäre Amine oder Methoxyfunktionen und wurden im Verhältnis 1:9 eingesetzt, sodass davon auszugehen war, dass 10 % der Partikeloberfläche Amine trug.

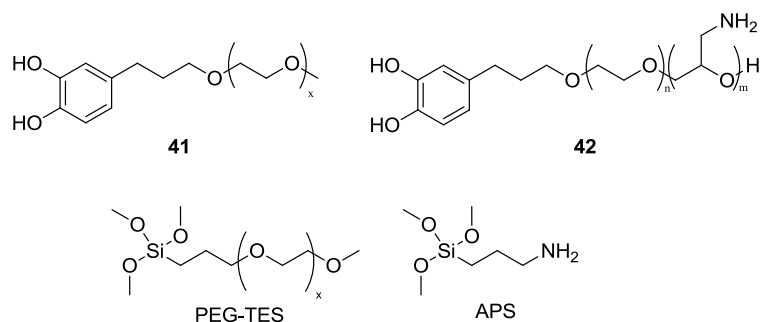


Abbildung 75: Oberflächenfunktionalisierungen mit Methoxyfunktion und mit Amonifunktion. Oben Catechol-funktionalisierte PEG-basierte Polymere, unten PEG-TES und  $\gamma$ -Aminopropylsilan (APS)

Freie Amine auf der Oberfläche von Partikeln sind sehr gut in der Lage,  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  zu komplexieren und rufen somit eine Konkurrenzreaktion zur Komplexierung durch den eigentlichen Chelator hervor<sup>100</sup>. Es wurde vermutet, dass man diese Konkurrenzreaktion und eine daraus resultierende unspezifische Bindung vermeiden kann, indem man den Aminanteil gering hält (vgl. hierzu auch Abschnitt 3.2.2). Zusätzlich zu den Amino-funktionalisierten Polymeren wurden daher auch Methoxy-funktionalisierte Polymere verwendet. Um die Zugänglichkeit der Aminofunktionen sicherzustellen, wurden Polymere verschiedener Längen verwendet. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Endgruppen der längeren Polymere aus der Korona herausragen, sodass sie für die weitere Umsetzung leichter zugänglich sind. Es wurden Amino-funktionalisierte Polymere mit einer Kettenlänge von 120 Ethylenglycoleinheiten

verwendet, wohingegen die Methoxy-funktionalisierten Polymere nur eine Kettenlänge von 32 Ethylenglycoleinheiten hatten.

In folgender Abbildung 76 sind TEM-Bilder der beiden hier verwendeten eisenhaltigen Nanopartikel gezeigt. Links sind die Januspartikel  $\text{FePt}@Fe_3O_4$  zu sehen, bei denen  $Fe_3O_4$  auf  $FePt$  „aufgewachsen“ ist. Im rechten Bild sind Core-Shell-Partikel abgebildet, bei welchen die Oberfläche von Eisenpartikeln zu  $FeO_x$  oxidiert wurde. Dadurch ergibt sich ein Eisenkern mit einer Eisenoxidhülle.

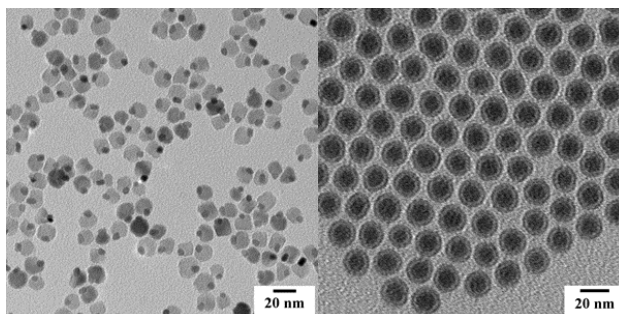


Abbildung 76: TEM-Bilder von  $\text{FePt}@Fe_3O_4$  (links) und  $Fe/Fe_xO$ -Partikeln (rechts)

### 3.2.1 Organische Synthesen

Zunächst wird die nasschemische Anbindung von Chelatoren an verschiedene polymergecoatete anorganische Nanopartikel über Amidbindungen beschrieben.

#### Anbindung von DOTA und NODA-GA an polymergecoatete Nanopartikel

Eine etablierte Möglichkeit der Amidbindungsknüpfung ist der Einsatz von Carbonsäure-Aktivestern. Diese setzen die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs deutlich herauf und ermöglichen dadurch den Angriff des Amins<sup>48,49,78</sup> (vgl. hierzu auch Kapitel 1.2.1). Dabei besteht die Möglichkeit, den Reaktivester *in situ* herzustellen, oder direkt als isoliertes Edukt einzusetzen.

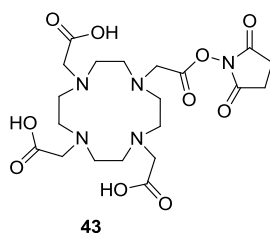


Abbildung 77: DOTA-NHS-Ester (43)

Der *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) des DOTA wurde in der Form wie er in Abbildung 77 gezeigt ist als isoliertes Edukt verwendet. Der Aktivester ist nur an einer der vier Säurefunktionen eingeführt worden, wodurch sichergestellt wird, dass drei der vier Carbonsäuren nach der Knüpfung der Amidbindung noch für die Komplexierung des Radiometalls zur Verfügung stehen. Dadurch, dass nur einer der vier Carbonylkohlenstoffe für den Angriff durch das Amin aktiviert ist, ist der Einsatz von Schutzgruppen für die anderen drei Säurefunktionen nicht notwendig, was einen großen Vorteil darstellt.

Für die Berechnung der Ansätze wurde davon ausgegangen, dass 1 mg Partikel etwa 1,6  $\mu\text{mol}$  primäre Amine enthält.

Die wässrig dispergierten Nanopartikel wurden mit DOTA-NHS-Ester versetzt, der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt und die Reaktionsmischung wurde für einige Stunden bei 40 °C belassen. Die

Reaktionskontrolle mittels DC erwies sich als nicht aussagekräftig, da entsprechend den Erwartungen weder das DOTA noch die Nanopartikel einen  $R_f$ -Wert  $>0$  aufwiesen. Durch die drei freien Carbonsäuren wechselwirkt der Chelator sehr stark mit der Kieselgeloberfläche der DC-Platte, sodass er selbst durch sehr hydrophile mobile Phasen und Zusatz von Base oder Säure nicht mobilisiert werden konnte.

Es war jedoch möglich, mit Hilfe der Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}$  festzustellen, ob die Kopplung des Chelators an die Partikel stattgefunden hatte (vgl. hierzu Kapitel 3.2.2). Somit wurde die Radiomarkierung auch als indirekte analytische Methode angewendet.

Um nicht-gekoppelten Chelator aus der Reaktionslösung abzutrennen, wurden verschiedene Methoden getestet und miteinander verglichen. Zunächst wurde einfache Zentrifugation angewendet. Hierbei wurde die jeweilige Partikellösung bei 9500 rpm für unterschiedlich lange Zeiträume zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils re-suspendiert und ebenfalls erneut zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Es konnte jedoch nicht in allen Fällen ein sichtbares Pellet erhalten werden, was insbesondere von der Menge der eingesetzten Partikel abhängig war. Daher wurde dem Gemisch vor der Zentrifugation THF zur Fällung zugesetzt. Auch dies führte bei Proben mit geringer Partikelmenge nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen, weshalb die Zentrifugation nicht als zuverlässige Aufreinigungsmethode für diese Proben identifiziert wurde. Da die Partikel extra aus Gründen der besseren Wasserlöslichkeit ein Polymercoating auswiesen, war das Ausfällen mit verschiedenen Lösungsmitteln nicht erfolgreich. In den seltenen Fällen, in denen eine Fällung erreicht werden konnte, war das Re-suspendieren nicht mehr möglich.

Reproduzierbare Ergebnisse konnten mit Hilfe von Dialyse erreicht werden. Hierbei wurde die Kopplungsmischung über eine 0,1-0,5 kDa-Membran dialysiert, wodurch die Menge an freiem Chelator deutlich reduziert, jedoch nicht vollständig eliminiert werden konnte. Für den Erfolg der Dialyse ist ein häufiges Wechseln des Filtrats sehr wichtig, da die Dialyse ein Diffusionsprozess ist, der entlang eines Konzentrationsgefälles abläuft. Je größer dieses Gefälle ist, desto effektiver verläuft sie, und je mehr niedermolekulare Substanzen die Membran passiert haben, desto kleiner wird das Konzentrationsgefälle. Das Filtrat wurde gesammelt, durch Lyophilisieren aufkonzentriert und mittels LC/MS massenspektrometrisch analysiert. So wurde festgestellt, dass das Filtrat DOTA enthielt, der DOTA-NHS-Ester konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Da es sich lediglich um eine massenspektrometrische Analyse gehandelt hat, ist nicht auszuschließen, dass in der Lösung noch intakter Aktivester enthalten war. Jedoch ist davon auszugehen, dass der NHS-Ester zu einem maßgeblichen Teil durch Hydrolyse in das freie DOTA überführt wurde.

Die Reproduzierbarkeit der Anbindung des Chelators über NHS-Ester war nicht zufriedenstellend, weshalb die Reaktionsbedingungen weiter optimiert wurden. Dazu wurden verschiedene Reaktionszeiten, Temperaturen, Puffer, pH-Werte und verschiedene Konzentrationen bzw. Stöchiometrien miteinander verglichen. Außerdem wurde die gleiche Reaktion mit NODA-GA-NHS-Ester durchgeführt, um auszuschließen, dass das Chelatorgrundgerüst selbst einen Einfluss auf die Reaktion hat. Die gewünschte Knüpfung der Amidbindung war jedoch nur in wenigen Proben zu beobachten (vgl. hierzu Tabelle 8), und es konnte bestätigt werden, dass dies unabhängig davon stattfand, ob DOTA- oder NODA-GA-NHS-Ester eingesetzt wurden. In Tabelle 8 sind die Temperatur und die Reaktionsdauer der Übersicht halber nicht angeführt. Es wurde jeweils mit den Parametern 40 °C für 16 h begonnen. Nach erfolgter Kontrolle wurde die Temperatur in 10 °C-Schritten im Abstand von 24 h auf maximal 90 °C erhöht. Zwei der hier gezeigten Ansätze wurden mit DMSO als Lösungsmittel und dem Zusatz von Base und Kopplungsreagenz durchgeführt. Dies erfolgte aufgrund der Tatsache, dass der Aktivester im wässrigen, leicht basischen Milieu sowie im Säuren zur Hydrolyse neigt<sup>46,47</sup>. Die Zugabe von Kopplungsreagenzien sollte zur *in situ* Bildung eines Aktivesters führen und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Kopplungsreaktion steigern.

Tabelle 8: Studie der Amidbindungsknüpfung über NHS-Ester

Menge Partikel (Stoffmenge Amin)	eq. DOTA-NHS-Ester (* = NODA-GA statt DOTA)	gesamtes Volumen	Lösungsmittel (pH-Wert)
500 µg (0,8 µmol)	3 eq.	1000 µL	Phosphatpuffer (7,8)
500 µg (0,8 µmol)	3 eq.	1500 µL	Phosphatpuffer (7,8)
500 µg (0,8 µmol)	3 eq.	1500 µL	Phosphatpuffer (9,2)
500 µg (0,8 µmol)	5 eq.	1500 µL	Phosphatpuffer (7,8)
500 µg (0,8 µmol)	8 eq.	1500 µL	Phosphatpuffer (7,8)
500 µg (0,8 µmol)	8 eq.*	1500 µL	Phosphatpuffer (7,8)
800 µg (1,28 µmol)	6 eq.*	1500 µL	Phosphatpuffer (8,9)
1000 µg (1,6 µmol)	4 eq.	1000 µL	Phosphatpuffer (7,8)
1000 µg (1,6 µmol)	4 eq.	1000 µL	DMSO + HATU + DIPEA
1500 µg (2,4 µmol)	8 eq.	3500 µL	Phosphatpuffer (8,5)
3000 µg (4,8 µmol)	3 eq.	3500 µL	Carbonatpuffer (8,3)
3000 µg (4,8 µmol)	3 eq.	1000 µL	DMSO + HATU + Collidin

Aufgrund der Hydrolyseanfälligkeit des NHS-Esters wurde auf Grundlage der oben durchgeführten Studie die Reaktionsführung vollständig auf die Verwendung von Kopplungsreagenzien und aprotischem LM umgestellt. Anstelle des wässrigen Puffers wurde das aprotische DMSO verwendet und anstelle von DOTA-NHS-Ester wurde dreifach *tert*-Butyl-geschütztes DOTA benutzt (DOTA-tris-(*t*Bu)<sub>3</sub>). Um die Reaktivität der Carbonsäure zu steigern, sollte sie *in situ* mit HATU zum Aktivester umgesetzt werden. Hierbei wurde DIPEA als Base verwendet. Da die drei Carbonsäuren, welche nicht für die Kopplung vorgesehen waren, mit *tert*-Butylgruppen geschützt waren, erfolgte vor der Reaktionskontrolle durch Radiomarkierung immer eine Entschützung. Hierzu wurde jeweils ein Aliquot des Reaktionsgemischs mit Wasser gequenchet, vom LM befreit und mit TFA versetzt. Es wurde für 16 h bei RT gerührt und anschließend mit Wasser verdünnt. Nach Entfernen des LM schloss sich Dialyse an und es folgte die Reaktionskontrolle.

Auch bei dieser Vorgehensweise zeigte sich kein Umsatz. Darum wurde auch hier ein Vergleich von verschiedenen Stöchiometrien von Base, Kopplungsreagenz, Chelator und Partikeln vorgenommen. Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der Reaktionstemperatur und -dauer, sowie der Einfluss des Kopplungsreagenzes selbst. Es konnte nur in wenigen Fällen eine erfolgreiche Kopplung nachgewiesen werden, wobei kein Zusammenhang zur Reaktionsführung zu erkennen war. Jedoch war bei allen Ansätzen auch nach intensiver Dialyse der Probe freies DOTA bei der Radiomarkierung zu erkennen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Dialyse nicht vollständig verlaufen war. Es kann allerdings auch darauf hindeuten, dass sich DOTA-Moleküle nicht-kovalent an die Oberfläche der Partikel angelagert haben, und unter den Bedingungen der Radiomarkierung wieder freigesetzt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Systems HATU/DIPEA das gewünschte Kopplungsprodukt lieferte. Das EDC/HOBt-System hingegen führte zu keiner nachweisbaren Kopplung. Anzumerken ist hierbei, dass bei der Reaktion mit EDC und HOBt keine Base zugesetzt wurde, da das EDC selbst die Carbonsäure deprotonieren kann.

Auch eine Verlängerung der Reaktionsdauer und eine Erhöhung der Temperatur zeigten keine Auswirkung auf den Erfolg der Reaktion.

Die folgende Tabelle 9 fasst die verschiedenen Reaktionsführungen zusammen.

Tabelle 9: Studie der verschiedenen Kopplungsreagenzien und Stöchiometrien

Menge Partikel (Stoffmenge Amin)	DOTA-tris- ( <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub>	Kopplungs- reagenz	Base	Volumen	Kopplung
750 µg (1,12 µmol)	16 eq.	24 eq. HOBt 24 eq. EDC	-	1550 µL	nein
750 µg (1,12 µmol)	16 eq.	24 eq. HATU	24 eq. DIPEA	1550 µL	nein
750 µg (1,12 µmol)	16 eq.	31 eq. HATU	62 eq. DIPEA	2000 µL	nein
750 µg (1,12 µmol)	16 eq.	64 eq. HATU	128 eq. DIPEA	2000 µL	ja
1400 µg (2,24 µmol)	8 eq.	12 eq. HATU	23 eq. DIPEA	2000 µL	ja
1500 µg (2,4 µmol)	3 eq.	6 eq. HATU	25 eq. DIPEA	1000 µL	nein
1500 µg (2,4 µmol)	16 eq.	24 eq. HATU	24 eq. DIPEA	1000 µL	ja
3000 µg (4,8 µmol)	3 eq.	3 eq. HATU	10 eq. Collidin	1000 µL	nein

Es ist keine Systematik zu erkennen, die erklärt, unter welchen Bedingungen die Reaktion erfolgreich verläuft.

Ähnliche Schwierigkeiten wurden von Tu *et al.* beschrieben, die *p*-SCN-Bn-DOTA an Silikon-Quantumdots anbinden wollten. Sie gingen davon aus, dass für die schlechten Ausbeuten bei der Kopplung der kurze *p*-SCN-Bn-Linker verantwortlich sei und synthetisierten daher ein DO3A-Derivat mit einem Butylaminlinker. Sie konnten so die vermuteten sterischen Hinderungen umgehen und den Chelator erfolgreich anbinden<sup>101</sup>. Auf Grundlage dieser Arbeit wurde ein DOTA-Derivat synthetisiert, bei welchem ein Essigsäurearm durch einen Butansäurearm ersetzt wurde. Durch die Verlängerung des Linkers sollten eventuelle sterische Hinderungen vermieden und die Anbindung erleichtert werden. Die Synthese dieses Derivats wird im Folgenden beschrieben.

#### Tri-*tert*-2,2',2''-(10-(4-(methoxyloxy)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat (46)

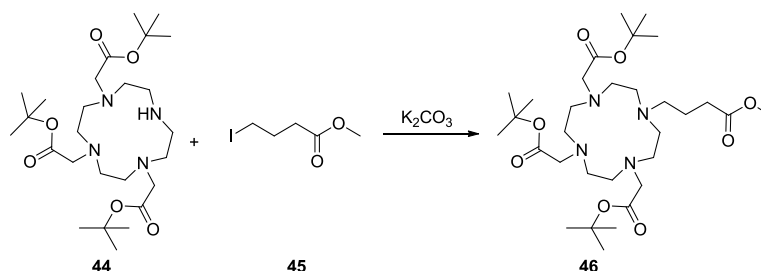


Abbildung 78: Darstellung von Tri-*tert*-2,2',2''-(10-(4-(methoxyloxy)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat (46)

Dreifach *tert*-Butyl-geschützte 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure (DO3A(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>) (**44**) wurde in einer nukleophilen Substitution mit Methyl-4-Iodobutyrat (**45**) umgesetzt (vgl. Abschnitt 5.2.2). Nach Zugabe von Kaliumcarbonat und der methylgeschützten ω-halogenierten Butansäure wurde bei 75 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch.

Die Reaktion verlief in moderaten Ausbeuten, wobei untersucht wurde, ob eine Veränderung der Basenmenge und der Temperatur die Ausbeuten steigern konnten. Wie zu erwarten war, konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Temperatur von 55 °C auf 75 °C und das Verdoppeln der Menge an Base die Ausbeuten deutlich steigerte.

Die Wahl der Schutzgruppe für die Butansäurefunktion fiel auf einen Methyl ester, da dieser orthogonal zu den *tert*-Butylestern entfernt werden kann. Dadurch wird gewährleistet, dass nur die Butansäurefunktion für die Anbindung an die Oberfläche der Nanopartikel verwendet wird. Die Essigsäurefunktionen hingegen stehen weiterhin für die Komplexbildung mit dem Radiometall zur Verfügung.

#### Tri-*tert*-2,2',2''-(10-butansäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat (**47**)

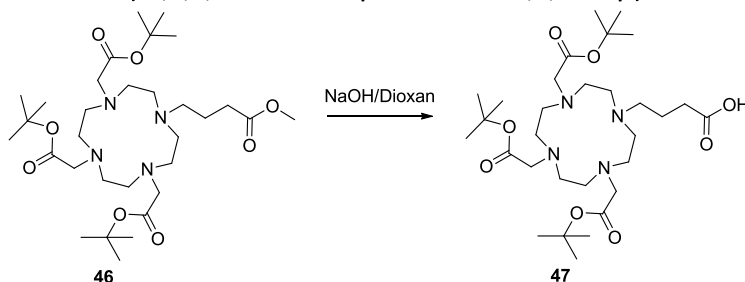


Abbildung 79: Darstellung von Tri-*tert*-2,2',2''-(10-butansäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat (**47**)

**46** wurde zur Entschützung der Butansäurefunktion für 21 h in Dioxan und 1 M NaOH gerührt und wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben säulenchromatographisch gereinigt.

Die Reaktion wurde nicht weiter optimiert, da sie das Produkt (**47**) in guten Ausbeuten und in hoher Reinheit lieferte.

Im Folgenden wird Tri-*tert*-2,2',2''-(10-butansäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat (**47**) als DO3A-But bezeichnet werden.

#### Kopplung von DO3A-But (**47**) an polymergecoatete Nanopartikel

**47** wurde über eine Amidbindung an aminotragende TaO<sub>x</sub>-Nanopartikel angebunden. Hierzu wurden die in DMSO dispergierten Partikel mit DIPEA, HATU und **47** versetzt und bei RT gerührt.

Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde ein Dialyseschritt vorgenommen, um nicht abgeagierten Chelator zu entfernen. Das so vorgereinigte Gemisch wurde getrocknet und zum Entfernen der *tert*-Butyl-Gruppen mit TFA versehen. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit Wasser verdünnt und erneut dialysiert und lyophilisiert.

Radiochemische Experimente mit dieser Probe zeigten, dass die Kopplungsreaktion nicht erfolgreich war (siehe Abschnitt 3.2.2).

Die Verlängerung der Carbonsäure, um die Anbindung zu verbessern, war demzufolge nicht zielführend. Es wurden auch Versuche unternommen, ein analoges Derivat mit einer Dodecansäure statt der Butansäure zu synthetisieren. Damit sollte ein noch größerer Abstand zwischen dem Chelator und der Kopplungsstelle erzeugt werden. Dies erwies sich jedoch aufgrund der schlechten Löslichkeit des neuen Derivates als ebenfalls nicht zielführend.

Es wurde vermutet, dass die Polymer-gecoateten Nanopartikel sich deutlich schwieriger derivatisieren lassen, als das Polymer allein. Dieses sollte in einer Studie untersucht werden, bei der zuerst der Chelator an das Polymer angebunden werden sollte. Erst im Anschluss daran sollte das Polymer auf die Partikeloberfläche gebracht werden. Dadurch wurde eine erhöhte Effizienz in der Anbindung erwartet. Diese Studie wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

### Anbindung von DOTA an Polymere für die Funktionalisierung von Nanopartikeln

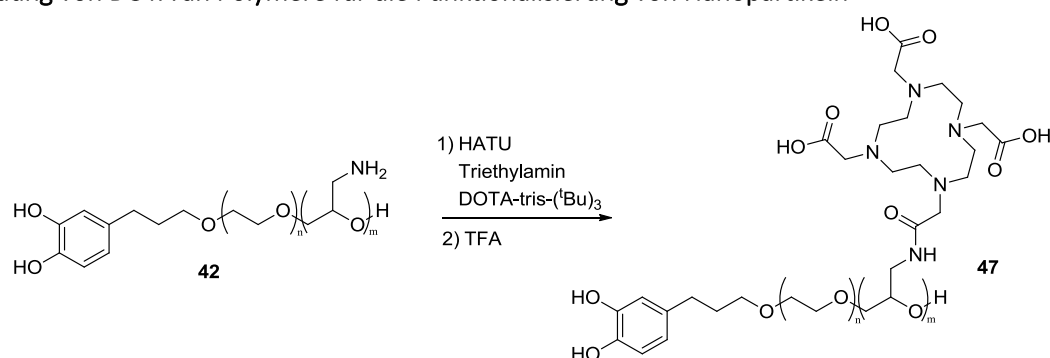


Abbildung 80: Kopplung von DOTA-tris-( $t\text{Bu}$ )<sub>3</sub> an das Catechol-PEG-Amin-Polymer

Es sollte überprüft werden, ob die Kopplungsreaktion des Chelators besser und reproduzierbarer abläuft, wenn zuerst das Polymer modifiziert wird und danach das Coating der Partikel durchgeführt wird. Ein weiterer Vorteil bei dieser Strategie wäre, dass die Abtrennung von ungekoppeltem Chelator vom Polymer durch eine einfache Fällungsreaktion des Makromoleküls deutlich schneller und eleganter durchzuführen ist.

Das Polymer wurde von Jana Herzberger aus der Arbeitsgruppe Prof. H. Frey (Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Es wurde mit Base, HATU und dem dreifach *tert*-Butyl-geschützten Chelator in DMSO zur Reaktion gebracht. Das DMSO wurde entfernt und der Rückstand mit TFA versetzt, um die *tert*-Butylgruppen abzuspalten. Nachdem die TFA entfernt worden war, wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und zur Fällung des Polymers in eiskalten Diethylether getropft. Die eingetrübte Lösung wurde zentrifugiert und der Überstand wurde dekantiert. Der leicht gelblich gefärbte Feststoff wurde nach Trocknung bei vermindertem Druck mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert (vgl. Abschnitt 3.2.2) um sicherzustellen, dass kein freier Chelator in der Probe vorhanden ist bzw. um den Erfolg der Kopplung nachzuweisen. Nachdem dies bestätigt worden war, wurde das mit Chelator modifizierte Polymer für das Coating von FePt@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel eingesetzt (durchgeführt von Kristina Wichmann, Arbeitsgruppe Prof. W. Tremel, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Diese Partikel wurden ebenfalls der Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}$  unterzogen (siehe 3.2.2).

Es zeigte sich, dass diese Methode, bei der das Coating des Partikels mit bereits modifiziertem Polymer durchgeführt wird, sehr gute Resultate lieferte. Die Kopplungsreaktion verlief sehr gut und die Abtrennung des Polymers von den Kopplungsreagenzien und dem nicht abreagierten Chelator konnte

durch Ausfällen sehr elegant und einfach durchgeführt werden. Bei dem Coating der anorganischen Nanopartikel gab es im Vergleich zu dem unmodifizierten Polymer keine Unterschiede.

Durch die ausgezeichnete Markierungseffizienz zeigte sich, dass diese Strategie (erst koppeln, dann coat) der bisher verfolgten Strategie (erst coat, dann koppeln) deutlich vorzuziehen ist.

### 3.2.2 Radiochemische Experimente

#### Radiomarkierung der mit DOTA-NHS-Ester modifizierten Partikel

Zur Reaktionskontrolle der Kopplung des DOTA-NHS-Esters mit den Nanopartikeln wurde ein Aliquot der Reaktionsmischung mit HEPES-Puffer und Generatoreluat versetzt und bei 95 °C für 15 min inkubiert. Als Blindprobe wurde eine Probe von wässrig dispergierten Nanopartikeln ohne Chelator unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass sich das  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  unspezifisch an der Partikeloberfläche anlagert. Die Auswertung dieser Versuche erfolgte mittels Radio-DC (Citratpuffer 0,1 M, pH 4,5).

In Abbildung 81 ist eine Radio-DC einer solchen Radiomarkierungs-Reaktion gezeigt. Als Laufmittel wurde Citratpuffer verwendet (0,1 M; pH = 4). Die linke Spur zeigt die Blindprobe, welche die reinen Nanopartikel (ohne Chelator) enthielt und die rechte Spur zeigt das Reaktionsgemisch der NHS-Ester-basierten Kopplungsreaktion.

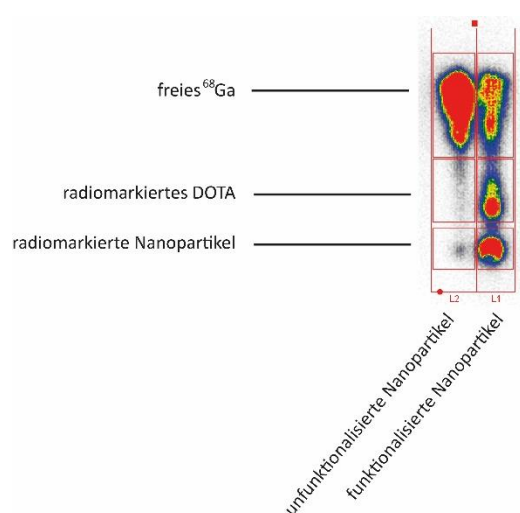


Abbildung 81: Citrat-DC von DOTA-funktionalisierten (rechts) und unfunktionalisierten (links) Eisenoxidnanopartikeln nach Inkubation mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  für 15 min bei 95 °C

Auf der Grundlinie ( $R_f = 0$ ) befinden sich jeweils die Nanopartikel, bei  $R_f = 0,4$  ist der  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA}$ -Komplex zu sehen und freies Gallium befindet an der Laufmittelfront der DC. Man sieht den deutlichen Unterschied der beiden Proben. Die Kontrollprobe enthielt nur freies Gallium, weshalb eine unspezifische Anlagerung des Radiometalls an der Oberfläche der Partikel nahezu ausgeschlossen werden konnte. Die zweite Probe enthielt neben nicht-komplexiertem Gallium (43,1 %) auch ungebundenen Chelator (23,3 %), sowie ein deutliches Signal auf der Baseline (33,6 %). Dieses wurde den mit DOTA modifizierten  $^{68}\text{Ga}$ -markierten Nanopartikeln zugeordnet.

Um unkomplexiertes  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  und den  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA}$ -Komplex nach der Radiomarkierung abzutrennen, wurde das Gemisch auf eine PD10-Säule der Firma GE (Säulenmatrix Sephadex® G-25) gegeben. Auf dieser Art von Säulen haben kleine Moleküle wie der  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA}$ -Komplex eine längere Retentionszeit als Makromoleküle oder Nanopartikel. Kleinere Moleküle legen durch das porenhaltige Säulenmaterial einen viel längeren Weg zurück als große Moleküle oder Partikel, da diese für die meisten Poren zu groß sind.

Nach einem Vorlauf von 4 mL wurden Fraktionen von 250  $\mu\text{L}$  Volumen gesammelt und im Curiemeter auf die Menge an enthaltener Aktivität überprüft. Die Proben mit der größten Menge an Radioaktivität wurden mittels Radio-DC analysiert.

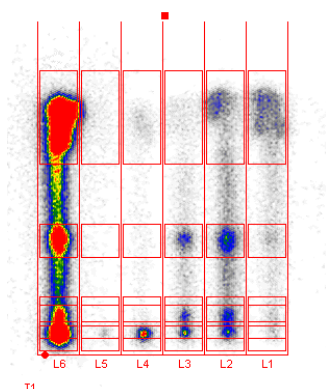


Abbildung 82: Citrat-DC nach PD10 Abtrennung der radiomarkierten Eisenoxidnanopartikel (links: Reaktionsmischung, es folgen Fraktionen 3-7)

In Abbildung 82 sind die Fraktionen 3-7, sowie ganz links die Reaktionsmischung aufgetragen. Die RCA bei dieser Reaktion betrug 34,1 %. Eine Abtrennung der Partikel von freiem Gallium war zwar durchaus möglich, allerdings wurden trotz der geringen Volumengröße Mischfraktionen erhalten, die sowohl den  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA}$ -Komplex, als auch die radiomarkierten Partikel enthielten. Um die Abtrennung zu erleichtern, wurde dazu übergegangen, die Reaktionsmischung bereits vor der Radiomarkierung zu dialysieren (vgl. Kapitel 3.2.1). Dabei war die Markierungseffizienz der Nanopartikel umso größer, je länger dialysiert wurde.

Um die Stabilität der Radiomarkierung zu überprüfen, wurden die über PD10 abgetrennten Partikel für 120 min in isoton. NaCl-Lsg. bzw. in Humanserum eingebracht, bei 37 °C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Lösungen mittels Radio-DC (Citratpuffer) analysiert. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abbildung 83 dargestellt.

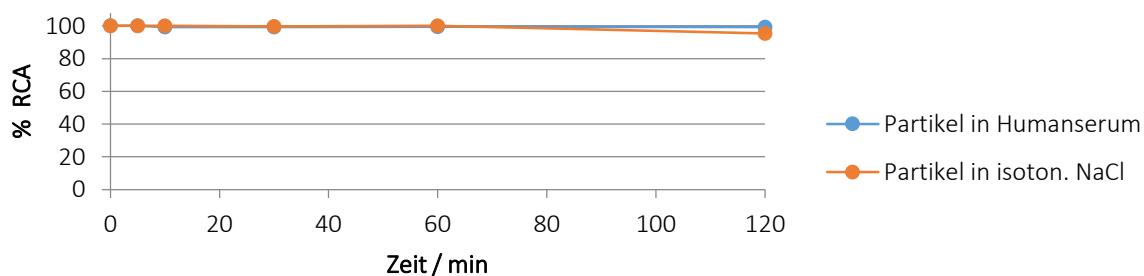


Abbildung 83: Stabilitätstests der mit DOTA funktionalisierten Eisenoxidpartikel in HS und isoton. NaCl

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Partikel in beiden Medien nach 2 h noch mehr als 95 % der Aktivität gebunden haben. Damit kann die Radiomarkierung der Nanopartikel als stabil angesehen werden. Die sehr kleinen, kaum sichtbaren Fehlerbalken sind ebenfalls ein gutes Indiz für die ausgezeichnete Stabilität der radiomarkierten Nanopartikel, sowie die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse.

Die Oberfläche der hier gezeigten Partikel bestand zu 90 % aus Methoxygruppen und 10 % aus Aminogruppen. Es wurde auch eine Charge Partikel mittels  $^{68}\text{Ga}$ -Radiomarkierungen untersucht, deren Oberfläche ausschließlich Aminogruppen enthielt. Sie zeigten in Abwesenheit von komplexbildenden Chelatoren eine 100 %ige Anlagerung des  $^{68}\text{Ga}$ . Aliquots der aminofunktionalisierten und mit  $^{68}\text{Ga}$  unspezifisch markierten Partikel wurden in Lösungen von Apo-Transferrin und DTPA eingebracht und bei 37 °C inkubiert. Es war jeweils eine deutliche Abnahme der am Partikel gebundenen Aktivität zu

erkennen. Abbildung 84 ist zu entnehmen, dass sowohl in DTPA-Lösung als auch in Anwesenheit von Transferrin nach 2 h bei 37 °C weniger als 70 % der Aktivität an den Partikeln verblieb.

