

Technische Universität München
TUM School of Natural Sciences

Selektion, Charakterisierung und präklinische Evaluierung von Radiopharmaka mit cyclopeptidischer Leitstruktur

Mara Katharina Parzinger

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Natural Sciences der Technischen
Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Angela Casini

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Margret Schottelius
2. Apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich

Die Dissertation wurde am 10.03.2023 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Natural Sciences am 19.06.2023
angenommen.

Abstract

The somatostatin receptor (SST) and its five subtypes SST₁ – SST₅ belong to the family of G-protein-coupled-receptors (GPCR). Through the binding of the endogenous ligand somatostatin, the somatostatin-receptor complex is formed, which can affect hormone release, cell proliferation and cell apoptosis. SSTs are primarily expressed in tissues of neuroendocrine origin such as the gastrointestinal tract. Due to the high overexpression of SST₂ on cells of neuroendocrine tumors (NET), several SST₂ targeted radiopharmaceuticals have been developed during the last 3 decades.

Due to the simplicity of the labeling method for gallium, which can be introduced into a ligand molecule by complexation, [⁶⁸Ga]Ga-labeled SST₂ agonists have become the ligands of choice for the diagnosis of NETs *via* positron emission tomography (PET). Thus, although [¹⁸F]fluorine is known to have superior nuclear properties, the more complex and often multistep methods for ¹⁸F-labeling have favored the use of [⁶⁸Ga]Ga-labelled radiopharmaceuticals.

The objective of this work was the development of novel [¹⁸F]fluorine labeled radiohybrid (rh) SST₂ ligands (rhSST₂) for the diagnosis of NETs *via* PET. As radiohybrid ligands, these derivatives should bear a silicon-fluorine-acceptor (SiFA) alongside a chelator. While the SiFA-moiety can be labeled with [¹⁸F]fluorine by ¹⁹F-for-¹⁸F isotopic exchange, the chelator can be complexed with a radioactive or a non-radioactive metal cation. The chelator also compensates the high lipophilicity of the SiFA-moiety. The SST₂-ligands in this work (rhSST₂ ligands) were compared with the literature-known compound [¹⁸F]SiTATE, which is also a SiFA-ligand. The synthesis of the rhSST₂ derivatives was carried out by solid-phase-peptide-synthesis (SPPS). The affinity to SST₂ (half-maximum inhibitory concentration, IC₅₀) was determined using CHO-SST₂ cells, whereas SST₂ mediated internalization of the rhSST-ligand/SST₂ receptor complex was evaluated employing AR42J cells. The lipophilicity was determined by the shake-flask method in 1-octanole and PBS. The binding towards human serum albumin (HSA) was determined by high performance affinity chromatography (HPAC) and albumin-mediated-size-exclusion-chromatography (AMSEC).

Different classes of rhSST₂-ligands were developed. In the class of linker-free ligands especially [^{18/19}F]Ga-rhLF-4 and [^{18/19}F]Ga-rhLF-9 showed favorable *in vitro* data. The affinity (IC₅₀) of both compounds was comparable with the reference compound [¹⁸F]SiTATE and their hydrophilicity (LogD_{pH=7.4}) was slightly enhanced. However, in contrast to [¹⁸F]SiTATE, biodistribution in mice revealed predominantly hepatobiliary excretion of both ligands. Compared to [¹⁸F]SiTATE, insufficient hydrophilicity and thus high binding to HSA of these rhSST₂ ligands was considered as root cause for this observation.

Based on these results, the class of linker-based rhSST₂ derivatives, with different generations, has been developed. Within this class, promising results were obtained for the 3rd generation of ligands bearing the optimized SiFA-moiety SiFAN⁺Gly. Opposed to the linker-free ligands, these new derivatives consist

ABSTRACT

of a quarternary amine and therefore a positive charge in close proximity to the SiFA moiety. This results in a significant reduction of HSA binding and thus, to a reduced hepatobiliary excretion of these ligands. Furthermore, the additional positive charge resulted in high affinity towards SST₂ (low nM range). As an example, [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 with a SST₂ affinity (IC₅₀) of 3.01 ± 0.03 nM, a lipophilicity (LogD_{pH=7.4}) of -2.00 ± 0.12 and only low HSA-binding (AMSEC: MW_{app} = 8.18 kDa) outperforms the literature-known reference [¹⁸F]SiTATE (IC₅₀ = 6.98 ± 0.61 nM; LogD_{pH=7.4} = -1.27 ± 0.07; MW_{app} = 6.96 kDa). In addition, [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 showed a higher tumor accumulation (31.8 ± 2.49 %ID/g; [¹⁸F]SiTATE: 22.7 ± 2.68 %ID/g) at 1 h post injection in tumor bearing mice, while tumor/organ ratios of [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 for blood, heart, kidneys, muscle and liver were nearly doubled.

To simplify the structure of the linker-based ligands, the linker moiety was removed and the chelator was applied as a bridging unit between the SST₂ binding motif and the SiFA-moiety. This class of rhSST₂ ligands resulted in DOTA-TATE-based ligands that showed the highest affinity towards SST₂ in this work ([^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.3: IC₅₀ = 2.57 ± 0.20 nM) and the lowest binding towards HSA ([^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.3: MW_{app} = 5.13 kDa). Similarly, the usage of SiFAN⁺Gly within this class of ligands resulted in a number of ligands with high SST₂ affinity and less pronounced HSA binding. Nevertheless, biodistribution studies in tumor bearing mice revealed that [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 should be the most promising candidate for a future clinical translation.

Kurzzusammenfassung

Bei dem Somatostatin Rezeptor (SST) und seinen fünf Subtypen SST₁ – SST₅ handelt es sich um G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR). Durch die Bindung des endogenen Liganden Somatostatin bildet sich der Somatostatin-Rezeptor-Komplex, der wiederum Einfluss auf die Ausschüttung von Hormonen, die Zellproliferation oder die Zellapoptose nimmt. SSTs werden vor allem in Gewebestrukturen neuroendokrinen Ursprungs beobachtet, wie zum Beispiel im GI-Trakt. Aufgrund der hohen Überexpression von SST₂ auf den Zellen neuroendokriner Tumorerkrankungen (NET), wurden in den vergangenen drei Jahrzehnten, zahlreiche SST₂ adressierende Radiopharmazeutika entwickelt.

Aufgrund der Einfachheit der Markierungsmethode für Gallium, welches in einer Komplexierungsreaktion in das Ligand-Molekül eingebaut werden kann, wurden [⁶⁸Ga]Ga-markierte SST₂ Agonisten die Liganden der Wahl für die Diagnose von NETs *via* Positronen Emissions Tomographie (PET). Obwohl [¹⁸F]Fluor bekanntermaßen verglichen mit [⁶⁸Ga]Gallium überlegene nukleare Eigenschaften besitzt, wurden [⁶⁸Ga]Ga-markierte Liganden, aufgrund der komplexeren und häufig mehrschrittigen Methoden zur [¹⁸F]F-Markierung, bevorzugt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer, radiohybrider (rh) SST₂ Liganden (rhSST₂) für die Diagnostik von NETs *via* PET. Als radiohybride Liganden sollten diese Derivate einen Silizium-Fluor-Akzeptor (SiFA), benachbart zu einem Chelator tragen. Die SiFA-Einheit kann mit [¹⁸F]Fluor über einen ¹⁸F-¹⁹F-Isotopenaustausch markiert werden, während der Chelator mit einem Radiometall oder einem nicht radioaktiven Metall komplexiert wird. Der Chelator kann außerdem die hohe Lipophilie des SiFA-Bausteins kompensieren.

Die in dieser Arbeit entwickelten SST₂-Liganden wurden mit der Literaturverbindung [¹⁸F]SiTATE verglichen, bei dem es sich ebenfalls um einen SiFA-Liganden handelt. Die Synthese der rhSST₂ Liganden erfolgte mittels Festphasenpeptidsynthese. Die Affinität zu SST₂ (halbmaximale inhibitorische Konzentration, IC₅₀) wurde an CHO-SST₂ Zellen ermittelt, während die SST₂ vermittelte Zellinternalisierung des rhSST₂-Ligand/SST₂-Rezeptor-Komplexes unter Anwendung von AR42J Zellen bestimmt wurde. Die Lipophilie wurde mittels der Schüttelmethode in 1-Oktanol und PBS ermittelt. Die Bindung an humanes Serum Albumin (HSA) wurde sowohl per High Performance Affinity Chromatography (HPAC) als auch per Albumin-Mediated-Size-Exclusion-Chromatography (AMSEC) ermittelt.

Es wurden verschiedene Klassen von rhSST₂-Liganden entwickelt. In der Klasse der linkerfreien Liganden lieferten [^{18/19}F]Ga-rhLF-4 und [^{18/19}F]Ga-rhLF-9 vielversprechende *in vitro* Daten. Die Affinitäten (IC₅₀) beider Liganden waren vergleichbar mit der Referenzverbindung [¹⁸F]SiTATE und ihre Hydrophilien (LogD_{pH=7.4}) waren geringfügig erhöht. Im Unterschied zu [¹⁸F]SiTATE offenbarte sich in der Biodistribution in Mäusen, für beide Liganden eine vordergründig hepato biliäre Exkretion.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Verglichen mit [^{18}F]SiTATE wurden eine unzureichende Hydrophilie und eine daraus resultierende hohe Bindung dieser rhSST₂ Liganden an HSA, als Ursache identifiziert.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, wurde die Klasse der linkerbasierten Liganden mit verschiedenen Generationen entwickelt. Innerhalb dieser Klasse zeigten die Liganden der 3. Generation vielversprechende Ergebnisse. Diese wurden mit dem optimierten SiFA-Baustein SiFAN⁺Gly entwickelt. Im Unterschied zu den linkerfreien Liganden, tragen diese eine zum SiFA benachbarte positive Ladung in Form eines quartären Amins. Dieses sorgt für eine signifikante Reduktion der Bindung an HSA und damit für eine verringerte Exkretion dieser Liganden über die Leber. Außerdem führte die zusätzliche positive Ladung zu einer hohen Affinität zu SST₂ (niedriger nM Bereich). Besonders hervorzuheben war dabei der Ligand [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLB-3.2, der mit einer Affinität von 3.01 ± 0.03 nM (IC₅₀), einem LogD_{pH=7.4} von -2.00 ± 0.12 und einer HSA-Bindung von 8.18 kDa (AMSEC) der Referenz [^{18}F]SiTATE insgesamt überlegen war (IC₅₀ = 6.98 ± 0.61 nM; LogD_{pH=7.4} = -1.27 ± 0.07 ; MW_{app} = 6.96 kDa). Im *in vivo* Mausexperiment wies [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 eine gesteigerte Tumorrakkumulation (31.8 ± 2.49 %ID/g; [^{18}F]SiTATE: 22.7 ± 2.68 %ID/g) 1 h post Injektion in Tumor tragenden Mäusen auf, während die Tumor/Organ Verhältnisse von [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 für Blut, Herz, Niere, Muskel und der Leber annähernd verdoppelt wurden.

Um die Struktur der linkerbasierten Liganden zu vereinfachen, wurde der Linker entfernt und der Chelator als verbrückende Einheit zwischen dem SST₂ Bindemotiv und dem SiFA-Baustein eingesetzt. In der resultierenden Klasse der DOTA-TATE-basierten Liganden wurde die in dieser Arbeit höchste Affinität zu SST₂ ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhDTB-2.3: IC₅₀ = 2.57 ± 0.20 nM) und die niedrigste Affinität zu HSA ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhDTB-3.3: MW_{app} = 5.13 kDa) eines Liganden erreicht. Auch hier führte die Verwendung von SiFAN⁺Gly zu Liganden mit hoher Affinität zur Zielstruktur und zu einer gesenkten Bindung an HSA. Dennoch zeigte die Biodistributionsstudien in Tumor tragenden Mäusen, dass [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 der vielversprechendste Kandidat für eine zukünftige klinische Translation sein sollte.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Kurzzusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
I. Theoretischer Hintergrund	8
1. Neuroendokrine Neoplasien	8
2. Somatostatin und seine Rezeptorfamilie	9
2.1 Somatostatin-14 und -28	9
2.2 Struktur und Funktion von Somatostatin Rezeptoren	10
2.3 Expression der SST Rezeptoren	11
2.4 Ligand Entwicklung	11
3. Somatostatin in der Nuklearmedizin – A Brief History	14
4. ¹⁸F in der Nuklearmedizin	16
4.1 Warum [¹⁸ F]Fluor?	16
4.2 Produktion und Verwendung von [¹⁸ F]Fluor	18
4.3 Moderne Fluorierungsmethoden – Ein Überblick	20
4.4 Silizium-Fluor-Akzeptoren (SiFA)	22
4.5 [¹⁸ F]Fluorierte Somatostatin Rezeptor Liganden	32
5. Zielsetzung der Dissertation	38
II. Materialien und Methoden	40
1. Verwendete Materialien, Chemikalien, Geräte und Software	40
2. Organische Synthese	45
3. Peptidsynthese	49
3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	49
3.2 Synthese peptidischer Bausteine	53
3.3 Variation des Bindemotivs	54
3.4 Synthese linkerfreier Liganden	60
3.5 Synthese linkerbasierter Liganden	67
3.6 Synthese DOTA-TATE-basierter Liganden	88
4. Radiomarkierungen	94
4.1 ¹⁸ F-Markierung	94
4.2 ¹²⁵ I-Markierung von TOC	95
4.3 ¹⁷⁷ Lu-Markierung	96
5. <i>In vitro</i> Experimente	96
5.1 Biochemikalien	96

INHALTSVERZEICHNIS

5.2 Zellkultur	97
6. Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$)	99
7. Bestimmung der HSA-Bindung	99
8. <i>In vivo</i> Maus-Experimente	102
III. Ergebnisse und Diskussion	103
1. Methoden dieser Arbeit	103
1.1 Allgemeines zur Peptidsynthese	103
1.2 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Evaluierung	104
2. SST₂ Bindemotive und analoge DOTA-Derivate	105
2.1 Synthese	106
2.2 <i>In vitro</i> Evaluierung, Hydrophilie und Bewertung des Zellassays zur IC ₅₀ Bestimmung	108
3. Linkerfreie rhSST₂-Liganden	111
3.1 Entwicklungskonzept	111
3.2 Synthese	112
3.3 <i>In vitro</i> Evaluierung und Hydrophilie	115
3.4 <i>In vivo</i> Biodistribution	119
3.5 Bindung an humanes Serum Albumin	121
3.6 Fazit der linkerfreien Liganden	123
4. Linkerbasierte rhSST₂-Liganden	124
4.1 Allgemeines zur Synthese der linkerbasierten Liganden	125
4.2 Linkerbasierte Liganden der 1. Generation	127
4.3 Linkerbasierte Liganden der 2. Generation	130
4.4 Linkerbasierte Liganden der 3. Generation	145
4.5 Linkerbasierte Liganden der 4. Generation	174
5. DOTA-TATE-basierte rhSST₂-Liganden	183
5.1 Entwicklungskonzept	183
5.2 Synthese	184
5.3 <i>In vitro</i> Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie	186
5.4 <i>In vivo</i> Biodistribution	197
6. Radiofluorierung mit [¹⁸F]Fluorid	200
6.1 Manuelle Radiofluorierung von SiFA-Liganden	200
6.2 Optimierung des Isotopenaustauschs	201
6.3 Optimierung der finalen Kartuschenreinigung	205
6.4 Radiosynthese der verschiedenen rhSST ₂ -Ligandklassen	207
IV. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	209
V. Anhang	213
1. Abkürzungen	213

INHALTSVERZEICHNIS

2. Referenzen	214
3. Abbildungsverzeichnis	222
4. Tabellenverzeichnis	226
5. Schemenverzeichnis	228
6. Ergänzende Daten	230
7. Danksagung	234

I. Theoretischer Hintergrund

1. Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) beschreiben eine Gruppe heterogener, epithelialer Neoplasien, die von gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren (NET), bis hin zu kaum differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (NEC), reicht.[1–3] NEN treten in nahezu jeder Region des menschlichen Körpers auf und weisen, neben einander ähnlichen morphologischen und immunophenotypischen Eigenschaften, auch immer ortsspezifische Charakteristika auf.[1] Hinsichtlich Epidemiologie, Proliferation und vor allem Aggressivität gibt es Unterschiede je nach Entstehungsort der NEN. Daher ergeben sich aus Typ und Ursprungsorgan der NEN Unterschiede in deren Klassifizierung.[2] NEN treten in rein endokrinen Organen wie der Adenohypophyse[4], Schilddrüse[5], Nebenschilddrüse[6] und den Nebennieren oder auch in Organen des diffusen neuroendokrinen Zellsystems wie Haut[7, 8], Lunge[9, 10], Brust[11] sowie in den digestiven Organen[12] und dem Urogenitaltrakt[13, 14], auf.[1, 3]

NEN treten in der Bevölkerung mit niedrigen Inzidenzen und Prävalenzen auf und gehören damit zu den raren Entitäten (rare disease) der Onkologie. Eine statistische Analyse von 2012 mit umfangreichen Daten des SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) Programms der Vereinigten Staaten von Amerika ergab für die USA eine jährliche Inzidenz von 6.98 je 100'000 Einwohner und eine Prävalenz von 0.048%. Diese Zahlen nahmen in den vergangenen Jahrzehnten deutlich zu. So lag die Inzidenz 1973 noch bei 1.09 je 100'000 Einwohner.[15] Die Gründe für diese Zunahme in Inzidenz und Prävalenz sind nicht abschließend geklärt, werden aber teilweise auf die Optimierung der Diagnosemethoden zurückgeführt, wie die breitere Anwendung von Endoskopie und Ultraschall, verbesserte Computertomographie (CT) und der Somatostatin-basierten Szintigraphie.[16, 17]

Davon abgesehen, hängen Inzidenz und Überlebensrate von verschiedenen Faktoren, wie Geschlecht, Nationalität, Ethnie, und Alter zum Zeitpunkt der Diagnose ab. Es konnten sogar Unterschiede zwischen verheirateten und alleinstehenden Personen festgestellt werden.[15, 17–19] Liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten unter 20 Jahren bei Diagnosestellung noch bei 88.8%, verschlechtert sich diese bei Patienten von über 70 Jahren auf 36.5% (Mittelwerte verschiedener NET/NEC Typen ohne Berücksichtigung von Unterschieden hinsichtlich des Ursprungs des Primärtumors).[17] In einer SEER Datenanalyse von 2018 wurde eine mittlere Überlebenszeit (ÜZ) von 9.3 Jahren über alle NEN Erkrankungen hinweg ermittelt. Bei detaillierter Betrachtung ergaben sich deutliche Unterschiede für *local* (mittlere ÜZ >30 Jahre), *regional* (mittlere ÜZ 10.2 Jahre) und *distant* (mittlere ÜZ 12 Monate) NETs, wobei sich auch das ermittelte Tumor-Grading und der Ursprung des Primärtumors signifikant auf die Überlebensdauer auswirken (siehe Abbildung 1).[15]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

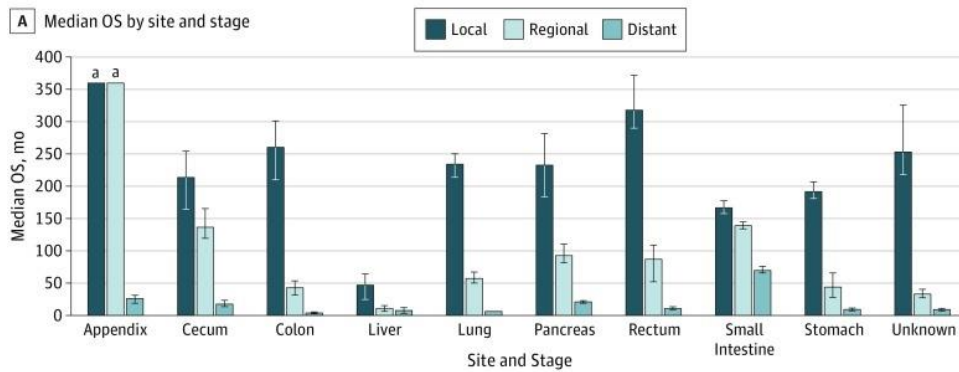


Abbildung 1: Mittleres Überleben in Monaten in Abhängigkeit von Lokalisation des Primärtumors und Fortschritt der Tumorerkrankung (*local, regional, distant*) (OS = overall survival; mo = months). Abbildung adaptiert von *Dasari et al.*[15]

Hervorzuheben ist dabei die Beobachtung, dass Grade 1 Patienten (ohne Metastasierung und Befall anderer Organe oder Lymphknoten) durch eine chirurgische Tumoresektion eine 5-Jahres-Überlebensrate von 97% aufweisen.[17] Eine möglichst frühe Detektion mit korrekter Einordnung in das entsprechende Grading-System ist daher entscheidend für die Wahl der Therapie und die Überlebenschancen der Patienten und bietet damit die Argumentationsgrundlage für die Erforschung und Entwicklung neuer und verbesserter Diagnosemethoden.

2. Somatostatin und seine Rezeptorfamilie

2.1 Somatostatin-14 und -28

Das in Säugetieren gebildete *Somatostatin*¹ (SRIF) existiert in zwei bioaktiven Formen, das Tetradecapeptid SRIF-14 und das Octacosapeptid SRIF-28 (Strukturen in Abbildung 2 dargestellt).[21–23]

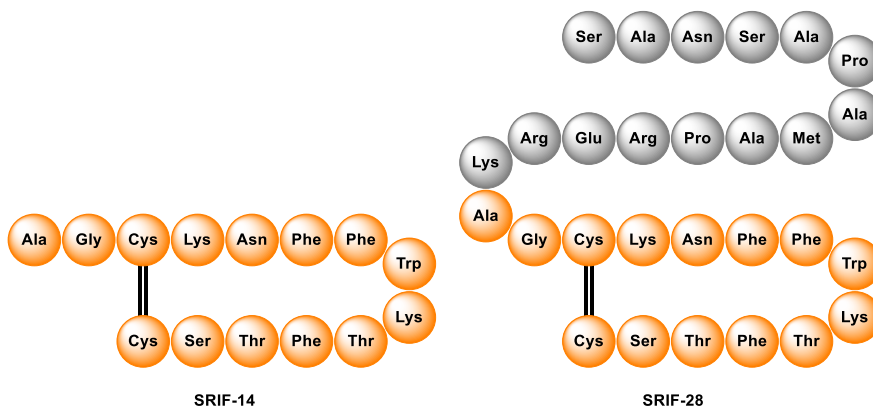


Abbildung 2: Sequenzen von SRIF-14 und SRIF-28 (Säuger). Jede Sphäre entspricht einer Aminosäure die durch die Angabe des Dreibuchstabencodes definiert wird; orange: identisch in beiden Peptiden; grau: Aminosäuren nur in SRIF-28 enthalten. Abbildung adaptiert von *Günther et al.*[21–24]

¹ In der Literatur findet sich neben SRIF vor allem SST als gebräuchliche Abkürzung für Somatostatin. In dieser Arbeit wird die nach IUPHAR empfohlene Abkürzung SRIF verwendet [20].

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

SRIF wurde als ein Neuropeptid des Hypothalamus entdeckt. Aufgrund seiner Eigenschaft die Sekretion von *Growth Hormone* (GH oder *Somatropin*) zu inhibieren, wurde es initial als *Somatropin-Release-Inhibiting Factor* (SRIF) benannt.[21, 24] In den meisten Organen des menschlichen Körpers und anderer Säugetiere findet sich SRIF in unterschiedlicher Ausprägung wie z.B. in Hirn, Schilddrüse, Pankreas, Magen, Dünndarm, Speicheldrüsen, Nebennieren und, in einigen Spezies, auch in der Niere. In Abhängigkeit von seiner Lokalisation erfüllt SRIF eine Vielzahl regulatorischer und inhibitorischer Funktionen wie die Inhibition von Hormon Sekretionen, exokrine Sekretion oder auch die Zellproliferation.[25] In der hypophysären Regulation verhält sich SRIF als Neurohormon und ist für die Inhibition der GH Exkretion und die Thyreotropin Regulation verantwortlich. Als Neurotransmitter hingegen moduliert SRIF die Neurotransmission in das zentrale Nervensystem.[24, 25] In sogenannten Pankreas-Inselzellen steuert SRIF die Sekretion von Insulin und Glukagon während es im Gastrointestinaltrakt (GIT) diverse Aufgaben erfüllt: die Inhibition der exokrinen Sekretion in Magen und Dünndarm, Inhibition der Gallenblasen- und Magenmotilität und die Reduktion der Nährstoffabsorption in Magen und Dünndarm (z.B. Kalium, Kohlenhydrate, Aminosäuren und H₂O).[24, 26]

2.2 Struktur und Funktion von Somatostatin Rezeptoren

Während SRIF bereits seit 1973 bekannt ist,[21] wurde der entsprechende Somatostatin Rezeptor (SST) erstmals 1991 von *Meyerhof et al.* beschrieben.[27] In den folgenden Jahren wurden insgesamt fünf Subtypen, namentlich SST₁[28], SST₂[28], SST₃[29], SST₄ [30, 31], und SST₅[30, 32] identifiziert.² Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass SST₂ in zwei aktiven Isoformen vorliegt (SST_{2A} und SST_{2B}) die sich nur in der Länge des zytoplasmischen Restes unterscheiden.[34, 35]

Alle fünf Subtypen stellen klassische G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) dar. Sie sind aus sieben Transmembrandomänen (TMD) aufgebaut und zeigen damit die charakteristische GPCR Architektur. Die Länge der Aminosäuresequenzen liegt zwischen 364 Aminosäuren für SST₅ und 418 Aminosäuren für SST₃. [24]

Alle 5 Subtypen teilen typische Signalpfade, welche durch die Bindung der endogenen Liganden ausgelöst werden. Der Somatostatin-Rezeptor-Komplex wirkt beispielsweise auf die Adenylyl-Zyklase, Calcium-Ionenkanäle, Kalium-Ionenkanäle oder auf Phosphatasen wie Calcineurin, die Serin-Threonin-Phosphatase oder die Tyrosin-Phosphatase und inhibiert auf diese Weise die Ausschüttung von Hormonen, die Zellproliferation oder induziert die Zellapoptose.[36–39]

²In der Literatur findet sich neben der Abkürzung SST₁₋₅ auch SSTR1-5, sstr1-5, SST1-5 oder sst1-5 als gebräuchliche Abkürzungen für die Somatostatin Rezeptoren. In dieser Arbeit wird die nach IUPHAR empfohlene Abkürzung SST₁₋₅ verwendet [33].

2.3 Expression der SST Rezeptoren

Die Expressionsmuster der SST Rezeptoren in gesundem Gewebe wurden detailliert untersucht und beschrieben. In Abhängigkeit von Organ und Gewebe ergeben sich für die SST-Subtypen stark unterschiedliche Expressionsprofile. Im Menschen wurden SSTs im GI-Trakt, Gehirn, Milz, Pankreas, Niere, Prostata, Schilddrüse, Lymphgewebe und allgemein in Gewebestrukturen neuroendokrinen Ursprungs beschrieben.[40]

Bei neuroendokrinen Tumorerkrankungen, aber auch bei einigen anderen benignen und malignen Neoplasien, kann die erhöhte SST-Expression zu einer verminderten Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden Faktoren wie Somatostatin führen. Obgleich, wie oben erwähnt, dass SST Expressionsprofil stark variieren kann, wird eine Überexpression von SST₂ am häufigsten beobachtet. Daher dient dieser Subtyp als primäre Zielstruktur für Diagnostik und Therapie, wobei Liganden, die ebenso hochaffin an SST₄ und SST₅ binden können, bevorzugt werden. [41–45]

In nachstehender Tabelle 1 sind einige Tumorerkrankungen, meist neuroendokrinen Ursprungs, und die jeweils dominant exprimierten SST Rezeptoren aufgelistet. Aus der Tabelle geht SST₂ als häufigster Subtyp, gefolgt von SST₁ und SST₃/SST₅, hervor. Die Expression von SST₄ wurde kaum beobachtet.[45]

Tabelle 1: Übersicht einiger Tumorerkrankungen und entsprechender SST Expression nach *Reubi et al.*[45]

Dominant exprimierte/r SST Rezeptor/en	Tumorerkrankung
SST ₁	Prostatakarzinom, Sarkom,
SST ₂	Neuroblastom, Meningeom, Medulloblastom, Mammakarzinom, Malignes Lymphom, Paragangliom, Kleinzelliges Lungenkarzinom, Nierenzellkarzinom, Hepatom
SST ₃	Inaktives Hypophysenadenom
SST ₂ + SST ₅	Wachstumshormon-produzierendes Adenom der Adenohypophyse
SST ₁ + SST ₂	Gastroenteropankreatischer Tumor, Phäochromozytom

2.4 Ligand Entwicklung

Seit seiner Entdeckung 1973 war SRIF-14 von großem klinischen Interesse, jedoch mit limitierter Anwendung wegen seiner *in vivo* Halbwertszeit von nur 3 bis 4 Minuten.[21] Der Fokus der Forschung lag auf der Entwicklung kleinerer Peptide mit verbesserter *in vivo* Stabilität und erhöhter biologischer Aktivität. Frühe Studien zeigten, dass die *N*-terminalen Aminosäuren L-Ala¹ und L-Gly² für die biologische Aktivität von untergeordneter Bedeutung sind und im Zuge der Peptidverkleinerung eliminiert werden können (**Abbildung 3**; gelbe Sphären). Als pharmakophore Einheit wurde schon früh

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

die Sequenz L-Phe⁷-L-Trp⁸-L-Lys⁹-L-Thr¹⁰ in Betracht gezogen.[46, 47] *Veber et al.* erbrachten in intensiven Struktur-Aktivitäts-Studien den entsprechenden Beweis, beispielsweise durch die Synthese und Bewertung der biologischen Aktivität von Peptiden wie *Aha-cyclo*(L-Cys-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys) (**Abbildung 3**; die pharmakophore Einheit wird durch orange und rote Sphären dargestellt). [48]

Neben der essentiellen pharmakophoren Einheit, erweist sich auch die durch L-Cys³ und L-Cys¹⁴ gebildete Disulfidbrücke als grundlegend für die Funktionalität von SRIF-14 (**Abbildung 3**; dargestellt als grüne Sphären). Zwei Aspekte sind hier von besonderer Wichtigkeit: einerseits ist die Disulfidbrücke verantwortlich für eine verzögerte *in vivo* Metabolisierung, insbesondere in peptidischen SRIF-14 Analoga von geringerer Ringgröße. Andererseits übt sie essentiellen konformationellen Zwang auf die pharmakophore Einheit aus. Gemeinsam mit dem pi-pi-Stacking zwischen L-Phe⁶ und L-Phe¹¹ (**Abbildung 3**; dargestellt als blaue Sphären), stabilisiert sie die Konformation der L-Phe⁷-L-Trp⁸-L-Lys⁹-L-Thr¹⁰ Sequenz. Die Disulfidbrücke ist daher wesentlich für die biologische Aktivität von SRIF-14 und seinen Analoga.[48, 49]

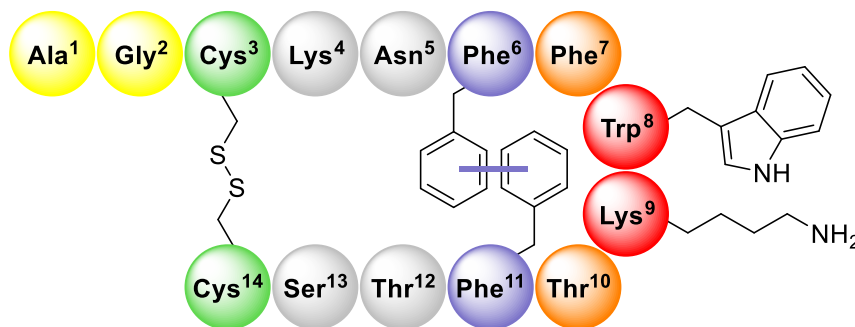


Abbildung 3: Sequenz von SRIF-14. Gelb und grau: nicht für die biologische Aktivität erforderlich; grün und blau: Stabilisation der Konformation der pharmakophoren Einheit; orange und rot: pharmakophore Einheit.[24]

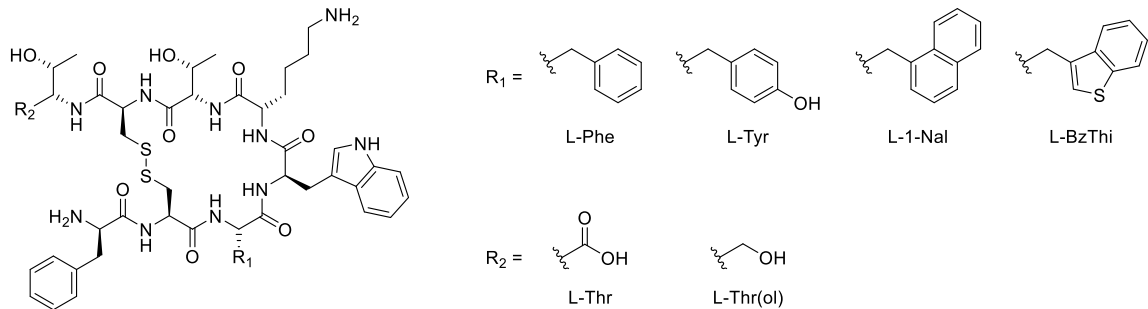
Elimination der Aminosäuren 1 bis 5 sowie 12 bis 14 und Positionierung der Disulfidbrücke von Position 3-14 nach Position 6-11 bei gleichzeitiger Elimination von L-Phe⁶ und L-Phe¹¹ konserviert den konformationellen Zwang auf die pharmakophore Einheit, wodurch die bitykliche Grundstruktur des SRIF-14 (Disulfidbrücke *und* hydrophobe Bindung) obsolet wird.[49]

Der Einsatz von D-Trp statt L-Trp in der pharmakophoren Sequenz von SRIF-14 resultiert in einer 6-8-fach erhöhten Potenz in der Inhibition von GH, Glukagon und Insulin.[50] Eine diesbezügliche, ausführliche NMR-basierte Studie offenbarte, dass innerhalb des Bindemotivs L-Phe⁷-L-Trp⁸-L-Lys⁹-L-Thr¹⁰, insbesondere das L-Trp⁸-L-Lys⁹ Motiv von SRIF-14 für die biologische Aktivität verantwortlich ist. Während L-Trp⁸-L-Lys⁹ in SRIF-14 als *beta-turn-type-I* vorliegt, lässt sich das D-Trp⁸-L-Lys⁹ Analogon als *beta-turn-type-II'* kategorisieren. Dies erweist sich als vorteilhaft, da die biologische Aktivität vordergründig durch die räumliche Nähe der Trp⁸-Lys⁹ Seitenketten bestimmt wird. Der *type-II'-beta-turn* garantiert eine verbesserte räumliche Nähe der Aminosäurerseitenketten im Vergleich zur endogenen Variante und erhöht damit die biologische Aktivität signifikant.[51]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Bei der strukturellen Gestaltung der Liganden bleibt daher die pharmakophore Einheit aus L-Phe⁷-D-Trp⁸-Lys⁹-L-Thr¹⁰ erhalten, wobei der Austausch dieser vier Aminosäuren durch chemisch verwandte Aminosäuren möglich ist. Der konformationelle Zwang wird entweder durch eine Amid-Brücke oder durch eine Disulfidbrücke zweier Cysteine (Positionen 5 und 12 in SRIF-14) ausgeübt.[52] Das erste klinisch angewandte Derivat Octreotid (H-D-Phe-*cyclo*(L-Cys-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr(ol)) verfügt zusätzlich über ein C-terminales L-Thr(ol) und ein N-terminales D-Phe (Abbildung 4). Beides soll das Peptid vor metabolischem Abbau schützen.[53]

Agonisten:



Agonist	R ₁	R ₂
Octreotid	L-Phe	L-Thr(ol)
TOC	L-Tyr	L-Thr(ol)
TATE	L-Tyr	L-Thr

Agonist	R ₁	R ₂
NOC	L-1-Nal	L-Thr(ol)
NOC-ATE	L-1-Nal	L-Thr
BOC	L-BzThi	L-Thr(ol)
BOC-ATE	L-BzThi	L-Thr

Antagonisten:

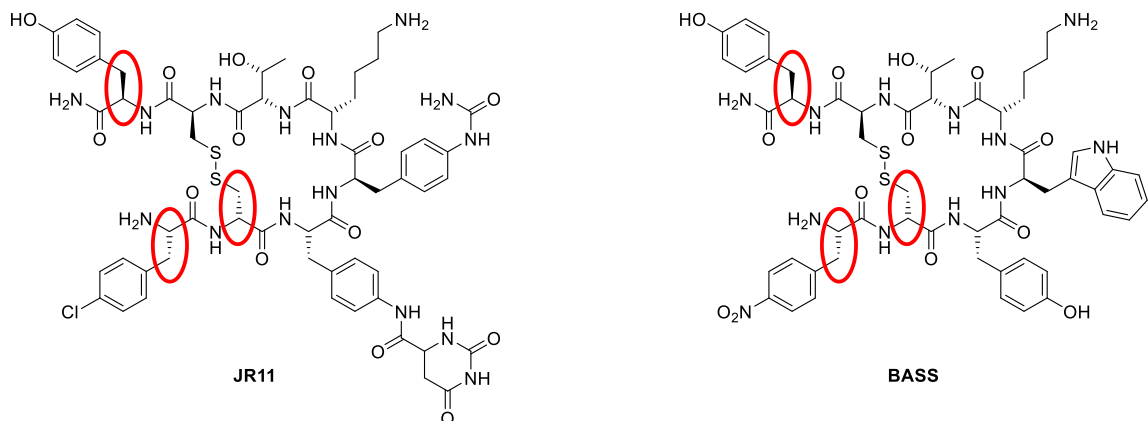


Abbildung 4: Chemische Strukturen einer Auswahl von agonistischen (Bild oben und Tabelle mitte) und antagonistischen (Bild unten) SST Bindemotiven. Agonisten: die jeweiligen Strukturen von Octreotid,[53] TOC,[54] TATE,[54] NOC,[55] NOC-ATE,[55] BOC[55] und BOC-ATE[55] sind der Tabelle zu entnehmen. Antagonisten: die rot markierten Stereozentren sind relativ zu den Agonisten invertiert.[56]

Die octapeptidische Struktur blieb ein beliebtes Grundmotiv bei der Ligandentwicklung. Der Austausch von L-Phe³ durch L-Tyr³ in Octreotid, liefert *L-Tyr*³-Octreotid (TOC; H-D-Phe-*cyclo*(L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr(ol)) mit einer erhöhten Affinität und Spezifität zu SST₂. Eine zusätzliche

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Affinitätssteigerung konnte durch die Verwendung von L-Thr⁸ erreicht werden. Zuvor war zum Schutz vor *in vivo* Degradation die zum Alkohol reduzierte Form L-Thr(ol)⁸ eingesetzt wrden. Das resultierende TATE (H-D-Phe-*cyclo*(L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr-OH), zeigt außerdem eine erhöhte Internalisierungsrate im Vergleich mit TOC.[54, 57]

Wird an Position 3 in Octreotid das Phe durch Aminosäuren wie L-1-Naphthyl-Alanin (L-1-Nal) oder L-Benzothienyl-Alanin (L-BzThi) ersetzt, ergeben sich daraus die pan-affinen Bindemotive NOC (H-D-Phe-*cyclo*(L-Cys-L-1-Nal-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr(ol)) und BOC (H-D-Phe-*cyclo*(L-Cys-L-BzThi-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr(ol)), die zusätzlich eine hohe Affinität zu SST₃ und SST₅ aufweisen.[55, 58] Die Einführung derselben Aminosäuren in TATE, liefert wiederum NOC-ATE (H-D-Phe-*cyclo*(L-Cys-L-1-Nal-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr-OH) und BOC-ATE (H-D-Phe-*cyclo*(L-Cys-L-BzThi-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr-OH).[55, 59]

All diese Liganden sind Agonisten, sind also zur Zellinternalisierung befähigt. Galt früher die allgemeine Annahme in der Radiopharmazie, dass die Internalisierung für eine adäquate Anreicherung im Tumor unabdingbar ist, so hat sich inzwischen gezeigt, dass auch Antagonisten von Interesse sein können. Diese werden zwar nicht internalisiert, jedoch sind sie in der Lage, auch an inaktiven Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu binden, wodurch Ihnen eine bedeutend größere Zahl an Zielstrukturen zur Verfügung stehen.[60, 61] Durch die gezielte Strukturveränderung der octapeptidischen Agonisten lassen sich strukturell verwandte Antagonisten entwickeln. Zu diesen Veränderungen gehört die Inversion des Stereozentrums an Positionen 1, 2 und 8, die optionale Einführung von Amid-reichen Bausteinen an den Positionen 3 und 4 und die Variation der C-terminalen Aminosäure hin zu aromatischen Varianten mit amidiertem C-Terminus.[60, 62, 63] Antagonisten wie BASS (H-L-Phe(4-NO₂)-*cyclo*(D-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-D-Tyr-NH₂) und JR11 (H-L-Phe(4-Cl)-*cyclo*(D-Cys-L-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-D-Tyr-NH₂) zeigen hohe Affinitäten und können ebenso wie Octreotid, TOC, TATE und andere Agonisten *N*-terminal mit einem Chelator verknüpft und in der Radiopharmazie zum Einsatz kommen.[56]

3. Somatostatin in der Nuklearmedizin – A Brief History

Auf die Entwicklung metabolisch stabilerer SST-Bindemotive folgten schnell radiomarkierte Analoga für die Nuklearmedizin. Das erste Radiopharmakon, [¹²³I]I-TOC, wurde für die Szintigraphie eingesetzt (Abbildung 5).[64] Allerdings ist ¹²³I in der für die *in vivo* Anwendung benötigten molaren Aktivität (A_m) kaum verfügbar und kostenintensiv, die Patientenanwendung hängt damit stark von Lieferzeiten und Verfügbarkeiten ab. Zudem zeigt [¹²³I]I-TOC eine hepatobiliäre Ausscheidung, wodurch die Szintigraphie im Bereich des Abdomens erschwert wird.[65] Um einige dieser Probleme zu umgehen wurde ¹²³I durch ¹¹¹In ersetzt, indem Octreotid mit dem Chelator DTPA verknüpft wurde. Das resultierende *Octreoscan* ([¹¹¹In]In-DTPA-Octreotid), war das erste kommerziell erhältliche Derivat

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

und wurde zunächst für die Szintigraphie und später für erste therapeutische Ansätze verwendet (Abbildung 5).[65–67]

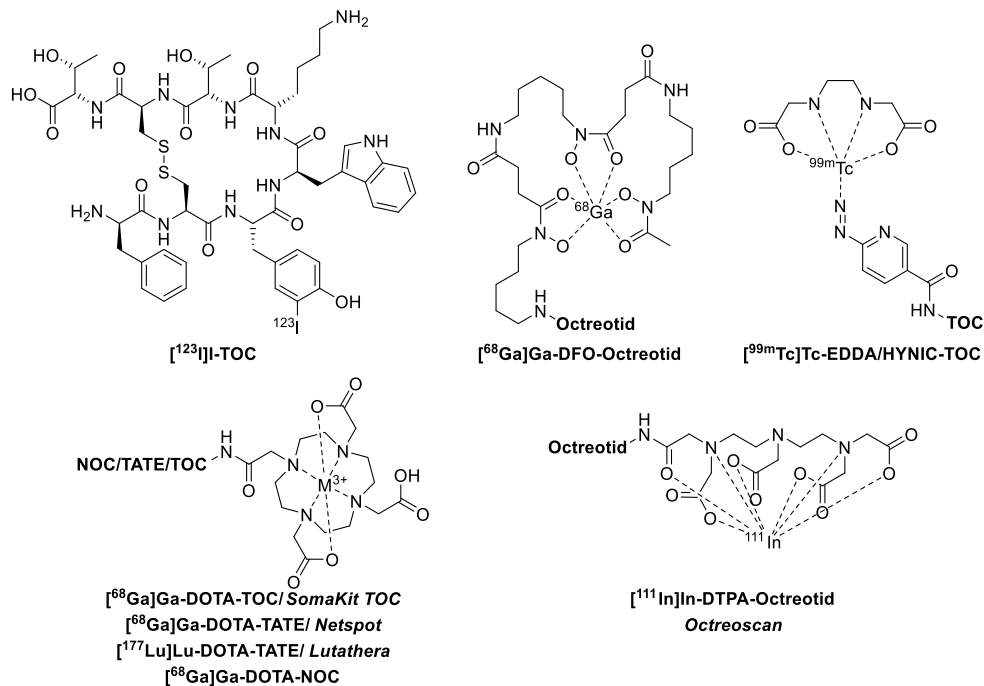


Abbildung 5: Strukturen einiger klinisch angewandter Radiopharmazeutika für Diagnostik und Therapie. Die Strukturen der Bindemotive Octreotid, TOC, TATE und NOC sind dem Kapitel 2.4 *Ligand Entwicklung* zu entnehmen.

Die simple Kombination aus Bindemotiv und *N*-terminal verknüpftem Chelator blieb ein bevorzugtes Konzept bei der Entwicklung weiterer Radiopharmazeutika. So wurde mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DFO-Octreotid}$ ein erster potentieller Ligand für Positronen-Emissions-Tomographie (PET) vorgestellt (Abbildung 5), der aufgrund seiner hohen Lipophilie nie eingesetzt wurde.[68] Mit der Entwicklung des breit einsetzbaren Chelators DOTA entstand auch DOTA-TOC, welches zunächst mit ^{90}Y und ^{111}In therapeutische Anwendung fand.[69, 70] Die ^{68}Ga -Variante wurde später unter dem Namen *SomaKit TOC*, in Europa und den USA für die PET-Diagnostik zugelassen (Abbildung 5).[71, 72]

Die Erschließung neuer Bindemotive, wie das zu SST_2 hoch affine TATE oder die pan-affinen Varianten NOC und BOC, erweiterten auch das nuklearmedizinische Portfolio. Dabei finden in der PET-Bildgebung vor allem $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TOC}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-NOC}$ Anwendung.[73] Ersteres erhielt inzwischen unter dem Namen *Netspot* eine Zulassung in den USA, während sein therapeutisches Gegenstück, $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$ (*Lutathera*), in der EU genehmigt wurde (Abbildung 5).[74, 75]

Auch wenn der Hauptfokus der Entwicklungsarbeit zunächst auf therapeutischen oder PET-Derivaten lag, wurde auch an der Optimierung von SPECT Tracern (neben ^{111}In -Octreoscan) geforscht. Hier finden inzwischen auch Derivate wie $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-EDDA/HYNIC-TOC}$ klinische Anwendung.[76]

Potentielle Derivate für die PET-Diagnostik mittels ^{18}F wurden bereits in den 1990er Jahren publiziert, wurden aber aufgrund der meist komplexen Syntheserouten im Vergleich zu ^{68}Ga zunächst nicht

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

weiterverfolgt.[77] Durch die zunehmende Problematik der erschwerten Zugänglichkeit und Verteuerung von ^{68}Ga -Generatoren hat sich der Bedarf an ^{18}F -basierten Alternativen deutlich erhöht.[78] Gleichzeitig stehen modernere und weniger komplexe Möglichkeiten zur ^{18}F -Markierung zur Verfügung (4.3 Moderne Fluorierungsmethoden – Ein Überblick). Erste vielversprechende klinische Daten wurden beispielsweise für $[^{18}\text{F}]\text{AIF-NOTA-Octreotid}$ und $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ publiziert, die aber weiterhin Spielraum für optimierte Alternativen lassen.[79, 80]

4. ^{18}F in der Nuklearmedizin

4.1 Warum $[^{18}\text{F}]\text{Fluor}$?

Für die molekulare Bildgebung mittels PET stehen eine Vielzahl an Nukliden zur Auswahl, die entweder über einen Generator oder durch Produktion am Zyklotron verfügbar sind. Eine Auflistung einiger Nuklide und ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften findet sich in Tabelle 2. Welcher Positronen-Emitter für ein neu zu entwickelndes Radiopharmakon gewählt werden sollte, hängt von verschiedenen Faktoren ab:[81, 82]

- Halbwertszeit (HWZ): diese muss einerseits zur *in vivo* Halbwertszeit des zu markierenden Liganden passen und andererseits die Radiomarkierung des Liganden mit hinreichend hoher molarer Aktivität erlauben.
- Molare Aktivität: die A_m des Nuklids nimmt direkt Einfluss auf die A_m des final zu applizierenden Radiopharmakons. Eine zu niedrige A_m kann eine adäquate Bildgebung durch die (teilweise) Absättigung der Zielstruktur negativ beeinflussen.
- Positronenenergie $E\beta^+_{max} / E\beta^+_{mean}$: die Positronenenergie bestimmt die Reichweite der Positronen im Gewebe. Eine bessere räumliche Auflösung kann mit Positronen von niedriger Energie und damit geringerer Reichweite erreicht werden.
- Markierungschemie: idealerweise sollte eine Markierungsmethode zur Verfügung stehen, die eine schnelle Markierung mit hoher A_m erlaubt und in die klinische Routine übertragen werden kann.
- Verfügbarkeit: je nach Nuklid kann dieses beispielsweise über einen Generator (z.B. ^{68}Ga , ^{44}Sc) gewonnen oder in einem Zyklotron produziert werden (z.B. ^{18}F , ^{152}Tb). Die Verfügbarkeit hängt daher je nach Nuklid von dem Zugang zu einem Zyklotron und/oder von dem Vorhandensein eines entsprechenden Distributionsnetzwerks ab. Im Falle von Generatoren ist dessen Verwendung zwar komfortabel, doch auch hier muss die Verfügbarkeit des Generators beziehungsweise des enthaltenen Mutternuklids gewährleistet sein.

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Tabelle 2: Liste gängiger Isotope für die Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie. Die Liste bietet nur einen grundlegenden Überblick und stellt nicht die Gesamtheit aller zur Verfügung stehenden β^+ -Emitter dar. Die physikalisch-chemischen Daten wurden unter anderem der *Table of Radionuclides* des *Bureau International des Poids et Mesures* entnommen.[82–87]

Nuklid	Halbwertszeit $T_{1/2}$	Anteil β^+ in %	$(E\beta^+_{max} \text{ [keV]})$	$(E\beta^+_{mean} \text{ [keV]})$	Vorteile	Nachteile
^{11}C	20.4 min	99.8	961	386	hoher Anteil β^+ -Zerfall moderate Positronenenergie	kurze HWZ
^{13}N	9.98 min	99.8	1199	492	hoher Anteil β^+ -Zerfall moderate Positronenenergie	kurze HWZ
^{15}O	2.04 min	99.9	1735	735	hoher Anteil β^+ -Zerfall	kurze HWZ hohe Positronenenergie
^{18}F	109.7 min	96.9	634	250	hoher Anteil β^+ -Zerfall geeignete Halbwertszeit niedrige Positronenenergie	synthetische Zugänglichkeit des Radiopharmakons
^{64}Cu	12.7 h	17.9	653	278	niedrige Positronenenergie	lange HWZ geringer Anteil β^+ -Zerfall 39.0% β^- (579 keV)
^{68}Ga	67.8 min	87.7	1899	836	Produktion per Generator	hohe Positronenenergie
^{89}Zr	3.27 d	22.8	902	396	moderate Positronenenergie	lange HWZ geringer Anteil β^+ -Zerfall
^{44}Sc	3.97 h	94.3	1474	632	Produktion per Generator	Hohe Positronenenergie
^{152}Tb	17.5 h	20	-	1140	-	Komplizierte Zyklotronproduktion
^{124}I	4.2 d	10.7, 11.7	2138, 1535	975, 687	-	lange HWZ geringer Anteil β^+ -Zerfall hohe Positronenenergie γ -Strahlung (602, 722, 1691 keV)

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Die PET-Nuklide ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O sind durch die kurze HWZ nicht zur Markierung mit SST-Analoga geeignet, da sie nicht mit deren Pharmakokinetiken kompatibel sind. Für SST-Analoga sind auch Nuklide mit langer HWZ (^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{124}I), hoher Positronenenergie (^{68}Ga , ^{124}I , ^{15}O) und einer geringen Positronen Ausbeute (^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{124}I) weniger attraktiv. Nuklide wie ^{64}Cu oder ^{124}I weisen neben dem gewünschten β^+ -Zerfall auch andere Zerfallsarten auf, welche die Strahlungs-dosis für den Patienten erhöhen.[81, 88]

Im Gegensatz dazu weist ^{18}F eine geeignete HWZ von 109.7 min und eine niedrige Positronenenergie von 634 keV auf und lässt sich im Zyklotron mit einer hohen A_m herstellen. Es wurde gezeigt, dass ^{18}F durch seine niedrigere Positronenenergie eine bessere Auflösung in der Bildgebung liefert als dies mit ^{68}Ga möglich ist.[89] Dennoch finden sich in der klinischen Routine der molekularen Bildgebung vor allem ^{68}Ga basierte PET-Diagnostika. Als einer der Gründe wird in der Literatur häufig der Umstand angegeben, dass ^{68}Ga bequem durch einen Generator gewonnen werden kann.[90] Allerdings existiert vielerorts ein umfangreiches Distributionssystem für ^{18}F und auch die Kosten für einen ^{68}Ga -Generator sind im Allgemeinen sehr viel höher als die Produktion von [^{18}F]Fluor. Ein ^{68}Ga -Generator stellt bei täglicher Elution etwa 1.8 GBq zur Verfügung, während ein Zyklotron von niedriger Energie (18 MeV) bereits zwischen 370 und 740 GBq ^{18}F produzieren kann.[78]

Die Bevorzugung von ^{68}Ga gegenüber ^{18}F ist vor allem auf die unterschiedlichen Markierungsmethoden zurückzuführen, da ^{68}Ga in einfachen Komplexbildungsreaktionen eingeführt werden kann und das markierte Radiopharmakon aufgrund der milden Markierungsbedingungen bestenfalls einer Kartuschenreinigung bedarf. Im Gegensatz dazu beruhen viele Methoden zur ^{18}F -Markierung auf vorab zu markierenden prosthetischen Gruppen, gefolgt von einer zeitaufwendigen Aufreinigung mittels RP-HPLC. Diese eher komplexen Synthesewege erwiesen sich insbesondere im Zusammenhang mit Peptiden, wie z.B. Somatostatinderivaten, als unattraktiv und sind für die klinische Routine kaum umsetzbar.[78, 88]

Nichts desto trotz weist ^{18}F überlegene physikalisch-chemische Eigenschaften auf (HWZ, Positronenenergie, Produktionsmenge) Durch intensive Forschung stehen inzwischen neuere und modernere Markierungsmethoden zur Verfügung, welche die effiziente Markierung mittels ^{18}F erlauben.

4.2 Produktion und Verwendung von [^{18}F]Fluor

[^{18}F]Fluor kann vielseitig sowohl über nukleophile als auch elektrophile Reaktionsmechanismen in ein Molekül eingebaut werden. Dabei stehen direkte Substitutionsreaktionen oder indirekte Methoden zur Verfügung, beispielsweise über prosthetische Gruppen. Hierfür müssen auf entsprechend unterschiedlichen Wegen in einem Zyklotron passende Markierungsspezies produziert werden (siehe Tabelle 3).[91, 92]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Für elektrophile Radiomarkierungen wird $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ benötigt. Die zwei relevantesten Produktionsrouten (Tabelle 3, Eintrag 1 und 4) werden mit ^{20}Ne oder $^{18}\text{O}_2$ Gas-Targets durchgeführt und liefern geringe molare Aktivitäten zwischen ~ 0.1 und $0.6 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$. Da die Bildung von molekularem ^{18}F - ^{18}F aufgrund der geringen absoluten Teilchenmengen an ^{18}F -Fluor und der damit verbundenen geringen statistischen Wahrscheinlichkeit im Target nicht stattfindet, würde elementares ^{18}F -Fluor ohne Zusatz von $^{19}\text{F}_2$ an der Targetwand adsorbiert. Da hierdurch die A_m signifikant gesenkt wird, werden elektrophile Reaktionsmechanismen nur für Tracer verwendet, die über schwer sättigbare, enzymatische Vorgänge angereichert werden können. Im Falle der nukleophilen Reaktionswege wird ^{18}F als Fluorid eingesetzt. Die wichtigsten Produktionswege erfolgen mit hochangereichertem $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ (Tabelle 3, Eintrag 2) oder mit $[^{16}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ (Tabelle 3, Eintrag 3). Letztere Reaktion ist aufgrund der kostenintensiven ^3He Bestrahlung und den vergleichsweise geringen Ausbeuten von untergeordneter Bedeutung. Die Produktion mittels eines $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ Targets wird aufgrund der A_m ($\sim 600 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$) und der hohen Ausbeuten, auch bei geringer Bestrahlungsdauer (1 h), allgemein bevorzugt, weshalb nukleophile Reaktionsmechanismen heute die Produktion von ^{18}F -markierten Radiopharmaka dominieren.[91, 93]

Tabelle 3: Mögliche Produktionswege zur Gewinnung von $[^{18}\text{F}]$. Die Tabelle gibt nur einen Überblick, für einen vollständigen Überblick, siehe *Guillaume et al.*[91, 92, 94]

	Reaktion	Target	Produkt	A_m [GBq/μmol]
1	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$[^{18}\text{O}]\text{O}_2$ (F_2 geträgert)	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ (Gas)	0.35-2.00
2	$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$	$[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (aq)	~ 600
3	$^{16}\text{O}(^3\text{He},\text{p})^{18}\text{F}$	$[^{16}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$	$[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ (aq)	~ 50
4	$^{20}\text{Ne}(\text{d},\alpha)^{18}\text{F}$	Ne (F_2 geträgert)	$[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ (Gas)	0.04-0.40

Meist wird dabei die Bildung von C-F Bindungen angestrebt, da Fluor als Bioisoster sowohl für Wasserstoff (Größe und Valenzelektronen) als auch Sauerstoff (Größe und Elektronegativität) eingesetzt werden kann.[95] Für Small-Molecules werden häufig direkte Markierungsmethoden wie aliphatische oder aromatische, nukleophile Substitutionen angewandt (z.B. $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, $[^{18}\text{F}]\text{FET}$). Für Biomoleküle erweisen sich diese Methoden jedoch häufig als nicht anwendbar, beispielsweise aufgrund zu hoher Temperaturen, des pH-Werts oder durch eine ungeeignete Lösungsumgebung.[93, 95] Als Alternative existiert ein breites Spektrum an prosthetischen Gruppen, die vorab radiomarkiert und im Anschluss durch Alkylierung, Acylierung, Amidierung, Click-Chemie, Oxim-Ligation oder andere Methoden an das Biomolekül verankert werden. Die prosthetische Gruppe muss nach der Markierung mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ jedoch isoliert und gereinigt werden. Auch auf die Reaktion mit dem Biomolekül folgt meist ein weiterer, zeitaufwändiger Aufreinigungsschritt per RP-HPLC, um Nebenprodukte oder Reaktanden zu entfernen.[88, 95]

Die gegebenen Methoden erfüllen oftmals nicht die Ansprüche, die an eine ^{18}F -Markierung im klinischen, automatisierten Routinebetrieb unter GMP Bedingungen gestellt werden. Die Reaktion sollte aufgrund der HWZ möglichst schnell verlaufen (innerhalb von Minuten) und unter milden

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Reaktionsbedingungen erfolgen um das Biomolekül nicht zu schädigen (z.B. Temperaturen $<100\text{ }^{\circ}\text{C}$, milder pH-Bereich). Hinsichtlich der Übertragbarkeit in die klinische Routine, sind außerdem wenige Reaktionsschritte und eine schnelle Reinigung erforderlich.[88, 93, 95]

4.3 Moderne Fluorierungsmethoden – Ein Überblick

Um diese Probleme zu umgehen, wurde in den letzten Jahren das Spektrum potentieller Markierungsreaktionen durch Übertragung moderner Verfahren der organischen Chemie erheblich erweitert. Im Folgenden soll jedoch nur auf das Methodenspektrum eingegangen werden, welches im Kontext dieser Arbeit gegenwärtig diskutiert wird.[94] So konnten in den letzten Jahrzehnten signifikante Fortschritte in der Chemie der Si- ^{18}F , B- ^{18}F oder auch Al- ^{18}F Verbindungen erzielt werden.[95] In Abbildung 6 wird ein Überblick über die relevantesten Methoden und den zugrundeliegenden Bausteinen gegeben.

Silizium-Fluor-Akzeptoren (SiFA) können sowohl über nukleophile Substitution (Abbildung 6, Eintrag A) als auch über einen Isotopenaustausch (Abbildung 6, Eintrag B) mit ^{18}F Fluorid radiomarkiert werden. Die Effizienz der Substitutionsreaktion von Alkoxysilanen oder Silanolen (Abbildung 6, Eintrag A) hängt von der gewählten Abgangsgruppe und den Reaktionsbedingungen ab. Dennoch lässt sich verallgemeinernd sagen, dass zufriedenstellende Umsätze (Radiochemical Conversion (RCC) $> 80\%$) vor allem bei Temperaturen über $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei niedrigen pH-Werten erreicht werden. Des Weiteren besteht die Problematik der chemischen Reinheit, da die Reaktion mit trägerfreiem ^{18}F Fluorid erfolgt. Der Vorläufer wird daher nicht vollständig umgesetzt, wodurch eine Aufreinigung mittels RP-HPLC erforderlich ist, um das radiomarkierte Produkt abzutrennen.[96, 97]

Ebenso wie die SiFA-Bausteine, lassen sich auch Trifluorborate (Abbildung 6, Eintrag C) schnell aus aromatischen Borsäureestern in einer Substitutionsreaktion herstellen.[98] Im Unterschied zur SiFA Substitution kann die Radiosynthese auch in wässriger Umgebung erfolgen, wodurch beispielsweise auf eine azeotrope Trocknung verzichtet werden kann. Doch auch bei diesem Verfahren steigt der Umsatz vor allem bei erhöhten Temperaturen und niedrigem pH-Wert. Als Konsequenz wird bei dieser Methode auf das Konzept der Markierung einer prosthetischen Gruppe und anschließender Konjugation an das Peptid zurückgegriffen (ein sogenanntes „preconjugate labeling“), wobei auf eine RP-HPLC Aufreinigung meist nicht verzichtet werden kann. Zusätzlich wird für die Bildung des Trifluorborats, mit ^{19}F Fluorid geträgertes ^{18}F Fluorid benötigt, wodurch die molare Aktivität des Produkts gesenkt wird.[99–101]

Sowohl für B-F als auch Si-F Bindungen hat sich der Isotopenaustausch als bevorzugter Reaktionsweg durchgesetzt (Abbildung 6, Einträge B und D). Die Reaktionsbedingungen sind grundsätzlich milder, da die Radiosynthese bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann. Der pH-Wert liegt bei den Trifluorboraten zwischen 1.5 und 2.5, während der SiFA Isotopenaustausch sogar zwischen $\text{pH} = 5.0$ –

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

7.0 erfolgt. Sofern weder die Bildung von Nebenprodukten noch Zersetzung beobachtet wird, kann auf eine RP-HPLC Aufreinigung verzichtet werden, da Vorläufermolekül und die radioaktive Spezies chemisch identisch sind. Stattdessen wird zur Abtrennung von freiem [^{18}F]Fluorid und organischen Lösemitteln eine Festphasenextraktion durchgeführt. Die Synthesen verlaufen mild, schnell und sind bereits mit geringen Vorläufermengen (<25 nmol) durchführbar. Daher können hohe radiochemische Ausbeuten und molare Aktivitäten von 40 – 111 GBq/ μmol für Trifluorborate und 30 – 63 GBq/ μmol für SiFAs erreicht werden.[102–105]

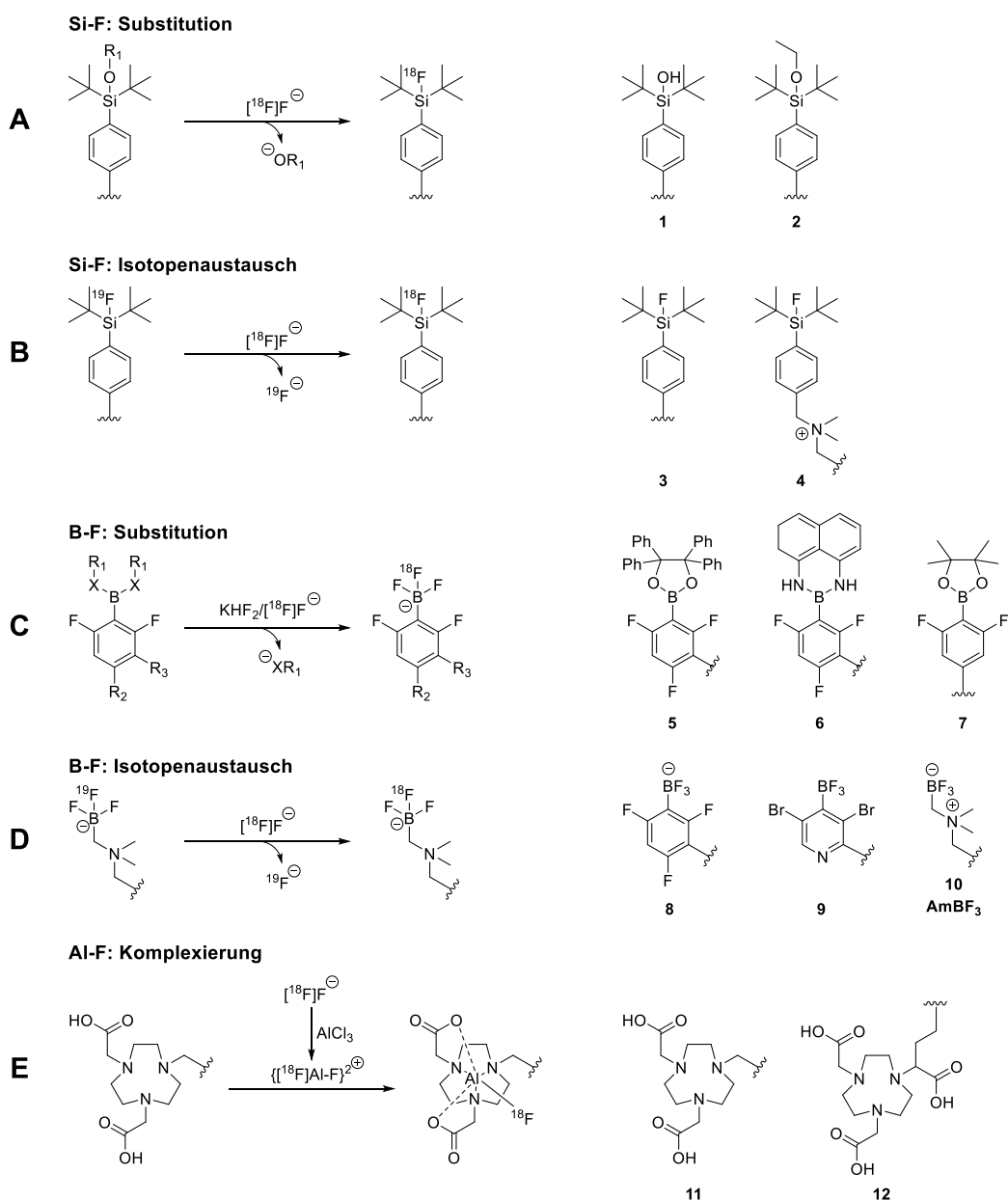


Abbildung 6: Übersicht über die Radiosynthesen mittels [^{18}F]Fluorid (links in der Abbildung) und eine Auswahl an entsprechenden prosthetischen Gruppen (rechts in der Abbildung, Moleküle **1** – **13**) die zur Erzeugung von Si-F, B-F oder Al-F Bindungen eingesetzt werden können. **A** [^{18}F]Si-F durch nukleophile Substitution an Alkoxysilanen; Beispiele **1** und **2**. **B** [^{18}F]Si-F durch Isotopenaustausch; Beispiele **3** und **4**. **C** [^{18}F]B-F durch nukleophile Substitution an Borsäureestern; Beispiele **5** – **7**. **D** [^{18}F]B-F durch Isotopenaustausch an Trifluorboraten; Beispiele **8** – **10**. **E** [^{18}F]Al-F durch Bildung von [^{18}F]Al-F $^{2+}$ und anschließender Komplexierung mittels geeignetem Chelator; Beispiele für mögliche Chelatoren **11** – **12**. Abbildung adaptiert von *Bernard-Gauthier et al.* und *Kumar et al.* [105, 106]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Die Verwendung von Aluminium gebundenem Fluor mit anschließender Komplexierung mittels des NOTA Chelators wurde erstmalig 2009 beschrieben und beruht auf der starken Koordination von Fluorid Ionen an Al^{3+} ($>670 \text{ kJ/mol}$; Abbildung 6, Eintrag E).[107] Dabei wird vor der Komplexierung, aus AlCl_3 und ^{18}F Fluorid in Target-Wasser (^{18}O] H_2O), der ^{18}F] AlF_2^+ Komplex gebildet. Anschließend wird dieser mit dem Chelator tragenden Peptid vereint und bei hohen Temperaturen ($90 - 110 \text{ }^\circ\text{C}$) komplexiert. Bei dieser Methode kann das ^{18}F Fluorid in wässrigem Milieu eingesetzt werden, ohne vorherige Überführung in eine rein organische Lösungsumgebung und auch eine RP-HPLC Aufreinigung ist nicht erforderlich. Der pH-Bereich liegt zwischen 4 und 5. Potentiell problematisch sind bei dieser Methode die hohen Temperaturen, die sich negativ auf die Stabilität der Peptide auswirken können. Allerdings wird die Radiomarkierung mit beispielsweise ^{177}Lu unter ähnlichen Bedingungen erfolgreich durchgeführt. Hohe Temperaturen sind daher nicht zwingend ein limitierender Faktor.[108, 109]

In dieser Arbeit steht die Anwendung von SiFA-Bausteinen und die Radiomarkierung mittels Isotopenaustausch und ^{18}F Fluorid im Vordergrund, daher wird diese Methodik in den nachfolgenden Kapiteln näher beleuchtet.

4.4 Silizium-Fluor-Akzeptoren (SiFA)

4.4.1 SiFA Entwicklung

Die starke Affinität von Fluor zu Silizium wird durch die hohe Bindungsenergie der Si-F Bindung von $576.4 \pm 17 \text{ kJ/mol}$ deutlich. Diese ist höher als die C-F Bindung mit nur $513.8 \pm 10 \text{ kJ/mol}$.[110] Gleichzeitig liegt die Bindung durch die hohe Elektronegativität des Fluors (4.1 nach Allred-Rochow), verglichen mit Silizium (1.7 nach Allred-Rochow), stark polarisiert liegt vor und ist eher ionisch als kovalent zu betrachten.[111] Dieser Umstand sorgt für die kinetische Instabilität der Si-F Bindung gegenüber anderen Silophilen, wodurch einfache Fluoralkylsilane in wässriger Umgebung schnell hydrolysiert werden.[112, 113] Diese Instabilität erlaubt aber auch die nukleophile Substitution am Siliziumatom durch ^{18}F Fluorid.[113] Zusätzlich sorgt der größere Atomradius des Siliziums dafür, dass die zur Fluorierung eingesetzten SiFA-Bausteine effizienter in einer nukleophilen Substitution reagieren, als dies mit analogen Kohlenstoffbausteinen der Fall ist.[113, 114]

Eine frühe Erwähnung einer ^{18}F Si-F Verbindung findet sich in einer Publikation von 1958, in der SiF_4 mit ^{18}F -Metallfluoriden umgesetzt wurde.[115] Später wurden Fluoralkylsilane hinsichtlich ihrer Eigenschaft zum $^{19}\text{F} - ^{18}\text{F}$ Isotopenaustausch näher untersucht.[116, 117] ^{18}F Fluortrimethylsilan (^{18}F FTMS) wurde, als erste ^{18}F F-Si-Verbindung, in einer Studie an Ratten *in vivo* untersucht. Dieses einfache Fluoralkylsilan erwies sich jedoch aufgrund der stark polarisierten Si-F Bindung als hydrolytisch instabil und führte zu einer hohen Anreicherung von ^{18}F Fluorid in den Knochen. Schon

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

damals postulierten *Rostenthal et al.*, dass die sterische Abschirmung des Siliziumatoms durch geeignete Substituenten, zu einer Senkung der Hydrolyserate führen könnte.[112]

Für die Radiopharmazie besaß der Isotopenaustausch an der Si-F Bindung zunächst keine größere Bedeutung. Wohingegen der $^{19}\text{F} - ^{18}\text{F}$ Isotopenaustausch an Kohlenstoff-Fluor Bindungen, beispielsweise anhand der Herstellung von $[^{18}\text{F}]\text{Haloperidol}$ und $[^{18}\text{F}]\text{Spiroperidol}$, näher untersucht wurde. Neben den harschen Reaktionsbedingungen, wie hohen Temperaturen und langen Reaktionszeiten, waren es vor allem die schlechten Ausbeuten und niedrigen molaren Aktivitäten, die diese Methodik unattraktiv machten. Je nach Publikation finden sich maximale molare Aktivitäten von $\sim 37\text{--}240 \text{ MBq}/\mu\text{mol}$, die eine *in vivo* Anwendung kaum ermöglichen.[118–120] Diese Problematiken dürften für die weitläufige Annahme verantwortlich sein, dass der Isotopenaustausch kein probates Mittel zur ^{18}F -Markierung darstellt.[121]

Erst durch die Arbeiten von *Schirmacher et al.* gewannen $[^{18}\text{F}]\text{Si-F}$ Verbindungen, hergestellt über den $^{18}\text{F}\text{-}^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch an Bedeutung. In diesem Kontext wurden nach detaillierten Vorarbeiten die drei SiFA-Bausteine $[^{18}\text{F}]\text{Ph}_3\text{SiF}$, $[^{18}\text{F}]\text{tBuPh}_2\text{SiF}$ und $[^{18}\text{F}]\text{tBu}_2\text{PhSiF}$ in einer vergleichenden Evaluierung bezüglich ihrer Stabilität in humanem Serum untersucht. In dieser konnte gezeigt werden, dass die Hydrolysestabilität durch Abschirmung der Si-F Bindung mit Phenyl, vor allem jedoch durch zwei *tBu* Substituenten, deutlich erhöht werden kann (Abbildung 7).[102]

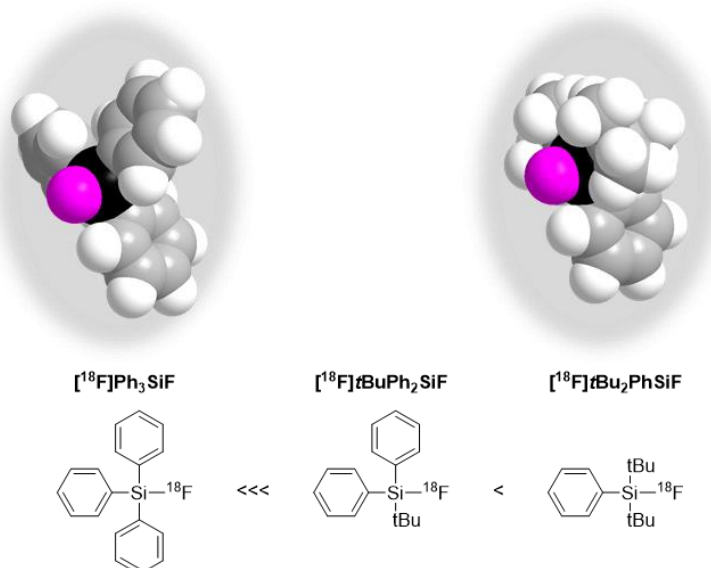


Abbildung 7: Von *Schirmacher et al.* entwickelte SiFA-Bausteine. Pfeile implizieren eine von links nach rechts steigende Hydrolysestabilität der $[^{18}\text{F}]\text{Si-F}$ -Bindung in humanem Serum.[102]

Auch für Alkoxysilane, welche in einer nukleophilen Substitution mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ markiert werden (siehe hierzu Abbildung 6, 4.3 Moderne Fluorierungsmethoden – Ein Überblick), wurden diese Beobachtungen bestätigt.[122] In einer Studie von *Höhne et al.* wurden verschiedenste Substituenten am Siliziumatom untersucht, wodurch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen sterischer

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Abschirmung der Si-F Bindung und der Hydrolysestabilität hergestellt werden konnte. Daher hat sich inzwischen das SiFA-Motiv $t\text{Bu}_2\text{PhSiF}$ als goldener Standard durchgesetzt.[123]

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus der Publikation von *Schirmacher et al.* waren neben den Erwägungen zur Stabilität vor allem die Resultate zum Isotopenaustausch (Abbildung 8).

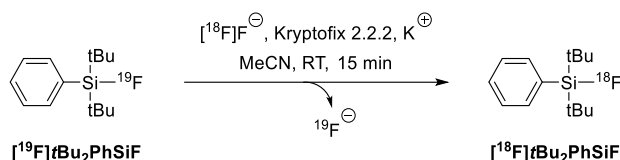


Abbildung 8: Von *Schirmacher et al.* beschriebener Isotopenaustausch an $[\text{}^{19}\text{F}]\text{tBu}_2\text{PhSiF}$. [102]

Der Isotopenaustausch an $[\text{}^{19}\text{F}]\text{tBu}_2\text{PhSiF}$ erfolgte innerhalb von 15 min bei Raumtemperatur und mit radiochemischen Ausbeuten zwischen 80 und 95%. Zusätzlich übertrafen die molaren Aktivitäten von 190 – 230 GBq/ μmol die bisherigen Ergebnisse an C-F-Bindungen bei weitem.[102]

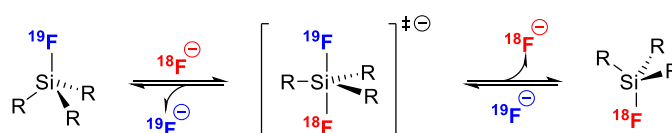
Diese vielversprechenden Ergebnisse stellten die Grundlage für die Entwicklung verschiedener SiFA-Bausteine dar, welche über geeignete Konjugationsmethoden an Peptiden verankert und zur PET-Bildgebung verwendet werden können.

4.4.2 Markierungschemie und mechanistische Aspekte

Zur Klärung der Frage, warum der Isotopenaustausch an SiFA-Bausteinen innerhalb weniger Minuten bei Raumtemperatur und annähernd stöchiometrisch verläuft, wurden sowohl theoretische Berechnungen als auch experimentelle Untersuchungen durchgeführt.