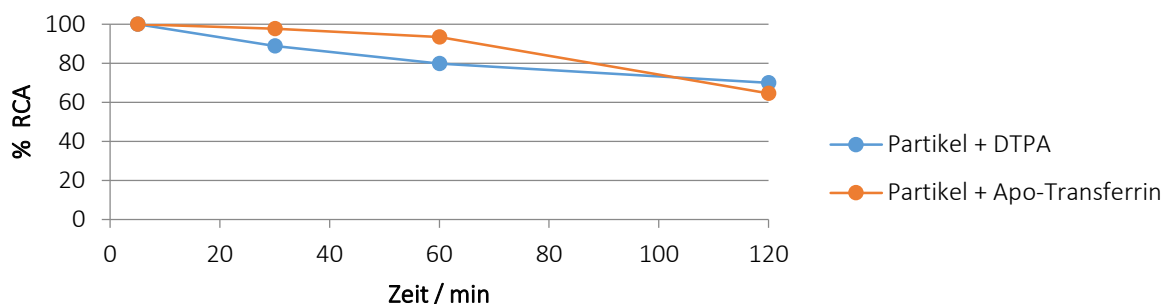


Abbildung 84: Stabilitätstest der Amino-funktionalisierten Partikel gegen Lösungen von DTPA und Transferrin.

Da die Stabilität dieser Bindung als nicht ausreichend angesehen wurde, wurde die Partikeloberfläche dahingehend modifiziert, dass diese unspezifische Bindung vollständig unterdrückt werden konnte. Dies wurde bereits in Abbildung 81 gezeigt.

Die adsorptiven Eigenschaften dieser Aminooberfläche entsprachen den Erwartungen. Durch das *lonepair* des Stickstoffs sind primäre Amine gute Elektronenpaardonoren, sodass eine dative Bindung mit dem dreiwertigen Metallkation nicht weiter überrascht. Dieser Effekt ist zum Teil sogar erwünscht. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele für aminofunktionalisierte Eisenoxidnanopartikel zu finden, welche dazu verwendet werden, Metallionen aus wässrigen Lösungen entfernen<sup>102–104</sup>. Solche Partikelsysteme werden mitunter regeneriert, was nur möglich ist, weil die Bindung zwischen Metall und Aminen schwach genug ist.

### Radiomarkierung der durch Kopplungsreagenzien mit DOTA modifizierten Nanopartikel

Auch die mittels Kopplungsreagenzien DOTA-funktionalisierten TaO<sub>x</sub>-Nanopartikel wurden radiochemisch untersucht und mittels Radio-DC analysiert. In Abbildung 85 ist das Ergebnis dieses Experiments gezeigt. Zu sehen sind von links nach rechts drei Zeitpunkte: 3 min, 7 min und 15 min. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass nach 3 min zwar nahezu die gesamte Aktivität (81 %) an die Partikel gebunden ist, dass allerdings nach 15 min nur noch 20 % am Partikel verblieben sind.

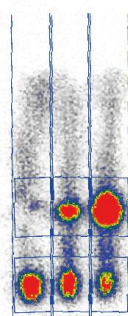


Abbildung 85: Citrat-DC der Kinetik der Radiomarkierung von DOTA-modifizierten TaO<sub>x</sub>-Nanopartikeln nach 3, 7, und 15 min

Der sich neu bildende und am Ende der Reaktion sehr prominente Spot bei einem R<sub>F</sub>-Wert von 0,4 wurde mithilfe von Kontrollproben [<sup>68</sup>Ga]DOTA zugeordnet.

Die Nachbildung von freiem DOTA im Verlauf der Radiomarkierung legt den Schluss nahe, dass die Kopplungsreaktion zwischen DOTA-NHS-Ester und Partikeloberfläche nicht in dem Maß erfolgreich gewesen sein konnte, wie zunächst angenommen.

Dieser Sachverhalt ist in nachfolgendem Diagramm (Abbildung 86) noch einmal veranschaulicht.

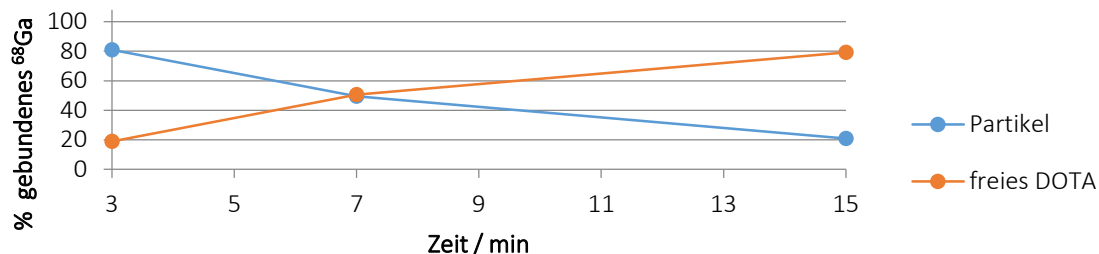


Abbildung 86: Kinetik der Radiomarkierung von DOTA-modifiziertem TaO<sub>x</sub> bei 3, 7, und 15 min

Da es sich bei der Amidbindung um eine äußerst stabile Bindung handelt, die vielfach Anwendung findet, um DOTA an Targetingvektoren etc. anzubinden<sup>49,77,78</sup>, ist nicht davon auszugehen, dass sie im Verlauf der Markierungsreaktion gespalten wird. Viel näherliegender ist die Vermutung, dass die Kopplungsreaktion zwischen dem Chelator und den Aminen auf der Partikeloberfläche nicht in dem Maß stattgefunden hat, wie es erwartet wurde. Die Bindung zwischen der Säurefunktion des Chelators und der Oberfläche wird nur wenig kovalenten Charakter haben, sodass die DOTA-Moleküle im Verlauf der Radiomarkierung langsam wieder von der Oberfläche der Partikel abgelöst werden können.

Wie in Kapitel 3.2.1 erläutert, wurde basierend auf der Arbeit von Tu *et al.*<sup>101</sup> vermutet, dass die Anbindung des DOTA-tris an der Partikeloberfläche aufgrund von sterischen Hinderungen nicht erfolgreich war. Um diese Hinderungen zu umgehen, wurde das Derivat **47** synthetisiert, an TaO<sub>x</sub>-Partikel angebunden und die Bindung wurde evaluiert. Die Ergebnisse der Synthese dieses Chelators wurden im vorherigen Kapitel diskutiert. Die Radiomarkierungen sind in Abbildung 87 und Abbildung 88 gezeigt. Es wird ersichtlich, dass dieser Versuch, die Funktionalisierung zu verbessern, nicht erfolgreich war. Zum einen ist die initiale Menge des an die Partikel gebundenen <sup>68</sup>Ga mit nur 20 % sehr gering. Dem gegenüber steht die quantitative Ausbeute, welche durch die zuvor beschriebene NHS-Kopplung mit unmodifiziertem DOTA erreicht werden konnte. Zudem nimmt die Menge an radiomarkiertem Partikel noch weiter ab, sodass nach 15 min nur noch etwa 7 % der Aktivität an die Partikel gebunden vorlagen, wohingegen über 90 % des <sup>68</sup>Ga von dem ungekoppelten Chelator komplexiert wurden.

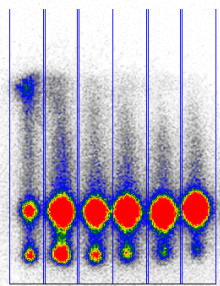


Abbildung 87: Radio-DC der Markierungskinetik von DO3A-But-modifizierten TaO<sub>x</sub>-Partikeln nach 1, 3, 5, 7, 10, 15 min

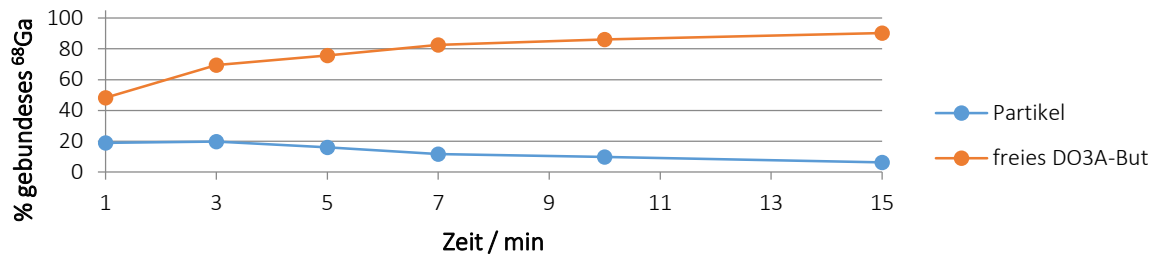


Abbildung 88: Kinetikstudie der DO3A-But-modifizierten TaO<sub>x</sub>-Partikel

Dies bestärkt die Hypothese, dass sich nur sehr wenige Amidbindungen gebildet haben und ein Großteil des Chelators nicht kovalent angebunden werden konnte. Die Tatsache, dass vor der Radiomarkierung eine ausführliche Dialyse stattgefunden hatte, legt den Schluss nahe, dass sich Chelatormoleküle lediglich an der Korona der Partikel angelagert haben und durch Wasserstoffbrücken oder andere nicht-kovalente Wechselwirkungen so festgehalten wurden, dass sie während der Dialyse nicht abgetrennt werden konnten. Erst durch die hohen Temperaturen und niedrigen pH-Werte bei der Radiomarkierung wurde der Chelator von der Partikeloberfläche abgelöst. Abbildung 89 fasst die instabile Bindung zwischen den verschiedenen Chelatoren und den Aminen der Nanopartikeloberfläche zusammen.

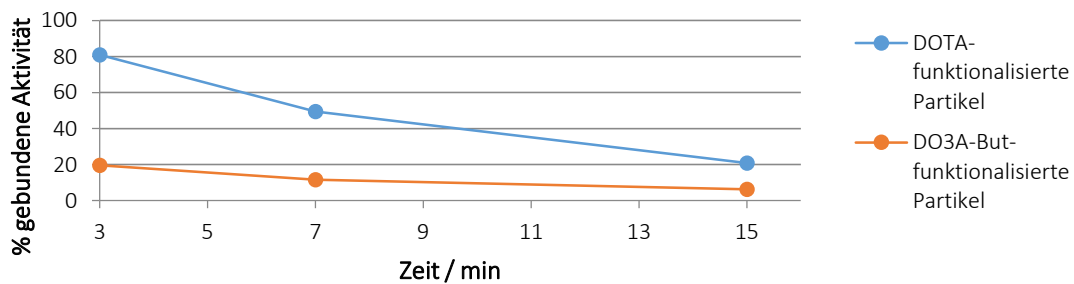


Abbildung 89: Vergleich von DOTA und DO3A-But-funktionalisierten Nanopartikeln bei der Radiomarkierung

Ein Grund für die Probleme bei der Ausbildung der Amidbindung kann sein, dass die Amine nicht aus der Partikelkorona herausragen, wodurch sie nicht für die Ausbildung einer Amidbindung zugänglich sind. Um diesem Problem entgegenzuwirken, waren die Kettenlängen der aminofunktionalisierten PEG-Moleküle größer gewählt worden, als die Kettenlänge der Methoxy-PEG-Moleküle. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wird vermutet, dass die Amine dennoch nicht besser zugänglich gemacht werden konnten. Zudem ist die tatsächliche Menge an primären Aminen auf der Partikeloberfläche nicht bekannt. Da die Polymere mit Amin und Methoxygruppe im Verhältnis 1:9 eingesetzt wurden, wurde davon ausgegangen, dass dieses Verhältnis auch auf der Partikeloberfläche vorliegt. Eine Quantifizierung der vorliegenden Aminogruppen wurde jedoch nicht durchgeführt.

Um eine effektive und stabile Radiomarkierung der anorganischen Nanopartikel zu gewährleisten, wurde auch untersucht, wie sich das Markierungsverhalten verändert, wenn die Kopplungsreaktion zwischen NHS-Ester und aminofunktionalisiertem Polymer vorgelagert wird. Das Coating der Partikel wurde dann mit dem bereits DOTA-modifizierten Polymer durchgeführt. Die Ergebnisse dieser veränderten Reihenfolge werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

### Radiomarkierung des modifizierten Polymers und der damit gecoateten Partikel

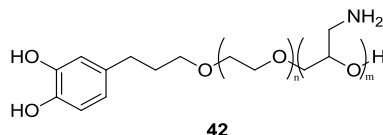


Abbildung 90: Aminofunktionalisiertes Catechol-PEG.

Das verwendete Polymer **42** (siehe Abbildung 90) war ein Catechol-funktionalisiertes PEG, das mit der Catecholfunktion eine Kondensation mit der Oberfläche der Nanopartikel eingehen kann.

Zunächst wurde das mit DOTA modifizierte Polymer (**48**) (siehe Kapitel 3.2.1 und 5.2.2) mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert, um sicherzustellen, dass es zur Anbindung des Chelators an das Polymer gekommen war. Als Blindprobe wurde unmodifiziertes Polymer unter denselben Bedingungen mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte über Radio-DC. Es zeigte sich, dass die Knüpfung der Amidbindung erfolgreich gewesen war, da eine radiochemische Ausbeute von ca. 10 % nach 15 min zu verzeichnen war. Das unmodifizierte Polymer zeigte keine Anlagerung oder Anbindung des Radiometalls. So konnte nachgewiesen werden, dass das  $^{68}\text{Ga}$  tatsächlich durch den Chelator komplexiert wurde, und nicht unspezifisch durch das Polymer. Sehr positiv bei dieser Herangehensweise ist, dass nicht-gekoppelter Chelator durch das Ausfällen des Polymers vollständig von diesem abgetrennt werden konnte, sodass dieser bei der Radiomarkierung keinen störenden Einfluss hatte.

Die mit dem modifizierten Polymer gecoateten FePt@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Partikel wurden ebenfalls radiomarkiert. Auch hier zeigte sich eine gute RCA von 61,1 % nach 15 min, ohne dass freies DOTA auf der Radio-DC zu erkennen war. Dies belegt, dass die kovalente und damit stabile Anbindung des Chelators an das Polymer *via* Amidbindung deutlich effizienter ist, bevor es den Partikel umhüllt.

Durch die Änderung der Strategie von „erst coateten, dann koppeln“ hin zu „erst koppeln, dann coateten“, war es möglich, die Ausbeute für die Radiomarkierung der Partikel von ca. 35 % auf über 60 % zu steigern (vgl. Abbildung 91).

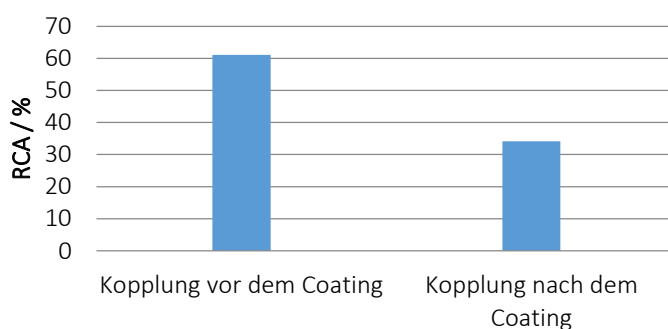


Abbildung 91: Markierungseffizienz von FePt@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> im Vergleich: Kopplung des Chelators vor und nach dem Coating der Partikel

Die Vermutung, dass die Ausbeuten bei der Anbindung von DOTA an den polymerumhüllten Partikel aufgrund der schlechten Zugänglichkeit der Amine so gering ausfielen, wird durch diese Studie bestätigt.

### Radiomarkierung der anorganischen Nanopartikel via SPAAC

Im folgenden Abschnitt werden die Kupfer-freien Clickreaktionen von Nanopartikeln mit verschiedenen Chelatoren beschrieben.

Die Clickreaktionen wurden an  $\text{Fe}_x\text{O}$ -Nanopartikeln durchgeführt, welche eine mesoporöse Silikahülle tragen, die PEGyliert ist. Die PEG-Ketten sind mit Aziden oder Methoxygruppen funktionalisiert. Die Präparation der Partikel wurde von der Arbeitsgruppe W. Tremel (Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt. Eine TEM-Aufnahme der hier verwendeten Probe ist in Abbildung 92 zu sehen.

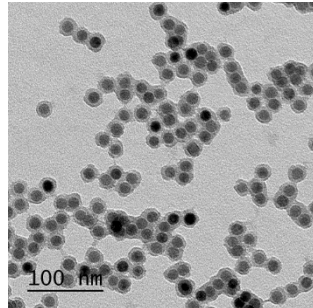


Abbildung 92: TEM-Aufnahme von  $\text{Fe}_x\text{O}@SiO_2@PEG_{5-9}\text{-OMe}@PEG_{10}\text{-N}_3$

Die Partikel hatten im TEM einen hydrodynamischen Radius von  $25,5 \pm 0,6$  nm und im Zetasizer 129,9 nm. Dies weist darauf hin, dass sich Agglomerate bildeten, die aus durchschnittlich fünf einzelnen Partikeln bestehen. Ein Grund dafür kann die für die Wasserlöslichkeit wichtige Silikahülle sein, welche oftmals mehrere Partikel umhüllt, wodurch die größeren Agglomerate zustande kommen.

Eine genaue Abschätzung der Menge an Azidfunktionen auf der Oberfläche war nicht möglich. Das azidierte PEG und das Methoxy-PEG wurden im molaren Verhältnis von 1:9 eingesetzt, und es wurde davon ausgegangen, dass die Verteilung auf den Partikeloberflächen diesem Verhältnis entspricht.

Die Radiomarkierung über Clickreaktion erfolgte indirekt, d. h. es wurde zunächst der entsprechende Chelator mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  radiomarkiert und in einem nachfolgenden Schritt an die Partikeloberfläche angebunden. Für die Clickreaktion wurden die Nanopartikel in PBS-Puffer dispergiert und mit dem entsprechenden radiomarkierten und gereinigten  $[^{68}\text{Ga}]$ Komplex (vgl. hierzu auch Abschnitt 3.1.2) versetzt. Es wurde für 30 min bei 65 °C inkubiert und anschließend über eine PD10-Säule abgetrennt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit komplementären Radio-DCs, sowie über Radio-HPLC/SEC.

Zum Vergleich wurde neben der indirekten Methode auch die direkte Methode angewendet, bei der die Clickreaktion vorgelagert ist und die Radiomarkierung im Anschluss erfolgt. Damit kann der Reinigungsschritt des reinen radiomarkierten Chelators eingespart werden. Jedoch war die Löslichkeit der Nanopartikel bei den sauren pH-Werten der Markierungsreaktion nicht mehr gegeben und es bildete sich ein brauner Niederschlag, der nicht mehr resuspendiert werden konnte. Verantwortlich hierfür ist die Hydrolyse der Silikahülle, welche unter den Markierungsbedingungen stattfindet. Die Verfolgung des Postlabeling-Ansatzes (direkte Methode) war bei diesen Nanopartikeln demnach nicht möglich, weshalb der Prelabeling-Ansatz (indirekte Methode) intensiv verfolgt wurde, da hier sehr milde Bedingungen vorliegen und empfindliche Systeme nicht angegriffen werden.

Da es lediglich eine ungefähre Abschätzung darüber gab, wie viele Azide sich auf der Oberfläche der Partikel befinden, war zunächst nicht klar, in welchem Verhältnis die Partikel und der Chelator eingesetzt werden sollten. Es wurden jeweils 30 nmol Chelator radiomarkiert und von nicht komplexiertem  $^{68}\text{Ga}$  abgetrennt. Dabei ist jedoch die Menge an tatsächlich radiomarkiertem Chelator um ein Vielfaches geringer. Beim Einsatz von bspw. 300 MBq  $[^{68}\text{Ga}]$ DOTA-DBCO sind nur etwa 2,9 pmol dieses Komplexes in der Reaktionsmischung vorhanden. Wurden 30 nmol Vorläufer verwendet, so tragen 29,9971 nmol ( $\cong 99,99$  %) kein Radiometall.

Um die Wahrscheinlichkeit dafür zu erhöhen, dass die Clickpartner in der Lösung aufeinandertreffen, wurde eine möglichst hohe Konzentration während der Clickreaktion angestrebt. Die Partikel waren synthesebedingt bereits in PBS dispergiert, weshalb die Vergrößerung der eingesetzten Menge an Partikeln immer mit einer Vergrößerung des Volumens einherging. Die Konzentration blieb also konstant. Demzufolge war es wichtig, den zuvor radiomarkierten Chelator so konzentriert wie möglich zuzugeben.

Zunächst wurden 500  $\mu\text{L}$  einer 1,5 mg/mL-Lösung von Nanopartikeln bei 37 °C mit  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  (bzw. mit  $[^{68}\text{Ga}]\text{NODA-GA-DBCO}$ ) zur Reaktion gebracht. Die Ausbeuten und besonders die Reproduzierbarkeit bei diesen Reaktionen waren nicht so gut, wie erwartet. Es traten sehr große Schwankungen auf, was sich in dem Mittelwert von  $20,49 \pm 19,63 \%$  widerspiegelt. Der Wert und der zugehörige Fehler sind gleich groß, weshalb die Aussagekraft dieses Ergebnisses als zweifelhaft betrachtet wurde.

Die schrittweise Erhöhung der Temperatur brachte keine deutliche Verbesserung der Clickausbeuten. Jedoch fiel hierbei auf, dass sich im Verlauf der Reaktion trotz der vorangegangenen Kartuschenreinigung immer freies Gallium bildete, was die Auswertung erschwerte. In Abbildung 93 sind die Ergebnisse aus der Clickreaktion zwischen DOTA-DBCO und den Nanopartikeln bei 45 °C und 55 °C gezeigt. Es ist klar zu erkennen, dass bei beiden Temperaturen die Click-Ausbeute nicht über 20 % steigt (blaue Kurven). Weiterhin sieht man besonders bei 55 °C, dass die Menge an freiem Gallium stark zunimmt (graue Kurven). Dies war nicht nur auf den komplementären Radio-DCs zu beobachten, sondern trat in gleichem Maße bei der HPLC/SEC auf. Da die Matrix der SEC-Säule und das Kieselgel der DC sehr verschieden sind, wurde eine Zersetzung der Probe auf einer der beiden stationären Phasen ausgeschlossen.

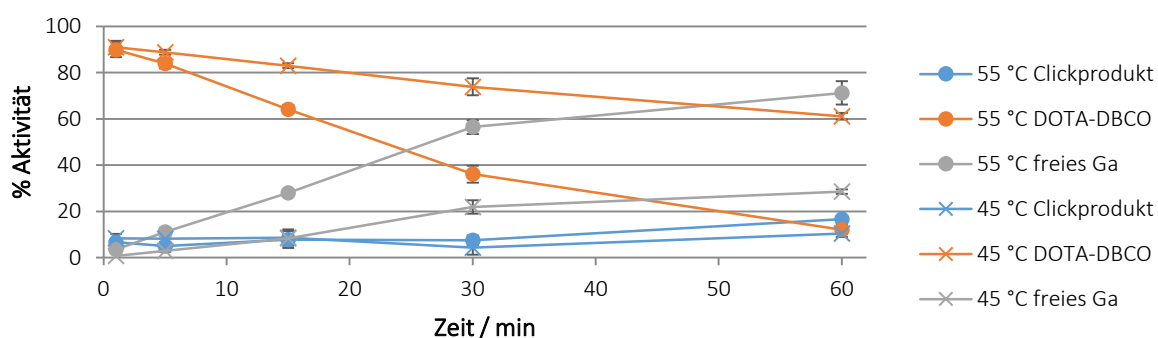


Abbildung 93: Kinetik der Clickreaktionen von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  an  $\text{FeO}_x$ -Nanopartikel bei 45 °C und 55 °C

Dieses Phänomen der Freisetzung des Radiometalls wurde genauer untersucht. In Kapitel 3.1.2 wurde bereits die Stabilität der reinen Chelatoren beschrieben. Auch hier zeigte sich die Freisetzung des Metalls, jedoch in deutlich geringerem Maße, was in Abbildung 94 veranschaulicht wird. Die Freisetzung von  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  aus  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  nimmt in Anwesenheit einer Azidofunktion deutlich zu, bzw. das pure DOTA-DBCO komplexiert das Radiometall bei den getesteten Temperaturen verhältnismäßig stabil. Die Anwesenheit der Azid-tragenden Komponente scheint ausschlaggebend für die verringerte Stabilität des Metall-Chelator-Komplexes zu sein.

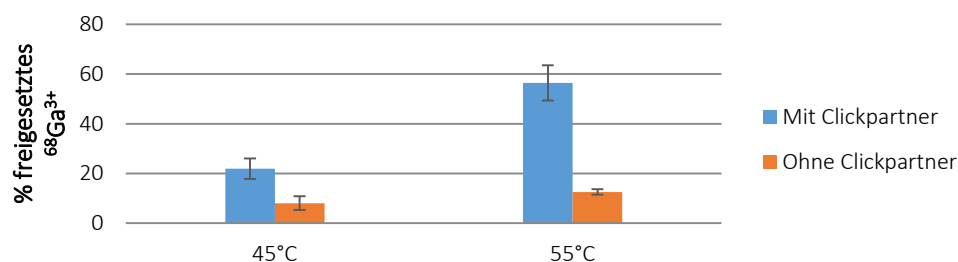


Abbildung 94: Freisetzung von  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  aus  $^{68}\text{Ga}$ ]DOTA-DBCO nach 30 min Reaktionszeit

Bei  $^{68}\text{Ga}$ ]NODA-GA-DBCO war ein analoges Verhalten zu beobachten.

Die Freisetzung von über 50 % des Radiometalls deutet darauf hin, dass das  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  nicht in dem Maße vom Chelator gebunden sein kann, wie es basierend auf Erfahrungen mit DOTA-Derivaten zu erwarten gewesen wäre. Dieser Sachverhalt wird ausführlich in Kapitel 3.1.2 und 3.3.1 diskutiert. Die Überlegungen der sterischen Hinderungen führten zur Entwicklung des um eine PEG<sub>4</sub>-Kette verlängerten DOTA- bzw. NODA-GA-DBCOs (**55** und **58**).

Auch diese Derivate wurden vor der Clickreaktion radiomarkiert und auf ihre Stabilität überprüft. Sie zeigten mäßige Stabilitäten in PBS-Puffer und wurden demzufolge nicht für Clickreaktionen verwendet. Die Ergebnisse hierzu sind ebenfalls in Kapitel 3.1.2 zu finden.

Um die indirekte Markierungsmethode weiter zu evaluieren und ihre Vorteile zu nutzen, wurde das kommerziell erhältliche Bicyclo[6.1.0]non-4-in-DOTA (BCN-DOTA) (**49**) (siehe Abbildung 95) als Alternative zu den selbst synthetisierten clickfähigen Chelatoren verwendet. Es unterscheidet sich von DOTA-DBCO (**7**) vor allem durch die fehlenden aromatischen Strukturen, wodurch sich allein die Wasserlöslichkeit deutlich verbesserte.

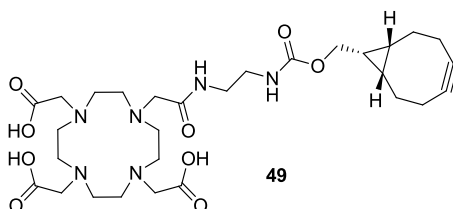


Abbildung 95: BCN-DOTA (**49**)

Die Radiomarkierung dieses Chelators erfolgte unter den üblichen Bedingungen, ebenso wie die Kartuschenabtrennung.

Für die Clickreaktion wurde 1 mL der Lösung aus 1,5 mg/mL Nanopartikel zu dem aus der Kartusche eluierten und vom Eluens befreiten Chelator gegeben. Es wurde für 30 min bei 45 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mit komplementären Radio-DCs und Radio-HPLC.

Die folgende Abbildung 96 zeigt die Radio-HPLC/SEC nach erfolgter Clickreaktion. Es ist deutlich zu sehen, dass sich neben dem  $^{68}\text{Ga}$ ]BCN-DOTA auch eine radiomarkierte Spezies gebildet hat, die als Nanopartikel identifiziert werden konnte.

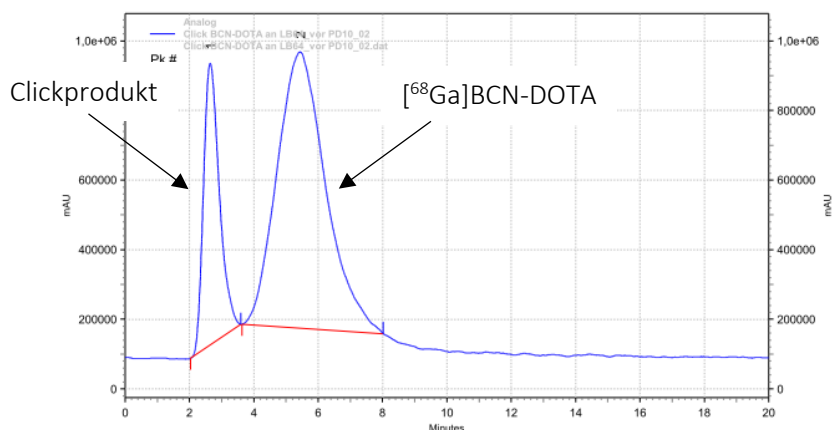


Abbildung 96: BCN-DOTA click an  $\text{Fe}_x\text{O}@Si\text{O}_2@\text{PEG}_{5-9}\text{-OMe}@PEG_{10}\text{-N}_3$  nach 30 min @ 45 °C vor PD10

Die Ausbeute bei der Clickreaktion von BCN-DOTA mit  $\text{Fe}_x\text{O}@Si\text{O}_2@\text{PEG}_{5-9}\text{-OMe}@PEG_{10}\text{-N}_3$  betrug nach 30 min 25 %. In der Literatur findet man zu Clickreaktionen mit BCN-basierten Molekülen geringere Reaktionsgeschwindigkeiten als mit vergleichbaren DBCO-Derivaten<sup>105,106</sup>, weshalb die nur moderaten Ausbeuten nicht überraschend waren. Dass jedoch kein freies Gallium zu beobachten war, zeigte den Erfolg dieser Methode im Vergleich zu den Clickreaktionen mit  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-DBCO}$  und  $[^{68}\text{Ga}]\text{NODA-GA-DBCO}$ .

Die Abtrennung von nicht geklicktem Chelator von den Nanopartikeln über PD10 war erfolgreich. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 250  $\mu\text{L}$  gesammelt und im Curimeter auf die in ihnen enthaltene Aktivität überprüft. Die Proben wurden anschließend über komplementäre Radio-DC und Radio-HPLC/SEC analysiert. Zusätzlich wurde die Abtrennung dadurch erleichtert, dass Fraktionen, welche Nanopartikel enthielten, gelb gefärbt waren. In Abbildung 97 sieht man das HPLC-Diagramm der in Abbildung 96 gezeigten Reaktionsmischung nach Reinigung *via* PD10 (Fraktion 13). Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass kein ungebundener Chelator mehr in der Reaktionsmischung vorhanden ist. Es konnten insgesamt sechs Fraktionen gewonnen werden, bei denen kein Chelator vorhanden war. Außerdem konnte eine Mischfraktion aus Chelator und Nanopartikel erhalten werden.

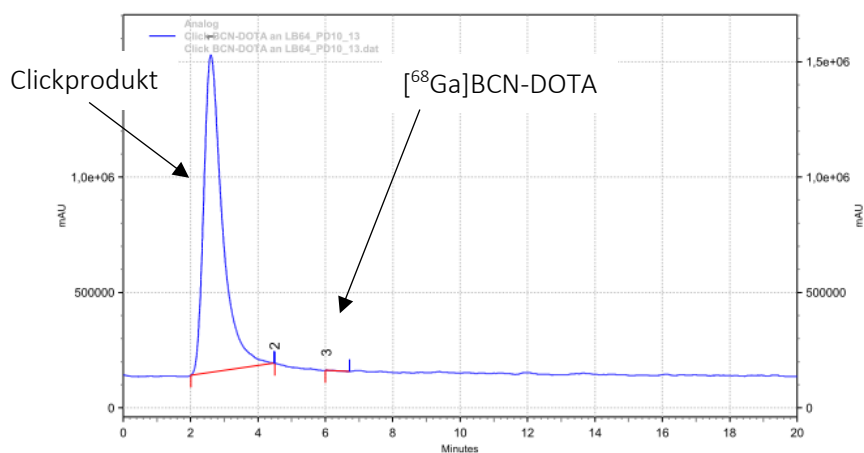


Abbildung 97: BCN-DOTA click an  $\text{Fe}_x\text{O}@Si\text{O}_2@\text{PEG}_{5-9}\text{-OMe}@PEG_{10}\text{-N}_3$  nach 30 min @ 45 °C nach PD10 (Fraktion 13)

Aufgrund dieser sehr guten Ergebnisse wurde eine *in vivo*- $\mu\text{PET}$ -Messung, sowie *ex vivo*-Biodistributionsstudien mit diesem System durchgeführt, um das *in vivo* Verhalten der Nanopartikel zu untersuchen. Die Resultate werden in Kapitel 3.2.3 gezeigt und diskutiert.

### Zusammenfassung der verschiedenen Markierungs- und Kopplungsstrategien

Um anorganische Nanopartikel für die Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  zugänglich zu machen, wurden unterschiedliche Herangehensweisen untersucht.

NHS-Ester des Chelator-Grundgerüsts wurden über Amidbindung an die Amine der Polymeroberfläche der Partikel gebunden. Hier zeigten sich große Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Kopplung. Als Grund hierfür wird die Hydrolyse des NHS-Esters angenommen. Trotz der guten Stabilität der auf diese Weise  $^{68}\text{Ga}$ -markierten Nanopartikel wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, da die Reproduzierbarkeit der Kopplung selbst nicht gegeben war.

Der *in situ* hergestellte Aktivester des entsprechenden Chelators wurde *via* Amidbindung an Amine auf der Partikeloberfläche angebunden. Auch hier war die Kopplung nicht reproduzierbar und wenig zuverlässig. Dies äußerte sich vor allem in der stetigen Bildung von purem Chelator während der Radiomarkierung der gekoppelten Systeme. Auch eine Modifikation der Länge des Linkers zwischen Chelatorgerüst und Carbonsäure konnte keine Verbesserung erzielen. Um zu beweisen, dass die schlechte Zugänglichkeit der Amine auf der Partikeloberfläche der Grund für die aufgetretenen Probleme war, wurde das Polymer vor dem Coating mit DOTA funktionalisiert. Es schloss sich das Coating der Partikel an, sowie die Radiomarkierung. Diese Strategie lieferte sehr gute Ergebnisse. Die Bildung von purem Chelator im Reaktionsgemisch konnte nicht beobachtet werden.

Als letzte Strategie wurde die kupferfreie, spannungsvermittelte Cycloaddition SPAAC verwendet. Hierbei wurde der fertig radiomarkierte Chelator unter sehr milden Bedingungen an Azide auf der Oberfläche der Nanopartikel gebunden. Die Reproduzierbarkeit dieser Versuche war sehr gut und auch die Abtrennung von nicht geklicktem Chelator war erfolgreich. Diese Methode bietet vor allem dann einen enormen Vorteil, wenn sich das System, welches markiert werden soll, unter den Markierungsbedingungen zersetzen würde.

### 3.2.3 *in vivo* $\mu$ PET-Studien und *ex vivo* Biodistributionsstudien

Die in isotonischer NaCl-Lösung formulierten radiomarkierten  $\text{Fe}_x\text{O}@Si\text{O}_2@PEG_{5-9}\text{-OMe}@PEG_{10}\text{-N}_3$ -Nanopartikel wurden vier gesunden C57BL/6-Mäusen in eine Schwanzvene injiziert. Ein Tier wurde dynamisch für 1 h im  $\mu$ PET vermessen. Alle Tiere wurden 1 h *p.i.* getötet, die Organe wurden entnommen, gewogen und in einem automatisierten  $\gamma$ -Counter auf die in ihnen enthaltene Aktivität hin vermessen.

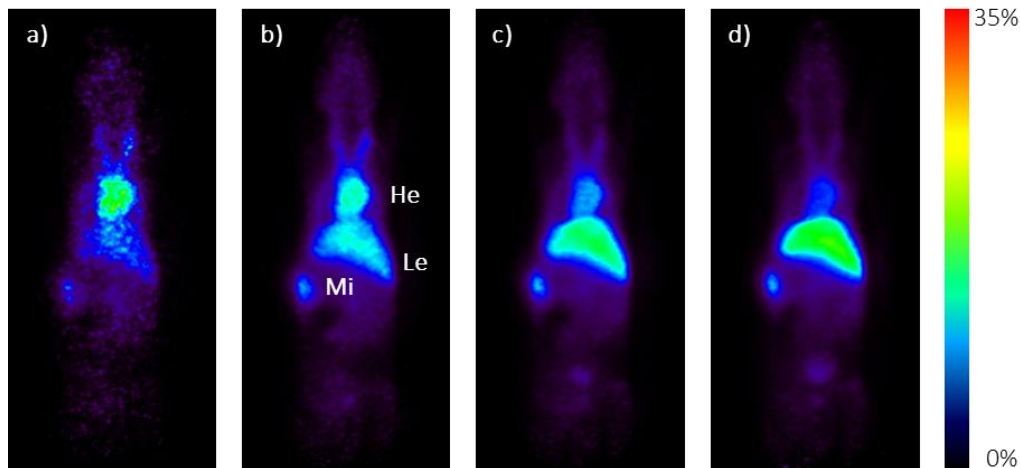


Abbildung 98:  $\mu$ PET-Aufnahmen einer gesunden C57BL/6 Maus, a) 0-1 min, b) 1-10 min, c) 10-30 min, d) 30-60 min, He = Herz, Le = Leber, Mi = Milz

Die  $\mu$ PET-Bilder in Abbildung 98 zeigen vier verschiedene Zeiträume. In der ersten Minute sieht man das Herz, sowie bereits Leber und Milz (Bild a). Im weiteren Verlauf der Messung nimmt die Menge an Aktivität in Leber und Milz immer weiter zu (Bilder b-d), was sich auch in den Zeit-Aktivitätskurven widerspiegelt. Diese sind in Abbildung 99 gezeigt. Die dargestellten Fehlerbalken resultieren aus verschiedenen „regions of interest“ (ROI), über welche ein Mittelwert berechnet wurde.

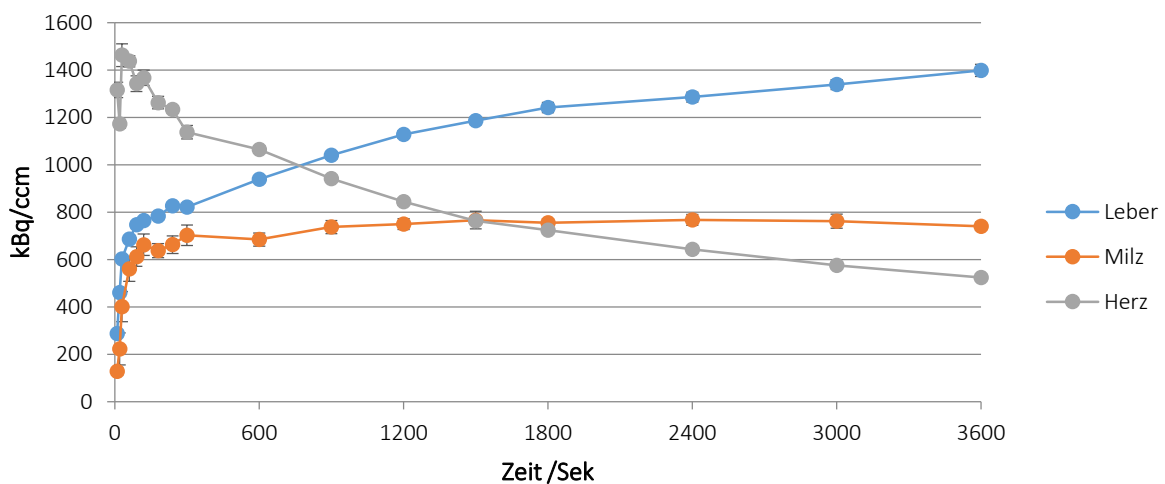


Abbildung 99: Zeit-Aktivitäts-Kurven von Herz, Leber und Milz

Die im Blut vorhandene Aktivität nimmt wie zu erwarten über die Zeit ab. Nach 60 min sind noch  $9,98 \pm 3,56$  % ID/g Blut vorhanden. Die Nanopartikel zirkulieren also eine gewisse Zeit in der Blutbahn, bevor sie von Leber und Milz aufgenommen werden. Die Anflutung in der Milz erreicht nach etwa 25 min eine Sättigung. In der Leber dagegen steigt die Menge an gemessener Aktivität stetig, sodass

sich nach 60 min noch keine Sättigung einstellen konnte. Diese Unterschiede in der Anreicherung werden auch in den Ergebnissen der *ex vivo*-Biodistributionsstudie (siehe Abbildung 100) deutlich.

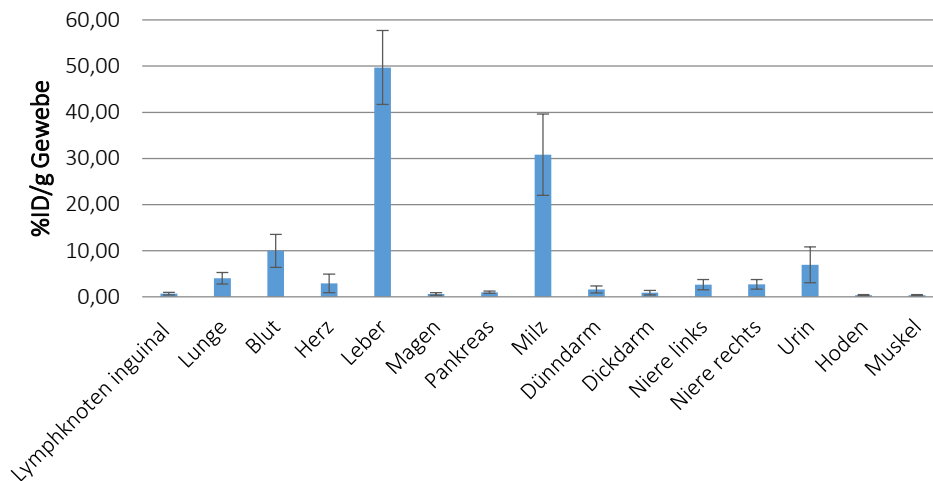


Abbildung 100: Ergebnisse der *ex vivo*-Biodistributionsstudie der  $^{68}\text{Ga}$ -markierten Eisenoxid-Nanopartikel nach 1 h in gesunden C57BL/6-Mäusen;  $n=4$

Hier zeigt sich auch, dass lediglich  $6,95 \pm 3,87$  % im Urin zu finden sind. Jeweils  $49,70 \pm 8,023$  % und  $30,84 \pm 8,811$  % befinden sich in Leber bzw. Milz.

Dass unterschiedlich große Nanopartikel desselben Materials sehr stark verschieden in ihrer Organverteilung, Pharmakokinetik und Toxizität sind, ist Gegenstand zahlreicher Publikationen und nicht weiter überraschend. Da die Poren in den Glomeruli der Niere einen Durchmesser von etwa 10 nm haben<sup>107,108</sup>, welchen die hier applizierten Nanopartikel um ein Vielfaches überschreiten, werden sie nicht renal gefiltert. Dies erklärt den sehr geringen Uptake in den Nieren sowie im Urin. Zugleich wird dadurch bestätigt, dass die Nanopartikel intakt bleiben, da niedermolekulare Fragmente renal ausgeschieden würden. Das Fehlen solcher niedermolekularen Fragmente bestätigt die Stabilität der Bindung des radiomarkierten Chelators mit der Oberfläche der Partikel und unterstreicht die Effizienz und Verlässlichkeit der indirekten Radiomarkierung.

Die Aufnahme in Leber und Milz ist größenbedingt bzw. bedingt durch das MPS. Dieses besteht aus Monozyten, welche im Blut zirkulieren, und aus den Makrophagen und dendritischen Zellen der Leber, Milz und des Knochenmarks<sup>107,109,110</sup>. Unterliegen intravenös applizierte Nanopartikel der Wechselwirkung mit sog. Opsoninen (u.A. Immunglobuline, Apolipoproteine), so lagern sich diese Proteine an der Oberfläche der Partikel an. Dadurch kann es zur Aufnahme durch Makrophagen kommen. Im Allgemeinen können Nanopartikel über Makropinozytose, Phagozytose oder Endozytose aufgenommen werden<sup>111</sup>. Partikel mit einem hydrodynamischen Radius  $>100$  nm werden von Kupferzellen in der Leber, von der roten Pulpa und von der Marginalzone aufgenommen. Dort werden sie abgebaut und ausgeschieden. Sind sie jedoch nicht bioabbaubar, so reichern sie sich in den MPS-Organen an<sup>107,111–113</sup>. Die Größe von Leber und Milz ist um ein Vielfaches verschieden. Die Leber einer Maus wiegt je nach Gewicht der Maus ca. 2 g, wohingegen die Milz lediglich 0,1 g wiegt<sup>114</sup>. Dadurch ist die Anzahl der Makrophagen in der Milz deutlich geringer als die der Kupferzellen in der Leber, wodurch sich die unterschiedlich starke Anreicherung der Nanopartikel in diesen beiden Organen erklären lässt.

Die Menge von  $9,98 \pm 3,56$  % ID/g im Blut deutet auf eine vielversprechende Blutzirkulationszeit der Partikel hin. Diese können prinzipiell als *drug delivery* Systeme fungieren, für die eine lange Retention im Blut wünschenswert ist. Denn durch die längere Zirkulation im Blut wird die Wahrscheinlichkeit dafür erhöht, dass die Nanopartikel ihr Zielorgan erreichen.

### 3.3 PSar-basierte Polymere

In diesem Kapitel wird die Radiomarkierung von Polysarconsinen via SPAAC beschrieben. Die kupferfreie Clickreaktionen wurden mit den DOTA- und NODA-GA-basierten Chelatoren **4**, **7**, **15** und **17** durchgeführt, welche in Kapitel 3.1 genauer beschrieben werden.

Es wurden zwei verschiedene Homopolymere verwendet, welche an den Endgruppen jeweils mit DBCO bzw. einem Azid funktionalisiert waren, um sie für die Click-Reaktion zugänglich zu machen. Die Synthese erfolgte nach der in der Literatur von Klinker *et al.* beschriebenen Vorschrift<sup>115</sup> durch Kristina Klinker aus der Arbeitsgruppe Dr. M. Barz, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

In untenstehender Abbildung 101 ist die Reaktionsgleichung der Polymersynthese dargestellt.

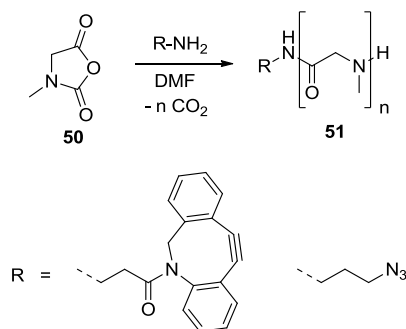


Abbildung 101: Reaktionsgleichung der Homopolymersynthese eines endgruppenfunktionalisierten Polysarcosins

Die Reaktion erfolgt über die Ringöffnung des Sarcosin-*N*-Carboxyanhydrids (**50**) durch das primäre Amin des DBCO-Amins bzw. des Azido-Amins. Dadurch, dass die clickfähige Funktionalität zugleich der Initiator der Reaktion ist, wird nur die Endgruppe des Polymers funktionalisiert und nicht das Rückgrat. Es ist demnach immer genau eine clickfähige Einheit pro Polymerkette vorhanden.

Für das Azid-funktionalisierte Polymer wurde die Anzahl der Wiederholungen zu 44 bestimmt, für das DBCO-funktionalisierte Polymer zu 50.

#### 3.3.1 Radiochemische Experimente

Für die Anbindung der verschiedenen Chelatoren an das jeweilige Polymer wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen untersucht: Die Pre- und Postlabeling-Strategie bzw. die direkte und die indirekte Radiomarkierung, welche in Abbildung 20 gezeigt sind. Es sollte untersucht werden, wie sich die clickfähigen Chelatoren (vgl. Kapitel 3.1) in der direkten und der indirekten Radiomarkierung der PSar-Homopolymere verhalten.

Um eine unspezifische Komplexierung des Radiometalls durch das Polymer auszuschließen, wurde dieses als Kontrollprobe mit Generatoreluat in Natriumacetatpuffer unter Markierungsbedingungen inkubiert. Es zeigte sich keine Anlagerung des  $^{68}Ga^{3+}$  an das Polymer. Dies ist eine zwingende Voraussetzung für die direkte Radiomarkierung, da nur so gewährleistet ist, dass das Radiometall stabil von den Chelatoren komplexiert werden kann, und nicht unspezifisch an das Polymer adsorbiert vorliegt (vgl. hierzu auch die unspezifische Bindung des  $^{68}Ga^{3+}$  an die primären Amine der Polymeroberfläche von Eisenoxidnanopartikeln, Kapitel 3.2.2).

Die einzelnen Chelatoren werden im Folgenden hinsichtlich der direkten und indirekten Methode verglichen und diskutiert.

## Clickreaktionen der azidierten Chelatoren mit PSar-DBCO

### NODA-GA-TEG-Azid Indirekt

Der Chelator wurde mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  radiomarkiert und von unkomplexiertem Gallium abgetrennt (vgl. Abschnitt 3.1.2 und Abschnitt 5.3.1). Die aus der Reinigung erhaltene ethanolische oder Aceton-haltige Lösung wurde eingedampft und zu dem Komplex wurde das in PBS-Puffer gelöste Polymer gegeben.

Inkubation bei 45 °C lieferte nach 30 min quantitative Clickausbeuten.

Die Reaktionskontrolle wurde mittels Radio-HPLC/SEC durchgeführt. Die Radio- und UV-Spuren der HPLC-Messung bei dieser Reaktion sind in Abbildung 102 dargestellt. Es ist nur ein Signal zu erkennen, das aufgrund seiner Retentionszeit und der enorm guten Sichtbarkeit im UV dem Polymer zugeordnet wurde. Als Vergleichsprobe wurde der pure radiomarkierte Chelator injiziert, sowie unbehandeltes Polymer. Der Chelator wies eine Retentionszeit von 4,97 min auf, das Polymer hingegen zeigte unter denselben Bedingungen eine Retentionszeit von 2,07 min. Aufgrund der sehr geringen Stoffmenge zeigte sich bei der Injektion des puren Chelators im UV keine signifikante Absorption.

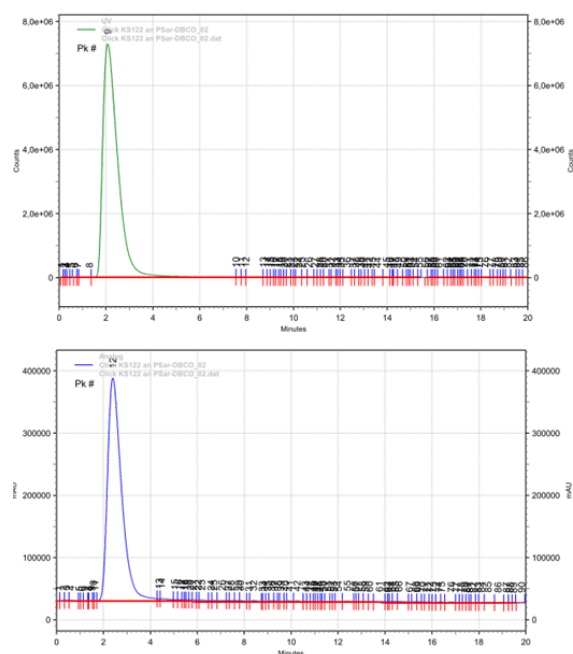


Abbildung 102: Oben UV-Spur, unten Radio-Spur nach Clickreaktion von  $[^{68}\text{Ga}]$ NODA-GA-TEG-Azid und PSar-DBCO

Das Verhältnis der Stoffmengen von Chelator zu Polymer betrug 1:10. Bei geringeren Mengen an eingesetztem Polymer zeigte sich, dass die Clickreaktion nicht vollständig verlief. Aufgrund der Halbwertszeit des  $^{68}\text{Ga}$  wurde auf eine Verlängerung der Reaktionszeit verzichtet.

### NODA-GA-TEG-Azid Direkt

Der Chelator und das Polymer wurden im Stoffmengenverhältnis 1:10 in PBS-Puffer vereinigt und für 36 h bei 45 °C gerührt. Ein Aliquot der Lösung wurde entnommen, um mittels Radiomarkierung das Verhältnis von Chelator zu Chelator-Polymer-Konjugat bestimmen zu können. Der verbliebene Teil der Probe wurde mittels PD10 in makromolekulare und niedermolekulare Fraktionen abgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden in Natriumacetatpuffer aufgenommen und mit Generatoreluat bei 45 °C inkubiert.

Die Radiomarkierung des Aliquots zur Überprüfung der Clickausbeuten ergab recht stark schwankende Ausbeuten von  $63,02 \pm 24,67$  %. Jedoch war in der Probe kein freies Gallium mehr enthalten, sondern

das gesamte Radiometall lag komplexiert vor, entweder an Polymer gebunden, oder an den ungeclickten Chelator. Da der freie Chelator viel besser zugänglich für das  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  ist als der an das Polymer gebundene, wird ersterer das Radiometall deutlich schneller aus der Lösung abfangen, als der an das Polymer gebundene. Beide konkurrieren demzufolge um das Gallium. Die Schwankungen in der Ausbeute bezogen auf das geclickte Produkt kann man darauf zurückführen. Da die Probe sowohl den freien Chelator, als auch den geclickten Chelator enthält, und beide um das Gallium konkurrieren, der freie Chelator jedoch die höheren Komplextionsgeschwindigkeiten hat, ist die so ermittelte Clickausbeute keine quantitative, sondern lediglich eine qualitative Aussage.

Die Abtrennung des ungeclickten Chelators über PD10 war erfolgreich, jedoch war die Kontrolle der Abtrennung im Vergleich zur indirekten Methode deutlich aufwändiger. Da die Stoffmenge des Chelators mit 30 nmol bereits vor der PD10-Abtrennung sehr gering war, und die PD10 eine große Verdünnung der Probe bewirkt, konnte die Analytik nicht über die UV-Spur der HPLC erfolgen. So musste jede PD10-Fraktion einzeln radiomarkiert werden, was sehr zeitintensiv ist. Viel schneller und effizienter ist in diesem Fall die indirekte Methode, da sich hier die Abtrennung sehr elegant über die Radio-HPLC/SEC verfolgen lässt.

Die Entfernung des ungeclickten Chelators aus dem Reaktionsgemisch ist für eine effiziente Radiomarkierung des Polymers sehr wichtig. Dies zeigten Vorversuche zu diesem Experiment, bei denen Chelator und Polymer im Verhältnis 1:2 eingesetzt wurden, und nach 16 h bei 37 °C radiomarkiert wurden. Die Vergleichsprobe der indirekten Radiomarkierung wurde in denselben Konzentrationen angefertigt. Abbildung 103 zeigt beide Proben im Vergleich nach 15 min bei 45 °C.

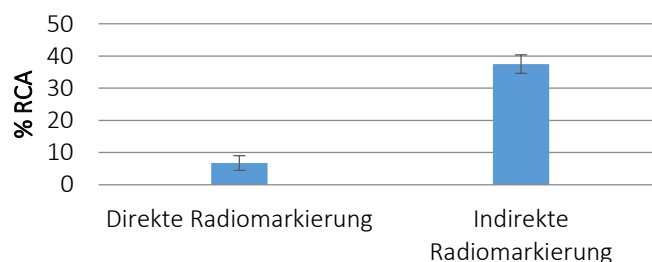


Abbildung 103: Vergleich der direkten und indirekten Radiomarkierung ohne Abtrennung von ungeclicktem Chelator

Es scheint klar zu sein, dass die direkte Methode RCAs, und damit auch Clickausbeuten im einstelligen Prozentbereich liefert, wohingegen die indirekte Methode deutlich bessere Ausbeuten ergibt. Wie bereits angesprochen, ist der Rückschluss von der RCA auf die Clickausbeute bei der direkten Methode nicht ohne weiteres möglich. Bei der Auswertung muss beachtet werden, welche radioaktive Spezies in der Probe vorhanden sind, da die Anwesenheit von freiem Radiometall eine andere Aussage liefert als die Anwesenheit von radiomarkiertem aber ungeclicktem Chelator. Bei den hier gezeigten Vorversuchen war die Menge an freiem  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  nach 15 min vernachlässigbar gering. In beiden Proben (direkt und indirekt) war stattdessen ungeclickter, radiomarkierter Chelator vorhanden, welcher mit dem geclickten Chelator um das Radiometall konkurriert. Demzufolge entspricht das Verhältnis von radiomarkiertem Chelator zu radiomarkiertem Chelator-Polymer-Konjugat nicht zwingend dem tatsächlichen Verhältnis von Chelator zu Chelator-Polymer-Konjugat. Eine Abtrennung des ungeclickten Chelators aus der Lösung ist also ratsam, wenn die Markierungseffizienz des Chelator-Polymer-Konjugats verbessert werden soll. Dies ist in Abbildung 104 sehr gut dargestellt, welche die gerade beschriebenen Ergebnisse zusammenfasst. Es ist die RCA der direkten Radiomarkierung bezogen auf das geclickte Produkt aufgetragen. Ganz links ist die Probe, bei der Chelator und Polymer im Stoffmengenverhältnis 1:2 eingesetzt wurden. In der Mitte befindet sich die Probe, bei der das Stoffmengenverhältnis 1:10 betrug. Ganz rechts befindet sich die Probe, bei der ebenfalls Chelator und

Polymer im Verhältnis 1:10 eingesetzt wurden und bei der zusätzlich vor der Radiomarkierung die Abtrennung von ungebundenem Chelator erfolgte.

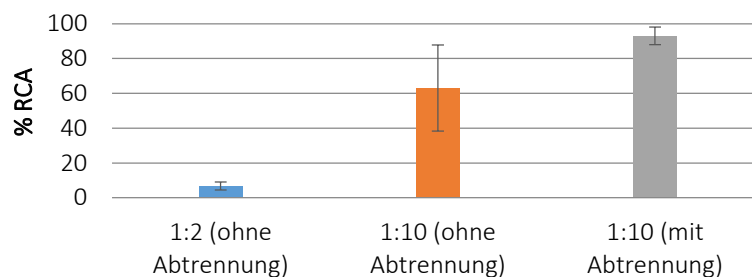


Abbildung 104: Indirekte Radiomarkierung von PSar mit und ohne Abtrennung des ungeclickten Chelators

Bei der Betrachtung dieser Graphik wird klar, dass die Vergrößerung der Stoffmenge des Polymers eine deutliche Verbesserung der Radiomarkierung des Polymers bewirkt. Die RCA konnte so von  $6,75 \pm 2,25 \%$  auf  $63,02 \pm 24,67 \%$  gesteigert werden. Die Abtrennung des ungeclickten Chelators vor der Radiomarkierung ermöglicht eine weitere Steigerung der Ausbeuten.

In Abbildung 105 ist zum Vergleich die direkte Methode mit Abtrennung und die indirekte Methode aufgetragen. Beide Varianten liefern nach 15 min sehr gute RCAs und zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse.

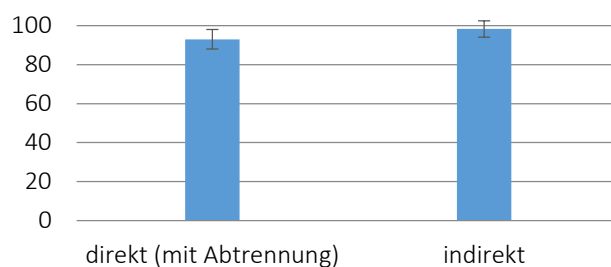


Abbildung 105: Ausbeuten der direkten (mit Abtrennung des ungeclickten Chelators) bzw. der indirekten Radiomarkierung von PSar

#### DOTA-TEG-Azid Indirekt

$[^{68}\text{Ga}]$ DOTA-TEG-Azid wurde nach erfolgreicher Kartuschenabtrennung mit in PBS-Puffer gelöstem Polymer versetzt (Verhältnis der Stoffmengen von Chelator zu Polymer = 1:10) und bei  $45^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert. Die Clickausbeuten waren quantitativ, was in dem HPLC-Diagramm in Abbildung 106 gut zu sehen ist.

Neben den Clickreaktionen mit dem  $^{68}\text{Ga}$ -markierten DOTA-TEG-Azid wurden auch Clickreaktionen mit dem  $^{177}\text{Lu}$ -markierten DOTA-TEG-Azid durchgeführt. Es sollte untersucht werden, in wieweit der Überschuss an Polymer verringert werden kann, wenn die Reaktionszeit der Clickreaktion vergrößert wird. Da dies mit  $^{68}\text{Ga}$  und seiner Halbwertszeit von 67,7 min nicht sehr sinnvoll erschien, wurde das längerlebige  $^{177}\text{Lu}$  verwendet, dessen Halbwertszeit 6,7 d beträgt.

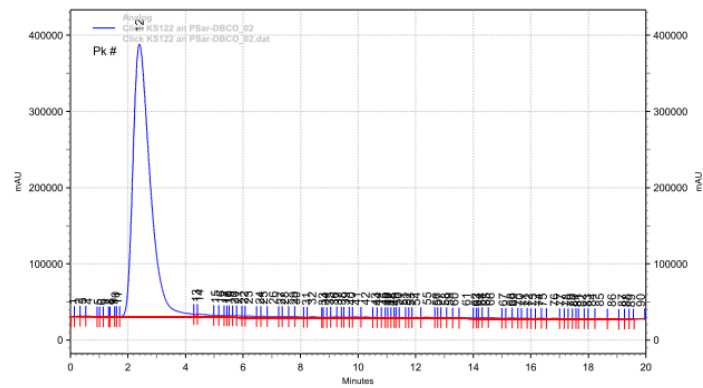


Abbildung 106: Radio-HPLC/SEC der Clickreaktion von  $[^{68}\text{Ga}]\text{DOTA-TEG-Azid}$  und PSar-DBCO

Abbildung 107 zeigt die Radio-HPLC/SEC dieser Clickreaktion nach 70 min Reaktionszeit mit  $[^{177}\text{Lu}]\text{DOTA-TEG-Azid}$ . Das molare Verhältnis von Chelator und Polymer betrug hier lediglich 1:2. Es ist neben dem sehr deutlichen Signal bei 2,86 min eine „Schulter“ zu erkennen, die auf den Verbleib von nicht geklicktem Chelator in der Reaktionsmischung hindeutet.

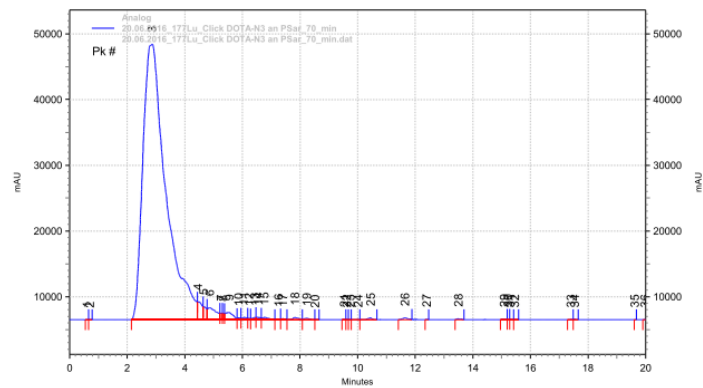


Abbildung 107: Radio-HPLC der Clickreaktion von  $[^{177}\text{Lu}]\text{DOTA-TEG-Azid}$  mit PSar-DBCO nach 70 min Reaktionszeit

Erst nach 180 min ist diese „Schulter“ nicht mehr zu erkennen, und 100 % der Radioaktivität sind an das Polymer gebunden, was in Abbildung 108 zu sehen ist.

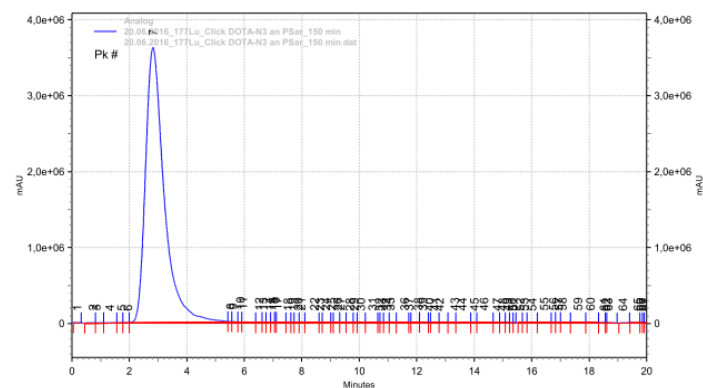


Abbildung 108: Radio-HPLC der Clickreaktion von  $[^{177}\text{Lu}]\text{DOTA-TEG-Azid}$  mit PSar-DBCO nach 180 min Reaktionszeit

Durch eine Verlängerung der Reaktionszeiten ist es also durchaus möglich, den Überschuss an Polymer deutlich zu reduzieren. Dies spart Polymer ein, und erhöht auch gleichzeitig den Anteil von geklicktem Polymer zu ungeklicktem Polymer.

*DOTA-TEG-Azid direkt*

Chelator und PSar-DBCO wurden im Verhältnis 1:10 in PBS-Puffer gemischt und bei 45 °C für 36 h gerührt. Die Lösung wurde mittels Lyophilisation eingeeengt und in 0,2 M NaOAc-Puffer aufgenommen. Es wurde für 15 min bei 95 °C radiomarkiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels komplementärer Radio-DC.

Die Ergebnisse dieser direkten Radiomarkierung des Chelator-Polymer-Konjugats zeigen gute radiochemische Ausbeuten von  $88,08 \pm 6,01 \%$ , wobei hier der Radiomarkierung keine PD10-Abtrennung vorausging. Auf diese wurde aus Gründen der Praktikabilität verzichtet. Die Abtrennung erfolgte jeweils nach der Radiomarkierung, wodurch sie sich sehr leicht mit Radio-HPLC/SEC überwachen ließ. Bei der direkten Radiomarkierung von DOTA-TEG-Azid mit PSar-DBCO wurde das Radiometall vollständig von Chelatormolekülen komplexiert. Es verblieb kein freies  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  in der Lösung. Lediglich  $8,58 \pm 3,43 \%$  des Radiometalls wurden durch nicht-geklickten Chelator komplexiert. Die untenstehende Abbildung 109 zeigt den Vergleich der direkten und indirekten Radiomarkierung von PSar-DBCO mit DOTA-TEG-Azid.