Mittels der Dichtefunktionaltheorie (DFT) wurde ein Reaktionsmechanismus für den Isotopenaustausch postuliert, der über ein 5-fach-koordiniertes Intermediat verläuft. Dieses erlaubt die Substitution des Fluorids, wobei ausgehend von dem Intermediat, sowohl ^{18}F als auch ^{19}F substituiert werden kann (Abbildung 9).[124] Die trigonal-bipyramidale Struktur des Intermediates geht konform mit der Literatur, die für tetravalente Silane die Ausbildung von hypervalenten 5- oder sogar 6-fach koordinierten Strukturen beschreibt.[125, 126]

Postulierter Reaktionsmechanismus für den Isotopenaustausch:



Mechanismus ergibt sich aus DFT-Berechnungen für:

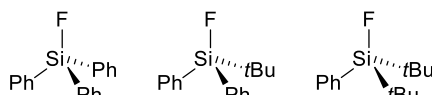


Abbildung 9: Reaktionsmechanismus des Isotopenaustauschs. Postuliert für die SiFA-Strukturen Ph_3SiF , $t\text{BuPh}_2\text{SiF}$ und $t\text{Bu}_2\text{PhSiF}$ (allgemeingültig für alle SiFA-Bausteine).[124]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Den Berechnungen für Ph_3SiF , $t\text{BuPh}_2\text{SiF}$ und $t\text{Bu}_2\text{PhSiF}$ zufolge sind die Pentakoordinate in der Gasphase stabil. Allerdings zeigt sich für die Berechnungen der Intermediate im Reaktionsmedium Acetonitril eine niedrige Energiebarriere der freien Gibbs-Energie (ΔG) zwischen 21 und 42 kJ/mol. Die Bildung des Intermediates $[\text{}^{18}\text{F}][\text{}^{19}\text{F}][\text{R}_3\text{SiF}_2]^-$ aus Abbildung 9 ist demnach energetisch weniger günstig. Unter Abgabe eines Fluorids wird anschließend entweder $[\text{}^{18}\text{F}]\text{R}_3\text{SiF}$ oder $[\text{}^{19}\text{F}]\text{R}_3\text{SiF}$ gebildet. Die Entstehung beider Varianten ist gleich wahrscheinlich, da für den Isotopenaustausch $\Delta G = 0$ angenommen werden kann. Die Aufnahme und Abgabe eines Fluorids verläuft damit schnell und annähernd stöchiometrisch, trotz der mangelnden energetischen Triebkraft in Richtung des ^{18}F -Produkts. Letzteres ist dem stöchiometrischen Überschuss des SiFA-Substrats geschuldet, der ein erneutes Zusammentreffen eines $[\text{}^{19}\text{F}]\text{Fluorids}$ mit einer $[\text{}^{18}\text{F}]\text{SiFA}$ Spezies statistisch unwahrscheinlich macht.[124]

Kostikov et al. führten experimentelle Studien anhand des SiFA Bausteins SiFAN^+ durch und ermittelten für den Isotopenaustausch eine niedrige Aktivierungsenergie von $E_a = 65.6$ kJ/mol und für den präexponentiellen Faktor A einen Wert von $7.6 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Abbildung 10).[127] Der präexponentielle Faktor A, beschreibt die Kollisionsfrequenz zweier Reaktanden und stellt damit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Reaktion dar.[128]

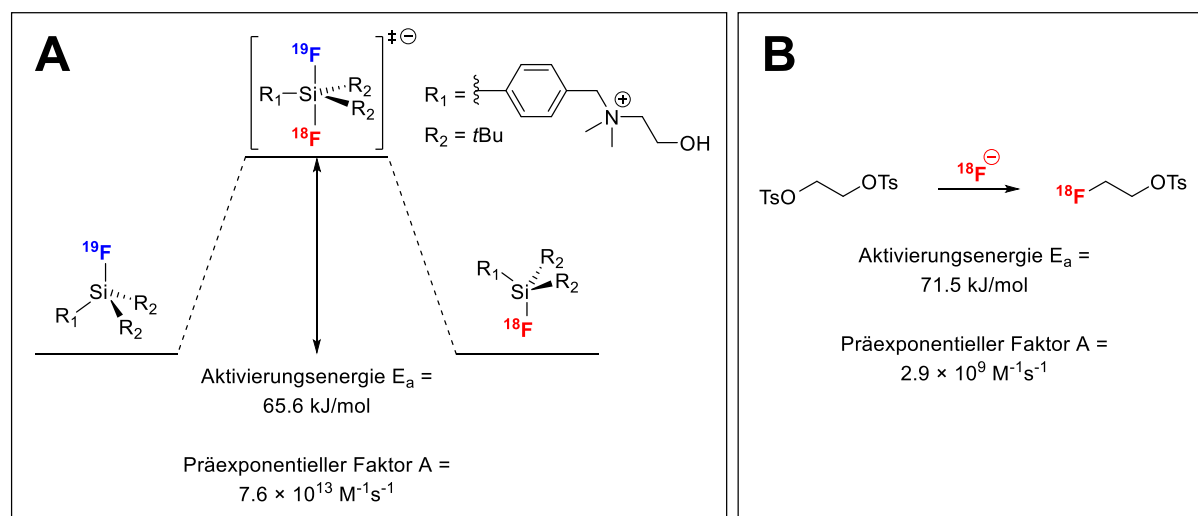


Abbildung 10: **A** Energetisches Profil für den Isotopenaustausch an SiFAN^+ . Aktivierungsenergie E_a und der präexponentielle Faktor A, berechnet aus mittels des Arrhenius-Plots. **B** Reaktionsgleichung für die nukleophile Substitution von Ethylenglykoldi-*p*-tosylat. Aktivierungsenergie E_a und der präexponentielle Faktor A, berechnet mittels des Arrhenius-Plots.[127]

Für eine bessere Einordnung der Ergebnisse wurden beide Werte auch für die nukleophile Substitution von Ethylenglykol-*p*-ditosylat mittels $[\text{}^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ berechnet, einer häufig verwendeten prosthetischen Gruppe für die ^{18}F -Markierung. Typisch für derartige Substitutionen an Kohlenstoffen – und im Unterschied zum SiFA-Isotopenaustausch - muss auch diese Reaktion bei erhöhten Temperaturen durchgeführt werden.[129] Die Aktivierungsenergie E_a ist mit 71.5 kJ/mol geringfügig höher die des Si-F Isotopenaustauschs. Allerdings ist der präexponentielle Faktor A mit $2.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ deutlich geringer als der des SiFAN^+ Isotopenaustauschs. Die niedrigere E_a und der hohe präexponentielle Faktor A,

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

bieten damit eine Erklärungsgrundlage für den effizienten Isotopenaustausch an SiFA-Bausteinen, auch bei niedrigen Temperaturen.[127]

4.4.3 Mögliche Bausteine für die Peptidsynthese

Für die Verwendung in Peptiden oder Proteinen stehen diverse SiFA-Bausteine zur Verfügung (Abbildung 11 und Abbildung 12). Aufgrund der hohen Stabilität gegenüber der Hydrolyse der Si-F Bindung, hat sich bei diesen Bausteinen das *t*Bu₂PhSiF-Motiv durchgesetzt. Die zur Konjugation benötigte Funktionalität befindet sich meist in *para*-Position zur Silizium-Einheit.[102, 130]

Ausgehend von SiFA-Alkohol lassen sich verschiedene Bausteine für unterschiedliche Anwendungen herstellen.[130] Zum SiFA-Aldehyd (SiFA-A) oxidiert, kann dieser im Rahmen einer Oximligation mit den Peptiden verknüpft werden.[124] Die SiFA-Benzoesäure (SiFA-BA) kann über eine Peptidbindung verknüpft, oder vorab in einen isolierbaren Pentafluorphenyl-Aktivester (SiFA-Pfp Aktivester) überführt werden.[130]

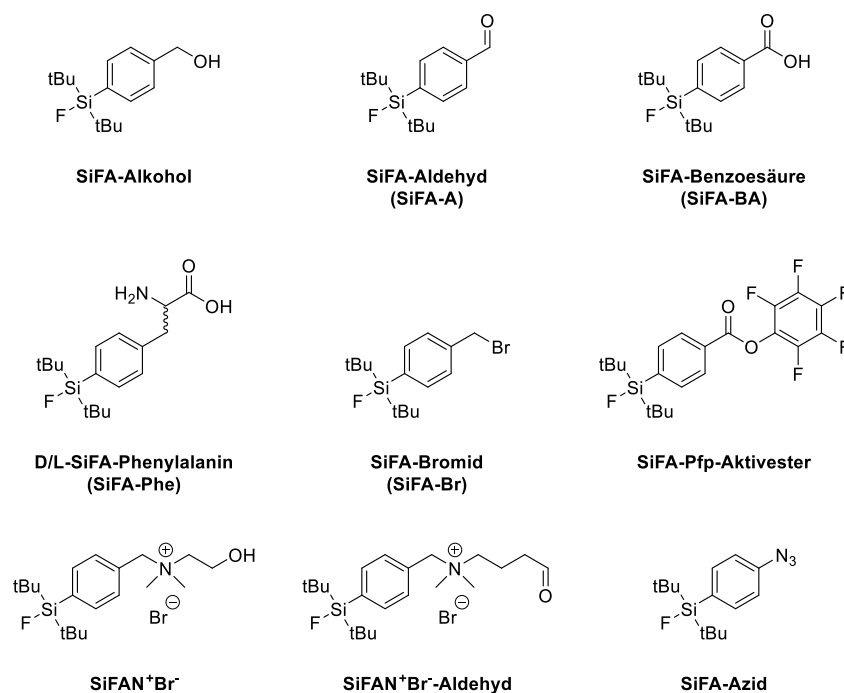


Abbildung 11: Auswahl an SiFA-Bausteinen, basierend auf dem *t*Bu₂PhSiF Grundmotiv, die vor allem in der Peptidsynthese Anwendung finden.[124, 127, 130–132]

Als bromierte Variante, wird SiFA-Bromid (SiFA-Br) vor allem zur Herstellung weiterführender Bausteine, wie dem SiFAN⁺Br⁻ oder dem SiFAN⁺Br⁻-Aldehyd, eingesetzt. Diese tragen, im Unterschied zu den bisher genannten Varianten, eine zusätzliche positive Ladung, welche die hohe Lipophilie von SiFA-Bausteinen kompensieren soll.[127, 131] Ebenfalls erwähnenswert ist die Entwicklung des SiFA-

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Phenylalanins (SiFA-Phe), das isomerenrein synthetisiert werden kann und direkt in die Peptid-Kette eingefügt wird.[132]

Für die Markierung von Proteinen (Abbildung 12) können SiFA-Thiol oder SiFA-Maleimid für eine Maleimid-Markierung eingesetzt werden. Zu bedenken ist jedoch, dass entweder eine Maleimid-Funktionalität im Protein positioniert werden muss oder nach der Markierung für die biologische Aktivität relevante Cysteine nicht mehr verfügbar sind.[130, 133, 134] Als Alternative stehen SiFA-Isothiocyanat oder der SiFA-NHS-Aktivester zur Verfügung, die mit Lysin-Seitenketten zur Reaktion gebracht werden.[135, 136]

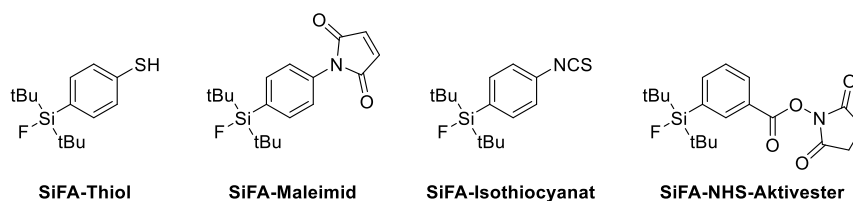


Abbildung 12: Auswahl an SiFA-Bausteinen, basierend auf dem $t\text{Bu}_2\text{PhSiF}$ Grundmotiv, die vor allem in der Proteinmarkierung Anwendung finden.[130, 133–136]

4.4.4 State-of-the-Art: Liganden-Design und das Radiohybrid-Konzept

Durch die verschiedenen funktionellen Gruppen am $t\text{Bu}_2\text{PhSiF}$ -Motiv, kann SiFA durch einfache Syntheseschritte in niedermolekulare Verbindungen, Peptide oder Proteine eingebaut werden. Das Hauptproblem bei der Verwendung von SiFAs sind demnach nicht synthetische Erwägungen. Durch die $t\text{Bu}$ -Reste am Silizium-Atom weisen die entsprechenden Bausteine – und damit auch die finalen Liganden – eine hohe Lipophilie auf. Dies kann unter anderem zu hepato biliärer Exkretion, geringer Akkumulation an der Zielstruktur und einer langsamen Clearance führen. Um diesen Effekten entgegen zu wirken, steht bei der Entwicklung SiFA-basierter Liganden der Einbau hydrophiler Elemente im Vordergrund.[113, 121, 137, 138]

Das prominenteste Beispiel für einen SiFA-Liganden ist $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ (auch $[^{18}\text{F}]\text{SiFalin-TATE}$), welches zur Adressierung des SST_2 Rezeptors eingesetzt wird.[131, 139] Das in Abbildung 13 dargestellte SiFA-TATE (**13**) ist der erste Peptidligand der mit dem $t\text{Bu}_2\text{PhSiF}$ -SiFA-Motiv konjugiert wurde.[102, 124] Im *in vivo* Mausversuch mit AR42J-Tumor tragenden Nacktmäusen wurde für $[^{18}\text{F}]\text{13}$ 90 min p.i. nahezu keine Tumoranreicherung beobachtet, dafür aber eine signifikante Ausscheidung über Leber und Darm. Diese Beobachtung begründen die Autoren mit dem hohen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (LogD) von 1.59 ± 0.01 . Durch Einführung der gezuckerten Aminosäure L-Asn(AcNH- β -Glc) und eines PEG_1 -Linkers sollte die Lipophilie gesenkt werden. Die resultierenden Derivate SiFA-L-Asn(AcNH- β -Glc)-TATE (**14**) und SiFA-L-Asn(AcNH- β -Glc)- PEG_1 -TATE (**15**) weisen mit einem $\text{LogD} = 1.23 \pm 0.05$ beziehungsweise 0.96 ± 0.07 immer noch eine hohe Lipophilie

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

auf. Jedoch zeigt [^{18}F]**15** im Mausversuch neben der hepatobiliären Ausscheidung (Leber = 16.1 ± 3.80 %ID/g) auch eine Tumoranreicherung von immerhin 7.73 ± 1.90 %ID/g.[140]

Um die Hydrophilie weiter zu steigern, wurden zusätzlich zwei L-Asp eingefügt (**16**) wodurch der LogD auf etwa -1.1^* gesenkt wird (Werte die mit * gekennzeichnet wurden, sind nicht in Zahlen publiziert und wurden daher graphisch abgeschätzt [131]). Die Einführung der Aspartate liefert damit den bisher größten Beitrag zur Hydrophilie.[131] Weitere Derivate (nicht dargestellt) zeigen, dass weder längere PEG-Linker noch der Einbau von weiteren Aspartaten die Lipophilie signifikant senken konnten.[131, 139] Durch den negativen LogD für [^{18}F]SiFA-L-Asn(AcNH- β -Glc)-[L-Asp]₂-PEG₁-TATE (**16**), liegt die Tumoranreicherung 60 min p.i. zwar bei annähernd 30 %ID/g, allerdings weist [^{18}F]**16** immer noch eine hohe Leberanreicherung auf, wenn auch niedriger als für [^{18}F]**16**. [131]

Statt des bisher eingesetzten SiFA-Aldehyds (**13** – **16**), wurde im weiteren Verlauf der SiFAN⁺ Baustein verwendet, welcher eine zum SiFA-Aromaten benachbarte positive Ladung trägt (SiTATE).[131, 139] Dieser Baustein, der zwar eigens zur Hydrophilie-Steigerung entwickelt wurde, senkt die Lipophilie nur geringfügig auf LogD = -1.21 ± 0.02 . [127, 131] [^{18}F]SiTATE wies im *in vivo* Mausversuch 60 min p.i., 18.5 ± 4.89 %ID/g im Tumor auf und ist damit vergleichbar zu [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE mit 14.1 ± 4.84 %ID/g. Überraschend ist vor allem die vorrangig renale Exkretion, mit einer Leberanreicherung im niedrigen einstelligen %ID/g Bereich und das trotz der nach wie vor mäßigen Hydrophilie. Die Autoren vermuteten hier bereits, dass dieser drastische Einfluss auf die Leberausscheidung nicht allein auf den geringfügigen Unterschied in der Hydrophilie von **17** im Vergleich zu SiTATE zurückgeführt werden kann. Diese Entwicklung muss mit der Struktur der unterschiedlichen SiFA-Bausteine in Zusammenhang stehen.[131] Die vielversprechenden präklinischen Daten des SiTATE, mündeten inzwischen in ersten Patientenstudien, auf die im Kapitel 4.5 [^{18}F]Fluorierte Somatostatin Rezeptor Liganden noch näher eingegangen wird.[80]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

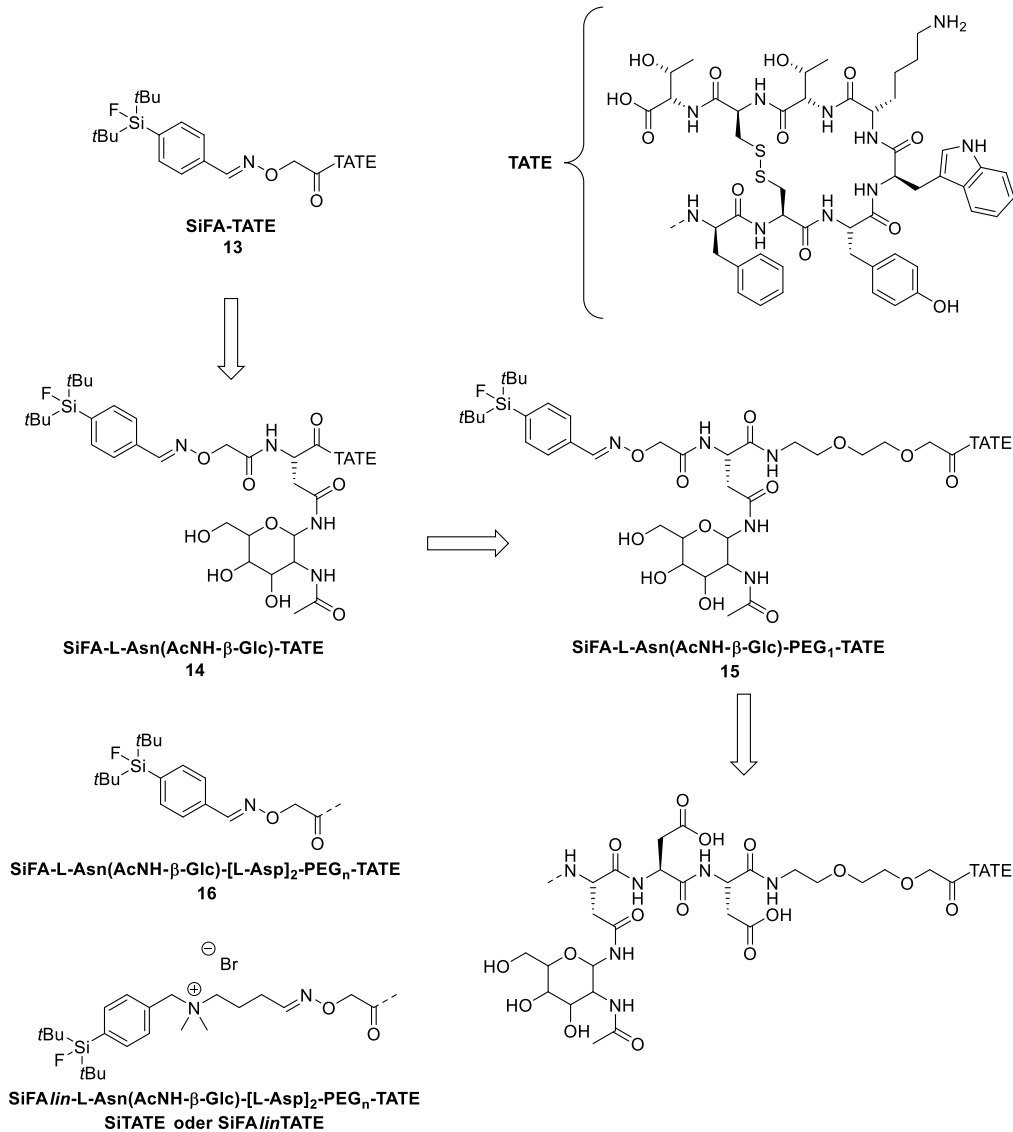


Abbildung 13: Entwicklung von SiTATE ausgehend von SiFA-TATE (14).[131, 139]

Die Entwicklung des SiTATE hat gezeigt, dass die Lipophilie der SiFA-Einheit ein Problemfaktor im Hinblick auf Exkretionsweg und der Akkumulation an der Zielstruktur ist. Durch die Verwendung hydrophiler Gruppen kann dies teilweise umgangen werden. Gleichzeitig können modifizierte SiFA-Bausteine wie das SiFAN⁺ signifikant auf Exkretion, Akkumulation und Clearance Einfluss nehmen. Die Entwicklungsarbeit von SiFA-Liganden für andere Zielstrukturen fokussierte sich jedoch vordergründig auf die Modulation des LogD Wertes.

Für die $\alpha_5\beta_3$ und $\alpha_5\beta_5$ Integrine stellten *Lindner et al.* verschiedene RGD-basierte Derivate vor, die strukturell auf dem klinisch angewandten [¹⁸F]Fluciclatid basieren (Abbildung 14).[138, 141] Erst durch die Verwendung der L-Lys(Me₃)- γ -Carboxy-D-Glu Sequenz, konnte eine Hydrophilie erzeugt werden (LogD = -1.97 ± 0.12), die für eine vielversprechende Clearance und Tumorakkumulation im Mausmodell sorgte. Im Gegensatz dazu zeigte das strukturell analoge Derivat ohne die L-Lys(Me₃)- γ -Carboxy-D-Glu Sequenz, durch den schlechteren LogD von -1.10 ± 0.03 , hepatobiliäre Exkretion.[141]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

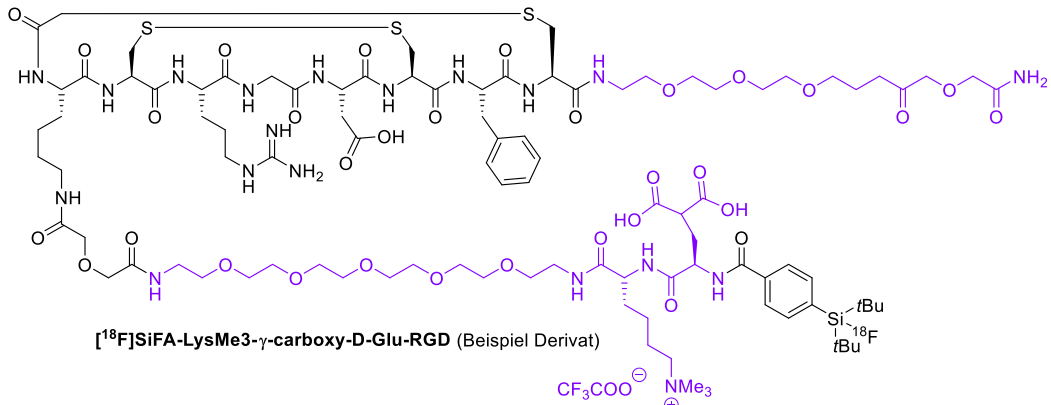


Abbildung 14: Chemische Struktur eines exemplarischen Integrin-Liganden nach *Lindner et al.*, basierend auf dem klassischen RGD-Motiv. Lila markierte Bereiche dienen zur Steigerung der Hydrophilie.[141]

Auch im Imaging des Gastrin-Releasing-Peptide-receptors (GRPr) wurden verschiedene, auf Bombesin basierende, SiFA-Liganden entwickelt (exemplarisch Abbildung 15).[142] Bisher gelang es jedoch nicht, Derivate von ausreichend niedriger Lipophilie zu entwickeln. Langsame Blut-Clearance, Leberausscheidung und geringe Tumorakkumulation im Mausmodell sind bisher noch ungelöste Probleme.[142–144]

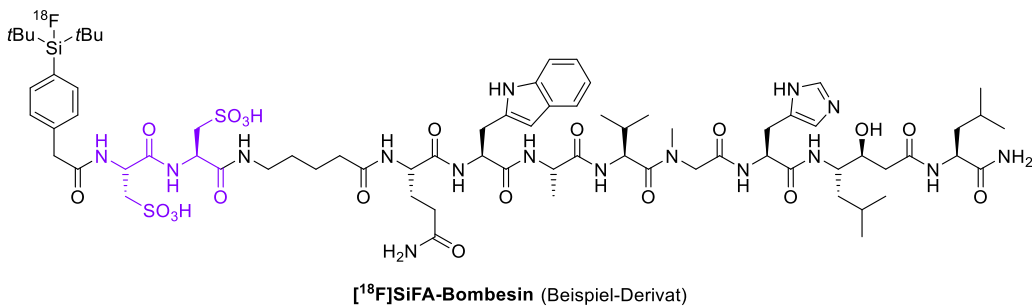


Abbildung 15: Chemische Struktur eines exemplarischen GRPr-Liganden nach *Dialer et al.*, basierend auf dem klassischen Bombesin-Motiv. Lila markierte Bereiche dienen zur Steigerung der Hydrophilie.[142]

Zur Diagnose neurologischer Erkrankungen wie dem Parkinsonismus, wurde der niedermolekulare D2-Rezeptor Ligand [¹⁸F]BMPP-SiF entwickelt (Abbildung 16).[145, 146] Da diese Verbindungsklasse die Blut-Hirn-Schranke überschreiten muss, ist in diesem Fall die erhöhte Lipophilie von Vorteil. Grundsätzlich ergibt sich für niedermolekulare Liganden jedoch die Problematik, dass zusätzliche hydrophile Einheiten die biologische Aktivität beeinflussen können und somit der Einbau in das Molekül verkompliziert wird.[137, 138]

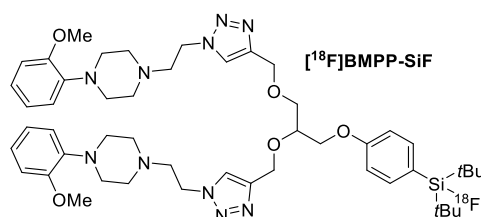


Abbildung 16: Chemische Struktur von [¹⁸F]BMPP-SiF, einem niedermolekularen, dimeren Liganden für den D2-Rezeptor.[146]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Abschließend kann der SiFA-PSMA Ligand $[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$ als weiteres Beispiel genannt werden. Dieser Ligand wird derzeit in zwei klinischen Phase III Studien untersucht (Abbildung 17). [80, 147–150]

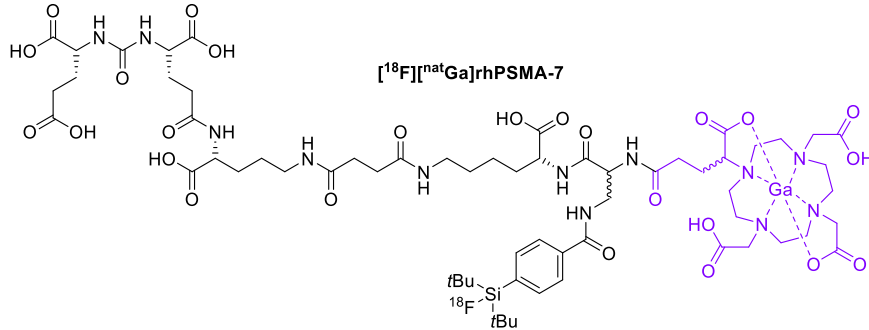


Abbildung 17: Chemische Struktur von $[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$. Lila markierte Bereiche dienen zur Steigerung der Hydrophilie.[151]

Die Besonderheit dieser Verbindung ist die Wahl der Hydrophilie-steigernden Einheit. Statt eines PEG-Linkers, hydrophiler Aminosäuren oder Zuckern, wurde bei $[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$ der Chelator *R/S*-DOTAGA eingesetzt und mit $^{\text{nat}}\text{Ga}$ komplexiert. Auf diese Weise wurde die Lipophilie in den bisher niedrigsten Bereich für einen SiFA-Liganden gesenkt (LogD zwischen -2.0 und -3.5 je nach gewähltem Chelator; siehe *Wurzer et al.*[151]).[151] Aus der Kombination von SiFA und einem Chelator ergab sich das sogenannte *Radiohybrid-Konzept* (rh-Konzept). Die Komplexierung eines dreiwertigen Metalls wie Gallium oder Lutetium steigert die Hydrophilie zusätzlich. Da die Markierung mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ in Form eines Isotopenaustauschs stattfindet, kann die unkomplexierte Vorläuferverbindung auch mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Gallium}$ markiert werden, während die SiFA-Struktur mit ^{19}F statt ^{18}F verbleibt. Es handelt sich jeweils nur um andere Isotope, daher zeigen $[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$ und $[^{\text{nat}}\text{F}][^{68}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$ dieselben pharmakologischen Eigenschaften. Dies ist für Kliniken von Interesse die zwar über einen ^{68}Ga -Generator verfügen, aber keinen Zugang zu einem Zyklotron haben. Ebenfalls von Interesse ist die Möglichkeit die Kombination aus Fluor und Lutetium zu verwenden. Letzteres erlaubt erstmalig, die ^{18}F -Diagnostik und ^{177}Lu -Therapie mit der gleichen molekularen Verbindung und ermöglicht eine akkurate, prätherapeutische Dosimetrie.[138, 151]

Das meistverwendete Nuklid-Paar für Diagnostik und Therapie ist ^{68}Ga und ^{177}Lu . Allerdings resultieren daraus chemisch verschiedene Liganden, mit unterschiedlichem *in vivo* Verhalten, worunter die Genauigkeit der Dosimetrie leidet (z.B. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ und $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$). Die Gruppe um *Perrin et al.* hat dieses Konzept inzwischen auf die Trifluorborat Methode erweitert und AmBF_3 mit DOTA kombiniert.[152]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

4.5 [¹⁸F]Fluorierte Somatostatin Rezeptor Liganden

Im Hinblick auf die unter 4.3 *Moderne Fluorierungsmethoden – Ein Überblick* vorgestellten Fluorierungsmethoden, werden im Folgenden die vielversprechenden ¹⁸F-markierten SST₂-Liganden [¹⁸F]SiTATE, [¹⁸F]AIF-NOTA-Octreotid und [¹⁸F]AmBF₃-TATE, näher betrachtet (Abbildung 18).

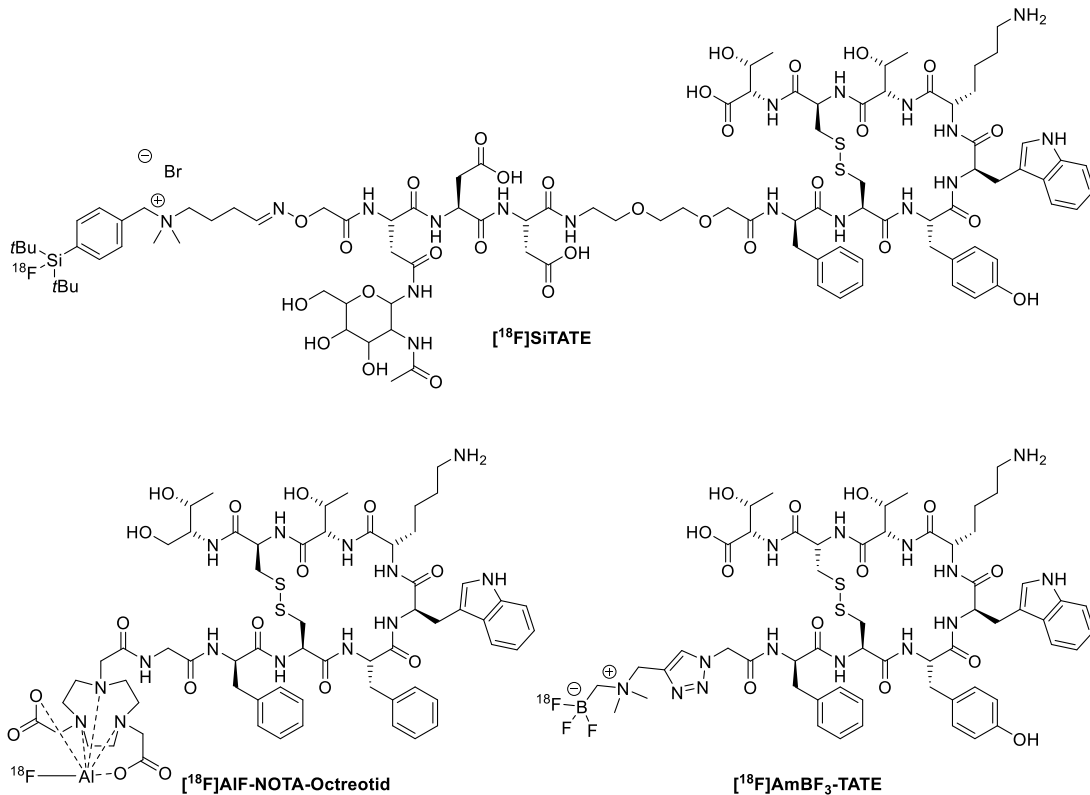


Abbildung 18: Strukturen der ¹⁸F-markierten SST₂-Liganden [¹⁸F]SiTATE, [¹⁸F]AmBF₃-TATE und [¹⁸F]AIF-NOTA-Octreotid.[131, 153, 154]

In Tabelle 4 sind wichtige *in vitro* Parameter sowie die präklinischen Daten der *in vivo* Biodistributionen am Mausmodell zusammengefasst. Ein direkter Vergleich von Zell- oder Maus-basierten Daten aus verschiedenen Publikationen und Forschungsgruppen ist fehlerbehaftet. Andere Zellmodelle oder unterschiedliches Vorgehen bei der Biodistribution, selbst bei gleichem Tumormodell, können zu abweichenden Daten führen. Beim Vergleich der Daten des klinischen Standards [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE von *Schottelius et al.* und *Niedermoser et al.* in Tabelle 4 wird dies anschaulich dargestellt.[57, 131] Dennoch werden die Daten im Folgenden beleuchtet und soweit möglich verglichen.

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Tabelle 4: Vergleichende Auflistung der *in vitro* Parameter und der *in vivo* Mausdaten der [¹⁸F]fluorierten SST₂-Liganden [¹⁸F]AmBF₃-TATE, [¹⁸F]SiTATE und [¹⁸F]AIF-NOTA-Octreotid.[131, 153, 154] Zusätzlich sind die analogen Daten des klinischen Standards [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE angegeben. Einerseits aus einer eigenständigen Publikation von *Schottelius et al.*,[57] andererseits wurden einige der Parameter ebenfalls in der [¹⁸F]SiTATE Publikation nach *Niedermoser et al.* bestimmt [131].

Ligand	[¹⁸ F]AmBF ₃ -TATE[153]	[¹⁸ F]SiTATE[131]	[¹⁸ F]AIF-NOTA-Octreotid[154]	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-TATE[57]	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-TATE[131]
I N V I T R O					
Affinität des Liganden [nM]	K _i = 0.13 ± 0.03 ¹	IC ₅₀ = 3.69 ± 1.09 ²	IC ₅₀ = 3.6 ± 0.6 ⁵	IC ₅₀ = 1.2 ± 0.6 ⁷	-
Affinität der Referenz [nM]	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA-TATE K _i = 0.7 ± 0.2	-	[^{nat} In]In-DTPA-Octreotid IC ₅₀ = 6.3 ± 0.9	-	-
LogD	-	-1.21 ± 0.02	-2.44 ± 0.12	-3.96	-
I N V I V O (B I O D I S T R I B U T I O N M A U S)					
Tumormodell	AR42J	AR42J	AR42J	AR42J	AR42J
Zeitpunkt	60 min p.i.	60 – 90 min p.i.	120 min p.i.	60 min p.i.	60 min p.i.
Tumor [%ID/g]	10.1 ± 1.7	18.5 ± 4.9 ³	28.3 ± 5.7	24.1 ± 4.9	14.1 ± 4.8
Leber [%ID/g]	0.39 ± 0.05	~ 1.5 ^{3,6}	<1.0 ⁶	0.5 ± 0.1	~0.3 ⁶
Niere [%ID/g]	4.90 ± 1.5	~ 13.8 ^{3,6}	10.0 ± 1.3	3.9 ± 0.5	~4.0 ⁶
T/Leber	26.2 ± 0.8	~ 12.7 ^{3,6}	-	48.2	~55 ⁶
T/Blut	25.1 ± 1.0	57.6 ± 35.9 ⁴	300 ± 90	80.3	~ 52 ⁶
T/Muskel	89.0 ± 3.1	211 ± 143 ⁴	-	88 ± 85	~ 215 ⁶
T/Knochen	21.3 ± 3.6	~ 10.6 ^{3,6}	86	-	~ 51 ⁶
Klinische Erprobung	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja

¹ CHO-SST₂ Zellmembranen; mit [¹²⁵I]Tyr-SRIF14 als radiomarkierter Referenzverbindung.

² AR42J Zellen; mit [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-TATE als radiomarkierter Referenzverbindung.

³ Biodistribution 60 min p.i.

⁴ Biodistribution 90 min p.i.

⁵ AR42J Zellen; mit [¹¹¹In]DTPA-Octreotid als radiomarkierter Referenzverbindung.

⁶ Daten nur in graphischer Form publiziert. Zahlenwerte wurden graphisch abgeschätzt und sind daher als Näherungen zu betrachten.

⁷ CHO-SST₂ Zellmembranen; mit [¹²⁵I]L-Leu⁸-D-Trp²²-L-Tyr²⁵-SRIF28 als radiomarkierter Referenzverbindung.

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Die Affinitäten der Liganden wurden zwar durch unterschiedliche Methoden bestimmt, dennoch lässt sich für alle Verbindungen eine hohe Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich feststellen.[131, 153, 154] Für [^{18}F]AmBF $_3$ -TATE wurde die Lipophilie nicht bestimmt.[153] Im Vergleich zum klinischen Standard [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE (LogD = -3.96) erweist sich [^{18}F]SiTATE als deutlich lipophiler (LogD = -1.21 ± 0.02).[57, 131] Trotz des strukturell ähnlichen Aufbaus mit einem *N*-terminalen Chelator ist [^{18}F]AlF-NOTA-Octreotid weniger hydrophil (LogD = -2.44 ± 0.12).[154]

In der Biodistribution an AR42J-Tumor tragenden Mäusen zeigt [^{18}F]AmBF $_3$ -TATE 60 min p.i. eine moderate Tumorkumulation von 10.1 ± 1.7 %ID/g und eine schnelle Ausscheidung über die Niere. Trotz der niedrigen Anreicherung in der Leber (0.39 ± 0.05 %ID/g) erfolgt eine teilweise hepatobiliäre Exkretion, die für eine Akkumulation im Dickdarm (2.28 ± 2.64 %ID/g) und Dünndarm (3.23 ± 1.58 %ID/g) verantwortlich ist (vgl. Abbildung 19).[153] Die Tumor/Organ Verhältnisse für Leber, Blut, Muskel und Knochen sind hoch, aber geringer als beim klinischen Standard [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE.[57, 153, 155]

Im direkten Vergleich mit [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE (14.1 ± 4.8 %ID/g) weist [^{18}F]SiTATE 60 min p.i. eine höhere Tumorkumulation (18.5 ± 4.9 %ID/g) auf. Durch die hohe Lipophilie von [^{18}F]SiTATE zeigt sich jedoch auch eine geringe Leberakkumulation die zu einem schlechteren Tumor/Leber Verhältnis führt. Die Tumor/Organ Verhältnisse sind durch die höhere Akkumulation im Tumor meist vergleichbar mit denen von [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE. Bei gleicher Skalierung zeigt sich aber dennoch eine geringere Bildqualität für den [^{18}F]Fluor-Liganden, bedingt durch eine verlangsamte Ausscheidung (vgl. Abbildung 20).[131] Hervorzuheben ist außerdem das Tumor/Knochen Verhältnis (Tabelle 4), das in der Reihe der gezeigten Fluor-Liganden deutlich geringer ist.

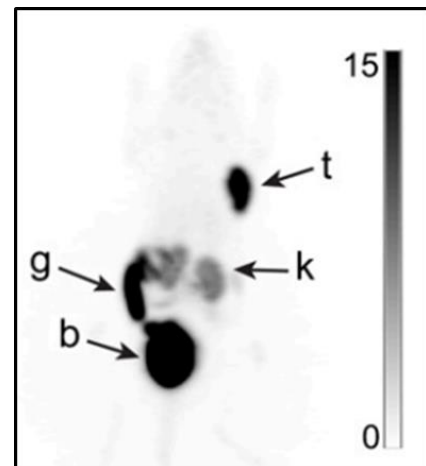


Abbildung 19: PET-Bildgebung von [^{18}F]AmBF $_3$ -TATE in AR42J-Tumor tragenden Mäusen 60 min p.i.. t = Tumor, k = Niere, g = Darm, b = Blase. Einheit der Legende in %ID/g.

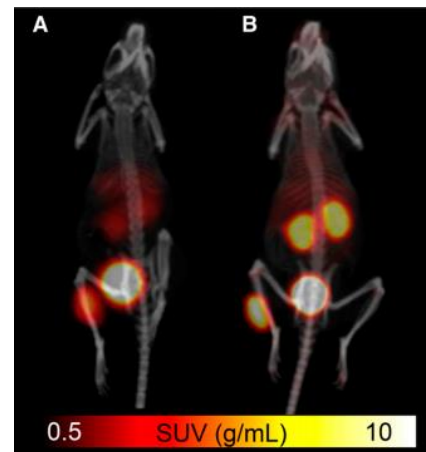


Abbildung 20: Vergleichende PET/CT-Bildgebung von [^{68}Ga]DOTA-TATE (A) und [^{18}F]SiTATE (B) in AR42J-Tumor tragenden Mäusen, 80-90 min p.i.).[116]

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

[¹⁸F]AlF-NOTA-Octreotid zeigt 120 min p.i. im Mausmodell die bisher höchste Anreicherung im Tumor von 28.3 ± 5.7 %ID/g. Die hohen Werte für das Tumor/Blut und Tumor/Knochen Verhältnis weisen einerseits auf eine schnelle Clearance und andererseits auf eine hohe Stabilität des [¹⁸F]AlF-NOTA-Komplexes hin. Trotz der geringen Leberanreicherung ist in der Bildgebung eine Akkumulation im Bereich des Darms zu sehen (vgl. Abbildung 21).[154]

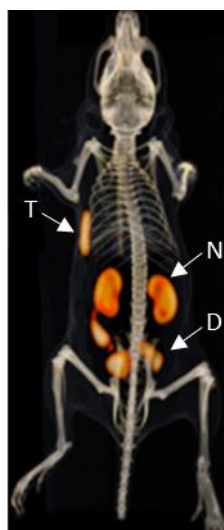


Abbildung 21: PET/CT-Bildgebung von [¹⁸F]AlF-NOTA-Octreotid in AR42J-Tumor tragenden Mäusen, 120 min p.i., T = Tumor, N = Niere, D = Darm. Keine Skalierung angegeben.[139]

In nachstehender Tabelle 5 sind relevante Parameter der Markierung mittels [¹⁸F]Fluorid angegeben. Dazu zählen die radiochemische Ausbeute (RCY), die radiochemische Reinheit (RCP), die A_m und die Synthesedauer. Sofern angegeben, wurde bei der RCY zusätzlich vermerkt, ob diese zerfallskorrigiert (d.c.) oder nicht zerfallskorrigiert (n.d.c.) bestimmt wurde.

Tabelle 5: Ergebnisse der [¹⁸F]Fluorierungen von AmBF₃-TATE, SiTATE und NOTA-Octreotid. Zugrundeliegende Publikationen sind der Spalte *Ref.* zu entnehmen.

	RCY %	RCP %	A_m [GBq/ μ mol]	Zeit [min]	Ref.	Kommentar
[¹⁸F]AmBF₃-TATE						
1	20 – 25 (n.d.c)	>99	>111	25	[153]	Manuelle Synthese; Aufreinigung: SPE
2	16 \pm 1 (d.c.)	>99	37 – 185	35 – 45	[155]	Microdropletmethode; Aufreinigung: SPE
3	15 \pm 4 (d.c.)	98 \pm 1.73	435 \pm 162	60	[156]	Automation
[¹⁸F]SiTATE						
4	49.8 \pm 5.9	>98	44 – 63	20 – 25	[131]	Manuelle Synthese; Aufreinigung: SPE
5	42 \pm 3 (d.c.)	>97	60 \pm 7	20 – 30	[80, 157]	Erste Patienten; manuelle Synthese
6	54 \pm 4 (n.d.c.)	96.3 \pm 0.1	472 \pm 45	22	[143]	Automation
[¹⁸F]AlF-NOTA-Octreotid						
7	6 – 52	-	8 – 54	45	[154]	Manuelle Synthese; Aufreinigung: HPLC + SPE
8	26.1 \pm 3.6	96.3 \pm 0.2	160 \pm 75	40	[158]	Automation; keine HPLC
9	-	93.7 \pm 1.6	23.2 \pm 13.0	-	[79]	Erste Patienten; automatische Synthese

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Das Trifluorborat-basierte [^{18}F]AmBF₃-TATE liefert sowohl bei der manuellen Synthese,[153, 155] als auch bei der automatisierten Synthese mittels Synthesemodul,[156] geringe RCYs von unter 25% (**Tabelle 5**, Einträge 1-3). Als positiv zu bewerten ist einerseits die radiochemische Reinheit, die auch in der automatisierten Synthese bei $98 \pm 1.73\%$ liegt.[156] Die Synthesedauer verlängert sich zwar von 25 min, für den manuellen Weg,[153] auf 60 min für die Automation, allerdings kann auf diese Weise eine sehr hohe A_m von 435 ± 162 GBq/ μmol erzielt werden.[156]

[^{18}F]SiTATE liefert im Vergleich die höchsten RCYs, sowohl manuell als auch automatisiert (Tabelle 5, Einträge 4-6). Die Reinheiten sind im Durchschnitt etwas niedriger als für [^{18}F]AmBF₃-TATE aber mit mindestens $96.3 \pm 0.1\%$ dennoch für die klinische Anwendung geeignet. Die A_ms für die manuelle Synthese sind meist niedriger, liegen aber bei der Modulsynthese in einer ähnlichen Größenordnung wie für [^{18}F]AmBF₃-TATE. Es sind also vor allem die höheren RCYs und die geringe Synthesedauer, welche die SiFA-Markierung überlegen gegenüber der AmBF₃-Methode machen.[80, 131, 143, 157] Dem liegen umfangreiche Optimierungen der Synthesebedingungen zu Grunde. Während zu Beginn noch mittels azeotroper Trocknung gearbeitet wurde,[102, 124] wird inzwischen ein angepasstes Protokoll, basierend auf der *Munich Methode* und unter Verwendung von Oxalsäure angewandt.[103, 134, 159, 160]

Im Vergleich zu [^{18}F]AmBF₃-TATE und [^{18}F]SiTATE, erweist sich [^{18}F]AIF-NOTA-Octreotid in allen Parametern als unterlegen.[79, 154, 158] Wobei insbesondere die A_m der automatisierten Synthese, die für erste Patientenstudien eingesetzt wurde, mit 23.2 ± 13.0 GBq/ μmol sehr niedrig ist. Ebenfalls zeigt sich eine geringere Reinheit von nur $93.7 \pm 1.6\%$.[79]

Die klinische Anwendbarkeit von [^{18}F]AmBF₃-TATE wurde bislang noch nicht untersucht. Für [^{18}F]AIF-NOTA-Octreotid und [^{18}F]SiTATE hingegen, stehen bereits erste Daten zur Anwendung am Patienten zur Verfügung.[161]

[^{18}F]AIF-NOTA-Octreotid zeigt im direkten Vergleich mit [^{18}F]FDG eine grundsätzlich höhere Detektionsrate. Zusätzlich ergeben sich für Grade 1 und Grade 2 Läsionen deutlich höhere SUV_{max}.[162] Relevanter ist der Vergleich mit dem klinischen Standard [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE. In einer ersten Gegenüberstellung in einem Patienten mit rektalem-NET und diffusen Metastasen, wurde vor allem der bessere Kontrast – vermutlich

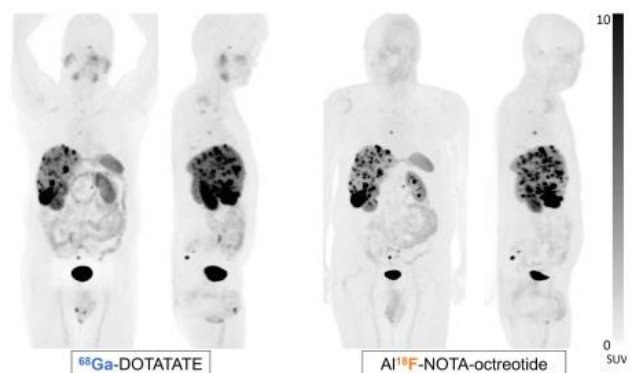


Abbildung 22: PET-Scan von [^{68}Ga]DOTA-TATE und [^{18}F]AIF-NOTA-Octreotid in einem männlichen Patienten mit rektalem NET und diffusen Metastasen.[147]

bedingt durch die besseren physikalischen Eigenschaften von ^{18}F – deutlich (vgl. Abbildung 22).[163] Studien mit kleinen Kohorten ergaben eine höhere Detektionsrate von Leberläsionen mit [^{18}F]AIF-NOTA-Octreotid aber eine geringere Effizienz bei der Identifizierung von Knochenmetastasen.

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

Ansonsten wurden die Detektionsraten und die Tumor/Hintergrund Verhältnisse als vergleichbar beschrieben. Daher wird [^{18}F]AlF-NOTA-Octreotid derzeit hauptsächlich als Alternative für [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE betrachtet, vor allem wenn kein ^{68}Ga -Generator, aber dafür ^{18}F zur Verfügung steht.[79, 164] Des Weiteren wurde der Ligand erfolgreich für die Diagnose tumorinduzierter Osteomalazie eingesetzt und das Anreicherungsprofil in einer Kohorte von 162 Patienten näher beleuchtet.[165, 166]

[^{18}F]SiTATE wurde mit [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC verglichen. In Abbildung 23 weist [^{18}F]SiTATE eine höhere Leberakkumulation, mit daraus resultierender Darmanreicherung auf.[167] Eine Beobachtung die bereits für das Mausmodell beschrieben wurde.[131] Eine Studie unter 13 NET-Patienten zeigte eine höhere Aufnahme in gesunder Leber, Nebennieren und der Milz. Dennoch ergeben sich durch höhere Standard-Uptake-Values (SUV) der Läsionen, höhere

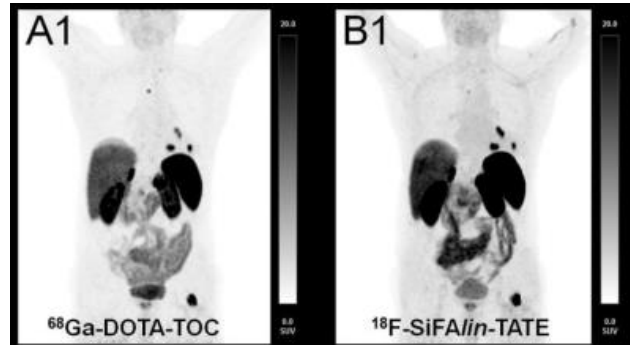


Abbildung 23: Vergleichender PET-Scan von [^{18}F]SiTATE und [^{68}Ga]DOTA-TOC in einem männlichen Patienten mit einem NET unbekanntes Ursprungs. [153]

Tumor/Leber und Tumor/Milz Verhältnisse für [^{18}F]SiTATE. Insbesondere kleine Metastasen profitieren von der [^{18}F]Fluor-Verbindung, da sie kontrastreicher erfasst werden. In einer Blindstudie wurden beide Varianten als *exzellent* oder *gut* bewertet. Die Bevorzugung des [^{18}F]SiTATE-Scans lag jedoch nur bei 21% während 28% den [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC PET-Scan vorgezogen. Für 51% der Scans wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.[80] Um das volle Potential ausschöpfen zu können, wurde eine Studie zur Dosimetrie und zur Optimierung der Scan-Dauer durchgeführt.[168] Studien mit größeren Patientenkohorten wurden bisher noch nicht durchgeführt.

5. Zielsetzung der Dissertation

Erste klinische Untersuchungen mit [^{18}F]AlF-NOTA-Octreotid und [^{18}F]SiTATE haben gezeigt, dass moderne Methoden zur Fluorierung, basierend auf Al-F und Si-F Bindungen, [^{18}F]Fluor-markierte Liganden für die Anwendung am Menschen erschließen können. Solche Liganden können zukünftig wertvolle Alternativen für etablierte ^{68}Ga -Derivate darstellen. Mit [^{18}F]SiTATE steht damit ein auf SiFA basierender ^{18}F -fluorierter SST₂-Ligand zur Diagnostik mittels PET zur Verfügung. Wie in 4.5 [^{18}F]Fluorierte Somatostatin Rezeptor Liganden erläutert, bietet dieser Ligand in der Patientenanwendung jedoch keine signifikanten diagnostischen Vorteile gegenüber etablierten [^{68}Ga]Ga-Liganden wie [^{68}Ga]DOTA-TOC. Daher war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, einen [^{18}F]Fluor SST₂-Liganden zu entwickeln, der [^{18}F]SiTATE *in vitro* und im *in vivo* Mausversuch überlegen ist.

Dies sollte durch die Anwendung des rh-Konzepts an SST₂-Liganden erfolgen (Abbildung 24). Analog zu den von Wurzer *et al.* vorgestellten rh-PSMA Liganden sollte ein SST₂ Bindemotiv mit einem hydrophilen Chelator und einem SiFA-Baustein kombiniert werden.[151] Um dem rh-Konzept gerecht zu werden und eine Radiomarkierung mit [^{18}F]Fluor einerseits und einem Radiometall andererseits zu ermöglichen, sollte der Chelator dabei immer komplexiert vorliegen. In Abhängigkeit von der Wahl des Chelators und des Radiometalls, wäre damit neben der PET-Diagnostik mittels [^{18}F]Fluor auch eine PET Diagnostik mit ^{68}Ga , SPECT-Diagnostik mittels ^{111}In oder eine Radioligandtherapie mittels ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{212}Pb oder ^{225}Ac (um nur einige mögliche Nuklide zu nennen) möglich.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit sollte auf rein diagnostischen Derivaten liegen, weshalb die Komplexierung mit Gallium bevorzugt wurde. Da aber auch therapeutische Ansätze möglich wären, sollte im Falle vielversprechender Derivate auch der Lutetium Komplex bewertet werden. Der Fokus der Entwicklung sollte zunächst auf der Optimierung der SST₂-Affinität (IC₅₀), der Lipophilie (LogD_{pH=7.4}) und der HSA-Bindung liegen.

I. THEORETISCHER HINTERGRUND

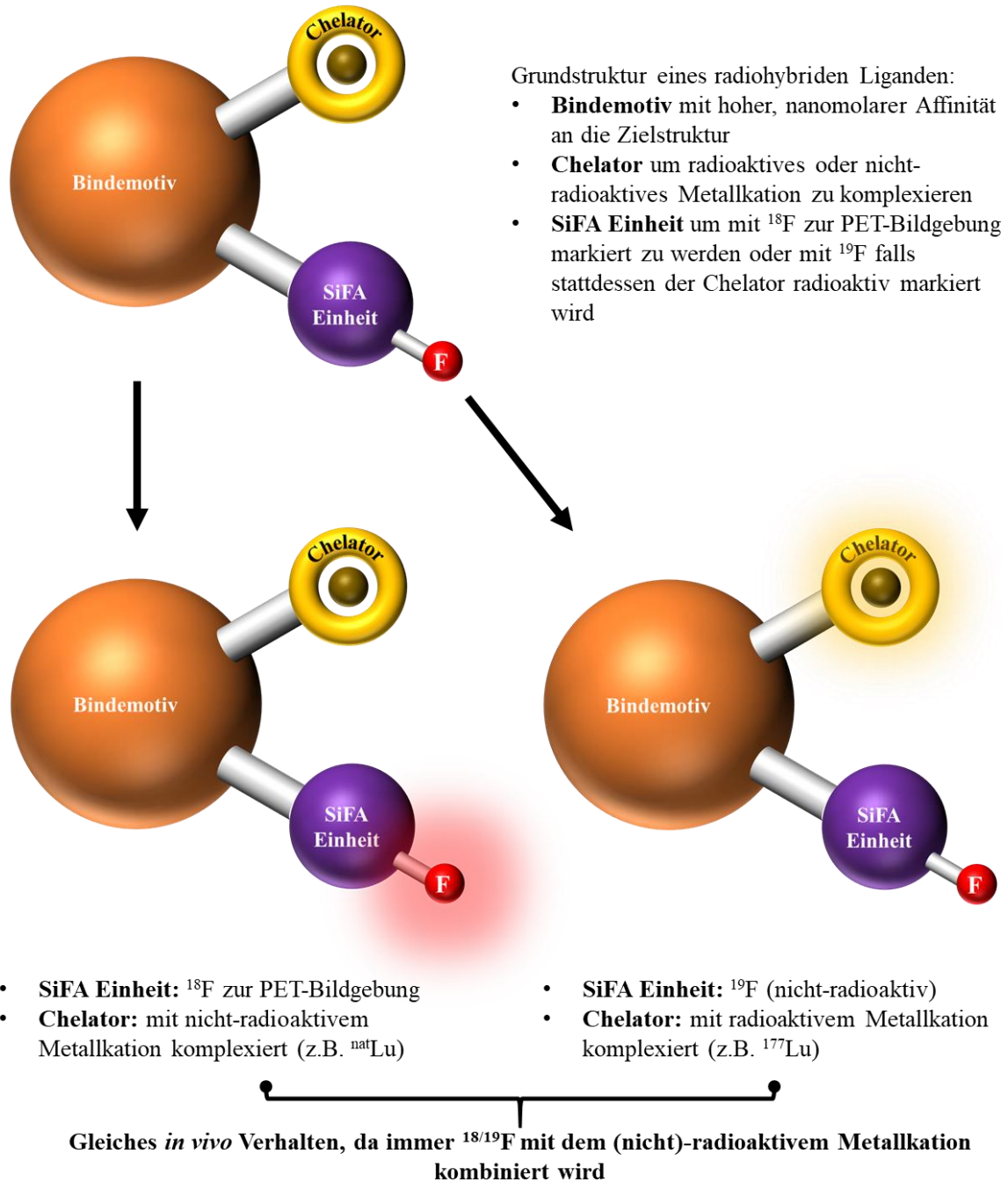


Abbildung 24: Konzeptionelle Darstellung des radiohybrid-Konzepts.[151]

Ein Hinweis zur Nomenklatur: die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Liganden wurden ausschließlich mit ^{18}F Fluorid radiomarkiert. Andere Isotope kamen dabei nicht zum Einsatz. Daher wird bei der Bezeichnung von komplexierten Liganden (Ga, Lu oder Pb) auf die Angabe von Isotopen verzichtet. Die Liganden werden daher nach dem Schema ^{18}F Ga-/Lu-/Pb-rhSST₂ benannt.

II. Materialien und Methoden

1. Verwendete Materialien, Chemikalien, Geräte und Software

Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden ohne vorherige Aufreinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen *VWR International* (Bruchsal, Deutschland) oder *Sigma Aldrich* (München, Deutschland) bezogen. Das Wasser für die mobile Phase der HPLC-Systeme wurde vor der Verwendung über ein Millipore-System der Firma *Thermo Fischer Scientific Inc.* (Waltham MA, USA) aufgereinigt, während Tracepure Wasser von *Merck Millipore* (Darmstadt, Deutschland) bezogen wurde.

Chemikalien

Aminosäuren wurden von *IRIS Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland), *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland), *Carbolution Chemicals GmbH* (St. Ingbert, Deutschland) oder *Merck Millipore* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Harze zur Festphasenpeptidsynthese wurden von *IRIS Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland) oder *CEM* (Matthews, USA) erworben. Kopplungsreagenzien oder andere Chemikalien wurden von *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland), *Molekula GmbH* (Garching, Deutschland), *CEM* (Matthews, USA) und *Macrocyclics Inc.* (Dallas, USA) bezogen. Weitere Chemikalien zur organischen Synthese wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich* (München, Deutschland) und *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Chelatoren wurden bei *CheMatech* (Dijon, Frankreich) erworben.

Radioaktive Isotope

Radioaktive Markierungen mit ^{125}I wurden mit einer Lösung von $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ in 40 mM NaOH durchgeführt. Diese wurde von *HARTMANN ANALYTIC GmbH* (Braunschweig, Deutschland), mit einer molaren Aktivität von 74 TBq/mmol, erworben.

Das ^{18}F Fluorid wurde aus dem *Klinikum Rechts der Isar* (Technische Universität München, München, Deutschland) bezogen und in Target-Wasser zur Verfügung gestellt.

Radioaktive Markierungen mit ^{177}Lu wurden mit einer $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ -Lösung (40 GBq/mL; ART) in 40 mM HCl durchgeführt, die von der Firma *ITM Isotopen Technologien München AG* (Garching bei München, Deutschland) bezogen wurde.

Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Reaktions- und Qualitätskontrollen wurden mittels analytischer RP-HPLC durchgeführt. Zu diesem Zweck, wurde ein linearer Gradient von Acetonitril (MeCN) (zzgl. 0.1% Trifluoressigsäure (TFA), 2% H_2O v/v) in H_2O (zzgl. 0.1% TFA v/v) gefahren. Standardmäßig wurde das Maximum des MeCN-Anteils nach 15 min erreicht, gefolgt von 5 min bei 95% MeCN in H_2O (v/v). Die gewählten Gradienten

II. MATERIALIEN UND METHODEN

sind den jeweiligen Synthesebeschreibungen zu entnehmen. Die Signaldetektion erfolgte über einen UV/VIS-Detektor bei $\lambda = 220$ nm beziehungsweise 254 nm, je nachdem ob die Absorption der Peptidbindung oder rein aromatische Absorption detektiert werden sollte. Alle RP-HPLC Chromatogramme wurden mittels der LabSolutions Software der Firma *Shimadzu Corp.* (Kyoto, Japan) ausgewertet.

Für die analytische RP-HPLC von nicht radioaktiven Substanzen wurden zwei Systeme eingesetzt:

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan): Bestehend aus zwei LC-20AD Gradienten-Pumpen, einem CBM-20A Kommunikationsmodul, einem CTO-20A Säulenofen, einem SPD-20A UV/VIS-Detektor und einer DGU-20A3R Entgasungseinheit.

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan): Bestehend aus zwei LC-20AD Gradienten-Pumpen, einem CBM-20A Kommunikationsmodul, einem CTO-20A Säulenofen, einer DGU-20A3R Entgasungseinheit und einem Smartline 2500 UV/VIS-Detektor.

Für Reaktionskontrollen jeglicher Art wurde eine MultoKrom 100-5 C₁₈-Säule (5 μ m, 125 \times 4.6mm, *CS Chromatographie GmbH*, Langerwehe, Germany) verwendet. Für Qualitätskontrollen von Endprodukten, wurde eine Säule desselben Füllmaterials und Herstellers aber mit einer Länge von 150 mm statt 125 mm eingesetzt. Beide Säulen wurden mit einer Durchflussrate von 1 mL/min betrieben.

Für die analytische RP-HPLC von [¹⁸F]F-markierten Substanzen wurde folgendes System eingesetzt:

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan): Bestehend aus zwei LC-20AD Gradienten-Pumpen, einem CBM-20A Kommunikationsmodul, einem SPD-M20A Dioden-Array-Detektor und einer DGU-20A3R Entgasungseinheit. Für radioaktive Proben wurde zusätzlich ein HERM LB 500 NaI-Detektor der Firma *Berthold Technologies GmbH & Co. KG* (Bad Wildbad, Deutschland) in Reihe geschaltet. Als stationäre Phase wurde eine MultoKrom 100-5 C₁₈-Säule (5 μ m, 150 \times 4.6mm, *CS Chromatographie GmbH*, Langerwehe, Germany) mit einer Durchflussrate von 1 mL/min verwendet.

Für die analytische RP-HPLC von [¹²⁵I]I- oder [¹⁷⁷Lu]Lu-markierten Substanzen wurde folgendes System eingesetzt:

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan): Bestehend aus zwei LC-20AD Gradienten-Pumpen, einem CBM-20A Kommunikationsmodul, einem SPD-20A UV/VIS-Detektor, einer DGU-20A3R Entgasungseinheit, einem CTO-10AS VP Säulenofen, einem FRC-10A Fraktionssammler und einem SIL-20A Autosampler. Für radioaktive Proben wurde zusätzlich ein HERM LB 500 NaI-Detektor der Firma *Berthold Technologies GmbH & Co. KG* (Bad Wildbad, Deutschland) in Reihe geschaltet. Als stationäre Phase wurde eine MultoKrom 100-5 C₁₈-Säule (5 μ m, 125 \times 4.6mm, *CS Chromatographie GmbH*, Langerwehe, Germany) mit einer Durchflussrate von 1 mL/min verwendet.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

Die vollständige Aufreinigung von Zwischen- oder Endprodukten erfolgte mittels präparativer RP-HPLC. Auch hier wurde ein linearer Gradient von MeCN (zzgl. 0.1% TFA und 5% H₂O; v/v) in H₂O (zzgl. 0.1% TFA; v/v) gefahren, wobei das Maximum des MeCN-Anteils nach 20 min erreicht wurde, ebenfalls gefolgt von 5 min bei 95% MeCN in H₂O (v/v). Die weiteren Angaben entsprechen dem Vorgehen das bereits für die analytische RP-HPLC beschrieben wurde.

Zur präparativen Reinigung wurden drei Systeme der Firma *Shimadzu Corp.* (Kyoto, Japan) eingesetzt:

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan): Bestehend aus zwei LC-20AP Gradienten-Pumpen, einer DGU-20A Entgasungseinheit, einem CBM-20A Kommunikationsmodul, einem CTO-20A Säulenofen und einem SPD-20A UV/VIS-Detektor.

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan): Bestehend aus zwei LC-20AT Gradienten-Pumpen, einer DGU-20A Entgasungseinheit, einem CBM-20A Kommunikationsmodul und einem SPD-20A UV/VIS-Detektor.

Shimadzu Corp. (Kyoto, Japan): Bestehend aus zwei LC-20AP Gradienten-Pumpen, einer DGU-20A3R Entgasungseinheit, einem CBM-20A Kommunikationsmodul, einem SPD-20A UV/VIS-Detektor, SIL-10AP Autosampler und einem FRC-10A Fraktionensammler.

Für alle semi-präparativen RP-HPLC Systeme kamen folgende Säulen als stationäre Phase zum Einsatz:

Eine Multospher 100 C₁₈-Säule (5 µm, 250 × 10 mm, *CS Chromatographie GmbH*) mit einem Durchfluss von 5 mL/min. Eine Multospher 100 C₁₈-Säule (5 µm, 250 mm × 20 mm, *CS Chromatographie GmbH*) mit einem Durchfluss von 10 mL/min. Eine Multokrom 100 C₁₈-Säule (5 µm, 150 × 10 mm, *CS Chromatographie GmbH*) mit einem Durchfluss von 5 mL/min. Eine Multokrom 100 C₁₈-Säule (5 µm, 250 × 10 mm, *CS Chromatographie GmbH*) mit einem Durchfluss von 5 mL/min. Eine Multokrom 100 C₁₈-Säule (5 µm, 250 × 20 mm, *CS Chromatographie GmbH*) mit einem Durchfluss von 10 mL/min.

Elektronenspray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS)

Elektronenspray-Ionisations Massenspektrometrie wurde an einem Expression CMS Quadrupol Gerät der Firma *Advion Inc.* (Ithaca, USA) durchgeführt.

Flash-Chromatographie

Aufreinigungen von Zwischen- oder Endprodukten über Flash-Chromatographie wurden an einem Isolera™ Prime System der Firma *Biotage* (Uppsala, Schweden), mit einer Biotage 09474 Rev. E Bio Pumpe desselben Herstellers, durchgeführt. Zur Aufreinigung wurde ein linearer Gradient von MeCN (zzgl. 0.1% TFA, 2% H₂O v/v) in H₂O (zzgl. 0.1% TFA v/v) gefahren. Als stationäre Phase wurde eine Biotage™ SNAP KP-C₁₈ Kartusche (12 g Kartuschenmaterial, Porendurchmesser: 93 Å, Oberfläche: 382 m²/g) der Firma *Biotage* (Uppsala, Schweden) verwendet.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

Lyophilisator

Die Gefriertrocknung von Zwischen- und Endprodukten wurde an einem Alpha 1-2 Lyophilisationsgerät der Firma *Christ* (Osterode am Harz, Deutschland) und mittels einer RZ-2 Vakuumpumpe der *Vacuobrand GmbH* durchgeführt. Der zu trocknende Feststoff wurde zuvor in H₂O und *tert*-Butanol (*t*BuOH) gelöst und die Lösung bei -80 °C eingefroren.

Säulen- und Dünnschichtchromatographie (DC)

Für säulenchromatographische Aufreinigungen wurde Kieselgel (Partikeldurchmesser: 40-63 µm) der Firma *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (München, Deutschland) verwendet. Qualitative Dünnschichtchromatogramme wurden auf Fertigplatten der Firma *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) aufgenommen (0.25 mm Kieselgel 60, F₂₅₄). Die Detektion erfolgte durch Fluoreszenzdetektion im UV-Licht ($\lambda = 254$ nm).

Radiodünnschichtchromatographie (Radio-DC)

Die Vollständigkeit von radioaktiven Markierungen mit ¹⁸F oder ¹⁷⁷Lu wurde mittels Radiodünnschichtchromatographie ermittelt. Zur Auswertung wurde ein Scan-RAM Detektor der Firma *LabLogic Systems Inc.* (Brandon, USA) und die Software *Laura* derselben Firma verwendet.

Gammazähler

Zur Quantifizierung der Zerfallsrate radioaktiver Proben im kBq-Bereich wurde ein Gammazähler vom Modell 2480 Wizard² der Firma *PerkinElmer Inc.* (Waltham, USA) verwendet.

Aktivimeter

Zur Quantifizierung der Zerfallsrate radioaktiver Proben im MBq- bis GBq-Bereich, wurde ein Aktivimeter vom Modell CRC®-55tW der Firma *Mirion Technologies.* (Florham Park, USA) verwendet.

Auswertung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀ oder Affinität)

Zur Ermittlung des IC₅₀ (halbmaximale inhibitorische Konzentration) wurde die GraphPad PRISM Software der Firma *GraphPad Software Inc.* (La Jolla, USA) verwendet.

Brutschrank

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem HERAcell 150i-Inkubator der Firma *Thermo Fischer Scientific Inc.* (Waltham, USA). Als Brutbedingung wurden standardmäßig 37 °C und eine 5%ige CO₂-Atmosphäre gewählt.

Sicherheitswerkbank

Sterile Arbeiten wurden in einer sterilen Sicherheitswerkbank der Firma *Thermo Fischer Scientific Inc.* (Waltham, USA) durchgeführt. Alle innerhalb der Sicherheitswerkbank verwendeten Materialien wurden vor Einbringen in selbige autoklaviert und/oder mit 80% Ethanol (*v/v*) desinfiziert.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

Mikroskopie

Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Kontrolle des Zellwachstums wurde ein Inversmikroskop vom Modell AE 2000 der Firma *Motic Deutschland GmbH* (Wetzlar, Deutschland) verwendet. Zur Zellzählung wurde eine *Neubauer-Zählkammer* (0.1 mm Tiefe, 2.50 μm^2 Fläche) verwendet.

Zentrifugen

Zur Separation von Niederschlägen und flüssigen Überständen während der chemischen Synthese oder zur Separation von Zellen und dem korrespondierenden Nährmedium, kamen zwei Zentrifugen zum Einsatz. Für bis zu 2 mL Volumen wurde eine Heraeus Pico17-Zentrifuge der Firma *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, USA) eingesetzt. Für Volumina bis zu 50 mL wurde eine Heraeus Megafuge 16R-Zentrifuge der Firma *Thermo Fischer Scientific* (Waltham, USA) verwendet.

μ PET/CT Kleintier Scanner

Imaging Experimente wurden an einem MILabs VECTor⁴ small-animal SPECT/PET/OI/CT durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels der PMOD software (Version 4.0) ausgewertet.

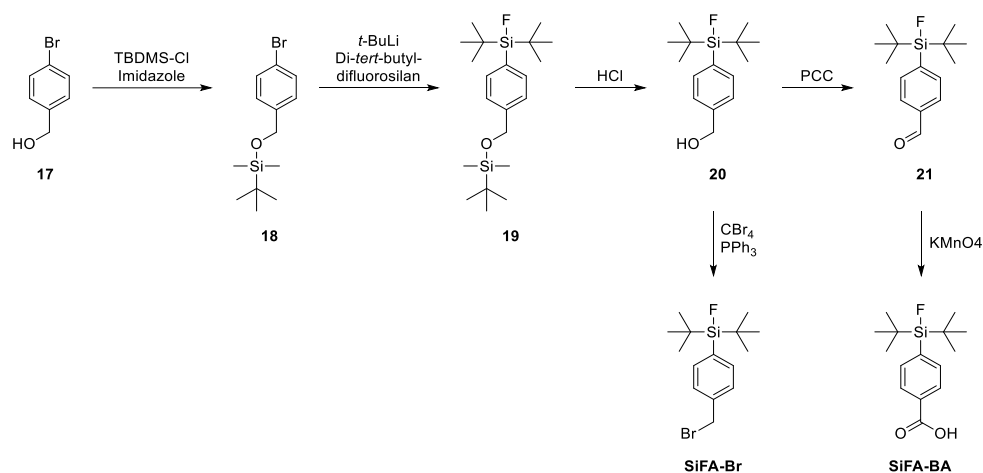
Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Für Messungen von Kernresonanzspektren wurden die Geräte AVHD-300 (300 MHz) oder AVHD-400 (400 MHz) der Firma *Bruker* (Billerica, USA) verwendet. Die Spektren wurden jeweils bei 300 K aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Werten (ppm) angegeben und beziehen sich im ¹H-Spektrum auf die jeweiligen Restprotonensignale des verwendeten deuterierten Lösungsmittels Chloroform-*d*₁ $\delta = 7.26$ ppm. In ¹³C-Spektren wurden die Deuterium-gekoppelten Signale der verwendeten Lösungsmittel als Referenz verwendet. Für die Zuordnung der einzelnen Signale und ihre Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s - Singulett, d - Dublett, m - Multiplett. Die angegebenen Kopplungskonstanten *J* sind als Mittelwerte der experimentell gefundenen Werte angegeben.

Zelllinien und Mausmodell

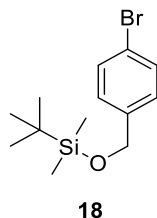
Die Bestimmung der Affinität (IC₅₀) wurde mit SST₂ transfizierten CHO Zellen durchgeführt. Im Folgenden wird mit CHO-SST₂ auf diese Zelllinie Bezug genommen. Für Internalisierungsstudien und zur Maus-Inokulation wurden AR42J Zellen eingesetzt. Für *in vivo* Studien wurden weibliche CD1 *nu/nu* Mäuse der Firma *Charles River Laboratories Inc.* (Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt.

2. Organische Synthese



Schema 1: Synthesestrategie für die Herstellung von SiFA-Bromid (**SiFA-Br**) und SiFA-Benzoesäure (**SiFA-BA**).

((4-Bromobenzyl)oxy)(*tert*-butyl)dimethylsilan (**18**)



In einem Rundkolben werden 4.68 g 4-Brom-benzylalkohol (**17**) (25.0 mmol, 1.00 Äq.) in 70 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst. Unter Rühren werden 2.04 g Imidazol (30.0 mmol, 1.20 Äq.) und 4.52 g TBDMSC-Chlorid (30.0 mmol, 1.20 Äq.) hinzugefügt und die Lösung für 20 h bei RT zur Reaktion belassen. Die Reaktionslösung wird zu 250 mL eiskaltem H₂O gegeben gefolgt von Extraktion mittels Diethylether (Et₂O) (5 × 50 mL). Die organischen Phasen werden vereint und mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (100 mL) und Brine (100 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und das Rohprodukt über Säulenchromatographie aufgereinigt (5% Ethylacetat (EtOAc) in Petrolether *v/v*). Nachdem die Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurden, werden 7.24 g ((4-Bromobenzyl)oxy)(*tert*-butyl)dimethylsilan (**18**) (24.1 mmol, 96%) als farbloses Öl erhalten.

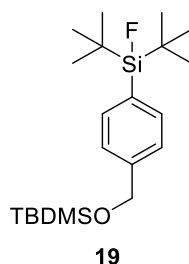
DC (SiO₂, 5% EtOAc/Petrolether): **R_f** = 0.97 [UV]

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.45 (d, ³*J* = 8 Hz, 2 H, H_{Ar}), 7.20 (d, ³*J* = 8 Hz, 2 H, H_{Ar}), 4.68 (s, 2 H, Ar-CH₂), 0.94 (s, 9 H, C-CH₃), 0.10 (s, 6 H, Si-CH₃).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 140.3 (s, C_i), 130.1 (s, C_m), 127.5 (s, C_o), 120.4 (s, C_p), 64.2 (s, CH₂), 25.8 (s, C-CH₃), 18.2 (s, C-CH₃), 5.4 (s, Si-CH₃).

II. MATERIALIEN UND METHODEN

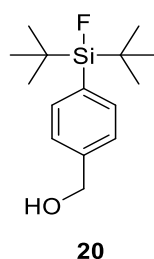
Di-*tert*-butyl(4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)phenyl)fluorsilan (**19**)



In einem Rundkolben mit Schutzgas Atmosphäre, werden 7.24 g **18** (24.1 mmol, 1.00 Äq.) in 67 mL trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Trockeneis und Aceton) gekühlt. Über eine Dauer von 1.5 h, werden 32.6 mL einer 1.7 M Lösung von *t*BuLi in *n*-Pentan (55.4 mmol, 2.30 Äq.) tropfenweise zur Lösung von **18** in THF gegeben. Die Reaktionslösung wird für weitere 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. In einem weiteren Rundkolben, werden 5.00 g Di-*tert*-butyldifluorsilan (27.7 mmol, 1.10 Äq.) in 44 mL trockenem THF ebenfalls auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Trockeneis und Aceton) gekühlt. Über eine Dauer von 2 h wird unter konstanter Kühlung und Rühren, die Lösung von **18** und *t*BuLi tropfenweise zur Lösung von Di-*tert*-butyldifluorsilan gegeben. Die Reaktionslösung wird über 15 h auf Raumtemperatur erwärmt und durch Zugabe von 120 mL Brine abgebrochen. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Et₂O extrahiert (3 × 100 mL). Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es werden 9.14 g Di-*tert*-butyl(4-(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)-phenyl)fluorsilan (**19**) (23.9 mmol, 99%) als gelbliches Öl isoliert. Das Produkt wird ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 143.0 (s, C_i), 134.1 (d, ³*J* (¹³C, ¹⁹F) = 12 Hz, C_m), 132.0 (d, ²*J* (¹³C, ¹⁹F) = 56 Hz, C_p), 125.3 (s, C_o), 65.0 (s, CH₂), 27.5 (s, CH₃), 26.8 (s, C-CH₃), 26.1 (s, CH₃), 20.4 (d, ²*J* (¹³C, ¹⁹F) = 8 Hz, C-CH₃), 5.11 (s, Si-CH₃).

(4-(Di-*tert*-butylfluorsilyl)phenyl)methanol (**20**)



In einem Rundkolben werden 9.14 g **19** (23.9 mmol, 1.00 Äq.) in 50 mL Methanol (MeOH) gelöst. Nach der Zugabe von 3.00 mL konzentrierter HCl (97.0 mmol, 4.10 Äq.), wird die Reaktionslösung für 18 h bei RT zur Reaktion belassen. Lösung wird im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Et₂O aufgenommen und die organische Phase mit gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase

II. MATERIALIEN UND METHODEN

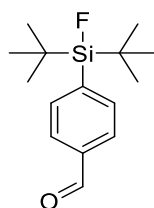
wird mit Et₂O extrahiert (3 × 50 mL), die organischen Phasen vereint und über MgSO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt und 5.90 g (4-(Di-*tert*-butylfluorosilyl)phenyl)methanol (**20**) (22.0 mmol, 92%) als gelbliches Öl isoliert. Das Produkt wird ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 7.61 (d, 2 H, ³*J* = 8 Hz, H_{Ar}), 7.38 (d, 2 H, ³*J* = 8 Hz, H_{Ar}), 4.72 (s, 2 H, Ar-CH₂), 1.06 (s, 18 H, C-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 142.3 (s, C_i), 134.4 (d, ³*J* (¹³C, ¹⁹F) = 12 Hz, C_m), 133.1 (d, ²*J* (¹³C, ¹⁹F) = 56 Hz, C_p), 125.6 (s, C_o), 65.4 (s, CH₂), 27.4 (s, CH₃), 20.4 (d, ²*J* (¹³C, ¹⁹F) = 8 Hz, C-CH₃).

RP-HPLC (50-100 % B in 15 min) *t*_R = 10.7 min

4-(Di-*tert*-butylfluorosilyl)benzaldehyd (**21**)



21

Alkohol **20** (5.90 g, 55.0 mmol, 2.5 Äq.) wird in 60 mL trockenem Dichlormethan (DCM) gelöst und tropfenweise zu einer eiskalten Lösung von 11.9 g Pyridiniumchlorochromat (PCC) (55.0 mmol, 2.50 Äq.) in 180 mL trockenem DCM gegeben. Die Lösung wird für 30 min bei 0 °C und 4 h bei RT gerührt. Durch die Zugabe von 60 mL Et₂O wird die Reaktion abgebrochen und der Überstand abdekantiert. Der unlösliche, schwarze Rückstand wird mehrfach mit Et₂O gewaschen und die vereinten organischen Phasen werden über Silica filtriert. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (2.5% EtOAc in Petrolether *v/v*). Nachdem die Lösungsmittel im Vakuum entfernt werden, werden 2.22 g 4-(Di-*tert*-butylfluorosilyl)-benzaldehyd (**21**) (8.33 mmol, 36%) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 10.1 (s, 1 H, CHO), 7.88 (d, ³*J* = 6 Hz, 2 H, H_{Ar}), 7.79 (d, ³*J* = 9 Hz, 2 H, H_{Ar}), 1.07 (s, 18 H, C-CH₃).

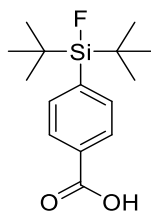
¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 192.7 (s, CHO), 142.5 (s, C_i), 137.2 (s, C_p), 134.7 (d, ³*J* (¹³C, ¹⁹F) = 12 Hz, C_m), 128.6 (s, C_o), 27.4 (s, CH₃), 20.5 (s, C-CH₃).

¹⁸F-NMR (CDCl₃) = δ [ppm] = 188.4 (s, F).

RP-HPLC (50-100 % B in 15 min) *t*_R = 15.9 min.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

4-(Di-*tert*-butylfluorsilyl)benzoesäure (SiFA-BA)



SiFA-BA

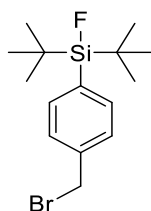
Der Aldehyd **21** (1.00 Äq.) wird in *t*BuOH (23 mL/g Aldehyd) und DCM (2.5 mL/g Aldehyd) gelöst und mit $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (1.25 M, pH = 4.0 – 4.5, 15 mL/g Aldehyd) und $\text{KMnO}_{4\text{aq}}$ (1 M, 23 mL/g Aldehyd) versetzt. Unter Rühren wird die Lösung nach 25 min bei RT auf 5 °C gekühlt und mit KMnO_4 (1.00 Äq.) versetzt. Kurz danach wird die Reaktion durch die Zugabe einer gesättigten, wässrigen NaHCO_3 -Lösung abgebrochen. Die organische Phase wird abgetrennt und über MgSO_4 getrocknet. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt und das Produkt wird durch Umkristallisation aus Et_2O und *n*-Hexan (1/3 v/v) aufgereinigt. 4-(Di-*tert*-butylfluorsilyl)benzoesäure (SiFA-Benzoesäure oder SiFA-BA) wird als farbloser Feststoff isoliert (60% Ausbeute).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.10 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2 H, H_m), 7.74 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 2 H, H_o), 1.07 (s, 18 H, CCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.0 (s, COOH), 141.4 (d, C_p), 134.2 (d, C_m), 129.0 (d, $\text{C}_{i,o}$), 27.4 (s, CCH_3), 20.4 (d, CCH_3).

RP-HPLC (50-100 % in 15 min) $t_R = 8.4$ min.

4-(Bromomethyl)phenyldi-*tert*-butylfluorsilan (SiFA-Br)



SiFA-Br

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von **21** (3.08 g, 11.5 mmol, 1.00 Äq.) und Tetrabrommethan (4.18 g, 12.6 mmol, 1.10 Äq.) in 100 mL trockenem DCM (Schutzgas Atmosphäre), werden, über eine Dauer von 30 min, 3.30 g Triphenylphosphin (PPh_3) (12.6 mmol, 1.10 Äq.) in kleinen Portionen zugegeben. Die Lösung wird für 2 h bei RT zur Reaktion belassen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit kaltem *n*-Hexan (3 × 50 mL) gewaschen. Ein weißer, unlöslicher Rückstand wird filtriert und die Lösung im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (5% EtOAc in Pentan v/v) und 3.06 g 4-(Bromomethyl)phenyldi-*tert*-butylfluorsilan (SiFA-Bromid oder SiFA-Br) nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum, als farbloser Feststoff isoliert (9.20 mmol, 80%).

II. MATERIALIEN UND METHODEN

RP-HPLC (50–100% B in 15 min): $t_R = 9.2$ min, $K' = 3.73$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.58 (2 H, d, C_6H_4), 7.40 (2 H, d, C_6H_4), 4.49 (2 H, s, CH_2OSi), 1.05 (18 H, s, $\text{Si}(t\text{Bu})_2$).

3. Peptidsynthese

3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

Bei der hier angewandten SPPS per Fmoc-Strategie (Fluorenylmethoxycarbonyl), werden Peptide an einem Harz synthetisiert, wobei Fmoc als temporäre, *N*-terminale Schutzgruppe eingesetzt wird. Das Harz wird mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure (Xaa) beladen, Fmoc-entschützt und mit der nächsten Aminosäure umgesetzt. Nach der Fertigstellung des finalen Peptids, wird dieses vom Harz abgespalten. Vor der Verlängerung des Peptids, der Abspaltung von Schutzgruppen oder einer anderen Art von chemischer Modifikation, muss das bereits beladene Harz für mindestens 30 min in einem geeigneten Lösungsmittel (*N,N*-Dimethylformamid (DMF), Dichlormethan (DCM), *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)) gequollen werden. Nach jedem Reaktionsschritt muss das Harz gründlich, mit dem zur Reaktion verwendeten Lösungsmittel, gewaschen werden. Wird kein weiterer Reaktionsschritt durchgeführt, wird das Harz mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Alle Syntheseschritte am Harz, werden in Polypropylen Reaktoren (Spritzen) durchgeführt. Durch manuell ausgeübten Unter- oder Überdruck kann durch eine Luer-Öffnung, Lösungsmittel in den Reaktor oder aus dem Reaktor befördert werden. Durch eine Polyethylenfritte (Porengröße = 25 μm) vor der Luer-Öffnung kann ein gleichzeitiger Austritt des Harzes verhindert werden.

AAV1: Beladung von 2-CTC-Harz

Die Beladung von 2-Chlorotriylchlorid Harz (2-CTC) mit einer Fmoc-geschützten Aminosäure (Fmoc-Xaa-OH) wird durchgeführt indem eine Suspension von 2-CTC-Harz (1.60 mmol/g), Fmoc-Xaa-OH (0.70 Äq.) und Diisopropylethylamin (DIPEA) (4.50 Äq.) in DMF (10 mL/g Harz) für 4 h bei RT zur Reaktion belassen wird. Die Suspension wird mit MeOH (2 mL/g Harz) versetzt und für weitere 15 min zur Reaktion belassen. Das Harz wird filtriert und mit DMF (5×5 mL/g Harz) und MeOH (3×5 mL/g Harz) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die finale Belegungsdichte l der Aminosäure Fmoc-Xaa-OH wird nachfolgender Formel ermittelt:

$$l \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{(m_2 - m_1) \times 1000}{(M_W - M_{\text{HCl}}) m_2}$$

AAV2: Fmoc-Entschätzung am Harz

II. MATERIALIEN UND METHODEN

Fmoc-geschützte Aminosäuren/Peptide am Harz werden durch Zugabe von 20% Piperidin in DMF (v/v; 8 mL/g Harz) entschützt. Die Zugabe erfolgt dabei zweifach (1×5 min, 1×15 min) und anschließend wird das Harz mit DMF (8×5 mL/g Harz) gewaschen.

Die Fmoc-Entschützung ist vor der Konjugation mit weiteren Aminosäuren oder anderen Carbonsäuren meist impliziert und wird daher in den konkreten Syntheseanweisungen nicht immer explizit angegeben.

AAV3: Peptidsynthese am Harz

Fmoc-Xaa-OH oder eine andere zu konjugierende Carbonsäure (3.00 Äq.), wird in DMF gelöst (8 mL/g Harz) und mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU) (3.00 Äq.), 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) (3.00 Äq.) und DIPEA (3.00 Äq.), 10 min bei RT voraktiviert. Das Harz-gebundene Peptid $\text{NH}_2\text{-(Xaa)}_x\text{-2-CT}$ (1.00 Äq.) wird mit der voraktivierten Lösung versetzt und unter Schütteln für 2 h bei RT zur Reaktion belassen. Die Vollständigkeit der Reaktion wird mittels Testabspaltung, gefolgt von analytischer RP-HPLC und ESI-MS, untersucht. Bei Unvollständigkeit kann die Reaktionszeit verlängert werden. Bei Vollständigkeit wird das Harz mit DMF gewaschen (6×5 mL/g Harz) und kann für weitere Modifikationen eingesetzt werden. Andere Bausteine, wie die SiFA-Benzoesäure, werden ebenfalls nach der beschriebenen Methode konjugiert. Für Chelatoren und zur Razemisierung neigende Aminosäuren (Dap, Cys) finden sich im Folgenden eigene Syntheseprotokolle (AAV4, AAV5 und AAV6).

AAV4: Peptidsynthese am Harz: Diaminopropionsäure (Dap)

N-Terminal und Seitenketten geschützte Derivate der Diaminopropionsäure (Dap) werden nach einem angepassten Protokoll konjugiert. Die Aminosäure (1.50 Äq.) wird in DMF gelöst (8 mL/g Harz) und mit TBTU (1.50 Äq.), HOAt (1.50 Äq.) und 2,4,6-Collidin (5.50 Äq.), 2 min bei RT voraktiviert. Alle folgenden Schritte sind analog zu AAV3 durchzuführen. Wird Dap sowohl mit Fmoc als auch mit der 2-Actetyldimedon-Schutzgruppe (Dde) eingesetzt, so muss beachtet werden, dass grundsätzlich zuerst die Dde-Schutzgruppe orthogonal zur Fmoc-Schutzgruppe abzuspalten ist (AAV2 und AAV7). Andernfalls wird nach der Fmoc-Entschützung die Dde-Schutzgruppe teilweise umgelagert.

AAV5: Peptidsynthese am Harz: Cystein (Cys)

N-terminal- und Seitenketten geschützte Derivate des Cystein (Cys) werden nach einem angepassten Protokoll konjugiert. Die Aminosäure (2.00 Äq.) wird in DMF gelöst (8 mL/g Harz) und mit *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC, 4.00 Äq.), Ethylcyanohydroxyiminoacetat (Oxyma, 2.00 Äq.) und DIPEA (0.80 Äq.), 2 min bei RT voraktiviert. Alle folgenden Schritte sind analog zu AAV3 durchzuführen.

AAV6: Chelator Konjugation am Harz

II. MATERIALIEN UND METHODEN

2-(4,7,10-Tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)essigsäure (DOTA(*t*Bu)₃) und 5-(*Tert*-butoxy)-5-oxo-4-(4,7,10-tris(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)pentansäure (*R/S*-DOTAGA(*t*Bu)₄): Der Chelator (3.00 Äq.) wird in DMF (8 mL/g Harz) gelöst und mit TBTU (3.00 Äq.), HOAt (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (11.0 Äq), 10 min bei RT voraktiviert.

2-(4,7,10-Tris(2-amino-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)essigsäure (DO3AM-Essigsäure): Der Chelator (2.20 Äq.) wird in DMF (8 mL/g Harz) gelöst und mit TBTU (2.00 Äq.), HOAt (2.00 Äq.) und DIPEA (3.00 Äq), 10 min bei RT voraktiviert.

Das Harz-gebundene Peptid NH₂-(Xaa)_x-2-CT (1.00 Äq.) wird mit der voraktivierten Lösung versetzt und unter Schütteln für 2-4 h bei RT zur Reaktion belassen. Die Vollständigkeit der Reaktion *muss* mittels Testabspaltung, gefolgt von analytischer RP-HPLC und ESI-MS, untersucht werden. Bei Unvollständigkeit kann die Reaktionszeit verlängert oder weitere Äquivalente der Reaktanden hinzugefügt werden. Bei Vollständigkeit wird das Harz mit DMF gewaschen (6 × 5 mL/g Harz) und kann für weitere Modifikationen eingesetzt werden.

AAV7: Dde-Entschützung am Harz

Das Dde-geschützte Peptid am Harz, wird mit einer Lösung aus Imidazol (0.92 g) und Hydroxylamin Hydrochlorid (1.26 g) in NMP (5 mL) und DCM (1 mL) versetzt und für 3 h bei RT zur Reaktion belassen. Die Vollständigkeit der Reaktion wird mittels Testabspaltung, gefolgt von analytischer RP-HPLC und ESI-MS, untersucht. Bei Vollständigkeit wird das Harz mit NMP gewaschen (6 × 5 mL/g Harz) und kann für weitere Modifikationen eingesetzt werden.

AAV8: Abspaltung vom Harz unter Schutzgruppenerhalt

Das Harz-gebundene Peptid wird mit einer Lösung aus Hexafluorisopropanol (HFIP) und DCM (4/1 v/v, 8 mL/g Harz) behandelt. Nach 45 min bei RT, wird die Lösung, welche das geschützte Peptid enthält, in einen Rundkolben überführt und das Harz mit einer weiteren Portion der Abspaltungslösung versetzt. Nach weiteren 45 min bei RT, werden die Lösungen vereint und die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird lyophilisiert und das geschützte Peptid verbleibt als Feststoff (Lyophilisation vgl. AAV12).

AAV9: Abspaltung vom Harz mit gleichzeitiger Entschützung Säurelabiler Schutzgruppen (*t*Bu, Trt, Boc, Pbf)

Das Harz-gebundene Peptid wird mit einer Lösung aus Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIPS) und H₂O (95/2.5/2.5 v/v/v; 8 mL/g Harz) behandelt. Nach 45 min bei RT, wird die Lösung, welche das entschützte Peptid enthält, in einen Rundkolben überführt und das Harz mit einer weiteren Portion der Abspaltungslösung versetzt. Nach weiteren 45 min bei RT, werden die Lösungen vereint und die Lösung im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Enthält das Peptid einen *t*Bu-geschützten Chelator (DOTA(*t*Bu)_x oder *R/S*-DOTAGA(*t*Bu)_x), werden die vereinten Lösungen noch weitere 60 min

II. MATERIALIEN UND METHODEN

bei RT inkubiert, bevor mit der Einengung im Stickstoffstrom begonnen wird. Der Rückstand wird lyophilisiert und das entschützte Peptid verbleibt als farbloser Feststoff (Lyophilisation vgl. AAV12). Enthält das Peptid ein Derivat des Tryptophans (Trp), welches während der Synthese am Harz an der Seitenkette Boc-geschützt vorlag, muss dieses vor der weiteren Verwendung in einem geringen Volumen aus MeCN und H₂O gelöst werden und diese Lösung für 30 min bei 40 °C inkubiert werden. Andernfalls liegt Trp noch teilweise geschützt vor (vgl. AAV11).

AAV10: Reaktionskontrolle: Testabspaltung und Analytik

Um die Vollständigkeit einer chemischen Modifikation am Harz (Kopplung einer Aminosäure, orthogonale Entschützung, u.v.m.) zu verifizieren, wird eine geringe Menge des zu untersuchenden Harzes in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Das Harz wird mit 200 µL der unter AAV8 oder AAV9 beschriebenen Abspaltlösungen versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand (enthält das Peptid) wird in 50 µL MeCN/H₂O (1/1 v/v) aufgenommen und einer Untersuchung mittels analytischer RP-HPLC unterzogen. Die im UV/VIS-Detektor beobachteten Intensitätsmaxima werden in 1.5 mL Reaktionsgefäßen manuell isoliert und anschließend einzeln per ESI-MS untersucht. Anhand der MS-Spektren kann eine Bewertung der Vollständigkeit einer chemischen Reaktion vorgenommen werden.

AAV11: Präparative Aufreinigung mittels RP-HPLC

Vollständig entschützte Peptide (falls erforderlich auch geschützte Zwischenprodukte) werden vor ihrer Verwendung für *in vitro* und *in vivo* Studien einer präparativen Aufreinigung unterzogen. Das lyophilisierte Rohprodukt wird zunächst in einem möglichst geringen Volumen (500 µL/25 µmol Harz) gelöst. Als Lösungsmittel wird eine, der Löslichkeit des Peptids entsprechende, Mischung aus MeCN und H₂O eingesetzt. Enthält das Peptid ein Derivat des Tryptophans (Trp), welches während der Synthese am Harz an der Seitenkette Boc-geschützt vorlag, muss diese Lösung für 30 min bei 40 °C inkubiert werden. Andernfalls liegt Trp noch teilweise geschützt vor. Anschließend wird die Lösung portionsweise in das präparative RP-HPLC System eingebracht. Die im UV/VIS-Detektor beobachteten Intensitätsmaxima werden in 20 mL Reaktionsgefäßen manuell isoliert und anschließend einzeln per ESI-MS untersucht. Anhand der MS-Spektren kann das gewünschte Produkt identifiziert und gezielt isoliert werden. Die Produktfraktionen werden vereint, die Lösungsmittel im Vakuum bis zur Trockne eingengt, der Rückstand wird lyophilisiert und das aufgereinigte Peptid verbleibt als Feststoff (Lyophilisation vgl. AAV12).

AAV12: Lyophilisation

Zwischenprodukte und Endprodukte werden zur vollständigen Trocknung, je nach Löslichkeit, in einer geeigneten Mischung aus *t*BuOH und H₂O gelöst und für etwa 30 min bei -80 °C gelagert. Anschließend werden sie im Vakuum lyophilisiert und nach vollständiger Sublimation der Lösungsmittel bei -20 °C

II. MATERIALIEN UND METHODEN

gelagert, weiter umgesetzt oder für die weitere Verwendung in Lösung gebracht. 3.1.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften für Metallkomplexierungen.

AAV13: Herstellung einer Stammlösung

Geringe Mengen des Peptids (1-5 mg) werden in ein LowBind Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf eingewogen und in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die gewünschte Konzentration beträgt 2 mM. Dem Molekulargewicht des Peptids wird je primärem Amin (z.B. Lys, Orn, Dap, Arg) und je enthaltenem SiFAN⁺Gly, ein Molekül TFA hinzugerechnet und auf dieser Basis die Stoffmenge des eingewogenen Peptids ermittelt.

AAV14: Bildung von [^{nat}Ga]Ga-Komplexen (DOTA, R/S-DOTAGA)

Für die Komplexierung wird eine 2 mM Stammlösung des Peptids mit einer Lösung aus [^{nat}Ga]Ga(NO₃)₃ (1.50 Äq., 100 mM in Tracepure-H₂O) versetzt. Um eine finale Konzentration von 1 mM zu erreichen, wird DMSO zugesetzt. Die Lösung wird für 40 min bei 70 °C inkubiert und der stöchiometrische Umsatz des Chelators mit [^{nat}Ga] mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS bestätigt.

AAV15: Bildung von [^{nat}Lu]Lu-Komplexen (DOTA, R/S-DOTAGA)

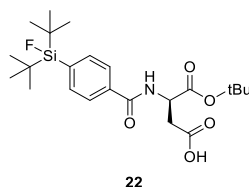
Für die Komplexierung wird eine 2 mM Stammlösung des Peptids mit einer Lösung aus [^{nat}Lu]LuCl₃ (1.50 Äq., 20 mM in Tracepure-H₂O) versetzt. Um eine finale Konzentration von 1 mM zu erreichen, wird DMSO zugesetzt. Die Lösung wird für 40 min bei 90 °C inkubiert und der stöchiometrische Umsatz des Chelators mit ^{nat}Lu mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS bestätigt.

AAV16: Bildung von [^{nat}Pb]Pb-Komplexen (DO3AM)

Für die Komplexierung wird eine 2 mM Stammlösung des Peptids mit einer Lösung aus [^{nat}Pb]PbCl₂ (1.10 Äq., 10 mM in Tracepure-H₂O) versetzt. Um eine finale Konzentration von 1 mM zu erreichen, wird DMSO zugesetzt. Die Lösung wird für 40 min bei 70 °C inkubiert und der stöchiometrische Umsatz des Chelators mit [^{nat}Pb] mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS bestätigt.

3.2 Synthese peptidischer Bausteine

Synthese von SiFA-D-Asp-OfBu (22)



Die Synthese von SiFA-D-Asp-OfBu (**22**) erfolgt unter Verwendung der allgemeinen Arbeitsvorschriften. 2-CTC-Harz wird mit Fmoc-D-Asp-OfBu beladen (AAV1) und Fmoc-entschützt (AAV2). SiFA-BA wird analog zu AAV3, unter Verwendung von HOAt (1.50 Äq.), TBTU (1.50 Äq.) und 2,4,6-Collidin (5.50 Äq.), konjugiert. **22** wird unter Schutzgruppenerhalt vom Harz abgespalten

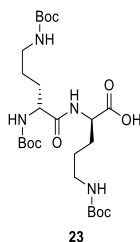
II. MATERIALIEN UND METHODEN

(AAV8) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird **22** als farbloser Feststoff erhalten. Die korrekte Produktbildung wird mittels RP-HPLC und ESI-MS überprüft.

RP-HPLC (10 – 90% in 15 min): $t_R = 17.1$ min.

ESI-MS: m_{exakt} ($C_{19}H_{28}FNO_5Si$): 397.2; m_{gefunden} : $m/z = 398.2 [M+H]^+$.

Synthese von Boc-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-OH (**23**)

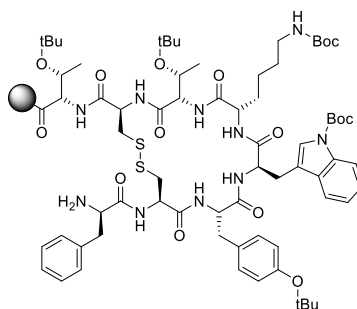


Die Synthese von Boc-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-OH (**23**) erfolgt unter Verwendung der allgemeinen Arbeitsvorschriften. 2-CTC-Harz wird mit Fmoc-D-Orn(Boc)-OH beladen (AAV1) und Fmoc-entschützt (AAV2). Boc-D-Orn(Boc)-OH wird analog zu AAV3, unter Verwendung von HOAt (1.50 Äq.), TBTU (1.50 Äq.) und 2,4,6-Collidin (5.50 Äq.), konjugiert. **23** wird unter Schutzgruppenerhalt vom Harz abgespalten (AAV8) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird **23** als farbloser Feststoff erhalten.

3.3 Variation des Bindemotivs

3.3.1 Synthese von SST Bindemotiven am Harz

H-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-Tyr(*t*Bu)-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT (H-TATE(PG)-2-CT; **V1**)



Peptid Sequenz

Die Synthese von vollständig geschütztem TATE am Harz (H-TATE(PG)-2-CT; **V1**) wird analog zu publizierten Verfahren und mittels der allgemeinen Arbeitsvorschriften, durchgeführt.[131, 140] 2-CTC-Harz wird mit Fmoc-L-Thr (*t*Bu)-OH beladen (AAV1). Nacheinander werden Fmoc-L-Cys (Acm)-OH (AAV5), Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-L-Lys (Boc)-OH (AAV3), Fmoc-D-Trp

II. MATERIALIEN UND METHODEN

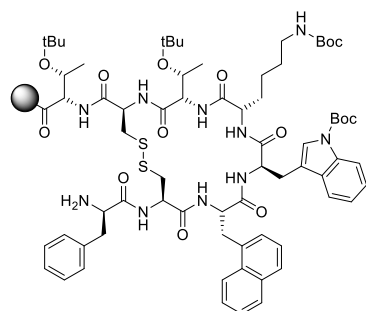
(Boc)-OH (AAV3), Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-L-Cys(Acm)-OH (AAV5) und Fmoc-D-Phe-OH (AAV3) konjugiert. Vor der Kopplung der jeweils nächsten Aminosäure wird der *N*-Terminus Fmoc-entschützt (AAV2). Die Fmoc-Schutzgruppe der finalen Aminosäure wird erst nach der Bildung der Disulfidbrücke entschützt.

Bildung der Disulfidbrücke[131, 140, 169, 170]

Fmoc-D-Phe-L-Cys(Acm)-L-Tyr(*t*Bu)-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys(Acm)-L-Thr(*t*Bu)-2-CT (1.00 Äq.) wird mit $\text{I}(\text{TFA})_3$ (4.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz) versetzt und 45 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird verworfen und das Harz mit einer weiteren Portion der Reaktionslösung versetzt. Nach weiteren 45 min bei RT wird die Lösung verworfen und das Harz mit DMF (6×5 mL/g Harz) gewaschen. Die Vollständigkeit der Zyklisierung wird mittels Testabspaltung gefolgt von analytischer RP-HPLC und ESI-MS untersucht (AAV10). Nach abschließender Fmoc-Entschützung (AAV2) liegt das Harz-gebundene Produkt, H-D-Phe-*cyclo*[L-Cys-L-Tyr(*t*Bu)-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT (H-TATE(PG)-2-CT; **V1**), vor.

Fmoc-D-Phe-*cyclo*[L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys]-L-Thr-OH: **RP-HPLC** (10 – 90% in 15 min); $t_R = 10.8$ min. **ESI-MS**: $m_{\text{exakt}} (\text{C}_{64}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}_2)$: 1270.5; m_{gefunden} : $m/z = 1273.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

H-D-Phe-*cyclo*[L-Cys-L-1-Nal-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT (H-NOCATE(PG)-2-CT, **V2**)



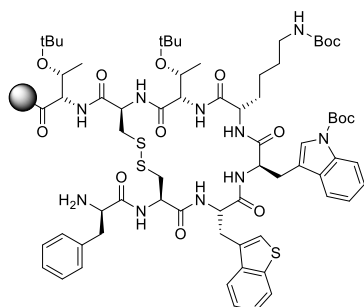
Die Synthese von vollständig geschütztem NOCATE am Harz (H-D-Phe-*cyclo*[L-Cys-L-1-Nal-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT; H-NOCATE(PG)-2-CT; **V2**) wird analog zur Synthese von **V1** durchgeführt. Statt Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH wird Fmoc-L-1-Nal-OH eingesetzt.

Fmoc-D-Phe-*cyclo*[L-Cys-L-1-Nal-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys]-L-Thr-OH: **RP-HPLC** (10 – 90% in 15 min); $t_R = 12.7$ min.

ESI-MS: $m_{\text{exakt}} (\text{C}_{68}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}_2)$: 1304.5; m_{gefunden} : $m/z = 1305.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

H-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-3-BzThi-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT (H-BOCATE(PG)-2-CT, V3)

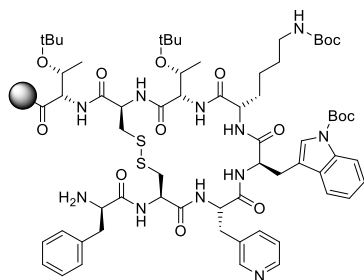


Die Synthese von vollständig geschütztem BOCATE am Harz (H-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-3-BzThi-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT; H-BOCATE(PG)-2-CT; **V3**) wird analog zur Synthese von **V1** durchgeführt. Statt Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH wird Fmoc-L-3-BzThi-OH eingesetzt.

Fmoc-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-3-BzThi-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys]-L-Thr-OH: **RP-HPLC** (10 – 90% in 15 min): $t_R = 12.6$ min. **ESI-MS**:

m_{exakt} ($C_{66}H_{74}N_{10}O_{13}S_3$): 1310.5; m_{gefunden} : $m/z = 1311.3$ $[M+H]^+$.

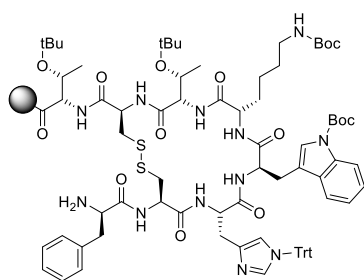
H-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-Pya-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT (H-Pya³-TATE(PG)-2-CT, V4)



Die Synthese von vollständig geschütztem *Pya*³-TATE am Harz (H-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-Pya-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT; H-*Pya*³-TATE(PG)-2-CT; **V4**) wird analog zur Synthese von **V1** durchgeführt. Statt Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH wird Fmoc-L-(3-Pyridyl)alanin-OH (Fmoc-Pya-OH) eingesetzt. Fmoc-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-Pya-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys]-L-Thr-OH:

RP-HPLC (10 – 90% in 15 min): $t_R = 9.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{63}H_{73}N_{11}O_{13}S_2$): 1255.5; m_{gefunden} : $m/z = 1327.3$ $[M+Acm+H]^+$, 664.8 $[M+Acm+2H]^{2+}$.

H-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-His(Trt)-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT (H-His³-TATE(PG)-2-CT, V5)

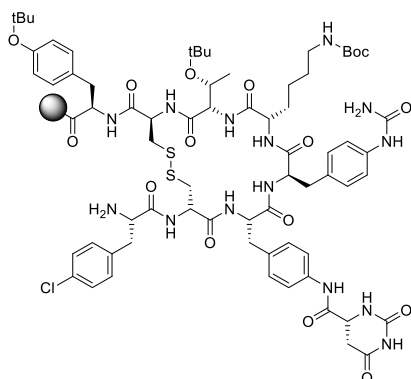


Die Synthese von vollständig geschütztem *His*³-TATE am Harz (H-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-His(Trt)-D-Trp(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-L-Thr(*t*Bu)-2-CT; H-*His*³-TATE(PG)-2-CT; **V5**) wird analog zur Synthese von **V1** durchgeführt. Statt Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH wird Fmoc-L-His(Trt)-OH eingesetzt. Fmoc-D-Phe-cyclo[L-Cys-L-His-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys]-L-Thr-OH:

RP-HPLC (10 – 90% in 15 min): $t_R = 9.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{61}H_{72}N_{12}O_{13}S_2$): 1244.5; m_{gefunden} : $m/z = 623.4$ $[M+2H]^{2+}$, 1245.0 $[M+H]^+$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

H-L-Phe(4-Cl)-*cyclo*[D-Cys-L-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-D-Tyr(*t*Bu)-Rink-Amid (H-JR11(PG)-Rink-Amid, V6)



Peptid Sequenz

Die Synthese von vollständig geschütztem JR11 am Harz (H-JR11(PG)-Rink-Amid; **V6**) wird mittels der allgemeinen Arbeitsvorschriften durchgeführt. Statt des sonst verwendeten 2-CTC Harzes, wird ChemMatrix Rink Amid Harz verwendet. Die erste Aminosäure kann unter Standardbedingungen konjugiert werden. Nacheinander werden Fmoc-D-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Cys(Acm)-OH (AAV5), Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (AAV3), Fmoc-D-Aph(Cbm)-OH (AAV3), Fmoc-L-Aph(Hor)OH (AAV3), Fmoc-D-Cys(Acm)-OH (AAV5) und Fmoc-L-Phe(4-Cl)-OH (AAV3) konjugiert. Vor der Kopplung der jeweils nächsten Aminosäure wird der *N*-Terminus Fmoc-entschützt (AAV2). Die Fmoc-Schutzgruppe der finalen Aminosäure wird erst nach der Bildung der Disulfidbrücke entschützt.

Bildung der Disulfidbrücke

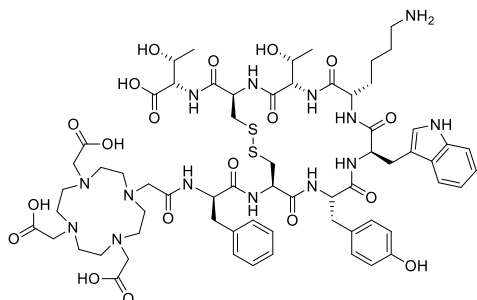
Fmoc-L-Phe(4-Cl)-D-Cys-L-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys-D-Tyr(*t*Bu)-Rink-Amid (1.00 Äq.) wird mit $\text{I}(\text{TFA})_3$ (4.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz) versetzt und 45 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird verworfen und das Harz mit einer weiteren Portion der Reaktionslösung versetzt. Nach weiteren 45 min bei RT wird die Lösung verworfen und das Harz mit DMF (6×5 mL/g Harz) gewaschen. Die Vollständigkeit der Zyklisierung wird mittels Testabspaltung gefolgt von analytischer RP-HPLC und ESI-MS untersucht (AAV10). Nach abschließender Fmoc-Entschützung (AAV2) liegt das Harz-gebundene Produkt, H-L-Phe(4-Cl)-*cyclo*[D-Cys-L-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-L-Lys(Boc)-L-Thr(*t*Bu)-L-Cys]-D-Tyr(*t*Bu)-Rink-Amid (H-JR11(PG)-Rink-Amid; **V6**), vor.

Fmoc-L-Phe(4-Cl)-*cyclo*[D-Cys-L-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-L-Lys-L-Thr-L-Cys]-D-Tyr-NH₂:

RP-HPLC (10 – 90% in 15 min): $t_R = 9.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₇₃H₈₂ClN₁₅O₁₆S₂): 1523.5; m_{gefunden} : $m/z = 1524.2$ [M+H]⁺, 763.7 [M+2H]²⁺.

3.3.2 Synthese von *N*-terminalen DOTA Derivaten

DOTA-TATE

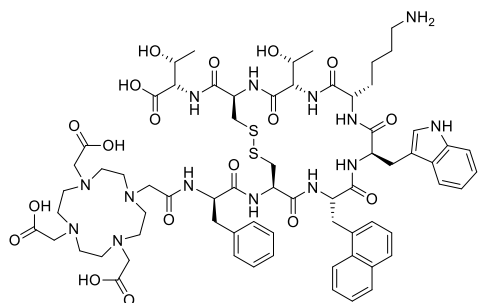


Für die Synthese von DOTA-TATE wird zunächst Harz-gebundenes H-TATE(PG)-2CT (**V1**) analog zu AAV8 unter Erhalt der Schutzgruppen vom Harz abgespalten und Lyophilisation (AAV12) liefert H-TATE(PG)-OH. 5.00 mg H-TATE(PG)-OH (3.53 μmol , 1.00 Äq.) werden in ein 2.00 mL Reaktionsgefäß eingewogen und in 500 μL

II. MATERIALIEN UND METHODEN

trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von 5.31 mg DOTA-NHS-Ester (10.6 μmol , 3.00 Äq.) und 4.30 μL DIPEA (3.19 mg, 24.7 μmol , 7.00 Äq.) wird die Lösung unter Rühren für 18 h bei RT zur Reaktion belassen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeignet und zur Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen, wird der Rückstand in 500 μL TFA/TIPS/ H_2O (95/2.5/2.5 v/v/v) aufgenommen und 90 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird DOTA-TATE als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (25 – 40% in 20 min): $t_R = 9.50$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 8.1$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($\text{C}_{65}\text{H}_{90}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{S}_2$): 1434.6; m_{gefunden} : $m/z = 479.2$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 718.2 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1434.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

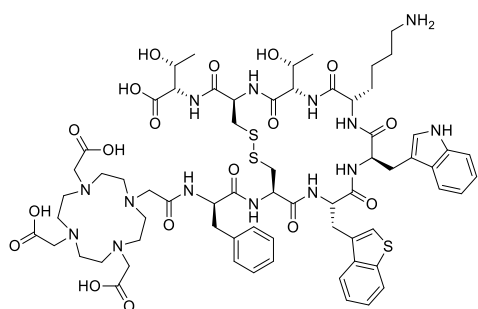
DOTA-NOC-ATE



Ausgehend von H-NOC-ATE(PG)-2-CT (**V2**) erfolgt die Synthese von DOTA-NOC-ATE analog zur Synthese von DOTA-TATE. Eingesetzt werden nach Harzabspaltung 5.00 mg H-NOC-ATE(PG)-OH (3.58 μmol , 1.00 Äq.), 5.40 mg DOTA-NHS-Ester (10.7 μmol , 3.00 Äq.) und 4.37 μL DIPEA (3.24 mg, 25.1 μmol , 7.00 Äq.) in 500 μL trockenem DMF. Alle weiteren Schritte sind übertragbar und

DOTA-NOC-ATE wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (27 – 45% in 20 min): $t_R = 15.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 10.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($\text{C}_{69}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{18}\text{S}_2$): 1468.6; m_{gefunden} : $m/z = 490.1$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 735.0 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1469.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1960.0 $[\text{4M}+3\text{H}]^{3+}$.

DOTA-BOC-ATE

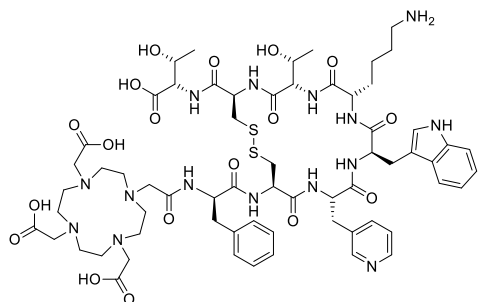


Ausgehend von H-BOC-ATE(PG)-2-CT (**V3**) erfolgt die Synthese von DOTA-BOC-ATE analog zur Synthese von DOTA-TATE. Eingesetzt werden nach Harzabspaltung 5.00 mg H-BOC-ATE(PG)-OH (3.57 μmol , 1.00 Äq.), 5.37 mg DOTA-NHS-Ester (10.7 μmol , 3.00 Äq.) und 4.35 μL DIPEA (3.23 mg, 25.0 μmol , 7.00 Äq.) in 500 μL trockenem DMF. Alle weiteren Schritte sind übertragbar und

DOTA-BOC-ATE wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (27 – 45% in 20 min): $t_R = 14.4$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 10.1$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($\text{C}_{67}\text{H}_{92}\text{N}_{14}\text{O}_{18}\text{S}_3$): 1476.6; m_{gefunden} : $m/z = 492.5$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 738.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1474.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

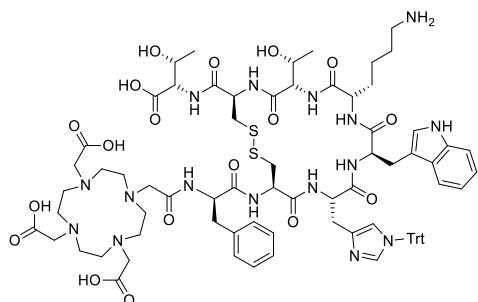
DOTA-*Pya*³-TATE



Ausgehend von H-*Pya*³-TATE(PG)-2-CT (**V4**) erfolgt die Synthese von DOTA-*Pya*³-TATE analog zur Synthese von DOTA-TATE. Eingesetzt werden nach Harzabspaltung 5.00 mg H-*Pya*³-TATE(PG)-2-CT (3.72 μmol , 1.00 Äq.), 5.59 mg DOTA-NHS-Ester (11.1 μmol , 3.00 Äq.) und 4.53 μL DIPEA (3.36 mg, 26.0 μmol , 7.00 Äq.) in 500 μL trockenem DMF. Alle weiteren Schritte sind übertragbar.

DOTA-*Pya*³-TATE wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (20 – 40% in 20 min): $t_R = 12.3$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 7.4$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($\text{C}_{64}\text{H}_{89}\text{N}_{15}\text{O}_{18}\text{S}_2$): 1419.6; m_{gefunden} : $m/z = 474.2$ [$\text{M}+3\text{H}$]³⁺, 710.4 [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺, 1419.8 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.

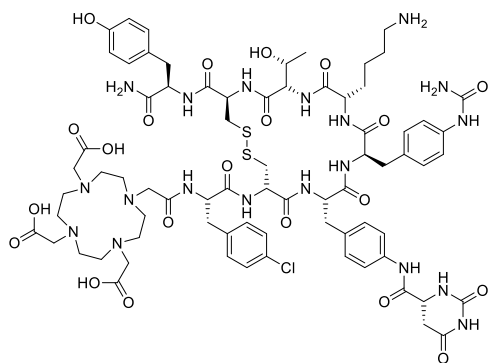
DOTA-*His*³-TATE



Ausgehend von H-*His*³-TATE(PG)-2-CT (**V5**) erfolgt die Synthese von DOTA-*His*³-TATE analog zur Synthese von DOTA-TATE. Eingesetzt werden nach Harzabspaltung 5.00 mg H-*His*³-TATE(PG)-2-CT (3.17 μmol , 1.00 Äq.), 7.24 mg DOTA-NHS-Ester (9.51 μmol , 3.00 Äq.) und 3.87 μL DIPEA (2.87 mg, 22.2 μmol , 7.00 Äq.) in 500 μL trockenem DMF. Alle weiteren Schritte sind übertragbar.

DOTA-*His*³-TATE wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (20 – 40% in 20 min): $t_R = 12.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 7.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($\text{C}_{62}\text{H}_{88}\text{N}_{16}\text{O}_{18}\text{S}_2$): 1408.6; m_{gefunden} : $m/z = 705.2$ [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺, 1408.8 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 1879.2 [$4\text{M}+3\text{H}$]³⁺.

DOTA-JR11



DOTA-JR11 muss durch die Verwendung eines anderen Peptidsynthese-Harzes mittels eines anderen Syntheseprotokolls hergestellt werden. H-JR11(PG)-Rink-Amid **V6** (1.00 Äq.) wird analog zu AAV6 mit dem Chelator DOTA(*t*Bu)₃ (3.00 Äq.) zu DOTA(*t*Bu)₃-JR11(PG)-Rink-Amid umgesetzt. Das Peptid wird anschließend mit TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5; AAV9) entschützt und vom Harz abgespalten. Alle weiteren

Schritte sind analog zur Synthese von DOTA-TATE durchzuführen und DOTA-JR11 wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (28 – 35% in 20 min): $t_R = 12.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 7.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($\text{C}_{74}\text{H}_{98}\text{ClN}_{19}\text{O}_{21}\text{S}_2$): 1687.6; m_{gefunden} : $m/z = 563.8$ [$\text{M}+3\text{H}$]³⁺, 845.2 [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺, 1689.5 [$\text{M}+\text{H}$]⁺.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

3.3.3 Metall Komplexierung

Die Komplexierung von ^{nat}Ga und ^{nat}Lu wird nach den allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV14 und AAV15 durchgeführt und mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS überprüft

$[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Komplexe

$[^{nat}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-JR11: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 8.2$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($\text{C}_{74}\text{H}_{96}\text{ClGaN}_{19}\text{O}_{21}\text{S}_2$): 1754.5; m_{gefunden} : $m/z = 878.5$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1755.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$[^{nat}\text{Lu}]\text{Lu}$ -Komplexe

$[^{nat}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-TATE: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 8.0$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($\text{C}_{65}\text{H}_{87}\text{LuN}_{14}\text{O}_{19}\text{S}_2$): 1606.5; m_{gefunden} : $m/z = 803.9$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1071.9 $[2\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1607.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$[^{nat}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-NOC-ATE: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 10.2$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($\text{C}_{69}\text{H}_{89}\text{LuN}_{14}\text{O}_{18}\text{S}_2$): 1640.5; m_{gefunden} : $m/z = 820.9$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1641.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$[^{nat}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-BOC-ATE: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 10.0$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($\text{C}_{67}\text{H}_{87}\text{LuN}_{14}\text{O}_{18}\text{S}_3$): 1646.5; m_{gefunden} : $m/z = 823.7$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1647.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$[^{nat}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-Py α^3 -TATE: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 7.4$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($\text{C}_{64}\text{H}_{86}\text{LuN}_{15}\text{O}_{18}\text{S}_2$): 1591.5; m_{gefunden} : $m/z = 796.4$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1592.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

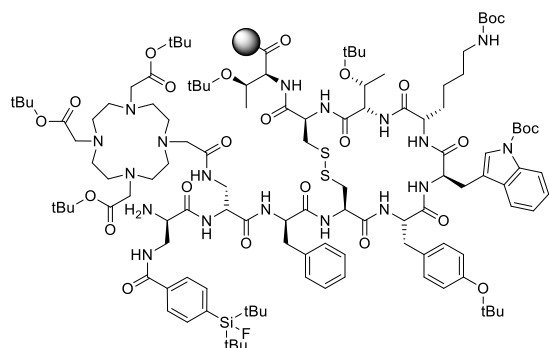
$[^{nat}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-His 3 -TATE: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 7.5$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($\text{C}_{62}\text{H}_{85}\text{LuN}_{16}\text{O}_{18}\text{S}_2$): 1580.5; m_{gefunden} : $m/z = 527.9$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 791.4 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1582.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$[^{nat}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-JR11: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 8.0$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($\text{C}_{74}\text{H}_{95}\text{ClLuN}_{19}\text{O}_{21}\text{S}_2$): 1859.6; m_{gefunden} : $m/z = 931.2$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 1241.2 $[2\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, 1861.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3.4 Synthese linkerfreier Liganden

3.4.1 Synthese der Peptidvorläufer am Harz

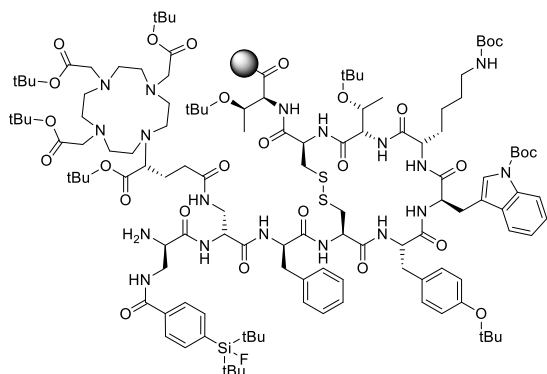
H-D-Dap(SiFA)-D-Dap{DOTA(*t*Bu) $_3$ }-TATE(PG)-2-CT (V7)



Die Synthese von H-D-Dap(SiFA)-D-Dap{DOTA(*t*Bu) $_3$ }-TATE(PG)-2-CT (V7) wird unter Anwendung der allgemeinen Arbeitsvorschriften durchgeführt. V1 wird mit Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4), Dde-entschützt (AAV7) und mit dem Chelator DOTA(*t*Bu) $_3$ konjugiert (AAV6). Nach der Fmoc-Entschützung (AAV2) wird Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4), Dde-entschützt (AAV7) und SiFA-BA konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung liefert Vorläufer V7.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

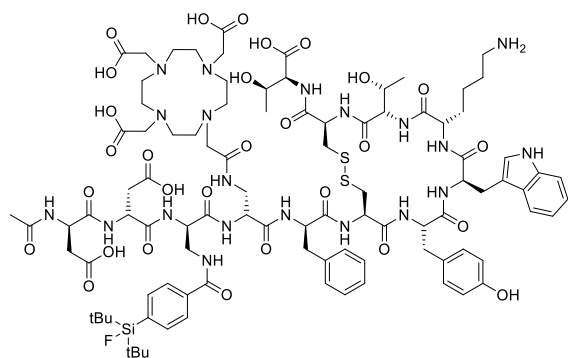
H-D-Dap(SiFA)-D-Dap{R-DOTAGA(*t*Bu)₄}-TATE(PG)-2-CT (**V8**)



Die Synthese von H-D-Dap(SiFA)-D-Dap{R-DOTAGA(*t*Bu)₄}-TATE(PG)-2-CT (**V8**) wird analog zur Synthese von **V7** durchgeführt. Als Chelator wird R-DOTAGA(*t*Bu)₄ eingesetzt. Die finale Fmoc-Entschützung liefert Vorläufer **V8**.

3.4.2 Ligand Synthese

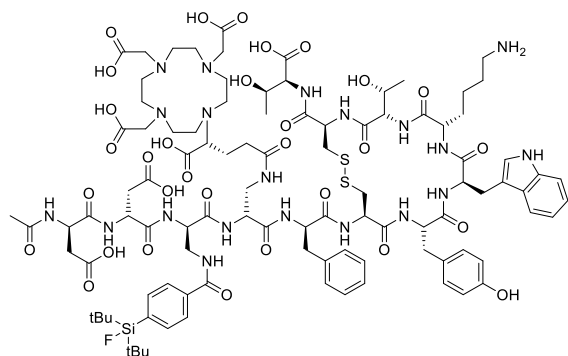
Ac-[D-Asp]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(DOTA)-TATE-OH (rhLF-1)



V7 wird zweifach mit Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3) und Fmoc-entschützt (AAV2). Der *N*-Terminus wird acetyliert indem das Harzgebundene Peptid (1.00 Äq.) mit DIPEA (5.00 Äq.) und Essigsäureanhydrid (5.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz) inkubiert wird. Nach 2 h bei Raumtemperatur wird das Harz mit DMF gewaschen (6 × 5 mL/g Harz) und das Peptid vollständig entschützt und vom

Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird Ac-[D-Asp]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(DOTA)-TATE-OH (rhLF-1) als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (40 – 55% in 20 min): $t_R = 13.7$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 13.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₉₆H₁₃₅FN₂₀O₂₉S₂Si): 2142.9; m_{gefunden} : $m/z = 1073.7$ [M+2H]²⁺, 1431.6 [2M+3H]³⁺, 1610.3 [3M+4H]⁴⁺.

Ac-[D-Asp]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (rhLF-2)



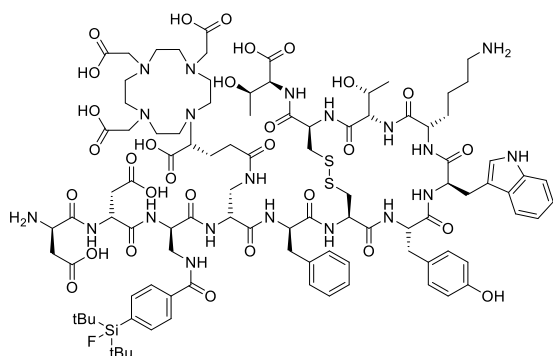
V8 wird zweifach mit Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3) und Fmoc-entschützt (AAV2). Der *N*-Terminus wird acetyliert indem das Harzgebundene Peptid (1.00 Äq.) mit DIPEA (5.00 Äq.) und Essigsäureanhydrid (5.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz) inkubiert wird. Nach 2 h bei Raumtemperatur wird das Harz mit DMF gewaschen (6 × 5 mL/g Harz) und das Peptid vollständig entschützt und vom

Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt

II. MATERIALIEN UND METHODEN

(AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird Ac-[D-Asp]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (**rhLF-2**) als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (40 – 55% in 20 min): $t_R = 19.3$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.8$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{99}H_{139}FN_{20}O_{31}S_2Si$): 2214.9; m_{gefunden} : $m/z = 739.8 [M+3H]^{3+}$, 1109.1 $[M+2H]^{2+}$, 1478.8 $[2M+3H]^{3+}$, 1663.8 $[3M+4H]^{4+}$.

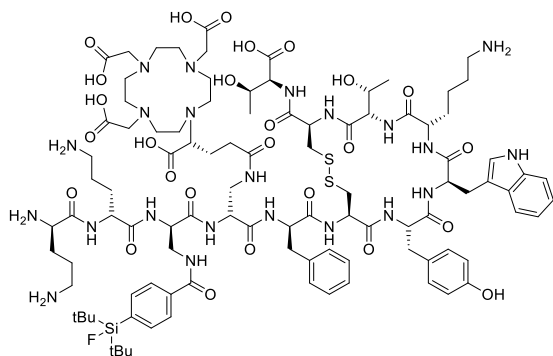
H-[D-Asp]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (**rhLF-3**)



V8 wird zweifach mit Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Nach finaler Fmoc-Entschützung (AAV2) wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-[D-Asp]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (**rhLF-3**) als farbloser

Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (36 – 44% in 20 min): $t_R = 17.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{97}H_{137}FN_{20}O_{30}S_2Si$): 2172.9; m_{gefunden} : $m/z = 726.0 [M+3H]^{3+}$, 1088.5 $[M+2H]^{2+}$, 1451.4 $[2M+3H]^{3+}$.

H-[D-Orn]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (**rhLF-4**)

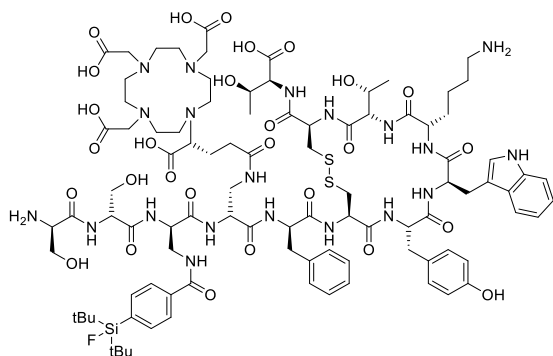


V8 wird zweifach mit Fmoc-D-Orn(Boc)-OH konjugiert (AAV3). Nach finaler Fmoc-Entschützung (AAV2) wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-[D-Orn]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (**rhLF-4**) als farbloser

Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (33 – 41% in 20 min): $t_R = 20.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{99}H_{147}FN_{22}O_{26}S_2Si$): 2171.0; m_{gefunden} : $m/z = 725.5 [M+3H]^{3+}$, 1087.7 $[M+2H]^{2+}$, 1450.1 $[2M+3H]^{3+}$, 1631.4 $[3M+4H]^{4+}$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

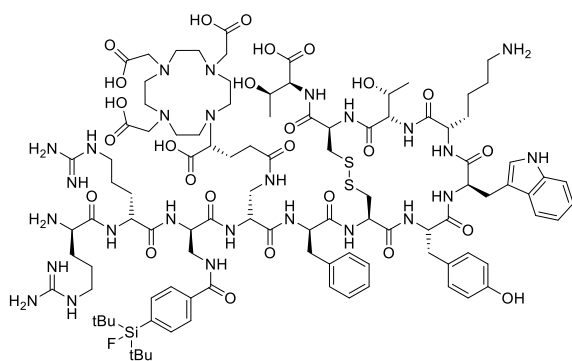
H-[D-Ser]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (rhLF-5)



V8 wird zweifach mit Fmoc-D-Ser(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Nach finaler Fmoc-Entschützung (AAV2) wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-[D-Ser]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (**rhLF-5**) als farbloser Feststoff isoliert.

RP-HPLC semi-präparativ (38 – 46% in 20 min): $t_R = 11.8$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₉₅H₁₃₇FN₂₀O₂₈S₂Si): 2116.9; m_{gefunden} : $m/z = 707.4$ [M+3H]³⁺, 1060.7 [M+2H]²⁺, 1414.2 [2M+3H]³⁺.

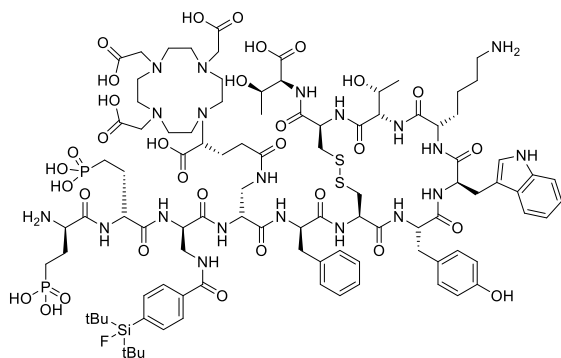
H-[D-Arg]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (rhLF-6)



V8 wird zweifach mit Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH konjugiert (AAV3). Nach finaler Fmoc-Entschützung (AAV2) wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-[D-Arg]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-

OH (**rhLF-6**) als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (34 – 39% in 20 min): $t_R = 18.5$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.5$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₁H₁₅₁FN₂₆O₂₆S₂Si): 2255.1; m_{gefunden} : $m/z = 774.1$ [M+3H]³⁺, 1160.1 [M+2H]²⁺, 1546.2 [2M+3H]³⁺.

H-[L-Pma]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (rhLF-7)



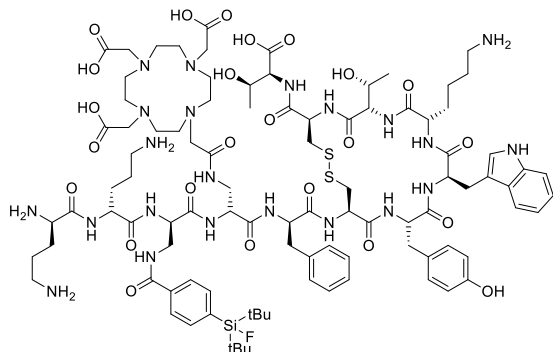
V8 wird zweifach mit Fmoc-D-Pma(*t*Bu)₂-OH konjugiert (AAV3). Nach finaler Fmoc-Entschützung (AAV2) wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-[L-Pma]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-

OH (**rhLF-7**) als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 45% in 20 min):

II. MATERIALIEN UND METHODEN

$t_R = 19.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{97}H_{143}FN_{20}O_{32}P_2S_2Si$): 2272.9; m_{gefunden} : $m/z = 758.4 [M+2H]^{3+}$, 1136.9 $[M+2H]^{2+}$, 1515.6 $[2M+3H]^{3+}$.

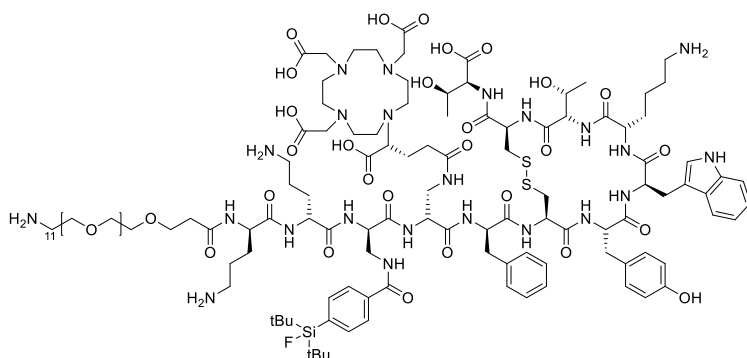
H-[D-Orn]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(DOTA)-TATE-OH (rhLF-8)



V7 wird zweifach mit Fmoc-D-Orn(Boc)-OH konjugiert (AAV3). Nach finaler Fmoc-Entschützung (AAV2) wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-[D-Orn]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(DOTA)-TATE-OH (**rhLF-8**) als farbloser

Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 45% in 20 min): $t_R = 12.7$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{96}H_{143}FN_{22}O_{24}S_2Si$): 2099.0; m_{gefunden} : $m/z = 700.5 [M+3H]^{3+}$, 1050.1 $[M+2H]^{2+}$, 1400.3 $[2M+3H]^{3+}$, 1575.4 $[3M+4H]^{4+}$.

H-PEG₁₂-[D-Orn]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (rhLF-9)

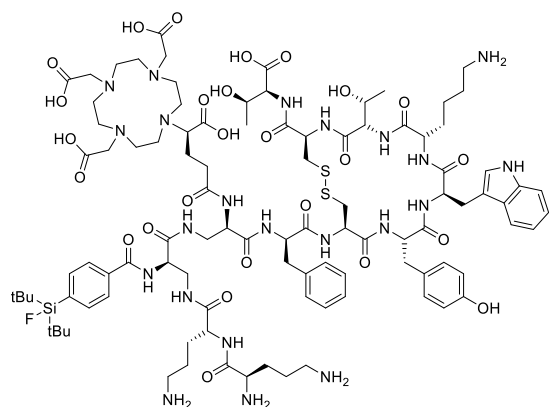


V8 wird zweifach mit Fmoc-D-Orn(Boc)-OH konjugiert (AAV3) und Fmoc-entschützt (AAV2). Anschließend wird *N*-Terminal Fmoc-PEG₁₂-OH konjugiert (AAV3) und Fmoc-entschützt (AAV2). Das Peptid wird vollständig entschützt und vom Harz

abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-PEG₁₂-[D-Orn]₂-D-Dap(SiFA)-D-Dap(R-DOTAGA)-TATE-OH (**rhLF-9**) als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (30 – 45% in 20 min): $t_R = 17.3$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{126}H_{200}FN_{23}O_{39}S_2Si$): 2770.4; m_{gefunden} : $m/z = 693.8 [M+4H]^{4+}$, 924.6 $[M+3H]^{3+}$, 1386.5 $[M+2H]^{2+}$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

R-DOTAGA-D-Dap{SiFA-D-Dap[H-(D-Orn)₂]}-TATE-OH (rhLF-11)

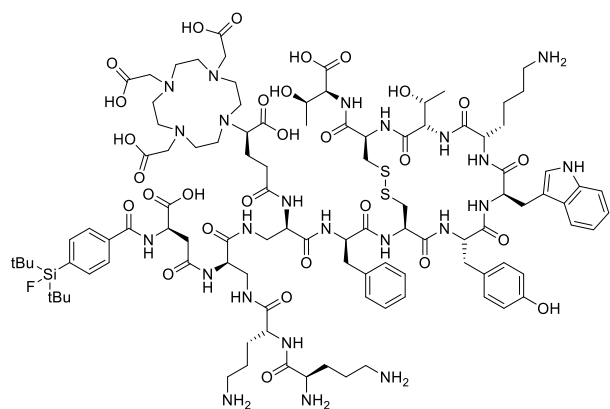


V1 wird mit Dde-D-Dap(Fmoc)-OH konjugiert (AAV4), Dde-entschützt (AAV7) und mit dem Chelator *R*-DOTAGA(*t*Bu)₄ konjugiert (AAV6). Nach der Fmoc-Entschützung (AAV2) wird Dde-D-Dap(Fmoc)-OH konjugiert (AAV4), Dde-entschützt (AAV7) und SiFA-BA konjugiert (AAV3). Nach der Fmoc-Entschützung (AAV2) wird zweifach mit Fmoc-D-Orn(Boc)-OH konjugiert (AAV3). Nach finaler Fmoc-Entschützung (AAV2) wird das Peptid

vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird *R*-DOTAGA-D-Dap{SiFA-D-Dap[H-(D-Orn)₂]}-TATE-OH (**rhLF-11**) als farbloser Feststoff isoliert.

RP-HPLC semi-präparativ (30 – 50% in 20 min): $t_R = 17.3$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 10.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₉₉H₁₄₇FN₂₂O₂₆S₂Si): 2171.0; m_{gefunden} : $m/z = 554.5$ [M+4H]⁴⁺, 725.3 [M+3H]³⁺, 1087.0 [M+2H]²⁺, 1449.1 [2M+3H]³⁺.

R-DOTAGA-D-Dap{SiFA-β-D-Asp-D-Dap[H-(D-Orn)₂]}-TATE-OH (rhLF-10)



Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLF-11**. Anstelle von SiFA-BA, wird Baustein **22** mittels AAV3 konjugiert. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. *R*-DOTAGA-D-Dap{SiFA-β-D-Asp-D-Dap[H-(D-Orn)₂]}-TATE-OH (**rhLF-10**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (30 – 50% in 20 min): $t_R = 18.6$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS**:

m_{exakt} (C₁₀₃H₁₅₂FN₂₃O₂₉S₂Si): 2286.0; m_{gefunden} : $m/z = 572.8$ [M+4H]⁴⁺, 763.5 [M+3H]³⁺, 1144.0 [M+2H]²⁺, 1525.7 [2M+3H]³⁺.

3.4.3 Metall Komplexierung

Die Komplexierung von ^{nat}Ga und ^{nat}Lu wird analog zu den allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV14 und AAV15 durchgeführt. Die Ergebnisse der analytischen Untersuchung (analytische RP-HPLC und ESI-MS) sind im Folgenden aufgelistet.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

[^{nat}Ga]Ga-Komplexe

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 13.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{96}H_{133}FGaN_{20}O_{29}S_2Si$): 2209.8; m_{gefunden} : $m/z = 737.6 [M+3H]^{3+}$, 1106.4 $[M+2H]^{2+}$, 1475.0 $[2M+3H]^{3+}$, 1660.3 $[3M+4H]^{4+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 13.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{99}H_{137}FGaN_{20}O_{31}S_2Si$): 2281.8; m_{gefunden} : $m/z = 1142.5 [M+2H]^{2+}$, 1522.7 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.5$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{97}H_{135}FGaN_{20}O_{30}S_2Si$): 2239.8; m_{gefunden} : $m/z = 748.4 [M+3H]^{3+}$, 1122.4 $[M+2H]^{2+}$, 1496.4 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-4: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{99}H_{145}FGaN_{22}O_{26}S_2Si$): 2237.9; m_{gefunden} : $m/z = 747.7 [M+3H]^{3+}$, 1121.5 $[M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-5: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{95}H_{135}FGaN_{20}O_{28}S_2Si$): 2183.8; m_{gefunden} : $m/z = 1092.2 [M+2H]^{2+}$, 1455.9 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-6: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{149}FGaN_{26}O_{26}S_2Si$): 2322.0; m_{gefunden} : $m/z = 774.5 [M+3H]^{3+}$, 800.6 $[M+DMSO+3H]^{3+}$, 1161.0 $[M+2H]^{2+}$, 1548.0 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-8: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.3$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{96}H_{141}FGaN_{22}O_{24}S_2Si$): 2165.9; m_{gefunden} : $m/z = 722.6 [M+3H]^{3+}$, 748.4 $[M+DMSO+3H]^{3+}$, 1083.9 $[M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-7: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{97}H_{141}FGaN_{20}O_{32}P_2S_2Si$): 2339.8; m_{gefunden} : $m/z = 1170.7 [M+2H]^{2+}$, 1560.7 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-9: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{126}H_{198}FGaN_{23}O_{39}S_2Si$): 2837.3; m_{gefunden} : $m/z = 710.1 [M+4H]^{4+}$, 946.4 $[M+3H]^{3+}$, 1419.5 $[M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-10: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{103}H_{150}FGaN_{23}O_{29}S_2Si$): 2352.9; m_{gefunden} : $m/z = 785.7 [M+3H]^{3+}$, 1177.4 $[M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLF-11: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 10.8$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{99}H_{145}FGaN_{22}O_{26}S_2Si$): 2237.9; m_{gefunden} : $m/z = 747.6 [M+3H]^{3+}$, 773.1 $[M+DMSO+3H]^{3+}$, 1120.5 $[M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Lu]Lu-Komplexe

[^{nat}Lu]Lu-rhLF-1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 13.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{96}H_{132}FLuN_{20}O_{29}S_2Si$): 2314.81; m_{gefunden} : $m/z = 772.9 [M+3H]^{3+}$, 1158.3 $[M+2H]^{2+}$, 1544.8 $[2M+3H]^{3+}$, 1737.4 $[3M+4H]^{4+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLF-2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 13.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{99}H_{136}FLuN_{20}O_{31}S_2Si$): 2386.8; m_{gefunden} : $m/z = 1193.7 [M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLF-3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.9$ min.

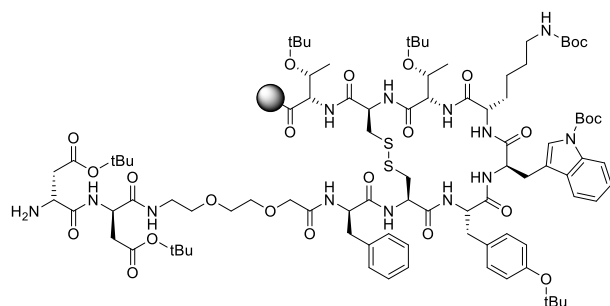
II. MATERIALIEN UND METHODEN

[^{nat}Lu]Lu-rhLF-4: **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{99}H_{144}FLuN_{22}O_{26}S_2Si$): 2342.9; m_{gefunden} : $m/z = 781.5 [M+3H]^{3+}$, $807.5 [M+DMSO+3H]^{3+}$, $1171.7 [M+2H]^{2+}$, $1562.6 [2M+3H]^{3+}$.

3.5 Synthese linkerbasierter Liganden

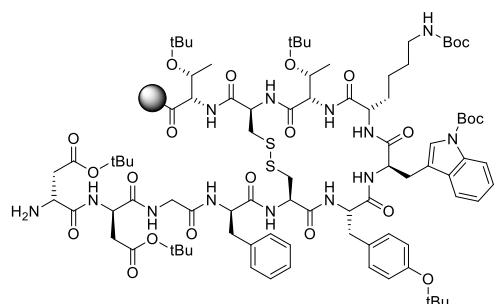
3.5.1 Synthese der Peptidvorläufer am Harz

H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-PEG₁-TATE(PG)-2-CT (V9)



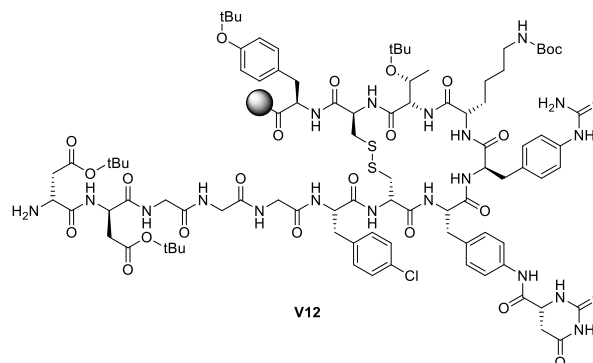
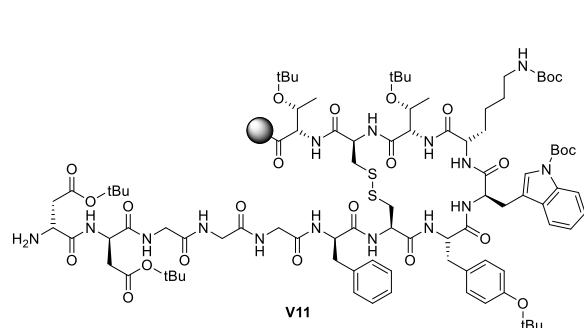
V1 wird mit Fmoc-O₂Oc-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer **V9**.

H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-Gly-TATE(PG)-2-CT (V10)



V1 wird mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer **V10**.

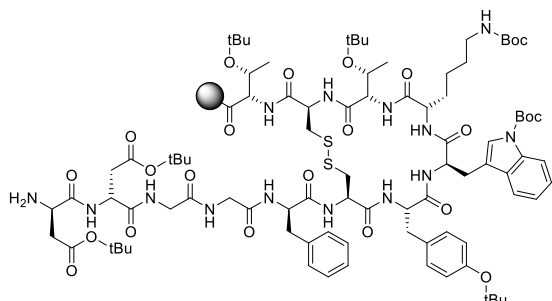
H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[Gly]₃-TATE(PG)-2-CT (V11) und H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[Gly]₃-JR11(PG)-2-CT (V12)



II. MATERIALIEN UND METHODEN

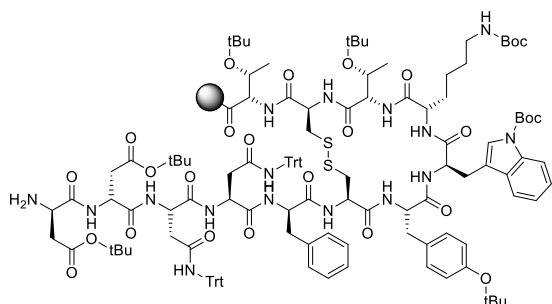
V1 oder **V6** werden mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert die Vorläufer **V11** und **V12**.

H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[Gly]₂-TATE(PG)-2-CT (**V13**)



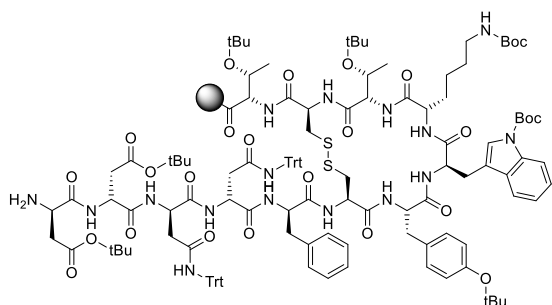
V1 wird mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer **V13**.

H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[L-Asn(Trt)]₂-TATE(PG)-2-CT (**V14**)



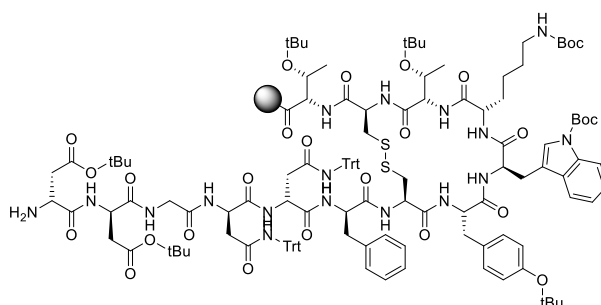
V1 wird mit Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer **V14**.

H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[D-Asn(Trt)]₂-TATE(PG)-2-CT (**V15**)



V1 wird mit Fmoc-D-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer **V15**.

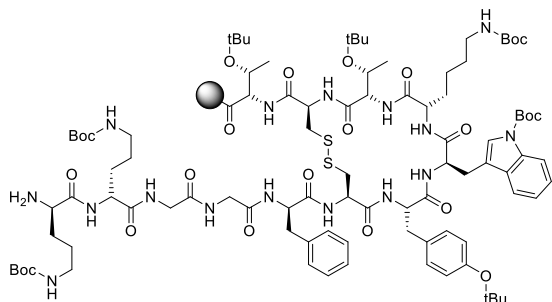
H-[D-Asp(*t*Bu)]₂-Gly-[D-Asn(Trt)]₂-TATE(PG)-2-CT (**V16**)



V1 wird mit Fmoc-D-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer **V16**.

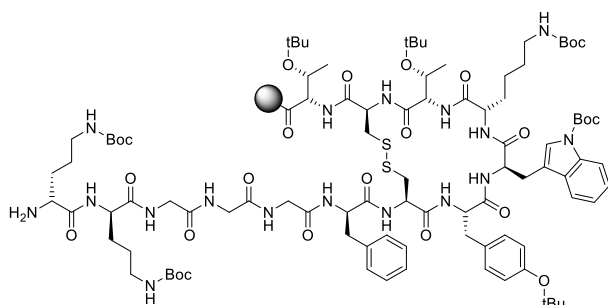
II. MATERIALIEN UND METHODEN

H-[D-Orn(Boc)]₂-[Gly]₂-TATE(PG)-2-CT (V17)



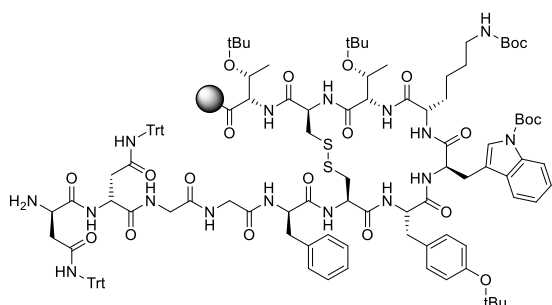
V1 wird mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Orn(Boc)-OH und Fmoc-D-Orn(Boc)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer V17.

H-[D-Orn(Boc)]₂-[Gly]₃-TATE(PG)-2-CT (V18)



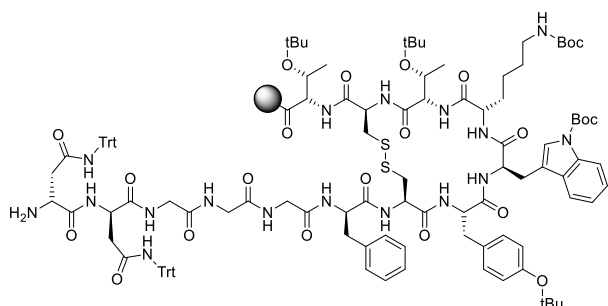
V1 wird mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Orn(Boc)-OH und Fmoc-D-Orn(Boc)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer V18.

H-[D-Asn(Trt)]₂-[Gly]₂-TATE(PG)-2-CT (V19)



V1 wird mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Asn(Trt)-OH und Fmoc-D-Asn(Trt)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer V19.

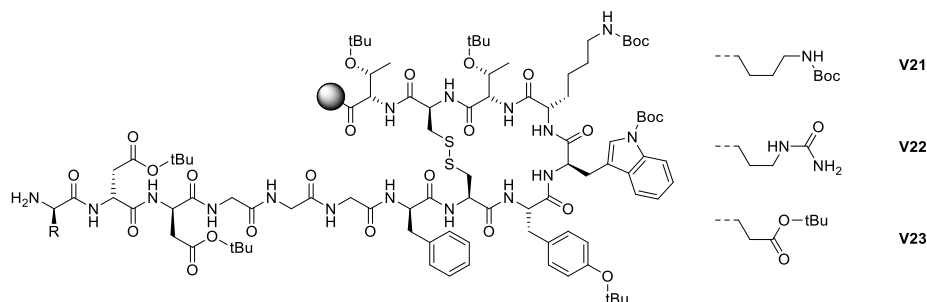
H-[D-Asn(Trt)]₂-[Gly]₃-TATE(PG)-2-CT (V20)



V1 wird nacheinander mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Asn(Trt)-OH und Fmoc-D-Asn(Trt)-OH konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert Vorläufer V20.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

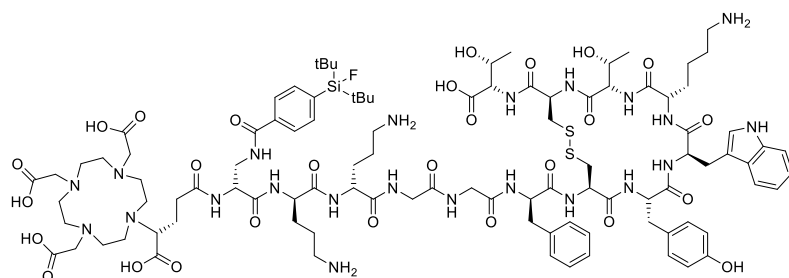
H-D-Lys(Boc)-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[Gly]₂-TATE(PG)-2-CT (V21), H-D-Cit-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[Gly]₂-TATE(PG)-2-CT (V22) und H-D-Glu(*t*Bu)-[D-Asp(*t*Bu)]₂-[Gly]₂-TATE(PG)-2-CT (V23)



V1 wird mit Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Asp(*t*Bu)-OH konjugiert (AAV3). Anschließend wird entweder Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (**V21**) oder Fmoc-D-Cit-OH (**V22**) oder Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (**V23**) konjugiert (AAV3). Die finale Fmoc-Entschützung (AAV2) liefert die Vorläufer **V21**, **V22** und **V23**.

3.5.2 Ligand Synthese: 1. Generation

R-DOTAGA-D-Dap(SiFA)-[D-Orn]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-1.9)



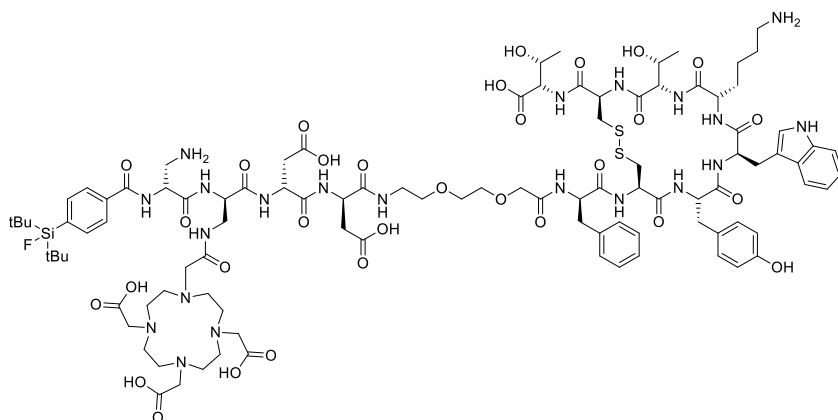
V17 wird mit Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4) und Dde-entschützt (AAV7). Anschließend wird SiFA-BA konjugiert (AAV3), der *N*-Terminus Fmoc-entschützt

(AAV2) und mit *R*-DOTAGA(*t*Bu)₄ (AAV6) umgesetzt. Das Peptid wird entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und lyophilisiert (AAV12). *R*-DOTAGA-D-Dap(SiFA)-[D-Orn]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-1.9**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (30 – 50% in 20 min): $t_R = 16.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₀H₁₄₇FN₂₂O₂₇S₂Si): 2199.0; m_{gefunden} : $m/z = 550.7$ [M+4H]⁴⁺, 733.8 [M+3H]³⁺, 1099.9 [M+2H]²⁺, 1466.1 [2M+3H]³⁺.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

3.5.3 Ligand Synthese: 2. Generation

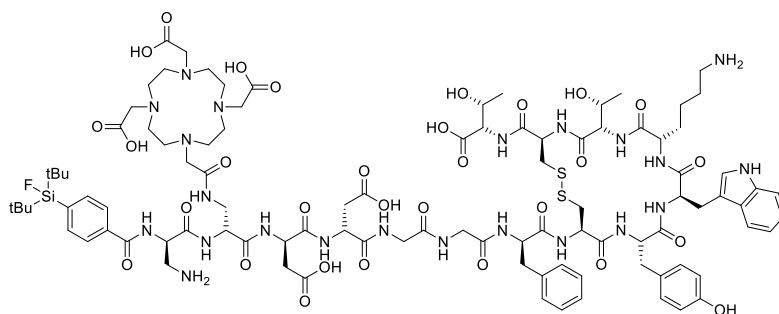
SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-PEG₁-TATE-OH (rhLB-2.6)



V9 wird mit Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4) und Dde-entschützt (AAV7). Anschließend wird DOTA(*t*Bu)₃ konjugiert (AAV6), der *N*-Terminus Fmoc-entschützt (AAV2) und mit Fmoc-D-Dap(Boc)-OH umgesetzt (AAV4).

Nach Fmoc-Entschätzung (AAV2), wird SiFA-BA konjugiert (AAV3) und das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und lyophilisiert (AAV12). SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-PEG₁-TATE-OH (**rhLB-2.6**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (37 – 45% in 20 min): $t_R = 14.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₀H₁₄₄FN₂₁O₃₁S₂Si): 2246.0; m_{gefunden} : $m/z = 749.6$ [M+3H]³⁺, 1123.8 [M+2H]²⁺, 1499.0 [2M+3H]³⁺, 1685.7 [3M+4H]⁴⁺.

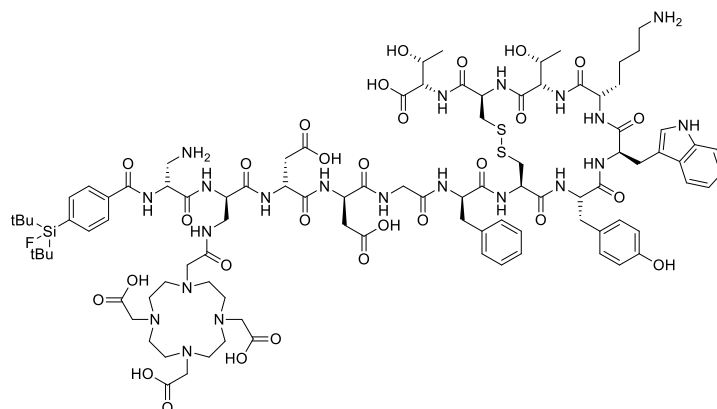
SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-2.1)



Ausgehend von **V13** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-2.1**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (33 – 45% in 20 min): $t_R = 17.6$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₉₈H₁₃₉FN₂₂O₃₀S₂Si): 2214.9; m_{gefunden} : $m/z = 739.7$ [M+3H]³⁺, 1108.5 [M+2H]²⁺, 1477.8 [2M+3H]³⁺, 1662.5 [3M+4H]⁴⁺.

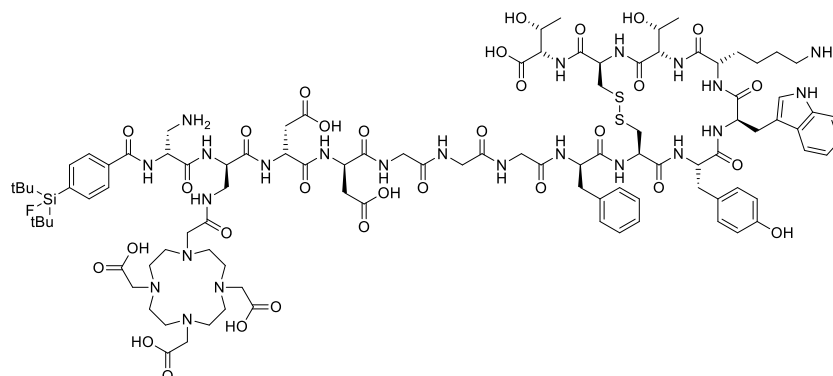
II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-Gly-TATE-OH (rhLB-2.7)



Ausgehend von **V10** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-Gly-TATE-OH (**rhLB-2.7**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (34 – 44% in 20 min): $t_R = 15.5$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{96}H_{136}FN_{21}O_{29}S_2Si$): 2157.9; m_{gefunden} : $m/z = 720.6 [M+3H]^{3+}$, $1080.5 [M+2H]^{2+}$, $1440.9 [2M+3H]^{3+}$, $1620.3 [3M+4H]^{4+}$.

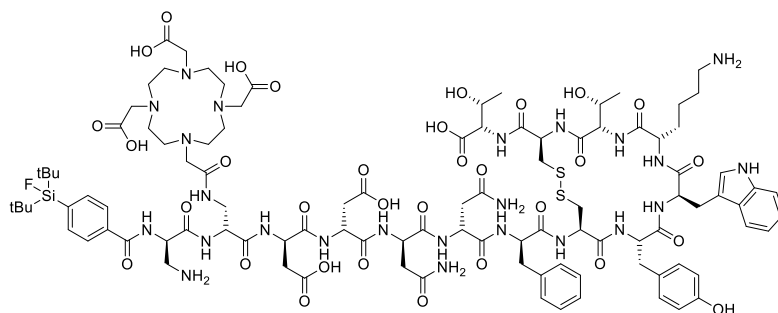
SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-2.8)



Ausgehend von **V11** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-2.8**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (37 – 44% in 20 min): $t_R = 14.8$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{100}H_{142}FN_{23}O_{31}S_2Si$): 2271.9; m_{gefunden} : $m/z = 758.7 [M+3H]^{3+}$, $1137.6 [M+2H]^{2+}$, $1517.2 [2M+3H]^{3+}$, $1706.5 [3M+4H]^{4+}$.