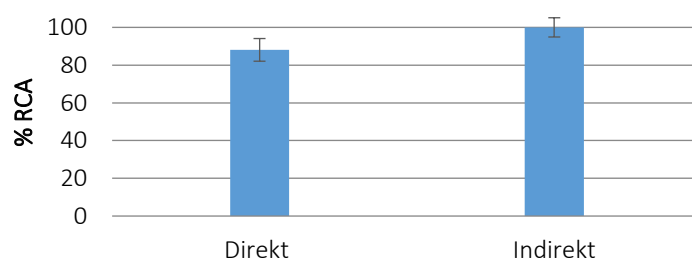


Abbildung 109: Vergleich zwischen direkter und indirekter Radiomarkierung mit DOTA-TEG-Azid

Beide Methoden zeigen gute bis sehr gute RCAs.

Im Vergleich der Chelatoren untereinander (vgl. Abbildung 110) fällt zunächst auf, dass jeweils die indirekte Methode die besseren RCAs liefert, als die direkte Methode, unabhängig vom Chelatorgrundgerüst. Der Unterschied zwischen der direkten und der indirekten Methode ist bei dem NOTA-Derivat viel größer als bei dem DOTA-Derivat, wobei der Fehler bei der direkten Radiomarkierung mit NODA-GA-Azid sehr groß ist.

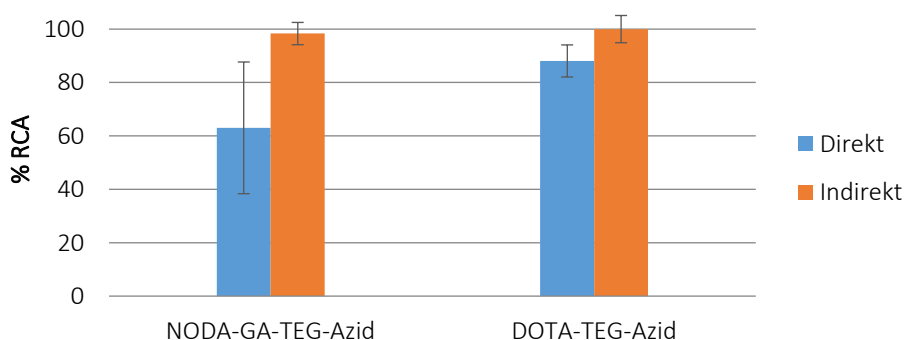


Abbildung 110: Vergleich der direkten und indirekten Radiomarkierungen von DOTA-TEG-Azid und NODA-GA-TEG-Azid

Die Vor- und Nachteile der direkten und der indirekten Radiomarkierung mit den azidierten Chelatoren liegen weniger in den radiochemischen Ausbeuten, als vielmehr in Faktoren wie Zeitersparnis und den Reaktionsbedingungen. Eine detaillierte Gegenüberstellung der beiden Markierungsmethoden findet sich am Ende des Kapitels.

### Clickreaktionen der DBCO-modifizierten Chelatoren mit PSar-Azid

Interessant bei den Clickreaktionen der DBCO-funktionalisierten Chelatoren war vor allem die Fragestellung nach der Freisetzung des Radiometalls, welche bereits bei den reinen Chelatoren beobachtet werden konnte (vgl. hierzu auch Abschnitt 3.1.2.). Hierbei hatte sich gezeigt, dass diese sogar noch verstärkt wurde, wenn der radiomarkierte Chelator einer Clickreaktion unterzogen wurde. In Kapitel 3.1.2 wurden dafür zwei mögliche Gründe diskutiert. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die sterisch anspruchsvolle und sehr hydrophobe DBCO-Einheit eine vollständige bzw. korrekte Komplexierung des  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  verhindert, wodurch das Metallkation im Verlauf der Zeit wieder freigesetzt werden würde. Dies würde jedoch nicht erklären, warum die Freisetzung des Metalls in Anwesenheit einer azidierten Komponente sogar noch verstärkt würde.

Eine zweite mögliche Begründung ist, dass die Dreifachbindung des DBCO selbst als Elektronendonator fungiert und an der Komplexierung des Radiometalls beteiligt ist. Aufgrund der Clickreaktion wird die Konformation des DBCOs allerdings verändert, und die Koordination des Metallions ist nicht mehr gegeben, was eine Freisetzung nach sich ziehen würde. Diese Hypothese kann dadurch bestätigt werden, wenn bei der direkten Radiomarkierung bei der Komplexierung des  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  weniger Schwierigkeiten auftreten, was im Folgenden untersucht wird.

#### *NODA-GA-DBCO indirekt*

Der radiomarkierte Chelator wurde über eine C8-Kartusche von unkomplexiertem Gallium abgetrennt, das LM wurde entfernt und das in PBS-Puffer gelöste Polymer wurde hinzugefügt. Das Verhältnis von Chelator zu Polymer betrug 1:10. Die Lösung wurde für 30 min bei 45 °C in einem Heizschüttler gemischt und dann mittels komplementärer Radio-DC, sowie Radio-HPLC/SEC analysiert.

Die Menge an radiomarkiertem Polymer betrug  $10,81 \pm 3,26$  %, was sehr stark von der Ausbeute bei der Clickreaktion des azidierten Chelators mit dem analogen Polymer abweicht. Das größte Problem bei der Reaktion war die bereits angesprochene Bildung von freiem Radiometall, welche dazu führte, dass die Menge an radiomarkiertem Polymer sogar im Verlauf der Clickreaktion abnahm. Sie betrug nach 1 min Reaktionszeit noch  $25,96 \pm 1,44$  %. Die Menge an freiem Gallium stieg um  $13,07 \pm 4,43$  % an, die Menge an ungeclicktem Chelator blieb konstant.

Dieses Resultat zeigt, dass der Gallium-Komplex bei dem geclickten Chelator instabiler ist, als der Gallium-Komplex mit dem ungeclickten Chelator.

#### *NODA-GA-DBCO direkt*

Polymer und Chelator wurden im molaren Verhältnis 10:1 in PBS-Puffer gemischt und bei 45 °C für 36 h gerührt. Die Lösung wurde mittels Lyophilisation eingeeengt und in 0,2 M NaOAc-Puffer aufgenommen. Die Radiomarkierung wurde bei 45 °C durchgeführt. Die Reaktionskontrolle dieser Reaktion erfolgte mittels Radio-HPLC/SEC und komplementärer Radio-DC.

Die Ausbeuten waren mit  $5,64 \pm 3,67$  % wenig zufriedenstellend.

Abbildung 111 zeigt den Vergleich zwischen der direkten und der indirekten Radiomarkierung des Polysarcosins mit NODA-GA-DBCO.

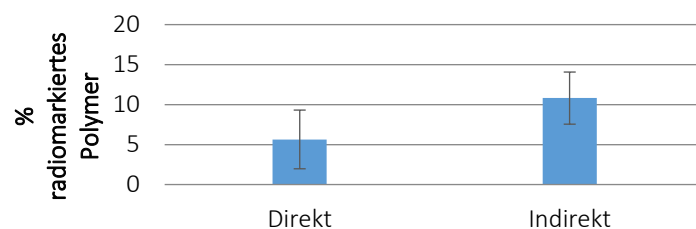


Abbildung 111: Vergleich zwischen der direkten und indirekten Radiomarkierung von PSar mit NODA-GA-DBCO

Um den Einfluss des Polymers auszuschließen, wurde derselbe Versuchsaufbau mit 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin als Clickpartner durchgeführt. Auch bei diesem niedermolekularen Reaktionspartner waren die radiochemischen Ausbeuten bezogen auf das Clickprodukt nach 15 min Reaktionszeit im einstelligen Prozentbereich. Etwa 20 % des Galliums waren in den ungeclickten Chelator eingebunden vor, und über 70 % lagen als freies  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  vor. Die Reaktionsmischung der Clickreaktion zwischen NODA-GA-DBCO und 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin wurde massenspektrometrisch analysiert. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Clickreaktion erfolgreich gewesen war. Lediglich das azidierte Tetraethylglykolamin konnte in den auftretenden Massensignalen identifiziert werden. Der DBCO-funktionalisierte Chelator und das Clickprodukt waren nicht sichtbar. Allerdings liefert ein Massenspektrum lediglich Informationen über die Ionisierbarkeit der in der Probe enthaltenen Substanzen. Ist eine Komponente nicht in dem Spektrum zu erkennen, bedeutet dies entweder, dass die Ionenausbeuten der Substanz nicht hoch genug sind, oder, dass sie nicht in der Probe vorhanden war.

#### *DOTA-DBCO indirekt*

Der radiomarkierte Chelator wurde nach erfolgter Kartuschenabtrennung vom Lösungsmittel befreit und im molaren Verhältnis von 1:10 mit azidiertem PSar in PBS-Puffer gemischt. Die Clickreaktion erfolgte für 30 min bei 45 °C. Die Reaktion wurde mit komplementärer Radio-DC und Radio-HPLC/SEC analysiert und ausgewertet.

Auch bei diesem DBCO-Derivat zeigten sich die erwarteten Schwierigkeiten. Das wird in dem Durchschnittswert der Ausbeute von  $20,49 \pm 19,63$  % sehr deutlich. Der große Fehler zeigt an, wie wenig verlässlich die Reaktion war. Hierbei war, wie bereits bei NODA-GA-DBCO, die Freisetzung des Galliums das größte Problem. Die Menge steigt von  $10,65 \pm 7,76$  % nach 1 min bis hin zu  $41,44 \pm 14,95$  % nach 30 min an, wobei das freigesetzte Gallium zum Großteil aus dem Chelator-Polymer-Konjugat stammte.

#### *DOTA-DBCO direkt*

DOTA-DBCO und das Polymer wurde im molaren Verhältnis von 1:10 in PBS-Puffer gemischt und für 36 h bei 45 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Lyophilisator entfernt und der Rückstand wurde in Natriumacetatpuffer aufgenommen, mit Generatoreluat versetzt und bei 95 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte über komplementäre Radio-DC und Radio-HPLC/SEC.

Wie schon bei dem NODA-GA-DCBO-Derivat waren auch hier die Ausbeuten nach der Clickreaktion sehr gering, was in Abbildung 112 noch einmal zusammenfassend gezeigt ist.

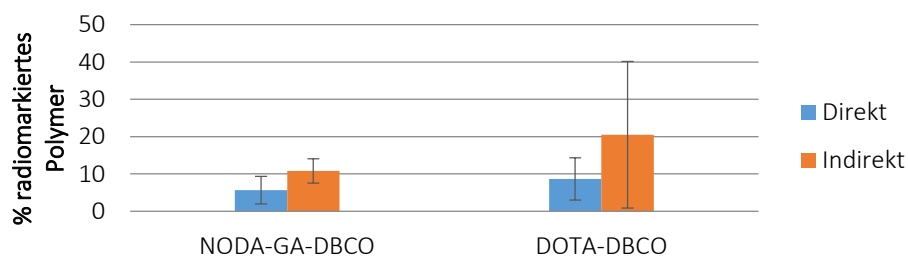


Abbildung 112: Vergleich der direkten und indirekten Radiomarkierung mit DOTA-DBCO und NODA-GA-DBCO

Zum Vergleich wurde anstelle des azidierten Polymers, wie bereits bei dem NODA-GA-DBCO-Derivat, 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin als Reaktionspartner verwendet. Hier zeigten sich ähnliche Resultate, wie bei dem NODA-GA-Derivat, nämlich freies Gallium und radiomarkierter Chelator, jedoch kein Click-Produkt. Auch die Reaktionsmischung aus der Clickreaktion zwischen DOTA-DBCO und 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin ergab bei der massenspektrometrischen Analyse keine Aussage über den Erfolg der Clickreaktion, da lediglich das azidierte Tetraethylglykolin Ionenausbeuten lieferte.

Dass die DBCO-funktionalisierten Chelatoren das Radiometall weniger stabil komplexieren als die azidierten Derivate, wurde bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Es sollte untersucht werden, ob sich diese Eigenschaft unterdrücken lässt, wenn die Clickreaktion mit dem DBCO des Chelators und der Azidfunktion des Polymers schon vor der Komplexbildung des Radiometalls stattfindet. Es zeigte sich, dass weder bei der direkten noch bei der indirekten Methode zur Radiomarkierung der Polymere zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden konnten. Interessanterweise lieferten bei den azidierten Chelatoren beide Strategien hervorragende Resultate. Auch das als Modellverbindung kommerziell erhältliche BCN-DOTA (**49**) zeigte bei der direkten und der indirekten Radiomarkierung deutlich bessere Resultate als die DBCO-funktionalisierten Chelatoren. Hier waren gute Click- bzw. Markierungsausbeuten zu verzeichnen.

Da der Versuchsaufbau jeweils identisch war und dieselben Lösungen (PBS-Puffer, Generatoreluat, Natriumacetatpuffer usw.) verwendet wurden, wird ein systematischer Fehler ausgeschlossen.

Zusammengefasst treten bei den DBCO-funktionalisierten Chelatoren zwei Phänomene auf. Zum einen zeigen sie sehr schlechte Clickausbeuten, unabhängig davon, ob die direkte Methode oder die indirekte Methode verwendet wurde. Zum anderen wird bei der indirekten Methode im Verlauf der Clickreaktion Gallium freigesetzt. Es gibt bisher keine eindeutige Erklärung, die beide Phänomene begründen kann. Darum werden die beiden Probleme separat diskutiert.

Eine mögliche Erklärung für die deutlich schlechter verlaufende Clickreaktion bei den DBCO-funktionalisierten Chelatoren stützt sich auf den hydrophoben Charakter des DBCOs. Durch ihn werden DOTA-DBCO und NODA-GA-DBCO zu amphiphilen Molekülen. Gelöst in wässrigen Medien, wie es bei den Clickreaktionen der Fall ist, können sich daher Mizellen bilden, bei denen das DBCO innen liegt und der hydrophile DOTA- (bzw. NODA-GA-)Teil außen. Durch die Bildung dieser Mizellen ist die DBCO-Einheit für die Clickreaktion mit dem Polymer nicht mehr so gut zugänglich und die Clickausbeuten sind entsprechend gering. Die azidierten Chelatoren hingegen haben keinen hydrophoben Teil, der die Bildung von Mizellen bewirken würde. Die Azide sind optimal für die Clickreaktion zugänglich, was sich in guten Clickausbeuten widerspiegelt.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Komplexstabilität der  $[^{68}\text{Ga}]\text{DBCO}$ -Derivate muss beinhalten, dass das Gallium nicht korrekt durch das DOTA bzw. NODA-GA komplexiert wurde, da DOTA und NODA-GA für gewöhnlich sehr gute Komplexstabilitäten mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  aufweisen. Diese unvollständige

Koordination in Anwesenheit eines DBCO kann daraus resultieren, dass das Metallion durch die DBCO-Einheit koordiniert wird. Dadurch gelangt es nicht in den Makrozyklus des Chelators, der es stabil komplexieren könnte. Die Koordination des Metallions durch das DBCO wird in dem Moment aufgehoben, in dem die Clickreaktion stattfindet, sodass das Gallium als freies Metallion vorliegt. Da während der Clickreaktion die Bedingungen für die Komplexbildung des Gallium-DOTA-Komplexes (bzw. des Gallium-NODA-GA-Komplexes) nicht gegeben sind, ist die Bildung von freiem Gallium auf der Radio-DC und der Radio-HPLC sichtbar.

### **Gegenüberstellung der direkten und der indirekten Methode bei der Radiomarkierung mittels SPAAC**

Die indirekte Radiomarkierung mittels SPAAC stellt eine sehr effiziente und elegante Alternative zu üblichen Ligationsarten dar. Der Charme dieser Variante besteht vor allem darin, dass auch sensitive Moleküle wie beispielsweise Antikörper auf diese Weise für die Radiomarkierung mit verschiedenen Radiometallen zugänglich gemacht werden können.

Im Folgenden werden weitere Vor- und Nachteile der beiden Ansätze erörtert und in Tabelle 10 einander gegenübergestellt.

Die Probenpräparation ist bei der direkten Methode deutlich aufwändiger als bei der indirekten Methode, da die Probe vor der Radiomarkierung mittels PD10 von ungeclicktem Chelator befreit werden sollte. Die Analytik der PD10-Fractionen ist jedoch aufgrund der sehr geringen Konzentration mit UV-HPLC nicht möglich. Es muss exemplarisch eine radiochemische „*proof-of-concept*“-Analytik durchgeführt werden, was aufgrund des Probenvolumens nicht jedes Mal möglich ist. Eine Qualitätskontrolle ist demzufolge sehr schwierig durchzuführen. Anders verhält es sich bei der indirekten Methode. Da hier die Komponenten bereits während der Clickreaktion radioaktiv sind, ist eine Überwachung der Reaktion mit Radio-HPLC oder Radio-DC sehr einfach und jedes Mal möglich.

Dadurch, dass die Probe bei der direkten Methode vor der Radiomarkierung von ungeclicktem Chelator abgetrennt wird, und dadurch, dass der ungeclickte Chelator sich schneller radiomarkieren lässt, als das Chelator-Polymer-Konjugat, ist eine quantitative Aussage über den Erfolg der Clickreaktion bei der direkten Methode nicht möglich. Denn dafür müsste entweder der über PD10 abgetrennte Chelator quantifiziert werden (was bei den geringen Konzentrationen eine große Herausforderung ist), oder es müsste ein Faktor bestimmt werden, der angibt, wie viel schneller der ungeclickte Chelator das Radiometall komplexiert, als der an das Polymer geclickte Chelator.

Aufgrund der Halbwertszeit, aber auch wegen der Strahlenexposition ist es vorzuziehen, so wenig radioaktive Arbeits- und Syntheseschritte wie möglich durchzuführen. Dies ist ein Vorteil der direkten Methode, bei der die Reaktionszeit während der Radiomarkierung vergleichsweise kurz ist. Die indirekte Methode hingegen sieht nach der Radiomarkierung des Chelators und dessen Abtrennung noch eine 30 minütige Clickreaktion vor.

Bei beiden Methoden muss sich eine PD10-Säule anschließen, um eventuell vorhandene niedermolekulare Substanzen abzutrennen, und die radiomarkierten Makromoleküle in isotonischer NaCl-Lösung zu formulieren. Bei der direkten Methode muss zusätzlich eine PD10-Abtrennung vor der Radiomarkierung durchgeführt werden. Hier ist die indirekte Methode wieder im Vorteil.

Dadurch, dass sämtliches freies Gallium bei der indirekten Methode abgetrennt wird, noch bevor es in Kontakt mit dem Polymer kommt, ist bei dieser Methode eine unspezifische Bindung des Radiometalls an das Polymer vollständig auszuschließen. Es können demnach auch Polymere, Nanopartikel oder Biomoleküle mit der indirekten Methode radiomarkiert werden, welche das Gallium unspezifisch und nicht stabil binden würden.

Die Markierungsbedingungen von makrozyklischen Chelatoren, besonders von den vielseitigen DOTA-Derivaten, sind i.d.R. sehr harsch. Die niedrigen pH-Werte und sehr hohen Temperaturen führen bei vielen Substanzen zur Zersetzung, weshalb sie nicht zuverlässig mit Radiometallen markiert werden können. Die Verwendung der indirekten Methode ermöglicht es, den radiomarkierten Chelator unter sehr milden Bedingungen anzubringen, wodurch selbst sensitive Moleküle (z.B. Antikörper) für die Radiomarkierung zugänglich gemacht werden können.

Tabelle 10: Vor- und Nachteile der direkten und der indirekten Radiomarkierung mittels SPAAC im Überblick

	direkte Methode	indirekte Methode
Aufwand der Probenpräparation	hoch	normal
Qualitätskontrolle der Clickreaktion möglich?	nein	ja
Abtrennung vor der Radiomarkierung nötig?	ja	nein
Abtrennung nach der Radiomarkierung nötig	ja	ja
Anzahl der radioaktiven Synthese- bzw. Arbeitsschritte	2	4
Quantitative Aussage über den Erfolg der Clickreaktion möglich?	nein	ja
Reaktion trotz unspezifischer Bindung an das jeweilige Polymer möglich?	nein	ja
Milde Reaktionsbedingung?	nein	ja

Da beide Varianten der Radiomarkierung mit den azidierten Derivaten vergleichbare Ergebnisse liefern, die indirekte Methode jedoch deutlich mehr Vorteile hat, ist diese Methode der direkten vorzuziehen.

### 3.4 Kernvernetzte Mizellen

In diesem Kapitel wird die Radiomarkierung von kernvernetzten Mizellen beschrieben, welche den Chelator nicht auf ihrer Oberfläche tragen, sondern im Kern. Die Mizellen bestanden aus Polysarcosin-Polycystein-Blockcopolymeren. Diese aggregieren zu Mizellen mit dem hydrophoberen Cystein im Kern und dem hydrophileren Sarcosin außen. Kernvernetzt werden die Mizellen über Disulfidbrücken, welche sich mit dem Vernetzer Liponsäure ausbilden. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 113 gezeigt.

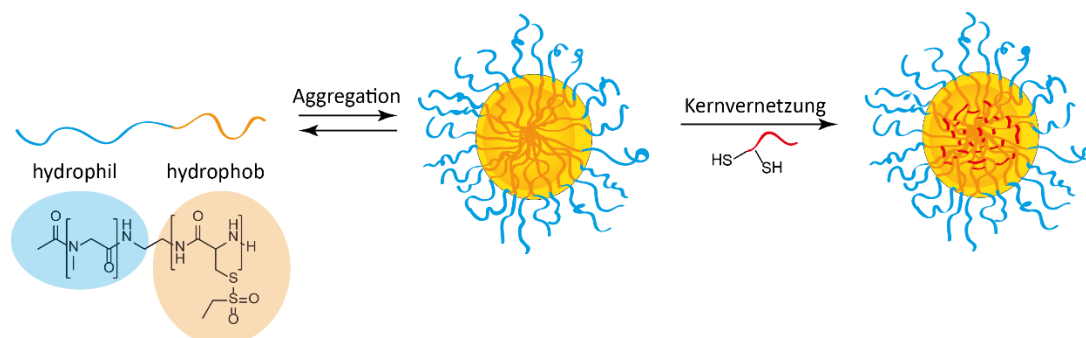


Abbildung 113: Schema der Bildung der Kernvernetzten Mizellen

Trägt der Cysteinblock oder der Vernetzer einen Chelator, so sind die Mizellen für die Radiomarkierung zugänglich, ohne dass ihre Oberfläche und damit ihre Pharmakokinetik beeinflusst werden.

#### 3.4.1 Organische Synthesen

##### NODA-GA-Liponamid (**54**)

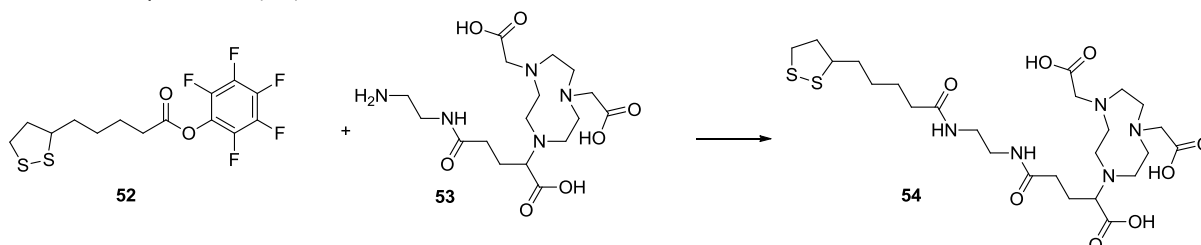


Abbildung 114: Darstellung von NODA-GA-Liponamid (**54**)

Der Pentafluorphenylsther der Liponsäure (**52**), welcher durch Kristina Klinker (Arbeitskreis Dr. M. Barz, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert worden war, wurde zusammen mit dem Chelator (**53**) und Triethylamin unter Argonatmosphäre im abs. DMF gerührt. Zunächst wurden 4 eq. Base zugegeben und nach 1 h wurde das Reaktionsgemisch massenspektrometrisch untersucht. Da nur sehr wenig Umsatz zu beobachten war, wurden erneut 4 eq. Base zugegeben und es wurde 3 h bei RT gerührt. Die Reinigung der Reaktionsmischung erfolgte über semipräparative HPLC und ergab 80 % des Produkts, sodass keine weitere Optimierung dieser Reaktion stattfand.

Die Präparation und Charakterisierung der Blockcopolymeren und der kernvernetzten Mizellen erfolgte ebenfalls durch Kristina Klinker (Arbeitskreis Dr. M. Barz, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Sie wiesen einen hydrodynamischen Radius von 47 nm auf.

### 3.4.2 Radiochemische Experimente

Zunächst wurde das Liponamid (**54**) alleine radiomarkiert. Dabei sollte der Einfluss der Liponsäure auf die Komplexeigenschaften des NODA-GA-Gerüsts untersucht werden. **54** wurde in NaOAc-Puffer gelöst, zu dem von Aceton befreiten Generatoreluat gegeben und für 15 min bei 45 °C inkubiert.

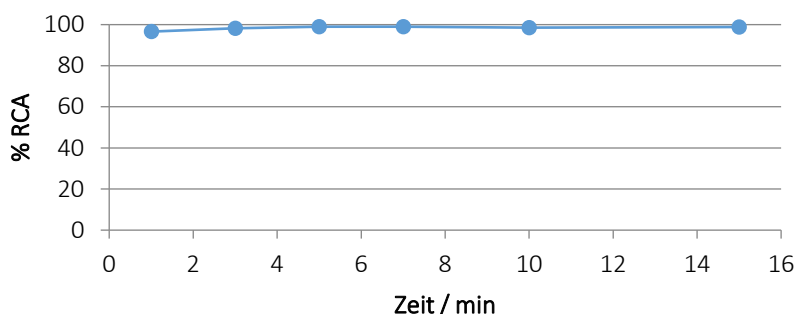


Abbildung 115: Radiomarkierung des NODA-GA-Liponamid-Vernetzers

In Abbildung 115 ist die Kinetikstudie gezeigt. Bereits nach kürzester Reaktionszeit konnten quantitative RCAs erhalten werden. Die Liponsäurefunktion stört demzufolge bei der Radiomarkierung nicht. Dieses Resultat bot die Grundlage dafür, NODA-GA-Liponamid als Vernetzer einzusetzen.

Für die Radiomarkierung der Mizellen wurde analog vorgegangen. Es wurde ein Aliquot von 700 µg der Mizellen in 1 mL NaOAc-Puffer gelöst und zu der eingedampften N2-Lösung gegeben. Es wurde für 15 min bei 45-65 °C inkubiert. Die Bestimmung der RCA wurde mittels komplementärer DCs und Radio-HPLC/SEC vorgenommen.

Um auszuschließen, dass sich das Radiometall unspezifisch an der Oberfläche der Mizellen anlagert, wurde eine Blindprobe unter denselben Bedingungen mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  inkubiert. In dieser Probe waren die Mizellen identisch präpariert worden, jedoch ohne Chelator am Vernetzer.

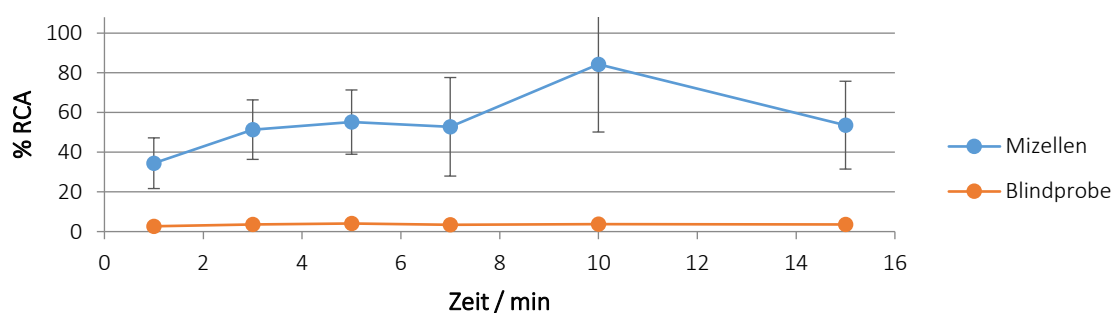


Abbildung 116: Radiomarkierung der Mizellen mit NODA-GA-Liponamid als Vernetzer und der Blindprobe

Die Ergebnisse beider Radiomarkierungen sind in Abbildung 116 aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mizellen ohne Vernetzer keine Aufnahme von Aktivität aufweisen. Eine unspezifische Bindung kann somit ausgeschlossen werden. Die Mizellen hingegen, welche mit NODA-GA-Liponamid vernetzt wurden, zeigen eine moderate Aufnahme des Radiometalls, wobei die Schwankungen bei den verschiedenen Chargen recht groß waren. Da jede Charge einen anderen Vernetzungsgrad hat und der Kern jeweils etwas unterschiedlich stark abgeschirmt ist, war diese Tatsache nicht weiter überraschend.

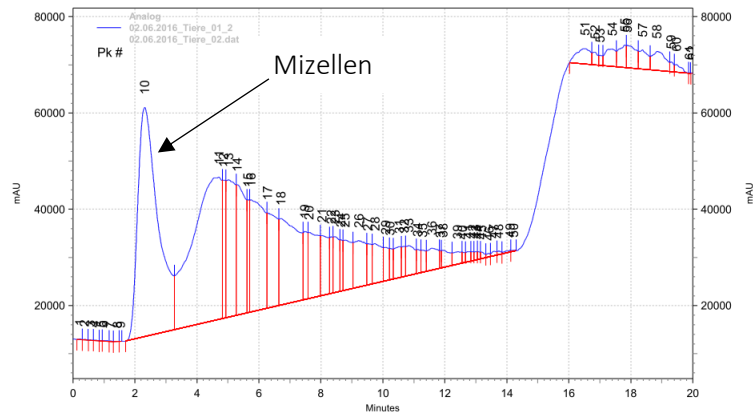


Abbildung 117: Radio-HPLC/SEC der Markierungsreaktion der mit Liponamid kernvernetzten PSar-PCys-Mizellen

Die Reaktionszeit betrug 30 min. Aufgrund der Halbwertszeit des  $^{68}\text{Ga}$  wurde eine Verlängerung der Reaktionszeiten nicht als sinnvoll angesehen. Die Vergrößerung der Reaktionstemperatur von  $45\text{ }^\circ\text{C}$  auf  $65\text{ }^\circ\text{C}$  brachte keine signifikante Verbesserung der RCA. Um die Integrität der Mizellen nicht zu beeinträchtigen, wurde darauf verzichtet, die Reaktionstemperatur weiter zu erhöhen.

Das freie Gallium konnte von den kernvernetzten Mizellen sehr effizient mit einer PD10-Säule abgetrennt werden, welche mit Gravitationsfluss betrieben wurde. Als Eluens wurde hierbei isiton. NaCl-Lsg. verwendet, wodurch die Formulierung der Mizellen mit diesem Reinigungsschritt bereits abgeschlossen war. Die Radio-HPLC/SEC-Diagramme der Reaktionsmischung, sowie der durch PD10-Abtrennung erhaltenen Probe sind in Abbildung 117 und Abbildung 118 gezeigt. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass mit der PD10-Abtrennung eine sehr gute radiochemische Reinheit der kernvernetzten Mizellen erzielt werden konnte.

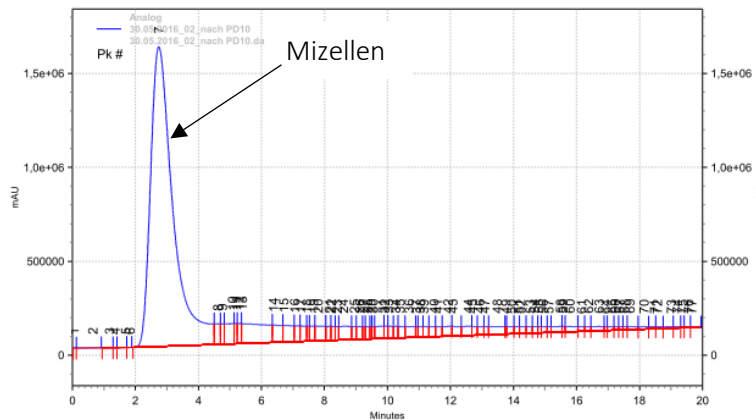


Abbildung 118: Radio-HPLC/SEC der Markierungsreaktion der mit Liponamid kernvernetzten PSar-PCys-Mizellen nach PD10-Abtrennung

Die Stabilität der Radiomarkierung wurde in NaCl-Lösung über 120 min überwacht. Es konnte keine Freisetzung des Radiometalls beobachtet werden, was Abbildung 119 bestätigt.

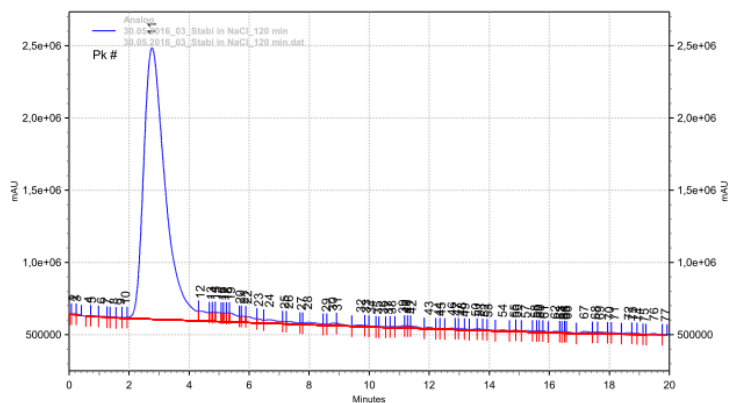


Abbildung 119: Radio-HPLC/SEC der kernvernetzten PSar-PCys-Mizellen nach 120 min in isoton. NaCl.

Neben den über Liponamid vernetzten Mizellen wurden auch Mizellen präpariert, welche den Chelator nicht am Vernetzer trugen, sondern im hydrophoben Block des Polymers. Hier kam neben Liponsäure als Vernetzer auch das hydrophobere Hexandithiol zum Einsatz. Dadurch wurde die Hydrophobizität des Kerns erhöht. Auch diese Partikel wurden von Kristina Klinker (Arbeitskreis Dr. M. Barz, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert und charakterisiert.

Die Fragestellung bei der Radiomarkierung und insbesondere der *in vivo*-Evaluierung war es, durch die an unterschiedlichen Stellen radiomarkierten Bestandteile der Mizelle mehr Informationen über ihr *in vivo*-Verhalten zu bekommen. Denn nach der Applikation und der Verstoffwechslung der Mizellen würde ein radioaktiv markiertes Blockcopolymer eine andere Körperverteilung aufweisen als NODA-GA-Liponamid.

Die Menge an Chelator, welcher an den hydrophoben Block des Polymers gekoppelt war, konnte nicht bestimmt werden. Die Radiomarkierung der Mizellen erfolgte analog zu der oben beschriebenen. Es konnte jedoch keine Koordination des Radiometalls beobachtet werden. Ob dies an den besser abgeschirmten Kernen der Mizellen liegt, oder daran, dass zu wenig bis gar kein Chelator vorhanden war, lässt sich nur mutmaßen.

Aus diesem Grund wurden lediglich die über NODA-GA-Liponamid kernvernetzten Mizellen für die *in vivo*-Evaluierung verwendet.

Zusammengefasst kann man diese Art der Radiomarkierung von makromolekularen Systemen als sehr elegant, jedoch nicht trivial beschreiben. Sie ermöglicht es, die entsprechenden Partikel für PET zugänglich zu machen, ohne dass die pharmakokinetischen Eigenschaften verändert werden. Für den Erfolg dieser Methode ist es sehr wichtig, Mizellen-Chargen mit konstanten Parametern zu verwenden (z.B. Grad der Vernetzung, Länge der Blöcke der Polymere, Größe der Mizellen), damit die Markierungseffizienzen vergleichbar sind.

### 3.4.3 *in vivo* $\mu$ PET-Studien und *ex vivo*-Biodistributionsstudien

Für die  $\mu$ PET-Studien und die *ex vivo*-Biodistributionsstudien wurden zunächst die radiomarkierten kernvernetzten Mizellen über eine PD10-Säule von unkomplexiertem  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  abgetrennt. Eluens war isotonische Kochsalzlösung. Somit wurden die Abtrennung und die Formulierung in einem Schritt durchgeführt.

Die Injektion erfolgte *i.v.* in eine Schwanzvene von vier gesunden C57BL/6-Mäusen. Eine Maus wurde 60 min dynamisch in einem kombinierten PET/MR vermessen. Nach einer Stunde wurden alle Mäuse getötet, die Organe entnommen, gewogen und in einem automatisierten Gamma-Counter auf die enthaltene Aktivität vermessen.

Die Mizellen zeigen nach 60 min eine gute Blutretentionszeit. Die *ex vivo*-Biodistribution ergab einen Wert von  $20,57 \pm 1,93$  % ID/g Blut. Für Nanopartikel, welche als Wirkstofftransportsysteme zum Einsatz kommen sollen, ist es natürlich exzellent, wenn sie eine gute Blutretentionszeit aufweisen. Die weiteren Werte der *ex vivo*-Biodistribution sind in Abbildung 120 aufgetragen.

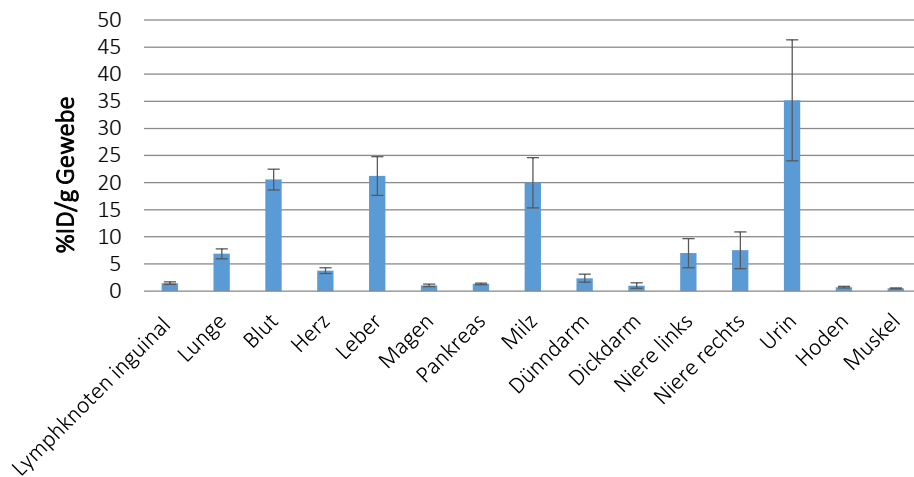


Abbildung 120: Ergebnisse der *ex vivo*-Biodistributionsstudien für die kernvernetzten Mizellen nach 60 min in gesunden C57BL/6-Mäusen;  $n = 4$

Es ist eine erhöhte Aufnahme im Urin zu verzeichnen, sowie Aufnahmen in Leber und Milz. Die Werte für die Nieren, sowie für die Lunge sind geringer. In den Organen des Intestinaltraktes ist kaum Aktivität aufgenommen worden, ebenso wie in den Muskeln, Lymphknoten oder den Hoden.

Die PET/MR-Bilder (Abbildung 121), sowie die daraus resultierenden Zeit-Aktivitäts-Kurven (Abbildung 122) bestätigen die gute Retention der Partikel im Blut (für das die Werte aus dem PET-Bild durch eine ROI im Herzen bestimmt wird), sowie die Anreicherung in der Blase.

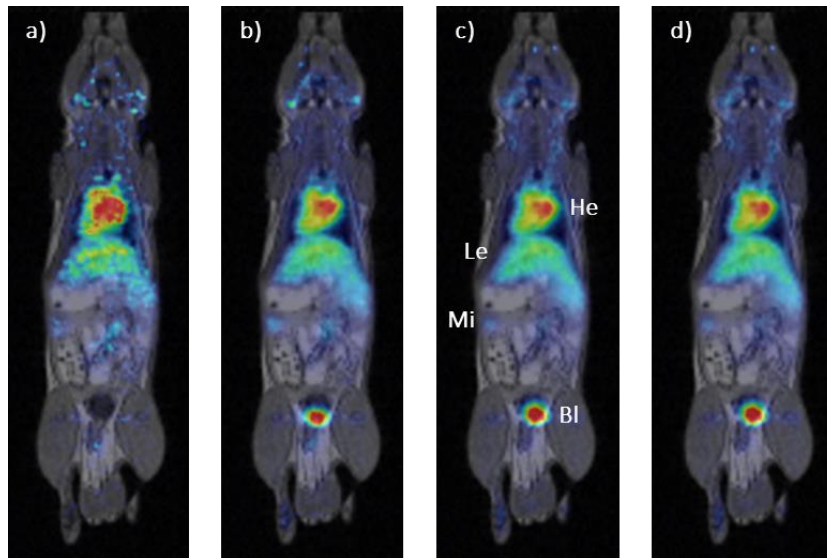


Abbildung 121:  $\mu$ PET/MR-Aufnahmen einer gesunden C57BL/6-Maus. a) 0-1 min; b) 1-10 min; c) 10-30 min; d) 30-60 min; He=Herz, Le=Leber, Mi=Milz, Bl=Blase

In den Zeit-Aktivitätskurven ist in den untersuchten Organen mit Ausnahme der Blase eine schnelle initiale Anflutung der Aktivität zu erkennen. Danach scheint sich in Leber, Lunge, Milz und Niere eine Sättigung einzustellen. Lediglich in der Blase steigt der Wert für die Aktivität kontinuierlich an, wobei die Werte der Blase mit zum Teil sehr großen Fehlern behaftet sind. Der Wert für das Blut ist über einen längeren Zeitraum konstant und nimmt dann langsam ab.

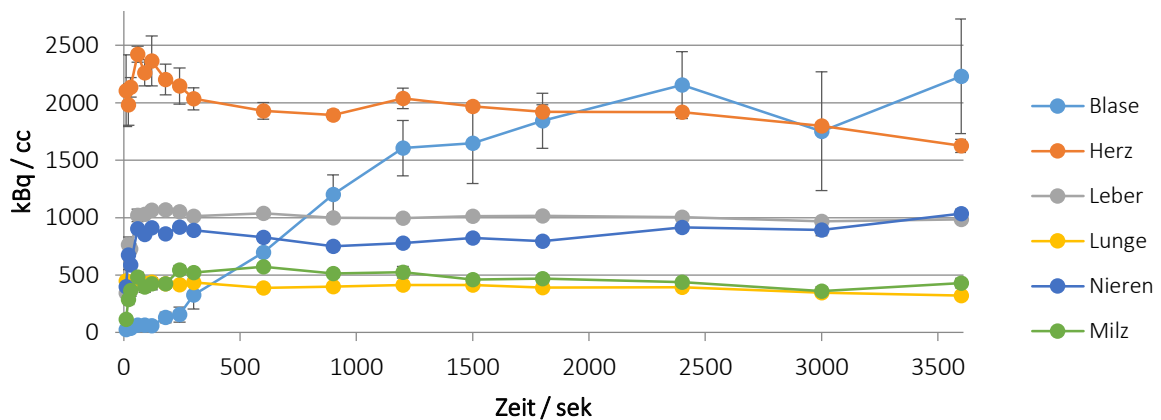


Abbildung 122: Zeitaktivitätskurven für verschiedene Organe über 60 min

In Kombination mit den PET/MR-Bildern ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Mizellen sehr gut im Blut zurückgehalten werden. Die leicht erhöhten Werte für Leber, Lunge, Niere und Milz sind auf die gute Durchblutung dieser Organe zurückzuführen. Dies wird vor allem durch die plateauartigen Zeit-Aktivitätskurven nahegelegt. Würden die Mizellen beispielsweise hepatobiliär ausgeschieden, so wäre für die Leber ein Anstieg der Aktivität über die Zeit zu erwarten. Der relativ hohe Wert für die Blase wird aufgrund der großen Fehler nicht so stark gewertet. Er resultiert aus radioaktiven Fragmenten, welche unterhalb der renalen Ausschlussgrenze (ca. 5 nm)<sup>116</sup> liegen. Dies deutet darauf hin, dass die Mizellen mit der Zeit abgebaut werden, was den Erwartungen entspricht.

Für Langzeit-Studien sind Experimente mit längerlebigen Nukliden geplant, welche es ermöglichen, Zeit-Aktivitätskurven über mehrere Stunden aufzunehmen. Dies soll in Kombination mit der HPLC-Analytik

des Urins und mit Blutmetaboliten-Analyse mehr Aufschluss über das Schicksal der Mizellen im Körper geben.

---

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Evaluierung von nanodimensionalen und polymeren Wirkstofftransportsystemen mittels PET ist es essenziell, robuste und zuverlässige Methoden für die Radiomarkierung zur Verfügung zu haben. Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, den Positronemitter  $^{68}\text{Ga}$  auf verschiedene Arten an Polymere und Nanopartikel anzubinden und diese Systeme so für PET zugänglich zu machen.

Radiometalle wie das  $^{68}\text{Ga}$  werden über bifunktionale Chelatoren eingeführt, welche das Metallion stabil komplexieren, und eine zusätzliche Funktion für die Anbindung an das Polymer bzw. den Nanopartikel aufweisen. Im ersten Teil der Arbeit wurden Chelatoren durch entsprechende Funktionalisierung für SPAAC zugänglich gemacht. Als Azid-Komponente wurde ein Tetraethylenglycol-Azid verwendet, und als ringgespanntes Alkin das DBCO. Die auf diese Weise funktionalisierten Chelatoren sollten dazu verwendet werden, mit Nanopartikeln oder Polymeren die Clickreaktion einzugehen, bevor und auch nachdem sie radiomarkiert werden sollten. Diese Vorgehensweise wird als direkte bzw. indirekte Radiomarkierung bezeichnet. Die indirekte Radiomarkierung orientiert sich hierbei an dem Konzept der prosthetischen Gruppen oder Synthons für die Radiomarkierung von sensitiven Molekülen, das bei  $^{18}\text{F}$ -Fluorierungen oft angewendet wird.

Die clickfähigen Chelatoren wurden auf ihr radiochemisches Verhalten mit  $^{68}\text{Ga}$ , aber auch mit  $^{177}\text{Lu}$  und  $^{44}\text{Sc}$  untersucht. Alle Derivate zeigten sehr gute radiochemische Ausbeuten bei der Komplexierung des Radiometalls. Jedoch zeigten nur die Azid-funktionalisierten Chelatoren die nötige Komplexstabilität. Es wird vermutet, dass die amphiphilen DBCO-funktionalisierten Chelatoren aufgrund der sterisch recht anspruchsvollen DBCO-Funktion und ihrer relativ starken  $\pi$ -Donorwirkung für die Radiomarkierung mit Metallionen weniger geeignet sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten unterschiedliche Polymer-gecoatete anorganische Nanopartikel radiomarkiert werden. Sie wurden zum einen über Amidbindung mit dem NHS-Ester oder einem *in situ* generierten Aktivester der Chelatoren gekoppelt. Hierbei war die direkte Reaktionskontrolle über herkömmliche Analytik nicht möglich, sodass die Radiomarkierung der Reaktionsmischung als indirekte Analytik verwendet wurde. Auf diese Weise wurde es möglich, zu verfolgen, ob die Kopplungsreaktion erfolgreich gewesen war. Die Kopplung selbst erwies sich als mäßig zuverlässig. Sie konnte deutlich verbessert werden, wenn das Polymer mit dem Chelator reagierte, bevor es die Partikeloberfläche umhüllte. Auf diese Weise konnten die Ausbeuten, sowie die Radiomarkierung des gesamten Systems deutlich verbessert werden.

Die anorganischen Nanopartikel wurden mittels SPAAC radiomarkiert. Hierfür wurde  $^{68}\text{Ga}$ BCN-DOTA nach Radiomarkierung und festphasenbasierter Reinigung an Azid-funktionalisierte Nanopartikel angebunden. Die auf diese Weise radiomarkierten Nanopartikel wurden in einer  $\mu\text{PET}$ -Studie, sowie in *ex vivo*-Biodistributionsstudien auf ihre Pharmakokinetik hin untersucht. Die Partikel zeigten eine hohe Anreicherung in Leber und Milz, und nach 60 min waren noch nahezu 10 % im Blut vorhanden. Das Anreicherungsmuster lässt darauf schließen, dass die ca. 130 nm großen Nanopartikel vom MPS erkannt werden. Da die anorganischen Nanopartikel nicht bioabbaubar sind, verweilen sie in der Leber und werden nicht weiter verstoffwechselt. Die Werte der Aktivität im Blut nach 60 min geben erste Hinweise auf eine gute Blutretention mkt verlängerter Zirkulationszeit dieses Systems. Für weitere Aussagen müssen Tierstudien mit längerlebigen Radionukliden durchgeführt werden. Da die indirekte Radiomarkierung mit BCN-DOTA sich als sehr gute Markierungsmethode herausgestellt hat, und DOTA vielseitig einsetzbar ist, kann auch das langlebige  $^{177}\text{Lu}$  etc. als Nuklid verwendet werden. Interessant wäre bei diesem Partikelsystem eine Struktur-Wirkungsbeziehung herstellen zu können, die den Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und der Pharmakokinetik zeigt.

Die genauere Untersuchung der direkten und der indirekten Radiomarkierung mit den neu synthetisierten Chelatoren **4**, **7**, **15** und **17** sollten anhand einer Modellverbindung durchgeführt werden. Hierzu wurden PSar-Homopolymere verwendet, welche mit einem Azid oder einem DBCO endgruppenfunktionalisiert worden waren. Hierbei zeigten die DBCO-funktionalisierten Chelatoren erneut die bereits beschriebenen Schwächen. Auch bei der direkten Radiomarkierung, bei der die Chelatoren noch vor der Radiomarkierung an das Polymer geklickt wurden, konnten keine zufriedenstellenden Click- bzw. radiochemische Ausbeuten erhalten werden. Dies wird dem amphiphilen Charakter von **4** und **7** zugeschrieben, durch den die Moleküle in der Lage sind, Mizellare Strukturen zu bilden. Dadurch, dass sich der clickfähige DBCO-Teil der Chelatoren dann im inneren dieser Mizellen befindet, steht er nicht mehr zur Clickreaktion zur Verfügung. Die azidierten Chelatoren hingegen zeigten hervorragende Clickausbeuten und RCAs in beiden Reaktionen (direkt und indirekt). Das stöchiometrische Verhältnis von Chelator zu Polymer betrug hierbei 1:10 und die Reaktionszeit betrug bei der indirekten Methode 30 min. Dieser Überschuss an Polymer konnte auf 1:2 verringert werden, wenn die Reaktionszeit auf 120 min verlängert wurde. Da dies für das verhältnismäßig kurzlebige  $^{68}\text{Ga}$  wenig sinnvoll erschien, wurden diese Studien mit dem deutlich längerlebigen  $^{177}\text{Lu}$  durchgeführt.

Besonders die indirekte Methode bietet aufgrund der sehr milden Reaktionsbedingungen während der Clickreaktion viele Vorteile. Dadurch wird sie als vielseitige Methode angesehen, welche es ermöglicht, auch sensitive (Bio-)Moleküle für PET zugänglich zu machen.

PSar-PCys-Blockcopolymermizellen, welche im Kern mit NODA-GA-Liponamid vernetzt waren, wurden mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert. Dadurch, dass die komplexbildende Funktionalität im Kern der Systeme angebracht worden war, konnten die Mizellen auf ihr *in vivo*-Verhalten hin untersucht werden, ohne dass eine Oberflächenfunktionalisierung die Pharmakokinetik beeinflusst. Die Radiomarkierung der Mizellen verlief moderat und zeigt noch Optimierungsbedarf. Die markierten Mizellen wurden in gesunden Mäusen in einer  $\mu\text{PET}$ -Studie und in *ex vivo*-Biodistributionsstudien untersucht. Sie zeigten sehr gute Blutretentionszeiten und nur eine geringe Anreicherung in der Leber. Das deutet darauf hin, dass die Partikel nicht -oder kaum- durch das MPS erkannt werden.

Da sich diese Polymermizellen als sehr vielversprechende Systeme herausstellten, sind weitere Studien mit ihnen in Planung. Dabei sollen längerlebige Nuklide zum Einsatz kommen, um die Blutretention zu späteren Zeitpunkten bestimmen zu können.

---

---

# 5. Experimentalteil

## 5 Experimentalteil

In diese Arbeit fließen Teile der Bachelorarbeit von Gianna Köhn und der Modularbeit von Adrian Sevenich ein.

### 5.1 Chemikalien, Messgeräte und Software

#### 5.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel (HPLC-grade, trocken oder deuteriert) wurden von kommerziellen Anbietern (Sigma Aldrich, Alpha Aesar, Chematech, Deutero GmbH, Jena Bioscience, TCI...) erworben und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

$^{68}\text{Ga}$  wurde über einen  $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ -Radionuklidgenerator erhalten (Eckert & Ziegler AG, Berlin und Zyklotron Obninsk Ltd. Co., Russland).

Polysarcosin-basierte Polymere und Mizellen wurden von der Arbeitsgruppe Dr. M. Barz, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Anorganische Nanopartikel wurden von der Arbeitsgruppe Prof. W. Tremel, Institut für Anorganische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

#### 5.1.2 Geräte und Software

##### **Abbildungen**

Sofern nicht anders angegeben, wurden die in der Einleitung gezeigten Abbildungen mit Adobe-Illustrator angefertigt.

##### **Aktivitätsmessungen**

Messungen der Radioaktivität erfolgen in einem Isomed 2000-Aktivimeter (MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden, Deutschland).

##### **Dialyse von Nanopartikeln**

Membranen Float-A-Lyzer G2 0,1-0,5 kDa

##### **Dünnschichtchromatographie**

DCs wurden mit DC-Platten der Firma Merck (Kieselgel 60, F254) angefertigt.

##### **Größenausschlussäulen, Graviationsfluss**

PD10-Einwegsäulen, gepackt mit Sephadex® G-25, Firma GE

##### **HPLC**

Semipräparative HPLC-Aufreinigung der Substanzen erfolgte an einer LaChrom der Firma Merck mit Hitachi-Pumpe L7100 und UV-Detektor L7400. Zum Einsatz kamen verschiedene Säulen:

- Phenomenex® Synergi, 4 u, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 mikron
- Phenomenex® Gemini, 5 u, C18, 110 Å, 250 x 10,00 mm, 5 mikron
- Phenomenex® Luna, 5 u, C18, 110 Å, 250 x 10,00 mm, 5 mikron

Die verwendeten Lösungsmittel waren Wasser + 0.1 % TFA (Pumpe A) und MeCN + 0.1 % TFA (Pumpe B). Die Angaben der Laufmittelsysteme beziehen sich jeweils auf den Acetonitril-Anteil im Laufmittel.

Die Auswertung der Chromatogramme (Integration, Baselinekorrektur) erfolgte mit der Software EZChrom Elite.

**Kartuschen zur Festphasenextraktion**

Zur Abtrennung von unkomplexiertem  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  und radiomarkiertem Chelator wurden Kartuschen der Firma Waters verwendet. Es kamen hierbei Sep-Pak C18 Plus Light und Sep-Pak C8 Plus Light Kartuschen zum Einsatz.

**Kationenaustauscherharz (Generator)**

Bio-Rad; AG50WX8-400

**Massenspektrometrie**

Massenspektrometrische Analysen wurden an einer 6130 Quadropole LC/MS in Kombination mit 1220 Infinity LC (Agilent Technologies) durchgeführt.

**NMR-Spektrometrie**

NMR-Messung wurden an einem Avance III HD 300 (300 MHz, 5 mm BBFO-Kopf mit z-Gradient und ATM, B-ACS 60 Probenwechsler) mit Open-Access-Automation, an einem Avance II 400 (400 MHz, 5 mm BBFO-Kopf mit z-Gradient und ATM, SampleXPress 60 Probenwechsler) mit Open-Access-Automation oder an einem Avance III 600 (600 MHz, 5 mm TCI-CryoProbe mit z-Gradient und ATM, SampleXPress Lite 16 Probenwechsler) durchgeführt.

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Mestrenova 9.1.0.

Die eindeutige Zuordnung der Protonen und Kohlenstoffatome im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR erfolgte über HSQC- und HMBC-Experimente.

**PET-MR**

Mediso NanoScan, Rekonstruktionen erfolgten mit der Software „Teratomo“

**Radio-DC**

Radio-DCs wurden auf DC-Platten der Firma Merck (Kieselgel 60, F254) angefertigt. Die Messungen der Radio-DCs wurden mit einem Instant Imager der Firma Canberra Packard, oder mit RITA der Firma Raytest durchgeführt.

**Radio-HPLC**

Radio-HPLC wurde an einer LaChrom (Firma Marck) mit Hitachi-Pumpe L7100, UV-Detektor L7400 und Radiodetektor Gabi (Raytest) durchgeführt.

Die Auswertung der Chromatogramme (Integration, Baselinekorrektur) erfolgte mit der Software EZChrom Elite. Zum Einsatz kamen zwei verschiedene Säulen:

- Phenomenex® Luna, 5  $\mu$ , C18(2), 110 Å, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m
- HiTrap™ Desalting column 5 mL; Sephadex™ G-25 Superfine; GE Healthcare

**Säulenchromatographie**

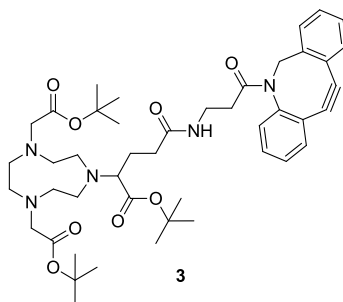
Säulenchromatographie wurde an Kieselgel der Firma Merck (0,063-0,200 mm) durchgeführt.

 **$\gamma$ -Counter**

WIZARD der Firma PerkinElmer

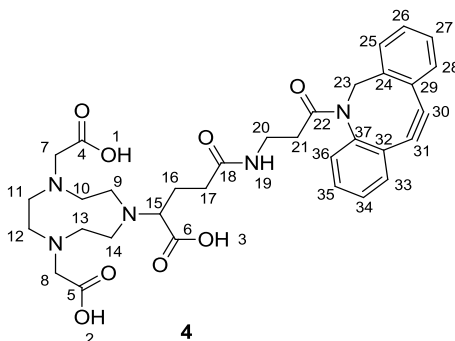
## 5.2 Organische Synthesen

## 5.2.1 Synthese von clickfähigen Chelatorsystemen

NODA-GA-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-DBCO (3)

NODA-GA-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (25 mg; 0,046 mmol; 1,0 eq.) wurde in 1 mL DMF vorgelegt und HATU (70 mg; 0,184 mmol; 4,0 eq.) wurde zugegeben. Es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. DIPEA (35,5 µL; 0,368 mmol; 8,0 eq.) wurde zu einer Lösung aus DBCO-Amin (12,7 mg; 0,046 mmol; 1,0 eq.) und 1 mL DMF gegeben und es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. Die Lösung aus DBCO-Amin, DIPEA und DMF wurde über 45 min zu der Lösung aus HATU und Chelator getropft. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Umsetzung des Rohprodukts erfolgte ohne Reinigung.

## NODA-GA-DBCO (4)



Zu dem dreifach *tert*-Butyl-geschützten NODA-GA-DBCO (3) wurde im Aceton/Stickstoffbad 1 mL TFA gegeben. Unter langsamem Erwärmen wurde für 3 h gerührt. Nach Wasserzugabe und Entfernen des LM erfolgte die Reinigung über semipräparative HPLC (Phenomenex® Synergi, 4 u, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 mikron; 35 % B, 4 mL; t<sub>r</sub> = 12,77 min). Das LM wurde entfernt und es wurden 8,6 mg (0,014 mmol; 29,5 %) des Produkts als gelbes Öl erhalten.

Die Zuordnung der Protonen und Kohlstoffe wurde über <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, HSQC-, HMBC-, NOESY- und TOCSY-Experimente vorgenommen. Da viele Signale überlagerten, war eine eindeutige Zuordnung nicht für jedes Proton bzw. Kohlenstoffatom möglich. Die Identifikation des Moleküls erfolgte über HPLC, ESI-LC/MS und Radio-HPLC.

**Analytik:**

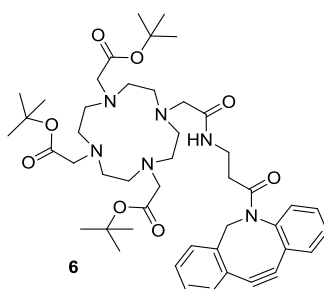
**ESI-LC/MS** *m/z* (% rel. Int.): 317,7 (100 %) [M+2H]<sup>2+</sup>; 634,3 (95 %) [M+H]<sup>+</sup>; 657,1 (10 %) [M+Na]<sup>+</sup> (ber.: 633,69 g/mol)

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8,02 (m, 1H, H<sub>19</sub>); 7,71-7,55 (m, 4H, H<sub>25-28</sub>; H<sub>33-36</sub>); 7,31-7,07 (m, 4H, H<sub>25-28</sub>; H<sub>33-36</sub>); 5,37 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H H<sub>23</sub>); 3,37 (m, 46H, H<sub>7-17</sub>; H<sub>20-21</sub>, H<sub>2</sub>O); 2,84 (m,

4H, H7-17; H20-21); 2,54 (m, 3H, H7-17; H20-21); 1,40 (m, 1H, H7-17; H20-21); 1,20 (m, 9H, H7-17; H20-21); 0,84 (m, 1H, H7-17; H20-21).

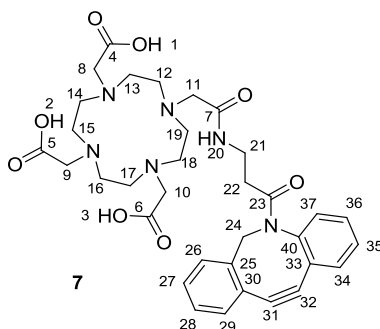
<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 193,26 (C4-6); 170,56 (C18; C22); 157,91 (C30; C31); 157,70 (C30; C31); 144,06 (C24); 133,34 (C25-28; C33-36); 129,87 (C25-28; C33-36); 128,63 (C25-28; C33-36); 125,58 (C25-28; C33-36); 124,18 (C25-28; C33-36); 122,87 (C25-28; C33-36); 121,66 (C25-28; C33-36); 49,15 (C23); 41,64 (C7-17; C20-21); 41,50 (C7-17; C20-21); 41,36 (C7-17; C20-21); 41,22 (C7-17; C20-21); 34,34 (C7-17; C20-21); 31,35 (C7-17; C20-21); 29,06 (C7-17; C20-21); 28,75 (C7-17; C20-21); 23,75 (C7-17; C20-21); 18,83 (C7-17; C20-21); 14,40 (C7-17; C20-21); 11,09 (C7-17; C20-21); 8,63 (C7-17; C20-21).

### DOTA-tris-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-DBCO (6)



DOTA-tris-(tBu)<sub>3</sub> (62 mg; 0,109 mmol; 1,0 eq.) wurde in 3,5 mL DMF gelöst und mit HATU (123,8 mg; 0,326 mmol; 3,0 eq.) versetzt. Es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. DBCO-Amin (30 mg; 0,109 mmol; 1,0 eq.) wurde in 500 µL DMF gelöst und nach Zugabe von DIPEA (83,1 µL; 0,869 mmol; 8,0 eq.) wurde bei 30 °C für 30 min gerührt. Die Lösung aus DBCO-Amin und DIPEA wurde der Lösung aus Chelator und HATU über 45 min zugetropft. Es wurde durch Wasserzugabe gequenchet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiter umgesetzt.

### DOTA-DBCO (7)



Zu DOTA-DBCO-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (6) wurde im Aceton/Stickstoffbad 1 mL TFA gegeben. Unter langsamem Erwärmen wurde für 3 h gerührt. Nach Entfernung des LM erfolgte die Reinigung über semipräparative HPLC (Phenomenex® Synergi, 4 u, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 mikron; 25 % B, 4 mL; t<sub>R</sub> = 16,9 min) Nach Entfernung des Lösungsmittels wurden 24,3 mg (0,037 mmol; 34 %) des Produkts als gelblicher Feststoff erhalten.

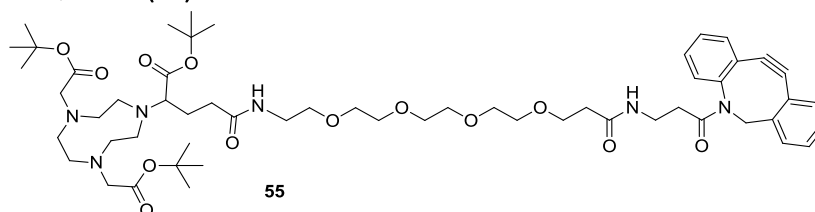
Die Zuordnung der Protonen und Kohlstoffe wurde über <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, HSQC-, HMBC-, NOESY- und TOCSY-Experimente vorgenommen. Da viele Signale überlagerten, war eine eindeutige Zuordnung nicht für jedes Proton bzw. Kohlenstoffatom möglich. Die Identifikation des Moleküls erfolgte über HPLC, ESI-LC/MS und Radio-HPLC.

**Analytik:**

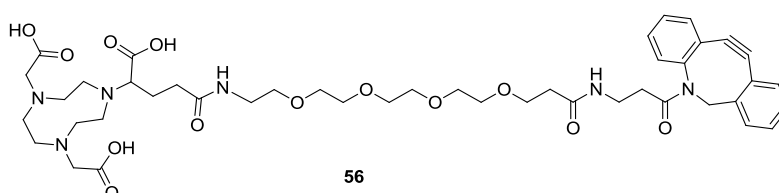
**ESI-LC/MS**  $m/z$  (% rel. Int.): 332,2 (100 %)  $[M+2H]^{2+}$ ; 633,3 (100 %)  $[M+H]^+$ ; (ber.: 662,73 g/mol)

**$^1H$ -NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,52 (m; 1H;  $H_{20}$ ); 8,89-7,31 (m; 8H;  $H_{26-29}$ ;  $H_{34-37}$ ); 5,36 (s; 2H;  $H_{24}$ ); 3,60 (m; 3H;  $H_{8-19}$ ;  $H_{21-22}$ ); 3,44 (m; 16H,  $H_{8-19}$ ;  $H_{21-22}$ ); 3,14 (m; 3H;  $H_{8-19}$ ;  $H_{21-22}$ ); 3,02 (m; 5H;  $H_{8-19}$ ;  $H_{21-22}$ ); 1,24 (m; 1H,  $H_{8-19}$ ;  $H_{21-22}$ ).

**$^{13}C$ -NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 193,07 ( $C_{4-6}$ ); 171,75 ( $C_7$ ,  $C_{23}$ ); 158,05 ( $C_{31}$ ;  $C_{32}$ ); 157,88 ( $C_{31}$ ;  $C_{32}$ ); 149,07 ( $C_{25}$ ;  $C_{30}$ ;  $C_{33}$ ;  $C_{40}$ ); 144,09 ( $C_{25}$ ;  $C_{30}$ ;  $C_{33}$ ;  $C_{40}$ ); 128,12 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 125,43 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 123,78 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 122,62 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 122,25 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 121,61 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 111,23 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 109,08 ( $C_{26-29}$ ;  $C_{34-37}$ ); 49,17 ( $C_{24}$ ); 41,62 ( $C_{8-19}$ ;  $C_{21-22}$ ); 40,04 ( $C_{8-19}$ ;  $C_{21-22}$ ); 34,45 ( $C_{8-19}$ ;  $C_{21-22}$ ); 27,59 ( $C_{8-19}$ ;  $C_{21-22}$ ); 14,77 ( $C_{8-19}$ ;  $C_{21-22}$ ); 8,60 ( $C_{8-19}$ ;  $C_{21-22}$ ).