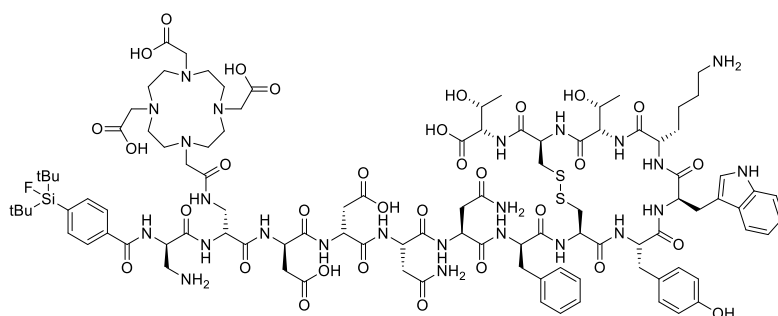
II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[D-Asn]₂-TATE-OH (rhLB-2.9)



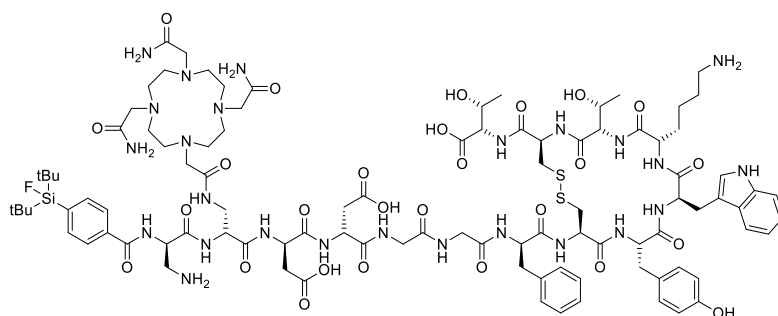
Ausgehend von **V15** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[D-Asn]₂-TATE-OH (**rhLB-2.9**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 45% in 20 min): $t_R = 14.6$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.8$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{102}H_{145}FN_{24}O_{32}S_2Si$): 2329.0; m_{gefunden} : $m/z = 778.0$ [$M+3H$]³⁺, 1166.9 [$M+2H$]²⁺, 1555.6 [$2M+3H$]³⁺.

SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[L-Asn]₂-TATE-OH (rhLB-2.10)



Ausgehend von **V14** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[L-Asn]₂-TATE-OH (**rhLB-2.10**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 45% in 20 min): $t_R = 15.4$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{102}H_{145}FN_{24}O_{32}S_2Si$): 2329.0; m_{gefunden} : $m/z = 777.7$ [$M+3H$]³⁺, 1165.8 [$M+2H$]²⁺, 1554.5 [$2M+3H$]³⁺.

SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTAM)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-2.3)

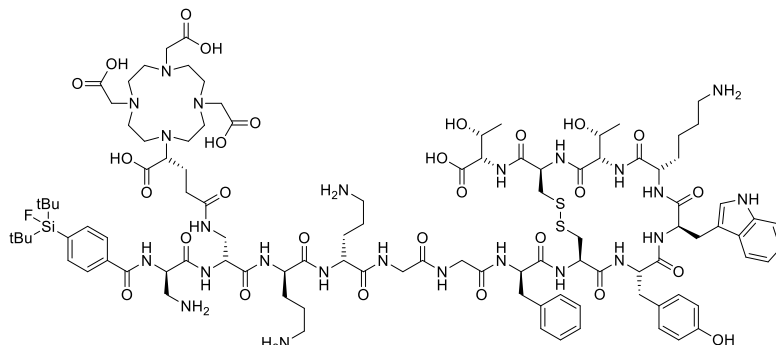


Ausgehend von **V13** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. Anstelle des Chelators DOTA(*t*Bu)₃ wird DO3AM-Essigsäure konjugiert (AAV6). SiFA-D-Dap-D-Dap(DOTAM)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-2.3**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ**

II. MATERIALIEN UND METHODEN

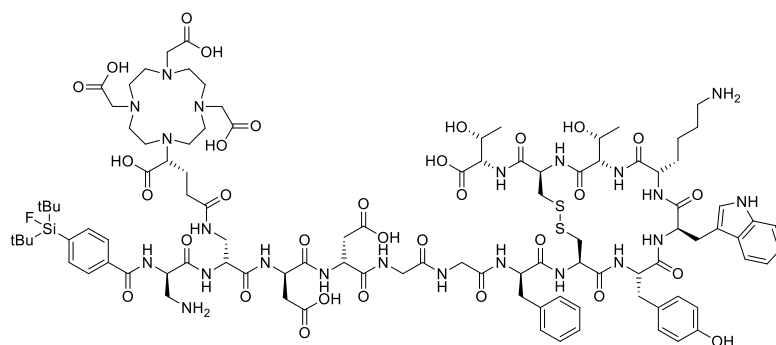
(34 – 43% in 20 min): $t_R = 14.7$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{98}H_{142}FN_{25}O_{27}S_2Si$): 2212.0; m_{gefunden} : $m/z = 728.4 [M+3H]^{3+}$, 1106.7 $[M+2H]^{2+}$, 1475.9 $[2M+3H]^{3+}$.

SiFA-D-Dap-D-Dap(*R*-DOTAGA)-[D-Orn]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-2.4)



Ausgehend von **V17** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. Anstelle des Chelators DOTA(*t*Bu)₃ wird *R*-DOTAGA(*t*Bu)₄ konjugiert (AAV6). SiFA-D-Dap-D-Dap(*R*-DOTAGA)-[D-Orn]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-2.4**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 45% in 20 min): $t_R = 10.5$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 10.8$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{103}H_{153}FN_{24}O_{28}S_2Si$): 2285.1; m_{gefunden} : $m/z = 573.1 [M+4H]^{4+}$, 763.9 $[M+3H]^{3+}$.

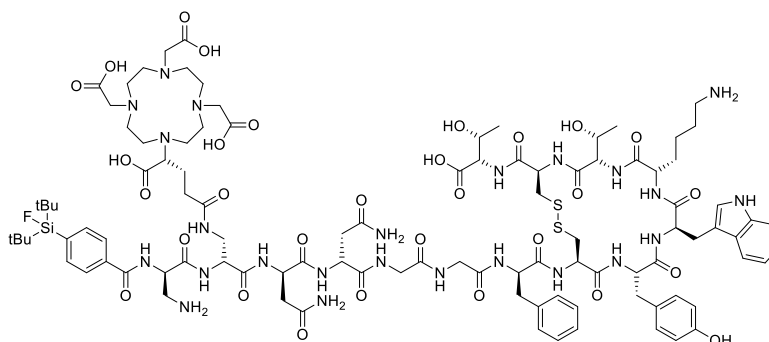
SiFA-D-Dap-D-Dap(*R*-DOTAGA)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-2.2)



Ausgehend von **V13** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. Anstelle des Chelators DOTA(*t*Bu)₃ wird *R*-DOTAGA(*t*Bu)₄ konjugiert (AAV6). SiFA-D-Dap-D-Dap(*R*-DOTAGA)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-2.2**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (34 – 42% in 20 min): $t_R = 17.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{101}H_{143}FN_{22}O_{32}S_2Si$): 2286.9; m_{gefunden} : $m/z = 572.9 [M+4H]^{4+}$, 763.7 $[M+3H]^{3+}$, 1144.5 $[M+2H]^{2+}$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

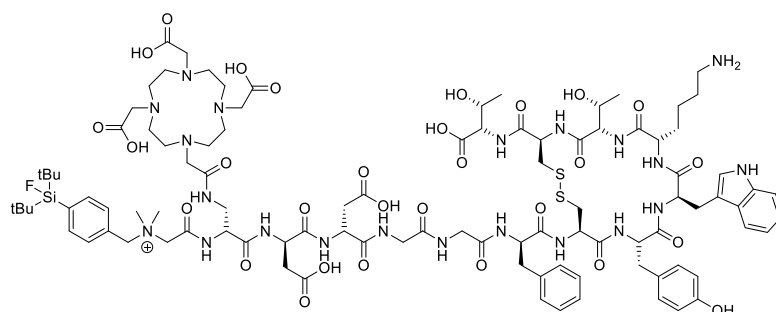
SiFA-D-Dap-D-Dap(*R*-DOTAGA)-[D-Asn]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-2.5)



Ausgehend von **V19** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-2.6**. Anstelle des Chelators DOTA(*t*Bu)₃ wird *R*-DOTAGA(*t*Bu)₄ konjugiert (AAV6). SiFA-D-Dap-D-Dap(*R*-DOTAGA)-[D-Asn]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-2.5**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 44% in 20 min): $t_R = 13.5$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₁H₁₄₅FN₂₄O₃₀S₂Si): 2285.0; m_{gefunden} : $m/z = 763.1$ [M+3H]³⁺, 1143.7 [M+2H]²⁺, 1525.4 [2M+3H]³⁺.

3.5.4 Ligand Synthese: 3. und 4. Generation

SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-3.1)

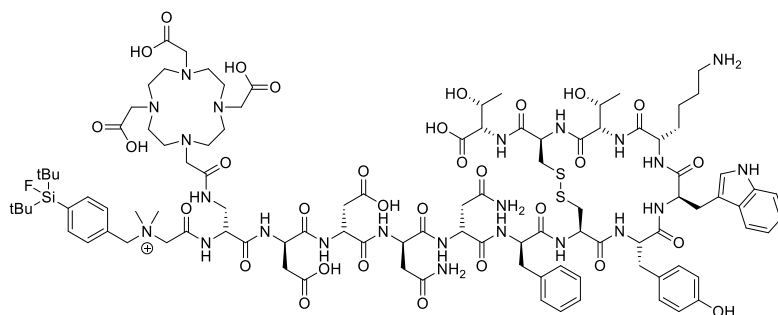


Vorläufer **V13** wird mit Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4) und Dde-entschützt (AAV7). Anschließend wird DOTA(*t*Bu)₃ konjugiert (AAV6) und der *N*-Terminus Fmoc-entschützt (AAV2). Das Harz-gebundene

Peptid (1.00 Äq.) wird unter Verwendung von HOAt (3.00 Äq.), TBTU (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (9.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz), mit *N,N*-Me₂-Gly-OH (3.00 Äq.) konjugiert (4 h bei RT). Die SiFAN⁺Gly Einheit wird durch Inkubation des Harzes (1.00 Äq.) mit SiFA-Br (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (6.00 Äq.) in DCM (8 mL/g Harz) aufgebaut (24 h bei RT). Eine anschließende Testabspaltung mittels TFA/TIPS/H₂O (vgl. AAV10) zeigt standardmäßig unvollständigen Umsatz. Dennoch wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-3.1**) als farbloser Feststoff isoliert. Die Reinheit und Identität wird mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS untersucht. **RP-HPLC semi-präparativ** (37 – 53% in 20 min): $t_R = 11.9$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₉₉H₁₄₃FN₂₁O₂₉S₂Si⁺): 2201.0; m_{gefunden} : $m/z = 1101.0$ [M+2H]²⁺, 1467.6 [2M+3H]³⁺, 1650.4 [3M+4H]⁴⁺.

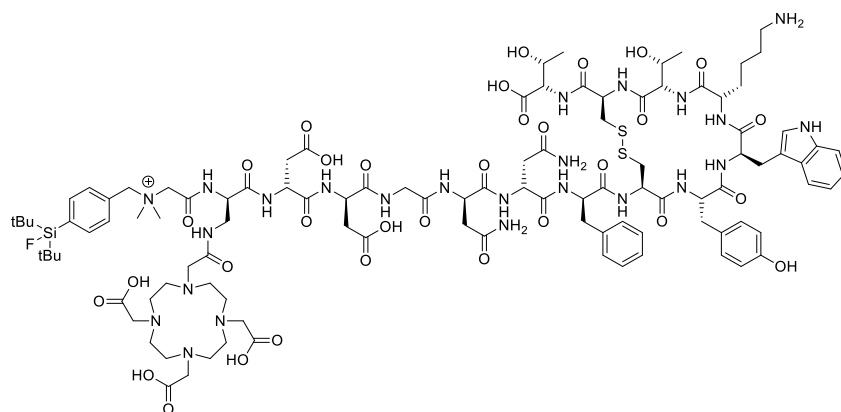
II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[D-Asn]₂-TATE-OH (rhLB-3.3)



Ausgehend von **V15** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[D-Asn]₂-TATE-OH (**rhLB-3.3**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (40 – 48% in 20 min): $t_R = 16.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{103}H_{149}FN_{23}O_{31}S_2Si^+$): 2315.0; m_{gefunden} : $m/z = 772.3$ [$M+3H$]³⁺, 1032.7 [$M-CH_2-C_6H_4-Si(tBu)_2F+2H$]²⁺, 1157.8 [$M+2H$]²⁺.

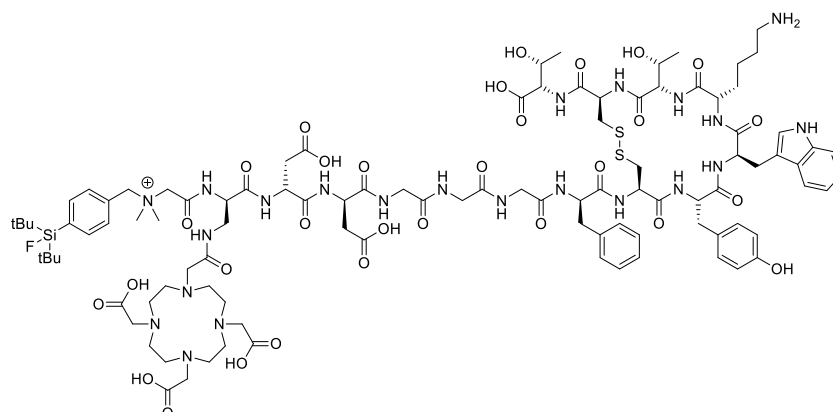
SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-Gly-[D-Asn]₂-TATE-OH (rhLB-3.4)



Ausgehend von **V16** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-Gly-[D-Asn]₂-TATE-OH (**rhLB-3.4**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (40 – 45% in 20 min): $t_R = 17.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.8$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{105}H_{152}FN_{24}O_{32}S_2Si^+$): 2372.0; m_{gefunden} : $m/z = 791.3$ [$M+3H$]³⁺, 1061.2 [$M-CH_2-C_6H_4-Si(tBu)_2F+2H$]²⁺, 1186.4 [$M+2H$]²⁺.

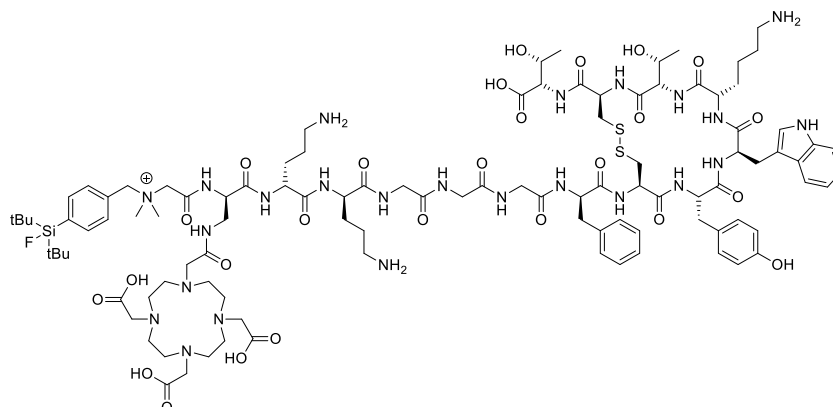
II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-3.2)



Ausgehend von **V11** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.2**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (42 – 47% in 20 min): $t_R = 14.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{101}H_{146}FN_{22}O_{30}S_2Si^+$): 2258.0; m_{gefunden} : $m/z = 753.3$ $[M+3H]^3+$, 1004.2 $[M-CH_2-C_6H_4-Si(tBu)_2F+2H]^2+$, 1129.4 $[M+2H]^2+$.

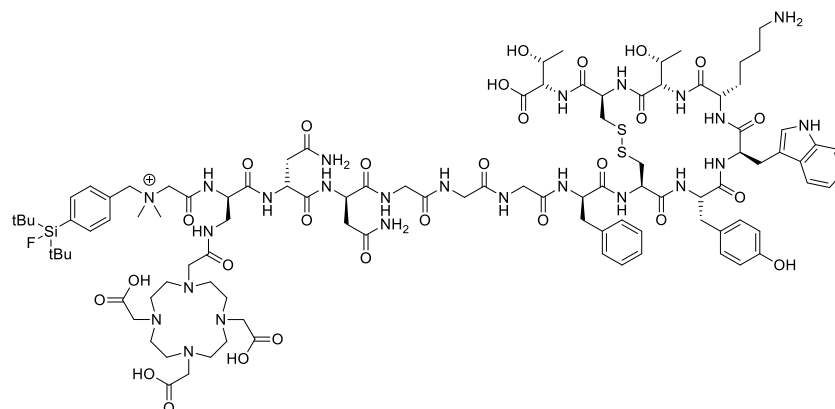
SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Orn]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-3.13)



Ausgehend von **V18** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Orn]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.13**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (34 – 45% in 20 min): $t_R = 11.9$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{103}H_{156}FN_{24}O_{26}S_2Si^+$): 2256.1; m_{gefunden} : $m/z = 565.1$ $[M+4H]^4+$, 753.2 $[M+3H]^3+$, 1129.2 $[M+2H]^2+$, 1505.1 $[2M+3H]^3+$, 1693.8 $[3M+4H]^4+$.

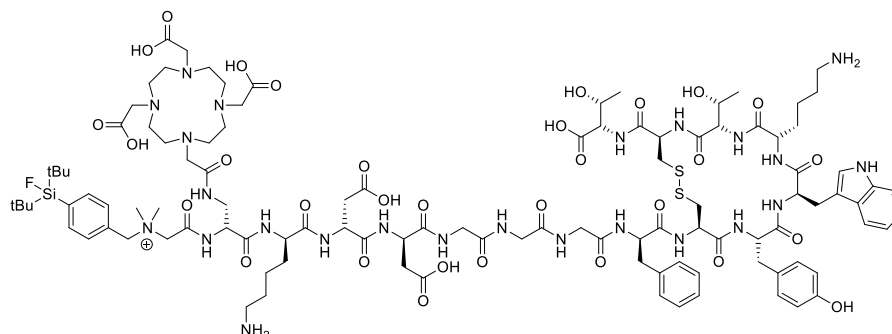
II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asn]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-3.14)



Ausgehend von **V20** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asn]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.14**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (36 – 48% in 20 min): $t_R = 12.6$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{101}H_{148}FN_{24}O_{28}S_2Si^+$): 2256.0; m_{gefunden} : $m/z = 753.0$ $[M+3H]^{3+}$, 1129.2 $[M+2H]^{2+}$, 1505.3 $[2M+3H]^{3+}$, 1694.0 $[3M+4H]^{4+}$.

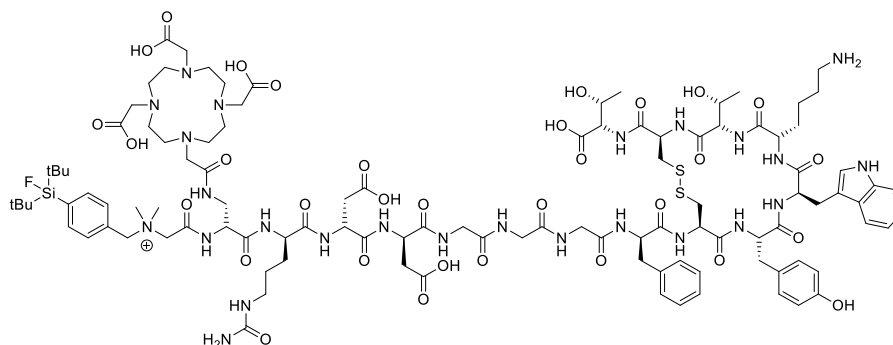
SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-D-Lys-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-3.11)



Ausgehend von **V21** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-D-Lys-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.11**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 42% in 20 min): $t_R = 12.3$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{107}H_{158}FN_{24}O_{31}S_2Si^+$): 2386.1; m_{gefunden} : $m/z = 597.7$ $[M+4H]^{4+}$, 796.4 $[M+3H]^{3+}$, 1194.2 $[M+2H]^{2+}$, 1592.3 $[2M+3H]^{3+}$, 1791.3 $[3M+4H]^{4+}$, 1910.7 $[4M+5H]^{5+}$.

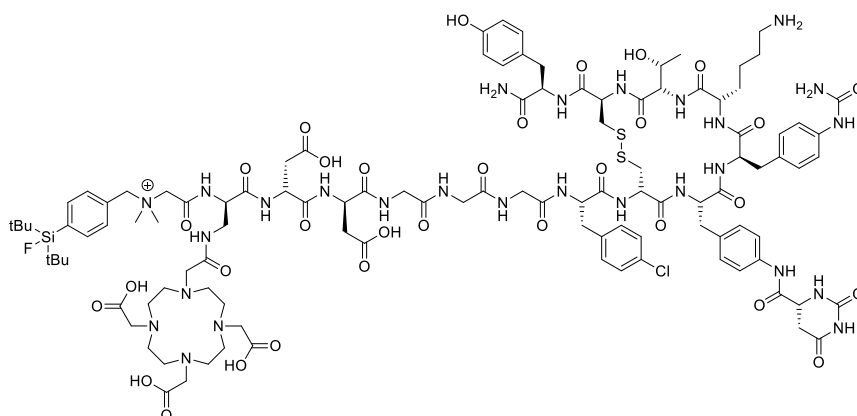
II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-D-Cit-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-3.12)



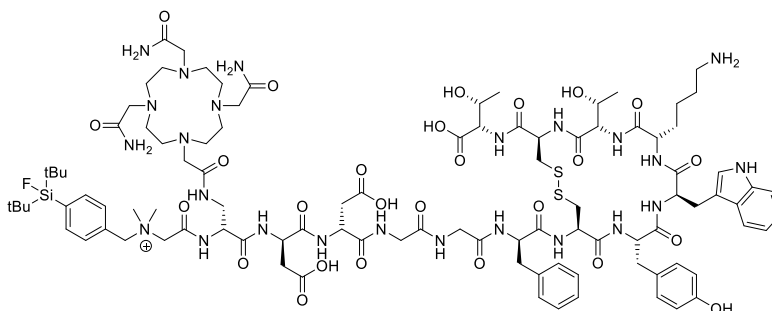
Ausgehend von **V22** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-D-Cit-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.12**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (38 – 42% in 20 min): $t_R = 11.3$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{107}H_{157}FN_{25}O_{32}S_2Si^+$): 2415.1; m_{gefunden} : $m/z = 806.1$ $[M+3H]^{3+}$, 1208.8 $[M+2H]^{2+}$.

SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-D-Lys-[D-Asp]₂-[Gly]₃-JR11-NH₂ (rhLB-3.15)



Ausgehend von **V12** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-JR11-NH₂ (**rhLB-3.15**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (37 – 45% in 20 min): $t_R = 14.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{110}H_{154}ClFN_{27}O_{32}S_2Si^+$): 2511.0; m_{gefunden} : $m/z = 629.0$ $[M+4H]^{4+}$, 838.3 $[M+3H]^{3+}$, 1257.0 $[M+2H]^{2+}$, 1676.1 $[2M+3H]^{3+}$, 1885.3 $[3M+4H]^{4+}$.

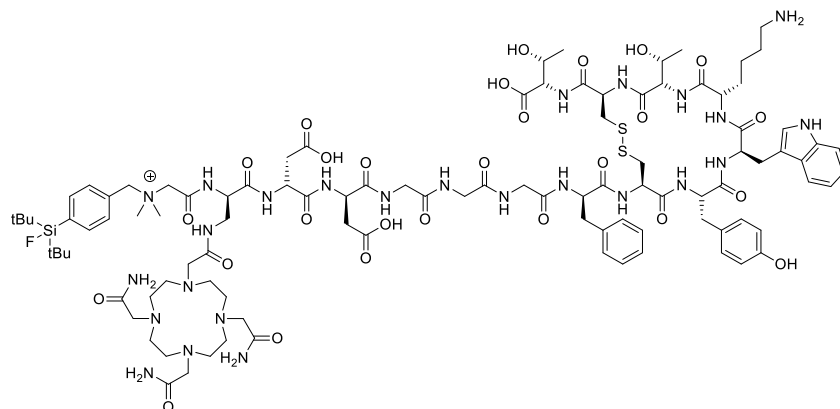
SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTAM)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (rhLB-3.5)



II. MATERIALIEN UND METHODEN

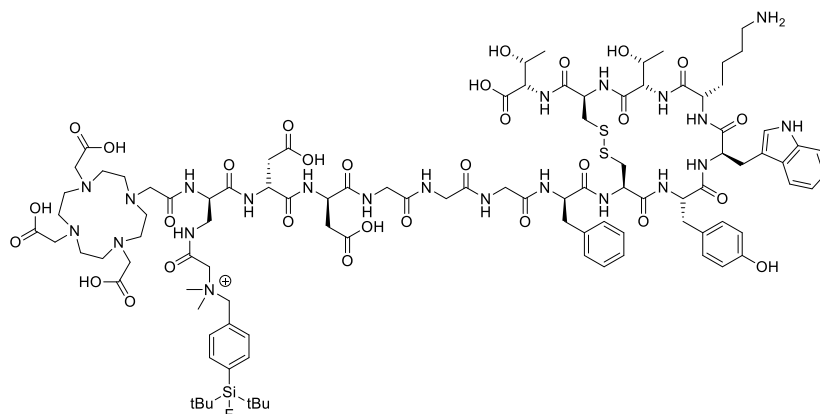
Ausgehend von **V13** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. Anstelle des Chelators DOTA(*t*Bu)₃ wird DO3AM-Essigsäure konjugiert (AAV6). SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTAM)-[D-Asp]₂-[Gly]₂-TATE-OH (**rhLB-3.5**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 43% in 20 min): $t_R = 14.6$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₉₉H₁₄₆FN₂₄O₂₆S₂Si⁺): 2198.0; m_{gefunden} : $m/z = 734.5$ [M+3H]³⁺, 1101.3 [M+2H]²⁺.

SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTAM)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.6**)



Ausgehend von **V11** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.1**. Anstelle des Chelators DOTA(*t*Bu)₃ wird DO3AM-Essigsäure konjugiert (AAV6). SiFAN⁺Gly-D-Dap(DOTAM)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.6**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (36 – 42% in 20 min): $t_R = 11.8$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.6$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₁H₁₄₉FN₂₅O₂₇S₂Si⁺): 2255.0; m_{gefunden} : $m/z = 564.8$ [M+4H]⁴⁺, 752.7 [M+3H]³⁺, 1128.6 [M+2H]²⁺, 1504.8 [2M+3H]³⁺.

DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.7**)

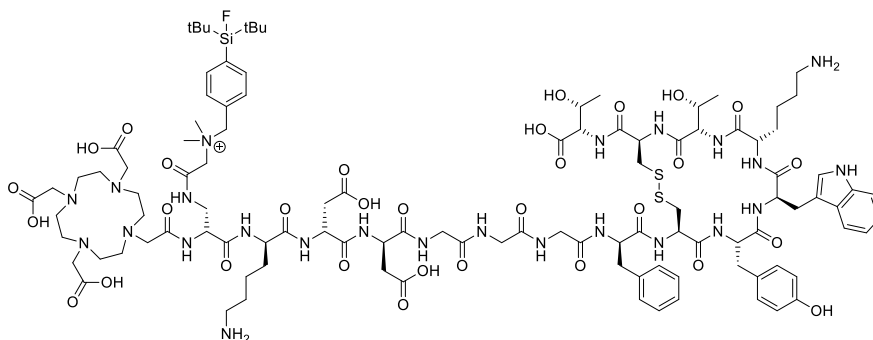


Vorläufer **V11** wird mit Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4) und Dde-entschützt (AAV7). Das Harz-gebundene Peptid (1.00 Äq.) wird unter Verwendung von HOAt (3.00 Äq.), TBTU (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (9.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz), mit *N,N*-Me₂-Gly-OH (3.00 Äq.) konjugiert (4 h bei RT). Anschließend wird der *N*-Terminus Fmoc-entschützt (AAV2) und DOTA(*t*Bu)₃ konjugiert (AAV6). Die SiFAN⁺Gly Einheit wird durch Inkubation des Harzes (1.00 Äq.) mit SiFA-Br (3.00 Äq.)

II. MATERIALIEN UND METHODEN

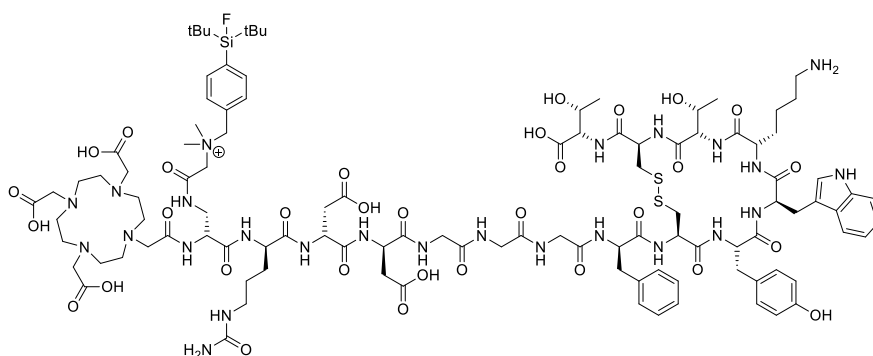
und 2,4,6-Collidin (6.00 Äq.) in DCM (8 mL/g Harz) aufgebaut (24 h bei RT). Das Peptid wird vollständig geschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.7**) als farbloser Feststoff isoliert. Die Reinheit und Identität wird mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS untersucht. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 45% in 20 min): $t_R = 13.2$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₁H₁₄₆FN₂₂O₃₀S₂Si⁺): 2258.0; m_{gefunden} : $m/z = 753.2$ [M+3H]³⁺, 1129.2 [M+2H]²⁺, 1505.0 [2M+3H]³⁺.

DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.8**)



Ausgehend von **V21** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.7**. DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.8**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (32 – 42% in 20 min): $t_R = 15.0$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₇H₁₅₈FN₂₄O₃₁S₂Si⁺): 2386.1; m_{gefunden} : $m/z = 597.4$ [M+4H]⁴⁺, 795.8 [M+3H]³⁺, 1193.2 [M+2H]²⁺, 1590.7 [2M+3H]³⁺.

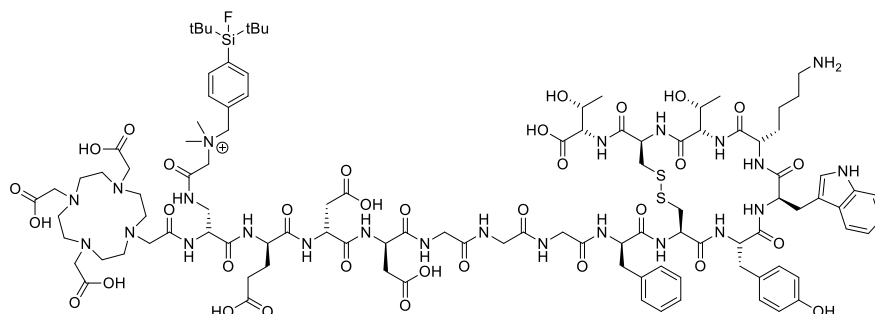
DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Cit-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.9**)



Ausgehend von **V22** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.7**. DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Cit-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.9**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (35 – 42% in 20 min): $t_R = 12.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.8$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₀₇H₁₅₇FN₂₅O₃₂S₂Si⁺): 2415.1; m_{gefunden} : $m/z = 805.4$ [M+3H]³⁺, 1207.7 [M+2H]²⁺, 1610.0 [2M+3H]³⁺.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

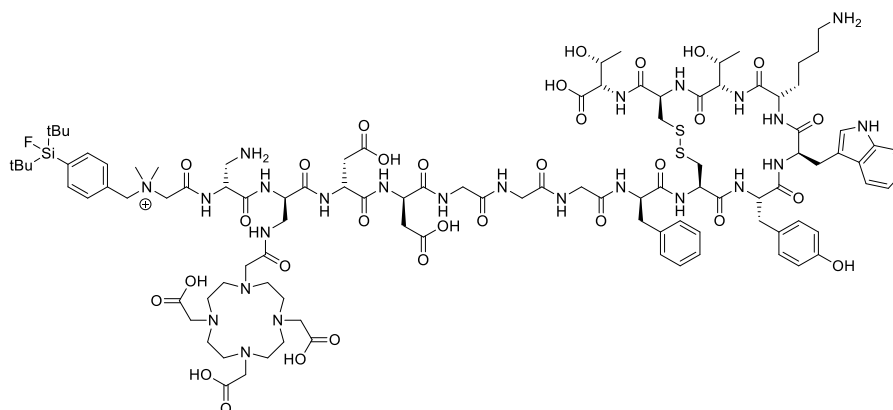
DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Glu-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-3.10)



Ausgehend von **V23** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-3.7**. DOTA-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Glu-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-3.10**) wird als farbloser Feststoff isoliert.

RP-HPLC semi-präparativ (40 – 50% in 20 min): $t_R = 15.5$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{106}H_{153}FN_{23}O_{33}S_2Si^+$): 2387.0; m_{gefunden} : $m/z = 796.3$ [$M+3H$]³⁺, 1068.7 [$M-CH_2-C_6H_4-Si(tBu)_2F+2H$]²⁺, 1193.8 [$M+2H$]²⁺.

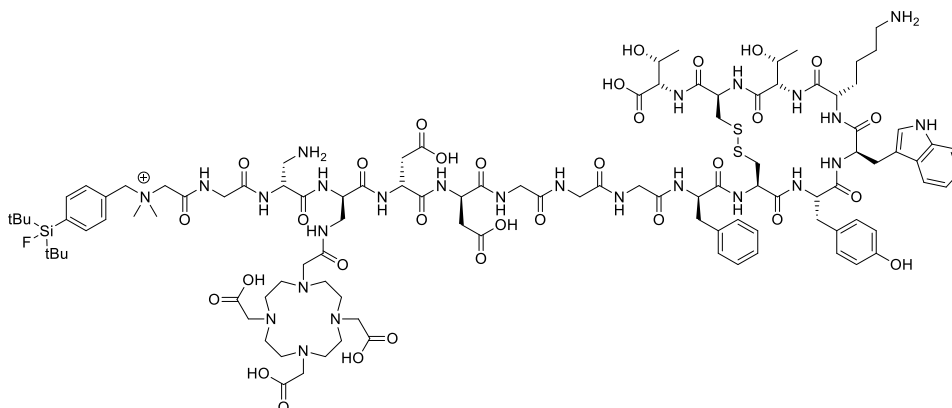
SiFAN⁺Gly-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-4.1)



V11 wird mit Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4) und Dde-entschützt (AAV7). Anschließend wird DOTA(*t*Bu)₃ konjugiert (AAV6), Fmoc-entschützt (AAV2) und Fmoc-D-Dap(Boc)-OH gekoppelt (AAV4). Nach der Fmoc-Entschützung, wird das Harz-gebundene Peptid (1.00 Äq.) unter Verwendung von HOAt (3.00 Äq.), TBTU (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (9.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz), mit *N,N*-Me₂-Gly-OH (3.00 Äq.) konjugiert (4 h bei RT). Die SiFAN⁺Gly Einheit wird durch Inkubation des Harzes (1.00 Äq.) mit SiFA-Br (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (6.00 Äq.) in DCM (8 mL/g Harz) aufgebaut (24 h bei RT). Das Peptid wird vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird SiFAN⁺Gly-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-4.1**) als farbloser Feststoff isoliert. Die Reinheit und Identität wird mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS untersucht. **RP-HPLC semi-präparativ** (40 – 45% in 20 min): $t_R = 14.5$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.6$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{104}H_{152}FN_{24}O_{31}S_2Si^+$): 2344.0; m_{gefunden} : $m/z = 781.3$ [$M+3H$]³⁺, 1171.4 [$M+2H$]²⁺, 1156.9 [$2M+3H$]³⁺, 1757.1 [$3M+4H$]⁴⁺.

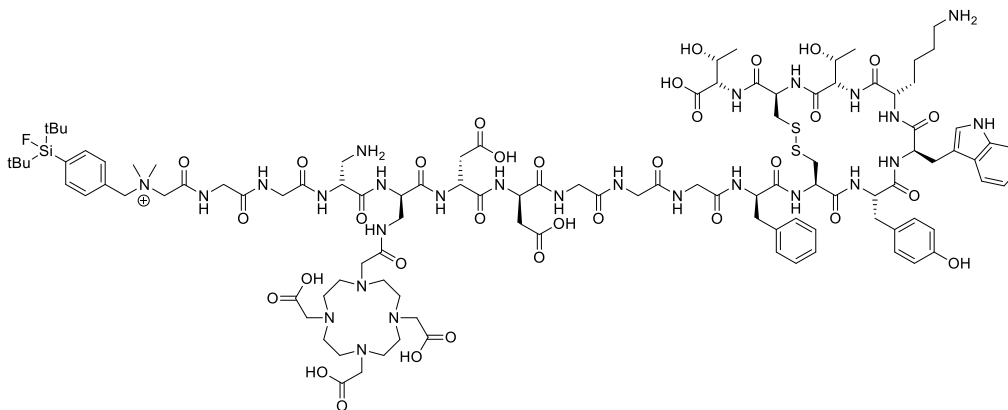
II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFAN⁺Gly-Gly-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-4.2)



Ausgehend von **V11** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-4.1**. Vor der Konjugation von *N,N*-Me₂-Gly-OH wird zunächst Fmoc-Gly-OH konjugiert (AAV3). SiFAN⁺Gly-Gly-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-4.2**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (45 – 48% in 20 min): *t_R* = 11.3 min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): *t_R* = 11.7 min. **ESI-MS**: *m_{exakt}* (C₁₀₆H₁₅₅FN₂₅O₃₂S₂Si⁺): 2401.1; *m_{gefunden}*: *m/z* = 800.2 [M+3H]³⁺, 1199.9 [M+2H]²⁺, 1599.9 [2M+3H]³⁺, 1800.2 [3M+4H]⁴⁺.

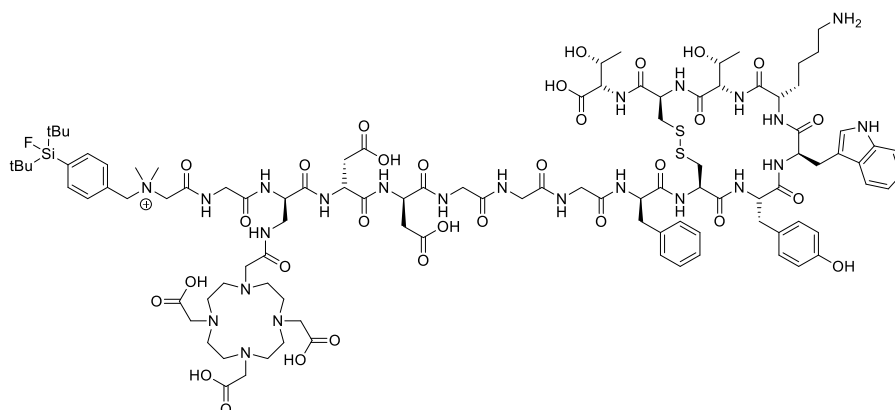
SiFAN⁺Gly-[Gly]₂-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-4.3)



Ausgehend von **V11** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-4.1**. Vor der Konjugation von *N,N*-Me₂-Gly-OH wird zunächst zweifach Fmoc-Gly-OH konjugiert (AAV3). SiFAN⁺Gly-[Gly]₂-D-Dap-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-4.3**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (42 – 45% in 20 min): *t_R* = 13.5 min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): *t_R* = 11.8 min. **ESI-MS**: *m_{exakt}* (C₁₀₈H₁₅₈FN₂₆O₃₃S₂Si⁺): 2458.1; *m_{gefunden}*: *m/z* = 819.2 [M+3H]³⁺, 1228.3 [M+2H]²⁺, 1637.4 [2M+3H]³⁺, 1841.8 [3M+4H]⁴⁺.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

SiFAN⁺Gly-Gly-D-Dap(DOTA)-D-Lys-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (rhLB-4.4)



Ausgehend von **V11** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhLB-4.1**. Statt Fmoc-D-Dap(Boc)-OH wird Fmoc-Gly-OH konjugiert (AAV3). SiFAN⁺Gly-Gly-D-Dap(DOTA)-[D-Asp]₂-[Gly]₃-TATE-OH (**rhLB-4.4**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (37 – 43% in 20 min): $t_R = 15.8$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{103}H_{149}FN_{23}O_{31}S_2Si^+$): 2315.0; m_{gefunden} : $m/z = 579.8$ [$M+4H$]⁴⁺, 772.8 [$M+3H$]³⁺, 1158.5 [$M+2H$]²⁺, 1544.9 [$2M+3H$]³⁺.

3.5.5 Metall Komplexierung

Die Komplexierung von ^{nat}Ga, ^{nat}Lu und ^{nat}Pb wird analog zu den allgemeinen Arbeitsvorschriften AAV14 und AAV15 durchgeführt. Die Ergebnisse der analytischen Untersuchung (analytische RP-HPLC und ESI-MS) sind im Folgenden aufgelistet.

[^{nat}Ga]Ga-Komplexe

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-1.9: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.6$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{100}H_{145}FGaN_{22}O_{27}S_2Si$): 2265.9; m_{gefunden} : $m/z = 1134.6$ [$M+2H$]²⁺, 757.0 [$M+3H$]³⁺.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{98}H_{138}FGaN_{22}O_{30}S_2Si$): 2282.8; m_{gefunden} : $m/z = 1142.1$ [$M+2H$]²⁺, 1522.5 [$2M+3H$]³⁺, 1712.1 [$3M+4H$]⁴⁺.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{101}H_{141}FGaN_{22}O_{32}S_2Si$): 2353.9; m_{gefunden} : $m/z = 1178.2$ [$M+2H$]²⁺, 1570.5 [$2M+3H$]³⁺, 1766.4 [$3M+4H$]⁴⁺.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.6: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{100}H_{142}FGaN_{21}O_{31}S_2Si$): 2312.9; m_{gefunden} : $m/z = 771.9$ [$M+3H$]³⁺, 1157.6 [$M+2H$]²⁺, 1542.9 [$2M+3H$]³⁺.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.4$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{99}H_{141}FGaN_{21}O_{29}S_2Si^+$): 2267.9; m_{gefunden} : $m/z = 756.6$ [$M+3H$]³⁺, 1134.4 [$M+2H$]²⁺, 1512.6 [$2M+3H$]³⁺.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.4: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{103}H_{151}FGaN_{24}O_{28}S_2Si$): 2352.0; m_{gefunden} : $m/z = 589.2 [M+4H]^{4+}$, 785.4 $[M+3H]^{3+}$, 1177.6 $[M+2H]^{2+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.7: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{96}H_{134}FGaN_{21}O_{29}S_2Si$): 2224.8; m_{gefunden} : $m/z = 743.0 [M+3H]^{3+}$, 1114.1 $[M+2H]^{2+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.8: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.8$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{100}H_{140}FGaN_{23}O_{31}S_2Si$): 2338.9; m_{gefunden} : $m/z = 781.1 [M+3H]^{3+}$, 1171.1 $[M+2H]^{2+}$, 1561.3 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.5: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{143}FGaN_{24}O_{30}S_2Si$): 2351.9; m_{gefunden} : $m/z = 785.2 [M+3H]^{3+}$, 1177.7 $[M+2H]^{2+}$, 1571.0 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.9: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{102}H_{143}FGaN_{24}O_{32}S_2Si$): 2395.9; m_{gefunden} : $m/z = 800.2 [M+3H]^{3+}$, 1200.3 $[M+2H]^{2+}$, 1599.2 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-2.10: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{102}H_{143}FGaN_{24}O_{32}S_2Si$): 2395.9; m_{gefunden} : $m/z = 799.8 [M+3H]^{3+}$, 1199.5 $[M+2H]^{2+}$, 1599.8 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.7: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{144}FGaN_{22}O_{30}S_2Si^+$): 2324.9; m_{gefunden} : $m/z = 775.4 [M+3H]^{3+}$, 1162.4 $[M+2H]^{2+}$, 1549.6 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.8: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{107}H_{156}FGaN_{24}O_{31}S_2Si^+$): 2453.0; m_{gefunden} : $m/z = 817.9 [M+3H]^{3+}$, 1226.0 $[M+2H]^{2+}$, 1634.6 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.9: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{107}H_{155}FGaN_{25}O_{32}S_2Si^+$): 2482.0; m_{gefunden} : $m/z = 827.6 [M+3H]^{3+}$, 1240.8 $[M+2H]^{2+}$, 1653.3 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.10: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{106}H_{151}FGaN_{23}O_{33}S_2Si^+$): 2453.9; m_{gefunden} : $m/z = 817.9 [M+3H]^{3+}$, 1226.6 $[M+2H]^{2+}$, 1635.3 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.3: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{103}H_{147}FGaN_{23}O_{31}S_2Si^+$): 2381.9; m_{gefunden} : $m/z = 794.1 [M+3H]^{3+}$, 1190.3 $[M+2H]^{2+}$, 1587.6 $[2M+3H]^{3+}$.
- [^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.4: RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{105}H_{150}FGaN_{24}O_{32}S_2Si^+$): 2438.9; m_{gefunden} : $m/z = 813.1 [M+3H]^{3+}$, 1218.8 $[M+2H]^{2+}$, 1625.1 $[2M+3H]^{3+}$, 1829.4 $[3M+4H]^{4+}$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{144}FGaN_{22}O_{30}S_2Si^+$): 2324.9; m_{gefunden} : $m/z = 775.1 [M+3H]^{3+}$, 1162.1 $[M+2H]^{2+}$, 1549.1 $[2M+3H]^{3+}$, 1742.3 $[3M+4H]^{4+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-4.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{104}H_{150}FGaN_{24}O_{31}S_2Si^+$): 2410.9; m_{gefunden} : $m/z = 803.5 [M+3H]^{3+}$, 1204.6 $[M+2H]^{2+}$, 1605.6 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-4.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.5$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{106}H_{153}FGaN_{25}O_{32}S_2Si^+$): 2468.0; m_{gefunden} : $m/z = 822.3 [M+3H]^{3+}$, 1232.8 $[M+2H]^{2+}$, 1643.7 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-4.3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{108}H_{156}FGaN_{26}O_{33}S_2Si^+$): 2525.0; m_{gefunden} : $m/z = 841.4 [M+3H]^{3+}$, 1261.3 $[M+2H]^{2+}$, 1680.8 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.13: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{103}H_{154}FGaN_{24}O_{26}S_2Si^+$): 2323.0; m_{gefunden} : $m/z = 581.8 [M+4H]^{4+}$, 775.3 $[M+3H]^{3+}$, 1163.2 $[M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.14: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{146}FGaN_{24}O_{28}S_2Si^+$): 2322.9; m_{gefunden} : $m/z = 775.3 [M+3H]^{3+}$, 1161.9 $[M+2H]^{2+}$, 1549.4 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.11: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{107}H_{156}FGaN_{24}O_{31}S_2Si^+$): 2453.0; m_{gefunden} : $m/z = 818.8 [M+3H]^{3+}$, 1227.9 $[M+2H]^{2+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.12: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{107}H_{155}FGaN_{25}O_{32}S_2Si^+$): 2482.0; m_{gefunden} : $m/z = 828.2 [M+3H]^{3+}$, 1242.2 $[M+2H]^{2+}$, 1655.7 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-3.15: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{110}H_{152}ClFGaN_{27}O_{32}S_2Si^+$): 2577.9; m_{gefunden} : $m/z = 860.6 [M+3H]^{3+}$, 1290.4 $[M+2H]^{2+}$, 1720.9 $[2M+3H]^{3+}$, 1935.3 $[3M+4H]^{4+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhLB-4.4: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{103}H_{147}FGaN_{23}O_{31}S_2Si^+$): 2381.9; m_{gefunden} : $m/z = 795.0 [M+3H]^{3+}$, 1192.0 $[M+2H]^{2+}$, 1588.6 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-Komplexe

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-2.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{98}H_{136}FLuN_{22}O_{30}S_2Si$): 2386.8; m_{gefunden} : $m/z = 796.9 [M+3H]^{3+}$, 1194.6 $[M+2H]^{2+}$, 1593.2 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-2.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.3$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{140}FLuN_{22}O_{32}S_2Si$): 2458.9; m_{gefunden} : $m/z = 820.8 [M+3H]^{3+}$, 1230.9 $[M+2H]^{2+}$, 1641.4 $[2M+3H]^{3+}$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.4$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{99}H_{140}FLuN_{21}O_{29}S_2Si^+$): 2372.9; m_{gefunden} : $m/z = 790.7 [M+3H]^{3+}$, 1185.8 $[M+2H]^{2+}$, 1581.2 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.7: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.2$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{143}FLuN_{22}O_{30}S_2Si^+$): 2429.9; m_{gefunden} : $m/z = 809.9 [M+3H]^{3+}$, 1214.2 $[M+2H]^{2+}$, 1618.7 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.8: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.6$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{107}H_{155}FLuN_{24}O_{31}S_2Si^+$): 2558.0; m_{gefunden} : $m/z = 852.6 [M+3H]^{3+}$, 1278.3 $[M+2H]^{2+}$, 1703.4 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.9: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{107}H_{154}FLuN_{25}O_{32}S_2Si^+$): 2587.0; m_{gefunden} : $m/z = 862.2 [M+3H]^{3+}$, 1292.8 $[M+2H]^{2+}$, 1722.8 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.10: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{106}H_{150}FLuN_{23}O_{33}S_2Si^+$): 2558.9; m_{gefunden} : $m/z = 853.0 [M+3H]^{3+}$, 1278.7 $[M+2H]^{2+}$, 1704.1 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{103}H_{146}FLuN_{23}O_{31}S_2Si^+$): 2486.9; m_{gefunden} : $m/z = 829.0 [M+3H]^{3+}$, 1242.7 $[M+2H]^{2+}$, 1656.3 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.4: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.0$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{105}H_{149}FLuN_{24}O_{32}S_2Si^+$): 2543.9; m_{gefunden} : $m/z = 847.9 [M+3H]^{3+}$, 1271.2 $[M+2H]^{2+}$, 1694.7 $[2M+3H]^{3+}$, 1907.3 $[3M+4H]^{4+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-3.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.3$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{101}H_{143}FLuN_{22}O_{30}S_2Si^+$): 2429.9; m_{gefunden} : $m/z = 810.0 [M+3H]^{3+}$, 1214.0 $[M+2H]^{2+}$, 1618.3 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-4.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{104}H_{149}FLuN_{24}O_{31}S_2Si^+$): 2515.9; m_{gefunden} : $m/z = 838.4 [M+3H]^{3+}$, 1257.5 $[M+2H]^{2+}$, 1676.2 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-4.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{106}H_{152}FLuN_{25}O_{32}S_2Si^+$): 2573.0; m_{gefunden} : $m/z = 857.3 [M+3H]^{3+}$, 1285.0 $[M+2H]^{2+}$, 1714.6 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Lu]Lu-rhLB-4.3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.3$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{108}H_{155}FLuN_{26}O_{33}S_2Si^+$): 2630.0; m_{gefunden} : $m/z = 876.4 [M+3H]^{3+}$, 1314.2 $[M+2H]^{2+}$, 1751.9 $[2M+3H]^{3+}$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

[^{nat}Pb]Pb-Komplexe

[^{nat}Pb]Pb-rhLB-2.3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($C_{98}H_{140}FN_{25}O_{27}PbS_2Si$): 2417.9; m_{gefunden} : $m/z = 807.2$ $[M+3H]^{3+}$, 1210.8 $[M+2H]^{2+}$, 1613.5 $[2M+3H]^{3+}$.

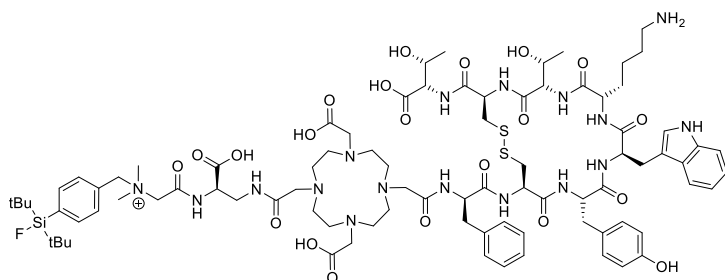
[^{nat}Pb]Pb-rhLB-3.5: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.8$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($C_{99}H_{144}FN_{24}O_{26}PbS_2Si$): 2404.0; m_{gefunden} : $m/z = 801.7$ $[M+3H]^{3+}$, 1202.0 $[M+2H]^{2+}$, 1603.4 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Pb]Pb-rhLB-3.6: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.6$ min. ESI-MS: m_{exakt} ($C_{101}H_{147}FN_{25}O_{27}PbS_2Si^+$): 2461.0; m_{gefunden} : $m/z = 616.2$ $[M+4H]^{4+}$, 821.2 $[M+3H]^{3+}$, 1231.5 $[M+2H]^{2+}$, 1641.7 $[2M+3H]^{3+}$.

3.6 Synthese DOTA-TATE-basierter Liganden

3.6.1 Ligand Synthese: 1. Generation

SiFAN⁺Gly-D-Dap(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-1.1)



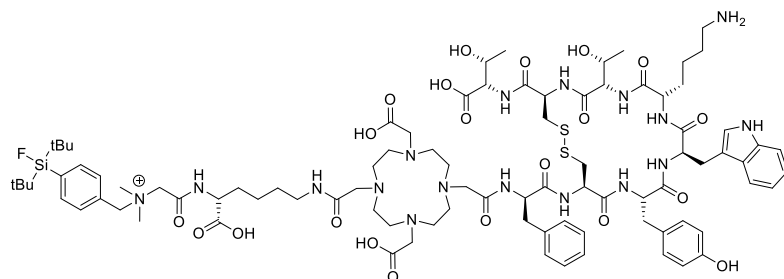
Für die Konjugation mit DOTA(*t*Bu)₂ wird ein von AAV3 abgeleitetes Protokoll angewandt. Eine Lösung aus DOTA(*t*Bu)₂ (3.00 Äq.), HOAt (3.00 Äq.), TBTU (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (11.0 Äq.) wird für 10

min in DMF (8 mL/g Harz) voraktiviert, zum an das Harz-gebundenen Vorläufer **V1** (1.00 Äq.) gegeben und für 24 h bei RT zur Reaktion belassen. Zur anschließenden Konjugation mit Fmoc-D-Dap-*O**t*Bu, wird das Harz (1.00 Äq.) mit einer Lösung aus TBTU (1.50 Äq.), HOAt (1.50 Äq.) und DIPEA (4.50 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz) versetzt und 10 min voraktiviert. Anschließend erfolgt die Zugabe des in wenig DMF gelösten Fmoc-D-Dap-*O**t*Bu (1.00 Äq.) zum Harz (2 h bei RT) AAV3. Nach der Fmoc-Entschützung (AAV2), wird das Harz-gebundene Peptid (1.00 Äq.) unter Verwendung von HOAt (3.00 Äq.), TBTU (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (9.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz), mit *N,N*-Me₂-Gly-OH (3.00 Äq.) konjugiert (4 h bei RT). Die SiFAN⁺Gly Einheit wird durch Inkubation des Harzes (1.00 Äq.) mit SiFA-Br (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (6.00 Äq.) in DCM (8 mL/g Harz) aufgebaut (24 h bei RT). Das Peptid wird vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird SiFAN⁺Gly-D-Dap(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-1.1**) als farbloser Feststoff isoliert. Die Reinheit und Identität wird mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS untersucht.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

RP-HPLC semi-präparativ (35 – 47% in 20 min): $t_R = 17.2$. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.6$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{87}H_{127}FN_{17}O_{21}S_2Si^+$): 1856.9; m_{gefunden} : $m/z = 619.9 [M+3H]^{3+}$, 929.3 $[M+2H]^{2+}$.

SiFAN⁺Gly-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-1.2)

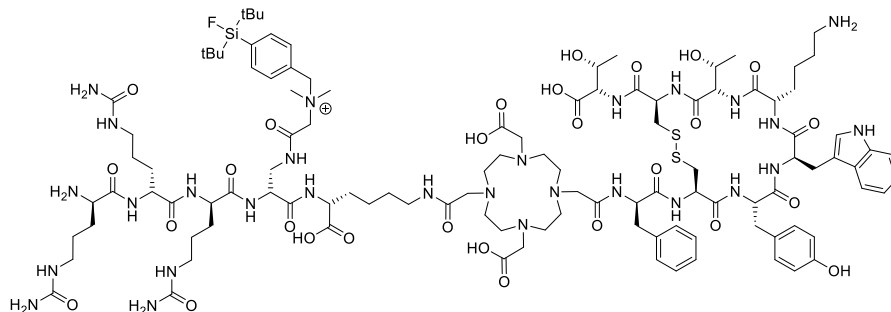


Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-1.1**. Statt Fmoc-D-Dap-*Or*Bu wird Fmoc-D-Lys-*Or*Bu eingesetzt. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. SiFAN⁺Gly-D-

Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-1.2**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (33 – 50% in 20 min): $t_R = 18.5$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 12.7$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{90}H_{133}FN_{17}O_{21}S_2Si^+$): 1898.9; m_{gefunden} : $m/z = 634.0 [M+3H]^{3+}$, 950.3 $[M+2H]^{2+}$, 1899.8 $[M+H]^+$.

3.6.2 Ligand Synthese: 2. und 3. Generation

H-[D-Cit]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-2.1)

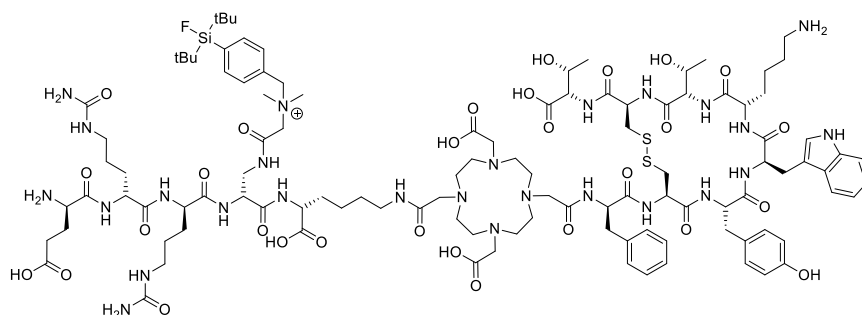


Für die Konjugation mit DOTA(*t*Bu)₂ wird ein von AAV3 abgeleitetes Protokoll angewandt. Eine Lösung aus DOTA(*t*Bu)₂ (3.00 Äq.), HOAt (3.00 Äq.), TBTU (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (11.0 Äq.) wird für 10 min in DMF (8 mL/g Harz) voraktiviert, zum Harz-gebundenen Vorläufer **V1** (1.00 Äq.) gegeben und für 24 h bei RT zur Reaktion belassen. Zur anschließenden Konjugation mit Fmoc-D-Lys-*Or*Bu, wird das Harz (1.00 Äq.) mit einer Lösung aus TBTU (1.50 Äq.), HOAt (1.50 Äq.) und DIPEA (4.50 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz) versetzt und 10 min voraktiviert. Anschließend erfolgt die Zugabe des in wenig DMF gelösten Fmoc-D-Lys-*Or*Bu (1.00 Äq.) zum Harz (2 h bei RT) AAV3. Nach der Fmoc-Entschützung (AAV2), wird Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert (AAV4) und Dde-entschützt (AAV7). Anschließend wird das Harz-gebundene Peptid (1.00 Äq.) unter Verwendung von HOAt (3.00 Äq.), TBTU (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (9.00 Äq.) in DMF (8 mL/g Harz), mit *N,N*-Me₂-Gly-OH (3.00 Äq.) konjugiert (4 h bei RT) und Fmoc-entschützt (AAV2). Nacheinander werden Fmoc-D-Cit-

II. MATERIALIEN UND METHODEN

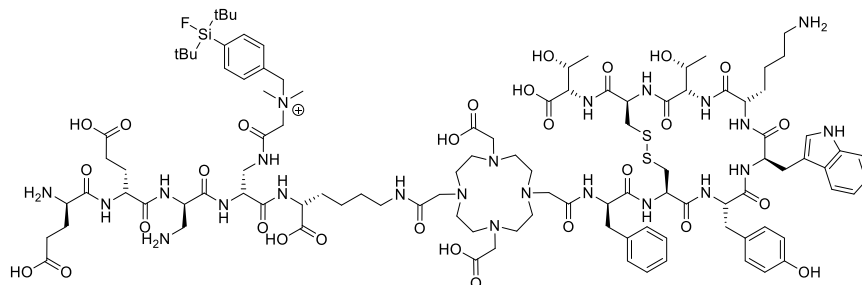
OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH analog zu AAV3 konjugiert, wobei die finale Fmoc-Schutzgruppe nicht abgespalten wird. Die SiFAN⁺Gly Einheit wird durch Inkubation des Harzes (1.00 Äq.) mit SiFA-Br (3.00 Äq.) und 2,4,6-Collidin (6.00 Äq.) in DCM (8 mL/g Harz) aufgebaut (24 h bei RT). Nach finaler Fmoc-Entschützung, wird das Peptid vollständig entschützt und vom Harz abgespalten (AAV9). Das Rohprodukt wird mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt (AAV11) und nach abschließender Lyophilisation (AAV12) wird H-[D-Cit]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-2.1**) als farbloser Feststoff isoliert. Die Reinheit und Identität wird mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS untersucht. **RP-HPLC semi-präparativ** (33 – 41% in 20 min): $t_R = 15.9$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₁₁H₁₇₂FN₂₈O₂₈S₂Si⁺): 2456.2; m_{gefunden} : $m/z = 819.9$ [M+3H]³⁺, 1229.1 [M+2H]²⁺, 1639.2 [2M+3H]³⁺, 1843.9 [3M+4H]⁴⁺.

H-D-Glu-[D-Cit]₂-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-2.2**)



Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-2.1**. Statt Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH werden nacheinander Fmoc-D-Cit-OH (AAV3), Fmoc-D-Cit-OH (AAV3) und Fmoc-D-Glu-OH (AAV3) konjugiert. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. H-D-Glu-[D-Cit]₂-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-2.2**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (33 – 40% in 20 min): $t_R = 7.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.3$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} (C₁₁₀H₁₆₈FN₂₆O₂₉S₂Si⁺): 2428.2; m_{gefunden} : $m/z = 810.3$ [M+3H]³⁺, 1215.2 [M+2H]²⁺, 1619.9 [2M+3H]³⁺.

H-[D-Glu]₂-D-Dap-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-2.3**)

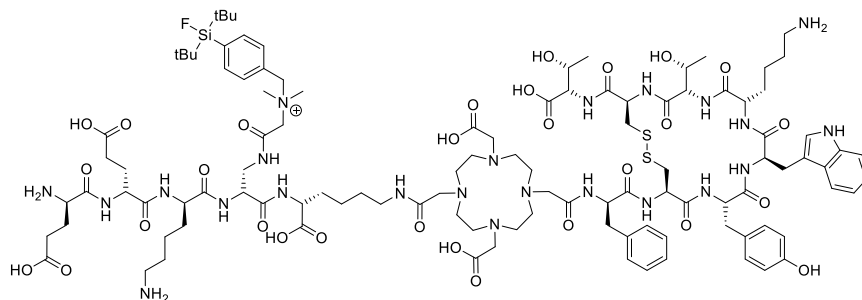


Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-2.1**. Statt Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH werden nacheinander Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) und Fmoc-D-Dap(Boc)-OH (AAV4) konjugiert. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. H-[D-Glu]₂-D-Dap-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-2.3**)

II. MATERIALIEN UND METHODEN

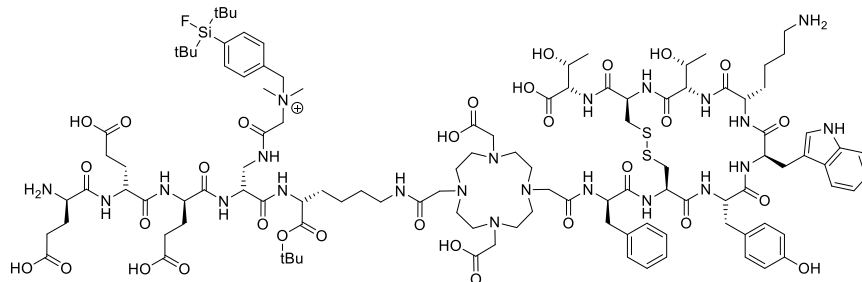
wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (30 – 43% in 20 min): $t_R = 17.6$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{106}H_{159}FN_{23}O_{29}S_2Si^+$): 2329.1; m_{gefunden} : $m/z = 583.2 [M+4H]^{4+}$, $777.1 [M+3H]^{3+}$, $1165.2 [M+2H]^{2+}$, $1553.6 [2M+3H]^{3+}$, $1748.9 [3M+4H]^{4+}$.

H-[D-Glu]₂-D-Lys-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-2.4)



Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-2.1**. Statt Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH werden nacheinander Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) und Fmoc-D-Lys(Boc)-OH (AAV3) konjugiert. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. H-[D-Glu]₂-D-Lys-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-2.4**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (30 – 47% in 20 min): $t_R = 15.7$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.1$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{109}H_{165}FN_{23}O_{29}S_2Si^+$): 2371.1; m_{gefunden} : $m/z = 791.2 [M+3H]^{3+}$, $1186.8 [M+2H]^{2+}$, $1582.5 [2M+3H]^{3+}$.

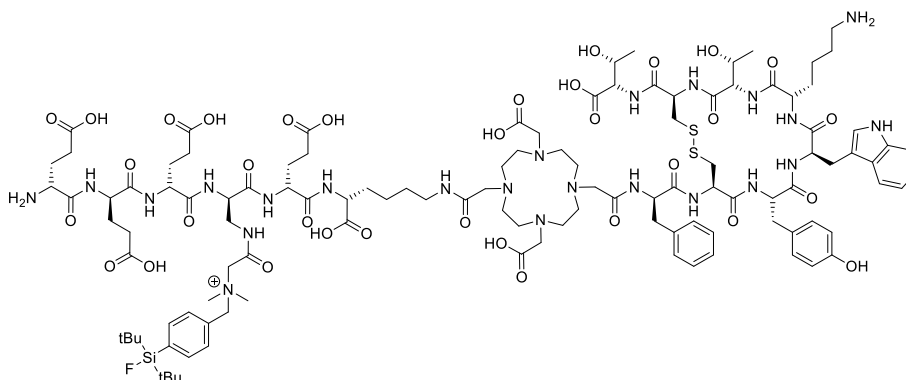
H-[D-Glu]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-2.5)



Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-2.1**. Statt Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH werden nacheinander Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) und Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) konjugiert. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. H-[D-Glu]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-2.5**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (30 – 43% in 20 min): $t_R = 17.2$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.5$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{108}H_{160}FN_{22}O_{31}S_2Si^+$): 2372.1; m_{gefunden} : $m/z = 593.2 [M+4H]^{4+}$, $791.0 [M+3H]^{3+}$, $1185.9 [M+2H]^{2+}$, $1581.1 [2M+3H]^{3+}$, $1779.2 [3M+4H]^{4+}$.

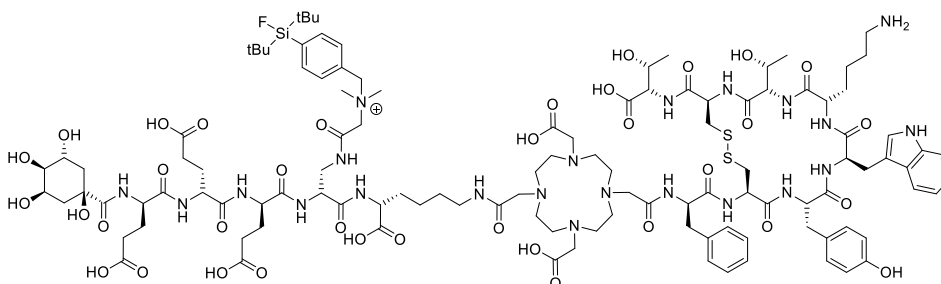
II. MATERIALIEN UND METHODEN

H-[D-Glu]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Glu-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-3.1)



Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-2.1**. Vor der Konjugation des Fmoc-D-Dap(Dde)-OH, erfolgt der Einbau eines zusätzlichen Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3). Des Weiteren werden statt Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH, nacheinander Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) und Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) konjugiert. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. H-[D-Glu]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Glu-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-3.1**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (30 – 60% in 20 min): $t_R = 18.1$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{113}H_{167}FN_{23}O_{34}S_2Si^+$): 2501.1; m_{gefunden} : $m/z = 625.8 [M+4H]^{4+}$, 834.0 $[M+3H]^{3+}$, 1250.5 $[M+2H]^{2+}$, 1667.1 $[2M+3H]^{3+}$, 1875.3 $[3M+4H]^{4+}$.

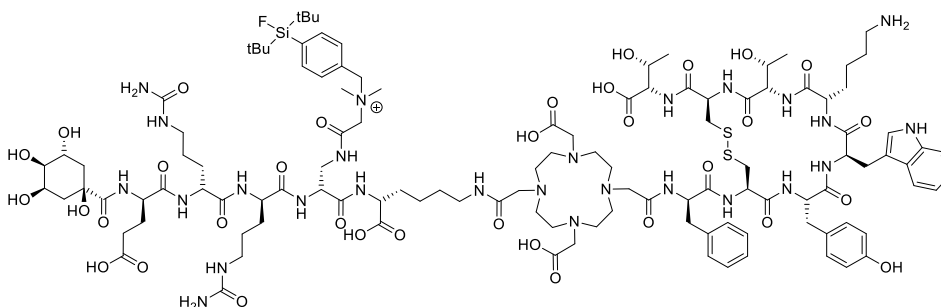
D-(-)-Chinasäure-[D-Glu]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-3.2)



Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-2.1**. Statt Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH werden nacheinander Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3), Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) und Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) konjugiert. Der *N*-Terminus wird Fmoc-entschützt und nach AAV3 mit Chinasäure konjugiert (die Reaktion muss zweifach durchgeführt werden). Anschließend wird analog zu **rhDTB-2.1** die SiFAN⁺Gly Einheit aufgebaut. Alle weiteren Schritte sind übertragbar. D-(-)-Chinasäure-[D-Glu]₃-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-3.2**) wird als farbloser Feststoff isoliert. **RP-HPLC semi-präparativ** (38 – 42% in 20 min): $t_R = 24.4$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.6$ min. **ESI-MS**: m_{exakt} ($C_{115}H_{170}FN_{22}O_{36}S_2Si^+$): 2546.1; m_{gefunden} : $m/z = 849.1 [M+3H]^{3+}$, 1272.9 $[M+2H]^{2+}$, 1696.8 $[2M+3H]^{3+}$.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

D-(-)-Chinasäure-D-Glu-[D-Cit]₂-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (rhDTB-3.3)



Ausgehend von **V1** erfolgt die Synthese analog zur Synthese von **rhDTB-2.1**. Statt Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Cit-OH und Fmoc-D-Cit-OH werden nacheinander Fmoc-D-Cit-OH (AAV3), Fmoc-D-Cit-OH (AAV3) und Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH (AAV3) konjugiert. Der *N*-Terminus wird Fmoc-entschützt und nach AAV3 mit Chinasäure konjugiert (die Reaktion muss zweifach durchgeführt werden). Anschließend wird analog zu **rhDTB-2.1** die SiFAN⁺Gly Einheit aufgebaut. Analog zu AAV8, wird das Peptid unter Erhalt der säurelabilen Schutzgruppen vom Harz abgespalten und mittels semi-präparativer RP-HPLC vor der eigentlichen Entschützung aufgereinigt (AAV11). Das aufgereinigte Rohprodukt wird in 2-5 mL TFA/TIPS/H₂O (95/2.5/2.5 v/v/v) aufgenommen, 1 h bei RT inkubiert und die Flüssigkeit im Stickstoffstrom eingedampft. Das verbleibende nun entschützte Rohprodukt wird analog zu AAV11 final aufgereinigt und Lyophilisation (AAV12) liefert D-(-)-Chinasäure-D-Glu-[D-Cit]₂-D-Dap(SiFAN⁺Gly)-D-Lys(*trans*-DOTA-TATE)-OH (**rhDTB-3.3**) als farblosen Feststoff.

rhDTB-3.3(PG): RP-HPLC semi-präparativ (48 – 88% in 20 min): $t_R = 20.5$ min.

rhDTB-3.3: RP-HPLC semi-präparativ (37 – 47% in 20 min): $t_R = 16.8$ min. **RP-HPLC** (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.4$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} (C₁₁₇H₁₇₈FN₂₆O₃₄S₂Si⁺): 2602.2; m_{gefunden} : $m/z = 868.0$ [M+3H]³⁺, 1301.6 [M+2H]²⁺, 1735.2 [2M+3H]³⁺, 1952.1 [3M+4H]⁴⁺.

3.6.3 Metall Komplexierung

Die Komplexierung von ^{nat}Ga wird analog zur allgemeinen Arbeitsvorschrift AAV14 durchgeführt. Die Ergebnisse der analytischen Untersuchung (analytische RP-HPLC und ESI-MS) sind im Folgenden aufgelistet.

[^{nat}Ga]Ga-Komplexe

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-1.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 13.1$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} (C₈₇H₁₂₅FGaN₁₇O₂₁S₂Si⁺): 1923.8; m_{gefunden} : 642.2 [M+3H]³⁺, 962.7 [M+2H]²⁺, 1283.5 [2M+3H]³⁺.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-1.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 13.2$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} (C₉₀H₁₃₁FGaN₁₇O₂₁S₂Si⁺): 1965.8; m_{gefunden} : 656.2 [M+3H]³⁺, 983.8 [M+2H]²⁺, 1311.8 [2M+3H]³⁺.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-2.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.5$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} (C₁₁₁H₁₇₀FGaN₂₈O₂₈S₂Si⁺): 2523.1; m_{gefunden} : 841.7 [M+3H]³⁺, 1262.3 [M+2H]²⁺, 1682.8 [2M+3H]³⁺.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-2.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.5$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{110}H_{166}FGaN_{26}O_{29}S_2Si^+$): 2495.1; m_{gefunden} : 832.3 $[M+3H]^{3+}$, 1248.3 $[M+2H]^{2+}$, 1664.2 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-2.3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.3$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{106}H_{157}FGaN_{23}O_{29}S_2Si^+$): 2396.0; m_{gefunden} : 600.3 $[M+4H]^{4+}$, 799.7 $[M+3H]^{3+}$, 1199.1 $[M+2H]^{2+}$, 1598.5 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-2.4: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.2$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{109}H_{163}FGaN_{23}O_{29}S_2Si^+$): 2438.0; m_{gefunden} : 610.6 $[M+4H]^{4+}$, 813.9 $[M+3H]^{3+}$, 1220.3 $[M+2H]^{2+}$, 1626.7 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-2.5: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{108}H_{158}FGaN_{22}O_{31}S_2Si^+$): 2439.0; m_{gefunden} : 610.2 $[M+4H]^{4+}$, 813.2 $[M+3H]^{3+}$, 1219.2 $[M+2H]^{2+}$, 1625.4 $[2M+3H]^{3+}$, 1828.7 $[3M+4H]^{4+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-3.1: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.5$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{113}H_{165}FGaN_{23}O_{34}S_2Si^+$): 2568.0; m_{gefunden} : 856.4 $[M+3H]^{3+}$, 1283.7 $[M+2H]^{2+}$, 1711.6 $[2M+3H]^{3+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-3.2: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.9$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{115}H_{168}FGaN_{22}O_{36}S_2Si^+$): 2613.0; m_{gefunden} : 871.7 $[M+3H]^{3+}$, 1306.9 $[M+2H]^{2+}$, 1742.3 $[2M+3H]^{3+}$, 1960.5 $[3M+4H]^{4+}$.

[^{nat}Ga]Ga-rhDTB-3.3: RP-HPLC (10 – 60% in 15 min): $t_R = 11.7$ min. **ESI-MS:** m_{exakt} ($C_{117}H_{176}FGaN_{26}O_{34}S_2Si^+$): 2669.1; m_{gefunden} : 890.3 $[M+3H]^{3+}$, 1334.9 $[M+2H]^{2+}$, 1779.5 $[2M+3H]^{3+}$.

4. Radiomarkierungen

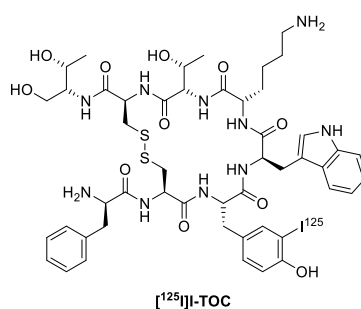
4.1 ¹⁸F-Markierung

Vor der eigentlichen Markierung, wird ein Elutionscocktail von Ammoniumformiat (40.0 mg) in trockenem DMSO (500 μ L) vorbereitet (mehrere mL können bis zu 6 Monate gelagert und angewandt werden). Das aq. [¹⁸F]Fluorid wird auf einer SAX Kartusche (Sep-Pak Accel Plus QMA Carbonate Plus Light, 46 mg, *Waters*) retentiert, die zuvor mit 10 mL H₂O konditioniert wurde. Nach Luft-Trocknung (20 mL Luft), wird die Kartusche langsam mit trockenem DMSO gewaschen (8 mL) und nochmals mit Luft getrocknet (20 mL Luft). Das getrocknete [¹⁸F]Fluorid wird mit 500 μ L des Elutionscocktails in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß (Protein LowBind, *Eppendorf*) eluiert. Anschließend erfolgt die Zugabe des zu markierenden Liganden. Dieser liegt in DMSO gelöst vor, wobei durch die Komplexbildung mit ^{nat}Ga, ^{nat}Lu oder ^{nat}Pb geringe Mengen H₂O enthalten sind. Die Konzentration der Stammlösung beträgt üblicherweise 1 mM und es werden zwischen 0.50 μ L und 150 μ L (0.05 nmol – 150 nmol) zugegeben. Die Reaktion wird für 5 min bei RT oder einer erhöhten Temperatur (bis zu 70 °C) belassen. Die Reaktion wird abgebrochen indem mit 10 mL PBS_{pH=3} (pH = 3 eingestellt mit 1 M aq. HCl) verdünnt wird. Diese Lösung wird langsam auf eine Oasis HLB Plus Light Kartusche (30 mg Sorbens, 30 μ m

II. MATERIALIEN UND METHODEN

Partikelgröße) beladen, die zuvor mit abs. EtOH (10 mL) und H₂O (10 mL) konditioniert wurde. Die Kartusche wird mit PBS_{pH=7.4} (10 mL) gewaschen und mit Luft getrocknet (10 mL). Final wird der [¹⁸F]-markierte Ligand mit einer Mischung aus abs. EtOH und PBS_{pH=7.4} (7/3 v/v; 300 µL) eluiert. Qualitätskontrollen erfolgen mittels analytischer Radio-RP-HPLC und Radiodünnschichtchromatographie. Als Elutionsmittel für die Radio-DC wird folgendes Gemisch verwendet: 10 mL MeCN und PBS (8/2 v/v), 1 mL NaOAc in H₂O (2 M), 200 µL TFA. Als stationäre Phase werden Fertigplatten des Typs *Silicagel 60 RP-18 F₂₅₄S* der Firma *MerckMillipore* eingesetzt.

4.2 ¹²⁵I-Markierung von TOC



Der Referenz-Ligand für *in vitro* Studien (IC₅₀, Internalisierung) wird analog zu publizierten Verfahren hergestellt.[171] Es werden 50-150 µg des nicht iodierten Vorläufers TOC, in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf (Protein LowBind), in 20 µL DMSO gelöst und mit 280 µL TRIS Puffer (25 mM TRIS-HCl, 0.4 mM NaCl, pH = 7.5) versetzt. Die Lösung wird in ein weiteres Reaktionsgefäß (1.5 mL, Protein LowBind) überführt, welches mit 150 µg Iodogen® beschichtet ist. Sofort werden 5.00 µL (10 – 20 MBq) [¹²⁵I]NaI-Lösung (74 TBq/mmol, 3.1 GBq/mL, 40 mM NaOH, Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) zugegeben und die Reaktionslösung wird für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird abgebrochen, indem die Lösung und das Oxidationsmittel (Iodogen®) getrennt werden. Das noch gelöste Rohprodukt [¹²⁵I]I-TOC wird mittels analytischer RP-HPLC aufgereinigt [(20 – 50% in 15 min): *t_R* = 9.4 min] und die resultierende Produktlösung wird mit 10 Vol-% einer 100 mM Na-Ascorbat-Lösung in H₂O versetzt, um Radiolyse zu verhindern. Die Konzentration des [¹²⁵I]I-TOC wird bestimmt, indem zunächst die gesamte Lösung mittels einer Mikroliter Pipette in ein neues Gefäß (20 mL Reaktionsgefäß) überführt und so das Volumen exakt bestimmt wird. Anschließend wird in einem Aktivimeter die enthaltene Menge ¹²⁵I ermittelt. Über die molare Aktivität der kommerziell erworbenen [¹²⁵I]NaI-Lösung, lässt sich die Stoffmengenkonzentration ermitteln. Diese wird verwendet um für Internalisierungen und IC₅₀-Studien, um das [¹²⁵I]I-TOC im Assay-Medium auf die benötigte Konzentration zu verdünnen. [¹²⁵I]I-TOC wird bei –4 °C gelagert und kann bis zu vier Wochen verwendet werden.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

4.3 ^{177}Lu -Markierung

Die Radiomarkierung mit ^{177}Lu erfolgt analog zu bereits publizierten Verfahren.[172, 173] Der zu markierende Vorläufer (1.00 – 2.00 nmol, 1.00 μL , 1 mM in DMSO) wird in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß (Protein LowBind, *Eppendorf*) mit 10 μL NaOAc Puffer (pH = 4.5) verdünnt. Anschließend erfolgt die Zugabe des in 0.04 M HCl gelösten [^{177}Lu]LuCl₃ (10 – 50 MBq, Volumen wird durch tagesaktuelle Aktivitätskonzentration definiert) und die Lösung wird durch Zugabe von 0.04 M HCl auf ein Gesamtvolumen von 100 μL ausgefüllt. Die Lösung wird kräftig durchmischt, abzentrifugiert und für 15 – 30 min bei 95 °C zur Reaktion belassen. Die Qualitätskontrolle erfolgt mittels Radiodünnschichtchromatographie und analytischer Radio-RP-HPLC. Als Elutionsmittel für die Radio-DC wird folgendes Gemisch verwendet: 10 mL MeCN und PBS (8/2 v/v), 1 mL NaOAc in H₂O (2 M), 200 μL TFA. Als stationäre Phase werden Fertigplatten des Typs *Silicagel 60 RP-18 F_{254S}* der Firma *MerckMillipore* eingesetzt. Zusätzlich wird eine weitere DC mit 0.1 M Na-Citrat-Lösung als Elutionsmittel und mit Silicagel bedampften Cellulose Streifen durchgeführt.