**NODA-GA-( $t$ Bu) $_3$ -PEG $_4$ -DBCO (55)**

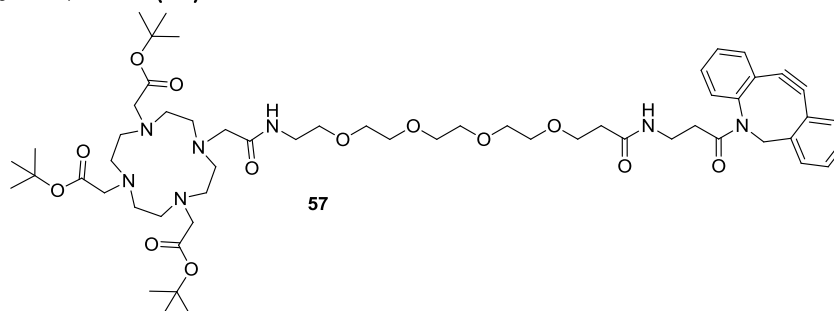
NODA-GA-( $t$ Bu) $_3$  (39 mg; 0,072 mmol; 1,5 eq) wurde in 1,5 mL DMF vorgelegt. HATU (54 mg; 0,143 mmol; 3,0 eq.) wurde zugegeben und es wurde für 60 min bei 30 °C gerührt. DBCO-PEG $_4$ -Amin (25 mg; 0,048 mmol; 1,0 eq.) wurde in 500  $\mu$ L DMF gelöst und mit DIPEA (36,3  $\mu$ L; 0,382 mmol; 8,0 eq.) versetzt. Es wurde für 60 min bei 30 °C gerührt. Im Anschluss daran wurde die Lösung aus DBCO-PEG $_4$ -Amin und DIPEA der Lösung aus NODA-GA-( $t$ Bu) $_3$  über einen Zeitraum von 45 min zugetropft. Es wurde für weitere 20 min gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde durch Wasserzugabe gequenchet. Das LM wurde entfernt und es wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**NODA-GA-PEG $_4$ -DBCO (56)**

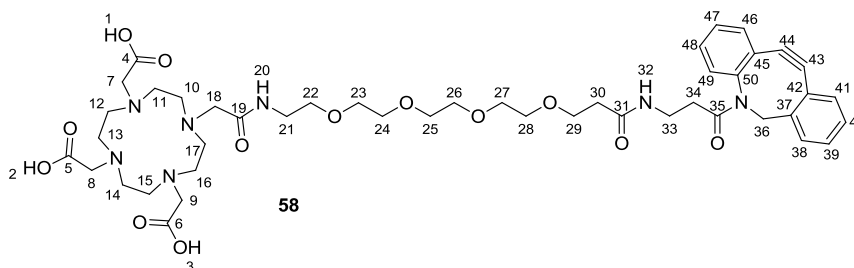
NODA-GA-( $t$ Bu) $_3$ -PEG $_4$ -DBCO (**55**) wurde im Aceton/Stickstoffbad gekühlt und mit 1 mL TFA versetzt. Es wurde für 2 h gerührt, bis die Lösung auf RT erwärmt war. Nach beendeter Reaktion (Kontrolle via LC/MS) wurde die stark saure Lösung verdünnt und getrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Phenomenex® Synergi, 4  $\mu$ , MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 Mikron; 25-45 % B in 20 min, 4 mL;  $t_R$  = 16,32 min). Das LM wurde entfernt und es wurden 5,9 mg (6,971  $\mu$ mol; 13,9 %) des Produkts als gelbes Öl erhalten.

**Analytik:**

**ESI-LC/MS**  $m/z$  (% rel. Int.): 441,3 (100 %)  $[M+2H]^{2+}$ ; 881,4 (85 %)  $[M+H]^+$  (ber.: 880,98 g/mol)

**DOTA-tris-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-DBCO (57)**


DOTA-tris-(tBu)<sub>3</sub> (41,0 mg; 0,072 mmol; 1,5 eq.) wurde in 2 mL DMF gelöst und mit HATU (54 mg; 0,143 mmol; 3,0 eq.) versetzt. Es wurde für 60 min bei 30 °C gerührt. DBCO-PEG<sub>4</sub>-Amin (25 mg; 0,048 mmol; 1,0 eq.) wurde in 700 µL DMF gelöst und mit DIPEA (36,3 µL; 0,382 mmol; 8,0 eq.) versetzt. Es wurde für 60 min bei 30 °C gerührt. Die Lösung aus DBCO-PEG<sub>4</sub>-Amin und DIPEA wurde über 45 min zu der Lösung aus DOTA-tris-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> und HATU getropft. Nach beendeter Reaktion wurde mit Wasser gequench und das LM bei vermindertem Druck entfernt. Es wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**DOTA-PEG<sub>4</sub>-DBCO (58)**


**57** wurde im Stickstoff/Acetonbad stark abgekühlt und mit 1 mL TFA versetzt. Es wurde für 2 h gerührt, bis die Reaktionslösung sich auf RT erwärmt hatte. Die stark saure Lösung wurde verdünnt, getrocknet und der Rückstand wurde über semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex® Synergi, 4 u, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 mikron; 30-32 % B in 15,83 min, 4 mL;  $t_R$  = 16,32 min). Nach Entfernung des LM wurden 5,1 mg (5,6 µmol; 12 %) des Produkts als farbloses Öl erhalten.

Die Zuordnung der Protonen und Kohlstoffe wurde über <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, HSQC-, HMBC-, NOESY- und TOCSY-Experimente vorgenommen. Da viele Signale überlagerten, war eine eindeutige Zuordnung nicht für jedes Proton bzw. Kohlenstoffatom möglich. Die Identifikation des Moleküls erfolgte über HPLC, ESI-LC/MS und Radio-HPLC.

**Analytik:**

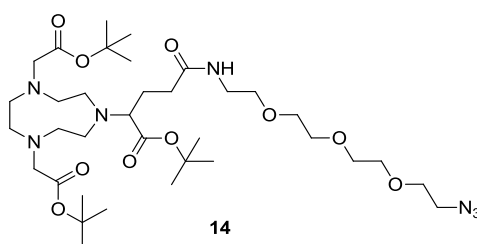
**ESI-LC/MS**  $m/z$  (% rel. Int.): 455,8 (100 %) [M+2H]<sup>2+</sup>; 911,5 (25 %) [M+H]<sup>+</sup>; 932,4 (15 %) [M+Na]<sup>+</sup>; (ber.: 910,02 g/mol)

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 8,62 (m; 2H; H<sub>20</sub>; H<sub>32</sub>); 8,10-7,52 (m; 8H; H<sub>38-41</sub>; H<sub>46-49</sub>); 5,37 (s; 2H; H<sub>36</sub>); 3,60 (m; 8H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 3,38 (m; 38H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>, H<sub>2</sub>O); 3,13 (m; 4H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 3,08 (m; 6H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 2,75 (m; 3H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 2,54 (m; 3H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 2,33 (m; 3H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 2,29 (m; 3H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 2,14 (m; 4H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 1,26 (m; 4H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>); 1,18 (m; 4H; H<sub>7-18</sub>; H<sub>21-30</sub>; H<sub>33-34</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) = 174,93 (C<sub>4-6</sub>; C<sub>19</sub>; C<sub>31</sub>; C<sub>35</sub>); 171,21 (C<sub>4-6</sub>; C<sub>19</sub>; C<sub>31</sub>; C<sub>35</sub>); 170,27 (C<sub>4-6</sub>; C<sub>19</sub>; C<sub>31</sub>; C<sub>35</sub>); 157,98 (C<sub>43</sub>; C<sub>44</sub>); 157,78 (C<sub>43</sub>; C<sub>44</sub>); 133,34 (C<sub>38-41</sub>; C<sub>46-49</sub>); 130,08

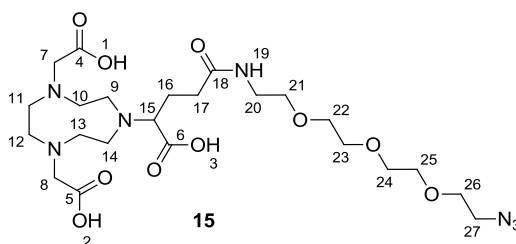
(C38-41; C46-49); 128,96 (C38-41; C46-49); 128,11 (C38-41; C46-49); 124,49 (C38-41; C46-49); 121,70 (C38-41; C46-49); 118,36 (C38-41; C46-49); 116,36 (C38-41; C46-49); 69,76 (C7-18; C21-30; C33-34); 69,69 (C7-18; C21-30; C33-34); 69,55 (C7-18; C21-30; C33-34); 66,78 (C7-18; C21-30; C33-34); 53,52 (C7-18; C21-30; C33-34); 49,41 (C36); 45,62 (C7-18; C21-30; C33-34); 41,79 (C7-18; C21-30; C33-34); 41,23 (C7-18; C21-30; C33-34); 40,43 (C7-18; C21-30; C33-34); 40,06 (C7-18; C21-30; C33-34); 38,37 (C7-18; C21-30; C33-34); 30,06 (C7-18; C21-30; C33-34); 29,16 (C7-18; C21-30; C33-34); 18,08 (C7-18; C21-30; C33-34); 16,75 (C7-18; C21-30; C33-34); 12,45 (C7-18; C21-30; C33-34); 8,61 (C7-18; C21-30; C33-34).

#### NODA-GA-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>-TEG-Azid (14)



NODA-GA-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (25 mg; 0,046 mmol; 1,0 eq.) wurde in 2 mL DMF gelöst und mit HATU (70 mg; 0,184 mmol; 4,0 eq.) versetzt. Es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (30 mg; 0,137 mmol; 3 eq.) wurde in 1 mL DMF gelöst und es wurde DIPEA (35,5 µL; 0,368 mmol; 8,0 eq.) zugegeben. Es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. Die Lösung aus 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin und DIPEA wurde über 45 min der Lösung aus NODA-GA-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> und HATU zugetropft. Nach beendeter Reaktion (Kontrolle mittels LC/MS) wurde mit Wasser gequenchet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

#### NODA-GA-TEG-Azid (15)



**14** wurde im Aceton/Stockstoffbad abgekühlt und mit 1 mL TFA versetzt. Es wurde langsam bis auf RT aufgetaut und der Fortschritt der Entschützung wurde mittels LC/MS nachgewiesen. Es wurde mit Wasser verdünnt und das Lösungsmittel wurde am Lyophilisator entfernt. Die Reinigung erfolgte über semipräparative HPLC (Phenomenex® Synergi, 4 µ, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 µm; 15-20 % B in 20 min, 4 mL; t<sub>R</sub> = 13,72 min). Nach Trocknen am Lyophilisator wurden 9 mg des Produkts (0,016 mmol; 34 %) als farbloses Öl erhalten.

Die Zuordnung der Protonen und Kohlstoffe wurde über <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, HSQC-, HMBC-, NOESY- und TOCSY-Experimente vorgenommen. Da viele Signale überlagerten, war eine eindeutige Zuordnung nicht für jedes Proton bzw. Kohlenstoffatom möglich. Die Identifikation des Moleküls erfolgte über HPLC, ESI-LC/MS und Radio-HPLC.

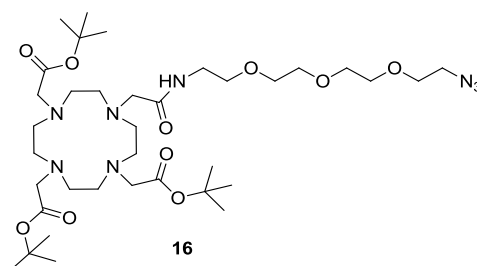
#### Analytik:

ESI-LC/MS  $m/z$  (% rel. Int.): 576,3 (100 %)  $[M+H]^+$ ; (ber.: 575,61 g/mol)

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,10 (m, 1H,  $H_{19}$ ); 3,65 (m, 13H,  $H_{9-14}$ ,  $H_{22-27}$ ); 3,59 (m, 2H,  $H_{9-14}$ ,  $H_{22-27}$ ); 3,55 (m, 2H,  $H_{9-14}$ ,  $H_{22-27}$ ); 3,51 (m, 6H,  $H_{9-14}$ ,  $H_{22-27}$ ); 3,39 (m, 10H,  $H_7$ ,  $H_8$ ,  $H_{15}$ ,  $H_{9-14}$ ,  $H_{21}$ ,  $H_{24-27}$ ;  $H_2O$ ); 3,19 (m, 2H,  $H_{20}$ ); 2,24 (m, 2H,  $H_{17}$ ); 1,96 (m, 1H,  $H_{16}$ ); 1,76 (m, 1H,  $H_{16}$ ).

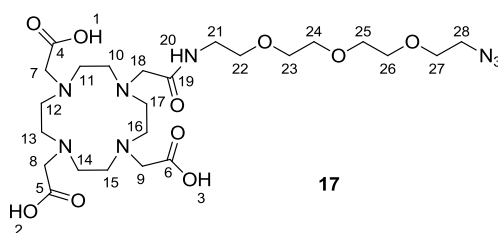
$^{13}\text{C-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 173,37 ( $C_4$ ;  $C_5$ ;  $C_6$ ); 172,00 ( $C_{18}$ ); 63,77 ( $C_{15}$ ); 69,82 ( $C_{9-14}$ ;  $C_{22-27}$ ); 69,78 ( $C_{9-14}$ ;  $C_{22-27}$ ); 69,72 ( $C_{9-14}$ ;  $C_{22-27}$ ); 96,71 ( $C_{9-14}$ ;  $C_{22-27}$ ); 96,59 ( $C_{9-14}$ ;  $C_{22-27}$ ); 69,56 ( $C_{9-14}$ ;  $C_{22-27}$ ); 69,30 ( $C_{9-14}$ ,  $C_{22-27}$ ); 69,03 ( $C_{9-14}$ ;  $C_{22-27}$ ); 50,01 ( $C_7$ ;  $C_8$ ); 38,52 ( $C_{20}$ ); 31,95 ( $C_{17}$ ); 24,79 ( $C_{16}$ ).

### DOTA-tris-( $t\text{Bu}$ ) $_3$ -TEG-Azid (16)



DOTA-tris-( $t\text{Bu}$ ) $_3$  (50 mg; 0,087 mmol; 1 eq.) wurde in 3 mL DMF gelöst und mit HATU (133 mg; 0,349 mmol; 4 eq.) versetzt. Es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. DIPEA (66,9  $\mu\text{L}$ ; 0,697 mmol; 8 eq.) wurde zu 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (60 mg; 0,261 mmol; 3 eq.) in 1 mL DMF gegeben und es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. Die Lösung aus 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin und DIPEA wurde über 45 min zu der Lösung aus DOTA-tris-( $t\text{Bu}$ ) $_3$  und HATU getropft. Es wurde für weitere 1,5 h bei 30 °C gerührt und anschließend mit Wasser-Zugabe gequenchet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

### DOTA-TEG-Azid (17)



**16** wurde im Stickstoff/Aceton-Bad abgekühlt und mit 1 mL TFA versetzt. Unter langsamem Erwärmen wurde für 1 h gerührt. Es wurde mit Wasser verdünnt und am Lyophilisator getrocknet. Das zurückbleibende Öl wurde mittels semipräparativer HPLC gereinigt (Phenomenex® Gemini, 5  $\mu$ , C18, 110 Å, 250 x 10,00 mm, 5 mikron; 14-20 % B in 25 min, 5 mL;  $t_R$  = 10,47 min) und am Lyophilisator vom Lösungsmittel befreit. Das Produkt wurde als gelbes Öl (11,6 mg; 0,019 mmol; 22,1 %) erhalten.

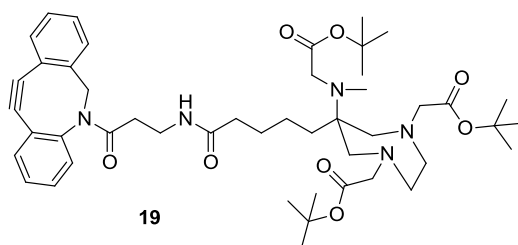
Die Zuordnung der Protonen und Kohlstoffe wurde über  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HSQC-, HMBC-, NOESY- und TOCSY-Experimente vorgenommen. Da viele Signale überlagerten, war eine eindeutige Zuordnung nicht für jedes Proton bzw. Kohlenstoffatom möglich. Die Identifikation des Moleküls erfolgte über HPLC, ESI-LC/MS und Radio-HPLC.

**Analytik:**

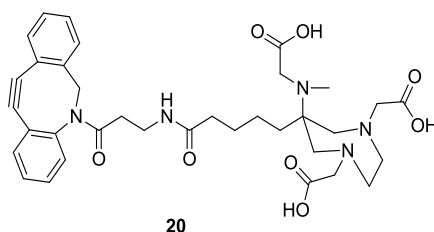
**ESI-LC/MS**  $m/z$  (% rel. Int.): 303,2 (100 %)  $[M+2H]^{2+}$ ; 605,3 (100 %)  $[M+H]^+$ ; 627,3 (15 %)  $[M+Na]^+$ ; (ber.: 604,65 g/mol)

**$^1H$ -NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,37 (m; 1H; *H*<sub>20</sub>); 3,60 (m; 4H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>); 3,53 (m; 6H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>); 3,43 (m; 2H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>); 3,39 (m; 62H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>; *H*<sub>2</sub>O); 3,26 (m; 3H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>); 3,13 (m; 7H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>); 2,91 (m; 4H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>); 2,57 (m; 7H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>); 1,25 (m; 4H; *H*<sub>7-18</sub>; *H*<sub>21-28</sub>).

**$^{13}C$ -NMR** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 171,56 (*C*<sub>19</sub>); 69,82 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 69,80 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 69,72 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 69,59 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 69,29 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 68,82 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 65,57 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 53,55 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 50,02 (*C*<sub>7-18</sub>; *C*<sub>21-28</sub>); 44,14 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 41,83 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 40,06 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 38,64 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 18,09 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 16,76 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>); 12,48 (*C*<sub>7-18</sub>, *C*<sub>21-28</sub>).

**DATA<sup>5m</sup>-(*t*Bu)<sub>3</sub>-DBCO (19)**

DATA<sup>5m</sup>-(*t*Bu)<sub>3</sub> (11 mg; 0,0193 nmol; 1,0 eq.) wurde in 0,5 mL DMF gelöst und mit HATU (29,4 mg; 0,0772 mmol; 4,0 eq.) versetzt. Es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. DIPEA (19,9 mg; 0,154 mmol; 8,0 eq.) wurde zu DBCO-Amin (5,0 mg; 0,0193 mmol; 1,0 eq.) in 0,5 mL DMF gegeben und es wurde für 30 min bei 30 °C gerührt. Die Lösung aus DBCO-Amin und DIPEA wurde über 45 min zu der Lösung aus DATA<sup>5m</sup>-(*t*Bu)<sub>3</sub> und HATU getropft. Es wurde für weitere 1,5 h bei 30 °C gerührt und anschließend mit Wasser-Zugabe gequenchet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**DATA<sup>5m</sup>-DBCO (20)**

Dreifach *tert*-Butyl-geschütztes DATA-DBCO (**19**) wurde im Aceton/Stickstoffbad bei -35 °C mit 1 mL TFA versehen. Die Mischung wurde sehr langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach beendeter Reaktion wurde mit Wasser verdünnt und das Lösungsmittel wurde am Lyophilisator entfernt. Der Rückstand wurde über semipräparative HPLC (Phenomenex® Synergi, 4 u, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 mikron; 35 % B isokratisch, 4 mL;  $t_R$  = 10,3 min) gereinigt. Es wurden 1,9 mg ( $2,87 \cdot 10^{-3}$  mmol; 14 %) des Produkts als farbloses Öl erhalten.



6,990 mmol; 1,0 eq.) und Paraformaldehyd (630 mg; 146,58 mmol; 20,97 eq.) wurden in 10 mL abs. Methanol gelöst und der Reaktionsmischung zugegeben. Es wurde für 16 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Chloroform aufgenommen. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Reinigung mit Hexan/Ethylacetat = 3:1 ergab 2,09 g (4,764 mmol; 68 %) des Produkts als gelbes Öl.

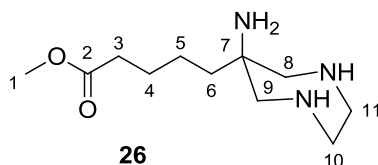
**Analytik:**

R<sub>f</sub>: 0,36 (Hexan/Ethylacetat = 3:1)

ESI-LC/MS *m/z* (% rel. Int.): 439,8 (100 %) [M+H]<sup>+</sup>; 461,8 (15 %) [M+Na]<sup>+</sup> (ber.: 439,25 g/mol)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7,30 (m; 10H; *H*15, *H*16, *H*17); 3,70 (d, 2H, *J* = 13,0 Hz; *H*8a, *H*9a); 3,64 (s, 3H; *H*1); 3,54 (d, 2H, *J* = 13,0 Hz; *H*8b, *H*9b); 3,47 (d; 2H; *J* = 14,2 Hz; *H*12a, *H*13a); 2,91 (d; 2H; *J* = 14,2; *H*12b, *H*13b); 2,58 (m, 4H, *H*10, *H*11); 2,12 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz; *H*3); 1,53 (m, 2H, *H*6); 1,30 (m, 2H, *H*4); 0,73 (m, 2H, *H*5)

<sup>13</sup>C-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 173,66 (*C*2); 139,22; 129,12; 128,27; 127,25 (*C*14, *C*15, *C*16, *C*17); 94,80 (*C*7); 64,08 (*C*12, *C*13); 61,73 (*C*8, *C*9); 58,98 (*C*10, *C*11); 51,52 (*C*1); 36,44 (*C*6); 33,55 (*C*3); 24,58 (*C*4); 22,55 (*C*5)

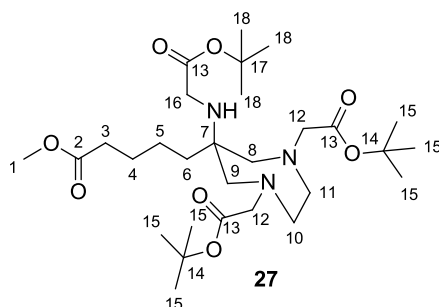
**5-(6-amino-1,4-diazepan-6-yl)pentansäuremethylester (26)**

**25** (200 mg; 0,455 mmol; 1,0 eq.) wurde in 5 mL Ethanol gelöst. Pd(OH)<sub>2</sub> und Essigsäure (82 mg; 97 μL; 1,365 mmol; 3,0 eq.) wurden zugegeben. Es wurde unter Wasserstoffatmosphäre (1 bar) für 19 h bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (188,6 mg; 1,365 mmol; 3,0 eq.) zugegeben und es wurde für 1 h bei RT gerührt. Filtration über Celite® und Einengen lieferte das Produkt **26** welches ohne weitere Reinigung eingesetzt wurde.

**Analytik:**

R<sub>f</sub>: 0,0 (Hexan/Ethylacetat = 3:1)

ESI-LC/MS *m/z* (% rel. Int.): 229,9 (100 %) [M+H]<sup>+</sup>; 243,9 (30 %) [M+Na]<sup>+</sup> (ber.: 229,18 g/mol)

**Di-*tert*-butyl-2,2'-(6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl) amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetate (27)**

**26** (156,4 mg; 0,682 mmol; 1 eq.) wurde in 5 mL abs. Acetonitril gelöst. *Tert*-Butylbromoacetat (506 mg; 2,5616 mmol; 3,5 eq.) und  $K_2CO_3$  (282,8 mg; 2,046 mmol; 3,0 eq.) wurde zugegeben. Es wurde für 18 h bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Das Acetonitril wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Es wurde filtriert und das LM wurde entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan/Ethylacetat = 7:1) ergab 95,8 mg (0,1676 mmol; 24,5 %) des Produkts als gelbes Öl.

**Analytik:**

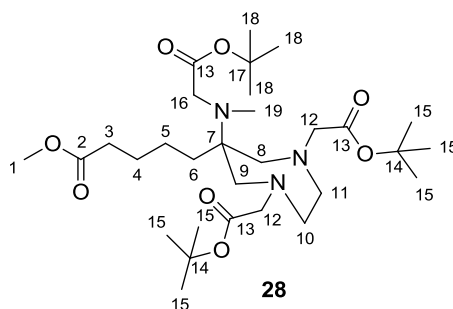
**R<sub>f</sub>**: 0,4 (Hexan/Ethylacetat = 7:1)

**ESI-LC/MS** *m/z* (% rel. Int.): 571,8 [M+H]<sup>+</sup> (ber.: 571,38 g/mol)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,64 (s, 3H, *H*1); 3,29 (s, 4H; *H*12); 3,23 (s, 2H, *H*16); 2,77 (m; 4H; *H*8a; *H*9a; *H*10a, *H*11a); 2,65 (m; 4H; *H*8a; *H*9a; *H*10a, *H*11a); 2,29 (t, 2H, *J* = 7,6 Hz; *H*3); 1,54 (m; 2H; *H*4); 1,45 (s, 9H, *H*18); 1,44 (s, 18H; *H*15); 1,29 (m, 4H; *H*5, *H*6)

**<sup>13</sup>C-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 174,24 (*C*2); 171,09 (*C*13); 81,00 (*C*14, *C*17); 77,36 (*C*7); 63,35 (*C*8, *C*9); 62,02 (*C*12), 57,30 (*C*10, *C*11); 51,59 (*C*1); 44,62 (*C*16); 35,24 (*C*6); 34,15 (*C*3); 28,35 (*C*15); 28,26 (*C*18); 25,83 (*C*4); 22,72 (*C*5)

**Di-*tert*-butyl-2,2'-(6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl) (methyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl) diacetate (28)**



**27** (95,8 mg; 0,1676 mmol; 1,0 eq.) und Formalin-Lösung (37 %) (50,3 mg; 1,676 mmol; 10,0 eq.) wurden in 3 mL Acetonitril vorgelegt und für 30 min bei RT gerührt.  $NaBH_4$  (25,5 mg; 0,6704 mmol; 4,0 eq.) und Essigsäure (120,7 mg; 2,0107 mmol; 12,0 eq.) in 0,5 mL Acetonitril gemischt und zu der Lösung aus Formalin und Chelator-Grundgerüst gegeben. Es wurde für 19 h bei RT gerührt. Das Acetonitril wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in gesättigter  $NaHCO_3$ -Lösung aufgenommen und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Hexan/Ethylacetat = 1:2 ergab 98,0 mg (0,1674 mmol; 99 %) des Produkts als farbloses Öl.

**Analytik:**

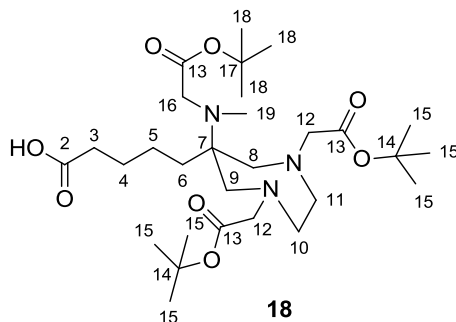
**R<sub>f</sub>**: 0,34 (Hexan/Ethylacetat = 1:2)

**ESI-LC/MS** *m/z* (% rel. Int.): 568,4 (100 %) [M+H]<sup>+</sup>; 600,3 (15 %) [M+Na]<sup>+</sup> (ber.: 585,77 g/mol)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,65 (s; 3H; H1); 3,45 (s; 2H; H16); 3,26 (m; 4H; H12; H13); 2,96 (m; 2H; H8a; H9a); 2,78 (m; 2H; H10a; H11a); 2,67 (m; 4H; H8b; H9b; H10b, H11b); 2,31 (m; 5H, H3; H19); 1,52 (m; 2H; H4) 1,45 (s; 18H; H15); 1,44 (s, 9H, H18); 1,37 (m; 4H; H5, H6)

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 174,39 (C2); 170,90 (C13); 81,03 (C14, C17); 77,36 (C7); 62,52 (C8; C9; C12; C13); 58,94 (C10; C11); 54,16 (C16); 51,57 (C1); 37,48 (C3, C19); 34,24 (C3, C19); 29,67 (C5, C6); 28,37 (C15); 28,27 (C18); 25,88 (C4); 22,04 (C5, C6)

**5-(1,4-bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-6-((2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-1,4-diazepan-6-yl)pentansäure (DATA<sup>5m</sup>-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>) (18)**



**28** (90,5 mg; 0,1546 mmol; 1,0 eq.) wurde in einer Lösung aus Dioxan/LiOH (1 M) = 2:1 für 18 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 15:1 → 10:1). Entfernen des Lösungsmittels ergab 23,1 mg (0,0404 mmol; 26,1 %) des Produkts als gelbes Öl.

**Analytik:**

**R<sub>f</sub>:** 0,27 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 15:1 )

**ESI-LC/MS** *m/z* (% rel. Int.): 572,40 (40 %) [M+H]<sup>+</sup>; 594,4 (100 %) [M+Na]<sup>+</sup> (ber.: 571,38 g/mol)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,48 (s; 2H; H16); 3,27 (m; 4H; H12); 2,96 (m; 2H; H8a; H9a); 2,80 (m; 2H; H10a; H11a); 2,72 (m; 4H; H8b; H9b; H10b; H11b); 2,36 (t; 2H; J = 7,61 Hz; H3); 2,31 (s; 3H; H19); 1,59 (m; 2H; H4); 1,47 (s; 18H; H15); 1,46 (s; 9H; H18); 1,29 (m; 4H; H5; H6)

**5.2.2 Kopplung von DOTA- und NOTA-Derivaten an anorganische Nanopartikel**

**1) DOTA über NHS-Ester**

500 µL wässrige Partikellösung (ca. 0,8 µmol primäres Amin) wurden mit DOTA-NHS-Ester (2,5 mg; 3,28 µmol; 4,1 eq.) versetzt und der pH-Wert wurde mit wässriger Ammoniumhydroxid-Lösung auf 7,8 eingestellt. Die Mischung wurde bei 40 °C für 19 h in einem Heizschüttler belassen und anschließend über eine 0,1-0,5 kDa-Membran dialysiert.

Die Reaktionskontrolle erfolgte anhand von Radiomarkierungen (vgl. hierzu Kapitel 3.2.2 und 5.3.2)

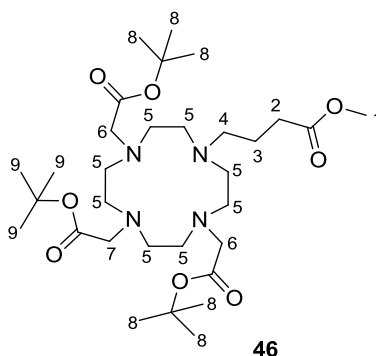
**2) DOTA und NOTA mit Kopplungsreagenzien**

1400 µg Nanopartikel (2,24 µmol Amin; 1 eq.) wurden in 2,0 mL DMSO vorgelegt. DOTA-tris-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (10,26 mg; 17,92 µmol; 8 eq.) wurde zugegeben, sowie HATU (6,81 mg; 17,92 µmol; 12 eq.) und DIPEA

(6,66 mg; 51,52  $\mu\text{mol}$ ; 23 eq.). Es wurde für 16 h bei 40 °C gerührt und anschließend durch Zugabe von Wasser gequenchet. Die Mischung wurde eingeeengt und es folgte die Zugabe von TFA. Anschließend wurde erneut Wasser zugegeben, das LM entfernt und es wurde über eine 0,1-0,5 kDa-Membran dialysiert.

Die Reaktionskontrolle erfolgte radiochemisch (vgl. Abschnitt 3.2.2 und 5.3.2).

**Tri-*tert*-2,2',2''-(10-(4-(methoxyloxy)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat (46)**



Wasserfreies  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (160 mg; 1,17 mmol; 3 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in 2 mL abs. Acetonitril suspendiert.  $\text{DO3A-}(\text{}^t\text{Bu})_3$  (200 mg; 0,389 mmol; 1 eq.) (**44**) wurde in 2 mL abs. Acetonitril gelöst und zu der Suspension getropft. Es wurde auf 75 °C erhitzt. Methyl-4-iodobutyrat (178 mg; 0,77 mmol; 2 eq.) wurde ebenfalls in 2 mL abs. Acetonitril gelöst und der erwärmten Suspension zugetropft. Nach 2 h bei 75 °C wurde filtriert, das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Es wurde zweimal mit Wasser und zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert und anschließend wurde das Lösungsmittel der organischen Phase im Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit  $\text{DCM}/\text{MeOH} = 20:1$  ergab 213 mg (0,346 mmol; 30 %) des Produkts als gelbes Öl.