5. *In vitro* Experimente

5.1 Biochemikalien

Bezeichnung	Zusammensetzung (<i>Hersteller</i>)
DMEM	DMEM/F12 (1:1); Nährmedium mit GlutaMAX-I (<i>Gibco, ThermoFisher Scientific</i>)
RPMI	RPMI Medium 1640; Nährmedium mit L-Glutamin (<i>Gibco, ThermoFisher Scientific</i>)
L-Glutamin	200 mM, endotoxinarm (<i>Biochrom GmbH</i>)
FKS	FKS Superior stabil, steril (<i>BIO&SELL GmbH</i>)
BSA	Proteasefrei (<i>biowest</i>)
HBSS	Hanks' Salzlösung mit NaHCO ₃ (0.35 g/L), Ca ²⁺ und Mg ²⁺ ; ohne Phenolrot (<i>Sigma-Aldrich</i>)
HBSA	HBSS mit 1% BSA (w/v) als Zusatz
PBS	PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , endotoxinarm, steril (<i>Sigma-Aldrich</i>)
Trypsin/EDTA	0.05% Trypsin, 0.02% EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , steril (<i>PAN-Biotech GmbH</i>)
EDTA	EDTA (Versen), 1% (w/v) in PBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , steril (<i>Biochrom GmbH</i>)
EDTA/PBS	0.1% (w/v) in PBS (EDTA wird 1/10 (v/v) in PBS verdünnt)
Trypanblau	0.4% ige Lösung (<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</i>)

II. MATERIALIEN UND METHODEN

5.2 Zellkultur

Alle verwendeten Medien und Lösungen die mit den Zellen in Kontakt gebracht werden, werden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

5.2.1 Kultivierung der SST₂-CHO Zellen

Die mit SST₂ transfizierten CHO Zellen werden in DMEM Medium (zzgl. 10% FKS v/v) und bei 37 °C in einer feuchten, 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um ein gleichmäßiges Zellwachstum zu garantieren werden diese bei ca. 80% Konfluenz, was in einem Rhythmus von 2-4 Tagen der Fall ist, passagiert. Das verbrauchte Medium wird abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen (10 mL, 37 °C). Durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (5 mL, 37 °C, 3 min) bei 37 °C werden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und nach Zugabe von 5 mL DMEM-Medium (zzgl. 10% FKS v/v) suspendiert. Die Suspension wird zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, RT) und die Zellen in DMEM-Medium (10 mL, zzgl. 10% FKS v/v, 37 °C) resuspendiert. Ein Teil der Suspension wird in neue Kulturflaschen überführt und das Volumen mit DMEM-Medium (zzgl. 10% FKS v/v) auf 25 mL aufgefüllt. Die Zellen werden bei den genannten Brutbedingungen gelagert und die Zelldichte regelmäßig unter dem Inversmikroskop kontrolliert.

5.2.2 Kultivierung der AR42J Zellen

Die AR42J Zellen werden in RPMI Medium (zzgl. 10% FKS v/v, 2 mM L-Glutamin) und bei 37 °C in einer feuchten, 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um ein gleichmäßiges Zellwachstum zu garantieren werden diese bei ca. 70% Konfluenz, was in einem Rhythmus von 3-4 Tagen der Fall ist, passagiert. Zu diesem Zweck wird das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen (10 mL, 37 °C). Durch Behandlung mit Trypsin/PBS (10 mL, 37 °C, 5-10 min) bei 37 °C werden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und nach Zugabe von 10 mL RPMI-Medium (zzgl. 10% FKS v/v, 2 mM L-Glutamin) suspendiert. Die Suspension wird zentrifugiert (1300 rpm, 3 min, RT) und die Zellen in RPMI-Medium (10 mL, zzgl. 10% FKS v/v, 2 mM L-Glutamin, 37 °C) resuspendiert. Ein Teil der Suspension wird in neue Kulturflaschen überführt und das Volumen mit RPMI Medium (zzgl. 10% FKS v/v, 2 mM L-Glutamin) auf 25 mL aufgefüllt. Die Zellen werden bei den genannten Brutbedingungen gelagert und die Zelldichte regelmäßig unter dem Inversmikroskop kontrolliert.

5.2.3 Zellzählung und Aussaat

Für Affinitäts- und Internalisierungsstudien werden, nach Ablösen der Zellen von der Kulturflasche, 10 µL der Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau versetzt. 10 µL dieses Gemisches werden in eine

II. MATERIALIEN UND METHODEN

Neubauer-Zählkammer (0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm² Fläche) eingebracht und mittels eines Inversmikroskops die Zellzahl bestimmt. Die Bestimmung der Bindungsaffinität wird mit CHO-SST₂ Zellen in 24-Well-Platten durchgeführt, wozu mittels der Zellsuspension und zusätzlichem DMEM-Medium (zzgl. 10% FKS *v/v*) eine Zellzahl von 1.0×10^5 Zellen/Well in einem Volumen von 1 mL erzeugt wird. Für Internalisierungsstudien werden AR42J Zellen in Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Platten verwendet, wozu mittels der Zellsuspension und zusätzlichem RPMI-Medium (zzgl. 10% FKS *v/v*, 2 mM L-Glutamin) eine Zellzahl von 2.0×10^5 Zellen/Well in einem Volumen von 1 mL erzeugt wird. Die Zellen werden $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ vor Durchführung ausgesät und unter den genannten Brutbedingungen gelagert.

5.2.4 Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀)

Vor Durchführung des Assays wird von dem zu untersuchenden Liganden eine Verdünnungsreihe in Konzentrationen von 10^{-4} M bis 10^{-10} M in HBSA angesetzt. Für die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀), werden 24 ± 2 h vor dem Experiment, SST₂-CHO Zellen in 24-Well-Platten (1.0×10^5 Zellen/Well) ausgesät. Das Nährmedium wird entfernt und der Zellrasen mit 300 µL HBSA gewaschen. Die Waschlösung wird entfernt und je Well werden 200 µL HBSA zugegeben. Es werden 25 µL des Referenzliganden [¹²⁵I]-TOC (Verdünnung 1 nM in HBSA; Assaykonzentration: 0.1 nM). Anschließend werden je Well 25 µL HBSA (Kontrollreihe) oder 25 µL der Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Liganden zugegeben (Assaykonzentration: $10^{-11} - 10^{-5}$ M). Jede Konzentration und die Kontrollreihe werden dabei dreifach untersucht (3 Wells je Konzentration). Der Assay wird 60 min bei RT inkubiert. Das Medium wird abgenommen und mit 300 µL eiskaltem PBS gewaschen. Medium und die PBS-Waschlösung werden in einer Fraktion je Well vereint (ungebundener Referenz-Radioligand). Die Zellen werden mit 300 µL 1 M NaOH je Well für 20 min bei RT behandelt und lysiert. Das Lysat wird abgenommen, mit je 300 µL 1 M NaOH nachgewaschen und das Lysat und die Waschfraktion werden vereint (Zellgebundener Referenz-Radioligand). Die Quantifizierung des ungebundenen und gebundenen Radioliganden erfolgt in einem Gamma-Counter und mittels der GraphPad PRISM Software wird der IC₅₀ ermittelt.

5.2.5 Internalisierung

Vor Durchführung des Assays wird der zu untersuchende Ligand mit ¹⁸F oder ¹⁷⁷Lu radiomarkiert und eine 20 nM Lösung in Assaymedium hergestellt (RPMI, 2 mM L-Gln, 5% BSA *w/v*). In derselben Lösung wird gleichzeitig der Referenzligand [¹²⁵I]-TOC auf eine Konzentration von 1 nM verdünnt. Für die Bestimmung der Internalisierung, werden 24 ± 2 h vor dem Experiment, AR42J Zellen in Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Platten (2.0×10^5 Zellen/Well) ausgesät. Das Nährmedium wird entfernt und der Zellrasen wird mit 300 µL Assaymedium gewaschen, die Waschlösung wird entfernt und es werden

II. MATERIALIEN UND METHODEN

200 μL Assaymedium zugegeben. Die Well-Platte wird für 15 min bei 37 °C in einer feuchten, 5%-igen CO_2 -Atmosphäre vorinkubiert. Anschließend werden entweder 25 μL Assaymedium (Internalisierung) oder 25 μL einer 10 μM Lösung von TOC in HBSA (Blockade, Assaykonzentration 1 μM) zugegeben. Danach werden je Well 25 μL der zu vor hergestellten Radioligandlösung zugegeben (Assaykonzentration [^{18}F]F- oder [^{177}Lu]Lu-Ligand 2 nM; Assaykonzentration Referenzligand [^{125}I]I-TOC: 0.1 nM), enthält. Die Zellen werden bei 37 °C für 60 min inkubiert. Jeder Ligand wird je dreifach mit und ohne Blockade untersucht. Das Experiment wird beendet, indem die Platte auf Eis platziert und der Überstand abgenommen wird. Es wird mit 300 μL RPMI (zzgl. 2 mM L-Gln) gewaschen und die Waschlösungen und Überstände werden vereint (ungebundene Liganden). Die Zellen werden anschließend mit Acid-Wasch (300 μL je Well) behandelt und 15 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen mit einer weiteren Fraktion Acid-Wasch (300 μL je Well) gewaschen und die Waschlösung und der Überstand werden vereint (Zellgebundene Liganden). Die Zellen werden mit 300 μL 1 M NaOH je Well für 20 min bei RT behandelt und lysiert. Das Lysat wird abgenommen und die Wells mit je 300 μL 1 M NaOH gewaschen und das Lysat und die Waschfraktion werden vereint (internalisierte Liganden). Die Quantifizierung des freien, zellgebundenen und internalisierten Anteils erfolgt in einem Gamma-Counter. Die Daten werden mittels des Blockade Experiments um die nicht-spezifische Internalisierung korrigiert. Die angegebenen Prozentwerte ergeben sich aus dem Verhältnis der absoluten Internalisierung des zu untersuchenden Liganden (in %) und der absoluten Internalisierung des Referenzliganden [^{125}I]I-TOC (in %).

6. Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$)

Etwa 0.5 – 0.75 MBq des radiomarkierten Liganden wird in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß in je 500 μL PBS (pH 7.4) und 1-Oktanol gelöst. Mittels eines Vortexmischers, wird die Lösung 3 min kräftig durchmischt und das Reaktionsgefäß anschließend für 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Je 100 μL der PBS und der 1-Octanol Phase werden mit einer Micropipette entnommen und getrennt im Gamma-Counter quantifiziert. Das Experiment wird parallel in 8 Reaktionsvials durchgeführt, der jeweils errechnete Verteilungskoeffizient gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

7. Bestimmung der HSA-Bindung

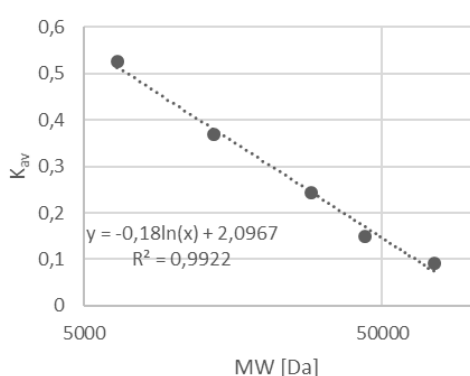
Albumin-Mediated Size Exclusion Chromatography (AMSEC Methode)

Die AMSEC Methode ist eine Methode die am Lehrstuhl für pharmazeutische Radiochemie (TUM) etabliert wurde. Die Resultate stellen ein Maß für die Stärke der Bindung eines Peptids an Humes Serum Albumin dar.[174] Eine Lösung von HSA in Wasser wird in einem HPLC System mit Größenausschluss säule als mobile Phase eingesetzt. Der zu untersuchende Ligand wird radiomarkiert

II. MATERIALIEN UND METHODEN

und in das System injiziert und ein HSA-Ligand Komplex wird gebildet. HSA dringt durch seine Größe von 66 kDa nicht in die Poren der Größenausschlussssäule ein, während die kleineren Peptide tief in das Porensystem eindringen. Bei hoher Affinität zu HSA, wird ein Peptid als HSA-Ligand Komplex am Porensystem vorbei transportiert. Die Elutionszeit stellt damit ein Maß für die Affinität zu HSA dar. Anhand der Retentionszeit kann das apparente Molekulargewicht errechnet werden. Ein Peptid mit einem hohen MW_{app} wird früher eluiert und weist damit eine hohe Affinität zu HSA auf.

Eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75 Increase 10/300 GL (*GE Healthcare*, Uppsala, Schweden)) wird vorab, nach Herstelleranweisungen, mittels eines Gelfiltrations-Kalibrierungskits kalibriert (*GE Healthcare*, Buckinghamshire, UK). Dieses beinhaltet Conalbumin (MW: 75 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ribonuklease A (13.7 kDa) und Aprotinin (6.5 kDa) als Referenzpunkte bekannten Molekulargewichts. Die eigentlichen AMSEC Experimente werden mit einer Lösung aus HSA in physiologischer Konzentration (700 μM) in PBS (pH 7.4), als mobiler Phase, durchgeführt. SST₂-Liganden werden wie beschrieben markiert und etwa 1.0 MBq je Ligand wird injiziert. Zu diesem Zweck werden ¹⁷⁷Lu markierte Verbindungen direkt aus der Markierungslösung injiziert, während ¹⁸F markierte Liganden, die in einer EtOH/PBS Lösung vorliegen, zunächst auf einen 20%-igen EtOH Anteil verdünnt und dann in das HPLC-System eingebracht werden. Die HSA-Bindung wird als apparentes Molekulargewicht ausgedrückt (MW_{app}), ermittelt aus der Retentionszeit des Radiosignals und der Kalibriergerade.



reference	MW	t_R	V	K_{av}
blue dextran 2000		10.034	8.027	
conalbumin	75000	11.859	9.487	0.0914
ovalbumin	44000	13.034	10.427	0.1503
carbonic anhydrase	29000	14.912	11.930	0.2443
ribonuklease A	13700	17.398	13.918	0.3688
aprotinin	6500	20.531	16.425	0.5257

Abbildung 25: Kalibriergerade der Superdex 75 Increase Gelfiltrationssäule, bestimmt mittels eines niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrierungskits. MW: Molekulargewicht [Da]; t_R : experimentelle Retentionszeit; V: Elutionsvolumen; K_{av} : Partitionskoeffizient.

Für die Evaluierung werden die experimentell bestimmten Retentionszeiten t_R , durch Multiplikation mit der Flussrate, zunächst in Elutionsvolumina V_e konvertiert. Diese werden dann nach Formel

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

in Partitionskoeffizienten K_{av} überführt, wobei V_0 dem Porenvolumen (8.027 mL) und V_c dem geometrischen Volumen (24.0 mL) entsprechen. Mittels der nach MW aufgelösten Trendliniengleichung der Kalibriergerade

II. MATERIALIEN UND METHODEN

$$MW_{app} = e^{\frac{2.0967 - K_{av}}{0.18}}$$

wird das apparente Molekulargewicht MW_{app} nach folgender Gleichung ermittelt:

$$K_{av} = -0.18 \ln(MW) + 2.0967$$

High Performance Affinity Chromatography (HPAC Methode)

Für die Bestimmung der HSA-Bindung nach der HPAC Methode wird eine Chiralpak HSA Säule (50 x 3 mm, 5 μ m, H13H-2433) bei einer konstanten Durchflussrate von 0.5 mL/min verwendet. Die mobile Phase (A: NH_4OAc , 50 mM in H_2O , pH 6.9 und B: *Isopropanol*) wird für jeden Durchführungstag frisch hergestellt. Die Säule wird während der Durchführung auf 25 °C temperiert und die Temperaturkonstanz regelmäßig kontrolliert. Die zu untersuchenden Substanzen werden zu etwa 0.5 mg/mL, in einer Mischung aus Laufmittel A und B (1/1 v/v), gelöst. Die Referenzverbindungen (Tabelle 6) beschreiben einen breiten Bereich der prozentualen Bindung an HSA. Vor der Untersuchung der Liganden, werden an jedem Durchführungstag alle neun Referenzsubstanzen untersucht und eine nicht-lineare Regression mittels OriginPro 2016G durchgeführt.

Tabelle 6: Referenzsubstanzen für die Kalibrierung in der HPAC Methode.[175, 176]

Referenz	t_R	Log t_R	Lit. HSA%	Log K HSA
<i>p</i> -Benzylalkohol	2.40	0.38	13.2	-0.82
Anilin	2.72	0.43	14.1	-0.79
Phenol	3.28	0.52	20.7	-0.59
Benzoessäure	4.08	0.61	34.27	-0.29
Carbamazepin	4.15	0.62	75.0	0.46
<i>p</i> -Nitrophenol	5.62	0.75	77.7	0.52
Estradiol	8.15	0.91	94.8	1.19
Probenecid	8.84	0.95	95.0	1.20
Glibenclamid	29.2	1.47	99.0	1.69

Die in Tabelle 6 gezeigten Daten und die in Abbildung 26 gezeigte graphische Aufarbeitung gelten exemplarisch für einen bestimmten Durchführungstag und müssen bei neuerlicher Durchführung erneut ermittelt werden (t_R Retentionszeit; Lit. HSA Literaturwert der HSA-Bindung in %; Log K HSA logarithmisches K der Bindung an humanes Serumalbumin).

II. MATERIALIEN UND METHODEN

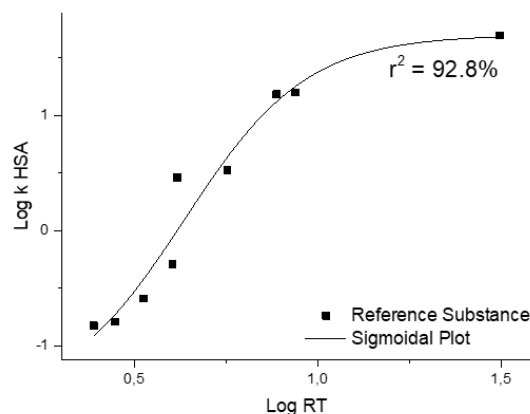


Abbildung 26: Exemplarische Korrelation der neun Referenzsubstanzen in OriginPro 2016G.

8. *In vivo* Maus-Experimente

Alle Tierexperimente werden im Einklang mit der allgemeinen deutschen Tierschutzverordnung und den institutionellen Richtlinien, für den Umgang mit und Einsatz von Versuchstieren, durchgeführt. Tumor-Xenografts werden erzeugt indem AR42J Zellen (5×10^6 Zellen/100 μ L) in RPMI Medium (2 mM L-Gln) suspendiert und subkutan im Bereich der rechten Schulter, von 6-8 Wochen alten Mäusen (weiblich, CD1 nu/nu), inokuliert werden. Die Verwendung von unterstützendem Matrigel ist nicht erforderlich. Die Mäuse werden eingesetzt sobald der Durchmesser des Tumors bei 5-9 mm liegt (5-15 Tage nach Inokulation).

Für eine *in vivo* Biodistribution werden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und die ^{18}F -markierte Verbindung wird *via* Schwanzvenen-Injektion appliziert (0.05 – 0.15 nmol; 0.5 – 2.0 MBq). Die Euthanasie erfolgt 1 h p.i. (n = 3 – 5). Die benötigten Organe werden entnommen, gewogen und in einem Gamma-Zähler quantifiziert. Für ein Blockade Experiment werden 20 μ g TOC gemeinsam mit der radiomarkierten Verbindung appliziert

III. Ergebnisse und Diskussion

1. Methoden dieser Arbeit

1.1 Allgemeines zur Peptidsynthese

Die Peptidsynthese erfolgte an 2-Chloro-Trityl-Chlorid Harz (2-CT) oder Rink-Amid Harz mittels der Fmoc-Methode, analog zu bekannten Verfahren.[177–180] Dabei wurden die Aminosäuren mit Fmoc-geschütztem *N*-Terminus, freiem *C*-Terminus und einer Schutzgruppe (PG) an der Seitenkettenfunktionalität eingesetzt (Fmoc-Aminosäure(PG)-OH). Das freie Carboxylat der *C*-terminalen Aminosäure wurde zunächst am Harz verankert. Vor der Konjugation weiterer Aminosäuren wurde der *N*-Terminus durch den Einsatz von Piperidin Fmoc-entschützt. Die Konjugation weiterer Aminosäuren, eines Chelators oder anderer Carboxylate erfolgte durch die *in situ* Bildung eines Aktivesters an dem zu konjugierenden Baustein, unter Verwendung von Standardreagenzien wie HOAt, HATU, TBTU, Oxyma oder DIC. Die im individuellen Fall eingesetzten Reagenzien sind dem Materialien und Methoden Teil zu entnehmen.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Optimierungen hinsichtlich der eingesetzten Äquivalente der Reaktanden, relativ zur am Harz vorhandenen Stoffmenge Peptid/Aminosäure, vorgenommen. Zu Beginn wurden 1.50 Äq. Aminosäure, beziehungsweise zu konjugierendes Carboxylat (z.B. Chelator), 1.50 Äq. der Kopplungsreagenzien (z.B. HOAt und TBTU) und 4.50 Äq. DIPEA, beziehungsweise 6.00 Äq. 2,4,6-Collidin eingesetzt. Jedoch erwiesen sich mit fortschreitender Synthese des jeweiligen Peptids die Reaktionen häufig als unvollständig. Daher mussten einige Konjugationen zweifach durchgeführt oder, nach Gabe weiterer Äquivalente der Reaktanden, die Reaktionszeit von 2 h auf bis zu 18 h verlängert werden. Zusätzlich war nach jedem Syntheseschritt eine Reaktionskontrolle mittels RP-HPLC zwingend erforderlich. Nachdem die Stoffmenge des zu konjugierenden Bausteins und die der Kopplungsreagenzien auf 3.00 Äq. erhöht und gleichzeitig die der verwendeten Base auf 3.00 Äq. gesenkt wurden, ließen sich diese Probleme umgehen.[140] Die Reaktionen verliefen stöchiometrisch, wodurch in den meisten Fällen auf eine Reaktionskontrolle verzichtet werden konnte. Des Weiteren verkürzten sich die Reaktionszeiten auf 2 – 4 h, wodurch einerseits die gesamte Synthesedauer verkürzt und andererseits die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten gesenkt wurde. Dies wiederum führte nach der finalen Abspaltung vom Harz und Entschützung der säurelabilen Schutzgruppen zu einer vereinfachten und schnelleren Reinigung der Endprodukte mittels semi-präparativer RP-HPLC.

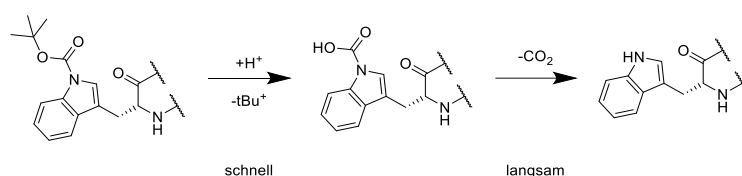
Bei der Synthese aller rhSST₂-Liganden kam die Aminosäure D-/L-Dap zum Einsatz, bei der unter den oben genannten Bedingungen der Peptidsynthese die Gefahr der Racemisierung besteht. Die Kopplungsreagenzien HOAt und TBTU wurden bei diesen Kopplungen nicht mit der sonst verwendeten

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Base DIPEA kombiniert, sondern es wurde 2,4,6-Collidin verwendet.[181, 182] Zusätzlich wurde die Zeit der Voraktivierung von 10 min auf maximal 2 min gesenkt. Eine signifikante Racemisierung dieser Aminosäure wurde nach Anwendung dieses Verfahrens nicht mehr beobachtet.

Die Amin-Schutzgruppe Dde ist basenlabil und kann dennoch orthogonal zu Fmoc abgespalten werden. Zur Entschützung wurden in dieser Arbeit standardmäßig Imidazol und $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, nach *Diaz-Mochon et al.* eingesetzt.[183] Zu beachten war hier, dass Dde zur Umlagerung auf freie Amine neigt,[184] weshalb Dde immer vor der Fmoc-Schutzgruppe abgespalten wurde. Die Synthesen der Liganden mussten entsprechend geplant werden um dieser potentiellen Problematik Rechnung zu tragen.

Im Zuge der finalen Abspaltung mit TFA wurde häufig ein hydrophiles Nebenprodukt in der RP-HPLC und der ESI-MS beobachtet. Dieses Nebenprodukt wies die Masse $m_{\text{Peptid}} + 44$ u auf und wurde bei der Synthese aller TATE-basierten rhSST_2 -Liganden beobachtet. Nach der Kontrolle der einzelnen Syntheseschritte konnte die Boc-geschützte Aminosäure D-Tryptophan im Bindemotiv TATE als Ursprung dieser Verunreinigung identifiziert werden. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt in zwei Schritten (vgl. Schema 2).[185] Zunächst erfolgt die Abspaltung des *t*Bu-Kation durch den Zusatz von Säure. Dieser Schritt verläuft schnell und liefert ein Tryptophan-Carbamat als Zwischenprodukt. Diese Carbamate sind im Allgemeinen labil und zerfallen schnell unter Freisetzung von CO_2 . Im Fall von Tryptophan wird das Carbamat jedoch durch die aromatische Struktur stabilisiert, wodurch die Freisetzung von CO_2 und die finale Bildung des entschützten Tryptophans langsam verlaufen.[185] In wässriger Umgebung und bei erhöhter Temperatur zerfällt das Carbamat jedoch rapide und vollständig.



Schema 2: Reaktionsmechanismus der Boc-Entschützung von D-Trp(Boc).[185]

Daher wurden die TFA-entschützten Rohprodukte der Liganden vor der präparativen Aufreinigung in wässriger Umgebung gelöst und für 30 min bei 40 °C inkubiert. Das Carbamat war im Anschluss nicht mehr nachweisbar.

1.2 *In vitro* und *in vivo* Evaluierung

Die Affinität zur Zielstruktur SST_2 wird durch die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} in nM) dargestellt und wurde für alle Liganden mittels eines Zellassays bestimmt. Zum Einsatz kamen dabei SST_2 transfizierte CHO Zellen. [^{125}I]I-TOC wurde als Referenzverbindung eingesetzt.[186] Der in dieser Arbeit angewandte Zellassay ist nicht literaturbekannt. Um dennoch eine Vergleichbarkeit zu

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

erzeugen, wurden verschiedene literaturbekannte Liganden im neu etablierten Assay untersucht. Die Daten sind den nachfolgenden Kapiteln zu entnehmen.

Die Internalisierung wurde als Dual-Tracer-Studie unter Verwendung von AR42J Zellen durchgeführt.[57] Auch hier wurde [¹²⁵I]I-TOC als Referenzverbindung eingesetzt.

Der LogD_{pH=7.4} Wert stellt ein Maß für Hydrophilie dar und wurde anhand der radioaktiv markierten Spezies bestimmt. Die Bestimmung erfolgte analog zu bereits publizierten Verfahren, nach der Shake-Flask Methode.[57]

Die Affinität zu HSA in % wurde mittels der HPAC Methode bestimmt, die ein Maß für die Bindung an Plasmaproteine darstellt.[151, 175, 176] Als weiteres Maß für die Affinität zu HSA wurde in unserer Arbeitsgruppe die sogenannte AMSEC Methode (Albumin-mediated Size Exclusion Chromatography) entwickelt, mit welcher das apparente Molekulargewicht (MW_{app} in kDa) eines Liganden ermittelt wird.[174]

Die *in vivo* Tierstudien wurden an weiblichen CD1 nu/nu Mäusen durchgeführt. Durch subkutane Applikation von AR42J Zellen wurden SST₂ exprimierende Tumore erzeugt. Das Vorgehen erfolgte ebenfalls analog zu bereits publizierten Verfahren und führte innerhalb von 3 Wochen in 100% der durchgeführten Zellapplikationen zu einem Tumorstadium.[57, 139, 186]

2. SST₂ Bindemotive und analoge DOTA-Derivate

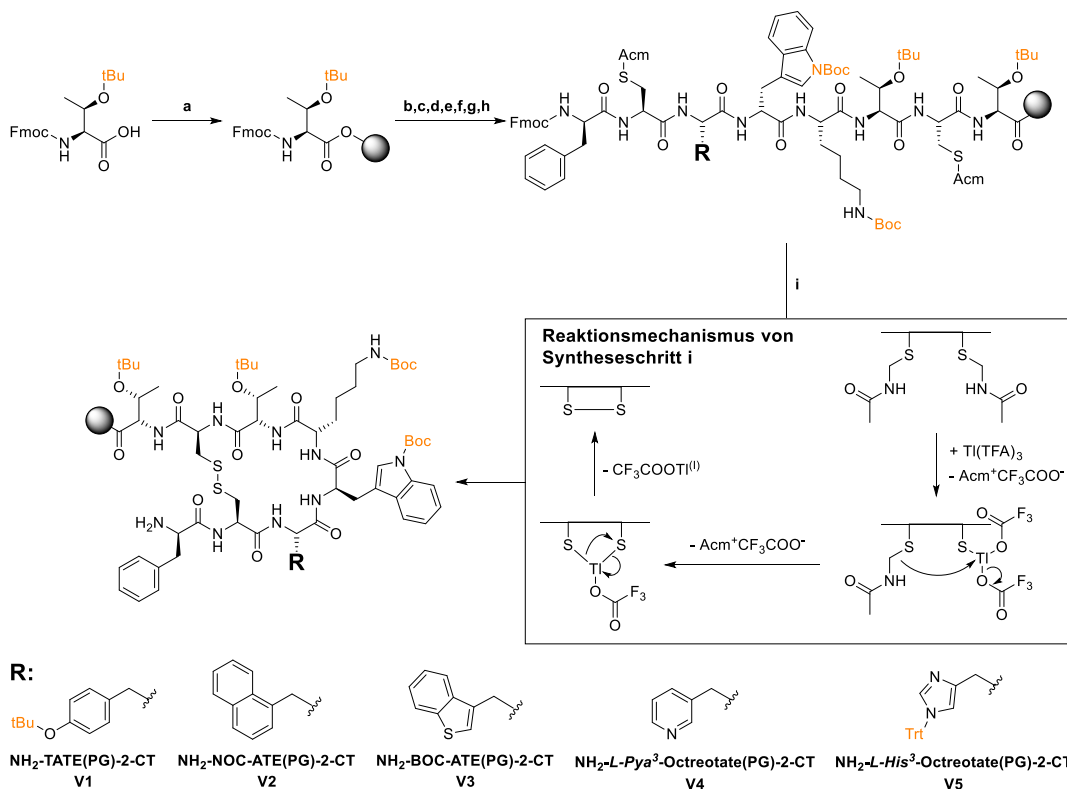
In der Einleitung wurden verschiedene agonistische und antagonistische Bindemotive vorgestellt, die zur Adressierung von SST₂ eingesetzt werden können. Die Literatur liefert für Bindemotive wie TOC und TATE,[54, 57] NOC und BOC[55, 58] oder deren Nachfolger NOC-ATE und BOC-ATE,[55, 59] eine große Menge an präklinischen Daten. Gleiches gilt für Radiopharmaka wie [^{nat/68}Ga]Ga-DOTA-TATE oder das pan-affine [^{nat/68}Ga]Ga-DOTA-NOC.[73] Die in den verschiedenen Publikationen vorgestellten Daten zu den wichtigen biologischen Parametern wie Affinität zur Zielstruktur, Lipophilie oder Internalisierungsrate, sind von Publikation zu Publikation inkonsistent. Dies begründet sich unter anderem in der Anwendung leicht unterschiedlicher Methoden und/oder Analyseverfahren. So wird der IC₅₀, als Maß der Affinität, sowohl mittels verschiedener Zelllinien, als auch über Membranpräparationen ermittelt.[54, 131, 187] Des Weiteren werden Daten wie LogD_{pH=7.4} und Internalisierung selten erhoben, während die Affinität zu HSA im Allgemeinen nicht bestimmt wird. Bevor mit der Entwicklung von radiohybriden SST₂-Liganden begonnen werden konnte, wurde daher zunächst ein Portfolio an Stammdaten für verschiedene literaturbekannte Bindemotive oder DOTA-Bindemotiv Kombinationen erstellt. Anhand dieser Daten wurde das Bindemotiv für die Entwicklung neuer rhSST₂-Liganden ausgewählt. Gleichzeitig sollte ein neuer Assay zur Affinitätsbestimmung bewertet werden. Für den in dieser Arbeit eingesetzten CHO-SST₂ Assay zur IC₅₀ Bestimmung

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

existieren keine Literaturdaten. Daher sollten bekannte Verbindungen in diesem untersucht werden, um eine Vergleichbarkeit mit der Literatur zu ermöglichen

2.1 Synthese

Die Synthese der agonistischen SST Bindemotive TATE, NOC-ATE, BOC-ATE, *Py*³-Octreotate und *His*³-Octreotate ist in Schema 3 dargestellt. Die Synthese erfolgte an 2-Chloro-Trityl-Chlorid-Harz (2-CT). Bei der Synthese von TATE wurde nach dem Einbau von Cys² in der analytischen RP-HPLC ein Doppelsignal gleicher Masse beobachtet. Dieses konnte auf die teilweise Racemisierung des Stereozentrums während der Ausbildung des Aktivesters zurückgeführt werden.[181] Nachdem statt HOAt und TBTU eine Kombination aus Oxyma Pure und DIC verwendet wurde, konnte die Racemisierung und damit die Doppelsignal-Bildung in der RP-HPLC verhindert werden. Dieses Protokoll wurde auch bei der Synthese der anderen Bindemotive angewandt.



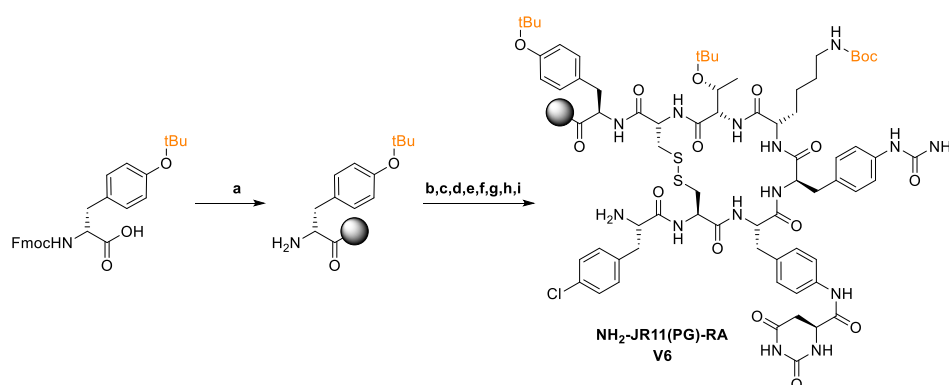
Schema 3: Synthese verschiedener SST₂ Bindemotive am Harz. **a)** Belegung von 2-CTC Harz mit Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH; **b)** Fmoc-L-Cys(Acm)-OH; **c)** Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH; **d)** Fmoc-L-Lys(Boc)OH; **e)** Fmoc-D-Trp(Boc)-OH; **f)** Fmoc-L-Tyr(*t*Bu)-OH (**V1**), Fmoc-L-1-Nal-OH (**V2**), Fmoc-L-3-BzThi-OH (**V3**), Fmoc-L-Pya-OH (**V4**), Fmoc-L-His(Trt)-OH (**V5**); **g)** Fmoc-L-Cys(Acm)-OH; **h)** Fmoc-D-Phe-OH; **i)** Bildung der Disulfidbrücke mit Tl(TFA)₃. Orange markierte Strukturelemente entsprechen säurelabilen Schutzgruppen.

Nachdem das Oktapeptid vollständig am Harz aufgebaut wurde, wurde mittels Tl(TFA)₃ die Disulfidbrücke zwischen den zwei Cysteinen geschlossen. Zu diesem Zweck wurde Cystein als Cys(Acm) eingesetzt. Diese säurestabile Schutzgruppe wurde im Zuge des Thallium-vermittelten

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ringschlusses abgespalten (vgl. Reaktionsmechanismus Schema 3).[170] Diese Methode barg den großen Nachteil der hohen Toxizität von Thallium. Dennoch wurde diese Methode anderen Verfahren, wie der H₂O₂-basierten Methode, vorgezogen.[188] Dies begründet sich darin, dass die Tl(TFA)₃ Methode am Harz durchgeführt werden kann und auch die weitere Synthese der Peptide kann nach dem Ringschluss am Harz erfolgen. Dies ist bei der H₂O₂-Oxidation nicht möglich. Nach dem Ringschluss lagen die Bindemotive als Harz-gebundene und vollständig geschützte Vorläufer NH₂-TATE(PG)-2-CT (**V1**), NH₂-BOC-ATE(PG)-2-CT (**V2**), NH₂-NOC-ATE(PG)-2-CT (**V3**), NH₂-L-Pya³-Otreotate(PG)-2-CT (**V4**) und NH₂-L-His³-Otreotate(PG)-2-CT (**V5**) vor.

Die Synthese des antagonistischen Bindemotivs JR11 erfolgte analog (Schema 4), wobei statt 2-CTC Harz, Rink Amid Harz (RA) zum Einsatz kam.[60, 189] Im Unterschied zum 2-CTC Harz, liegt der C-Terminus nach der finalen Abspaltung vom RA Harz und der Entschützung aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen nicht als Carboxylat, sondern als Amid vor. Nach der Bildung der Disulfidbrücke lag JR11 als vollständig geschützter und Harz gebundener Baustein NH₂-JR11(PG)-RA (**V6**) vor.



Schema 4: Synthese von JR11 am Harz. **a**) Belegung von RA Harz mit Fmoc-D-Tyr(*t*Bu)-OH; **b**) Fmoc-L-Cys(Acm)-OH; **c**) Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH; **d**) Fmoc-L-Lys(Boc)OH; **e**) Fmoc-D-Aph(Cbm)-OH; **f**) Fmoc-L-Aph(Hor)-OH; **g**) Fmoc-D-Cys(Acm)-OH; **h**) Fmoc-L-Phe(4-Cl)-OH; **i**) Bildung der Disulfidbrücke mit Tl(TFA)₃. Orange markierte Strukturelemente entsprechen säurelabilen Schutzgruppen.

Die Vorläufer **V1** – **V6** wurden zur Herstellung von rhSST₂-Liganden verwendet oder *N*-terminal mit DOTA verknüpft. TATE und JR11 wurden auch als nicht-modifizierten Bindemotive eingesetzt und *in vitro* bewertet. Nach finaler Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen (in Schema 3 und Schema 4 grau markiert) mittels TFA, lagen die literatur-bekanntesten Referenzverbindungen DOTA-TATE, DOTA-NOC-ATE, DOTA-BOC-ATE, DOTA-L-Pya³-Octreotate, DOTA-L-His³-Octreotate, DOTA-JR11, TATE und JR11 vor. TOC wurde vom Lehrstuhl für pharmazeutische Radiochemie (TUM) zur Verfügung gestellt.

2.2 *In vitro* Evaluierung, Hydrophilie und Bewertung des Zellassays zur IC₅₀ Bestimmung

Die Bindemotive und deren [^{nat/68}Ga]Ga-/[^{nat/177}Lu]Lu-DOTA-Derivate wurden hinsichtlich ihrer *in vitro* Parameter bewertet (Tabelle 7). Radiomarkierungen mit ⁶⁸Ga waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Daher konnten für die entsprechenden Gallium-Liganden die Werte LogD_{pH=7.4}, Internalisierung und MW_{app} nicht ermittelt werden. Neben der Wahl eines Bindemotivs für die neuen rhSST₂-Liganden, war auch von Interesse, ob die SST₂ Affinitäten mit denen der Literatur vergleichbar sind. Der IC₅₀ stellt einen Schlüsselparameter dar, der für die Bewertung eines neuen Liganden essenziell ist. Daher ist die Zuverlässigkeit des verwendeten Zellassays entscheidend.

TATE wird in der Literatur mit einem IC₅₀ von 0.30 ± 0.03 nM [190] und TOC mit einem IC₅₀ von 3.1 ± 1.8 nM [191] beschrieben. Diese Tendenz wurde auch mit dem CHO-SST₂ Assay dargestellt und beide Bindemotive weisen Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich auf (TOC: IC₅₀ = 10.8 ± 3.19 nM; TATE: IC₅₀ = 2.56 ± 0.32 nM). TATE zeigt von den untersuchten Bindemotiven TOC, TATE und JR11 damit die höchste Affinität zu SST₂.

Ginj et al. beschreiben verschiedene DOTA-konjugierte, oktapeptidische Bindemotive. Dabei sind die Variationen mit L-Benzothienylalanin (DOTA-BOC), L-1-Naphthylalanin (DOTA-NOC), L-Pyridylalanin (DOTA-L-Pya³-Octreotid) und L-Tyrosin (DOTA-TOC) aufgrund ihrer *in vitro* Daten von besonderem Interesse. Mit Indium komplexiert wiesen die Derivate hohe bis moderate SST₂ Affinitäten auf ([¹¹¹In]In-DOTA-TOC: IC₅₀ = 11.4 ± 1.7 nM; [¹¹¹In]In-DOTA-BOC: IC₅₀ = 3.1 ± 0.3 nM; [¹¹¹In]In-DOTA-NOC: IC₅₀ = 3.3 ± 0.2 nM; [¹¹¹In]In-DOTA-L-Pya³-Octreotid: IC₅₀ = 22 ± 9 nM). Die BOC und NOC Derivate zeichnen sich durch eine höhere Affinität gegenüber der Tyrosin-Variante TOC aus, während das L-Pya³-Derivat die niedrigste Affinität aufweist.[58]

In dieser Arbeit wurden die Octreotate-Varianten dieser Derivate hergestellt und als [^{nat/177}Lu]Lu-Komplexe verglichen. Es ergaben sich für die L-Benzothienylalanin und L-1-Naphthylalanin Derivate [^{nat/177}Lu]Lu-DOTA-BOC-ATE (IC₅₀ = 4.14 ± 0.10 nM) und [^{nat/177}Lu]Lu-DOTA-NOC-ATE (IC₅₀ = 4.65 ± 0.15 nM) geringfügig höhere Affinitäten als für das L-Tyr³ Derivat [^{nat/177}Lu]Lu-DOTA-TATE (IC₅₀ = 5.24 ± 1.01 nM). [^{nat/177}Lu]Lu-DOTA-L-Pya³-Octreotate erweist sich mit einem IC₅₀ von nur 117 ± 31.1 nM als nicht affin genug für eine weitere Anwendung. Dies ist unerwartet, da die publizierte Affinität von [¹¹¹In]In-DOTA-L-Pya³-Octreotid höher ist (IC₅₀ = 22 ± 9 nM). Allerdings wird für dieses Derivat auch eine hohe Standardabweichung angegeben. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der publizierte Wert die Affinität nicht ausreichend widerspiegelt.[58] Insgesamt zeigen die hier ermittelten Affinitäten der Bindemotive NOC-ATE, BOC-ATE, L-Pya³-Octreotate und TATE ähnliche Tendenzen im Vergleich zu den gezeigten Daten der Literatur.[54, 55, 58]

L-Pya³-Octreotate wurde für eine Verwendung als Bindemotiv für die rhSST₂-Liganden nicht in Erwägung gezogen. NOC-ATE und BOC-ATE wären aufgrund der geringfügig erhöhten Affinität

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

gegenüber TATE zu bevorzugen gewesen. Allerdings weisen beide Derivate deutlich geringere Hydrophilien auf. Die $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Werte der $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-Komplexe}$ sind mit -2.34 ± 0.12 ($[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-NOC-ATE}$) und -2.54 ± 0.01 ($[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-BOC-ATE}$) grundsätzlich ausreichend niedrig um diese Derivate *in vivo* anzuwenden. Im theoretischen Hintergrund wurde bereits erläutert, dass die Einführung von SiFA-Bausteinen die Lipophilie stark erhöht.[141, 151] $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$ bot mit einem $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Wert von -3.88 ± 0.03 eine deutlich höhere Hydrophilie und versprach daher eine bessere Basis für die Einführung eines SiFA-Bausteins zu sein. TATE wurde daher als Bindemotiv für die Entwicklung der rhSST_2 -Liganden gewählt.

Tabelle 7: Präklinische Daten verschiedener SST_2 Bindemotive und deren DOTA-Derivate. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	Internalisierung %	HSA-Bindung %	MW_{app} [kDa]
Bindemotiv					
TOC	10.8 ± 3.19	–	–	93.8	–
TATE	2.56 ± 0.32	–	–	66.9	–
JR11	6.98 ± 0.61	–	–	98.1	–
DOTA-Bindemotiv					
$[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	–	88.9	–
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$	5.24 ± 1.01	-3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-NOC-ATE}$	4.65 ± 0.15	-2.34 ± 0.12	287	70.0	0.39
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-BOC-ATE}$	4.14 ± 0.10	-2.54 ± 0.01	361	72.3	0.41
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{DOTA-L-Pya}^3\text{-Octreotate}$	117 ± 31.1	-3.88 ± 0.02	75.1	30.6	1.66
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{DOTA-L-His}^3\text{-Octreotate}$	95.0 ± 19.7	-3.55 ± 0.04	51.3	31.9	1.71
$[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-JR11}$	23.5 ± 3.76	–	–	86.7	–
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-JR11}$	13.8 ± 1.65	-3.38 ± 0.07	379	87.9	0.22

Für $[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ und $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$ werden in der Literatur IC_{50} -Daten von 1.2 ± 0.6 nM und 2.0 ± 0.8 nM beschrieben.[57] Im CHO- SST_2 Assay werden geringfügig höhere Werte von 1.90 ± 0.07 nM für den $[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-Komplex}$ und 5.24 ± 1.01 nM für den $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-Komplex}$ erhalten. Auch die antagonistischen Derivate $[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-JR11}$ ($\text{IC}_{50} = 23.5 \pm 3.76$ nM) und $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-JR11}$ ($\text{IC}_{50} = 13.8 \pm 1.65$) weisen deutlich geringere Affinitäten als die TATE Derivate auf. Dies ist nur bedingt im Einklang mit der Literatur. Für $[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-JR11}$ und $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-JR11}$ wurden Affinitäten von $\text{IC}_{50} = 29 \pm 2.7$ nM und $\text{IC}_{50} = 0.73 \pm 0.15$ nM publiziert.[192] Die Tendenzen beider Derivate zueinander werden zwar auch im CHO- SST_2 Assay

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

widergespiegelt, jedoch wird der [^{nat/177}Lu]Lu-Komplex um mehr als eine Größenordnung weniger affin dargestellt.

Im Gesamtbild kann der CHO-SST₂ Assay jedoch die Tendenzen der Literatur vergleichbar erzeugen und ermöglicht daher eine korrekte Einschätzung der Affinität zur Zielstruktur.

3. Linkerfreie rhSST₂-Liganden

3.1 Entwicklungskonzept

Die ersten in dieser Arbeit hergestellten rhSST₂-Liganden gehören zur Gruppe der linkerfreien Liganden (LF = linkerfrei). In Abbildung 27 ist der Grundaufbau dieser Verbindungsklasse schematisch dargestellt. Diese Liganden setzen sich zusammen aus einem peptidischen Bindemotiv (orange) das über eine trifunktionelle Einheit (grau) mit einem Chelator verknüpft (gelb) ist und mit einem dreiwertigen Metallkation komplexiert wird (ocker). Der SiFA-Baustein (lila) ist über eine weitere trifunktionelle Einheit (grau) verknüpft, der entweder ¹⁸F oder ¹⁹F trägt (rot). Über die zweite trifunktionelle Einheit ist der hydrophile Modifier (grün) verbunden.

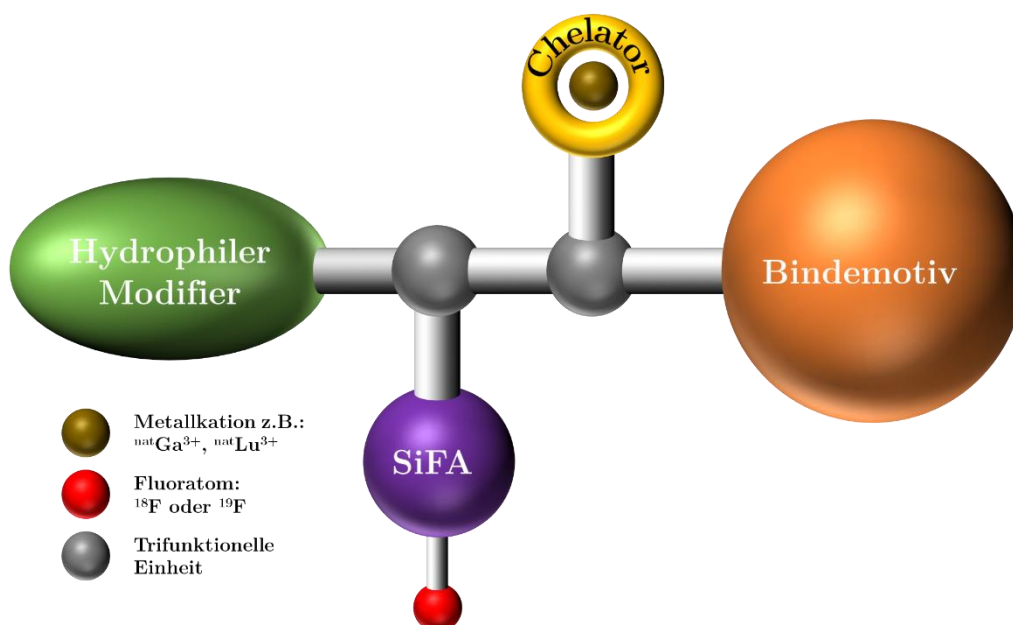


Abbildung 27: Schematische Struktur der linkerfreien rhSST₂-Liganden bestehend aus hydrophilem Modifier (grün), SiFA-Baustein (lila) mit [¹⁸F]- oder [¹⁹F]Fluor (rot), Chelator (gelber Ring) mit Metallkation (ocker), SST₂ Bindemotiv (orange) und den trifunktionellen Einheiten (grau).

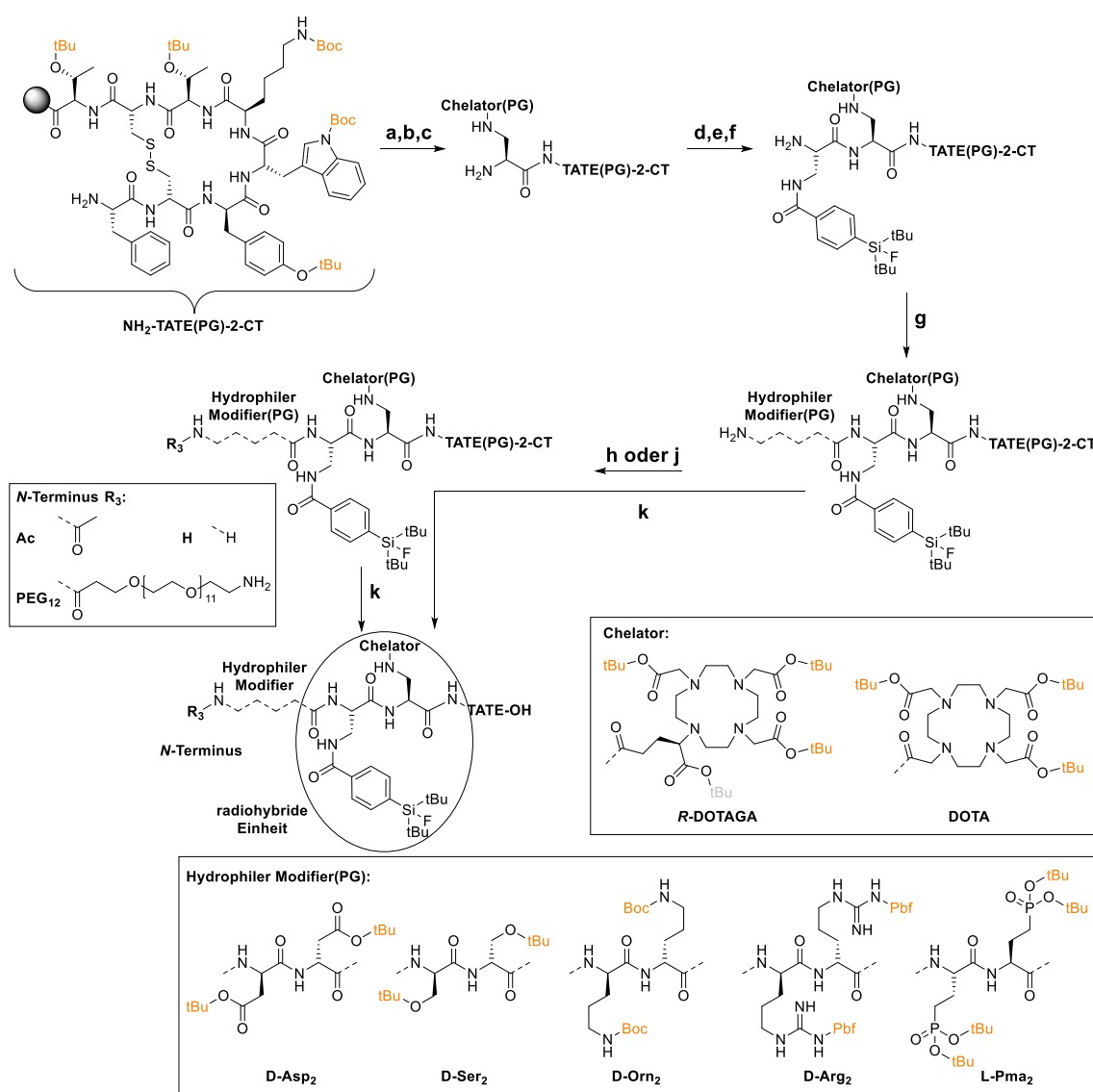
Als Bindemotiv wurde aus den zuvor genannten Gründen TATE gewählt (vgl. 2. SST₂ Bindemotive und analoge DOTA-Derivate). Die Struktur aus Bindemotiv und Chelator-Einheit orientiert sich dabei an DOTA-TATE. Bei diesem wird der Chelator am N-Terminus des TATE nicht nur sehr gut toleriert, sondern über die Wahl des Metallkations, kann auch Einfluss auf die Affinität genommen werden.[56, 57] Durch die hohe Lipophilie des SiFA-Bausteins wurde neben dem Chelator ein zusätzlicher hydrophiler Modifier eingeführt.[131, 139, 141] Zudem wurde die SiFA-Einheit so positioniert, dass ihre Lipophilie zwischen hydrophilem Chelator und hydrophilem Modifier optimal kompensiert wird. Als Metallkation zur Chelatisierung kam meist ^{nat}Ga zum Einsatz, in einigen Fällen auch ^{nat}Lu. Im Vordergrund stand bei der Wahl des Metalls prinzipiell die Auswirkung auf die *in vitro* Daten. Meist

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

wurde jedoch ^{nat}Ga bevorzugt, da in erster Linie ein rein diagnostisches SST₂ Derivat entwickelt werden sollte.

3.2 Synthese

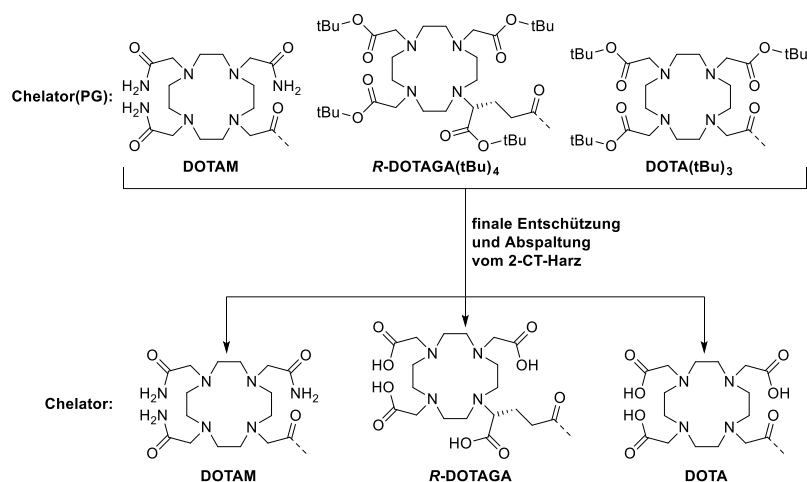
Die Synthese der Liganden erfolgte vollständig am Harz und wurde durch eine finale Abspaltung und Entschützung mittels TFA abgeschlossen (Schema 5). Alle in orange markierten Schutzgruppen sind säurelabil und wurden bei der Behandlung mit TFA durch ein Proton ersetzt.



Schema 5: Synthese der linkerfreien Liganden rhLF-1 bis rhLF-2 ausgehend von $\text{NH}_2\text{-TATE(PG)-2-CT}$ (V1). **a**) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; **b**) Dde-Entschützung; **c**) Konjugation des Chelators; **d**) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; **e**) Dde-Entschützung; **f**) Konjugation von SiFA-BA; **g**) Aufbau des hydrophilen Modifiers aus je zwei gleichen Aminosäuren: Fmoc-D-Asp(tBu)-OH, Fmoc-D-Ser(tBu)-OH, Fmoc-D-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Pma(tBu)₂-OH; **h**) N-terminale Acetylierung mit Ac_2O ; **j**) Fmoc-PEG₁₂-OH; **k**) TFA, H_2O , TIPS. Orange markierte Strukturelemente entsprechen säurelabilen Schutzgruppen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ausgehend von $\text{NH}_2\text{-TATE(PG)-2-CT}$ (**V1**) wurde Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert und die Dde-Schutzgruppe abgespalten. Anschließend wurde der geschützte Chelator (Chelator(PG)) an der D-Dap-Seitenkette konjugiert. Für die linkerfreien Liganden kam dabei $R\text{-DOTAGA}(t\text{Bu})_4$ und $\text{DOTA}(t\text{Bu})_3$ zum Einsatz. Im Falle anderer Ligandklassen, wie den linkerbasierten Liganden, wurde auch DOTAM verwendet. In Schema 6 sind die Strukturen dieser Chelatoren nach der Konjugation an ein Amin (impliziert durch gestrichelte Linie) sowohl mit $t\text{Bu}$ Schutzgruppen als auch nach der Entschützung mittels TFA dargestellt. DOTAM trägt statt den freien Carboxylaten drei Amide und konnte daher ungeschützt eingesetzt werden.



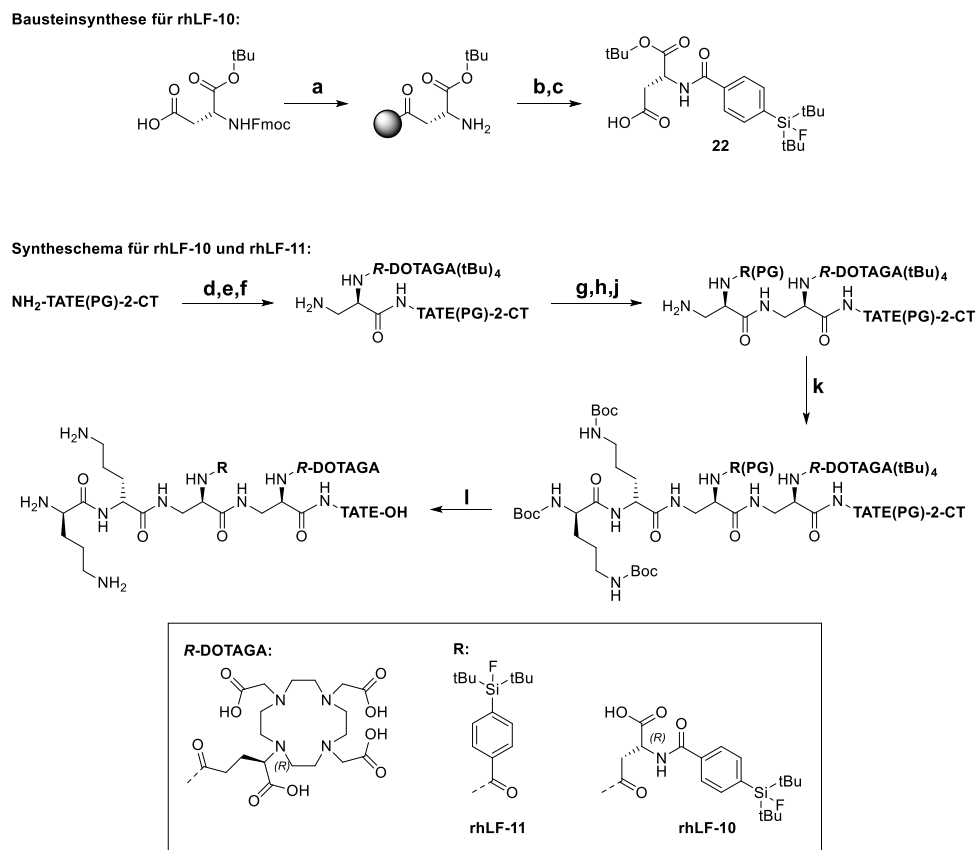
Schema 6: Entschützung der verwendeten Chelatoren DOTA, $R\text{-DOTAGA}$ und DOTAM. DOTAM wurde ungeschützt in der Peptidsynthese eingesetzt.

Nach der Konjugation des Chelators erfolgte die Konjugation der radiohybriden Einheit durch Verknüpfung eines weiteren Fmoc-D-Dap(Dde)-OH, anschließender Dde-Entschützung gefolgt von der Konjugation des SiFA-Bausteins SiFA-BA. Anschließend wurde der N -terminale hydrophile Modifizierer gebildet, der entweder aus D-Asp_2 , D-Ser_2 , D-Orn_2 , D-Arg_2 oder $\text{L-Phosphonomethylalanin}_2$ (L-Pma_2) bestand. Einige Liganden wurden mit einer N -terminalen Modifikation versehen, die entweder aus einer Acetylierung oder der Verknüpfung einer PEG_{12} Einheit bestand. Alle anderen wurden Fmoc-entschützt und dem finalen Syntheseschritt unterzogen. Abschließend wurden alle am Harz gebundenen Liganden mit TFA behandelt, um die Peptide vom Harz abzuspalten und alle säurelabilen Schutzgruppen zu entfernen.

Die Liganden rhLF-10 und rhLF-11 wurden abweichend von der beschriebenen Syntheseroute hergestellt. Für rhLF-10 wurde zunächst an 2-CTC Harz der Baustein **22** hergestellt und mittels Hexafluoroisopropanol (HFIP) in 2,2-Dichlormethan (DCM), unter Erhalt der $t\text{Bu}$ -Schutzgruppe vom Harz abgespalten (Schema 7). Die Synthese der Liganden erfolgte ebenfalls ausgehend von **V1**. Nach Konjugation von Dde-D-Dap(Fmoc)-OH wurde die N -terminale Dde-Schutzgruppe abgespalten und $R\text{-DOTAGA}(t\text{Bu})_4$ konjugiert. An der D-Dap Seitenkette wurde nach Fmoc-Entschützung nochmals Dde-D-Dap(Fmoc)-OH verknüpft und ebenfalls Dde abgespalten. Am N -Terminus des zweiten D-Dap

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

wurde entweder SiFA-BA (rhLF-11) oder Baustein **22** (rhLF-10) konjugiert. Der Aufbau des hydrophilen Modifiers, finale Entschützung und die Aufreinigung erfolgte analog zum zuvor beschriebenen Vorgehen.



Schema 7: Synthese des Bausteins **22**: **a**) Belegung von 2-CTC Harz mit Fmoc-D-Asp-OtBu; **b**) Konjugation von SiFA-BA; **c**) HFIP, DCM. Synthese der Liganden rhLF-10 und rhLF-11 ausgehend von NH₂-TATE(PG)-2-CT (**VI**): **d**) Dde-D-Dap(Fmoc)-OH; **e**) Dde-Entschützung; **f**) Konjugation von R-DOTAGA(tBu)₄; **g**) Dde-D-Dap(Fmoc)-OH; **h**) Dde-Entschützung; **j**) Konjugation von SiFA-BA oder Baustein **22**; **k**) Konjugation von Baustein **23**; **l**) TFA, H₂O, TIPS.

Der Aufbau der einzelnen Liganden ist Tabelle 8 zu entnehmen, in der die N-terminale Modifikation (Nt), der hydrophile Modifier (HM), Aufbau und Orientierung der SiFA- beziehungsweise Chelator-Einheit und die Wahl des Bindemotivs (BM) angegeben sind.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 8: Strukturelemente der linkerfreien Liganden. **Ligand**: Bezeichnung des Liganden; **Nt**: N-terminale Modifikation; **HM**: Hydrophiler Modifizier; **SiFA-Einheit**: Struktur der SiFA-Einheit; **Chelator-Einheit**: Struktur der Chelator Einheit; **BM**: SST₂ Bindemotiv.

Ligand	Nt	HM	SiFA-Einheit	Chelator-Einheit	BM
rhLF-1	Ac	D-Asp ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(DOTA)	TATE
rhLF-2	Ac	D-Asp ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(<i>R</i> -DOTAGA)	TATE
rhLF-3	H	D-Asp ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(<i>R</i> -DOTAGA)	TATE
rhLF-4	H	D-Orn ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(<i>R</i> -DOTAGA)	TATE
rhLF-5	H	D-Ser ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(<i>R</i> -DOTAGA)	TATE
rhLF-6	H	D-Arg ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(<i>R</i> -DOTAGA)	TATE
rhLF-8	H	D-Asp ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(DOTA)	TATE
rhLF-7	H	L-Pma ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(<i>R</i> -DOTAGA)	TATE
rhLF-9	PEG ₁₂	D-Orn ₂	D-Dap(SiFA-BA)	D-Dap(<i>R</i> -DOTAGA)	TATE
rhLF-10	H	D-Orn ₂	SiFA-BA-D-Asp-D-Dap	<i>R</i> -DOTAGA-D-Dap	TATE
rhLF-11	H	D-Orn ₂	SiFA-BA-D-Dap	<i>R</i> -DOTAGA-D-Dap	TATE

3.3 *In vitro* Evaluierung und Hydrophilie

Die linkerfreien Liganden wurden zunächst hinsichtlich ihrer Affinität zur Zielstruktur und ihrer Hydrophilie bewertet. Dargestellt werden diese Parameter durch den IC₅₀ in nM und den LogD_{pH=7.4} (Tabelle 9).

Tabelle 9: Präklinische Daten von [^{18/19}F]Ga- und [^{18/19}F]Lu-rhLF-1 und rhLF-2. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); Nettoladung z.

Ligand	IC ₅₀ ± SD [nM]	LogD _{pH=7.4} ± SD	z
[^{18/19} F]Ga-rhLF-1	–	–	–2
[^{18/19} F]Lu-rhLF-1	–	–	–2
[^{18/19} F]Ga-rhLF-2	370 ± 26.5	–	–3
[^{18/19} F]Lu-rhLF-2	556 ± 58.9	–1.97 ± 0.09	–3
[^{18/19} F]Ga-rhLF-3	85.3 ± 17.5	–1.97 ± 0.09	–2
[^{18/19} F]SiTATE	6.98 ± 0.61	–1.27 ± 0.07	–1
[^{nat/68} Ga]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	–3.69[57]	0

Die Affinitäten von [^{18/19}F]Ga-rhLF-2 und [^{18/19}F]Lu-rhLF-2 erlauben keine *in vivo* Anwendung (vgl. IC₅₀ für [¹⁸F]SiTATE). Auf eine Datenerhebung für rhLF-1, das DOTA Analogon von rhLF-2, wurde daher verzichtet. In der Literatur wird auf den Einfluss der Nettoladung eines Liganden auf seine Affinität zu SST₂ hingewiesen. Je höher die Zahl an elektropositiven Ladungen in einem Peptid, desto höher ist die Konzentration dieses Liganden an der elektronegativ geladenen Membranoberfläche der

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zelle. Daraus kann wiederum eine erhöhte Affinität zu SST₂ resultieren.[186, 193] Daher wurde das zu rhLF-2 strukturell analoge Derivat rhLF-3 entwickelt. Dieses trägt ebenfalls den Chelator *R*-DOTAGA, aber der *N*-Terminus ist nicht acetyliert. Für rhLF-1 und rhLF-2 wurde die Acetylierung ursprünglich als zusätzlicher Schutz vor enzymatischer Degradation gewählt. Da der HM jedoch D-konfiguriert ist, wurde dieses Risiko als gering eingestuft.[194]

Primäre Amine, wie die freien Seitenketten von Lys, Orn und Dap, die Guanidyl-Einheit der Arg Seitenkette oder die komplexierten Metallkationen Ga³⁺ und Lu³⁺, werden bei der Bestimmung der Ligand-Nettoladung als positive Ladungen betrachtet. Freie Carboxylate, wie in Asp und Glu oder auch in den Chelatoren DOTA und *R*-DOTAGA, werden als negative Ladung berücksichtigt.[195] Das primäre Amin des freien *N*-Terminus in rhLF-3 erhöht daher die Nettoladung im Vergleich zu rhLF-2. Die Nettoladung *z* für den Ga- und Lu-Komplex von rhLF-2 liegt bei -3 . Für Ga-Komplex von rhLF-3 berechnet sich diese zu -2 . Für [^{18/19}F]Ga-rhLF-3 resultiert dies in einer deutlich verbesserten Affinität von 85.3 ± 17.5 nM.

Tabelle 10: Präklinische Daten von [^{18/19}F]Ga-rhLF-3, [^{18/19}F]rhLF-4, [^{18/19}F]Ga-rhLF-4, [^{18/19}F]Lu-rhLF-4, [^{18/19}F]Ga-rhLF-5, [^{18/19}F]Ga-rhLF-6 und [^{18/19}F]Ga-rhLF-7. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Nettoladung *z*.

Ligand	IC ₅₀ \pm SD [nM]	LogD _{pH=7.4} \pm SD	<i>z</i>
[^{18/19} F]Ga-rhLF-3	85.3 \pm 17.5	-1.97 \pm 0.09	-2
[^{18/19} F]rhLF-4	8.74 \pm 0.34	-	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLF-4	6.01 \pm 0.62	-1.43 \pm 0.08	+2
[^{18/19} F]Lu-rhLF-4	19.8 \pm 5.52	-	+2
[^{18/19} F]Ga-rhLF-5	43.6 \pm 4.99	-1.17 \pm 0.04	0
[^{18/19} F]Ga-rhLF-6	19.6 \pm 3.21	-1.50 \pm 0.07	+2
[^{18/19} F]Ga-rhLF-7	147 \pm 9.18	-2.17 \pm 0.07	-4

Aufgrund dieses vielversprechenden Ergebnisses wurden die Liganden rhLF-4, rhLF-5, rhLF-6 und rhLF-7 entwickelt. Diese tragen ebenfalls den Chelator *R*-DOTAGA und einen freien *N*-Terminus. Variiert wurde nur der hydrophile Modifier, mit Hauptaugenmerk auf der resultierenden Nettoladung. Während die Ausgangsverbindung rhLF-3 mit D-Asp₂ versehen ist, wurde rhLF-4 mit D-Orn₂, rhLF-5 mit D-Ser₂, rhLF-6 mit D-Arg₂ und rhLF-7 mit L-Pma₂ konjugiert. Die Nettoladungen liegen für diese fünf Liganden zwischen -4 für [^{18/19}F]Ga-rhLF-7 und $+2$ für die Metallkomplexe von rhLF-4 und rhLF-6 (Tabelle 10).

Die Affinität von [^{18/19}F]Ga-rhLF-7 ist mit 147 ± 9.18 nM nicht ausreichend für die Radiopharmazie. Damit setzt sich der Trend fort, dass mit kleinerem *z*, die Affinität sinkt. Im Gegensatz dazu zeigt [^{18/19}F]Ga-rhLF-5 mit einer Nettoladung von 0 eine moderate Affinität von 43.6 ± 4.99 nM und die positiv geladenen Varianten [^{18/19}F]Ga-rhLF-4 und [^{18/19}F]Ga-rhLF-6 liefern die bisher höchsten

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Affinitäten von 6.01 ± 0.62 nM beziehungsweise 19.6 ± 3.21 nM. Der Unterschied zwischen diesen beiden Liganden, trotz gleichem Ladungszustand, zeigt, dass neben der Ladung auch andere strukturelle Aspekte Einfluss auf die Affinität nehmen. In diesem Fall senkt der höhere sterische Anspruch der Guanidiny-Einheiten der Arginine, relativ zu den primären Aminen der Ornithine, die Affinität von [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-6. Wie schon bei rhLF-2 beobachtet, weist der Lu-Komplex von rhLF-4 eine geringere Affinität auf, als der Ga-Komplex. Daher wurden alle weiteren Verbindungen als Ga-Komplexe untersucht.

Neben den Affinitäten wurde für diese Reihe an Liganden auch die Hydrophilie, dargestellt durch den $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$, untersucht. Liegt der $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ für [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-3 noch bei -1.97 ± 0.09 , führt der Austausch der freien Carboxylate im hydrophilen Modifier durch Alkohole ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-5), Amine ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4) oder Guanidine ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-6) zu einer Erhöhung der Lipophilie. Für Amine und insbesondere Guanidine ist dies unerwartet, da die Literatur für diese Aminosäuren zu Asp vergleichbare Lipophilien beschreibt.[196] [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 und [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-6 weisen mit -1.43 ± 0.08 und -1.50 ± 0.07 $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Werte in einem für die *in vivo* Anwendung geeigneten Bereich auf. Diese Einschätzung beruht auf dem Vergleich mit [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE, welches mit $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -1.27 \pm 0.07$ eigentlich eine eher geringe Hydrophilie aufweist., insbesondere im Vergleich mit dem klinischen Standard [$^{\text{nat}/68}\text{Ga}$]Ga-DOTA-TATE ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -3.69$).[57] Dennoch zeigt [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE keine signifikante hepatobiliäre Exkretion.[80, 131, 167] Daher wurde angenommen, dass die Hydrophilie von [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4, gepaart mit dessen hoher Affinität für eine *in vivo* Anwendung ausreichend sind. [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-5 weist in dieser Reihe von Liganden die geringste, aber immer noch eine zu [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE vergleichbare Hydrophilie auf ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -1.17 \pm 0.04$), während [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-7 die bisher höchste Hydrophilie zeigt ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.17 \pm 0.07$).

[$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 lieferte den vielversprechendsten Kompromiss zwischen Affinität und Hydrophilie. Daher wurden ausgehend von dieser Struktur wurden weitere Derivate entwickelt um die Affinität aber vor allem die Hydrophilie, zu optimieren. Um den Einfluss des Chelators auf Affinität und Hydrophilie des Liganden zu untersuchen, wurde zunächst der Chelator *R*-DOTAGA durch DOTA ersetzt (vgl. Tabelle 11). Das resultierende Derivat [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-8 weist trotz der höheren Nettoladung eine niedrigere Affinität von nur 11.0 ± 1.99 nM auf. Der $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ verschlechterte sich durch den Verlust eines hydrophilen Carboxylats auf -0.90 ± 0.05 , weshalb *R*-DOTAGA auch weiterhin der Chelator der Wahl blieb.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 11: Präklinische Daten von [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 und [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-8 – [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-11. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: [^{125}I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Nettoladung z .

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	z
[$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4	6.01 ± 0.62	-1.43 ± 0.08	+2
[$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-8	11.0 ± 1.99	-0.90 ± 0.05	+3
[$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-9	8.68 ± 1.10	-1.79 ± 0.07	+2
[$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-10	23.5 ± 5.05	-1.78 ± 0.03	+1
[$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-11	14.9 ± 0.05	-1.82 ± 0.10	+2

Das Derivat rhLF-9 trägt im Unterschied zu rhLF-4 eine PEG_{12} Einheit am *N*-Terminus des HM, um die Hydrophilie zu erhöhen. PEG Einheiten liegen stark solvatisiert vor, wodurch die Löslichkeit in wässriger Umgebung gesteigert wird.[197] Der $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ verbessert sich durch diese Modifikation auf -1.79 ± 0.07 . Mit einem IC_{50} von 8.68 ± 1.10 nM ist die Affinität von [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-9 nur geringfügig niedriger als für [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4.

Die Derivate rhLF-10 und rhLF-11 zeichnen sich durch eine andere räumliche Orientierung der trifunktionellen Einheiten im Vergleich zu ihrem strukturellen Vorgänger [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 aus. SiFA-BA und *R*-DOTAGA wurden über die *N*-Termini der zwei D-Dap konjugiert und die Peptidkette wurde über die jeweiligen Seitenkettenamine gebildet. rhLF-10 trägt zwischen D-Dap und SiFA-BA ein D-Asp, um die Hydrophilie zu steigern (siehe Schema 7). Die Ga-Komplexe von rhLF-10 und -11 weisen eine höhere Hydrophilie auf, allerdings geht dies auch mit einer niedrigeren Affinität von nur 23.5 ± 5.05 nM ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-10) und 14.9 ± 0.05 nM ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-11) einher. Auch in anderen Arbeiten zu radiohybriden SST_2 -Liganden wird geschildert, dass die räumliche Orientierung von Bindemotiv, Chelator und SiFA-Einheit starken Einfluss auf die Affinität nimmt.[198] Aufgrund der eher moderaten Affinitäten, wurde dieser strukturelle Ansatz nicht weiterverfolgt.

In Abbildung 28 wurden die Affinitätswerte der linkerfreien Liganden logarithmisch gegen die jeweilige Nettoladung des Liganden graphisch aufgetragen. In der Graphik ist ein klarer Verlauf zu erkennen, bei dem die Affinität mit Erhöhung der Nettoladung zunimmt. Dieser Effekt ist vor allem ausgeprägt, wenn in partiell stark negativ geladenen Verbindungen wie rhLF-2, rhLF-3 und rhLF-7 positive Ladungen in Form von Aminen hinzugefügt oder Carboxylate durch solche ersetzt werden (z.B. rhLF-4). Bei bereits partiell positiv geladenen Liganden wie rhLF-4, wirkt sich die Reduktion um ein Carboxylat nicht mehr in Form einer Affinitätssteigerung aus (Austausch von *R*-DOTAGA durch DOTA in rhLF-8). Ein direkter Zusammenhang wird vor allem für Liganden ähnlicher Struktur beobachtet. Die Referenzen [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE oder [$^{nat/68}\text{Ga}$]Ga-DOTA-TATE gliedern sich nicht in die Reihe der hier getesteten Liganden ein. Da neben der Nettoladung auch andere strukturelle Elemente Einfluss auf die Affinität zur Zielstruktur nehmen, ist ein linearer Zusammenhang nicht zwingend zu erwarten.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

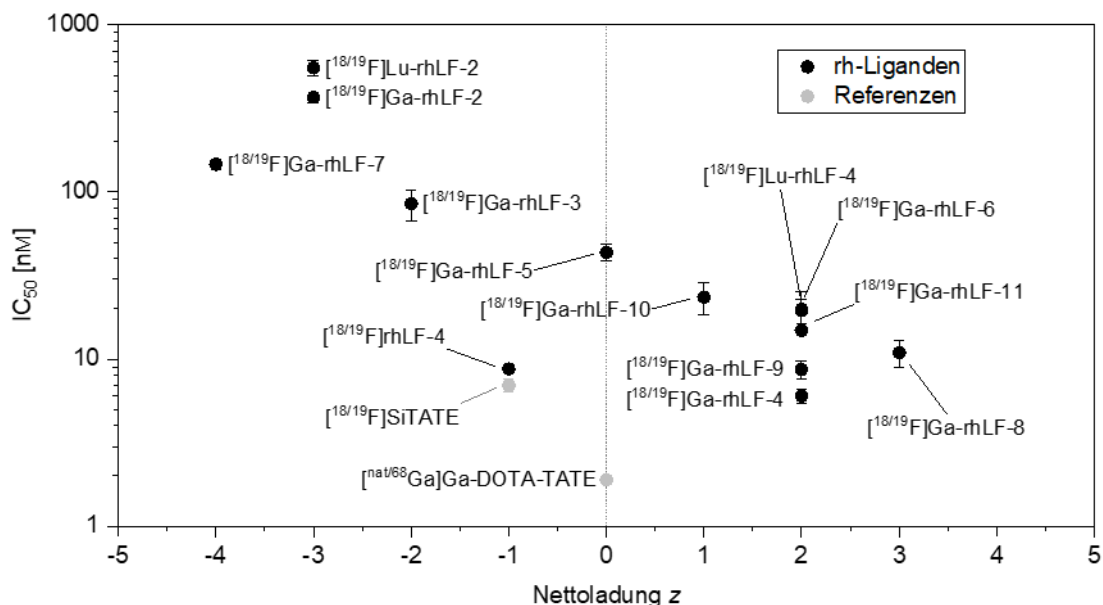


Abbildung 28: Logarithmische Auftragung der IC₅₀ Werte in nM (y-Achse) gegen die jeweilige Nettoladung z des Liganden (X-Achse). Datenpunkte schwarz: Daten der linkerfreien rhSST₂-Liganden; Datenpunkte grau: Daten der Referenzen.

Auch der Komplexierungszustand des Chelators wirkt sich auf die Affinität des Liganden aus. So ist die Nettoladung des unkomplexierten rhLF-4 durch das fehlende dreiwertige Kation zwar negativ, aber die Affinität wird im Vergleich zu Ga-rhLF-4 nicht signifikant gesenkt. Für DOTA-TOC oder DOTA-Octreotid wird in der Literatur ähnliches beschrieben. Je nach Wahl des Metallkations wird die Affinität (stark) verändert und für die unkomplexierten Varianten wird ebenfalls eine Verschlechterung der Affinität beobachtet.[54]

3.4 *In vivo* Biodistribution

Auf Basis der Parameter IC₅₀ und LogD_{pH=7.4} wurden die Liganden [¹⁸F]Ga-rhLF-4 und [¹⁸F]Ga-rhLF-9 für eine Biodistributionsstudie an AR42J-Tumor tragenden Mäusen ausgewählt. Zusätzlich wurde die SiFA-tragende Referenzverbindung [¹⁸F]SiTATE *in vivo* untersucht. Die Daten der Biodistributionen 1 h p.i., sind in Abbildung 29 vergleichend dargestellt.

Neben dem AR42J-Tumor wird SST₂ auch in einigen Organen exprimiert. Daher sind Anreicherungen in Pankreas und Nebennieren sowie in geringerem Ausmaß in Lunge und Magen zu erwarten.[40, 57] Insbesondere in Pankreas, Magen und Nebennieren zeigen die neuen Liganden höhere Anreicherungen als [¹⁸F]SiTATE. Dies wird auf die erhöhte Akkumulation im Blut und die damit verbundene, längere Zirkulation des Liganden im Blutkreislauf zurückgeführt. Durch diese längere Verweilzeit ist die Anreicherung an der Zielstruktur erhöht, da der Transport des Liganden durch die Gefäßstruktur von Tumor und anderen Organen mehrfach erfolgt, bevor es zur Ausscheidung kommt.[199]

Auffällig ist auch die hohe Nierenakkumulation beider Liganden, verglichen mit [¹⁸F]SiTATE ([¹⁸F]SiTATE: 16.3 ± 1.00 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLF-4: 34.2 ± 2.39 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLF-9:

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

89.0 ± 17.5 %ID/g). Ursächlich sind hierfür die zahlreichen positiven Ladungen dieser Liganden. Für DTPA-Octreotid Derivate wurde beobachtet, dass der zusätzliche Einbau eines Lysins die Nierenretention steigert.[200, 201]

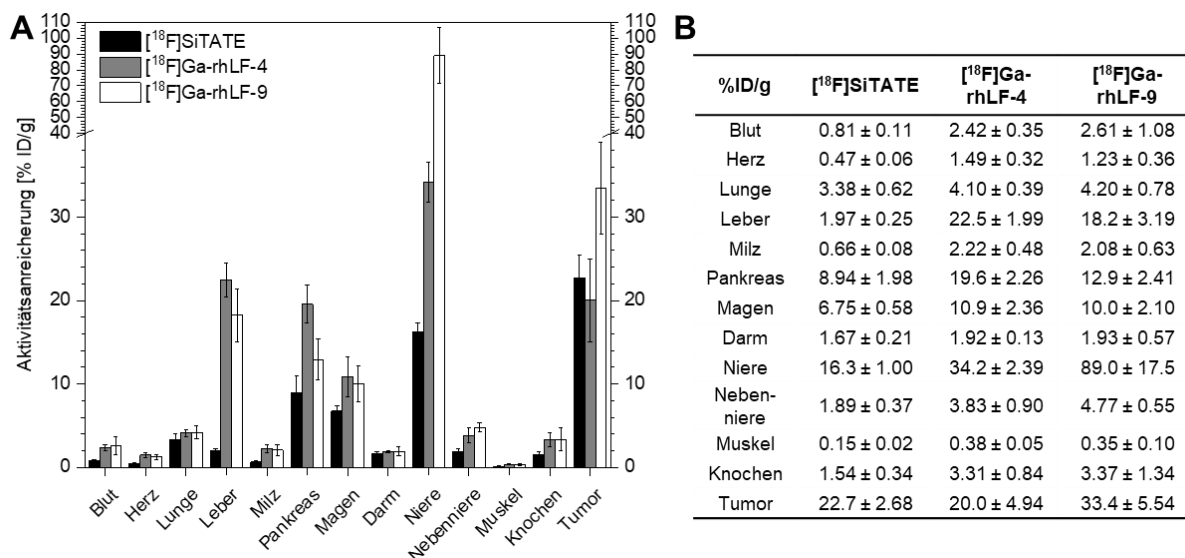


Abbildung 29: Biodistribution von [¹⁸F]SiTATE (n = 5), [¹⁸F]Ga-rhLF-4 (n = 5) und [¹⁸F]Ga-rhLF-9 (n = 4) in AR42J Tumortragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). **A**: Graphische Darstellung. **B**: Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD).

[¹⁸F]Ga-rhLF-4 und [¹⁸F]Ga-rhLF-9 zeigen im Vergleich zu [¹⁸F]SiTATE eine ausgeprägte hepatobiliäre Exkretion, die sich 1 h nach Injektion in einer hohen Leberanreicherung bemerkbar macht ([¹⁸F]SiTATE: 1.97 ± 0.25 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLF-4: 22.5 ± 1.99 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLF-9: 18.2 ± 3.19 %ID/g). Auch die Anreicherung im Blut ist dreifach erhöht und zeugt von einer langsamen Clearance ([¹⁸F]SiTATE: 0.81 ± 0.11 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLF-4: 2.42 ± 0.35 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLF-9: 2.61 ± 1.08 %ID/g). Diese Beobachtungen können teilweise mit den jeweiligen LogD_{pH=7.4} Werten erklärt werden. In der Literatur werden SiFA-Liganden mit ähnlichem *in vivo* Verhalten vorgestellt, deren LogD_{pH=7.4} Werte in vergleichbaren Größenordnungen angesiedelt sind (LogD_{pH=7.4} > -2). Erst ab einem LogD_{pH=7.4} von -2 und darunter zeigen diese SiFA-basierten Liganden eine ausreichend niedrige Leberanreicherung und adäquate Blutclearance.[140, 141, 151] Bei Betrachtung obiger Daten ist es daher nicht überraschend, dass [¹⁸F]Ga-rhLF-4 und [¹⁸F]Ga-rhLF-9 mit LogD_{pH=7.4} Werten von -1.43 ± 0.08 und -1.79 ± 0.07 einer hepatobiliären Exkretion unterliegen.

Gleichzeitig gilt es zu bedenken, dass [¹⁸F]SiTATE mit einem LogD_{pH=7.4} Wert von -1.27 ± 0.07 lipophiler als die hier untersuchten Verbindungen ist, jedoch nicht über die Leber ausgeschieden wird.[131] Die Lipophilie bietet damit zwar eine Erklärungsgrundlage für den Exkretionsweg von [¹⁸F]Ga-rhLF-4 und [¹⁸F]Ga-rhLF-9, erklärt aber wiederum nicht das *in vivo* Verhalten von [¹⁸F]SiTATE. Die Tumor Anreicherungen von [¹⁸F]Ga-rhLF-4 und [¹⁸F]SiTATE sind vergleichbar ([¹⁸F]SiTATE: 22.7 ± 2.68 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLF-4: 20.0 ± 4.94 %ID/g). Für [¹⁸F]Ga-rhLF-9 ist eine deutlich

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

gesteigerte Tumoranreicherung zu beobachten ($33.4 \pm 5.54 \%ID/g$). Auch wenn die Aktivitätskonzentrationen im Tumor vielversprechend sind, werden diese Liganden aufgrund der langsamen Blutclearance und der hepatobiliären Exkretion nicht weiterverfolgt.

3.5 Bindung an humanes Serum Albumin

In der Literatur wird im Zusammenhang mit SiFA primär die Lipophilie als Problemfaktor benannt. [113, 121, 137, 138] Dementsprechend fokussierte sich die Entwicklung der hier untersuchten linkerfreien Liganden auf die Erhöhung der Hydrophilie. Die *in vivo* Evaluierung der ersten Liganden zeigt jedoch, dass die reine Variation der Hydrophilie nicht ausreichend ist. Aufgrund der hohen Akkumulation in Leber und Blut wird angenommen, dass die Bindung an Plasmaproteine wie humanes Serum Albumin (HSA) ein weiterer wichtiger Parameter ist.

Das *free-drug-principle* besagt, dass nur ungebundene Moleküle *in vivo* an eine andere Struktur binden können. Moleküle, die stark an HSA binden, stehen diesem Konzept zur Folge nur mit dem nicht an HSA gebundenen Anteil für eine Bindung an SST₂ zur Verfügung. Aus diesem Grund ist die Verringerung der HSA-Bindung häufig Teil des Ligand-Designs.[202, 203] Im molekularen Imaging kann eine niedrige HSA-Affinität zu einer schnelleren Exkretion aus dem Blutkreislauf und einem besserem Tumor/Organ Verhältnis führen. Gleichzeitig wird ungebundener Ligand schneller renal ausgeschieden. Daraus kann wiederum eine insgesamt niedrigere Anreicherung am Zielorgan resultieren. Daher wird in der Literatur auch die Möglichkeit beschrieben, Bausteine von starker HSA Bindung in das Peptid einzufügen, um die Exkretionskinetik zu verzögern und die Tumorakkumulation zu erhöhen.[204–206]

Eine optimale Bindung an HSA sichert damit eine ausreichende Zirkulation im Blutkreislauf. Auf diese Weise dient der Ligand-Protein-Komplex im Blut als eine Art Reservoir, aus dem kontinuierlich Ligand an den Tumor nachgeliefert und die absolute Tumoraufnahme erhöht wird. Bindet ein Radiopharmakon jedoch mit sehr hoher Affinität an HSA, kann dessen Exkretionskinetik derart verzögert werden, dass die längere Zirkulation zu erniedrigten Tumor/Organ Verhältnissen führt. Insbesondere die Akkumulation in der Leber kann ungewollt gesteigert werden, da HSA hepatobiliär ausgeschieden wird (und damit auch der an das HSA gebundene Ligand). Ein Effekt der ebenfalls durch eine hohe Lipophilie hervorgerufen werden kann. Wie auch bei einer schnellen renalen Exkretion, kann eine erhöhte Exkretion über die Leber, zu einer niedrigeren Anreicherung am Zielorgan führen.[199, 207, 208]

Um einen potentiellen Einfluss der HSA Bindung auf die linkerfreien Liganden zu bewerten, wurde die Bindung der Liganden an HSA ermittelt. Hierzu wurde zum einen die HSA-Bindung (in %-Bindung) mittels Affinitätschromatographie (HPAC-Methode) bestimmt. Dabei kommt eine HPLC-Säule, mit auf Silicagel immobilisiertem HSA, zum Einsatz. Die %-Bindung an HSA wird anhand der Retentionszeit

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

des jeweiligen Liganden und einer Kalibrierkurve ermittelt, welche mittels verschiedener Referenzsubstanzen erstellt wird.[175, 176]

Zum anderen wurde das apparente Molekulargewicht MW_{app} (ausgedrückt in kDa) mittels der AMSEC-Methode bestimmt. Diese Methode wurde jüngst am Lehrstuhl für pharmazeutische Radiochemie (TUM) entwickelt.[174] Dabei wird eine Lösung von HSA in Wasser als mobile Phase eingesetzt, die in einem HPLC System durch eine Größenausschluss säule geleitet wird. Der zu untersuchende Ligand wird mit [^{18}F]Fluorid radiomarkiert und in das System injiziert. Dabei bildet sich ein HSA-Ligand Komplex, dessen Stabilität von der Affinität des Liganden zu HSA abhängt. HSA dringt durch seine Größe von 66 kDa nicht in die Poren der Größenausschluss säule ein.[209] Die kleineren Peptide hingegen dringen tief in das Porensystem ein. Bei hoher Affinität zu HSA, wird ein Peptid jedoch mit dem HSA am Porensystem vorbei transportiert und damit schneller eluiert als Peptide mit geringerer Affinität zu HSA. Die Elutionszeit stellt damit ein Maß für die Affinität zu HSA dar. Anhand der Retentionszeit kann das apparente Molekulargewicht errechnet werden. Ein Peptid mit hoher Affinität zu HSA wird daher früher eluiert als ein Peptid mit niedriger HSA Bindung und weist ein hohes MW_{app} auf. In Tabelle 12 werden die *in vitro* Daten von [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-4 und [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-9, erweitert um die Bindung an HSA, aufgelistet.

Tabelle 12: Präklinische Daten von [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-4 und [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-9. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: [^{125}I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $LogD_{pH=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu [^{125}I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.

Ligand	$IC_{50} \pm SD$ [nM]	$LogD_{pH=7.4}$ $\pm SD$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
[$^{18/19}F$]Ga-rhLF-4	6.01 ± 0.62	-1.43 ± 0.08	232	98.8	25.0	+2
[$^{18/19}F$]Ga-rhLF-9	8.68 ± 1.10	-1.79 ± 0.07	143	94.7	23.2	+2
[$^{18/19}F$]SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
[$^{nat/68}Ga$]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	–	88.9	–	0

[$^{18/19}F$]Ga-rhLF-4 und [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-9 weisen mit beiden Methoden eine deutlich höhere Affinität zu HSA auf als [$^{18/19}F$]SiTATE. Insbesondere das apparente Molekulargewicht ist für beide Liganden mehr als dreifach erhöht. Diese Daten bieten damit eine Erklärungsgrundlage für die obigen Biodistributionsstudien.

Die starke Bindung an HSA führt für [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-4 zu einer verzögerten Exkretion und verstärkten Akkumulation im Blut. Der Ligand-HSA-Komplex steigert dabei die Leberakkumulation, da HSA hepatobiliär ausgeschieden wird. Beide Effekte werden für [^{18}F]SiTATE nicht in diesem Ausmaß beobachtet, da dessen Affinität zu HSA weitaus geringer ist. [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-9 weist, verglichen mit [$^{18/19}F$]Ga-rhLF-4, eine geringfügig höhere Hydrophilie und eine ebenfalls geringfügig niedrigere HSA-Bindung auf. Beides reicht jedoch aus um die Akkumulation in der Leber teilweise zu senken und gleichzeitig die Anreicherung im Tumor zu erhöhen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Affinität zu HSA gemeinsam mit der Lipophilie, validere Vorhersagen zum *in vivo* Verhalten liefern kann, als die reine Betrachtung der Lipophilie. Für das weitere Liganddesign muss daher berücksichtigt werden, dass SiFA nicht nur die Lipophilie steigert. Gleichzeitig agiert dessen aromatische Struktur auch als starker HSA-Binder.

Umgangen werden können diese Problematiken einerseits durch den Einbau hydrophiler Bausteine, um die Lipophilie (bei gleichbleibender HSA-Bindung) zu senken. Andererseits durch strukturelle Veränderungen, die eine Senkung der HSA-Affinität zur Folge haben. Die Literatur bietet Beispiele für beide Ansätze. Im Falle des bereits vorgestellten $[^{18/19}\text{F}][^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA7.3}$, ist die Bindung an HSA mit über 94% ebenfalls hoch. Die Lipophilie ist mit einem $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} < -3$ allerdings sehr niedrig, wodurch der Effekt der HSA-Bindung ausgeglichen wird.[151] $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ hingegen weist eine moderate Hydrophilie auf und zeichnet sich vor allem durch die niedrige HSA-Bindung aus (vgl. Tabelle 12).

3.6 Fazit der linkerfreien Liganden

Die Grundstruktur der linkerfreien Liganden wird abschließend als wenig geeignet für die Entwicklung weiterer Liganden bewertet. Die Nachbarschaft der rh-Einheit zum Bindemotiv beeinflusst die Affinität in den betrachteten Fällen negativ (vgl. $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-2}$). Als Konsequenz musste dieser Effekt durch den Einbau positiv geladener Aminosäuren kompensiert werden. Dies wiederum ging mit einer Erhöhung der Lipophilie einher, die sich insbesondere im Zusammenhang mit der HSA-Bindung, als problematisch erwies (vgl. $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-4}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-9}$). Die Kombination aus hoher Affinität zu HSA und hoher Lipophilie führte *in vivo* zu einer ungewollten, hepatobiliären Exkretion. Auf Basis dieser Beobachtungen wurde die HSA-Bindung als wichtiger Bewertungsparameter ermittelt, der für die Entwicklung weiterer radiohybrider Somatostatin Liganden Berücksichtigung finden soll. Auch die Nettoladung wurde als wichtiger Parameter ermittelt und soll für die Entwicklung weiterer Liganden ebenfalls berücksichtigt werden.

4. Linkerbasierte rhSST₂-Liganden

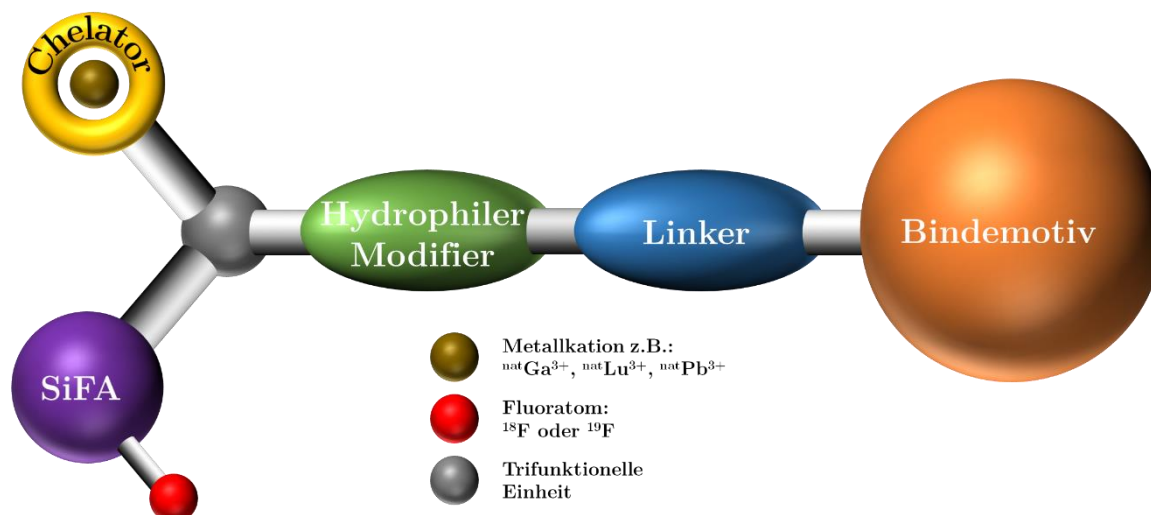


Abbildung 30: Schematische Struktur der linkerbasierten rhSST₂-Liganden bestehend aus SiFA-Baustein (lila) mit [¹⁸F]- oder [¹⁹F]Fluor (rot), Chelator (gelber Ring) mit Metallkation (ocker), hydrophilem Modifizierer (grün), Linker (blau), SST₂ Bindemotiv (orange) und der trifunktionellen Einheit (grau).

Die Struktur der linkerbasierten Liganden (LB = linkerbasiert) zeichnet sich durch einen Linker zwischen Bindemotiv und dem hydrophilen Modifizierer, gefolgt von der *N*-terminalen radiohybriden Einheit, aus (vgl. Abbildung 30). Abgeleitet ist diese Grundstruktur von dem bereits etablierten SiTATE, welches ebenfalls diesen Aufbau zeigt.

Ziel dieser strukturellen Veränderung, im Vergleich zu den linkerfreien Liganden, war die Steigerung der Affinität, indem die sterisch anspruchsvolle rh-Einheit vom Bindemotiv distanziert wurde. Auf diese Weise sollte die Kombination mit einem Carboxylat-basierten hydrophilen Modifizierer möglich sein, ohne dabei die Affinität abzusenken (vgl. 3. *Linkerfreie rhSST₂-Liganden*).

Im Zuge der Optimierung dieser Liganden, wurden Veränderungen am Linker, dem hydrophilen Modifizierer und dem Aufbau der rh-Einheit vorgenommen. Daraus resultierten final vier Generationen an linkerbasierten Liganden, wobei sich die jeweilige Generationsnummer auf die Struktur der rh-Einheit bezieht. Die Strukturmerkmale der vier Generationen sind in Abbildung 31 dargestellt. Die zugrundeliegenden Entwicklungskonzepte werden in den nachfolgenden Kapiteln näher beleuchtet.

Die 1. Generation wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit, im Rahmen der Masterarbeit von Markus Fahner in unserer Gruppe entwickelt und kann rückblickend als *proof-of-concept* Generation gelten.[198] In der 2. Generation stand die Optimierung der Affinität im Vordergrund, während in der 3. und 4. Generation vor allem die HSA-Bindung optimiert wurde. Die Entwicklung der verschiedenen Generationen resultierte primär aus den Ergebnissen der *in vitro* und *in vivo* Daten, die in der jeweiligen Vorgängergeneration erhoben wurden.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vier Generationen: Evolution der rh-Einheit

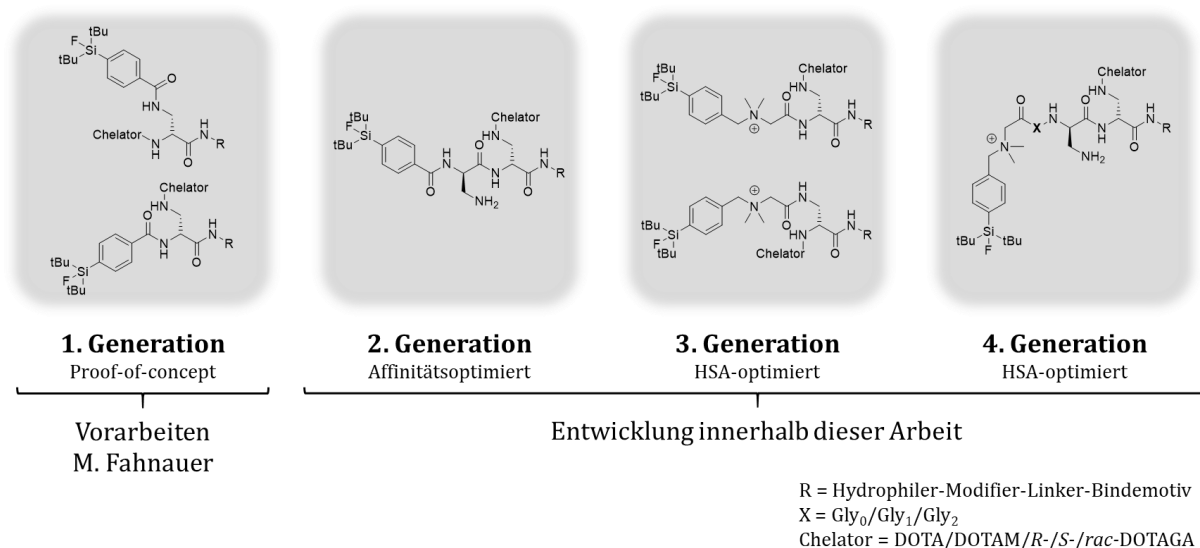


Abbildung 31: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden.

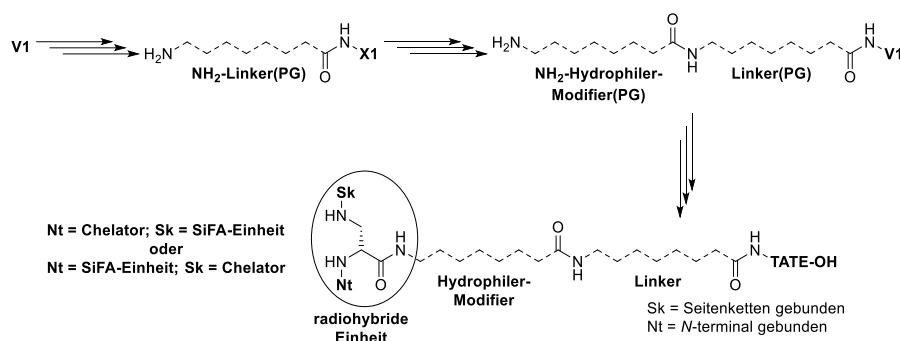
4.1 Allgemeines zur Synthese der linkerbasierten Liganden

Die Liganden wurden mit TATE als SST₂ Bindemotiv und damit ausgehend von NH₂-TATE(PG)-2-CT (**V1**) hergestellt. Die einzige Ausnahme stellt rhLB-3.15 dar, welches statt TATE das antagonistische Bindemotiv JR11 trägt. Da dessen Synthese analog zur Synthese der TATE-basierten Verbindungen verlief, wird auf dessen Verwendung nicht explizit eingegangen.

Ausgehend von Vorläufer **V1** wurde am *N*-Terminus mittels Standardpeptidsynthese der Linker aufgebaut (Schema 8). Die möglichen Linker waren L-Asn₂, D-Asn₂, D-Asn₂-Gly, PEG₁, Gly, Gly₂ oder Gly₃. Linker mit D/L-Asn lagen während der Synthese am Harz, Trityl (Trt) geschützt vor und wurden bei der finalen Entschützung und Harzabspaltung mittels TFA entschützt.

Ausgehend von NH₂-Linker(PG)-**V1** wurden *N*-terminal verschiedene hydrophile Modifier aufgebaut (Schema 8) und diverse Zwischenstufen der Form NH₂-Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)-**V1** hergestellt. Die möglichen hydrophilen Modifier waren D-Asp₂, D-Orn₂, D-Asn₂, D-Asp₂-D-Lys, D-Asp₂-D-Cit und D-Asp₂-D-Glu. Alle hydrophilen Modifier waren während der Synthese am Harz an den Seitenketten mit *t*Bu, Boc oder Trt geschützt und wurden bei der finalen Entschützung und Harzabspaltung mittels TFA entschützt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION



Schema 8: Allgemeines Syntheschema der linkerbasierten Liganden. Ausgehend von **V1** wird zunächst der geschützte Linker aufgebaut. Anschließend erfolgt der Aufbau des geschützten hydrophilen Modifiers. Im letzten Schritt wird die radiohybride Einheit aufgebaut. Sk = Seitenkettenposition der trifunktionellen Einheit D-Dap; Nt = N-terminale Position des D-Dap.

In Tabelle 13 sind alle Linker und hydrophilen Modifizier aufgeführt. Es wurden nicht alle theoretisch möglichen Kombinationen aus Linker und hydrophilem Modifizier hergestellt. Welche Varianten tatsächlich synthetisiert und untersucht wurden, ist den jeweiligen generationsspezifischen Kapiteln zu entnehmen.

Tabelle 13: Auflistung der möglichen Linker und hydrophilen Modifizier (HM) für die linkerbasierten Liganden.

Linker	HM
Asn ₂	D-Asp ₂
D-Asn ₂	D-Orn ₂
D-Asn ₂ -Gly	D-Asn ₂
PEG ₁	D-Asp ₂ -D-Lys
Gly	D-Asp ₂ -D-Cit
Gly ₂	D-Asp ₂ -D-Glu
Gly ₃	

Nachdem Linker und hydrophiler Modifizier aufgebaut wurden, wurde die Ligandsynthese durch den Aufbau der radiohybriden Einheit (rh) am N-Terminus abgeschlossen. Der grundlegende Aufbau ist in allen Generationen vergleichbar (vgl. Schema 8). Ein N-terminales D-Dap diente als trifunktionelle Einheit, über die der Chelator und die SiFA-Einheit verknüpft wurden. Je nach Generation befanden sich Chelator und SiFA an der Seitenkettenposition (Sk) oder dem N-Terminus (Nt) des D-Dap. Es wurden vier Generationen von linkerbasierten Liganden entwickelt. Der Aufbau der rh-Einheit definiert die Zugehörigkeit zur jeweiligen Generation. Die jeweilige Synthese und der strukturelle Aufbau werden in den nachfolgenden Kapiteln erläutert.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.2 Linkerbasierte Liganden der 1. Generation

4.2.1 Entwicklungskonzept

Die 1. Generation wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit im Rahmen der Masterarbeit von *Markus Fahnauer* entwickelt und wird rückblickend als *proof-of-concept* Generation betrachtet.[198] In der 1. Generation wurde das rh-Konzept nach *Wurzer et al.* ($[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$) auf Somatostatinliganden angewandt.[151] Die radiohybride Einheit bestand aus D-Dap, SiFA-BA und einem Chelator, wahlweise DOTA oder *rac*-DOTAGA. Ähnlich wie in $[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$, wurde die radiohybride Einheit durch einen Linker vom Bindemotiv TATE getrennt. Dabei kam sowohl PEG_1 als auch Gly_2 zum Einsatz. Zur zusätzlichen Steigerung der Hydrophilie wurde außerdem ein hydrophiler Modifizierer bestehend aus D-Asp₂ eingebaut. Sowohl die Verwendung des Linkers, als auch der hydrophile Modifizierer sind an $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ angelehnt. Die linkerbasierten Liganden der 1. Generation basieren damit strukturell auf $[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{Ga-rhPSMA-7}$ und $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ (vgl. Abbildung 32). Ziel war es die Erkenntnisse aus der Entwicklung der radiohybriden PSMA-Liganden und der Entwicklung von $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$, auf rhSST₂ Derivate zu übertragen.[131, 139, 198]

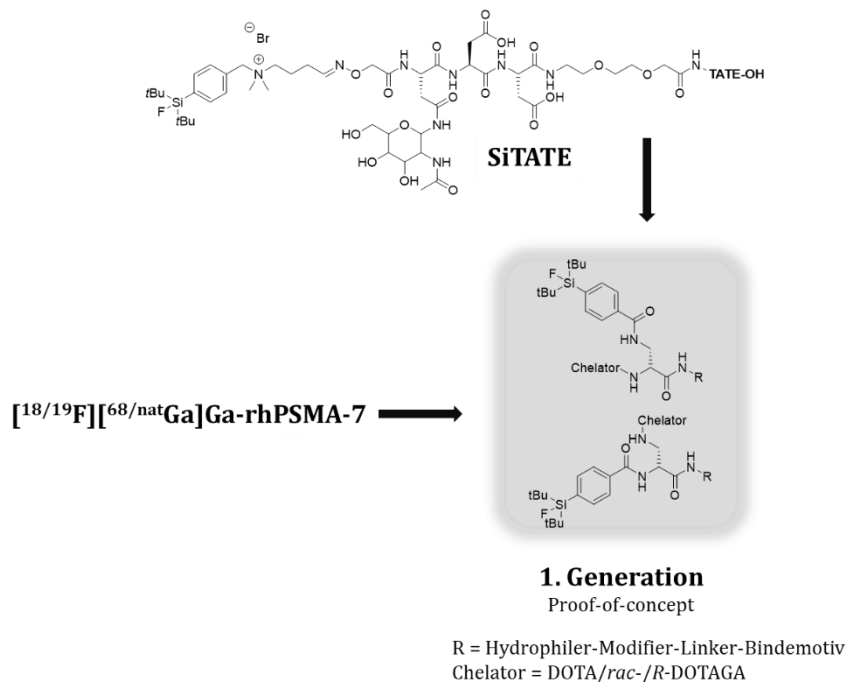


Abbildung 32: Struktur der radiohybriden Einheit der 1. Generation linkerbasierter Liganden.

Die 1. Generation der linkerbasierten Liganden ist von untergeordneter Bedeutung, da im Rahmen dieser Arbeit nur ein Derivat dieser Generation entwickelt wurde (rhLB-1.9). Dennoch werden die Daten der gesamten Generation kurz besprochen, da die Entwicklung der weiteren Generationen auf diesen ersten Liganden beruht.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.2.2 *In vitro* Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie

In Abbildung 33 sind die Strukturen der im Rahmen von *Design, Synthese und Evaluierung von innovativen Fluor-basierten Somatostatinrezeptor-Liganden* nach M. Fahnauer hergestellten Derivate dargestellt. Als Bindemotiv kommt ausschließlich TATE zum Einsatz. rhLB-1.1 – rhLB-1.4 tragen den PEG₁ Linker, der sich ebenfalls in der Struktur von [¹⁸F]SiTATE wiederfindet.[131, 139] rhLB-1.5 – rhLB-1.8 tragen einen Gly₂ Linker. Dieser soll den Liganden durch seine erhöhte Rigidität im Vergleich zu PEG₁, eine höhere strukturelle Stabilität verleihen, um die Affinität zu steigern. Ein hydrophiler Modifizierer, bestehend aus zwei Aspartaten, soll zudem die Hydrophilie steigern. Der Aufbau der radiohybriden Einheit ist analog zu [^{18/19}F][^{nat/68}Ga]Ga-rhPSMA-7. DOTA oder *rac*-DOTAGA und SiFA-BA sind über ein D-Dap sowohl *N*-terminal als auch über die Seitenkette verknüpft.[151, 198]

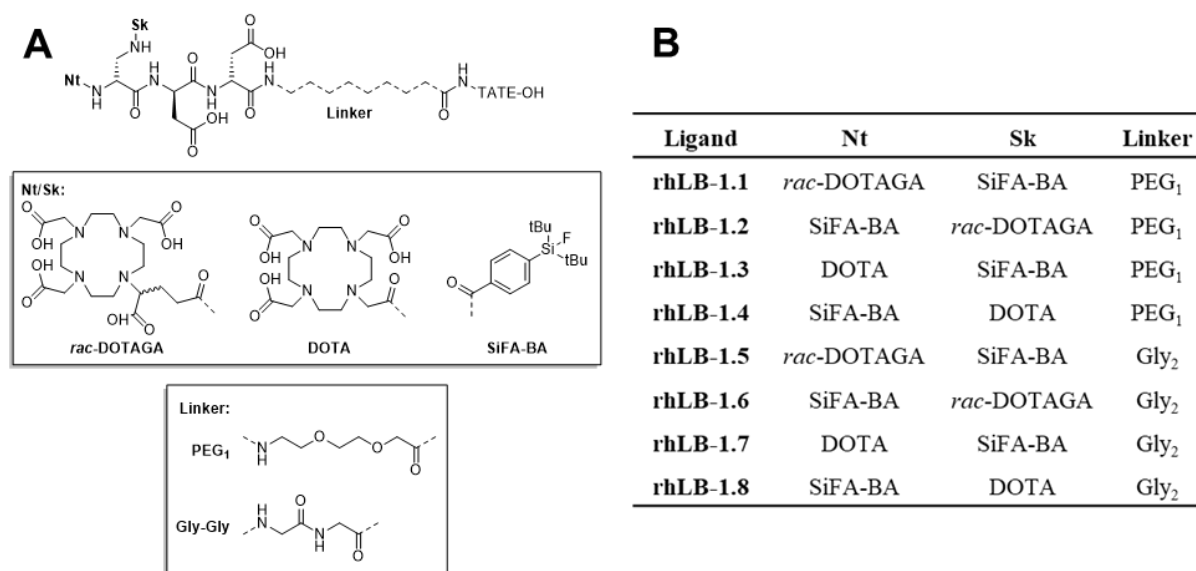


Abbildung 33: **A:** Graphische Darstellung der möglichen Strukturelemente der linkerbasierten Liganden der 1. Generation. **B:** Auflistung der Strukturelemente der Liganden. **Ligand:** Bezeichnung des Liganden; **Nt:** *N*-terminale Modifikation; **Sk:** Modifikation der Seitenkette des D-Dap; **Linker:** Strukturelement des Linkers.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich der Ligand rhLB-1.9 (Abbildung 34) entwickelt. Dessen Grundstruktur beruht auf dem Liganden rhLB-1.5. In Analogie zum linkerfreien Derivat rhLF-4, besteht der hydrophile Modifizierer in rhLB-1.9 aus D-Orn₂ anstelle des D-Asp₂ in rhLB-1.5.

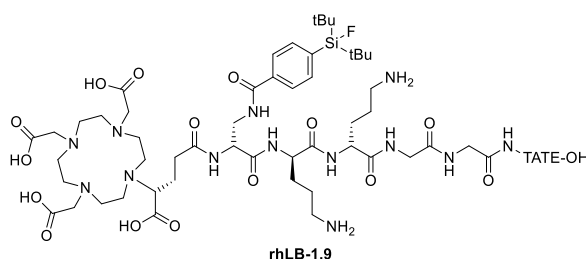


Abbildung 34: Struktur des Liganden rhLB-1.9.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle Liganden wurden *in vitro* als Gallium-Komplexe untersucht. Die Daten sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Für rhLB-1.1 – 1.9 fand die Bestimmung der Affinität im Rahmen dieser Arbeit statt. Die zugehörigen Daten für $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ und die Affinität zu HSA wurden von *Fahnauer et al.* bestimmt.[198]

Tabelle 14: Präklinische Daten von $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.1 – $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.9. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: ^{125}I I-TOC) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); HSA-Bindung in % (HPAC); Nettoladung z.

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	HSA Bindung %	z	Position SiFA
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.1	170 \pm 2.05	-2.02 \pm 0.04	97.9	-3	Sk
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.2	162 \pm 22.7	-2.30 \pm 0.09	97.8	-3	Nt
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.3	95.8 \pm 8.41	-1.87 \pm 0.07	93.9	-2	Sk
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.4	86.8 \pm 19.8	-2.15 \pm 0.11	93.6	-2	Nt
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.5	149 \pm 20.3	-2.15 \pm 0.09	–	-3	Sk
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.6	88.2 \pm 10.8	-2.14 \pm 0.11	–	-3	Nt
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.7	58.5 \pm 1.75	-2.02 \pm 0.04	–	-2	Sk
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.8	63.3 \pm 2.56	-2.02 \pm 0.04	–	-2	Nt
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.9	7.15 \pm 0.80	-1.39 \pm 0.04	97.7	+1	Sk

Die Liganden nach *Fahnauer et al.* weisen insgesamt eine zu niedrige Affinität zu SST_2 auf, als dass eine *in vivo* Anwendung in Erwägung gezogen werden könnte. Dennoch lassen sich aus den Daten wichtige Schlüsse ziehen. So weisen die Liganden mit einem Gly₂ Linker ($^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.5 – $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.8) eine höhere Affinität auf als die respektiven PEG₁ Verbindungen ($^{18/19}\text{F}$ Ga rhLB-1.1 – $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.4). Dies ist auf die höhere Rigidität des peptidischen Linkers zurückzuführen.[198] Des Weiteren erweisen sich Liganden tendenziell als affiner, wenn die SiFA-Funktion N-terminal am D-Dap verknüpft ist. Nur das entsprechende Ligandpaar $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.7 und $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.8 zeigt diese Tendenz nicht.

Außerdem ist zu beobachten, dass *rac*-DOTAGA tragende Derivate grundsätzlich eine geringere Affinität als die entsprechenden DOTA-tragenden Analoga aufweisen. Die *rac*-DOTAGA Derivate sind mit einem Wert von $z = -3$ partiell negativer geladen als die DOTA Liganden ($z = -2$). Wie schon für die linkerfreien Liganden, zeigt sich auch für die linkerbasierten Liganden ein Zusammenhang zwischen Nettoladung und Affinität zur Zielstruktur.[186, 193] Diesem Zusammenhang folgend wurde, um die Affinität durch Erhöhung der Nettoladung zu steigern, das Derivat $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.9 entwickelt. Die Gesamtnettoladung des komplexierten Liganden $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.9 ist durch die eingeführte Modifikation im hydrophilen Modifier positiv ($z = +1$). Daraus resultiert für $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.9 eine deutlich erhöhte SST_2 Affinität ($\text{IC}_{50} = 7.15 \pm 0.80$ nM) im Vergleich zu $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-1.5 ($\text{IC}_{50} = 149 \pm 20.3$ nM). Das Nettoladungskonzept wird damit auch innerhalb der linkerbasierten Liganden bestätigt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Gleichzeitig führt die Verwendung der positiv geladenen Ornithine auch zu einer Verringerung der Hydrophilie. Liegt der $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Wert für die Derivate mit D-Asp₂ als hydrophilem Modifier noch bei $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} \approx -2$ ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.1}$ – $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.8}$, weist $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.9}$ nur einen $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ von -1.39 ± 0.04 auf. Ähnlich wie bei den linkerfreien Liganden, geht die Verbesserung der Affinität durch eine positive Nettoladung, mit einem signifikanten Verlust von Hydrophilie einher. In der Literatur wird gezeigt, dass eine hohe Hydrophilie ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} > 2$) bei SiFA-Liganden entscheidend ist, um eine hepatobiliäre Exkretion zu verhindern.[131, 138, 140, 141] Daher ist $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.9}$ für eine *in vivo* Anwendung nicht geeignet.

4.3 Linkerbasierte Liganden der 2. Generation

4.3.1 Entwicklungskonzept

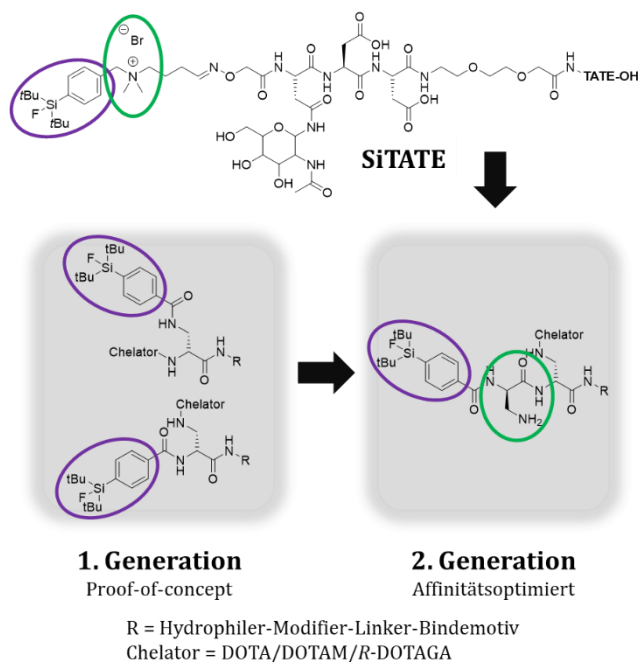


Abbildung 35: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden der 1. und der 2. Generation. Lila: SiFA-Aromat; grün: positive Ladung benachbart zum SiFA-Aromat.

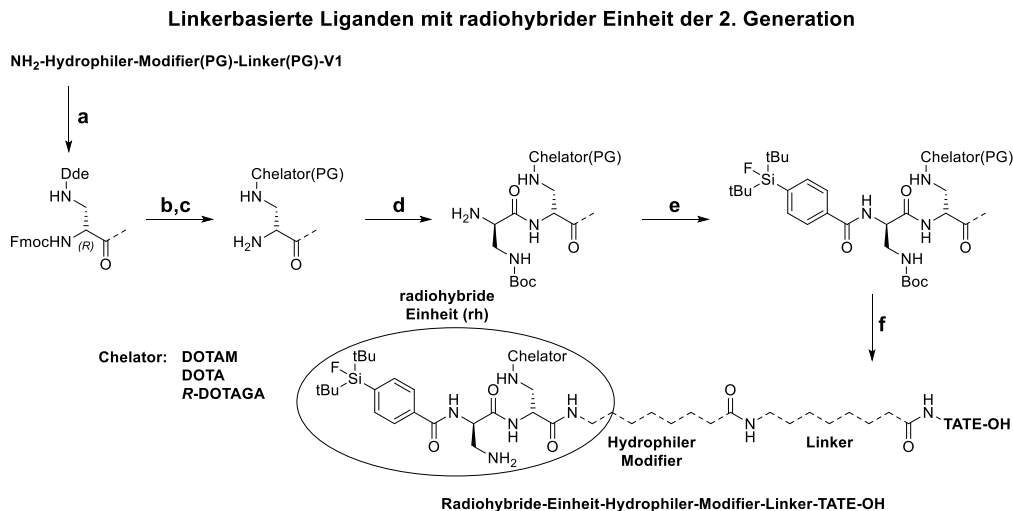
Die Liganden der 1. Generation weisen eine den linkerfreien Liganden ähnliche Problematik auf: je nach Gestaltung des hydrophilen Modifiers wird entweder eine geeignete Hydrophilie oder eine hinreichende Affinität zur Zielstruktur erreicht, jedoch nicht beides in geeigneter Kombination. Das Ziel der 2. Generation ist es, die Affinität der Ligand-Grundstruktur zu steigern, ohne dabei Einbußen bei der Hydrophilie in Kauf nehmen zu müssen. Dies soll erneut unter Anwendung des Nettoladungskonzepts erreicht werden. Die Daten des SiTATE zeigen, dass eine positive Ladung in Nachbarschaft zur SiFA-Einheit gut toleriert wird.[131, 139] Daher wird eine zusätzliche positive Ladung, in Form eines primären Amins, vor der SiFA-BA Einheit eingebaut. Anstelle des für $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ verwendeten SiFAN^+ , kommt die Sequenz SiFA-BA-D-Dap zum Einsatz (vgl. Abbildung

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

35). Um die Affinität weiter zu erhöhen, wird der SiFA-Baustein ausschließlich *N*-terminal verknüpft (vgl. 1. Generation).[198] Zusätzlich werden die Bausteine Linker, hydrophiler Modifier und der Chelator einer Variation unterzogen, um deren Einfluss auf die präklinischen Daten zu bewerten.

4.3.2 Synthese

In Schema 9 ist die Synthese der Liganden mit rh-Einheit der 2. Generation dargestellt. Ausgehend von NH_2 -Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)-V1 wurde Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert und Dde-entschützt. An der Sk-Position wurde zunächst der geschützte Chelator verknüpft und der *N*-Terminus um ein Fmoc-D-Dap(Boc)-OH verlängert. Nach der *N*-terminalen Konjugation von SiFA-BA erfolgte die finale Abspaltung vom Harz und die vollständige Entschützung des Chelator, hydrophilen Modifiers, Linkers und SST₂ Bindemotivs. Als Chelatoren kamen DOTAM, DOTA und *R*-DOTAGA zum Einsatz.



Schema 9: Synthese der linkerbasierten Liganden der 2. Generation ausgehend von NH_2 -Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)-V1. **a)** Fmoc-D-Dap(Dde)-OH, **b)** Dde-Entschützung; **c)** Konjugation des Chelators; **d)** Fmoc-D-Dap(Boc)-OH; **e)** Konjugation von SiFA-BA; **f)** TFA, H₂O, TIPS.

Unterschiede finden sich bei der Wahl des Linkers, des hydrophilen Modifiers (HM) und des verwendeten Chelators an der Sk-Position.

4.3.3 Variation des Chelators

4.3.3.1 *In vitro* Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie

Die Liganden rhLB-2.1, rhLB-2.2 und rhLB-2.3 gehen strukturell aus den Ergebnissen der 1. Generation hervor. Als Linker wird Gly₂ gewählt, welcher dem PEG₁ Linker hinsichtlich der Affinität zu SST₂, überlegen ist (siehe 4.2 *Linkerbasierte Liganden der 1. Generation*).[198] Variiert wird der Chelator, wobei DOTA (rhLB-2.1), *R*-DOTAGA (rhLB-2.2) und DOTAM (rhLB-2.3) zum Einsatz kommen (vgl. Abbildung 36).

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

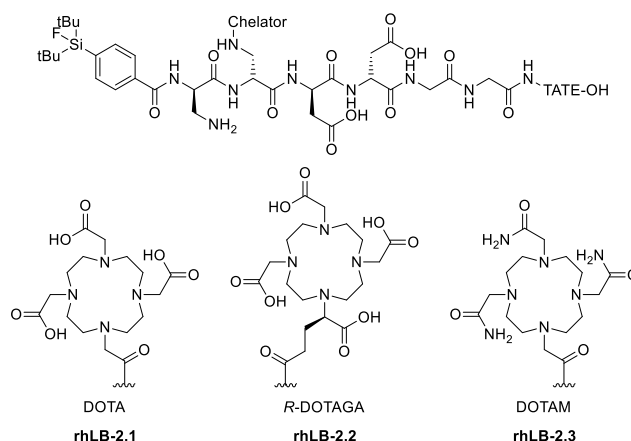


Abbildung 36: Strukturen der Liganden rhLB-2.1, rhLB-2.2 und rhLB-2.3.

rhLB-2.1 und rhLB-2.2 werden als $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Lu}$ Varianten untersucht, während rhLB-2.3 als $[^{18/19}\text{F}]\text{Pb}$ Verbindung verwendet wird.

Tabelle 15: Präklinische Daten der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z .

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$	11.2 ± 1.04	-2.11 ± 0.04	173	94.0	21.2	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-2.1}$	13.3 ± 1.97	-1.85 ± 0.02	–	95.8	–	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.2}$	12.7 ± 1.00	-2.16 ± 0.04	131	93.2	21.5	-2
$[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-2.2}$	11.0 ± 5.69	-2.35 ± 0.04	–	94.7	18.8	-2
$[^{18/19}\text{F}]\text{Pb-rhLB-2.3}$	6.57 ± 0.32	-1.82 ± 0.05	306	98.2	20.2	+1
$[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
$[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	–	88.9	–	0
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	379	32.6	1.12	0

Die Verwendung des D-Dap zwischen SiFA-BA und der trifunktionellen Einheit führt insgesamt zu einer deutlichen Affinitätssteigerung (vgl. Tabelle 15 und Abbildung 37). Liegen die Affinitäten für die strukturellen Analoga der 1. Generation, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.6}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.8}$, noch bei 63.3 ± 2.56 nM und 88.2 ± 10.8 nM, weisen die Ga und Lu Komplexe von rhLB-2.1 und rhLB-2.2 einen IC_{50} von < 15 nM auf. Dies ist auf die höhere Nettoladung der Liganden, durch das hinzugefügte D-Dap, zurückzuführen.[186, 193] Ein deutlicher Unterschied zwischen den Affinitäten der DOTA- und DOTAGA-tragenden Liganden der 1. Generation, ist in dieser Reihe nicht zu beobachten. Ebenso wenig wird ein klarer Trend für die Affinitäten der Ga und Lu Komplexe deutlich. Für DOTA-Bindemotiv Kombinationen wie DOTA-TATE werden für die Affinitäten verschiedener Metallkomplexe im Allgemeinen eindeutige Trends beobachtet. Dabei wird eine Wechselwirkung zwischen dem Metall-

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Chelator-Komplex und der *N*-terminalen Peptidbindung als verantwortliche Wechselwirkung postuliert.[192] Eine solche Wechselwirkung sollte in den linkerbasierten Liganden, aufgrund der erhöhten Distanz des Chelators zum Bindemotiv, nicht zur Wirkung kommen. [^{18/19}F]Pb-rhLB-2.3 zeigt mit 7.05 ± 1.61 nM die, bis zu diesem Zeitpunkt, höchste Affinität neuer radiohybrider SST₂-Liganden auf. Dies kann ebenfalls auf den Ladungszustand des Liganden zurückgeführt werden. Der Komplex aus DOTAM und Pb²⁺ ist durch das Fehlen der Carboxylate zweifach positiv geladen, wodurch die Nettoladung gegenüber den DOTA- und *R*-DOTAGA-tragenden Verbindungen erhöht ist.[186, 193] Die Internalisierungsraten von rhLB-2.1 – 2.3 korrelieren mit deren Affinitäten. [^{18/19}F]Pb-rhLB-2.3 zeigt die höchste Affinität und damit auch die höchste Internalisierungsrate. Der Ga-Komplex von rhLB-2.2 hat hingegen eine geringere Affinität und weist eine ebenso erniedrigte Internalisierungsrate auf.[57]

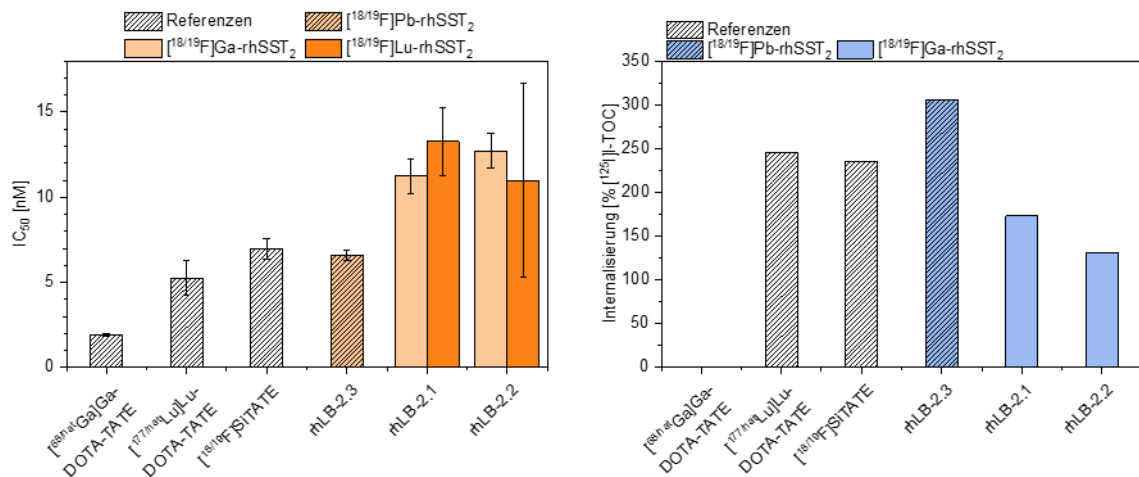


Abbildung 37: IC₅₀ und Internalisierung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]-TOC in % (nach 60 min).

Für [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.2 ergibt sich aufgrund des *R*-DOTAGA Chelators, mit seiner höheren Zahl an Carboxylaten im Vergleich zum DOTA-tragenden Liganden [^{18/19}F]Lu-rhLB-2.1, eine höhere Hydrophilie.[210] Der DOTAM-tragende Ligand [^{18/19}F]Pb-rhLB-2.3 zeigt wiederum eine höhere Lipophilie, verursacht durch die weniger hydrophilen Amide im Chelator (vgl. Abbildung 38).[196]

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

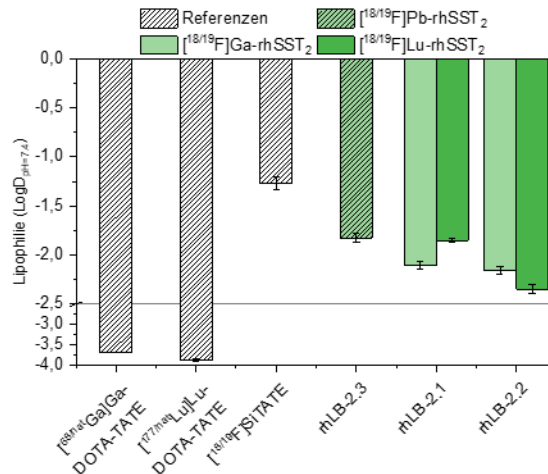
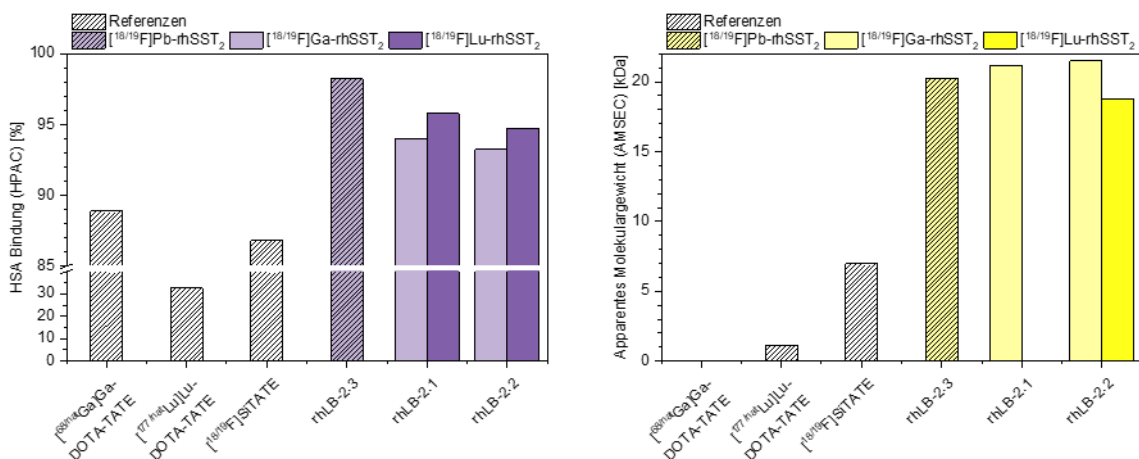


Abbildung 38: Lipophilie der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8).

Die HSA-Bindung aller Liganden der 2. Generation, ist, verglichen mit der Referenz [¹⁸F]SiTATE, deutlich erhöht (vgl. Abbildung 39). Somit bringt das zusätzliche D-Dap zwar die gewünschte Affinitätssteigerung, kann aber trotz strukturell enger Verwandtschaft zum SiTATE zu keiner ähnlich geringen HSA-Bindung der Liganden beitragen. Beim Vergleich der Ergebnisse aus der HPAC und AMSEC Methode werden außerdem Diskrepanzen zwischen diesen beiden Methoden deutlich. Im Mittel sind die Werte der rhSST₂ Liganden in beiden Methoden zwar höher als die der Referenzen, die Trends unterscheiden sich jedoch je nach gewählter Messmethode. Besonders auffällig ist dabei der hohe Wert von [^{18/19}F]Pb-rhLB-2.3 mit 98.2% in der HPAC Methode, der sich in der AMSEC Methode nicht im selben Maße bestätigen lässt. Die Beobachtung in der HPAC Methode ist für den Amid-basierten Chelator DOTAM unerwartet, da eine Erhöhung der HSA-Bindung vor allem für Peptide mit zahlreichen Carboxylaten oder lipophilen Aromaten beschrieben wird (z.B. R-DOTAGA, DOTA).[211]



III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 39: HSA-Bindung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).

Abschließend kann aufgrund der vorliegenden Daten kein Chelator-System eindeutig für eine Verwendung in der Synthese weiterer SST₂-Liganden favorisiert werden. Die Verwendung von Pb-DOTAM führt zwar zu einem Liganden mit hoher Affinität, allerdings ist die Anwendung von Pb-Nukliden wie ²¹²Pb weniger weit verbreitet als beispielsweise ⁶⁸Ga oder ¹⁷⁷Lu.[212] Die Verwendung von R-DOTAGA führt zu einer geringen Verbesserung hinsichtlich der Lipophilie. Allerdings zeigt Ga-DOTA eine geringfügig höhere Affinität.

4.3.3.2 *In vivo* Biodistribution

[¹⁸F]Pb-rhLB-2.3 und [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 wurden für eine Biodistributionsstudie an AR42J-Tumor tragenden Mäusen ausgewählt. Die Daten der Biodistributionen 1 h p.i., sind in Abbildung 40 vergleichend zu [¹⁸F]SiTATE dargestellt. Die Ergebnisse des μ PET/CT Imagings sind in Abbildung 94 im Anhang hinterlegt. Maßgebend für die Entscheidung diese Liganden zu wählen, waren die zu [¹⁸F]SiTATE vergleichbaren IC₅₀ Daten und die hinreichend hohen Hydrophilien. Des Weiteren sind die Affinitäten zu HSA bei diesen Liganden zwar höher als die von [^{18/19}F]SiTATE, aber geringer als die der linkerfreien Derivate [^{18/19}F]rhLF-4 und [^{18/19}F]rhLF-9. Beide neuen Liganden wurden als kalter Ga-Komplex eingesetzt, da die Entwicklung eines rein diagnostischen Agens im Vordergrund steht und die analogen Lu-Komplexe keine eindeutig besseren *in vitro* Daten aufweisen (Tabelle 15).

[¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 zeigt eine um mehr als 10 %ID/g höhere Tumoranreicherung als [¹⁸F]SiTATE (36.3 ± 4.53 %ID/g vs. 22.7 ± 2.68 %ID/g). Außerdem wird keine signifikante Leberanreicherung beobachtet. Im Vergleich zu den linkerfreien Derivaten [¹⁸F]Ga-rhLF-4 und [¹⁸F]Ga-rhLF-9 (vgl. 3.4 *In vivo* Biodistribution) stellt dies eine signifikante Verbesserung dar. Dies ist auf die erhöhte Hydrophilie von [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 zurückzuführen, wodurch die hohe Bindung an HSA teilweise kompensiert wird. Dennoch zeigt [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 durch dessen hohe HSA-Affinität eine verlangsamte Blutclearance.[151, 199] Der hohe Akkumulation in der Niere kann der hohen Gesamtladung des Liganden (sowohl negative als auch positive Ladungen) und dem primären Amin des D-Dap zugeschrieben werden.[200, 201] Obwohl [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 eine höhere Tumoranreicherung zeigt, sind die Tumor/Organ Verhältnisse vergleichbar mit [¹⁸F]SiTATE. Dies begründet sich in der verlangsamtem Blutclearance durch eine hohe HSA-Bindung, was erneut die Notwendigkeit der Verringerung der HSA-Bindung unterstreicht.

[¹⁸F]Pb-rhLB-2.3 akkumuliert stark in der Leber. Ursächlich ist die Kombination aus hoher HSA-Affinität und hohem $\text{Log}D_{\text{pH}=7.4}$. Lindner *et al.* untersuchten verschiedene Derivate für die $\alpha_5\beta_3$ und $\alpha_5\beta_5$ Integrine, die eine strukturell verwandte SiFA-Einheit tragen. Im Zuge dessen beobachteten sie eine prominente hepatobiliäre Exkretion der hergestellten Liganden, die sich, unseren Beobachtungen zu Folge, ebenfalls auf eine hohe HSA-Bindung zurückführen lässt. Erst durch die Verringerung des

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Log $D_{pH=7.4}$ der Verbindungen auf etwa -2 gelang es ihnen, eine signifikant niedrigere Leberakkumulation zu erreichen.[141] Die bisherigen Ergebnisse suggerieren, dass ein Idealbereich für HSA-Bindung und Log $D_{pH=7.4}$ existiert, den es konkret abzustecken gilt.

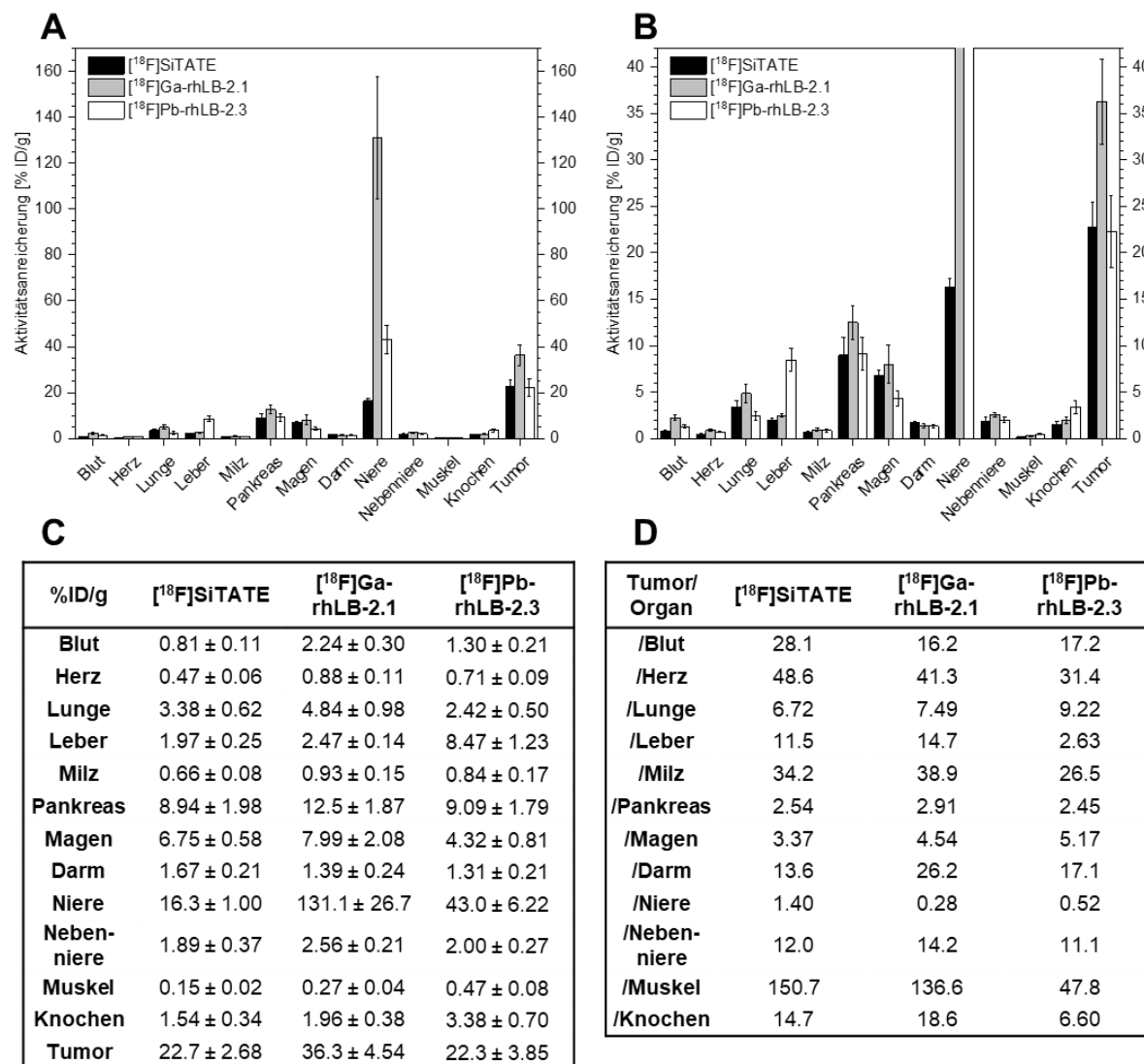


Abbildung 40: Biodistribution von [¹⁸F]SiTATE (n = 5), [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 (n = 5) und [¹⁸F]Pb-rhLB-2.3 (n = 5) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). **A:** Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 170 %ID/g). **B:** Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 42 %ID/g). **C:** Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). **D:** Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.

In Abbildung 41 wurden die Log $D_{pH=7.4}$ Werte und das MW_{app} von [¹⁸F]Ga-rhLF-4, [¹⁸F]Ga-rhLF-9, [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1, [¹⁸F]Pb-rhLB-2.3 und [¹⁸F]SiTATE gegen die jeweilige Leberakkumulation der Liganden in %ID/g aufgetragen. [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 und [¹⁸F]SiTATE weisen eine ähnlich niedrige Leberakkumulation auf. Erstere Verbindung erreicht dies durch die Kombination aus MW_{app} > 20 kDa mit einem Log $D_{pH=7.4}$ < -2 während [¹⁸F]SiTATE eine Kombination aus MW_{app} < 10 kDa und Log $D_{pH=7.4}$ > -1.5 aufweist. Relativ zu [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1, führt die geringere Hydrophilie bei gleichbleibender HSA-Bindung für [¹⁸F]Pb-rhLB-2.3 zu einer erhöhten hepatobiliären Exkretion.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

[¹⁸F]Ga-rhLF-9 wiederum, weist eine zu [¹⁸F]Pb-rhLB-2.3 vergleichbare Lipophilie auf. Die erhöhte HSA-Bindung von [¹⁸F]Ga-rhLF-9 sorgt in diesem Fall für eine gesteigerte Akkumulation in der Leber. Besonders offensichtlich ist der Einfluss der HSA-Bindung auf die hepatobiliäre Exkretion am Beispiel von [¹⁸F]Ga-rhLF-4. Trotz der zu [¹⁸F]SiTATE vergleichbaren Hydrophilie, zeigt dieser Ligand die bisher höchste Akkumulation in der Leber auf.

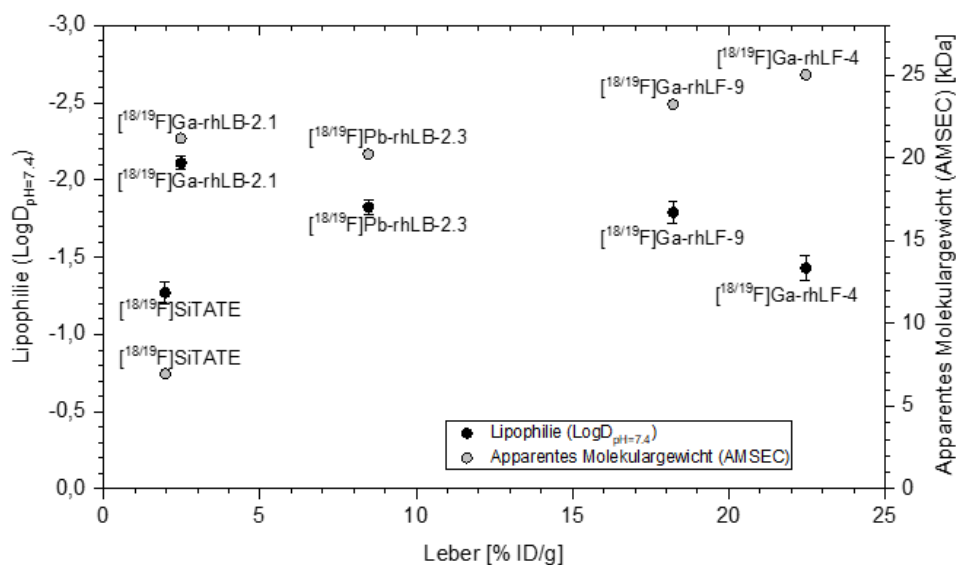


Abbildung 41: Zusammenhang zwischen der Lipophilie (y_1 -Achse), der *in vivo* Akkumulation in der Mausleber in %ID/g (x-Achse) und dem apparenten Molekulargewicht in kDa (y_2 -Achse).

Aus diesen Daten wird geschlossen, dass bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 20 kDa, ein $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ von ≤ -2 erreicht werden muss, um hepatobiliäre Exkretion in signifikantem Ausmaß zu verhindern (siehe [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 und [¹⁸F]Pb-rhLB-2.3). Alternativ muss bei einem $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ von ≥ -1.5 , ein apparentes Molekulargewicht von ≤ 10 kDa erreicht werden (siehe [¹⁸F]SiTATE und [¹⁸F]Ga-rhLF-4). Welches Ergebnis für Derivate in den Grenzbereichen von $\text{MW}_{\text{app}} = 10 - 20$ kDa und $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.0 - -1.5$ erzielt wird, lässt sich anhand dieser Daten nicht abschätzen.

4.3.4 Variation des hydrophilen Modifiers

Die Liganden rhLB-2.4 und rhLB-2.5 gehen strukturell aus Ligand rhLB-2.2 hervor (vgl. Abbildung 42). Die D-Aspartate im hydrophilen Modifier werden durch die positiv und neutral geladenen Aminosäuren D-Orn (rhLB-2.4) und D-Asn (rhLB-2.5) ersetzt (siehe Abbildung 16). Als Chelator wird R-DOTAGA gewählt. Einerseits um im Falle des D-Asn Derivats eine Gesamtladung von 0 zu erzeugen. Auf diese Weise, soll das Nettoladungskonzept erneut bewertet werden.[186, 193] Andererseits soll durch ein zusätzliches Carboxylat der geringeren Hydrophilie von D-Asn und D-Orn im Vergleich zu D-Asp entgegen gewirkt werden.[196, 210]

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

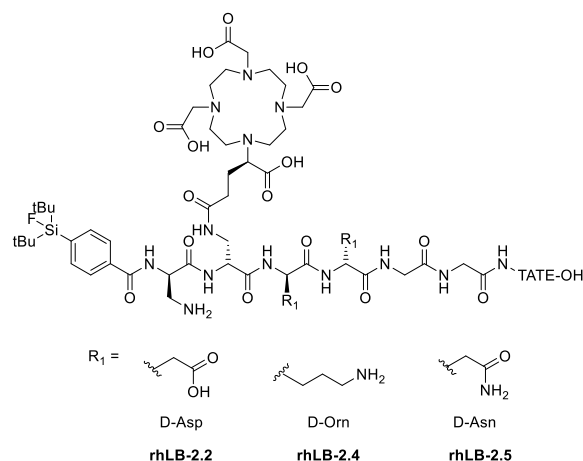


Abbildung 42: Struktur der Liganden rhLB-2.2, rhLB-2.4 und rhLB-2.5.

Tabelle 16: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.4}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.2}$	12.7 ± 1.00	-2.16 ± 0.04	131	93.2	21.5	-2
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.4}$	4.66 ± 0.53	-1.92 ± 0.04	452	98.8	17.6	+2
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$	3.64 ± 0.64	-1.58 ± 0.05	742	95.7	15.5	0
$[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
$[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	–	88.9	–	0
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0

Der Austausch der negativen Ladungen durch positive oder neutrale Seitenkettenfunktionalitäten führt zu einer deutlichen Affinitätssteigerung. Die Anwendbarkeit des Nettoladungskonzepts wird damit auch für die linkerbasierten Liganden bestätigt. Das neutral geladene Derivat $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$ zeigt mit 3.64 ± 0.64 nM die bisher höchste gemessene SST_2 -Affinität neuer rh SST_2 -Liganden. Die Internalisierungsrate korrelieren mit den Affinitätsdaten, weshalb $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$ auch hier den höchsten Wert liefert (siehe Abbildung 43).

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

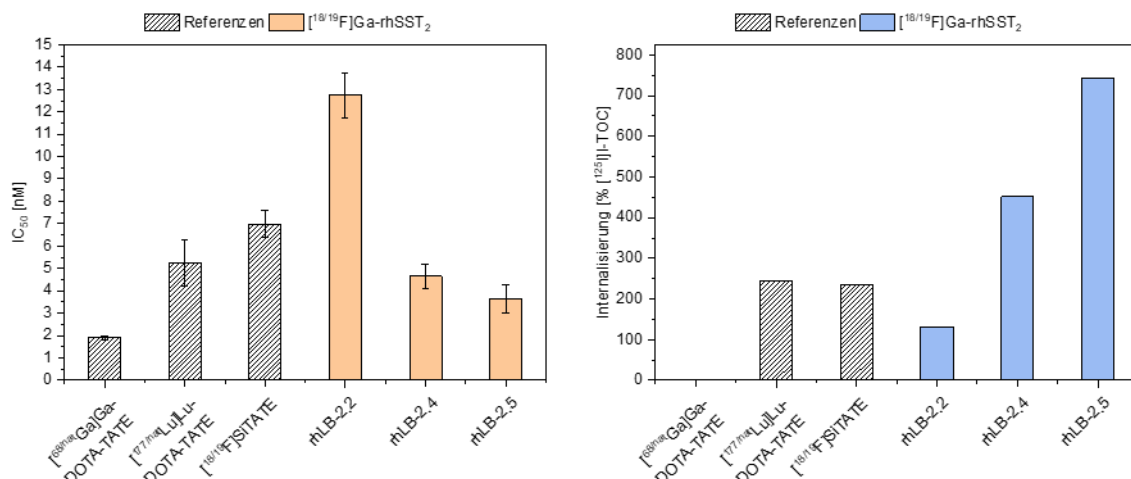


Abbildung 43: IC₅₀ und Internalisierung für die Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]I-TOC in % (nach 60 min).

In der Reihe D-Asp-, D-Orn- und D-Asn-tragender Liganden (rh 2.5 – 2.2) nimmt die Hydrophilie deutlich ab (siehe Abbildung 44). Mit $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -1.58 \pm 0.05$, zeigt [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.5 nur eine moderate Hydrophilie, was auf die weniger hydrophilen Amid-Seitenketten des Asn im hydrophilen Modifier zurückzuführen ist.[196]

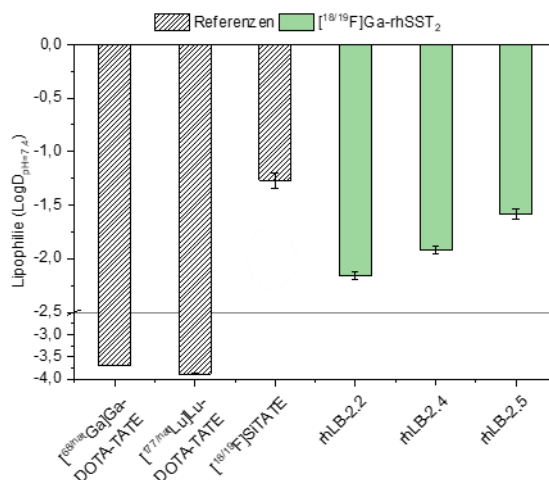


Abbildung 44: Lipophilie für die Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8).

Wie schon zuvor beobachtet, liefern die zwei Methoden zur Bestimmung der HSA-Bindung verschiedene Trends (vgl. 4.3.3 *Variation des Chelators*). Während die neuen Derivate [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.4 und [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.5 in der HPAC Methode eine höhere HSA-Bindung aufweisen, verläuft der Trend in der AMSEC Methode analog zum Trend der Hydrophilie der Liganden (siehe Abbildung 45). [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.5 zeigt den bisher niedrigsten Wert neuer rhSST₂-Liganden von 15.5 kDa, allerdings ist dieser relativ zu [¹⁸F]SiTATE immer deutlich erhöht.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

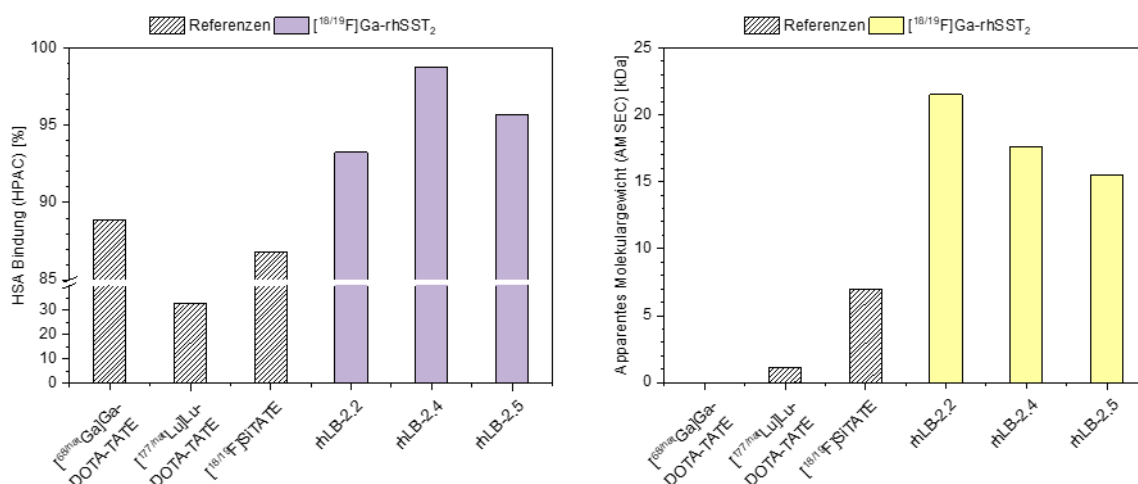


Abbildung 45: HSA-Bindung für die Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).

Trotz der vielversprechenden Daten wurde $[^{188}\text{ReGa}]Ga\text{-rhLB-2.5}$ keiner *in vivo* Studie unterzogen, da sowohl die Hydrophilie als auch die HSA-Bindung nicht geeignet sind.

4.3.5 Variation des Linkers

Die Liganden rhLB-2.7 und rhLB-2.8 sind strukturell, durch Verkürzung oder Verlängerung des Linkers um jeweils ein Glycin, von rhLB-2.1 abgeleitet (siehe Abbildung 46). Die Unterschiede in der Linkerlänge sollen Einblicke geben wie die Affinität, durch eine größere Distanz zwischen Bindemotiv und der sterisch anspruchsvollen rh-Einheit, beeinflusst wird. Die Vergrößerung des Abstands zwischen Bindemotiv und SiFA-Einheit führte bei Vorläufern des $[^{188}\text{ReGa}]Ga\text{-rhSST}_2$ zu einer Affinitätssteigerung (vgl. Referenzen).[131, 139] rhLB-2.6 trägt einen PEG₁ Linker, der direkt von SiTATE abgeleitet ist (siehe Abbildung 46).[131] Die 1. Generation von linkerbasierten Liganden hat bereits gezeigt, dass dieser Linker Nachteile hinsichtlich des IC_{50} birgt.[198] Mit diesem Derivat soll untersucht werden, ob diese Beobachtung auch in der 2. Generation Gültigkeit hat.

Es ist literaturbekannt, dass geladene Aminosäuren nahe dem SST_2 Bindemotiv häufig nicht toleriert werden. Des Weiteren wurde festgestellt, dass ein N-terminales Asparagin die Affinität nicht beeinflusst.[190] Die Liganden rhLB-2.9 und rhLB-2.10 sind daher mit D-Asn₂ und L-Asn₂ als Linkereinheit versehen (siehe Abbildung 46). Ziel war es die Affinität des strukturell verwandten Gly₂ Derivats rhLB-2.1 zu erhalten, aber gleichzeitig die Hydrophilie durch die Amid-basierten Asparagine zu erhöhen.[196]

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

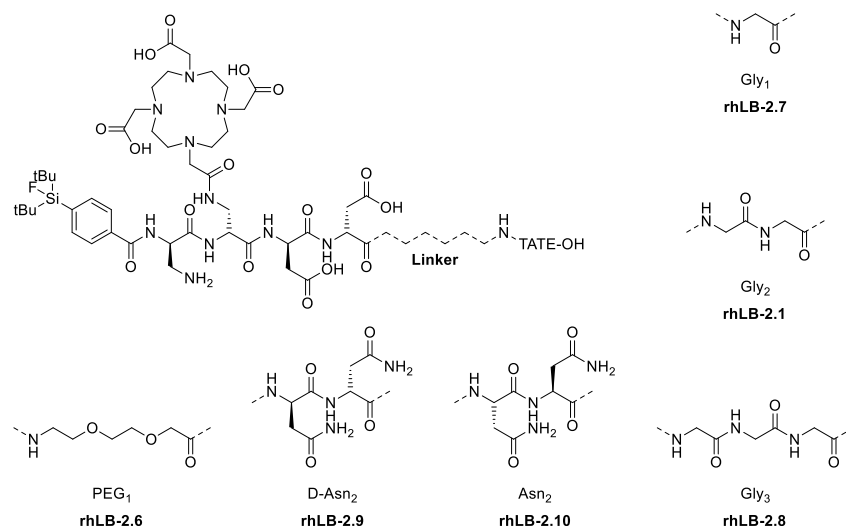


Abbildung 46: Strukturen der Liganden rhLB-2.6, rhLB-2.9, rhLB-2.10, rhLB-2.8, rhLB-2.1 und rhLB-2.7.

Tabelle 17: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.6}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.7}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.9}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.10}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z .

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$	11.2 ± 1.04	-2.11 ± 0.04	173	94.0	21.2	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.6}$	23.6 ± 3.57	-1.86 ± 0.06	81	95.7	18.6	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.7}$	14.9 ± 1.22	-2.20 ± 0.05	49	96.9	25.0	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$	3.61 ± 0.29	-2.24 ± 0.03	566	95.9	19.2	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.9}$	5.33 ± 0.78	-2.41 ± 0.05	200	95.9	18.0	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.10}$	16.6 ± 5.89	-2.29 ± 0.05	78	96.2	20.7	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
$[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga-DOA-TATE}$	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	–	88.9	–	0
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOA-TATE}$	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0

Die verschiedenen Linker wirken sich vor allem auf die Affinitäten und der Internalisierungsraten aus. Der PEG_1 Linker ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.6}$) sorgt auch in der 2. Generation für eine insgesamt verringerte Affinität und wird daher vom weiteren Optimierungsprozess ausgeschlossen (vgl. Abbildung 47). Besonders hervorzuheben sind die Werte der Gly-basierten Derivate. Mit zunehmender Linkerlänge nimmt die Affinität deutlich zu. Das Gly_3 Derivat $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$ weist eine ähnlich hohe Affinität auf, wie $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$ ($\text{IC}_{50} = 3.64 \pm 0.64$). Vorteilig ist, dass bei $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$ auf den Einsatz von Asparagin im hydrophilen Modifier verzichtet wird und damit keine Einbußen bei der Hydrophilie in Kauf genommen werden müssen (vgl. 4.3.4 *Variation des hydrophilen Modifiers*). Die Verwendung des Linkers Asn_2 in $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.10}$, verglichen mit Gly_2 in $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$, ist für die Affinität nachteilig. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da in der Literatur eine solche Modifikation

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

von SST₂-Liganden an N-terminaler Position beschrieben ist, ohne die Affinität negativ zu beeinflussen.[190] Das D-Asn tragende Derivat [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.9, zeigt eine höhere Affinität als der respektive Asn Ligand [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.10.