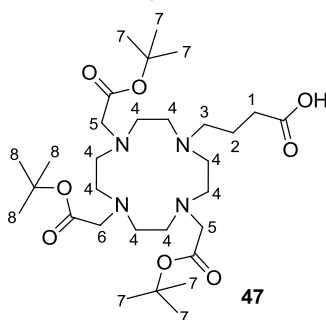
**Analytik:**

**R<sub>f</sub>:** 0,19 ( $\text{DCM}/\text{MeOH} = 10:1$ )

**ESI-LC/MS**  $m/z$  (% rel. Int.): 308,4 (100 %)  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ; 615,4 (40 %)  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (ber.: 614,43 g/mol)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3,61 (s; 3H;  $H_1$ ); 3,22-2,15 (br. m; 26H;  $H_2$ ;  $H_4$ ;  $H_5$ ;  $H_6$ ;  $H_7$ ); 1,80-1,61 (m; 2H;  $H_3$ ); 1,44 (s; 18H,  $H_8$ ); 1,38 (s; 9H;  $H_9$ )

**Tri-*tert*-2,2',2''-(10-butansäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat (47)**



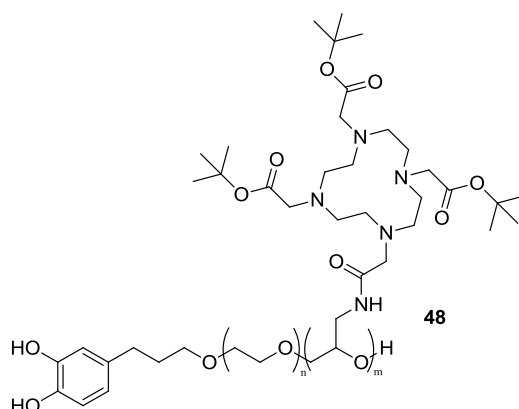
**46** (80 mg; 0,13 mmol; 1 eq.) wurde unter Argonatmosphäre in 2 mL abs. Dioxan vorgelegt. Unter Zutropfen von 1 mL 0,1 N NaOH entfärbte sich die zuvor gelbe Lösung. Es wurde für 21 h bei RT gerührt und anschließend wurde das LM bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das LM unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung mit DCM/MeOH = 15/1 ergab 54 mg (0,090 mmol; 69 %) des Produkts als gelbes Öl.

**Analytik:**

R<sub>f</sub>: 0,00-0,12 (DCM/MeOH = 10:1)

ESI-LC/MS *m/z* (% rel. Int.): 301,3 (65 %) [M+2H]<sup>2+</sup>; 601,4 (100 %) [M+H]<sup>+</sup>; 624,4 (20 %) [M+Na]<sup>+</sup> (ber.: 600,71 g/mol)

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 3,40-2,14 (br. m; 26H; H1; H3; H4; H5; H6) 1,81-1,67 (m; 2H; H2); 1,46 (s; 18H; H7); 1,44 (s; 9H; H8)

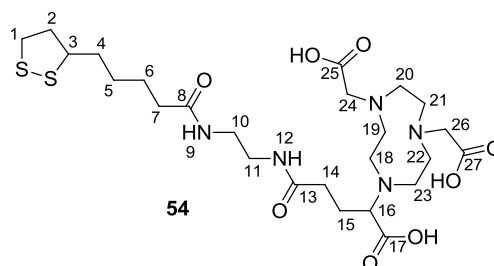
**4) Kopplung des Chelators an das Coating-Polymer**

PEG-Amin (**42**) (20 mg; 4 μmol; 1 eq.) (synthetisiert von Jana Herzberger, Arbeitsgruppe Prof. H. Frey, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) wurde unter Argonatmosphäre in abs. DMSO gelöst und mit 2 Tropfen Triethylamin versetzt. Es erfolgte die Zugabe von HATU (10 mg; 26,3 μmol; 6,6 eq.) und DOTA-tris-(<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub> (10 mg; 17,5 μmol; 4,4 eq.) und es wurde für 18 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des DMSO unter vermindertem Druck erfolgte die Zugabe von Wasser und TFA. Es wurde für 60 h bei 30 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Lyophilisator entfernt und der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen. Die Lösung wurde in eiskalten Diethylether getropft und der gebildete Niederschlag wurde mittels Zentrifugation vom Lösungsmittel abgetrennt. Es wurde am HV getrocknet und 21 mg (3,89 μmol; 97 %) des Produkts als gelblicher Feststoff erhalten.

Das so erhaltene funktionalisierte Polymer wurde von Kristina Wichmann (Arbeitsgruppe Prof. W. Tremel, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) verwendet, um FePt@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikel zu coat.

### 5.2.3 Synthese des Liponsäure-basierten NODA-GA

Der Liponsäure-basierte Vernetzer wurde in Zusammenarbeit mit Marilena Gimnich und Kristina Klinker (Arbeitsgruppe Dr. M. Barz, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) präpariert und gereinigt.



NODA-GA-NH<sub>2</sub> (72 mg; 0,147 mmol; 1 eq.) wurde mit Liponsäurepentafluorophenylester (60,3 mg; 0,162 eq.) und Triethylamin (163  $\mu$ L; 1,176 mmol; 8 eq.) in 1,5 mL DMF gelöst und für 4 h bei RT gerührt. Das LM wurde nach beendeter Reaktion (Kontrolle mittels LC/MS) bei vermindertem Druck entfernt und das Gemisch wurde über semipräparative HPLC gereinigt (Phenomenex® Synergi, 4 u, MAX-RP, 80 Å, 250 x 10,00 mm, 4 mikron; 30-40 % B in 25 min, 4 mL;  $t_R$  = 10,19 min). Nach Entfernen des LM wurden 71,4 mg (0,118 mmol; 80 %) des Produkts als farbloser Feststoff erhalten.

#### Analytik:

**ESI-LC/MS**  $m/z$  (% rel. Int.): 303,7 (30 %) [M+2H]<sup>2+</sup>; 607,3 (100 %) [M+H]<sup>+</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 7,95 (m; 2H, H<sub>9</sub>; H<sub>12</sub>); 3,64 (m, 1H, H<sub>3</sub> oder H<sub>16</sub>); 3,48 (m; 1H; H<sub>3</sub> oder H<sub>16</sub>); 3,07 (br. m; 22H; H<sub>1</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>18</sub>-H<sub>24</sub>, H<sub>26</sub>); 2,40 (dq; J = 12,34 Hz; 6,32 Hz; 6,32 Hz; 6,32 Hz; 1H; H<sub>2</sub> oder H<sub>14</sub>); 2,22 (dp; J = 14,7 Hz; 7,57 Hz; 7,57 Hz; 7,5 Hz; 7,5 Hz; 2H; H<sub>15</sub>); 2,05 (t; 2H; J = 7,33 Hz; H<sub>7</sub>); 1,59 (m, 3H; H<sub>2</sub> oder H<sub>14</sub>); 1,56 (dt; J = 7,34; 7,34; 13,48; 1H; H<sub>4</sub> oder H<sub>5</sub> oder H<sub>6</sub>); 1,52 (m; 2-3H; H<sub>4</sub> oder H<sub>5</sub> oder H<sub>6</sub>); 1,33 (dt; J = 7,08; 7,08; 13,86; 2-3H; H<sub>4</sub> oder H<sub>5</sub> oder H<sub>6</sub>)

## 5.3 Radiochemische Experimente

### 5.3.1 Radiomarkierung der clickfähigen Chelatoren

#### **Allgemeine Vorgehensweise zur Radiomarkierung mit <sup>68</sup>Ga**

Zur Gewinnung von hochreinem <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> wurde das Generatoreluat dem kationischen Aceton-basierten Post-Processing nach Zhernosekov *et al.*<sup>28</sup> unterzogen (vgl. auch Abschnitt 1.1.3). Das Aceton wurde jeweils verdampft, bevor der in Puffer vorgelegte Chelator zugegeben wurde.

DOTA-Derivate wurden i.d.R. bei 95 °C für 15 min in 1 mL NaOAc-Puffer (0,2 M; pH = 4,5) in einem Heizschüttler mit dem von Aceton befreiten Generatoreluat inkubiert, NODA-GA-Derivate bei 45 °C.

Radio-DCs wurden mit komplementären Systemen durchgeführt. Dazu wurde sowohl Citratpuffer (0,1 M; pH = 4,0) verwendet, als auch das Laufmittel Ammoniumacetat (1 M)/Methanol = 1:1. In dem Citratpuffer-System wird unkomplexiertes Gallium bis zur Laufmittelfront getragen, wohingegen der Chelator mit Radiometall einen R<sub>f</sub>-Wert von etwa 0-0,5 aufweist (abhängig von der Hydrophilie des Komplexes). In dem Gemisch aus Ammoniumacetat und Methanol verbleibt das nicht komplexierte Radiometall auf der Basislinie der Komplex weist einen R<sub>f</sub>-Wert >0 auf. Durch die Verwendung dieser komplementären Systeme ist eine optimale Auswertung der Ergebnisse sichergestellt.

Die Abtrennung von nicht-komplexiertem Gallium erfolgte über Kartuschen der Firma Waters. In der nachfolgenden Tabelle 11 sind zu allen clickfähigen Chelatoren die entsprechenden Kartuschen, das Eluens, sowie die Wiederfindungsraten aufgelistet.

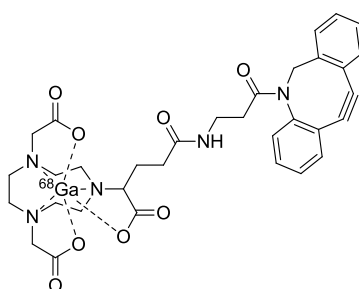
Tabelle 11: Festphasenabtrennung der radiomarkierten Chelatoren

Chelator	Kartusche	Eluens	Wiederfindungsrate
NODA-GA-DBCO	C8 light	250 $\mu$ L Aceton	84 %
DOTA-DBCO	C8 light	500 $\mu$ L Ethanol	76 %
DOTA-PEG-DBCO	C8 light	500 $\mu$ L Ethanol	35 %
NODA-GA-TEG-Azid	C18 light	500 $\mu$ L Ethanol	90 %
DOTA-TEG-Azid	C18 light	500 $\mu$ L Ethanol	76 %
BCN-DOTA	C18 light	600 $\mu$ L Ethanol	92 %

Radio-HPLC wurde bei den Reaktionskontrollen der Radiomarkierungen immer mit einer Gradientenmethode durchgeführt, welcher ein vierminütiges Plateau von 100 % Wasser/TFA vorausging. Dies diente zur Elution des freien Galliums und wird in der Beschreibung der jeweiligen Methode nicht erwähnt.

Stabilitätstests der radiomarkierten und abgetrennten Chelatoren wurden in NaCl-Lösung (isoton.), PBS-Puffer, DTPA-Lösung (0,05 M) und Humanserum durchgeführt. Hierzu wurden zu 500  $\mu$ L des jeweiligen Mediums 50  $\mu$ L des entsprechenden Chelators eingetragen. Es wurde für 120 min bei 37 °C in einem Heizschüttler inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots mittels Radio-HPLC und komplementärer Radio-DC auf ihre Reinheit bzw. Stabilität überprüft.

### [<sup>68</sup>Ga]NODA-GA-DBCO



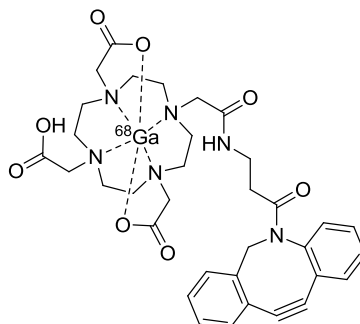
30 nmol **4** wurden in 1 mL Natriumacetatpuffer vorgelegt. Die nach dem Aceton-basierten Postprocessing erhaltene N2-Lösung (27-433 MBq) wurde eingedampft und der in Puffer gelöste Vorläufer wurde zugegeben. Es wurde für 15 min bei 45 °C in einem Heizschüttler inkubiert.

Der pH-Wert der Lösung betrug  $3,01 \pm 0,57$ .

Die Reaktionsmischung wurde in 5 mL MilliQ-Wasser aufgenommen, auf einer Kartusche (Sep-Pak C8 Plus Light) fixiert und der Komplex wurde mit 250  $\mu$ L Aceton und einer Wiederfindungsrate von 84 % eluiert.

Reaktionskontrolle erfolgte mit Radio-DC, sowie Radio-HPLC (Phenomenex® Luna, 5  $\mu$ , C18(2), 110 Å, 250 x 4,6 mm, 5 Mikron; 20-50 % B in 20 min, 1 mL;  $t_R$  = 20,02 min) und ergab eine RCA von 97 %.

### [<sup>68</sup>Ga]DOTA-DBCO

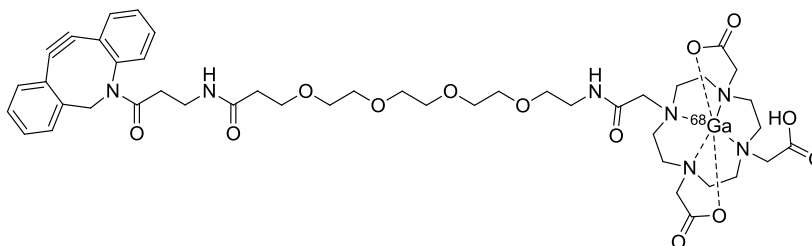


30 nmol **7** wurden in 1 mL Natriumacetatpuffer vorgelegt. Die aus dem Aceton-basierten Postprocessing erhaltene N2-Lösung (25-544 MBq) wurde eingedampft. Der in Puffer gelöste Vorläufer wurde zugegeben und es wurde für 15 min bei 95 °C in einem Heizschüttler inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde in 5 mL Wasser aufgenommen, auf einer Kartusche (Sep-Pak C8 Plus Light) fixiert und der Komplex wurde mit 500  $\mu$ L Ethanol eluiert. Die Wiederfindungsrate betrug 76 %.

Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $3,46 \pm 0,89$ .

Reaktionskontrolle erfolgte mit Radio-DC, sowie Radio-HPLC (Phenomenex® Luna, 5  $\mu$ , C18(2), 110 Å, 250 x 4,6 mm, 5 Mikron; 20-80 % B in 20 min, 1 mL;  $t_R$  = 12,64 min) und ergab eine RCA von 98 %.

### [<sup>68</sup>Ga]DOTA-PEG4-DBCO

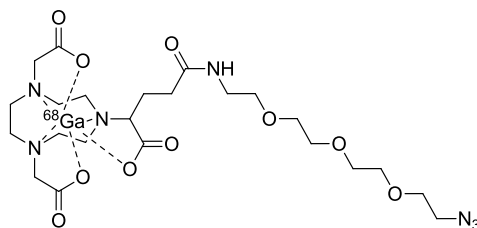


30 nmol **58** wurden in 1 mL Natriumacetatpuffer vorgelegt und zu dem vom Aceton befreiten Genertoreluat (145-220 MBq) gegeben. Es wurde für 15 min bei 95 °C inkubiert, wobei eine RCA von 97 % erreicht wurde.

Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $4,00 \pm 0,07$ .

Die Reinigung erfolgte festphasenbasiert (Sep-Pak C8 Plus Light), wobei der Komplex mit 500  $\mu$ L Ethanol eluiert wurde. Die Wiederfindungsrate lag bei 35 %.

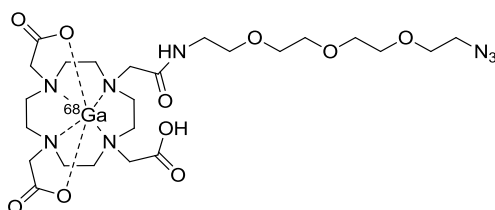
Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Radio-DC und Radio-HPLC (Phenomenex® Luna, 5  $\mu$ , C18(2), 110 Å, 250 x 4,6 mm, 5 Mikron; 20-70 % B in 20 min, 1 mL;  $t_R$  = 16,56 min)

**[<sup>68</sup>Ga]NODA-GA-TEG-Azid**

30 nmol **15** wurden in 1 mL Natriumacetatpuffer gelöst und zu dem vom Aceton befreiten Generatoreluat (33-202 MBq) gegeben. Es wurde für 15 min bei 45 °C in einem Heizschüttler inkubiert und nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Aliquots entnommen, welche mittels Radio-HPLC (Phenomenex® Luna, 5 u, C18(2), 110 Å, 250 x 4,6 mm, 5 mikron; 10-70 % B in 20 min; 1 mL;  $t_R = 14,93$  min) und komplementärer Radio-DC analysiert wurden. Die RCA für dieses Derivat war quantitativ.

Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $3,74 \pm 0,05$ .

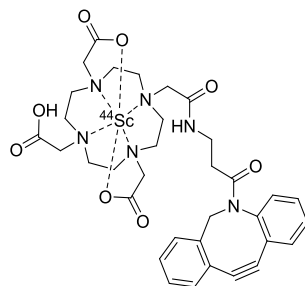
Festphasen-basierte Reinigung erfolgte über eine Sep-Pak C18 Plus Light, wobei die Wiederfindungsrate in Ethanol bei 90 % lag.

**[<sup>68</sup>Ga]DOTA-TEG-Azid**

30 nmol **17** wurden in 1 mL Natriumacetatpuffer vorgelegt und zu dem vom Aceton befreiten Generatoreluat gegeben (A = 30-357 MBq) gegeben. Die Lösung wurde bei 95 °C für 15 min gemischt. Es wurden Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mit Radio-HPLC (Phenomenex® Luna, 5 u, C18(2), 110 Å, 250 x 4,6 mm, 5 mikron; 10-70 % B in 20 min; 1 mL;  $t_R = 16,53$  min) und komplementärer Radio-DC analysiert. Es konnte eine quantitative RCA erreicht werden.

Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $3,49 \pm 0,37$ .

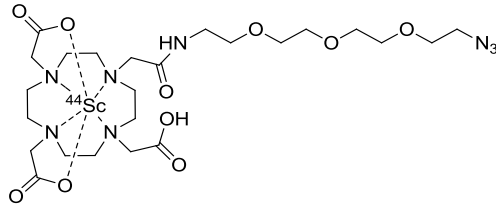
Festphasenbasierte Reinigung erfolgte mit einer Sep-Pak C18 Plus Light und die Wiederfindungsrate in Ethanol betrug 76 %.

**[<sup>44</sup>Sc]DOTA-DBCO**

**7** (30 nmol) wurde in 1 mL Ammoniumacetatpuffer (0,25 M; pH = 4,0) vorgelegt und mit 24 MBq  $^{44}\text{Sc}$  bei 95 °C für 30 min inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Aliquots entnommen und mittels komplementärer Radio-DC analysiert, woraus eine quantitative RCA bestimmt werden konnte.

Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $4,03 \pm 0,01$ .

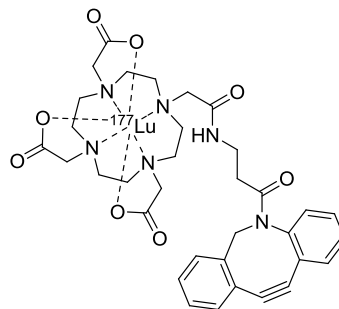
#### [ $^{44}\text{Sc}$ ]DOTA-TEG-Azid



**17** (30 nmol) wurde in 1 mL Ammoniumacetatpuffer gelöst und mit 24 MBq  $^{44}\text{Sc}$  für 30 min bei 95 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels komplementärer Radio-DC analysiert. Es konnte eine quantitative RCA erzielt werden.

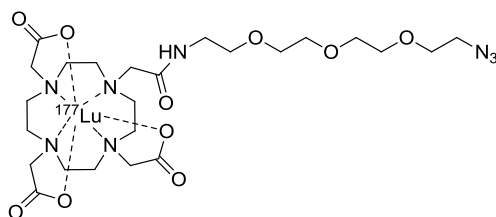
Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $4,04 \pm 0,01$ .

#### Radiomarkierung mit $^{177}\text{Lu}$ [ $^{177}\text{Lu}$ ]DOTA-DBCO



30 nmol DOTA-DBCO (**7**) wurden in 1 mL NaOAc-Puffer (0,2 M, pH = 4,5) vorgelegt und mit 92-97 MBq  $^{177}\text{Lu}$  für 30 min bei 95 °C inkubiert. Die Reaktionskontrolle ergab anhand von Radio-DCs quantitative Ausbeuten.

#### [ $^{177}\text{Lu}$ ]DOTA-TEG-Azid



30 nmol **17** wurden in 1 mL NaOAc-Puffer (0,2 M, pH = 4,5) gelöst und zu 92-97 MBq  $^{177}\text{Lu}$  gegeben. Es wurde für 30 min bei 95 °C in einem Heizschüttler inkubiert. Die Analytik mittels Radio-DC ergab eine quantitative RCA.

### 5.3.2 Radiomarkierung der anorganischen Nanopartikel

Die über NHS-Ester mit DOTA bzw. NODA-GA funktionalisierten anorganischen Nanopartikel wurden nach Dialyse durch Lyophilisation eingengt und in HEPES-Puffer (0,1 M; pH = 4,5) aufgenommen. Das Generatoreluat wurde zugegeben und es wurde für 15 min bei 95 °C (für DOTA) bzw. 45 °C (für NODA-GA) inkubiert. Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte über Radio-DC und ergab RCAs von  $45,97 \pm 17,42$  %.

Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $2,16 \pm 1,30$ .

Die Abtrennung erfolgte über eine PD10-Einwegsäule, gepackt mit Sephadex® G-25.

### 5.3.3 Radiomarkierung der kernvernetzten Mizellen und des Vernetzers

#### Liponsäure-NODA-GA

30 nmol des NODA-GA-Liponamids (**54**) wurde in 1 mL NaOAc-Puffer gelöst. Das Generatoreluat wurde vom Aceton befreit und die Lösung aus Chelator und Puffer wurde dem eingedampften Eluat hinzugefügt. Es wurde für 15 min bei 45 °C in einem Heizschüttler inkubiert. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte mittels Radio-DC und ergab quantitative Markierungseffizienzen.

Der pH-Wert der Lösung betrug  $4,01 \pm 0,27$ .

#### Kernvernetzte Mizellen mit NODA-GA-Liponamid

50 nmol der Mizellen wurden mit 1 mL NaOAc-Puffer verdünnt und zu dem vom Aceton befreiten Generatoreluat gegeben. Es wurde für 15 min bei 45 °C in einem Heizschüttler inkubiert. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte über komplementäre Radio-DC und Radio-HPLC/SEC und ergab RCAs von  $35,98 \pm 12,07$  %.

Der pH-Wert der Markierungslösung betrug  $3,69 \pm 0,32$ .

Die Abtrennung erfolgte über eine PD10-Einwegsäule (Sephadex® G-25).

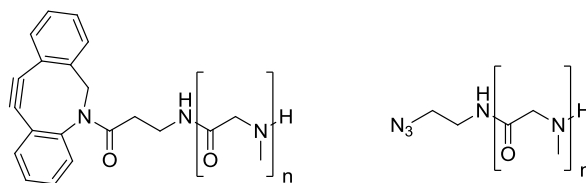
## 5.4 Click-Experimente

### 5.4.1 Click-Reaktionen mit anorganischen Nanopartikeln

30 nmol BCN-DOTA (**49**) wurden analog zu den DOTA-Derivaten wie unter 5.3.1 beschrieben radiomarkiert und über eine Festphasenkartusche gereinigt, wobei die Wiederfindungsrate 96 % betrug. Das zur Elution verwendete Ethanol (siehe Tabelle 11) wurde entfernt. 1,5 mg/mL  $\text{Fe}_x\text{O}@SiO_2@PEG_{5-9}\text{-OMe}@PEG_{10}\text{-N}_3$  in 1 PBS-Puffer wurden zu dem radiomarkierten Chelator gegeben. Es wurde für 30 min bei 65 °C inkubiert. Die Abtrennung erfolgte über eine PD10-Einwegsäule (Sephadex® G-25). Es wurden Fraktionen von 250 µL gesammelt. In den Fraktionen 9-14 befanden sich isolierte Nanopartikel. Die Reaktionskontrolle erfolgte anhand von komplementären Radio-DCs, sowie Radio-HPLC/SEC.

Die Markierungsausbeuten betragen  $24,12 \pm 10,51$ %.

## 5.4.2 Click-Reaktionen mit PSar-Homopolymeren



Es wurden zwei unterschiedliche PSar-Homopolymere verwendet, welche ein Molekulargewicht von jeweils ca. 7000 g/mol hatten. Die Polymere waren an der Endgruppe mit DBCO bzw. einem Azid funktionalisiert worden, um sie für die Click-Reaktion zugänglich zu machen (die Polymersynthese wurde von Kristina Klinker, Arbeitskreis Dr. M. Barz, Institut für Organische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt).

### NODA-GA-TEG-Azid @ PSar-DBCO

**Indirekte Radiomarkierung:** NODA-GA-TEG-Azid (30 nmol; 1 eq.) (**15**) wurde in einer vorgelagerten Reaktion mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  radiomarkiert (vgl. Abschnitt 5.3.1) und das aus der Kartuschenabtrennung erhaltene ethanolische Eluat wurde eingedampft. Das Polymer (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq.) wurde in 200  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer gelöst und zu dem radiomarkierten Komplex gegeben. Es wurde bei 45 °C für 20 min inkubiert. Die Reaktionskontrolle mit Radio-HPLC/SEC ergab quantitative Click-Ausbeuten.

**Direkte Radiomarkierung:** NODA-GA-TEG-Azid (30 nmol; 1 eq.) (**15**) wurde in 200  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer vorgelegt und mit dem DBCO-funktionalisierten Polymer (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq.) versetzt. Es wurde für 36 h bei 45 °C gerührt und anschließend mittels Lyophilisation eingeeengt. Der Rückstand wurde in 1 mL NaOAc-Puffer gelöst und mit dem vom Aceton befreiten Generatoreluat gemischt. Die Aktivität hierbei betrug 51-234 MBq. Nach 15 min bei 45 °C wurden komplementäre Radio-DCs angefertigt, welche RCAs von  $63,02 \pm 24,67\%$  ergaben.

### DOTA-TEG-Azid @ PSar-DBCO

**Indirekte Radiomarkierung:** DOTA-TEG-Azid (30 nmol; 1 eq.) (**17**) wurde mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  radiomarkiert (siehe auch Abschnitt 5.3.1) und mittels Festphasenkartusche gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Polymer (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq., gelöst in 200  $\mu\text{L}$  PBS), zugegeben und es wurde für 20 min bei 45 °C inkubiert. Analytik mittels Radio-HPLC/SEC ergab quantitative Click-Ausbeuten.

**Direkte Radiomarkierung:** DOTA-TEG-Azid (30 nmol; 1 eq.) (**17**) wurde mit dem Polymer (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq.) in 200  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer gemischt und bei 45 °C für 36 h gerührt. Nachdem die Lösung am Lyophilisator eingeeengt worden war, wurde 1 mL NaOAc-Puffer zugegeben, sowie das vom Aceton befreite Generatoreluat ( $A = 53-128$  MBq). Nach 15 min bei 95 °C wurde die RCA mittels Radio-HPLC/SEC zu  $88,08 \pm 6,01\%$  bestimmt.

### NODA-GA-DBCO @ PSar-Azid

**Indirekte Radiomarkierung:** NODA-GA-DBCO (30 nmol; 1 eq.) (**4**) wurde mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert (siehe auch Abschnitt 5.3.1) und mittels Festphasenkartusche gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das azidierte Polymer (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq., gelöst in 200  $\mu\text{L}$  PBS), zugegeben und es wurde für 20 min bei 45 °C inkubiert. Radio-HPLC/SEC ergab Clickausbeuten von  $10,81 \pm 3,26\%$ .

Direkte Radiomarkierung: NODA-GA-DBCO (30 nmol; 1 eq.) (**4**) wurde in 200  $\mu$ L PBS-Puffer mit dem Polymer (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq.) gemischt und bei 45 °C für 36 h gerührt. Nach dem Einengen der Lösung am Lyophilisator wurde 1 mL NaOAc-Puffer zugegeben und das vom Aceton befreite Generatoreluat ( $A = 47\text{-}183$  MBq). Es wurde für 15 min in einem Heizschüttler bei 45 °C inkubiert. Radio-HPLC/SEC ergab Clickausbeuten von  $5,64 \pm 3,67$  %.

### DOTA-DBCO @ PSar-Azid

Indirekte Radiomarkierung: DOTA-DBCO (30 nmol; 1 eq.) (**7**) wurde wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert und mittels Festphasenkartusche gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde PSar-Azid (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq., gelöst in 200  $\mu$ L PBS), zugegeben und es wurde für 20 min bei 95 °C inkubiert. Radio-HPLC/SEC ergab Clickausbeuten von  $20,49 \pm 19,63$  %.

Direkte Radiomarkierung: DOTA-DBCO (30 nmol; 1 eq.) wurde in 200  $\mu$ L PBS-Puffer gelöst, PSar-Azid (1,9 mg; 300 nmol; 10 eq.) wurde zugegeben und es wurde bei 45 °C für 36 h gerührt. Nach dem Einengen der Lösung wurde der Rückstand in 1 mL NaOAc-Puffer aufgenommen und mit dem vom Aceton befreiten Generatoreluat versetzt ( $A = 53\text{-}140$  MBq). Es wurde für 15 min in einem Heizschüttler bei 95 °C inkubiert. Radio-HPLC/SEC ergab Clickausbeuten von  $8,65 \pm 5,64$  %.

## 5.5 *in vivo* Experimente

Sämtliche  $\mu$ PET-Aufnahmen und *ex vivo*-Biodistributionsstudien wurden von der regionalen Ethikkommission genehmigt und im Einklang mit dem deutschen Gesetz für Tierschutz durchgeführt<sup>117,118</sup>.

Es wurden gesunde, männliche C57BL/6-Mäuse (black six) verwendet, welche von der Janvier Labs, Frankreich bezogen wurden. Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten und hatten nach ihrer Ankunft 12-26 Tage für die Akklimationierungszeit. Sie waren bei Injektion 4-6 Wochen alt.

Die Injektionen erfolgten *i.v.* in eine Schwanzvene der Mäuse. Die injizierte Aktivitätsmenge betrug 6,025 MBq-2,391 MBq in jeweils 100-150  $\mu$ L isotonomischer Kochsalzlösung. Mäuse, die nicht in die Schwanzvene injiziert werden konnten, wurden betäubt (Isofluran) und *retroorbital* injiziert.

Die Mäuse, welche für  $\mu$ PET/MR-Messungen verwendet wurden, waren bei der Injektion unter Isofluran-Narkose (2,5 %) und wurden für die Messung auf dem Bauch liegend, Kopf voran positioniert.

Die Mäuse, welche für *ex vivo* Biodistributionsstudien verwendet wurden, waren bei der Injektion nicht narkotisiert. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und es erfolgte die Entnahme der Organe (inguinale Lymphknoten links und rechts, Lunge, Blut, Herz, Leber, Magen, Pankreas, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Nieren links und rechts, Urin, Hoden, Muskel). Die Organe wurden gewogen und die Aktivität wurde in einem automatisierten  $\gamma$ -Counter gemessen. Aus den gemessenen Ereignissen und dem Gewicht der jeweiligen Proben wurden %ID/g bestimmt. Diese Ergebnisse sind in den Kapiteln 3.2.3 und 3.4.3 gezeigt und erläutert.

---

## 6. Anhang

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- (1) Statistisches Bundesamt  
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.
- (2) Mura, S.; Couvreur, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (13), 1394–1416.
- (3) Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. *J. Control. Release* **2015**, *200*, 138–157.
- (4) Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. *Mol. Pharm.* **2010**, *7* (6), 1899–1912.
- (5) Shao, Y.; Cherry, S. R.; Farahani, K.; Meadors, K. *Phys. Med. Biol.* **1997**, *42*, 1965–1970.
- (6) James, M. L.; Gambhir, S. S. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (2), 897–965.
- (7) Hanson, L. G. *Introduction to Magnetic Resonance Imaging Techniques*; 2009.
- (8) Schubiger, P. a. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **2007**, No. 62, 1–13.
- (9) Rudin, M.; Weissleder, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (2), 123–131.
- (10) Nobelpreis George de Hevesy <http://www.nobelpreis.org/chemie/hevesy.html>.
- (11) Magill, J.; Pfennig, G.; Dreher, R.; Sóti, Z. *Karlsruher Nuklidkarte*, 9th ed.; Nucleonica, 2015.
- (12) Ache, H. *Angew. Chemie* **1972**, *84* (6), 234–255.
- (13) Humm, J. L.; Rosenfeld, A.; Del Guerra, A. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2003**, *30* (11), 1574–1597.
- (14) *Handbook of Nuclear Chemistry*, Second Edi.; Vértes, Attila; Nagi, Sándor; Klencsár, Zoltán; Lovas, Rezső G., Rösch, F., Ed.; 2012.
- (15) Herzog, H.; Rösch, F. *Pharm. Unserer Zeit* **2005**, *34* (6), 468–473.
- (16) Lewellen, T. K. *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53* (17), R287–R317.
- (17) Rösch, F. *Curr. Radiopharm.* **2012**, *5* (3), 202–211.
- (18) Rösch, F. *Nuclear- and Radiochemistry*, 1st ed.; Walter de Gruyte GmbH: Berlin, 2014.
- (19) Saha, G. B. *Imaging* **2005**, 199.
- (20) *Theranostics, Gallium-68, and Other Radionuclides*; Baum, R. P., Rösch, F., Eds.; Berlin, Heidelberg, 2013.