Der Trend der Internalisierungsraten deckt sich erneut mit dem Trend der Affinität zur Zielstruktur. [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.8 (Gly₃-Linker) zeigt in der Reihe der Gly-basierten Linker die höchste SST₂ Affinität und die höchste Zellaufnahme. [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.9 (D-Asn₂-Linker) folgt diesem Trend und internalisiert stärker als das Asn₂ Derivat [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.10. Allerdings wäre eine zu [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.8 vergleichbare Internalisierungsrate zu erwarten gewesen. Die Literatur liefert jedoch Beispiele, für die der Zusammenhang zwischen Affinität und Internalisierung nicht immer derselben Linearität folgt.[57]

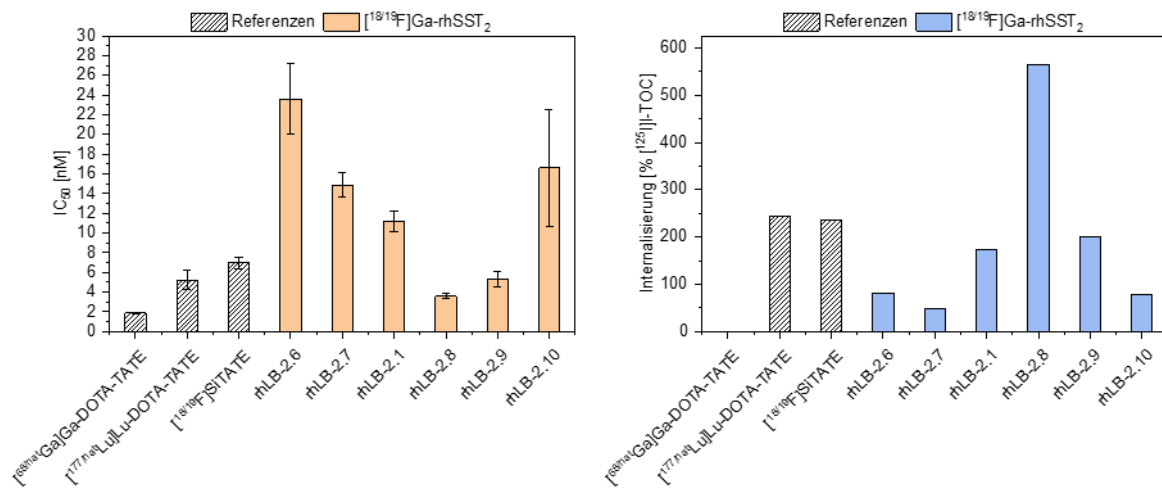


Abbildung 47: IC₅₀ und Internalisierung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]I-TOC in % (nach 60 min).

Alle Liganden mit einem Aminosäure-basierten Linker weisen einen LogD_{pH=7.4} zwischen -2.1 und -2.4 auf (siehe Abbildung 48). Die einzige Ausnahme bildet [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.6 (PEG₁-Linker), welches mit LogD_{pH=7.4} = -1.86 ± 0.06 die geringste Hydrophilie zeigt. PEG Einheiten werden häufig als hydrophile Elemente in Peptide integriert.[197] In [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.6 wurde jedoch ein Linker bestehend aus nur einer PEG Einheit eingesetzt, der für eine signifikante Steigerung der Hydrophilie zu kurz ist.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

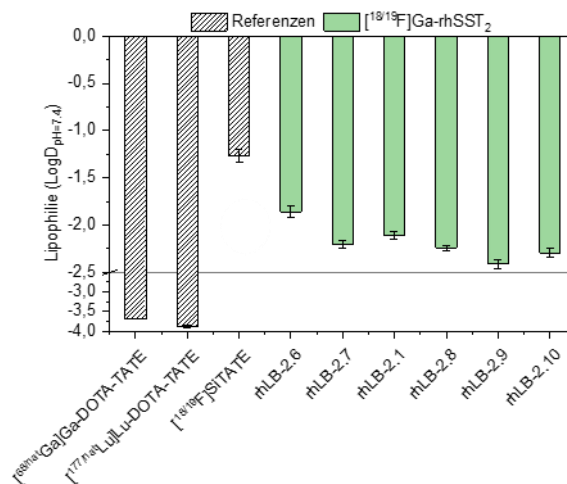


Abbildung 48: Lipophilie der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$).

Der Linker nimmt auch Einfluss auf die Affinität zu HSA, wobei die Effekte in der AMSEC Methode deutlicher zu erkennen sind (vgl. Abbildung 49). Mit zunehmendem Abstand von SiFA-Einheit und Bindemotiv nimmt die HSA-Bindung (AMSEC in kDa) in der Linker-Reihe Gly ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.7}$), Gly₂ ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$) und Gly₃ ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$) ab. Gly₃ zeigt damit einen ähnlich niedrigen Wert wie das analoge PEG₁ Derivat ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.6}$). Möglicherweise führt der längere und damit flexiblere Gly₃-Linker zu einer Konformation des Liganden, in der die SiFA-Einheit stärker vor einer Bindung an HSA abgeschirmt wird. Die Stereokonfiguration des Linkers nimmt ebenfalls Einfluss auf die HSA-Bindung. Während sich der Asn₂ Linker ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.10}$) hinsichtlich der HSA-Bindung analog zum Gly₂ Linker ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$) verhält, zeigt das D-Asn₂-Analogon ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.9}$) eine verringerte HSA-Affinität.

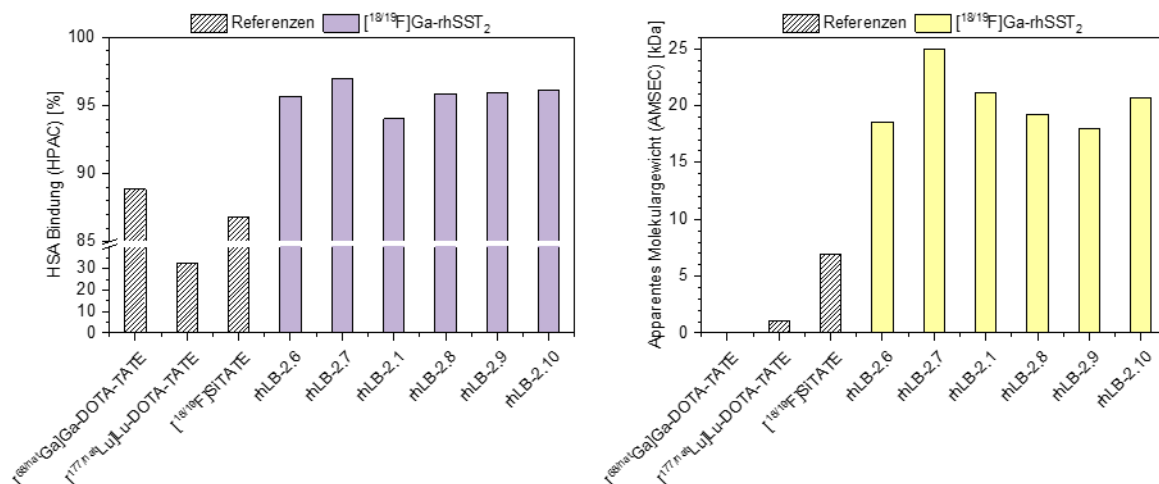


Abbildung 49: HSA-Bindung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).

Die Linker variierten Derivate zeigen in der AMSEC Methode eine Bandbreite an Werten zwischen $\text{MW}_{\text{app}} = 18.0$ bis 25.0 kDa. Im Gegensatz dazu werden in der HPAC Methode kaum Unterschiede

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

ermittelt und die Liganden zeigen eine %-Bindung an HSA zwischen 94.0% und 96.9%. Während die Kalibriergerade der AMSEC Methode einen Bereich bis zu $MW_{app} = 75$ kDa abdeckt, endet der lineare Bereich der Referenzkurve für die HPAC Methode bei 94.8% (vgl. 7. *Bestimmung der HSA-Bindung*). Liganden mit hoher HSA-Bindung lassen sich daher in der HPAC Methode nicht differenziert genug abbilden. Die AMSEC Methode kann im Gegensatz dazu ein breiteres Spektrum abbilden und erlaubt daher eine detaillierte Bewertung der hier untersuchten Linker variierten Liganden.

4.3.6 Fazit der linkerbasierten Liganden der 2. Generation

Der Ligand $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$ lieferte im *in vivo* Mausexperiment eine vielversprechende Biodistribution (vgl. 4.3.3 *Variation des Chelators*). Eine moderate Affinität gepaart mit einer hinreichend hohen Hydrophilie erwiesen sich bei diesem Liganden als zielführend. Trotz der hohen Anreicherung im Tumor, von über 35 %IDg, wurden nur mit $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ vergleichbare Tumor/Organ Verhältnisse erreicht. Dies wurde auf die hohe HSA-Bindung des rh-Liganden zurückgeführt, wodurch einerseits mehr Ligand in das Tumorgewebe transportiert, aber gleichzeitig die Blut-Clearance verlangsamt wurde. Als Konsequenz soll im Zuge künftiger Generationen von Liganden die HSA-Bindung gesenkt werden.

Durch die Variation von hydrophilem Modifier und Linker wurden Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich erzielt. Sowohl $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$ als auch $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$ zeigen höhere Affinitäten als die Referenzliganden $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ und $[^{nat/177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$. Als besonders vielversprechend gelten die Linker Gly₃ ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$) und D-Asn₂ ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.9}$), die eine Steigerung von Affinität und Internalisierung bei gleichzeitiger Verringerung der HSA-Bindung zur Folge haben. Die Verwendung von Aminen ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.4}$) und Amidin ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$) als hydrophile Modifier führte ebenfalls zu einer erhöhten Affinität, jedoch auch zu einer geringeren Hydrophilie. Die HSA-Bindung wurde durch diese Modifikationen zwar abgesenkt, aber insgesamt nicht signifikant genug verringert, um die niedrige HSA-Bindung von $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ zu erreichen.

Die Unterschiede zwischen der Verwendung von DOTA ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-2.1}$) und R-DOTAGA ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-2.2}$) als Chelatoren, waren gering. Allerdings erwies sich der Einsatz von R-DOTAGA, beziehungsweise dem geschützten Vorläufer R-DOTAGA(*t*Bu)₄, in der Synthese als problematisch. Lange Entschützungszeiten in TFA führten zu zahlreichen Nebenprodukten und erhöhtem Aufwand um die nötige Reinheit des Endprodukts zu erzielen. Der DOTAM-tragende Ligand $[^{18/19}\text{F}]\text{Pb-rhLB-2.3}$ lieferte vielversprechende *in vitro* Daten aber eine nicht zufriedenstellende Biodistribution. Mit einem Konzept zur Verringerung der HSA-Bindung des entstehenden Liganden, könnte jedoch auch dieser Chelator in Zukunft Anwendung finden. DOTA wurde dennoch primär als Chelator der Wahl eingesetzt, da die Anwendbarkeit von DOTAM in einem radiohybriden Kontext

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

limitiert wäre. Gängige Gallium oder Lutetium Nuklide lassen sich mit diesem Chelator nicht komplexieren, weshalb die Anwendung eines DOTAM Liganden auf ^{18}F beschränkt wäre.

Insgesamt konnte innerhalb der 2. Generation linkerbasierter Liganden vor allem die Affinität modifiziert werden. Das Nettoladungskonzept wurde auch für diese Ligand-Grundstruktur bestätigt und kann für künftige Optimierungen als Kriterium für die zu erwartende Affinität von Liganden herangezogen werden. Hinsichtlich Affinität und Hydrophilie sind die Liganden der 2. Generation der Literaturreferenz [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE überlegen. Trotz der strukturellen Verwandtschaft zu [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE konnte dessen niedrige HSA-Bindung jedoch nicht erreicht werden.

Die 2. Generation linkerbasierter Liganden wurde damit abschließend als Affinitäts-optimiert betrachtet und stellte damit eine deutliche Verbesserung gegenüber der 1. Generation dar. Die Senkung der HSA-Bindung war nicht das Ziel dieser Generation. Im Zuge der durchgeführten *in vivo* Studien, wurde die Signifikanz dieses *in vitro* Parameters hinsichtlich Blut-Clearance, Leberakkumulation und Tumor/Organ Verhältnissen deutlich.

4.4 Linkerbasierte Liganden der 3. Generation

4.4.1 Entwicklungskonzept

Der Einbau einer zusätzlichen positiven Ladung (D-Dap) in Nachbarschaft zum SiFA-Baustein lieferte in der 2. Generation der linkerbasierten Liganden eine gesteigerte Affinität zu SST₂. In Abhängigkeit vom eingesetzten hydrophilen Modifier konnte zusätzlich eine geeignete Hydrophilie erreicht werden. Mit [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLB-2.1 gelang es erstmals ein rhSST₂ Derivat zu entwickeln, welches *in vivo* keine signifikante hepato biliäre Exkretion zeigte. Dennoch wurde erneut deutlich, wie entscheidend das Zusammenspiel aus HSA-Bindung und Hydrophilie für das *in vivo*-Verhalten ist. Primäres Ziel der 3. Generation linkerbasierter Liganden war die Senkung der Affinität zu HSA, um auch Liganden von geringerer Hydrophilie für eine *in vivo* Anwendung in Betracht ziehen zu können.

Obwohl die Liganden der 2. Generation strukturell ähnlich zu SiTATE aufgebaut wurden, war die HSA-Bindung aller Liganden der 2. Generation mit $MW_{\text{app}} > 15 \text{ kDa}$ signifikant höher als die des [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE. Die niedrige HSA-Bindung von [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE war demnach nicht durch die partiell positiv geladene Seitenkette des D-Dap reproduzierbar, sondern basierte auf der positiv geladenen Grundstruktur des SiFAN⁺. Diese These wird gestützt, da die Entwickler des [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE für das strukturell analoge Derivat ohne quartärem Amin, eine hepato biliäre Exkretion beobachteten.[131] Daher liegt der Schluss nahe, dass das quartäre Amin die Affinität zu HSA senkt.

In der 3. Generation der linkerbasierten Liganden wird deshalb das D-Dap durch Me₂-Gly ersetzt, welches N-terminal mit SiFA alkyliert wird (vgl. Abbildung 50). Auf diesem Weg wird eine zu SiFAN⁺ analoge positive Ladung erzeugt, ohne den Abstand zwischen dem SiFA-Aromaten und der

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

trifunktionellen Einheit zu verändern. Ähnlich wie in der 2. Generation, sollen auch bei den linkerbasierten Liganden der 3. Generation Variationen des Linkers, des hydrophilen Modifiers und des Chelators entwickelt untersucht werden.

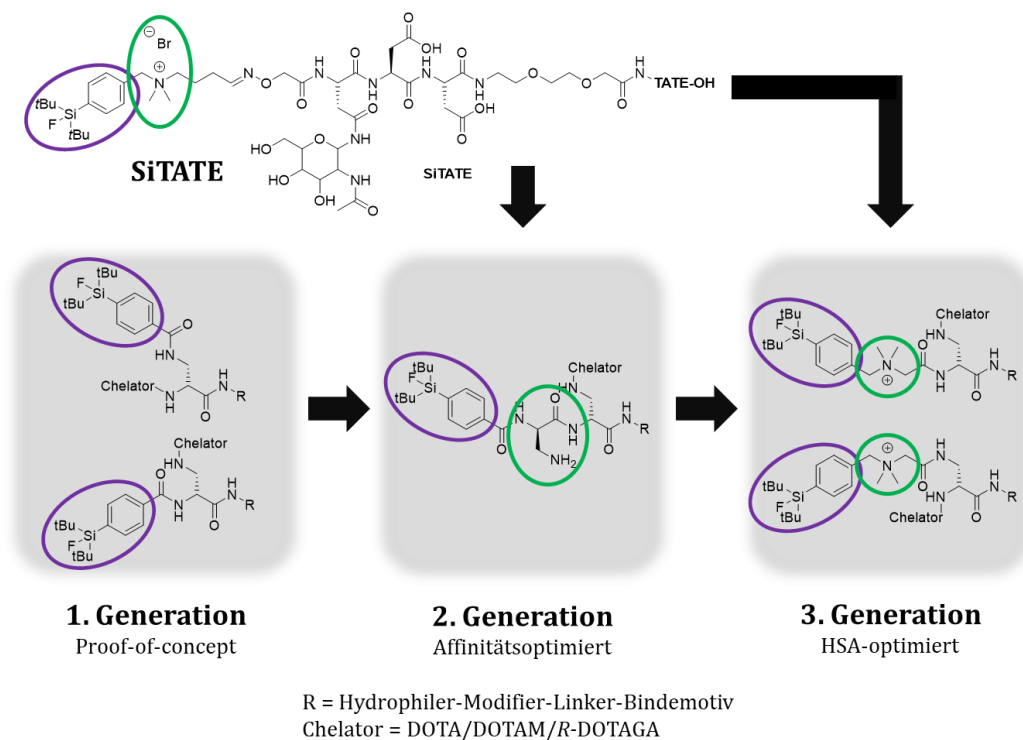


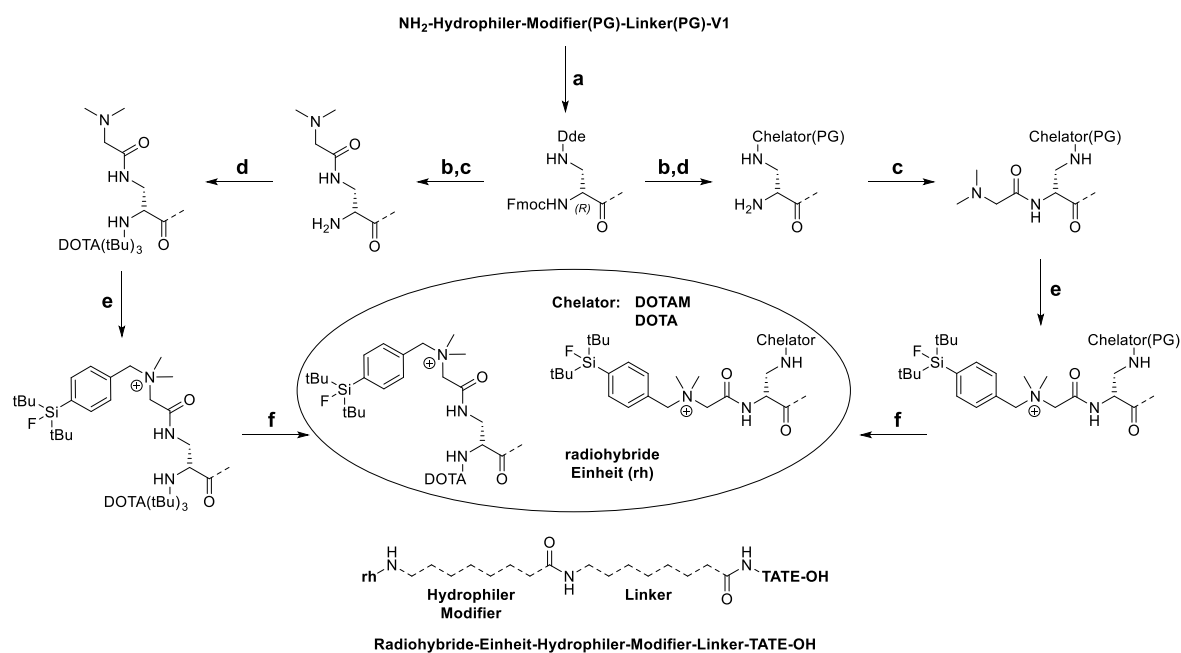
Abbildung 50: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden von der 1. bis zur 3. Generation. Lila: SiFA-Aromat; grün: positive Ladung benachbart zum SiFA-Aromat.

4.4.2 Synthese

In Schema 10 ist die Synthese der Liganden mit der rh-Einheit der 3. Generation dargestellt. Ausgehend von NH_2 -Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)-**V1** wurde Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert und Dde-entschützt. Im linken Synthesepfad wurde zunächst an der Sk-Position Me_2 -Gly-OH konjugiert und anschließend an der Nt-Position der Chelator $\text{DOTA}(t\text{Bu})_3$ verknüpft. Die SiFA-Einheit wurde durch die Alkylierung des tertiärenamins von Me_2 -Gly mit SiFA-Br über eine nukleophile Substitution aufgebaut. Das so gebildete Konstrukt aus SiFA und Me_2 -Gly trägt eine positive Ladung in Form eines quartärenamins und wird im Folgenden als SiFAN^+Gly bezeichnet.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Linkerbasierte Liganden mit radiohybrider Einheit der 3. Generation



Schema 10: Synthese der linkerbasierten Liganden der 3. Generation ausgehend von NH₂-Hydrophiler-Modifizier(PG)-Linker(PG)-V1. a) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; b) Dde-Entschützung; c) Me₂-Gly-OH; d) Konjugation von DOTA(*t*Bu)₃; e) SiFA-Br; f) TFA, H₂O, TIPS.

Im rechten Synthesepfad wurde an der Sk-Position der geschützte Chelator konjugiert und anschließend an der Nt-Position Me₂-Gly-OH verknüpft. Die SiFA-Einheit wurde ebenfalls durch die nukleophile Substitution mit SiFA-Br aufgebaut. Als Chelatoren kamen hier DOTAM und DOTA zum Einsatz. Für beide Pfade erfolgte abschließend die Abspaltung vom Harz und die vollständige Entschützung aller säurelabilen Schutzgruppen an Chelator, hydrophilem Modifizier, Linker und SST₂ Bindemotiv.

Der Hauptunterschied von Liganden dieser Generation zur 2. Generation, findet sich in der Art der positiven Ladung. Bei Liganden der 2. Generation wurde diese in Form von D-Dap zwischen SiFA und der trifunktionellen Einheit positioniert. Die positive Ladung in der 3. Generation linkerbasierter Liganden liegt nicht als primäres, sondern als quartäres Amin vor. Weitere Unterschiede zwischen den Liganden beider Generationen finden sich bei der Wahl des Bindemotivs (BM), des Linkers, des hydrophilen Modifiers (HM), des verwendeten Chelators (rh) und der relativen Orientierung der rh-Einheit hinsichtlich Sk und Nt Verknüpfung.

4.4.3 Variation des Linkers

Um den Einfluss der neuen rh-Einheit mit SiFAN⁺Gly statt SiFA-BA-D-Dap, auf die präklinischen Daten im Allgemeinen und die HSA-Bindung im Besonderen, bewerten zu können, wurden einige Derivate analog zur 2. Generation linkerbasierter Liganden entwickelt. rhLB-3.1 trägt wie rhLB-2.1 einen Gly₂ Linker während rhLB-3.2, ebenso wie Ligand rhLB-2.8, den verbesserten Gly₃ Linker trägt. rhLB-3.3 ist als Analogon zu rhLB-2.9 mit einem D-Asn₂ Linker ausgestattet (siehe Abbildung 51 und

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 46). In der 2. Generation linkerbasierter Liganden wurde beobachtet, dass sowohl der Gly₃ Linker als auch der D-Asn₂ Linker zu einer Steigerung der SST₂ Affinität führt. Um diese Effekte optimal zu nutzen, ist rhLB-3.4 mit einem kombinierten Gly-D-Asn₂ Linker versehen (Abbildung 51).

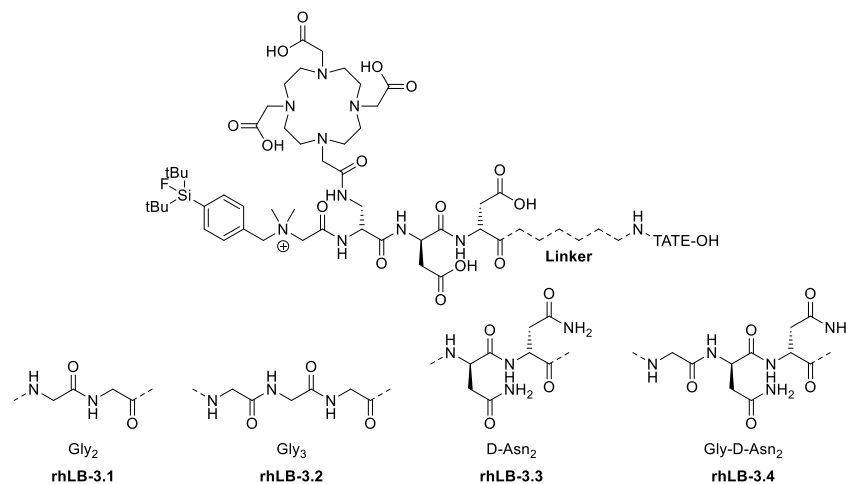


Abbildung 51: Strukturen der Liganden rhLB-3.1, rhLB-3.2, rhLB-3.3 und rhLB-3.4.

4.4.3.1 *In vitro* Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie

Die Linker-variierten Liganden wurden sowohl mit Gallium als auch mit Lutetium komplexiert, wobei der Fokus auf den rein diagnostischen Gallium-Varianten lag. Die *in vitro* Daten sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Präklinische Daten von [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.1, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.2, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.3, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.4. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.

Ligand	IC ₅₀ ± SD [nM]	LogD _{pH=7.4} ± SD	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW _{app} [kDa]	z
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.1	9.48 ± 1.96	-1.92 ± 0.03	213	90.7	8.77	-1
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.1	5.50 ± 0.76	-1.90 ± 0.05	–	91.1	7.77	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18	-1
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.2	3.72 ± 0.61	-1.79 ± 0.02	–	89.9	8.17	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.3	6.10 ± 0.57	-2.10 ± 0.05	186	90.2	8.11	-1
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.3	5.50 ± 1.47	-2.19 ± 0.05	–	90.4	–	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.4	6.31 ± 0.99	-2.16 ± 0.03	330	87.9	7.26	-1
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.4	4.47 ± 0.95	-2.24 ± 0.06	–	88.4	–	-1
[^{18/19} F]SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
[^{nat/68} Ga]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	-3.69[57]	–	88.9	–	0
[^{nat/177} Lu]Lu-DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die jeweiligen Ga- und Lu-Komplexe der Liganden der 3. Generation zeigen ähnliche Affinitäten mit einer geringen Tendenz zu einer höheren Affinität für die Lutetium-komplexierten Verbindungen (vgl. Abbildung 52). Nur für $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.1}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.1}$ ist der Unterschied im IC_{50} von größerer Signifikanz. Wie schon für die 2. Generation linkerbasierter Liganden beobachtet, führt die Verlängerung des Gly₂ Linkers (rhLB-3.1) um ein weiteres Gly (rhLB-3.2) zu einer Zunahme der Affinität.[131]

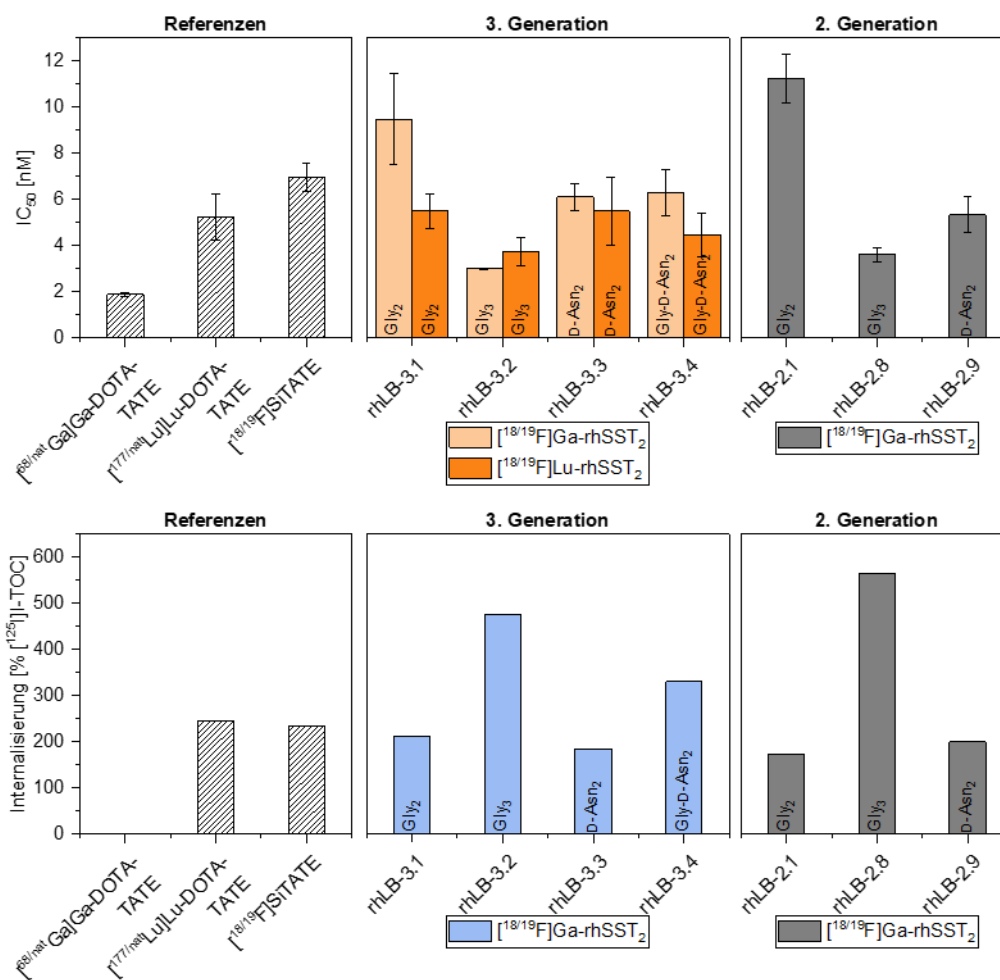


Abbildung 52: IC_{50} und Internalisierung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des jeweiligen Linkers. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

Die Verwendung des D-Asn₂ Linkers in rhLB-3.3 steigert im Vergleich mit dem Gly₂ Derivat rhLB-3.1 die Affinität, sofern dieses als $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -Ligand untersucht wird.[190] Der Linker Gly-D-Asn₂ in rhLB-3.4, stellt eine Kombination aus dem Gly₃-Linker und dem D-Asn₂-Linker dar. Ziel war es, die affinitätssteigernden Effekte dieser Linker in einem Derivat zu vereinen. Die resultierenden IC_{50} Werte können jedoch die hohen Affinitäten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.2}$ nicht übertreffen. In der Reihe der Linker variierten Derivate, liefert damit die Gly₃ Verbindung $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ die bisher höchste gemessene SST₂-Affinität neuer rhSST₂-Liganden ($\text{IC}_{50} = 3.01 \pm 0.03$ nM).

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Internalisierungsraten für die Liganden der 3. Generation wurden ausschließlich für die Ga-Derivate bestimmt. Die Tendenzen innerhalb beider Generationen sind vergleichbar, wobei Derivate mit höherer Affinität eine ebenfalls erhöhte Internalisierungsrate aufwiesen (siehe Abbildung 52).

Die Ga- und Lu-Komplexe der 3. Generation linkerbasierter Liganden weisen zueinander vergleichbare $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Werte (vgl. Abbildung 53) auf. Der Einsatz unterschiedlicher Metallkationen nimmt demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Hydrophilie. Allerdings führt die Verwendung der hydrophileren D-Asn-Linker (rhLB-3.3 und rhLB-3.4) statt der reinen Gly-Linker (rhLB-3.1 und rhLB-3.2) zu einer Steigerung der Hydrophilie.[196]

In Abbildung 53 sind die $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Daten der 3. Generation (mittig) vergleichend mit den strukturellen Analoga der 2. Generation (rechts) aufgeführt. Im Unterschied zu Affinität und Internalisierungsrate, ist für den $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ eine systematische Veränderung beim Übergang von der 2. zur 3. Generation linkerbasierter Liganden zu beobachten. Die Verwendung eines quartären (3. Generation) statt eines primären Amins (2. Generation) resultiert in einer Senkung der Hydrophilie. Diese Beobachtung steht im Kontrast zur Literatur. Bei der Entwicklung des $^{18/19}\text{F}$ SiTATE wird für Derivate mit einer SiFAN⁺ Einheit gegenüber Derivaten mit einem SiFA ohne positiver Ladung, eine geringfügige Steigerung der Hydrophilie beschrieben.[127, 131] Dennoch liegen die $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Werte der linkerbasierten Liganden der 3. Generation in einer für die *in vivo* Anwendung geeigneten Größenordnung ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.24$ bis -1.79).[141]

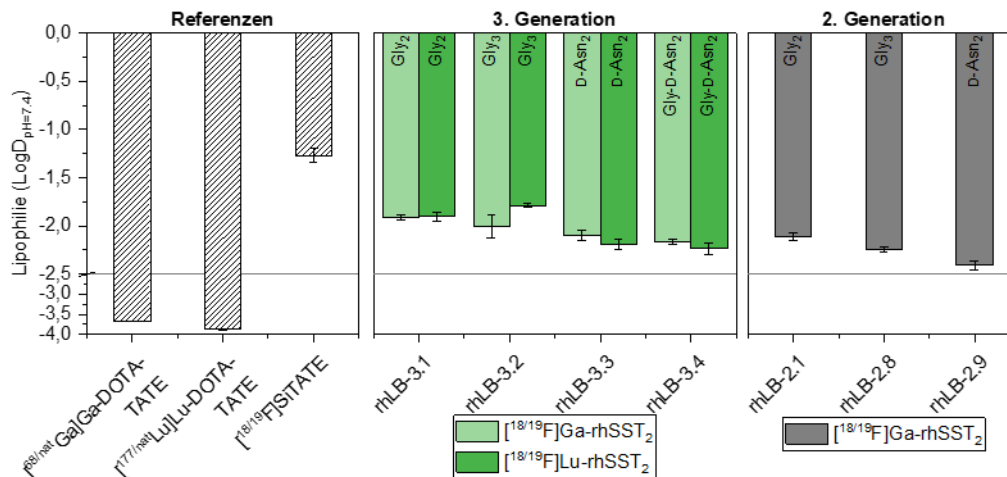


Abbildung 53: Lipophilie der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des jeweiligen Linkers. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

In Abbildung 54 sind die HSA Affinitäten der 3. Generation (mittig) vergleichend mit den strukturellen Analoga der 2. Generation (rechts) aufgeführt. Besonders hervorzuheben sind die signifikanten Unterschiede in der mittleren HSA-Bindung beider Generationen. Die Derivate der 2. Generation $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-2.1, $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-2.8 und $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-2.9 zeigen sowohl in der AMSEC Methode ($\text{MW}_{\text{app}} = 18.0 - 21.2$ kDa) als auch in der HPAC Methode (%-Bindung an

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

HSA = 94.0 – 95.9%) eine starke Bindung an HSA. Im Gegensatz dazu weisen die strukturell analogen Liganden der 3. Generation ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.1}$ – $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.4}$) ein apparentes Molekulargewicht MW_{app} von weniger als 9 kDa (AMSEC), oder eine maximale %-Bindung an HSA von nur 91.1% (HPAC) auf. Diese Derivate zeigen damit die bisher niedrigste gemessene HSA-Bindung neuer rhSST₂-Liganden. Damit liegen erstmalig Liganden mit einer zu $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ vergleichbaren HSA-Bindung vor.

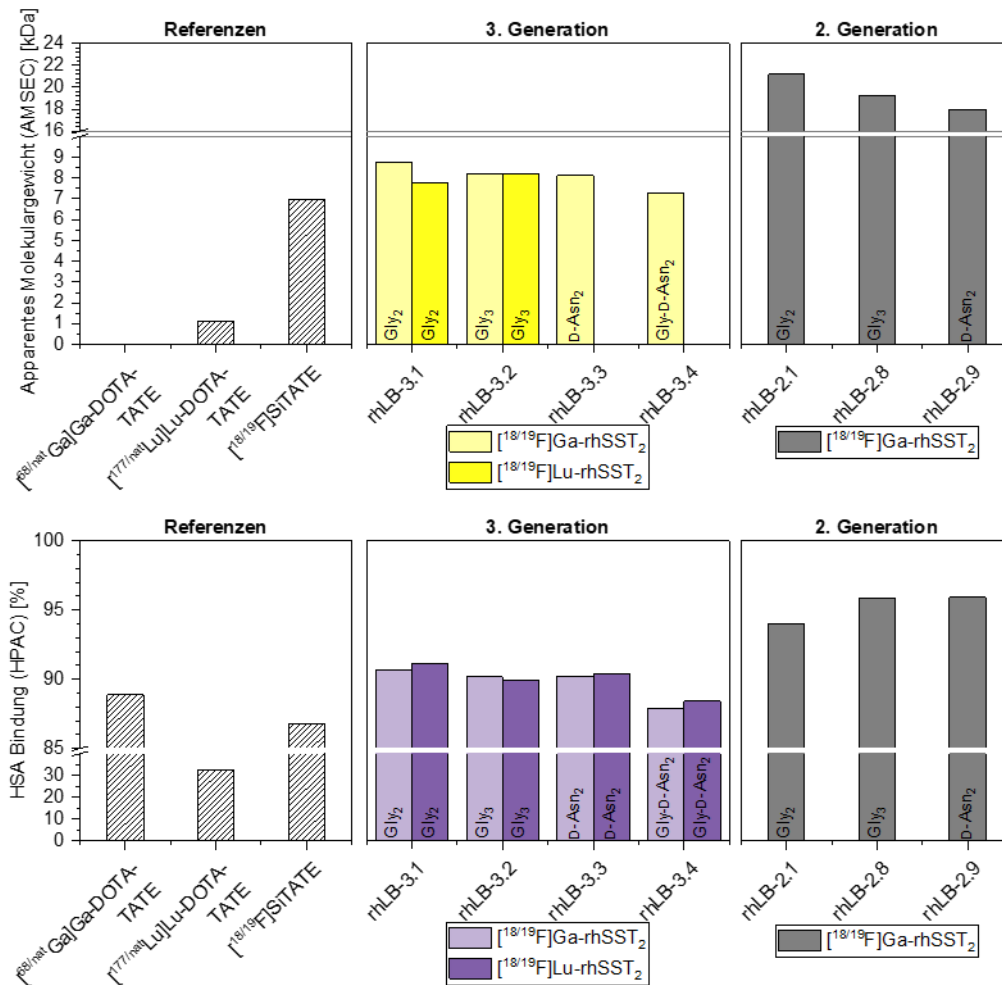


Abbildung 54: HSA-Bindung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC). Unten: HSA-Bindung in % (HPAC). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des jeweiligen Linkers. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

Für die 2. Generation linkerbasierter Liganden wurden, in Abhängigkeit von der gewählten Messmethode, unterschiedliche Trends für die Bindung an HSA beobachtet. Diese Trends werden in der 3. Generation nicht reproduziert. Im Gegenteil, die HPAC und AMSEC Ergebnisse zeigen in der 3. Generation sogar ähnliche Trends. Dies lässt sich auf die insgesamt geringere HSA-Bindung dieser Derivatgruppe zurückführen. Diese ist niedrig genug, sodass die Ergebnisse in beiden Methoden innerhalb des linearen Bereichs der jeweiligen Kalibrierung liegen. In Kapitel 4.3 *Linkerbasierte*

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Liganden der 2. Generation wurde bereits diskutiert, dass die HPAC Methode hohe Affinitäten zu HSA (%-Bindung > 94.8%) nicht mehr korrekt abbilden kann.

Die Wahl des komplexierten Metallkations nimmt nur geringen Einfluss auf die Affinität zu HSA (vgl. Abbildung 54). Systematische Unterschiede zwischen [^{18/19}F]Ga- und [^{18/19}F]Lu-Derivaten sind nur in der HPAC Methode zu beobachten. Hier zeigen drei von vier [^{18/19}F]Lu-Derivaten eine geringfügig erhöhte Affinität zu HSA verglichen mit den respektiven [^{18/19}F]Ga-Liganden. Die Wahl des Linkers wirkt sich ebenfalls nur gering auf die HSA-Bindung aus. rhLB-3.1, rhLB-3.2 und rhLB-3.3 zeigen vergleichbare Werte in der AMSEC Methode ($MW_{app} = 7.77 - 8.77$ kDa) und in der HPAC Methode (%-Bindung an HSA = 89.9 – 90.7%). rhLB-3.4 zeigt die niedrigsten Werte von 7.26 kDa (AMSEC) und 87.9% (HPAC) für den Ga-Komplex und 88.4% (HPAC) für den Lu-Komplex.

Die Verwendung des *N*-terminalen SiFAN⁺Gly (3. Generation) statt SiFA-D-Dap (2. Generation) nimmt auf die Affinität zu SST₂ und die Internalisierungsrate nur geringen Einfluss. Die Lipophilie wird im Vergleich zu den Liganden der 2. Generation geringfügig erhöht, liegt aber dennoch in einem geeigneten Bereich für die *in vivo* Anwendung. Die HSA-Bindung wird im Vergleich zur 2. Generation linkerbasierter Liganden signifikant gesenkt und ist für alle Derivate in einer zu [^{18/19}F]SiTATE vergleichbaren Größenordnung. Da [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 mit einem IC₅₀ von 3.01 ± 0.03 nM die höchste bis zu diesem Zeitpunkt gemessene Affinität zur Zielstruktur unter den neuen rhSST₂-Liganden aufweist, soll der, diesem Liganden innewohnende, Gly₃-Linker in den folgenden Optimierungen bevorzugt eingesetzt werden.

4.4.3.2 *In vivo* Biodistribution

[¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 wurden für eine Biodistributionsstudie an AR42J-Tumor tragenden Mäusen ausgewählt. Zusätzlich wurde [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 einer Kompetitions-Studie unterzogen. Dabei erfolgte eine zeitgleiche Injektion des Radiopharmakons mit 20 µg TOC, um die Spezifität der Anreicherung in SST₂ exprimierendem Gewebe zu bestätigen. Die Daten der Biodistributionen 1 h p.i., sind in Abbildung 55 vergleichend zu [¹⁸F]SiTATE und [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 dargestellt. Die Ergebnisse des µPET/CT Imagings von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 sind in Abbildung 95 im Anhang hinterlegt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

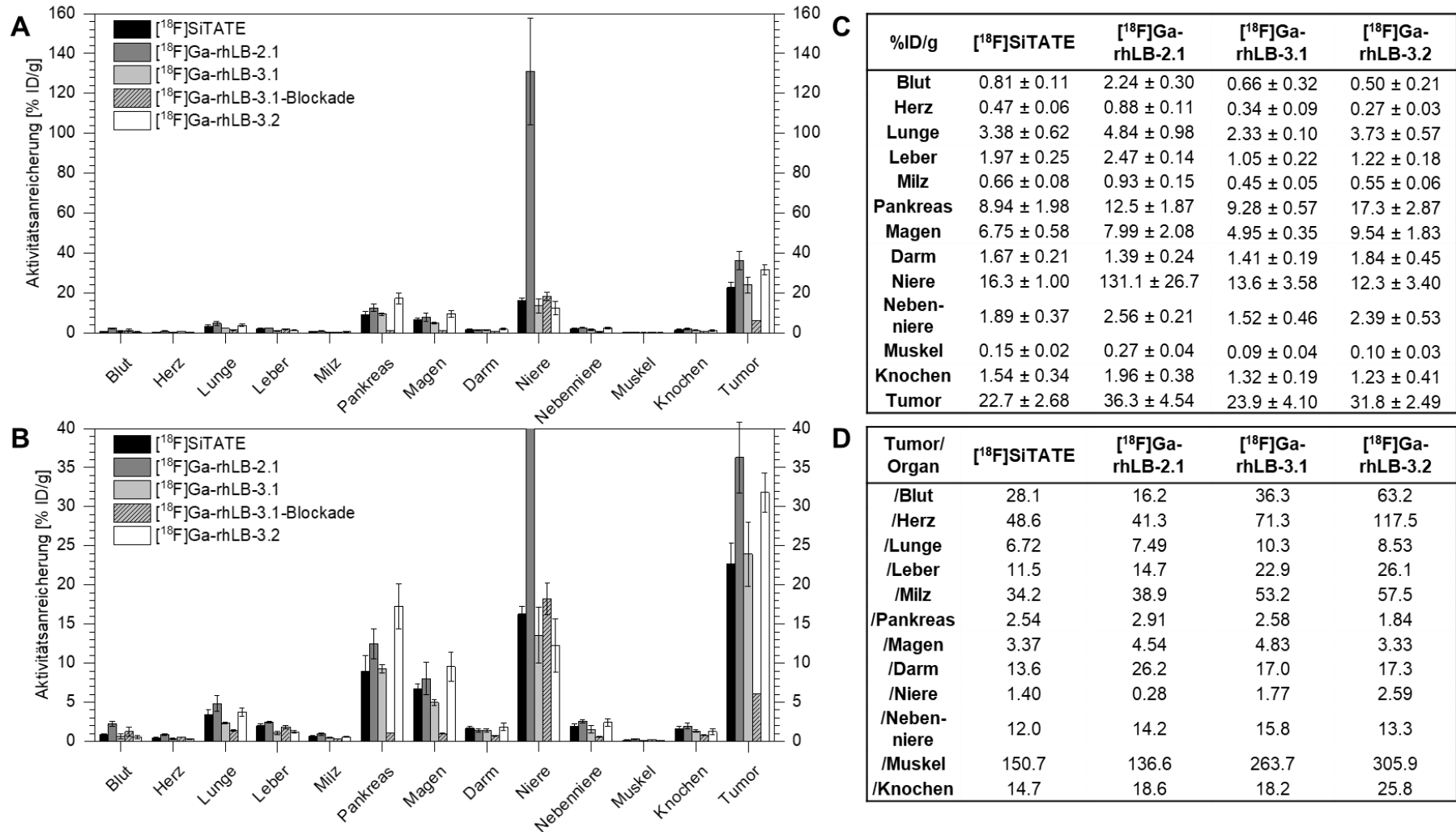


Abbildung 55: Biodistribution von [¹⁸F]SiTATE (n = 5), [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 (n = 5), [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 (n = 4), [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (n = 4) und Blockadestudie von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 (n = 2) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). **A:** Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 160 %ID/g). **B:** Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 40 %ID/g). **C:** Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). **D:** Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

[¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 zeigt, unter den bis jetzt vorgestellten Derivaten der 3. Generation linkerbasierter Liganden, die geringste Affinität zu SST₂. Dennoch wird dieser Ligand in einer Biodistributionsstudie untersucht, da es sich dabei um das strukturelle Analogon von [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 handelt. Der IC₅₀ ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 = 9.48 ± 1.96 nM; [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 = 11.2 ± 1.04 nM), die Internalisierungsraten ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 = 213%; [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 = 173%) und der LogD_{pH=7.4} ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 = -1.92 ± 0.03; [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 = -2.11 ± 0.04) beider Verbindungen unterscheiden sich nur gering. Die Bindung an HSA hingegen ist für [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 sowohl in der AMSEC als auch in der HPAC Methode deutlich erniedrigt ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 = 8.77 kDa und 90.7%; [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 = 21.1 kDa und 94.0%). Daher bietet die *in vivo* Untersuchung beider Derivate die Möglichkeit, den Einfluss der HSA-Bindung im direkten Vergleich zu bewerten.

Für die stark erhöhte Nierenakkumulation von [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 wurde bereits zuvor das primäre Amin der SiFA-D-Dap Sequenz verantwortlich gemacht. Diese Sequenz fehlt in [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 wodurch dieser Wert auf das Niveau von [¹⁸F]SiTATE gesenkt wird. Die Akkumulation von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 in Blut (0.66 ± 0.32 %ID/g), Herz (0.34 ± 0.09 %ID/g) und Leber (1.05 ± 0.22 %ID/g) ist geringer als für [¹⁸F]SiTATE (Blut = 0.81 ± 0.11 %ID/g; Herz = 0.47 ± 0.06 %ID/g; Leber = 1.97 ± 0.25 %ID/g) und [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 (Blut = 2.24 ± 0.30 %ID/g; Herz = 0.88 ± 0.11 %ID/g; Leber = 2.47 ± 0.14 %ID/g). Die Senkung der HSA-Bindung auf das Niveau von [^{18/19}F]SiTATE und ein niedrigerer LogD_{pH=7.4} von nur -1.92 ± 0.03 ([^{18/19}F]SiTATE: LogD_{pH=7.4} = -1.27 ± 0.07) führt für [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 zu einer beschleunigten Clearance aus dem Blutkreislauf und verhindert gleichzeitig eine hepatobiliäre Exkretion.

Sowohl die Anreicherung in Organen mit natürlicher SST₂ Expression (z.B. Pankreas, Nebenniere)[40], als auch die Akkumulation im Tumor (23.9 ± 4.10 %ID/g) sind vergleichbar zu [¹⁸F]SiTATE (Tumor = 22.7 ± 2.68 %ID/g). Verglichen mit [¹⁸F]Ga-rhLB-2.1 führt die Senkung der HSA-Bindung jedoch auch zu einer niedrigeren Anreicherung an der Zielstruktur. Da HSA auch als Transporter zur Zielstruktur dienen kann, liegt dies im Erwartungshorizont.[199, 204] Die Tumor/Organ Verhältnisse zeigen jedoch, dass [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 gegenüber beiden Referenzen eine verbesserte Pharmakokinetik aufweist. Dies zeigt sich durch die gesteigerten Verhältnisse von Tumorakkumulation zu Blut-, Herz-, Leber-, Nieren- und Muskelakkumulation.

[¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 verfügt über eine zu [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 vergleichbare Hydrophilie (LogD_{pH=7.4} = -2.00 ± 0.12) und eine ähnlich starke Bindung an HSA (AMSEC: MW_{app} = 8.18 kDa; HPAC: %-Bindung = 90.2%). Hauptunterschiede zwischen beiden Liganden sind die Affinität zu SST₂ ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.2: IC₅₀ = 3.01 ± 0.03 nM) und die Internalisierungsraten ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.2: 477%). Verglichen mit [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 sind die Akkumulationen von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 in Blut (0.50 ± 0.21 %ID/g), Herz (0.27 ± 0.03 %ID/g) und Leber (1.22 ± 0.18 %ID/g) vergleichbar. Da für diese Werte die Lipophilie und die HSA-Bindung entscheidend sind, ist diese Beobachtung zu erwarten.[186, 199] Aus der gesteigerten Affinität von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 ergibt sich jedoch ein

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

signifikanter Unterschied in der Anreicherung in SST₂ exprimierenden Gewebestrukturen. Die Akkumulation von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 in Pankreas und Nebenniere ist gegenüber [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 annähernd verdoppelt. Des Weiteren ist die Tumoranreicherung mit 31.8 ± 2.49 %ID/g deutlich erhöht. Verglichen mit [¹⁸F]SiTATE (22.7 ± 2.68 %ID/g) und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.1 (23.9 ± 4.10 %ID/g) stellt dies eine signifikante Zunahme dar. Insbesondere die Tumor/Organ Verhältnisse profitierten stark von der erhöhten Tumoranreicherung. Relativ zu [¹⁸F]SiTATE sind die Tumor/Organ Verhältnisse für Blut, Herz, Leber, Niere und Muskel annähernd verdoppelt. [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 stellt damit das bisher vielversprechendste Derivat für eine *in vivo* Anwendung am Patienten dar.

Die Senkung der HSA-Bindung in der 3. Generation linkerbasierter Liganden führt zu einer insgesamt verbesserten Pharmakokinetik, insbesondere zu einer schnellen Blut-Clearance und einer nahezu vollständigen Exkretion über die Nieren. Gleichzeitig wird deutlich, dass die Affinität zu SST₂, selbst im niedrigen nanomolaren Bereich, entscheidenden Einfluss auf die Tumorakkumulation nimmt. Für weitere Biodistributionsstudien werden daher nur noch Derivate mit einem IC₅₀ von mindestens 5 nM in Erwägung gezogen. Aufgrund der vielversprechenden Daten wird [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 als neue Lead-Compound betrachtet. Der verwendete Gly₃-Linker wird als Standard-Linker, in der Entwicklung weiterer rhSST₂-Liganden, eingesetzt.

4.4.4 Variation des Chelators

In der 2. Generation linkerbasierter Liganden wurde gezeigt, dass die Wahl des Chelators signifikanten Einfluss auf die *in vitro* Daten nimmt. Insbesondere durch die Verwendung von DOTAM, komplexiert mit Pb²⁺, wird die Affinität zur Zielstruktur erhöht. Daher werden auch in der 3. Generation linkerbasierter Liganden die Chelatoren DOTA und DOTAM vergleichend evaluiert. Die DOTA-basierten Derivate rhLB-3.1 und rhLB-3.2 wurden bereits im vorangegangenen Kapitel vorgestellt. Zusätzlich werden nun die analogen DOTAM basierten Derivate rhLB-3.5 und rhLB-3.6 vorgestellt. Ebenso wie das DOTA Derivat rhLB-3.1, trägt rhLB-3.5 den Gly₂ Linker. rhLB-3.6 hingegen verfügt wie rhLB-3.2, über den Gly₃ Linker (Abbildung 56).

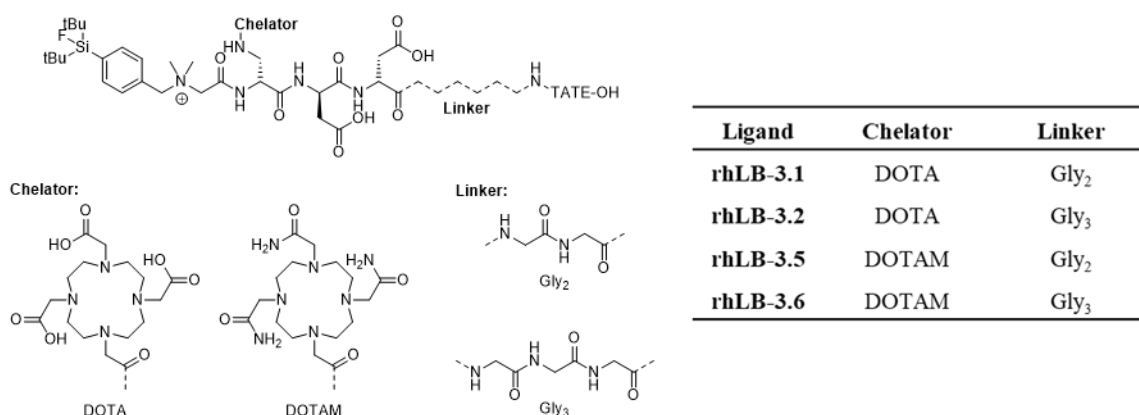


Abbildung 56: Strukturen der Liganden rhLB-3.1, rhLB-3.2, rhLB-3.5 und rhLB-3.6.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die DOTAM Liganden wurden mit Pb^{2+} komplexiert und evaluiert. Die DOTA Liganden wurden als Ga- und Lu-Komplexe untersucht. Alle erhobenen Daten sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Präklinische Daten von $^{18/19}\text{F}$ Ga-/ $^{18/19}\text{F}$ Lu-rhLB-3.1, $^{18/19}\text{F}$ Ga-/ $^{18/19}\text{F}$ Lu-rhLB-3.2, $^{18/19}\text{F}$ Pb-rhLB-3.5 und $^{18/19}\text{F}$ Pb-rhLB-3.6. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: ^{125}I I-TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu ^{125}I I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z .

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-3.1	9.48 ± 1.96	-1.92 ± 0.03	213	90.7	8.77	-1
$^{18/19}\text{F}$ Lu-rhLB-3.1	5.50 ± 0.76	-1.90 ± 0.05	-	91.1	7.77	-1
$^{18/19}\text{F}$ Pb-rhLB-3.5	4.67 ± 0.73	-1.95 ± 0.03	439	97.1	9.20	+1
$^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18	-1
$^{18/19}\text{F}$ Lu-rhLB-3.2	3.72 ± 0.61	-1.79 ± 0.02	-	89.9	8.17	-1
$^{18/19}\text{F}$ Pb-rhLB-3.6	4.24 ± 0.68	-1.86 ± 0.04	505	98.9	9.38	+1
$^{18/19}\text{F}$ SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
$^{\text{nat}/68}\text{Ga}$ Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	-	88.9	-	0
$^{\text{nat}/177}\text{Lu}$ Lu-DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0

In der 2. Generation linkerbasierter Liganden führte die Verwendung von Pb-DOTAM verglichen mit den strukturell analogen Ga- oder Lu-DOTA Derivaten zu einer Steigerung der SST_2 Affinität. Für die Gly₂-Linker basierten Derivate rhLB-3.1 und rhLB-3.5 der 3. Generation kann dieser Trend reproduziert werden (vgl. Abbildung 57). $^{18/19}\text{F}$ Ga- und $^{18/19}\text{F}$ Lu-rhLB-3.1 weisen je einen IC_{50} von 9.48 ± 1.96 nM und 5.50 ± 0.76 nM auf, wohingegen das DOTAM-Analogon $^{18/19}\text{F}$ Pb-rhLB-3.5 eine höhere Affinität von 4.67 ± 0.73 nM zeigt.

Die Liganden rhLB-3.2 (DOTA) und rhLB-3.6 (DOTAM) basieren auf dem affinitätsoptimierten Gly₃-Linker. Die Unterschiede hinsichtlich des IC_{50} sind für die DOTA Derivate $^{18/19}\text{F}$ Ga-rhLB-3.2 (3.01 ± 0.03 nM) und $^{18/19}\text{F}$ Lu-rhLB-3.2 (3.72 ± 0.61 nM) und das DOTAM Derivat $^{18/19}\text{F}$ Pb-rhLB-3.6 (4.24 ± 0.68 nM) nur gering. Daher ist anzunehmen, dass durch strukturelle Veränderungen, wie dem Wechsel des Chelators, die hohe Affinität der Gly₃-basierten Derivate nicht mehr signifikant verbessert werden kann.

Die Internalisierungsraten der Liganden spiegeln die Tendenzen der Affinitäten zu SST_2 wieder. Daher weisen die Derivate der 3. Generation eine höhere Internalisierungsrate als die analogen Liganden der 2. Generation auf (siehe Abbildung 57).

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

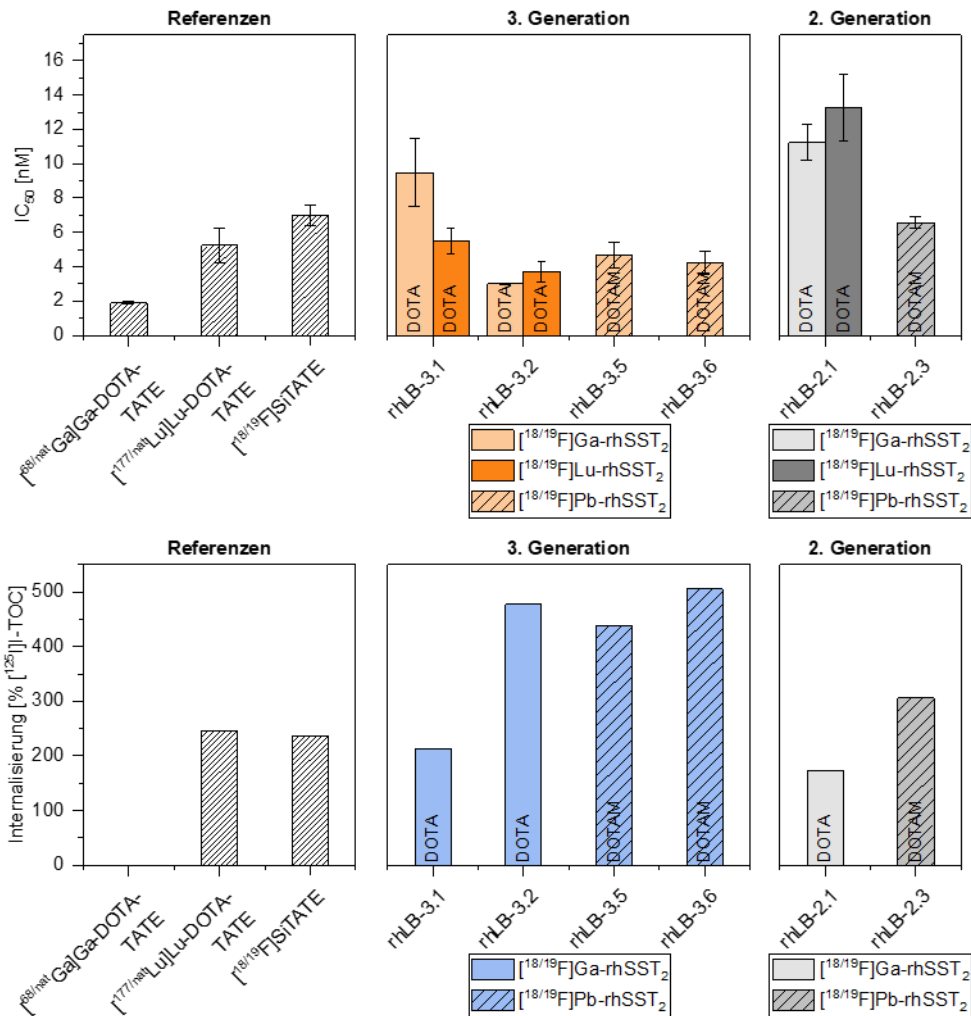


Abbildung 57: IC₅₀ und Internalisierung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Chelator. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

Die HSA-Bindungen der linkerbasierten Liganden der 3. Generation wurden mit der AMSEC und der HPAC Methode bestimmt (siehe Abbildung 58). In der 2. Generation zeigen die Ergebnisse der AMSEC und der HPAC Methoden unterschiedliche Trends (vgl. 4.3 *Linkerbasierte Liganden der 2. Generation*). Während in der AMSEC Methode das DOTAM Derivat [^{18/19}F]Pb-rhLB-2.3 einen niedrigeren Wert als das DOTA Derivat [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.1 aufweist, sind die Resultate der HPAC Methode umgekehrt. In der 3. Generation hingegen, zeigen alle DOTAM Derivate in beiden Methoden eine höhere HSA-Bindung als die analogen DOTA Derivate. Da eine Erhöhung der HSA-Bindung vor allem für Peptide mit zahlreichen Carboxylaten oder lipophilen Aromaten beschrieben wird, ist dies unerwartet.[211]

Besonders hervorzuheben ist die Entwicklung der HSA-Bindung beim Übergang von der 2. zur 3. Generation linkerbasierter Liganden. In der AMSEC Methodik zeigen [^{18/19}F]Ga-rhLB-2.1 und [^{18/19}F]Pb-rhLB-2.3 ein apparentes Molekulargewicht von 21.2 kDa und 20.2 kDa. Die DOTA und DOTAM Liganden der 3. Generation liefern hingegen Werte zwischen 7.77 kDa und 9.20 kDa. In dieser

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Methode wird erneut der starke Einfluss gezeigt, der durch die SiFAN⁺Gly-Einheit auf die HSA-Bindung ausgeübt wird.

Die Ergebnisse der HPAC Methode hingegen zeigen einen weit weniger signifikanten Unterschied zwischen Liganden der 2. und 3. Generation. rhLB-3.1 und rhLB-3.2 ergeben eine %-Bindung zwischen 89.9% und 91.1% und belegen damit eine geringere HSA-Bindung als für das DOTA Derivat der 2. Generation beobachtet ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$: %-Bindung = 94.0%; $[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-2.1}$: %-Bindung = 95.8%). Allerdings sind die Unterschiede in der %-Bindung an HSA eher gering. Die DOTAM-Liganden $[^{18/19}\text{F}]\text{Pb-rhLB-3.5}$ (97.1%) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Pb-rhLB-3.6}$ (98.9%) weisen sogar eine %-Bindung an HSA auf, die vergleichbar mit dem DOTAM Derivat der 2. Generation ist ($[^{18/19}\text{F}]\text{Pb-rhLB-2.3}$: %-Bindung = 98.2%).

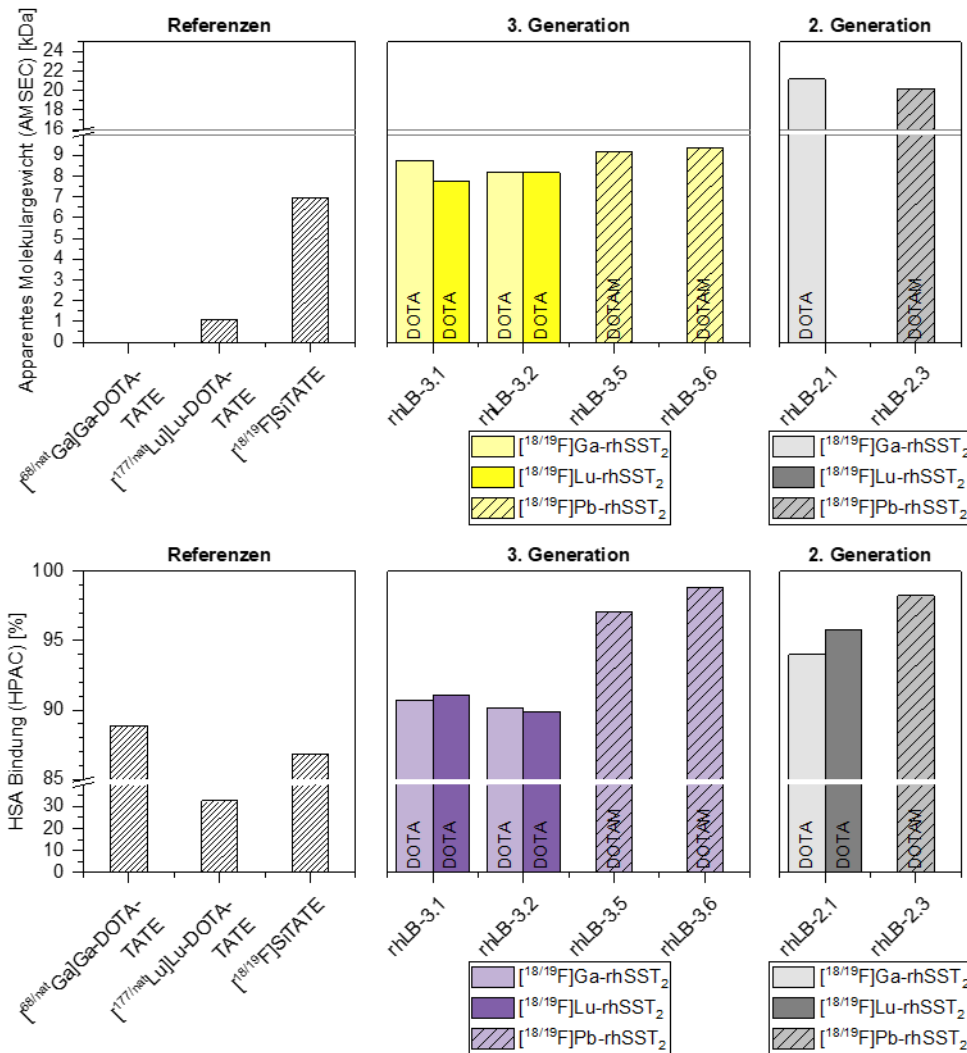


Abbildung 58: HSA-Bindung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC). Unten: HSA-Bindung in % (HPAC). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Chelator. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

Beide Methoden zur Bestimmung der HSA-Bindung liefern unterschiedliche Ergebnisse für dieselben Liganden. Die Ergebnisse der AMSEC Methode werden dabei jedoch als relevanter eingestuft. Dies

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

begründet sich im grundsätzlichen Aufbau der Methode. Während in der HPAC Methode das HSA als feste Phase vorliegt,[175, 176] wird zur Ermittlung des apparentes Molekulargewichts gelöstes HSA eingesetzt. Auf diese Weise wird die Zirkulation von HSA durch den Blutstrom nachgeahmt und es wird angenommen, dass das *in vivo* Verhalten realistischer abgebildet wird.

Die Hydrophilie wird in der 3. Generation durch die Verwendung von Pb-DOTAM anstatt Ga-/Lu-DOTA kaum beeinflusst (siehe Abbildung 59). Die Derivate mit einem Gly₂-Linker, [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.1, [^{18/19}F]Lu-rhLB-3.1 und [^{18/19}F]Pb-rhLB-3.5 zeigen vergleichbare LogD_{pH=7.4} Werte zwischen. Bei den Gly₃-Linker basierten Derivaten [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2, [^{18/19}F]Lu-rhLB-3.2 und [^{18/19}F]Pb-rhLB-3.6 zeigt das Ga-Derivat eine geringfügig höhere Hydrophilie.

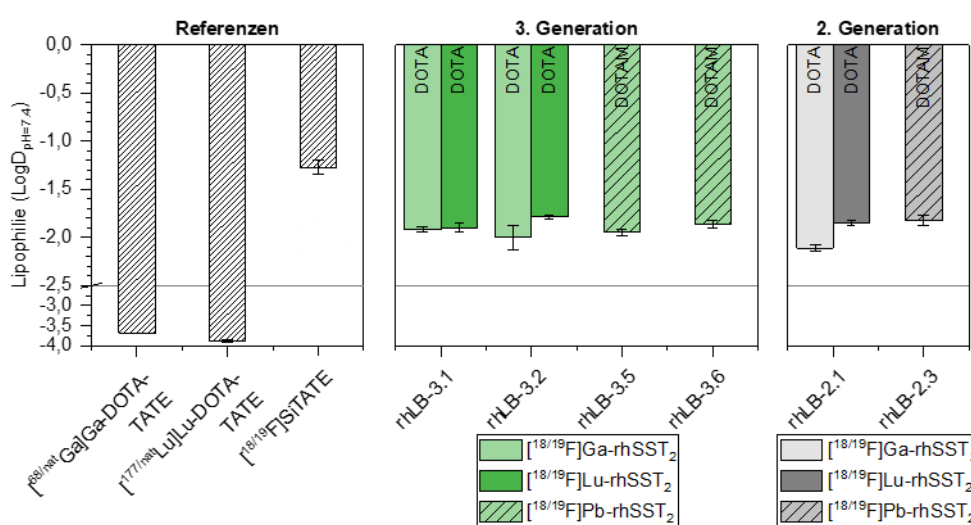


Abbildung 59: Lipophilie der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Chelator. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

Für die DOTAM-Derivate werden insgesamt höhere HSA-Bindungen als für die analogen DOTA-Derivate ermittelt. Die starke Affinitätssteigerung durch die Verwendung von DOTAM statt DOTA in der 2. Generation linkerbasierter Liganden, konnte in der 3. Generation nicht reproduziert werden. Die *in vitro* Daten stellten daher keine Verbesserung gegenüber der bisher vielversprechendsten Verbindung [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 dar.

4.4.5 Verlängerung des hydrophilen Modifiers und Orientierung der rh-Einheit

Sowohl in der 2. als auch der 3. Generation linkerbasierter Liganden wurde die SiFA-Einheit *N*-terminal mit dem Peptid verknüpft. Dies ging aus den Ergebnissen der 1. Generation nach *Fahnauer et al.* hervor. Dort resultierte aus der *N*-terminalen Verknüpfung eine höhere SST₂ Affinität, als für die Konjugation der SiFA-Einheit an der D-Dap-Seitenkette.[198] Um zu untersuchen, ob dies konzeptionell auch für hochaffine Liganden wie [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 zutreffend ist, wurde das strukturelle Analogon rhLB-3.7 entwickelt, welches DOTA *N*-terminal und die SiFA-Einheit an der D-Dap-Seitenkette trägt (Abbildung

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

60). Des Weiteren wurde untersucht, in welchem Ausmaß eine zusätzlich zur SiFA-Einheit benachbarte Aminosäure Einfluss, auf die *in vitro* Daten im Allgemeinen und die Affinität zu HSA im Besonderen, nimmt. Daher wurden sowohl in der Grundstruktur von rhLB-3.7, als auch in der von rhLB-3.2, zusätzliche Aminosäuren zwischen der trifunktionellen Einheit und dem hydrophilen Modifizier (D-Asp₂) eingebaut. Zum Einsatz kamen dabei D-Cit, D-Lys und D-Glu. Da es sich dabei um hydrophile Aminosäuren handelt,[196] werden diese Modifikationen als Verlängerung des hydrophilen Modifiers betrachtet. rhLB-3.8, rhLB-3.9 und rhLB-3.10 gehen strukturell aus rhLB-3.7 hervor und tragen als hydrophile Modifizier D-Lys-D-Asp₂, D-Cit-D-Asp₂ oder D-Glu-D-Asp₂. Basierend auf rhLB-3.2 wurden rhLB-3.11 und rhLB-3.12 mit D-Lys-D-Asp₂ und D-Cit-D-Asp₂ als hydrophilen Modifiern entwickelt (vgl. Abbildung 60).

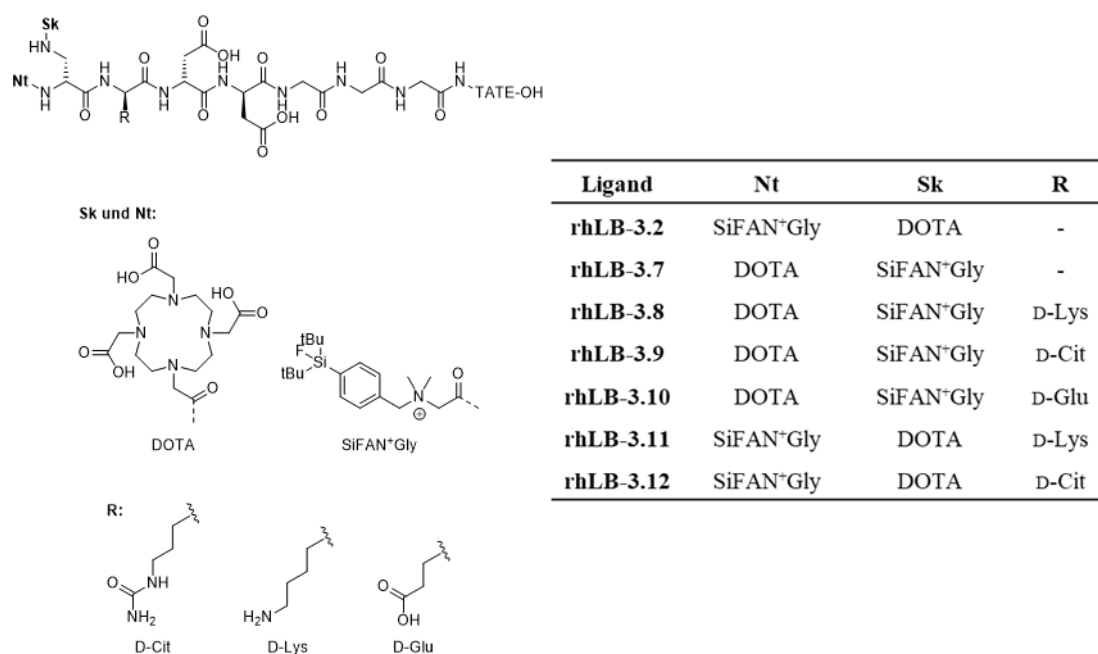


Abbildung 60: Strukturelemente der Liganden und tabellarische Auflistung der jeweils verwendeten Strukturelemente. **Ligand:** Bezeichnung des Liganden; **Nt:** N-terminale Modifikation; **Sk:** Modifikation der Seitenkette des D-Dap; **R:** gewählte Aminosäure für den verlängerten hydrophilen Modifizier.

4.4.5.1 *In vitro* Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie

Alle Liganden dieser Reihe wurden mit Ga³⁺ komplexiert und *in vitro* untersucht. Einige Liganden wurden zusätzlich als Lu-Komplex untersucht. Alle *in vitro* Daten sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Keines der untersuchten Derivate übertrifft die SST₂ Affinität von [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2. Die Verwendung von Lu³⁺ führt für die Derivate rhLB-3.7 – rhLB-3.10 zu einer höheren Affinität als die der entsprechenden Ga-Komplexe. In der Reihe der Liganden rhLB-3.2, rhLB-3.11 und rhLB-3.12 (SiFAN⁺Gly an der Nt-Position) wurden nur für rhLB-3.2 beide Metall-Komplexe untersucht. In diesem Fall liefert der Lu-Komplex jedoch eine geringere Affinität als der Ga-Komplex.

Die Verwendung von D-Lys-D-Asp₂ und D-Cit-D-Asp₂ führt, verglichen mit den D-Asp₂ Varianten rhLB-3.7 und rhLB-3.2, zu unterschiedlichen Ergebnissen, je nachdem an welcher Position die

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

SiFAN⁺Gly-Einheit verknüpft wird. Wird die SiFAN⁺Gly-Einheit *N*-terminal konjugiert, liefern die Derivate mit den hydrophilen Modifiern D-Lys-D-Asp₂ (rhLB-3.11) und D-Cit-D-Asp₂ (rhLB-3.12), eine geringere SST₂ Affinität als das analoge D-Asp₂ Derivat (rhLB-3.2). Wird die SiFAN⁺Gly-Einheit hingegen an der Seitenkette angebracht, wird ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Hier zeigen die Derivate mit den hydrophilen Modifiern D-Lys-D-Asp₂ (rhLB-3.8) und D-Cit-D-Asp₂ (rhLB-3.9), eine gesteigerte SST₂ Affinität, gegenüber dem analogen D-Asp₂ Derivat (rhLB-3.7).

Tabelle 20: Präklinische Daten von [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.2, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.7, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.8, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.9, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.10, [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.11 und [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.12. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.

Ligand	IC ₅₀ ± SD [nM]	LogD _{pH=7.4} ± SD	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW _{app} [kDa]	z
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18	-1
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.2	3.72 ± 0.61	-1.79 ± 0.02	–	89.9	8.17	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.7	5.45 ± 0.50	-2.06 ± 0.08	215	86.5	6.99	-1
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.7	3.86 ± 0.23	-1.98 ± 0.05	–	91.6	–	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.8	4.30 ± 0.06	-2.10 ± 0.04	575	93.9	7.76	0
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.8	3.37 ± 0.35	-2.10 ± 0.08	–	95.1	–	0
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.9	4.79 ± 0.84	-2.22 ± 0.03	306	84.9	6.81	-1
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.9	4.07 ± 0.52	-2.12 ± 0.05	–	89.2	–	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.10	7.58 ± 0.58	-2.30 ± 0.02	137	85.4	7.66	-2
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.10	5.13 ± 0.51	-2.29 ± 0.03	–	89.5	–	-2
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.11	4.74 ± 0.22	-2.25 ± 0.14	445	97.0	7.26	0
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.12	4.41 ± 0.81	-2.31 ± 0.04	754	89.0	6.15	-1
[^{18/19} F]SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
[^{nat/68} Ga]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	-3.69[57]	–	88.9	–	0
[^{nat/177} Lu]Lu-DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0

Gemäß dem Nettoladungskonzept weist das stark negativ geladene (z = -2) D-Glu-D-Asp₂ Derivat ([^{18/19}F]Ga-rhLB-3.10) die geringste SST₂-Affinität auf (vgl. Abbildung 61).[186, 193] Dennoch kann das Nettoladungskonzept nicht als Erklärungsgrundlage für den Verlauf der Affinitäten der hier besprochenen Derivate dienen. So kann anhand der vorliegenden Daten nicht ermittelt werden, ob sich der Einbau positiv oder neutral geladener Aminosäuren, zwischen der trifunktionellen Einheit und dem hydrophilen Modifier, vorteilhaft auf die Affinität der Liganden auswirkt. Wie schon bei der Chelator-Variation der 3. Generation linkerbasierter Liganden beobachtet, kann auch hier nur ein geringer und nicht systematischer Einfluss auf die Affinität zur Zielstruktur erreicht werden. *Niedermoser et al.* machten vergleichbare Beobachtungen für SST₂ Derivate. Eigentlich affinitätssteigernde, strukturelle

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Optimierungen an den von ihnen beschriebenen Derivaten, nahmen ab einem $IC_{50} < 2.5$ nM kaum noch Einfluss auf selbigen.[131] Keiner der in dieser Reihe vorgestellten Liganden kann den IC_{50} von [$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.2 (3.01 ± 0.03 nM) übertreffen.