- 
- (21) Radchenko, V.; Busse, S.; Roesch, F. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (9), 721–727.
- (22) Baum, E. M.; Ernesti, M. C.; Knox, H. D.; Miller, T. R.; Watson, A. M. *Nuclides and Isotopes - Chart of Nuclides*, 17th ed.; 2010.
- (23) Radchenko, B. V.; Hauser, H.; Eisenhut, M.; Vugts, D. J.; Dongen, G. A. M. S. Van; Roesch, F. **2012**.
- (24) Anderson, C. J.; Ferdani, R. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24* (4), 379–393.
- (25) Gleason, G. I. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1960**, *8*, 90–94.
- (26) Greene, W.; Tucker, W. J. *Int. Radioat. Appl. Instrum.* **1961**, *12*, 62–63.
- (27) Šimeček, J.; Hermann, P.; Wester, H.-J.; Notni, J. *Chem Med Chem* **2013**, *8*, 95–103.
- (28) Zhernosekov, K. P.; Filosofov, D. V.; Baum, R. P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Rösch, F. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48* (10), 1741–1748.
- (29) Mueller, D.; Klette, I.; Baum, R. P.; Gottschaldt, M.; Schultz, M. K.; Breeman, W. A. P. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1712–1717.
- (30) Riedel, E. *Anorganische Chemie*, 5th ed.; Berlin, New York, 2002.
- (31) Delgado, R.; Sun, Y.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E. *Inorg. Chem.* **1993**, *32* (13), 3320–3326.
- (32) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858–2902.
- (33) Byegard, J.; Skarnemark, G.; Skahlberg, M. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **1999**, *241* (2), 281–290.
- (34) Boswell, C. A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1465–1474.
- (35) Viola-Villegas, N.; Doyle, R. P. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (13-14), 1906–1925.
- (36) Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, E.; Lukes, I. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (23), 10960–10969.
- (37) Tae, W.; Hyun, J.; Woo, J.; Lee, Z.; Jin, H.; Su, H.; Seong, J.; Kyoung, H. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (2), 2204–2208.
- (38) Bahri, Z.; Rezai, B.; Kowsari, E. *Mater. Eng.* **2016**, *86*, 104–113.
- (39) Ghosh, S. C.; Pinkston, K. L.; Robinson, H.; Harvey, B. R.; Wilganowski, N.; Gore, K.; Sevick-muraca, E. M.; Azhdarinia, A. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42* (2), 177–183.
- (40) Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; Clarke, E. T.; Delgado, R.; Sun, Y.; Ma, R. *Supramol. Chem.* **1996**, *6* (March), 353–363.
- (41) Riss, P. J.; Kroll, C.; Nagel, V.; Rösch, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (20), 5364–5367.

- (42) Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P. *Inorg. Chem.* **2012**.
- (43) Wängler, C.; Wängler, B.; Lehner, S.; Elsner, A.; Todica, A.; Bartenstein, P.; Hacker, M.; Schirmacher, R. *J. Nucl. Med.* **2011**, *52* (4), 586–592.
- (44) Seemann, J.; Waldron, B. P.; Roesch, F.; Parker, D. *Chem Med Chem* **2015**, *10*, 1019–1026.
- (45) Seemann, J.; Eppard, E.; Waldron, B. P.; Ross, T. L.; Roesch, F. *Appl. Radiat. Isot.* **2015**, *98*, 54–59.
- (46) Lawrence, J.; Emrick, T. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 2393–2398.
- (47) Kalkhof, S.; Sinz, A. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *392*, 305–312.
- (48) Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606–631.
- (49) Montalbetti, C. a G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.
- (50) Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1272–1279.
- (51) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (52) Gaetke, L. M.; Chow, C. K. *Toxicology* **2003**, *189* (1-2), 147–163.
- (53) Bertozzi, R.; J. M. Baskin. *Aldrichimica Acta* **2010**, *43* (1), 15–23.
- (54) Ess, D. H.; Jones, G. O.; Houk, K. N. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1633–1636.
- (55) Kuzmin, A.; Poloukhtine, A.; Wolfert, M. A.; Popik, V. V. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.
- (56) Steitz, G.; Pohl, L.; Pohlke, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, *8*, 447–448.
- (57) Turner, R. B.; Jarrett, A. D.; Goebel, P.; Mallon, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 790–792.
- (58) Wittig, G.; Krebs, A. *Chem. Ber.* **1961**, No. 5, 3260–3275.
- (59) Lutz, J. F. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2182–2184.
- (60) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, No. 1, 210–216.
- (61) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2010**, *340*, 457–460.
- (62) Powers, A. R.; Ghiviriga, I.; Abboud, K. A.; Veige, A. S. *Dalt. Trans.* **2015**, *44*, 14747–14752.
- (63) Ess, D. H.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 10646–10647.
- (64) Ess, D. H.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 10187–10198.
- (65) Prabhu, R. H.; Patravale, V. B.; Joshi, M. D. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 1001–1018.

- (66) Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 175–187.
- (67) Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1986**, *46* (December), 6387–6392.
- (68) Theek, B.; Baues, M.; Ojha, T.; Möckel, D.; Koyadan, S.; Steitz, J.; Bloois, L. Van; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T. *J. Control. Release* **2016**, 9–12.
- (69) Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2–25.
- (70) Huesmann, D.; Sevenich, A.; Weber, B.; Barz, M. *Polymer (Guildf)*. **2015**, *67*, 240–248.
- (71) Kobayashi, A.; Oda, T.; Maeda, H. *J. Bioact. an Compat. Polym.* **1988**, *3*, 319–333.
- (72) Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 169–185.
- (73) Lee, D.-E.; Na, J. H.; Lee, S.; Kang, C. M.; Kim, H. N.; Han, S. J.; Kim, H.; Choe, Y. S.; Jung, K.-H.; Lee, K. C.; Choi, K.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y.; Lee, K.-H.; Kim, K. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (6), 2190–2198.
- (74) Stelter, L.; Pinkernelle, J. G.; Michel, R.; Schwartländer, R.; Raschzok, N.; Morgul, M. H.; Koch, M.; Denecke, T.; Ruf, J.; Bäuml, H.; Jordan, A.; Hamm, B.; Sauer, I. M.; Teichgräber, U. *Mol. imaging Biol.* **2010**, *12* (1), 25–34.
- (75) Kettenbach, K.; Schieferstein, H.; Ross, T. L. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014.
- (76) Ross, T. L. *Curr. Radiopharm.* **2010**, *3*, 202–223.
- (77) Han, S.; Kim, Y. *Tetrahedron* **2004**, *60* (672), 2447–2467.
- (78) Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. *Nature* **2011**, *480* (7378), 471–479.
- (79) Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, L.; Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30* (21), 2739–2742.
- (80) Phenomenex-Katalog <https://www.phenomenex.com/> (accessed Jun 17, 2016).
- (81) Parker, D.; Waldron, B. P. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2827–2838.
- (82) Ballini, R.; Petrini, M.; Polzonetti, V. *Synthesis (Stuttg)*. **1992**, *4*, 355–357.
- (83) Salvatore, R. N.; Yoon, H.; Woon, K. *Tetrahedron* **2001**, *57* (584), 7785–7811.
- (84) Kanzian, T.; Nigst, T. A.; Maier, A.; Pichl, S.; Mayr, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6379–6385.
- (85) Brotzel, F.; Chu, Y. C.; Mayr, H. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3679–3688.
- (86) Kukis, D. L.; Denardo, S. J.; Denardo, G. L.; Donnell, R. T. O.; Meares, C. F.; Kukis, D. L.; Denardo, S. J.; Denardo, G. L.; Donnell, R. T. O.; Meares, C. F. *J. Nucl. Med.* **1998**, 2105–2110.
- (87) Viola, N. A.; Jr, R. S. R.; Ouellette, W.; Doyle, R. P. *Polyhedron* **2006**, *25*, 3457–3462.

- (88) Heppeler, A.; Andrø, J. P.; Buschmann, I.; Wang, X.; Reubi, J.; Hennig, M.; Kaden, T. A.; Maecke, H. R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3026–3034.
- (89) Chatt, B. J.; Guy, R. G.; Duncanson, L. A. *J. Chem. Soc.* **1961**, 827.
- (90) Schore, N. E. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 1081–1119.
- (91) Yamazaki, H.; Wakatsuki, Y. *J. Organomet. Chem.* **1977**, *139*, 157–167.
- (92) Bock, V. D.; Hiemstra, H.; Maarseveen, J. H. Van. **2006**, 51–68.
- (93) Nicholas, K. M. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20* (6), 207–214.
- (94) Ryu, E.; Zhao, Y. **2005**, No. c, 3187–3189.
- (95) Rösch, F. *Curr. Radiopharm.* **2012**, *5* (3), 187–201.
- (96) Filosofov, B. D. V.; Loktionova, N. S.; Rösch, F. *Radiochim. Acta* **2010**, *156*, 149–156.
- (97) Holleman, A. F.; Wiberg, E. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*; 1995.
- (98) Lebedev, N. A.; Novgorodov, A. F.; Misiak, R.; Brockmann, È.; Ro, F. *Appl. Radiat. Isot.* **2000**, *53*, 421–425.
- (99) Redvanly, C. S. *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications.*; 2003.
- (100) Jarrett, B. R.; Kukis, D. L.; Louie, A. Y. **2008**, 1496–1504.
- (101) Tu, C.; Ma, X.; House, A.; Kauzlarich, S. M.; Louie, A. Y. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2* (4), 285–288.
- (102) Xin, X.; Wei, Q.; Yang, J.; Yan, L.; Feng, R.; Chen, G.; Du, B.; Li, H. *Chem. Eng. J.* **2012**, *184*, 132–140.
- (103) Yong-mei, H.; Man, C.; Zhong-bo, H. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *184* (1-3), 392–399.
- (104) Wang, J.; Zheng, S.; Shao, Y.; Liu, J.; Xu, Z.; Zhu, D. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *349* (1), 293–299.
- (105) Ramil, C. P.; Lin, Q.; Lin, Q. *ChemComm* **2013**, *49* (ii), 11007–11022.
- (106) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; Delft, F. L. van. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 1–20.
- (107) García, K. P.; Zarschler, K.; Barbaro, L.; Barreto, J. A.; Malley, W. O.; Spiccia, L.; Stephan, H.; Graham, B. *Small* **2014**, *10* (13), 2516–2529.
- (108) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 505–515.
- (109) Chow, A.; Brown, B. D.; Merad, M. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11* (11), 788–798.
- (110) Haniffa, M.; Bigley, V.; Collin, M. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *41*, 59–69.

- (111) Devadasu, V. R.; Bhardwaj, V.; Kumar, M. N. V. R. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1686–1735.
- (112) Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nanomedicine (Lond)* **2012**, *3* (5), 703–717.
- (113) Dobrovolskaia, M. A.; Aggarwal, P.; Hall, J. B.; Mcneil, S. E. **2008**, *5* (4), 487–495.
- (114) Harbor, B. *The Handbook of Experimental Animals The Laboratory Mouse*; Elsevier, 2004.
- (115) Klinker, K.; Holm, R.; Heller, P.; Barz, M. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 4612–4623.
- (116) Singh, A. K. *Engineered nanoparticles Structure, properties and mechanisms of toxicity*; Elsevier: London, San Diego, Waltham, Oxford, 2015.
- (117) Bundesjustizministerium. *Dtsch. Tierschutzgesetz* **2006**.
- (118) Workman, P.; Aboagye, E. O.; Balkwill, F.; Balmain, A.; Bruder, G.; Chaplin, D. J.; Double, J. A.; Everitt, J. *Br. J. Cancer* **2010**, *102* (11), 1555–1577.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

%ID/g	Prozent injizierter Dosis pro Gramm
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
A	Masenzahl
Å	Angström
AAZTA	6-Amino-6-methylperhydro-1,4-diazepinetetraessigsäure
abs.	absolut
ADIBO	Azadibenzoylcyclooctin
APS	$\gamma$ -Aminopropylsilan
BCN-DOTA	Bicyclo[6.1.0]non-4-in-DOTA
BFC	Bifunktionelle Chelatoren
BGO	Bismut-Germanat
c	Lichtgeschwindigkeit (Zusammenhang)
c	Konzentration (Zusammenhang)
COT	Cyclooctin
CT	Computertomographie
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition
d	Tage
d.h.	das heißt
DATA	6-Amino-1,4-diazepineessigsäure
DBCO	Dibenzylcyclooctin
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DFO	Desferoxamin
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DO3A-But	Tri- <i>tert</i> -2,2',2''-(10-butansäure)- <i>N,N',N'',N'''</i> -tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecan- <i>N,N',N'',N'''</i> -1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTA-NHS-Ester	1,4,7,10-tetraazacyclododecan- <i>N,N',N'',N'''</i> -1,4,7,10-tetraessigsäure-mono- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester
DOTA-tris-(tBu) <sub>3</sub>	2-(4,7,10-tris(2-( <i>tert</i> -butoxy)-2-oxoethyl)- <i>N,N',N'',N'''</i> -tetraazacyclododecan-1-yl)essigsäure
DTPA	Diethylentriamintetraessigsäure
e <sup>+</sup>	Positron
E <sub>Akt</sub>	Aktivierungsenergie
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
E <sub>Deform</sub>	Deformationsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E <sub>e</sub>	Anregungsenergie
en	Ethylendiamin
EPR	Enhanced permeability and retention
eq.	Äquivalent(e)
ESI	Electronspray-Ionisation
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
EWG	Elektronenziehende Gruppe
E <sub>ww</sub>	Wechselwirkungsenergie
FV	Feinvakuum

GSO	Gadoliniumsilikat
h	Stunde(n)
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES	Hydroxyethylstärke
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOAc	Essigsäure
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	Humanserum
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Core
i.d.R.	in der Regel
i.V.	intravenös
isoton.	isotonisch
J	Gesamtdrehimpuls
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
LC/MS	liquid chromatography mass spectrometry
LM	Lösungsmittel
LOR	Line of Response
Lsg.	Lösung
LSO	Lutetium- <i>ortho</i> -Silikat
m	Ruhemasse des Elektrons
M	Mutternuklid (Zusammenhang)
M	molar (Zusammenhang)
MBq	Megabequerel
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Neutron
N	Anzahl an Atomen (Zusammenhang)
N	normal (Zusammenhang)
n.c.a.	no carrier added
NaOAc	Natriumacetat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanz
NODA-GA	1,4,7-Triazacyclononane- <i>N</i> -glutarsäure- <i>N',N''</i> -diessigsäure
NODA-GA-(tBu) <sub>3</sub>	4-(4,7-bis(2-( <i>tert</i> -butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazacyclononan-1-yl)-5-( <i>tert</i> -butoxy)-5-oxopentanoic acid
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan- <i>N,N',N''</i> -triessigsäure

ns	Nanosekunde
o.Ä.	oder Ähnliches
p	Partialdruck (Zusammenhang)
p	Proton (Zusammenhang)
p.i.	post injection
PBS	Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung
PCys	Polycystein
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronen Emissions Tomographie
pm	Pikometer
pmol	Pikomol
Ps	Positronium
PSar	Polysarcosin
Q	Energiebetrag, der bei $\beta^+$ -Umwandung frei wird
r	Radius
RCA	Radiochemische Ausbeute
ROI	region of interest
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SEC	Größenausschluss
sog.	sogenannt
SPAAC	spannungsvermittelte Alkin-Azid Cycloaddition
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
T	Tochternuklid
TEG	Tetraethylenglycol
<i>tert</i>	tertiär
TES	Triethylensilan
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilyl-
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
$t_R$	Retentionszeit
TRAP	Triazacyclononanphosphinsäure
u.a.	unter Anderem
US	Ultraschall
V	Ionisationspotential
vgl.	vergleiche
Z	Ordnungszahl
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
$Z_{eff}$	effektive Massenzahl
$\beta^+$	Positron
$\varepsilon$	Elektroneneinfang
$\lambda$	Vernichtungskonstante
$\nu_e$	Elektroneutrino
$\tau$	mittlere Lebensdauer
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\sigma$	Wirkungsquerschnitt

## 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung (nicht maßstabsgetreu) der $\beta^+$ -Umwandlung. Rote Kugeln stellen Protonen dar, weiße Kugeln stellen Neutronen dar, das Positron ist in blau dargestellt, das Elektroneutrino in grün. ....	18
Abbildung 2: Koinzidenzmessung nach Annihilation eines Positron-Elektron-Paares (in blau-gelb dargestellt) bei PET.....	19
Abbildung 3: Koinzidenzen: a) Wahre Koinzidenz; b) gestreute Koinzidenz; c) zufällige Koinzidenz; d) Single.....	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Emissions- und Transmissionsmessung.....	21
Abbildung 5: Ausschnitt aus der Karlsruher Nuklidkarte.....	23
Abbildung 6: Radiochemische Gleichgewichte.....	24
Abbildung 7: Anwachsen der Aktivität nach Elution.....	24
Abbildung 8: Elutionsschema eines $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators N1 = 80 % Aceton mit 0,15 M HCl; N2 = 97,6 % Aceton mit 0,05 M HCl.....	25
Abbildung 9: Einige offenkettige Chelatoren.....	26
Abbildung 10: Einige makrozyklische Chelatoren.....	27
Abbildung 11: Mechanismus für die Knüpfung einer Amidbindung am Beispiel von HATU als Kopplungsreagenz.....	29
Abbildung 12: Gleichgewicht zwischen der Uronium-Spezies und der Guanidinium-Spezies des HATU.....	29
Abbildung 13: Nebenreaktion bei HATU-Kopplungen.....	29
Abbildung 14: DBCO-Amin ( <b>1</b> ).....	30
Abbildung 15: Allgemeiner Reaktionsmechanismus einer Kupfer-freien Click-Reaktion.....	31
Abbildung 16: Mechanismus der CuAAC <sup>61,62</sup> .....	31
Abbildung 17: Zusammenhang zwischen Aktivierungsenergie ( $E_{\text{Akt.}}$ ), Deformationsenergie ( $E_{\text{Deform.}}$ ) und Wechselwirkungsenergie ( $E_{\text{Ww}}$ ) bei der SPAAC <sup>54</sup> .....	32
Abbildung 18: Schematische Darstellung des EPR-Effekts.....	34
Abbildung 19: Übersicht über einige nanodimensionale Strukturen.....	34
Abbildung 20: Pre- und Postradiolabeling.....	36
Abbildung 21: Direkte und indirekte Radiomarkierung mittels SPAAC am Beispiel von Blockcopolymeren.....	38
Abbildung 22: Strategien für die Chelator-Funktionalisierung von Eisenoxidnanopartikeln.....	39
Abbildung 23: Radiomarkierung einer kernvernetzten Mizelle.....	39
Abbildung 24: Darstellung von NODA-GA-DBCO ( <b>4</b> ).....	42
Abbildung 25: Darstellung von DOTA-DBCO ( <b>7</b> ).....	43
Abbildung 26: Darstellung von NODA-GA-PEG <sub>4</sub> -DBCO ( <b>10</b> ).....	45
Abbildung 27: Darstellung von DOTA-PEG <sub>4</sub> -DBCO ( <b>12</b> ).....	45
Abbildung 28: HPLC-Diagramme von DOTA-PEG <sub>4</sub> -DBCO ( <b>12</b> ). Blau: Isokratisch 30 % B; Grün: Gradient 30-32 % B in 20 min.....	46
Abbildung 29: Schematische Gegenüberstellung einer isokratischen HPLC-Messung (oben) und einer HPLC-Messung mit Gradient (unten).....	46
Abbildung 30: Darstellung von NODA-GA-TEG-Azid ( <b>15</b> ).....	47
Abbildung 31: Darstellung von DOTA-TEG-Azid ( <b>17</b> ).....	48

Abbildung 32: Darstellung von DATA <sup>5m</sup> -DBCO (20).....	49
Abbildung 33: Darstellung von DATA <sup>5m</sup> -TEG-Azid (22) .....	49
Abbildung 34: Syntheseroute A des dreifach tert-Butyl-geschützten DATA <sup>5m</sup> (18) .....	50
Abbildung 35: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (25).....	51
Abbildung 36: Mechanismus der doppelten Mannichreaktion .....	51
Abbildung 37: Darstellung von 5-(6-amino-1,4-diazepan-6-yl)pentansäuremethylester (26).....	52
Abbildung 38: Nebenprodukte bei der Hydrierungsreaktion von 25 .....	53
Abbildung 39: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (27).....	53
Abbildung 40: Nebenprodukte bei der Alkylierungsreaktion von 26.....	54
Abbildung 41: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (28).....	54
Abbildung 42: Mechanismus der reduktiven Aminierung.....	54
Abbildung 43: Darstellung von 5-(1,4-bis(2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)-6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)(methyl)amino)-1,4-diazepan-6-yl)pentansäure (18).....	55
Abbildung 44: Alternative Syntheseroute B zum DATA <sup>5m</sup> .....	56
Abbildung 45: Darstellung von Di-tert-butyl-N,N'-dibenzylethylendiamin-N,N'-diacetat (36).....	56
Abbildung 46: Darstellung von Di-tert-butyl-ethylendiamin-N,N'-diacetat (37) .....	57
Abbildung 47: Nebenprodukte bei der Hydrierung in Methanol von 36.....	57
Abbildung 48: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-6-nitro-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (34).....	58
Abbildung 49: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-amino-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (38).....	58
Abbildung 50: Darstellung von Di-tert-butyl-2,2'-(6-((2-(tert-butoxy)-2-oxoethyl)amino)-6-(5-methoxy-5-oxopentyl)-1,4-diazepan-1,4-diyl)diacetat (27).....	59
Abbildung 51: Kinetiken der NODA-GA-Derivate bei der Radiomarkierung mit <sup>68</sup> Ga <sup>3+</sup> .....	61
Abbildung 52: Einfluss verschiedener Stoffmengen von NODA-GA-TEG-Azid bei A = 50 MBq auf die Markierungsausbeute.....	62
Abbildung 53: Einfluss verschiedener Temperaturen auf die RCA bei der Radiomarkierung von NODA-GA-TEG-Azid .....	62
Abbildung 54: Radio-HPLC-Diagramm von [ <sup>68</sup> Ga]NODA-GA-Azid nach Kartuschenabtrennung.....	63
Abbildung 55: Stabilitätstest der [ <sup>68</sup> Ga]NODA-GA-Derivate in verschiedenen Medien bei 37 °C.....	64
Abbildung 56: Radio-HPLC von [ <sup>68</sup> Ga]NODA-GA-DBCO in NaCl-Lösung nach 120 min bei 37 °C .....	64
Abbildung 57: Radio-HPLC von [ <sup>68</sup> Ga]NODA-GA-DBCO in DTPA-Lösung nach 120 min bei 37 °C .....	64
Abbildung 58: Ammoniumacetat/Methanol-DC der Transchelatierung von [ <sup>68</sup> Ga]NODA-GA-DBCO mit DTPA nach 120 min .....	65
Abbildung 59: Radio-HPLCs von [ <sup>68</sup> Ga]NODA-GA-TEG-Azid in DTPA-Lösung (links) und NaCl-Lösung (rechts) nach 120 min .....	66

Abbildung 60: Kinetiken von DOTA-DBCO, DOTA-PEG <sub>4</sub> -DBCO und DOTA-TEG-Azid bei der Radiomarkierung mit <sup>68</sup> Ga.....	67
Abbildung 61: Radio-HPLC von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO nach 15 min Reaktionszeit.....	67
Abbildung 62: Radio-HPLC von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-PEG <sub>4</sub> -DBCO nach 15 min Reaktionszeit und Kartuschenabtrennung ..	68
Abbildung 63: Einfluss der Stoffmenge des Vorläufers auf die Kinetik und RCA von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO .....	68
Abbildung 64: Stabilitätstest von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-TEG-Azid und [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO in verschiedenen Medien bei 37 °C .....	69
Abbildung 65: Radio-HPLC von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-TEG-Azid nach 120 min bei 37 °C in DTPA-Lösung.....	69
Abbildung 66: Radio-HPLC von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO nach 40 min bei 70 °C in PBS-Puffer.....	70
Abbildung 67: Radio-HPLC von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO nach 90 min bei 70 °C in PBS-Puffer.....	70
Abbildung 68: Freisetzung von <sup>68</sup> Ga <sup>3+</sup> aus [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO bei 45 °C, 55 °C und 70 °C in PBS-Puffer bzw. in PBS-Puffer mit NaN <sub>3</sub> nach 30 min .....	71
Abbildung 69: Struktur des [Ga(HDOTA)·5,5 H <sub>2</sub> O]-Komplexes. Wassermoleküle und Protonen sind der Übersicht halber nicht dargestellt <sup>35,87</sup> .....	71
Abbildung 70: Radio-HPLC von DOTA-PEG <sub>4</sub> -DBCO nach Kartuschenabtrennung und 90 min bei 70 °C in PBS-Puffer .....	72
Abbildung 71: Kinetikstudie für die Radiomarkierung von DOTA-DBCO und DOTA-TEG-Azid mit <sup>44</sup> Sc .....	74
Abbildung 72: Kinetik der Radiomarkierung von DOTA-DBCO und DOTA-TEG-Azid mit <sup>177</sup> Lu.....	74
Abbildung 73: Vergleich der Kinetiken von DOTA-DBCO und DOTA-TEG-Azid mit <sup>68</sup> Ga, <sup>44</sup> Sc und <sup>177</sup> Lu.....	75
Abbildung 74: Vereinfachte schematische Darstellung eines Eisenoxidpartikels mit Polymerhülle und angebundenem DOTA .....	76
Abbildung 75: Oberflächenfunktionalisierungen mit Methoxyfunktion und mit Amonifunktion. Oben Catechol-funktionalsierte PEG-basierte Polymere, unten PEG-TES und γ-Aminopropylsilan (APS).....	76
Abbildung 76: TEM-Bilder von FePt@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (links) und Fe/Fe <sub>x</sub> O-Partikeln (rechts) .....	77
Abbildung 77: DOTA-NHS-Ester ( <b>43</b> ).....	77
Abbildung 78: Darstellung von Tri-tert-2,2',2''-(10-(4-(methoxyloxy)-4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat ( <b>46</b> ) .....	80
Abbildung 79: Darstellung von Tri-tert-2,2',2''-(10-butansäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-trityl)triacetat ( <b>47</b> ).....	81
Abbildung 80: Kopplung von DOTA-tris-( <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> an das Catechol-PEG-Amin-Polymer.....	82
Abbildung 81: Citrat-DC von DOTA-funktionalisierten (rechts) und unfunktionalisierten (links) Eisenoxidnanopartikeln nach Inkubation mit <sup>68</sup> Ga <sup>3+</sup> für 15 min bei 95 °C .....	84
Abbildung 82: Citrat-DC nach PD10 Abtrennung der radiomarkierten Eisenoxidnanopartikel (links: Reaktionsgemisch, es folgen Fraktionen 3-7).....	85
Abbildung 83: Stabilitätstests der mit DOTA funktionalisierten Eisenoxidpartikel in HS und isoton. NaCl .....	85
Abbildung 84: Stabilitätstest der Amino-funktionalisierten Partikel gegen Lösungen von DTPA und Transferrin. ..	86
Abbildung 85: Citrat-DC der Kinetik der Radiomarkierung von DOTA-modifizierten TaO <sub>x</sub> -Nanopartikeln nach 3, 7, und 15 min .....	86
Abbildung 86: Kinetik der Radiomarkierung von DOTA-modifiziertem TaO <sub>x</sub> bei 3, 7, und 15 min .....	87
Abbildung 87: Radio-DC der Markierungskinetik von DO3A-But-modifizierten TaO <sub>x</sub> -Partikeln nach 1, 3, 5, 7, 10, 15 min.....	87

Abbildung 88: Kinetikstudie der DO3A-But-modifizierten TaO <sub>x</sub> -Partikel.....	88
Abbildung 89: Vergleich von DOTA und DO3A-But-funktionalisierten Nanopartikeln bei der Radiomarkierung .....	88
Abbildung 90: Aminofunktionalisiertes Catechol-PEG. ....	89
Abbildung 91: Markierungseffizienz von FePt@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> im Vergleich: Kopplung des Chelators vor und nach dem Coating der Partikel .....	89
Abbildung 92: TEM-Aufnahme von Fe <sub>x</sub> O@SiO <sub>2</sub> @PEG <sub>5-9</sub> -OMe@PEG <sub>10</sub> -N <sub>3</sub> .....	90
Abbildung 93: Kinetik der Clickreaktionen von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO an FeO <sub>x</sub> -Nanopartikel bei 45 °C und 55 °C .....	91
Abbildung 94: Freisetzung von <sup>68</sup> Ga <sup>3+</sup> aus [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-DBCO nach 30 min Reaktionszeit .....	92
Abbildung 95: BCN-DOTA ( <b>49</b> ) .....	92
Abbildung 96: BCN-DOTA click an Fe <sub>x</sub> O@SiO <sub>2</sub> @PEG <sub>5-9</sub> -OMe@PEG <sub>10</sub> -N <sub>3</sub> nach 30 min @ 45 °C vor PD10.....	93
Abbildung 97: BCN-DOTA click an Fe <sub>x</sub> O@SiO <sub>2</sub> @PEG <sub>5-9</sub> -OMe@PEG <sub>10</sub> -N <sub>3</sub> nach 30 min @ 45 °C nach PD10 (Fraktion 13).....	93
Abbildung 98: μPET-Aufnahmen einer gesunden C57BL/6 Maus, a) 0-1 min, b) 1-10 min, c) 10-30 min, d) 30-60 min, He = Herz, Le = Leber, Mi = Milz .....	95
Abbildung 99: Zeit-Aktivitäts-Kurven von Herz, Leber und Milz .....	95
Abbildung 100: Ergebnisse der ex vivo-Biodistributionsstudie der <sup>68</sup> Ga-markierten Eisenoxid-Nanopartikel nach 1 h in gesunden C57BL/-Mäusen; n=4 .....	96
Abbildung 101: Reaktionsgleichung der Homopolymersynthese eines endgruppenfunktionalisierten Polysarcosins .....	97
Abbildung 102: Oben UV-Spur, unten Radio-Spur nach Clickreaktion von [ <sup>68</sup> Ga]NODA-GA-TEG-Azid und PSar-DBCO .....	98
Abbildung 103: Vergleich der direkten und indirekten Radiomarkierung ohne Abtrennung von ungeclicktem Chelator.....	99
Abbildung 104: Indirekte Radiomarkierung von PSar mit und ohne Abtrennung des ungeclickten Chelators .....	100
Abbildung 105: Ausbeuten der direkten (mit Abtrennung des ungeclickten Chelators) bzw. der indirekten Radiomarkierung von PSar .....	100
Abbildung 106: Radio-HPLC/SEC der Clickreaktion von [ <sup>68</sup> Ga]DOTA-TEG-Azid und PSar-DBCO.....	101
Abbildung 107: Radio-HPLC der Clickreaktion von [ <sup>177</sup> Lu]DOTA-TEG-Azid mit PSar-DBCO nach 70 min Reaktionszeit .....	101
Abbildung 108: Radio-HPLC der Clickreaktion von [ <sup>177</sup> Lu]DOTA-TEG-Azid mit PSar-DBCO nach 180 min Reaktionszeit.....	101
Abbildung 109: Vergleich zwischen direkter und indirekter Radiomarkierung mit DOTA-TEG-Azid .....	102
Abbildung 110: Vergleich der direkten und indirekten Radiomarkierungen von DOTA-TEG-Azid und NODA-GA-TEG-Azid .....	102
Abbildung 111: Vergleich zwischen der direkten und indirekten Radiomarkierung von PSar mit NODA-GA-DBCO .....	104
Abbildung 112: Vergleich der direkten und indirekten Radiomarkierung mit DOTA-DBCO und NODA-GA-DBCO .....	105
Abbildung 113: Schema der Bildung der Kernvernetzten Mizellen .....	108
Abbildung 114: Darstellung von NODA-GA-Liponamid ( <b>54</b> ).....	108
Abbildung 115: Radiomarkierung des NODA-GA-Liponamid-Vernetzers .....	109

---

Abbildung 116: Radiomarkierung der Mizellen mit NODA-GA-Liponamid als Vernetzer und der Blindprobe .....	109
Abbildung 117: Radio-HPLC/SEC der Markierungsreaktion der mit Liponamid kernvernetzten PSar-PCys-Mizellen .....	110
Abbildung 118: Radio-HPLC/SEC der Markierungsreaktion der mit Liponamid kernvernetzten PSar-PCys-Mizellen nach PD10-Abtrennung .....	110
Abbildung 119: Radio-HPLC/SEC der kernvernetzten PSar-PCys-Mizellen nach 120 min in isoton. NaCl. ....	111
Abbildung 120: Ergebnisse der ex vivo-Biodistributionsstudien für die kernvernetzten Mizellen nach 60 min in gesunden C57BL/6-Mäusen; n = 4 .....	112
Abbildung 121: $\mu$ PET/MR-Aufnahmen einer gesunden C57BL/6-Maus. a) 0-1 min; b) 1-10 min; c) 10-30 min; d) 30-60 min; He=Herz, Le=Leber, Mi=Milz, Bl=Blase .....	113
Abbildung 122: Zeitaktivitätskurven für verschiedene Organe über 60 min .....	113

## 6.4 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht einiger bildgebender Verfahren<sup>6,8,9</sup></i> .....	17
<i>Tabelle 2: Physikalische Eigenschaften einiger PET-Nuklide<sup>14,17-24</sup></i> .....	22
<i>Tabelle 3: Parameter der Phenomenex®-HPLC-Säulen Luna und Gemini<sup>80</sup></i> .....	44
<i>Tabelle 4: Parameter der Phenomenex®-HPLC-Säulen Gemini und Synergi MAX-RP<sup>80</sup></i> .....	47
<i>Tabelle 5: Variationen der Reaktionsbedingungen bei der Hydrierung von <b>36</b></i> .....	57
<i>Tabelle 6: Variationen der Reaktionsbedingungen bei der Reduktion von <b>34</b></i> .....	59
<i>Tabelle 7: Vergleich der unterschiedlichen Syntheserouten für die Darstellung von DATA<sup>5m</sup> (<b>18</b>)</i> .....	59
<i>Tabelle 8: Studie der Amidbindungsknüpfung über NHS-Ester</i> .....	79
<i>Tabelle 9: Studie der verschiedenen Kopplungsreagenzien und Stöchiometrien</i> .....	80
<i>Tabelle 10: Vor- und Nachteile der direkten und der indirekten Radiomarkierung mittels SPAAC im Überblick</i> ...	107
<i>Tabelle 11: Festphasenabtrennung der radiomarkierten Chelatoren</i> .....	136









## 6.5 Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. T.L. Ross in der Zeit vom 01.08.2012 bis zum 05.10.2016 am Institut für Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Ich versichere, dass ich die Arbeit selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mainz, den 05.10.2016

Katharina Stockhofe