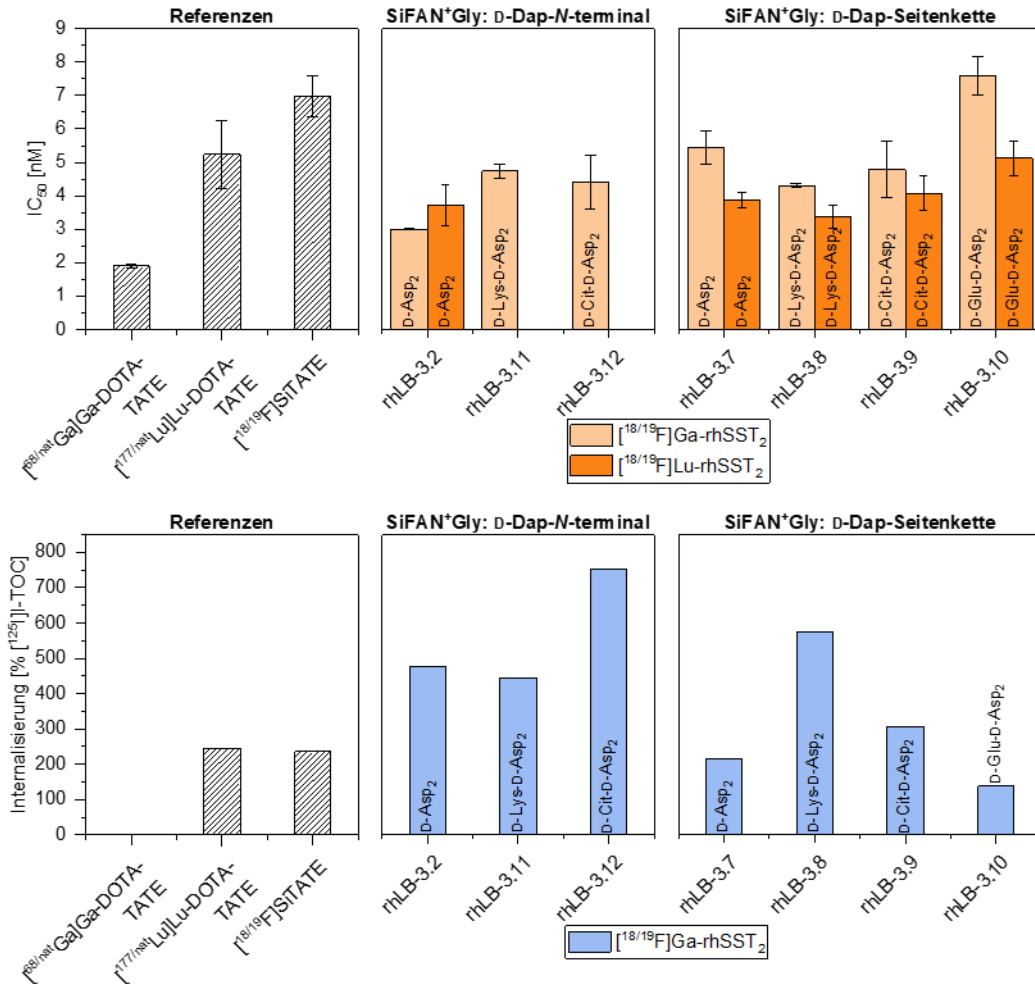


Abbildung 61: IC_{50} und Internalisierung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: [^{125}I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [^{125}I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger hydrophiler Modifier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der *N*-terminal verknüpften SiFAN⁺Gly Einheit. Rechts: Daten der über die Seitenkette verknüpften SiFAN⁺Gly Einheit.

Die Internalisierungsraten der Ga-Komplexe verhalten sich nur teilweise analog zur SST_2 Affinität (siehe Abbildung 61). In der Reihe der Derivate mit SiFAN⁺Gly-Seitenkettenverknüpfung ([$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.7/rhLB-3.8/rhLB-3.9/rhLB-3.10) zeigt das D-Lys-D-Asp₂ Derivat ([$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.8) die höchste Affinität ($IC_{50} = 4.30 \pm 0.06$ nM) und die höchste Internalisierungsrate (575% nach 60 min). Für die Liganden mit *N*-terminaler Verknüpfung kann kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Affinität und Internalisierungsrate festgestellt werden. Das D-Lys-D-Asp₂ Derivat [$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.11 ($IC_{50} = 4.74 \pm 0.22$ nM) und das D-Cit-D-Asp₂ Derivat [$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.12 ($IC_{50} = 4.41 \pm 0.81$ nM) zeigen nur geringe Unterschiede hinsichtlich der SST_2 Affinität. Die Internalisierungsraten nach 60 min, weichen hingegen mit 445% ([$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.11) und 754%

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

($^{18/19}\text{F}$)Ga-rhLB-3.12) stark voneinander ab. Auch in der Literatur wird nicht immer ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern beobachtet.[57]

Die HSA-Bindung der untersuchten Liganden zeigt ebenfalls keine klare Tendenz hinsichtlich einzelner Modifikationen. Die Reihe der Lu-Liganden wurde nur mittels der HPAC Methode vollständig evaluiert. Dabei zeichnet sich für die [$^{18/19}\text{F}$]Lu-Derivate eine Tendenz zur erhöhten HSA-Affinität gegenüber den [$^{18/19}\text{F}$]Ga-Liganden ab. Die D-Lys-D-Asp₂ Derivate zeigen in der HPAC Methode eine %-Bindung an HSA zwischen 93.9% und 97.0%. Das D-Glu-D-Asp₂ Derivat weist mit 85.4% ($^{18/19}\text{F}$)Ga-rhLB-3.10) bzw. 89.5% ($^{18/19}\text{F}$)Lu-rhLB-3.10), vergleichbare Werte zu den D-Asp₂ und D-Cit-D-Asp₂ Derivaten auf. Dies ist unerwartet, da HSA über spezifische Bindestellen für Carboxylate verfügt. Daher wäre durch das zusätzliche D-Glu eher eine gesteigerten HSA Affinität zu erwarten.[211]

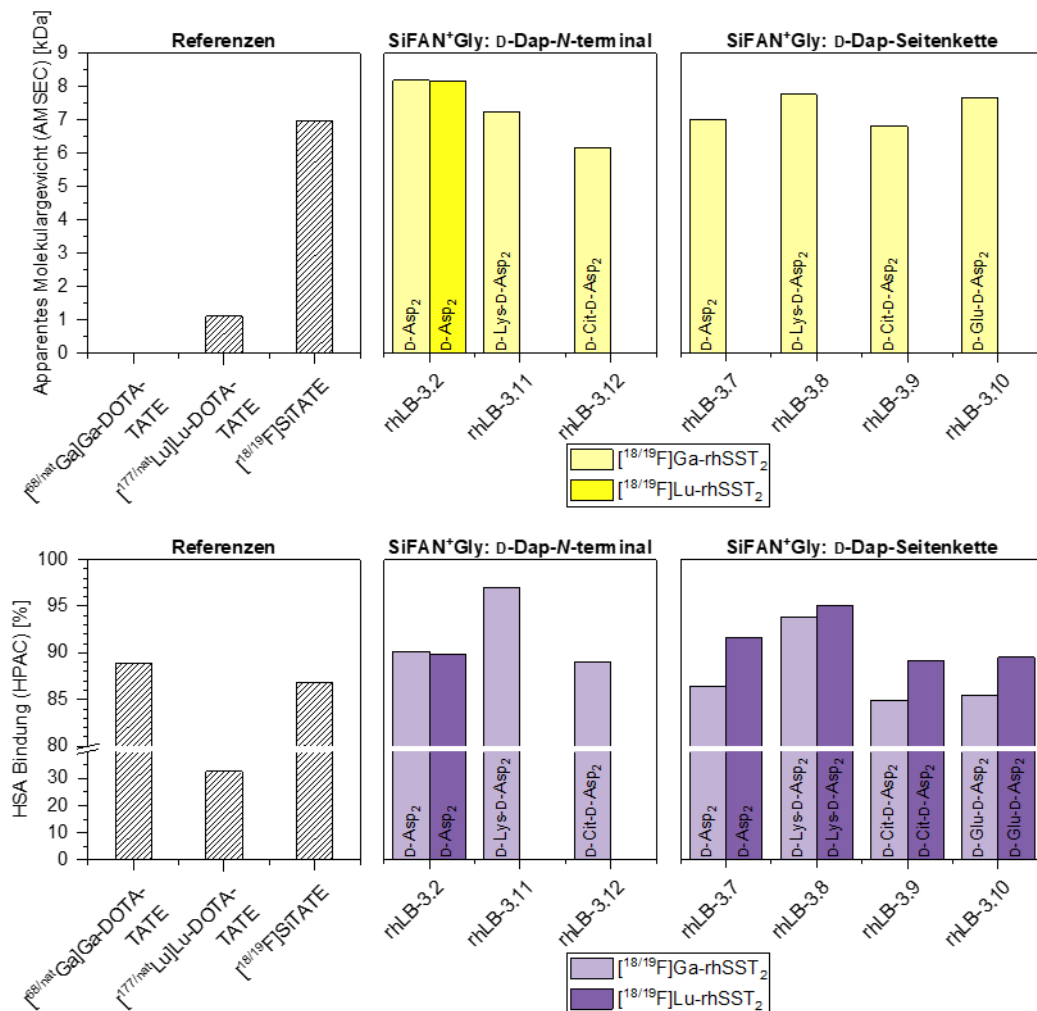


Abbildung 62: HSA-Bindung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC). Unten: HSA-Bindung in % (HPAC). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger hydrophiler Modifier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der N-terminal verknüpften SiFAN⁺Gly Einheit. Rechts: Daten der über die Seitenkette verknüpften SiFAN⁺Gly Einheit.

Die Unterschiede zwischen den Liganden sind in der AMSEC Methode weniger stark ausgeprägt und spiegeln die Tendenzen der HPAC Methode nur bedingt wieder (siehe Abbildung 62). Der lineare Bereich der HPAC Methode endet bei einem Wert von 94.8%, weshalb die Bewertung von hochaffinen

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

HSA-Bindern nur bedingt möglich war.[175, 176] Die AMSEC Methode wurde daher entwickelt, um vor allem Liganden besser bewerten zu können, die eine hohe Affinität zu HSA aufweisen.[174] Die Kalibriergerade der AMSEC Methode beginnt jedoch erst bei 6.5 kDa. Daher ist nicht auszuschließen, dass in der AMSEC Methode die niedrigen HSA-Affinitäten der 3. Generation nur unzureichend abgebildet wurden.

Der Einbau einer zusätzlichen Aminosäure in den hydrophilen Modifizier führte zu Liganden mit einer in geringem Ausmaß gesteigerten Hydrophilie. Unabhängig von der Position der SiFAN⁺Gly Einheit im Peptid verbesserte sich der LogD_{pH=7.4} in der Reihe D-Asp₂, D-Lys-D-Asp₂, D-Cit-D-Asp₂ und D-Glu-D-Asp₂ kontinuierlich, wenn auch insgesamt gering (vgl. Abbildung 63).[196]

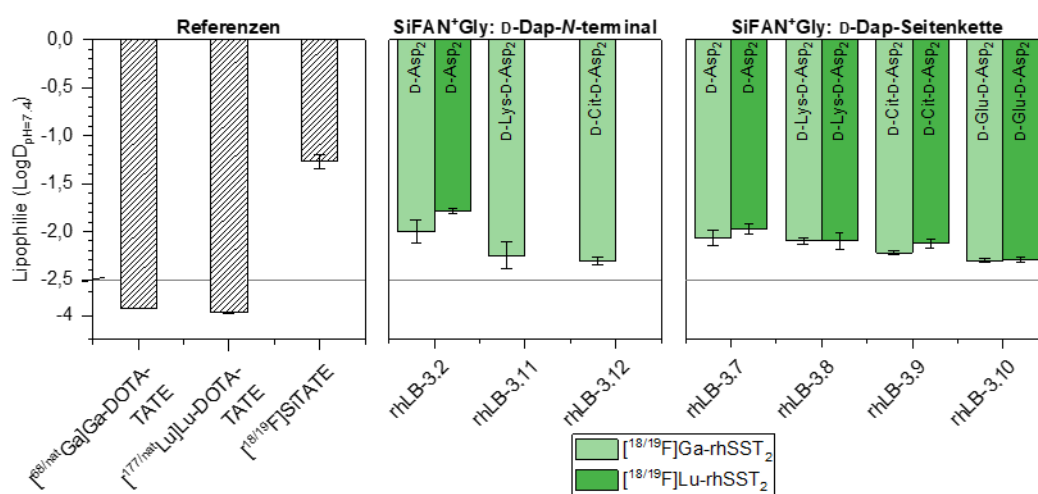


Abbildung 63: Lipophilie der Variation des hydrophilen Modifizier von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger hydrophiler Modifizier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der N-terminal verknüpften SiFAN⁺Gly Einheit. Rechts: Daten der über die Seitenkette verknüpften SiFAN⁺Gly Einheit.

4.4.5.2 In vivo Biodistribution

[¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 wurden für eine Biodistributionsstudie an AR42J-Tumor tragenden Mäusen ausgewählt. Die Daten der Biodistributionen 1 h p.i., sind in Abbildung 64 vergleichend zu [¹⁸F]SiTATE und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 dargestellt. Die Ergebnisse des μ PET/CT Imagings sind in Abbildung 95 im Anhang hinterlegt.

Mit einer Tumorakkumulation von 31.6 ± 4.96 %ID/g, weist [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 einen zu [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (31.8 ± 2.49 %ID/g) vergleichbaren und damit einen höheren Wert als [¹⁸F]SiTATE (22.7 ± 2.68 %ID/g) auf. Da IC₅₀, LogD_{pH=7.4} und Internalisierungsrate von [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.8 mit den Werten von [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 vergleichbar sind, bestätigt dieses Ergebnis den positiven Einfluss einer niedrigen HSA-Bindung auf die Tumoranreicherung.

[¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 weist eine deutlich niedrigere Anreicherung im Tumor auf (23.4 ± 1.07 %ID/g). Dies lässt sich, trotz der hohen Affinität zu SST₂, auf die geringere Internalisierungsrate verglichen mit [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 zurückführen.[172] Zu erwarten wäre jedoch auch eine geringere Anreicherung von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 in SST₂ exprimierenden Organen. Allerdings weisen

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

[¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 vergleichbare Akkumulationen in Pankreas ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 = 11.1 ± 2.61 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 = 11.8 ± 1.36 %ID/g), Magen ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 = 6.51 ± 1.64 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 = 7.50 ± 0.13 %ID/g) und Nebennieren ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 = 1.71 ± 0.38 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 = 1.54 ± 0.28 %ID/g) auf, die wiederum geringer sind als für [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (Pankreas = 17.3 ± 2.87 %ID/g; Magen = 9.54 ± 1.83 %ID/g; Nebennieren = 2.39 ± 0.53 %ID/g).

Die Anreicherung im Blut unterscheidet sich zwischen den drei linkerbasierten Liganden nur wenig ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 = 0.53 ± 0.23 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 = 0.57 ± 0.24 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 = 0.50 ± 0.21 %ID/g). Aber durch den Vergleich mit [¹⁸F]SiTATE (Blut = 0.81 ± 0.11 %ID/g) wird deutlich, dass die Retention dieser neuen rhSST₂ Liganden im Blut, durch die höhere Hydrophilie gesenkt wird.[143]

Für [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 wurde mittels der HPAC Methode eine vergleichsweise hohe Affinität zu HSA ermittelt (%-Bindung = 93.9%), während das apparente Molekulargewicht ähnlich niedrig ist (MW_{app} = 7.76 kDa), wie das der anderen hier vorgestellten Derivate. In der Leber zeigt [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 (1.28 ± 0.11 %ID/g) eine zu [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (1.22 ± 0.18 %ID/g) vergleichbare Akkumulation. Im Darm weist [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 sogar eine niedrigere Anreicherung ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 = 1.27 ± 0.13 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 = 1.84 ± 0.45 %ID/g). Dies impliziert, dass der erhöhte Wert der HPAC Methode nicht das *in vivo* Verhalten von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 beschreibt.

[¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 weist zwar eine geringere Leberakkumulation auf (0.83 ± 0.14 %ID/g), jedoch ist das Tumor/Leber Verhältnis durch die geringere Anreicherung im Tumor kaum höher (Tumor/Leber = 28.2) als das von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (Tumor/Leber = 26.1) und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 (Tumor/Leber = 24.7).

Hinsichtlich der Tumor/Organ Verhältnisse sind [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 weitestgehend miteinander vergleichbar. Das Tumor/Darm Verhältnis ist für [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 (24.9) höher als für [¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 (16.3) und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (17.3). Allerdings weist [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 mit 72.7 ± 7.68 %ID/g eine höhere Nierenakkumulation auf ([¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 = 12.6 ± 1.58 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 = 12.3 ± 3.40 %ID/g), die sich wiederum in einem geringeren Tumor/Niere Verhältnis widerspiegelt. Das primäre Amin des zusätzlichen Lysins im Linker von [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 wird hierfür als Ursache ermittelt, da auch für DTPA-Octreotid Derivate ein vergleichbarer Effekt beobachtet wurde.[200, 201] [¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 weist aufgrund der niedrigen Tumoranreicherung insgesamt niedrigere Tumor/Organ Verhältnisse auf als [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 (Abbildung 64). Im Vergleich zu [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 kann jedoch keiner der neuen Liganden vollständig überzeugen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

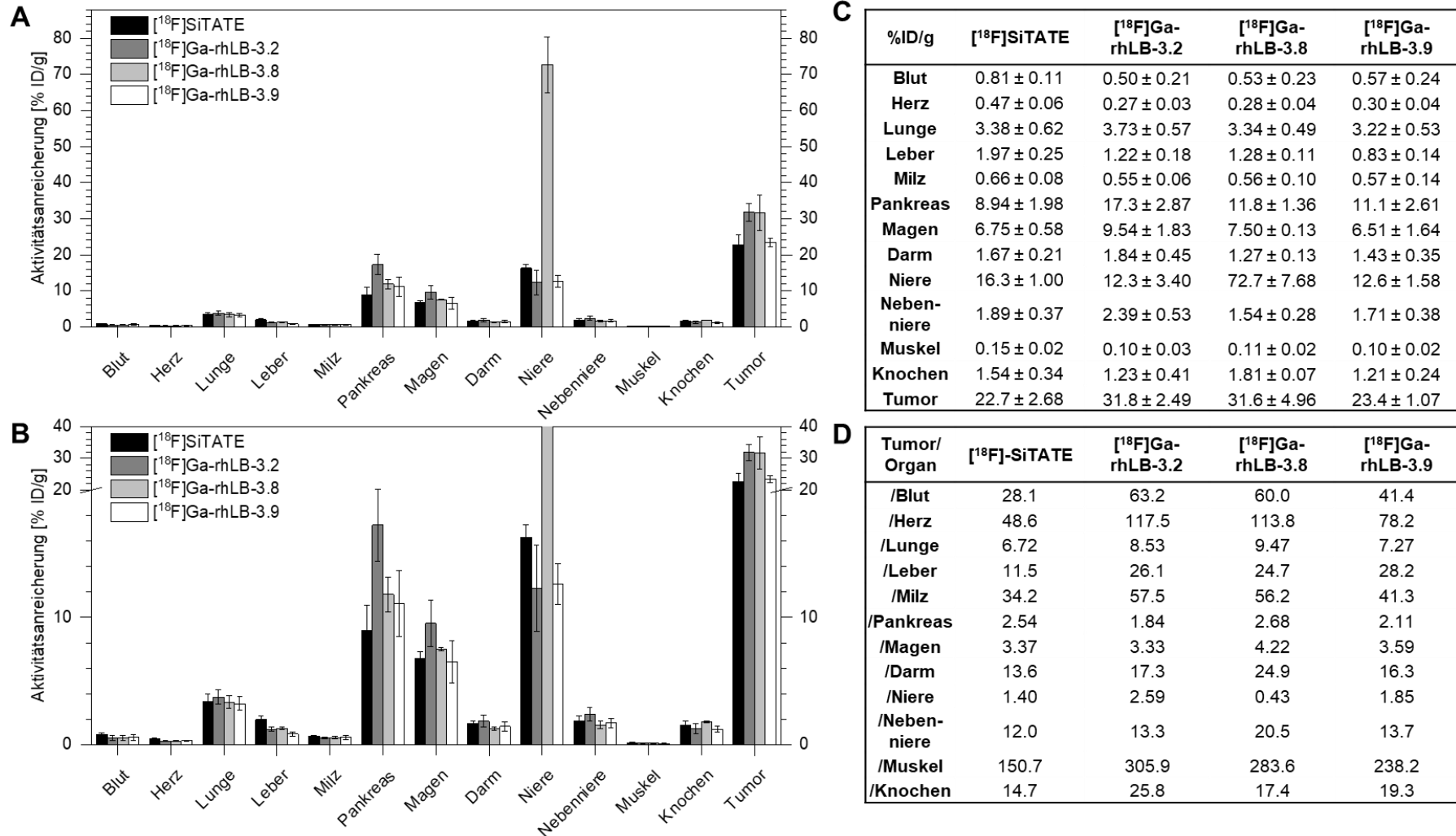


Abbildung 64: Biodistribution von [¹⁸F]SiTATE (n = 5), [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (n = 4), [¹⁸F]Ga-rhLB-3.8 (n = 4) und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.9 (n = 4) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). **A:** Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 90 %ID/g). **B:** Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 40 %ID/g). **C:** Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). **D:** Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.4.6 Variation des hydrophilen Modifiers

Bereits in der 2. Generation linkerbasierter Liganden wurde der hydrophile D-Asp₂ Modifier durch positiv und neutral geladene Aminosäuren ersetzt. In Einklang mit dem Nettoladungskonzept wurde dabei beobachtet, dass die Affinität der Liganden durch die Verwendung von D-Orn und D-Asn gesteigert wird. Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass das Nettoladungskonzept bei hochaffinen Liganden wie [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2, nur noch bedingt Einfluss auf die Affinität eines Liganden nimmt (vgl. 4.4.5 *Verlängerung des hydrophilen Modifiers und Orientierung der rh-Einheit*). Um dies näher zu beleuchten, wurden auch in der 3. Generation linkerbasierter Liganden, Derivate mit einem hydrophilen Modifier bestehend aus D-Orn₂ (rhLB-3.13) und D-Asn₂ (rhLB-3.14) hergestellt (Abbildung 65). Die Grundstruktur basiert auf rhLB-3.2, welches den hydrophilen D-Asp₂ Modifier trägt.

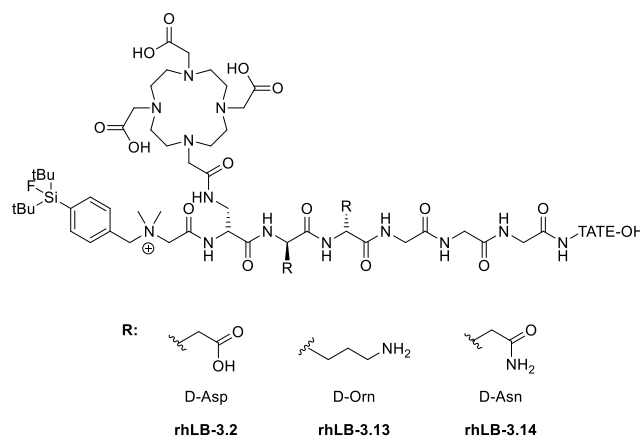


Abbildung 65: Strukturen der Liganden rhLB-3.2, rhLB-3.13 und rhLB-3.14.

Alle Liganden wurden mit Ga³⁺ komplexiert und *in vitro* bewertet. Die Daten sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Präklinische Daten von [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2, [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.13, [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.14. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.

Ligand	IC ₅₀ ± SD [nM]	LogD _{pH=7.4} ± SD	Internalisierung %	Affinität zu HSA %	MW _{app} [kDa]	z
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.13	4.10 ± 0.54	-1.69 ± 0.04	790	>99	13.7	+3
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.14	4.00 ± 0.34	-1.51 ± 0.03	601	98.8	6.81	+1
[^{18/19} F]SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
[^{nat/68} Ga]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	-3.69[57]	–	88.9	–	0
[^{nat/177} Lu]Lu-DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die deutliche Affinitätssteigerung durch Variation des hydrophilen Modifiers in der 2. Generation linkerbasierter Liganden, konnte in der 3. Generation nicht reproduziert werden (vgl. Abbildung 66). $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.13}$ (D-Orn_2) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.14}$ (D-Asn_2) ergeben SST_2 -Affinitäten von $\text{IC}_{50} = 4.10 \pm 0.54 \text{ nM}$ und $4.00 \pm 0.34 \text{ nM}$. Beide Liganden weisen damit eine geringere Affinität zur Zielstruktur auf als $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ ($3.01 \pm 0.03 \text{ nM}$). Dies widerspricht dem Nettoladungskonzept, demzufolge $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.13}$ ($z = +3$) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.14}$ ($z = +1$) eine höhere Affinität zu SST_2 aufweisen sollten als $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ ($z = -1$). Auch hier zeigt sich, dass das Nettoladungskonzept für Liganden von ohnehin hoher Affinität kaum noch Einfluss nehmen kann.

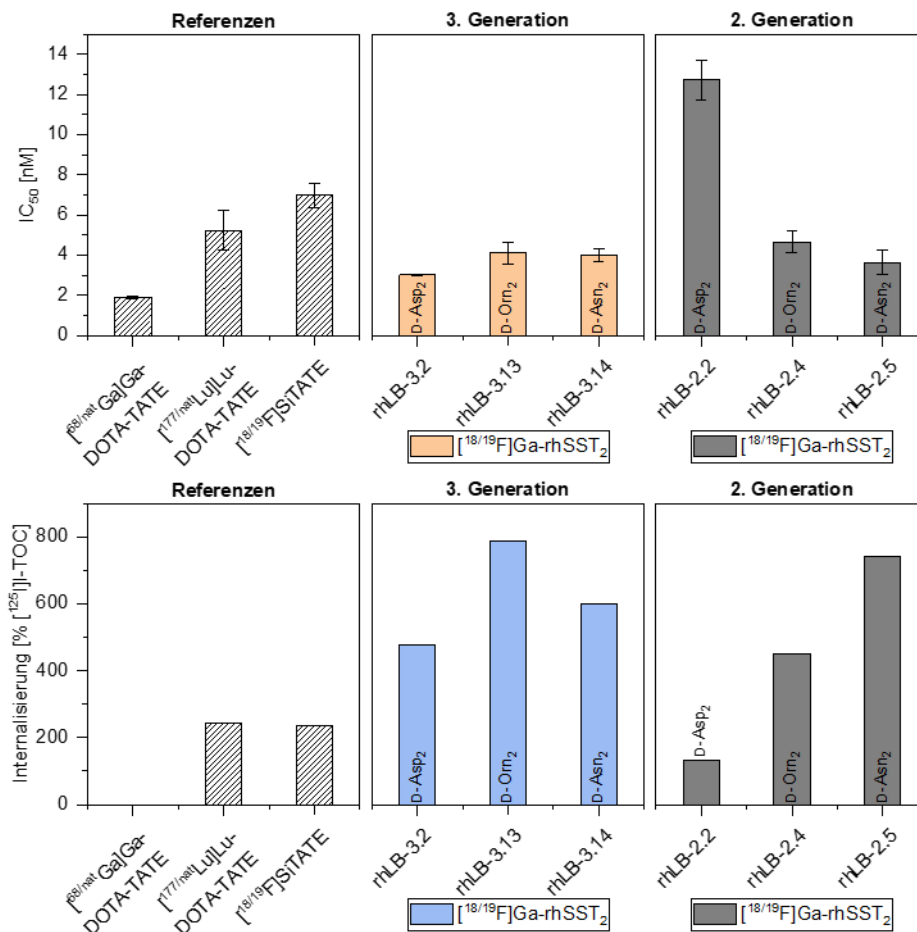


Abbildung 66: IC_{50} und Internalisierung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{-TOC}$ in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: hydrophiler Modifier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

Die Internalisierungsraten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.13}$ (D-Orn_2) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.14}$ (D-Asn_2) zeigen deutliche Unterschiede zu $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$, die nicht auf die Affinität zur Zielstruktur zurückgeführt werden können. Trotz der geringeren Affinität zu SST_2 , internalisieren beide Derivate stärker als $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, besteht jedoch zwischen Affinität und Internalisierungsrate nicht immer ein direkter Zusammenhang.[57]

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Reihe D-Asp, D-Orn und D-Asn nimmt die Hydrophilie deutlich ab (siehe Abbildung 67). Mit $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -1.51 \pm 0.03$, liefert $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.14}$ nur eine moderate Hydrophilie, was sich auf die Amid-Seitenketten zurückführen lässt.[196] Diese Beobachtungen decken sich mit den Daten der 2. Generation linkerbasierter Liganden.

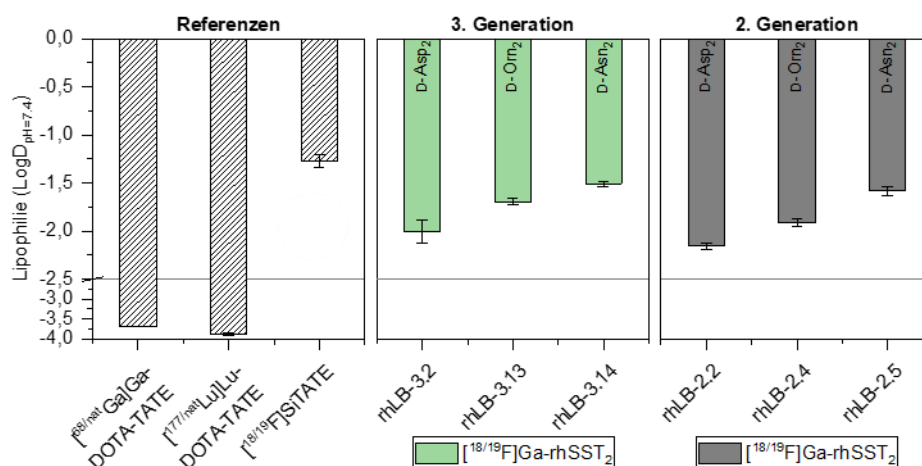


Abbildung 67: Lipophilie der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$). Beschriftung der einzelnen Balken: hydrophiler Modifier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

In der AMSEC Methode zeigt sich beim Übergang von der 2. zur 3. Generation der linkerbasierten Liganden mit variiertem, hydrophilen Modifer eine deutliche Abnahme der HSA-Affinitäten (vgl. Abbildung 68). Das D-Asn₂ Derivat $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.14}$ weist mit 6.81 kDa ein niedrigeres MW_{app} auf als das D-Asp₂ Derivat $[^{18/19}\text{F}]\text{rhLB-3.2}$ mit 8.18 kDa. Auch für Liganden der 2. Generation führte die Verwendung von Amidem im hydrophilen Modifer zu einer Senkung der HSA-Bindung in der AMSEC Methode (vgl. $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$). In der HPAC Methode hingegen zeigt $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.14}$ (98.8%) verglichen mit $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ (90.2%) eine deutlich erhöhte Affinität zu HSA. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten der Liganden, die einer Chelator Variation unterzogen wurden. Die Verwendung des Amid-basierten DOTAM Chelators führte dort ebenfalls zu Diskrepanzen zwischen beiden Methoden (vgl. 4.4.4 *Variation des Chelators*).

Während das Verhalten des D-Asn₂ Modifiers in beiden Generationen vergleichbar ist, führt die Verwendung von D-Orn₂ zu verschiedenen Tendenzen. Mit $\text{MW}_{\text{app}} = 13.7$ kDa weist $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.13}$ verglichen mit $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ einen deutlich erhöhten Wert auf. Dies weicht von den Daten der 2. Generation linkerbasierter Liganden ab, in der die Verwendung von D-Orn anstelle von D-Asp zu einer Verringerung der HSA-Bindung führte (vgl. $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.4}$). In der HPAC Methode kann die HSA-Bindung von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.13}$ nicht eindeutig bestimmt werden, da der Ligand nicht von der Säule eluiert wurde. Das Experiment wurde für dieses Derivat abgebrochen und eine HSA-Bindung von >99% angenommen. Auch in der 2. Generation linkerbasierter Liganden wurde für das D-Orn Derivat ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.4}$) ein erhöhter Wert

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

verglichen mit dem D-Asp Liganden ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.2}$) beobachtet. Eine gesteigerte Affinität zu HSA durch Lys und Asn steht allerdings im Kontrast zur Literatur.[211]

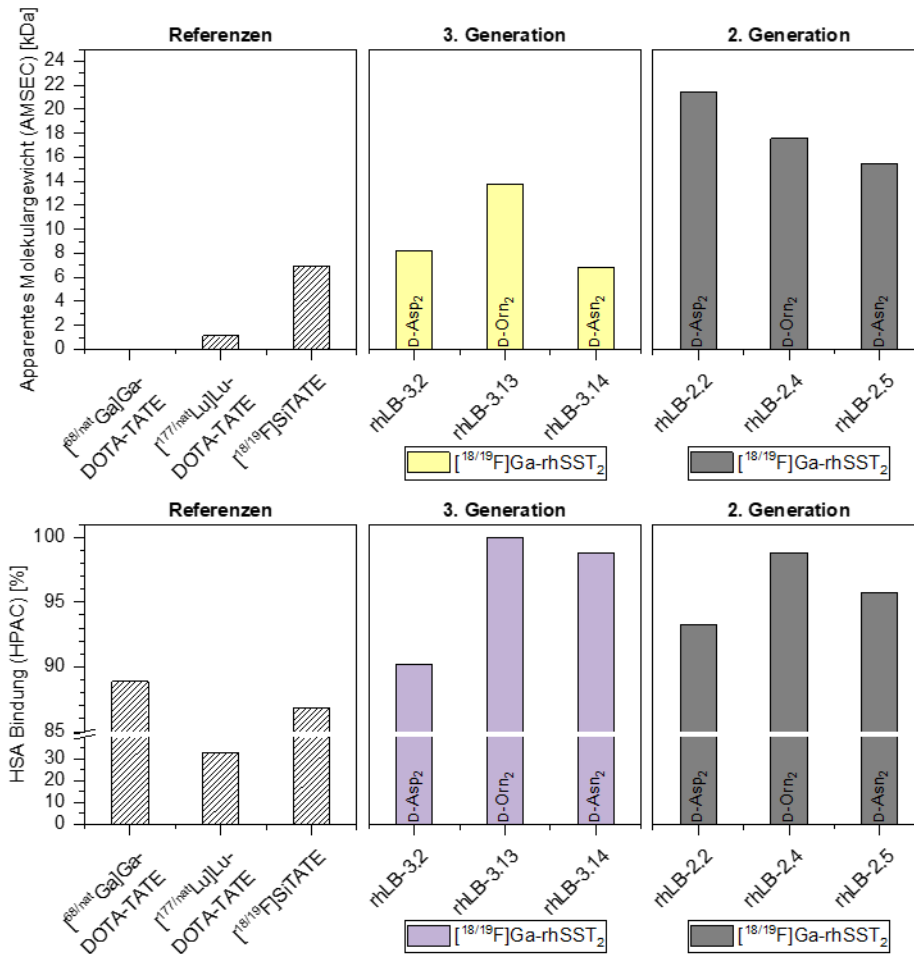


Abbildung 68: HSA-Bindung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: HSA-Bindung in % (HPAC). Unten: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC). Beschriftung der einzelnen Balken: hydrophiler Modifier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.

Je nach Messmethode, sorgt der Einbau von primären Aminen und Amiden zu einer Erhöhung oder Senkung der HSA-Bindung. Eine Einordnung dieser Derivate in den bisherigen Verlauf der HSA-Bindungsdaten ist daher nicht möglich. Es muss an dieser Stelle angenommen werden, dass je nach Methode andere Strukturelemente Einfluss auf das Ergebnis nehmen. Um entscheiden zu können welche Methode das *in vivo* Verhalten genauer vorhersagen kann, wären umfangreiche Biodistributionsstudien erforderlich. Da jedoch der $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ für beide hier untersuchten Liganden ungeeignet ist und die Affinität zu SST_2 ebenfalls keine Verbesserung gegenüber bereits *in vivo* untersuchten Liganden darstellt, wurde von diesem Vorhaben abgesehen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.4.7 Variation des Bindemotivs

In 2. SST₂ Bindemotive und analoge DOTA-Derivate wurden bereits diverse SST₂ Bindemotive und deren DOTA-Derivate *in vitro* untersucht. Die bisher vorgestellten Liganden tragen das agonistische Bindemotiv TATE, da dieses hinsichtlich der Affinität zu SST₂, der Internalisierungsrate und der Hydrophilie am vielversprechendsten ist. Die Verwendung eines Agonisten führt zu Liganden, die nach der Bindung an die Zielstruktur in die Zelle internalisieren. Allerdings sind diese Liganden nur in der Lage an aktive Rezeptoren zu binden. Antagonistische Bindemotive wie JR11 werden nicht internalisiert, sind aber dazu fähig an aktive und an inaktive Rezeptoren zu binden. Daher steht ihnen eine größere Zahl an Bindestellen zur Verfügung, wodurch die Anreicherung an der Zielstruktur gesteigert werden kann, selbst bei einer geringeren Affinität zur Zielstruktur.[60, 61] Auf Basis vielversprechender Literaturdaten antagonistischer Somatostatin Liganden im Allgemeinen und JR11-basierter Derivate im Besonderen, wurde rhLB-3.15 entwickelt (vgl. Abbildung 69).[56, 189, 192, 213] rhLB-3.15 ist strukturell verwandt zur bisherigen Lead-Compound rhLB-3.2 und wurde mit JR11 als Bindemotiv, Gly₃ als Linker, D-Asp₂ als hydrophilem Modifer und DOTA als Chelator versehen.

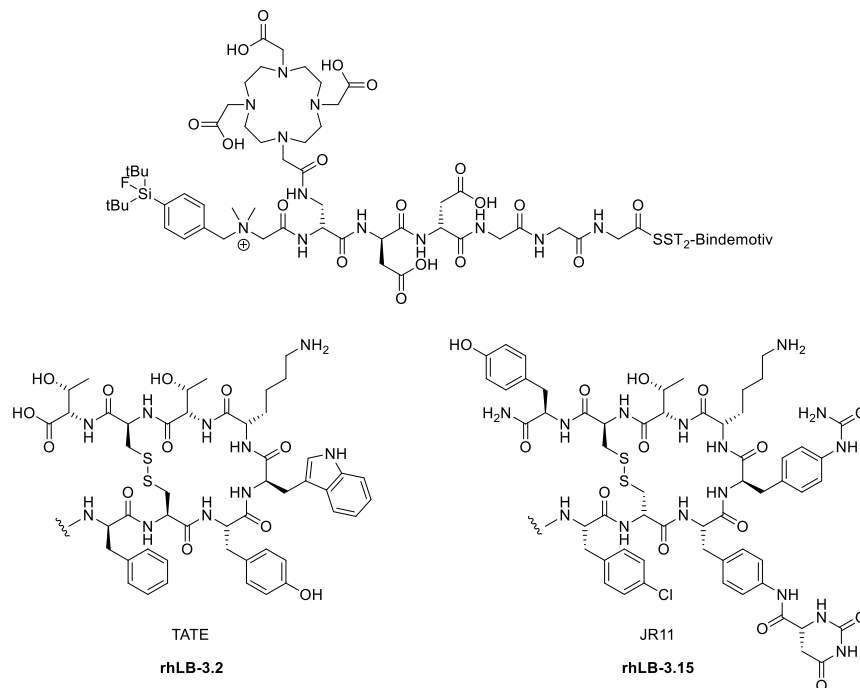


Abbildung 69: Strukturen der Liganden rhLB-3.2 und rhLB-3.15.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.4.7.1 *In vitro* Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie

rhLB-3.15 wurde mit Ga^{3+} komplexiert und *in vitro* untersucht. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 22: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.2 und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.15. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I}$ -TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I}$ -TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z .

Ligand	$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ [nM]	$\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ $\pm \text{SD}$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18	-1
$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.15	23.7 ± 1.50	-2.14 ± 0.03	132	96.4	4.36	0
$[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
$[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	–	88.9	–	0
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0
$[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-JR11	23.5 ± 3.76	–	–	86.7	–	+1
$[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-JR11	13.8 ± 1.65	-3.38 ± 0.07	379	87.9	0.22	+1

$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.15 weist mit $\text{IC}_{50} = 23.7 \pm 1.50$ nM eine geringere Affinität zur Zielstruktur auf als das analoge TATE Derivat $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.2 ($\text{IC}_{50} = 3.01 \pm 0.03$ nM). Auch im Vergleich zu den Referenz-Verbindungen DOTA-TATE und DOTA-JR11 zeigt $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.15 eine geringere Affinität. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beschreibungen in der Literatur.[56] Wie erwartet wurde durch die antagonistischen Eigenschaften des neuen Liganden die Internalisierungsrate von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ rhLB-3.15 herabgesetzt. Auf die Hydrophilie nahm die Wahl des Bindemotivs keinen nennenswerten Einfluss.

In der HPAC-Methode weist $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.15 mit 96.4% eine höhere %-Bindung an HSA auf als $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.2 mit 90.2%. Im Gegensatz dazu liefert das JR11 Derivat in der AMSEC Methode einen 50% niedrigeren Wert von nur 4.36 kDa, verglichen mit 8.18 kDa für $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -rhLB-3.2. Dieser Effekt wird nicht in gleicher Weise für die Referenzverbindungen beobachtet. $[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-TATE und $[^{\text{nat}/68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-JR11 weisen mit einer %-Bindung in der HPAC Methode von 88.9% und 86.7% keinen signifikanten Unterschied auf. Im Gegensatz dazu zeigt $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-TATE mit nur 32.6% einen sehr niedrigen Wert, während $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-JR11 mit 87.9% einen mit den Gallium-Komplexen vergleichbaren Wert liefert. Mit der AMSEC Methode wurden nur die Lutetium-Varianten der Referenzen untersucht. Diese verhalten sich analog zu den rhSST₂-Liganden und $[^{\text{nat}/177}\text{Lu}]\text{Lu}$ -DOTA-TATE weist mit 1.12 kDa einen höheren Wert auf als das JR11 Analogon mit nur 0.22 kDa.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da sich die TATE und JR11 basierten Referenzen nur in der AMSEC Methode wie die hier untersuchten rh-Liganden verhalten, lassen sich die Unterschiede von [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLB-3.2 und [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLB-3.15 in den HSA-Methoden nicht eindeutig auf die Wahl der Bindemotive zurückführen. Die HSA-Bindung kann nicht abschließend bewertet werden, da die Ergebnisse je nach Methode sehr stark voneinander abweichen. Eventuell kann hier eine Biodistributionsstudie eine bessere Einordnung ermöglichen.

4.4.7.2 *In vivo* Biodistribution

[^{18}F]Ga-rhLB-3.15 wurde für eine Biodistributionsstudie an AR42J-Tumor tragenden Mäusen ausgewählt. Die Daten der Biodistribution 1 h p.i., sind in Abbildung 70 vergleichend zu [^{18}F]SiTATE und [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 dargestellt. Die Ergebnisse des $\mu\text{PET/CT}$ Imagings sind in Abbildung 96 im Anhang hinterlegt.

Die Tumorakkumulation (19.7 ± 5.16 %ID/g) ist vergleichbar zu [^{18}F]SiTATE (22.7 ± 2.68 %ID/g). Dies wird auf die antagonistischen Eigenschaften von [^{18}F]Ga-rhLB-3.15 zurückgeführt, aufgrund derer die geringere Affinität zur Zielstruktur teilweise kompensiert und dennoch eine vergleichbare Tumorakkumulation erreicht wird. Die Anreicherung im Tumor ist jedoch deutlich niedriger als für [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 (31.8 ± 2.49 %ID/g). Auch diese Beobachtung wird auf die Unterschiede in der SST₂ Affinität zurückgeführt. [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 zeigt eine nochmals höhere Affinität als [^{18}F]SiTATE, die durch das antagonistische Bindemotiv von [^{18}F]Ga-rhLB-3.15 nicht kompensiert werden kann. Auch die Anreicherungen von [^{18}F]Ga-rhLB-3.15 in anderen SST₂ exprimierenden Gewebestrukturen (z.B. Pankreas, Nebennieren) sind vergleichbar zu [^{18}F]SiTATE aber geringer als für [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 beobachtet.

Besonders hervorzuheben ist die Akkumulation in der Leber ([^{18}F]Ga-rhLB-3.15: 4.05 ± 1.13 %ID/g). Diese ist sowohl für [^{18}F]SiTATE (1.97 ± 0.25 %ID/g) als auch [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 (1.22 ± 0.18 %ID/g) deutlich geringer. Da die Lipophilie von [^{18}F]Ga-rhLB-3.15 ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.14 \pm 0.03$) ausreichend niedrig ist, ist die Bindung an HSA vermutlich die Ursache für diese Beobachtung. Wie bereits erörtert weist [^{18}F]Ga-rhLB-3.15 in der AMSEC eine geringe HSA Affinität auf ($\text{MW}_{\text{app}} = 4.36$ kDa), während die %-Bindung in der HPAC Methode (96.4%) als hoch zu bewerten ist. Letzteres Ergebnis bildet das *in vivo* Verhalten des Liganden korrekt ab, da eine starke Bindung an HSA, zu einer Ausscheidung über die Leber führt. Weshalb die AMSEC Methode zur Bestimmung der HSA Bindung in diesem Fall ein stark abweichendes Resultat liefert, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Biodistribution war insbesondere aufgrund der Leberakkumulation nicht vielversprechend, weshalb die JR11-basierten Liganden nicht weiterverfolgt wurden.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

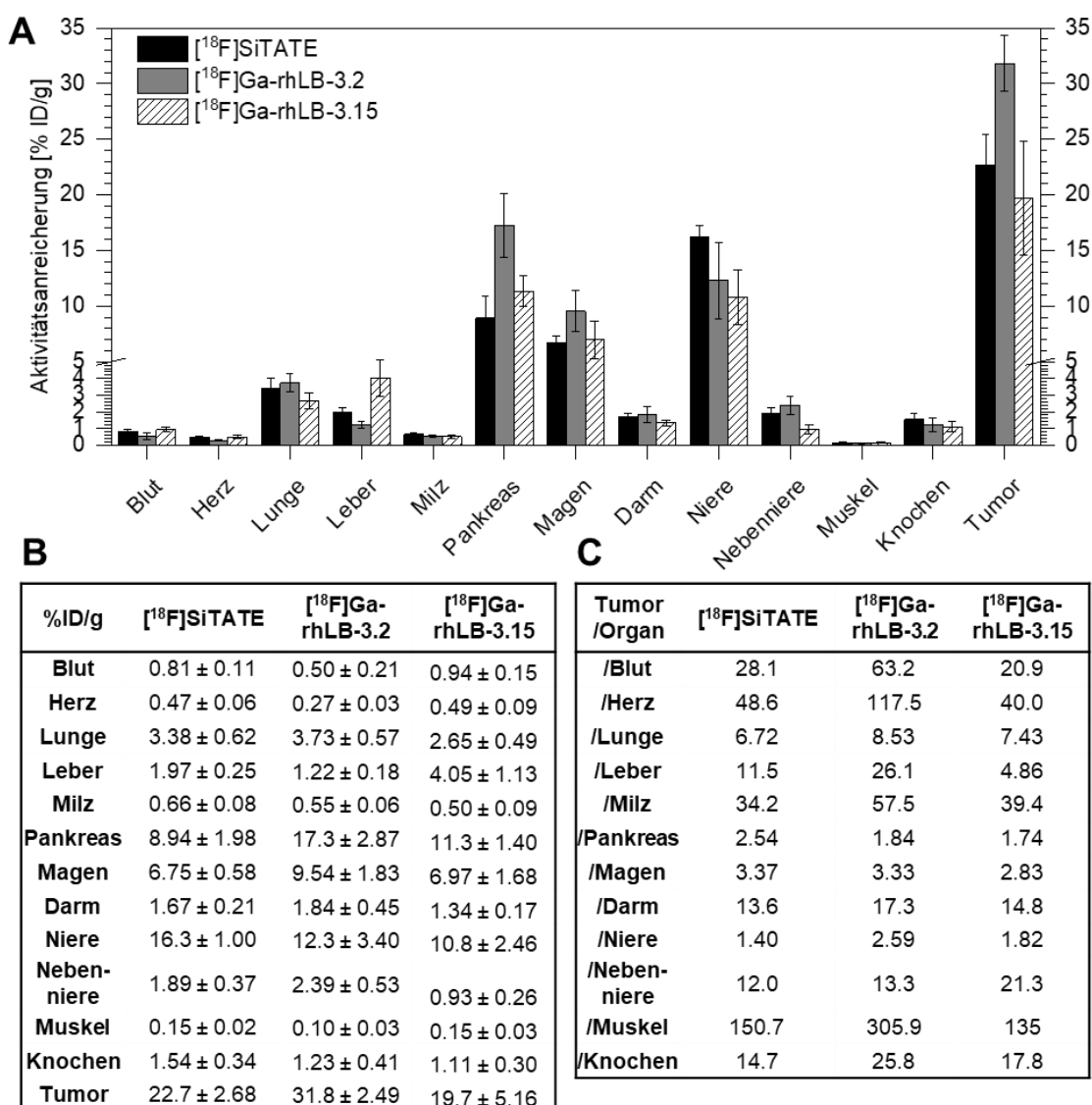


Abbildung 70: Biodistribution von [¹⁸F]SiTATE (n = 5), [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 (n = 4) und [¹⁸F]Ga-rhLB-3.15 (n = 5) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). **A:** Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 35 %ID/g). **B:** Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). **C:** Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.

4.5 Linkerbasierte Liganden der 4. Generation

4.5.1 Entwicklungskonzept

HSA verfügt über verschiedene Bindetaschen in die vor allem Carboxylate und aromatische Strukturen von Peptidliganden binden können.[214] Die Daten der bisher vorgestellten Liganden zeigen, dass das in ihnen enthaltene aromatische SiFA-Motiv vordergründig für ihre HSA Affinität verantwortlich ist.[151] Es wird daher angenommen, dass SiFA in der aromatischen Bindetasche des HSA gebunden

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

wird. Dabei könnte es unter anderem zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl der zum SiFA benachbarten Amidbindung und Y₄₁₁ kommen (vgl. Abbildung 71).[211]

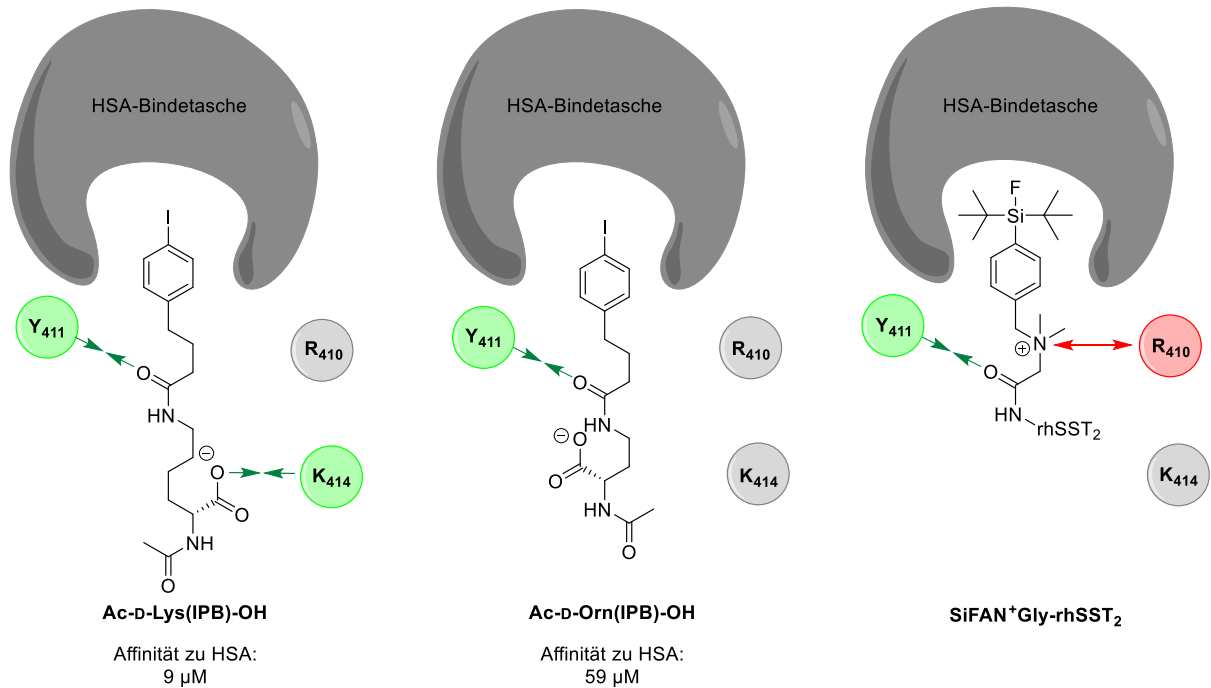


Abbildung 71: Postulierte Bindung verschiedener Aromaten und des SiFA-Aromaten basierend auf den Publikationen von Ghuman *et al.* und Dumelin *et al.*.[211, 215]

Dumelin *et al.* untersuchten verschiedene Derivate der 4-(*p*-Iodphenyl)-buttersäure (IPB). Dabei wurde das Carboxylat von IPB sowohl mit D-Lys (Ac-D-Lys(IPB)-OH) als auch mit D-Orn konjugiert (Ac-D-Orn(IPB)-OH). Die Affinität zu HSA ist für das D-Lys Derivat mit 9 µM um einen Faktor von 6.5 höher als die Affinität des D-Orn Derivats (59 µM).[215] Für diesen Unterschied wird die Aminosäure K₄₁₄ der HSA-Bindetasche als potentiell verantwortlich gemacht. In Abhängigkeit von der Länge der Seitenkette von D-Lys oder D-Orn, wechselwirkt das C-terminale Carboxylat mit K₄₁₄ unterschiedlich stark (Abbildung 71 links und mitte; grün: anziehende Wechselwirkung; grau: keine oder geringe Wechselwirkung).[211] Des Weiteren beschreiben Ghuman *et al.* die in der Nähe der Bindetasche positionierte Aminosäure R₄₁₀. Für diese wird bei Ac-D-Lys(IPB)-OH und Ac-D-Orn(IPB)-OH keine Wechselwirkung vermutet, jedoch kann diese zur Erklärung für die niedrige HSA-Affinität von SiFAN⁺-Derivaten herangezogen werden. Im Falle von SiFAN⁺Gly-rhSST₂-Liganden (Abbildung 71 rechts), kommt es zwischen dem positiv geladenen, quartären Amin des SiFAN⁺ und der ebenfalls positiv geladenen Seitenkettenfunktion des R₄₁₀ zu einer repulsiven Wechselwirkung (rot: Abstoßung), welche die Affinität zu HSA absenkt.[211] Mit K₄₁₄ existiert eine weitere positiv geladene Aminosäure am Eingang der Bindetasche. Für die IPB-Liganden wurde bereits gezeigt, dass diese Aminosäure spezifisch adressiert werden kann.[211, 215] In der 4. Generation linkerbasierter Liganden sollte basierend auf diesen Daten eine weitere positive Ladung in die Peptidstruktur eingebaut werden, die für eine Repulsion mit K₄₁₄ sorgt und die Affinität zu HSA somit weiter senkt (vgl. Abbildung 72).

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

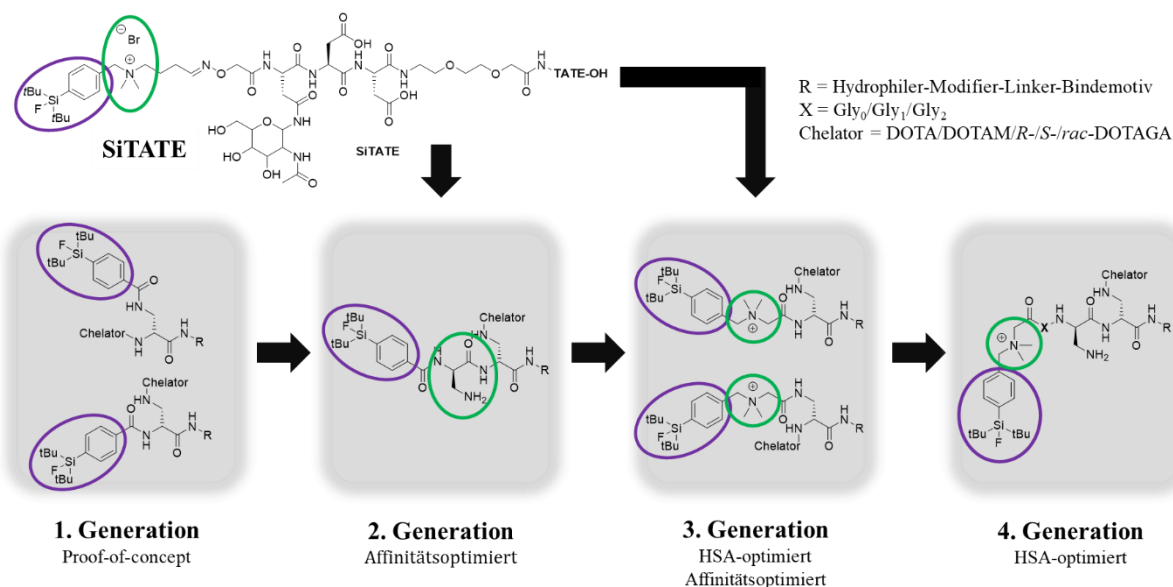


Abbildung 72: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden von der 1. bis zur 4. Generation. Lila: SiFA-Aromat; grün: positive Ladung benachbart zum SiFA-Aromat.

Die zusätzliche positive Ladung, dargestellt durch das freie Seitenkettenamin eines D-Dap, wurde zwischen der SiFAN⁺Gly-Einheit und dem D-Dap(DOTA) eingebaut (rhLB-4.1; vgl. Abbildung 73). Um den optimalen Abstand zwischen SiFAN⁺ und dem D-Dap zu ermitteln, wurden ein (rhLB-4.2) beziehungsweise zwei Glycine (rhLB-4.3) als Linkersequenz hinzugefügt. Zusätzlich wurde Derivat rhLB-4.4 entwickelt, welches statt einem zusätzlichen D-Dap nur ein Gly zwischen SiFAN⁺Gly und D-Dap(DOTA) trägt. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass Veränderungen der HSA-Bindung auch tatsächlich auf die neu hinzugefügte positive Ladung zurückzuführen sind und nicht auf einem veränderten Abstand zwischen SiFA und Chelator beruhen.

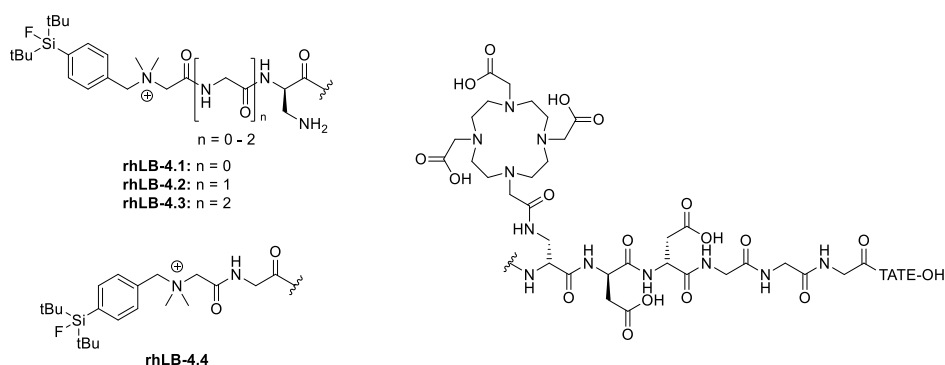


Abbildung 73: Strukturen der Liganden rhLB-4.1, rhLB-4.2, rhLB-4.3 und rhLB-4.4.

In Abbildung 74 sind die postulierten Wechselwirkungen der neuen Liganden und der HSA-Bindetasche dargestellt. Für alle vier Derivate wird postuliert, dass es durch Y₄₁₁ und der Amidbindung zur affinitätssteigernden Ausbildung einer Wasserstoffbrücke kommt. Das quartäre Amin und R₄₁₀ sollen hingegen für eine affinitätssenkende Repulsion sorgen. Zwischen dem freien Amin des D-Dap und K₄₁₄ kann es nun ebenfalls zu einer Repulsion kommen die für rhLB-4.1 (Abbildung 74 links), rhLB-4.2 und rhLB-4.3 (Abbildung 74 mittig) unterschiedlich stark ausgeprägt sein sollte. Für Derivat rhLB-4.4

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

hingegen, sollten keine abstoßenden Effekte auftreten, da statt dem positiv geladenen D-Dap ein neutrales Gly verwendet wurde. Im Idealfall ist dessen HSA-Bindung vergleichbar zu rhLB-3.2, sofern der zusätzliche Abstand zwischen SiFAN⁺Gly und D-Dap(DOTA) nicht selbst Einfluss auf die Affinität zu HSA nimmt, beispielsweise durch eine anziehende Wechselwirkung zwischen den Carboxylaten des DOTA und K₄₁₄.

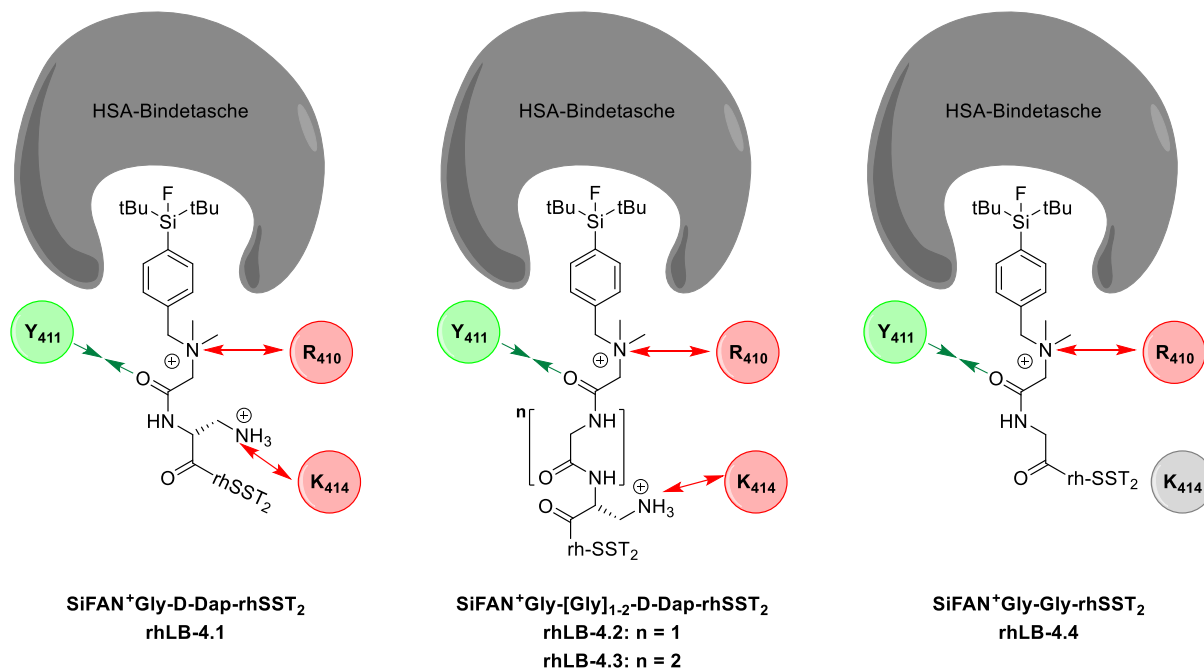


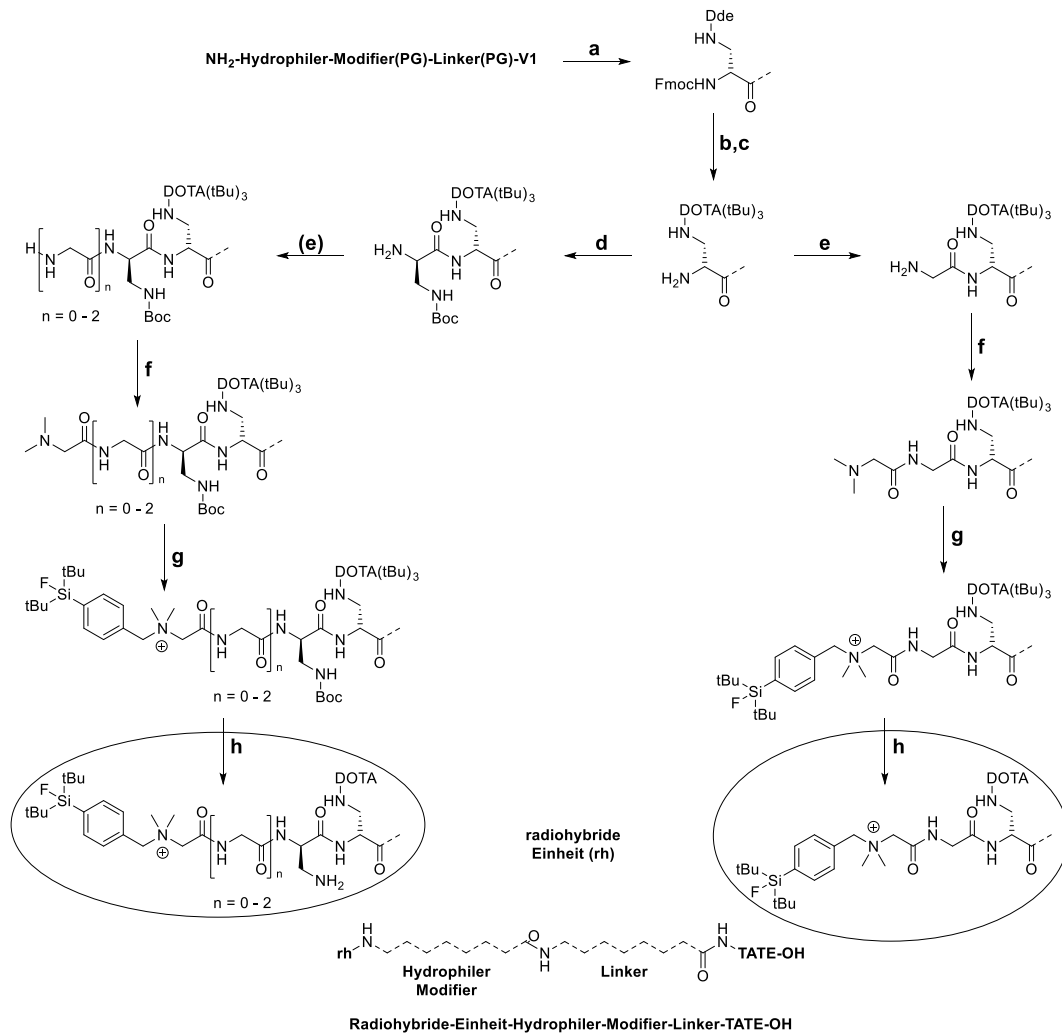
Abbildung 74: Postulierte Bindung der linkerbasierten Liganden der 4. Generation in die HSA-Bindetasche.

4.5.2 Synthese

In Schema 11 ist die Synthese der Liganden der 4. Generation dargestellt. Ausgehend von Stukturschema „NH₂-Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)-V1“ wurde Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert, Dde-entschützt und die Seitenkettenposition (Sk) mit DOTA(*t*Bu)₃ verknüpft. Im linken Synthesepfad, wurde zunächst *N*-Terminus (Nt) Fmoc-D-Dap(Boc)-OH konjugiert. Je nach Ligand wurde der *N*-Terminus entweder um 0, 1 oder 2 Fmoc-Gly-OH verlängert. Anschließend wurde Me₂-Gly-OH verknüpft und die SiFA-Einheit durch die nukleophile Substitution mit SiFA-Br aufgebaut.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Linkerbasierte Liganden mit radiohybrider Einheit der 4. Generation



Schema 11: Synthese der linkerbasierten Liganden der 4. Generation ausgehend von NH_2 -Hydrophiler-Modifizier(PG)-Linker(PG)-V1. **a**) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; **b**) Dde-Entschützung; **c**) Konjugation von $\text{DOTA}(t\text{Bu})_3$; **d**) Fmoc-D-Dap(Boc)-OH; **e**) Fmoc-Gly-OH; **f**) Me_2 -Gly-OH; **g**) SiFA-Br; **h**) TFA, H_2O , TIPS.

Im rechten Synthesepfad, wurde an der Nt-Position statt eines zusätzlich D-Dap, Fmoc-Gly-OH konjugiert. Der Aufbau der SiFA-Einheit mit Me_2 -Gly-OH und SiFA-Br verlief analog zum linken Synthesepfad. Für beide Syntheserouten erfolgte danach die finale Abspaltung vom Harz und die vollständige Entschützung aller säurelabilen Schutzgruppen an Chelator, hydrophilem Modifizier, Linker und SST_2 Bindemotiv. In Tabelle 23 ist der finale Aufbau aller Liganden der 4. Generation aufgeführt. Unterschiede finden sich ausschließlich beim Aufbau der rh-Einheit, hinsichtlich der Anzahl und Art der Aminosäuren zwischen trifunktioneller Einheit und SiFA-Baustein in Nt-Position.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 23: Auflistung der Strukturelemente der Liganden. **Ligand:** Bezeichnung des Liganden; **Nt:** N-terminale Modifikation; **Sk:** Modifikation der Seitenkette des D-Dap; **HM:** Hydrophiler Modifier; **BM:** SST₂ Bindemotiv.

Ligand	rh-Einheit		HM	Linker	BM
	Nt	Sk			
rhLB-4.1	[SiFAN ⁺ Gly]-D-Dap	DOTA	D-Asp ₂	Gly ₃	TATE
rhLB-4.2	[SiFAN ⁺ Gly]-Gly-D-Dap	DOTA	D-Asp ₂	Gly ₃	TATE
rhLB-4.3	[SiFAN ⁺ Gly]-Gly ₂ -D-Dap	DOTA	D-Asp ₂	Gly ₃	TATE
rhLB-4.4	[SiFAN ⁺ Gly]-Gly	DOTA	D-Asp ₂	Gly ₃	TATE

4.5.3 *In vitro* Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie

Alle Liganden wurden hinsichtlich ihrer *in vitro* Eigenschaften, HSA-Bindung und Hydrophilie untersucht. Die neuen Liganden werden mit rhLB-3.2 verglichen, da dieses ebenfalls den Gly₃ Linker, den D-Asp₂ hydrophilen Modifier und DOTA als Chelator tragen. Die *in vitro* Parameter von rhLB-3.2 werden daher als Ausgangspunkt für Veränderungen betrachtet, die durch das neue Design hervorgerufen werden. Die erhobenen Daten sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Präklinische Daten von [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-3.2, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-4.1, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-4.2, [^{18/19}F]Ga-/[^{18/19}F]Lu-rhLB-4.3 und [^{18/19}F]Ga-rhLB-4.4. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).

Ligand	IC ₅₀ ± SD [nM]	LogD _{pH=7.4} ± SD	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW _{app} [kDa]
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.2	3.72 ± 0.61	-1.79 ± 0.02	–	89.9	8.17
[^{18/19} F]Ga-rhLB-4.1	3.56 ± 0.25	-1.97 ± 0.01	293	82.8	8.71
[^{18/19} F]Lu-rhLB-4.1	3.09 ± 0.16	-1.71 ± 0.05	–	87.5	8.84
[^{18/19} F]Ga-rhLB-4.2	3.69 ± 0.34	-2.00 ± 0.02	294	84.7	7.82
[^{18/19} F]Lu-rhLB-4.2	3.51 ± 0.41	-1.88 ± 0.05	–	88.0	8.47
[^{18/19} F]Ga-rhLB-4.3	3.40 ± 0.18	-1.96 ± 0.01	343	88.1	8.48
[^{18/19} F]Lu-rhLB-4.3	3.36 ± 0.27	-1.74 ± 0.03	–	88.3	9.81
[^{18/19} F]Ga-rhLB-4.4	4.15 ± 0.79	-2.24 ± 0.05	479	89.5	7.61

Die IC₅₀ Daten liegen für alle Liganden zwischen 3.01 und 4.15 nM. Dementsprechend nehmen die neu hinzugefügten Strukturelemente keinen signifikanten Einfluss auf die SST₂ Affinität. Die Internalisierungsraten wurden nur für die [^{18/19}F]Ga-Varianten bestimmt (siehe Abbildung 75). Der Einbau eines zusätzlichen Glycins in [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 führt für den Liganden [^{18/19}F]Ga-rhLB-4.4 zu keiner Veränderung der Internalisierungsrate. Da die Affinitäten beider Verbindungen vergleichbar sind, war dieses Ergebnis erwartet. Im Gegensatz dazu weisen die Liganden [^{18/19}F]Ga-rhLB-4.1, -rhLB-4.2 und -rhLB-4.3 eine zueinander vergleichbare, aber relativ zu

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-4.4}$ verringerte Internalisierungsrate auf. Diese Beobachtung lässt sich nicht auf die Unterschiede im IC_{50} zurückführen. Die positive Ladung der D-Dap Seitenkette scheint für diesen Effekt verantwortlich zu sein.

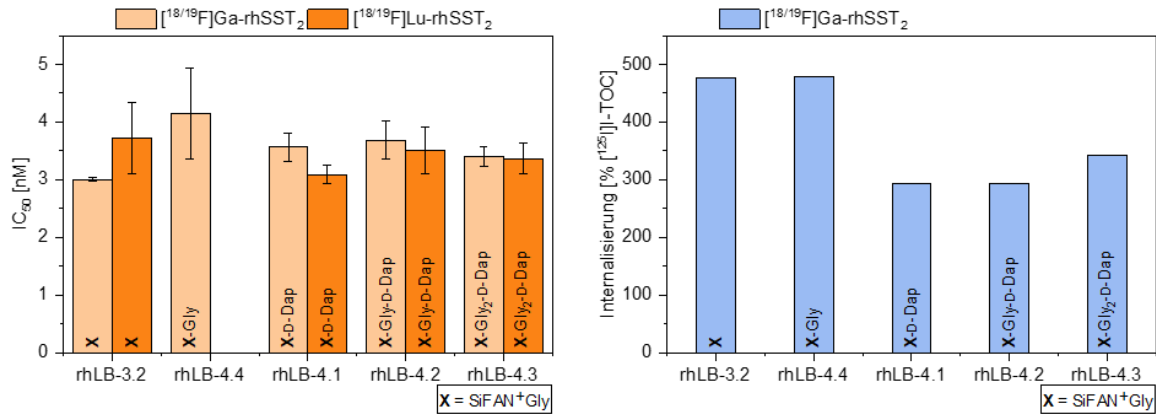


Abbildung 75: IC_{50} und Internalisierung der Liganden der 4. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{-TOC}$ in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Aufbau der SiFA-Einheit.

Die Hydrophilie ist für alle Liganden vergleichbar (siehe Abbildung 76). Die $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -Derivate liefern $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Werte von etwa -2 , mit $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-4.4}$ als einziger Ausnahme ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.24 \pm 0.05$). Die $[^{18/19}\text{F}]\text{Lu}$ -Varianten erweisen sich Allgemeinen als weniger hydrophil und liefern $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Werte von etwa -1.8 .

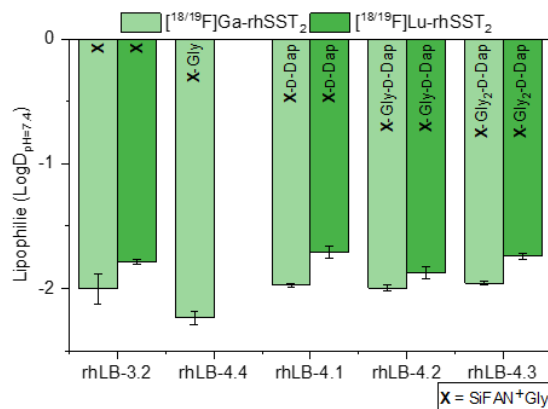


Abbildung 76: Lipophilie der Liganden der 4. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Aufbau der SiFA-Einheit.

Von besonderem Interesse ist in der 4. Generation linkerbasierter Liganden die HSA-Bindung (vgl. Abbildung 77). Erneut wurden alle Liganden sowohl mit der HPAC als auch der AMSEC Methode untersucht. Mit der HPAC Methode ist keine wesentliche Veränderung der HSA-Bindung beim Einbau des zusätzlichen Gly in rhLB-4.4 festzustellen. Diese Beobachtung deckt sich mit den zuvor aufgestellten Hypothesen zur Relevanz der Aminosäure K_{414} in der HSA-Bindetasche. Wird statt Gly ein D-Dap eingebaut, sinkt die %-Bindung an HSA von 89.5% ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-4.4}$) auf 82.8% ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-4.1}$) bzw. 87.5% ($[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-4.1}$). Durch den Einbau zusätzlicher Glycine wird

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

die Distanz zwischen SiFAN⁺Gly und D-Dap erhöht. Mit zunehmender Distanz nimmt die HSA-Bindung in der Reihe rhLB-4.1, rhLB-4.2 und rhLB-4.3 wieder zu. Diese Beobachtung deckt sich mit der Annahme, dass die Aminosäure K₄₁₄ in HSA für die Modulation der HSA-Affinität der Liganden genutzt werden kann. Die Repulsion zwischen dem freien Amin der Seitenkette des K₄₁₄ und dem freien Amin des D-Dap wird maximiert, wenn sich die positiv geladenen Amine in räumlicher Nähe befinden. Bei rhLB-4.1 wird diese räumliche Anordnung erreicht und die HSA-Bindung auf diese Weise minimiert. Die Erhöhung der Distanz in rhLB-4.2 und rhLB-4.3, verringert hingegen die Repulsion und steigerte damit wieder die Affinität zur HSA-Bindetasche.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Tendenzen sowohl für Ga- als auch Lu-Komplexe vergleichbar sind, jedoch für die Lu-Varianten weniger stark ausgeprägt. Daraus lässt sich schließen, dass auch der komplexierte Chelator DOTA, durch eine Wechselwirkung mit der HSA-Bindetasche, Einfluss auf die HSA-Affinität nahm.

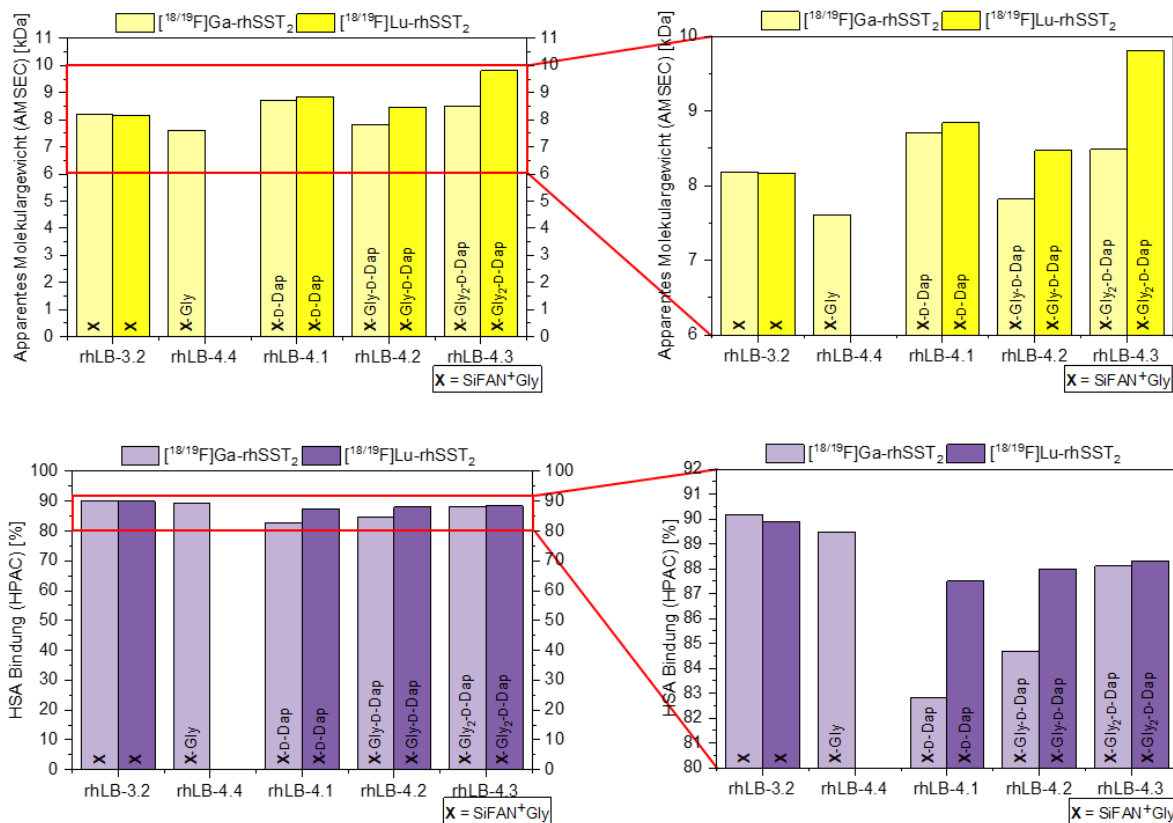


Abbildung 77: HSA-Bindung der Liganden der 4. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC) in zwei Skalierungen von 0 – 11 kDa und 6 – 10 kDa. Unten: HSA-Bindung in % (HPAC) in zwei Skalierungen von 0 – 100% und 80 – 92%.

Die AMSEC Methode hingegen liefert andere Trends, die nicht zur aufgestellten Hypothese passen. $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-4.4}$ zeigt mit dieser Methode den niedrigsten Wert von nur $MW_{\text{app}} = 7.61$ kDa. Die Liganden mit zusätzlicher positiver Ladung liefern tendenziell höhere apparente Molekulargewichte als $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-4.4}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.2}$. Damit lässt sich in dieser Methode die angestrebte Repulsion zwischen D-Dap und K₄₁₄ nicht bestätigen. Im Gegenteil wird hier sogar gezeigt,

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

dass die Verwendung des D-Dap zu einer Zunahme der HSA-Affinität führt. Dieses Ergebnis steht somit in starkem Widerspruch zu den Ergebnissen der HPAC Methode. Es ist jedoch anzumerken, dass die absoluten MW_{app} -Werte der obigen Liganden sehr geringe Unterschiede aufweisen, so dass es einer genaueren Analyse durch eine größere Zahl von AMSEC Einzelläufen mit statistischer Auswertung bedurft hätte. Dieses Vorgehen war zum Ende der Dissertation aus Zeitgründen leider nicht mehr durchführbar. Gleichzeitig ist zu bedenken, dass die AMSEC Methode nur apparente Molekulargewichte von >6.5 kDa abbilden kann (vgl. Kalibriergerade in Materialien und Methoden). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die AMSEC Methode bei diesen Liganden an seine Detektionsgrenzen stößt.

5. DOTA-TATE-basierte rhSST₂-Liganden

Die Synthese der nachfolgenden Derivate und deren *in vitro* Evaluierung wurden als Teilprojekt in einer von mir betreuten Masterarbeit von *L. Wendlinger* aus- und durchgeführt.[216]

5.1 Entwicklungskonzept

Die Struktur der DOTA-TATE-basierten Liganden (DTB = DOTA-TATE-basiert) basiert auf den klinisch angewandten Verbindungen [⁶⁸Ga]Ga-DOTA-TATE und [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA-TATE. DOTA-TATE dient als Grundstruktur und wird mit einem hydrophilen Modifier und einer SiFA-Einheit modifiziert, um eine neue Klasse radiohybrider SST₂-Liganden zu erzeugen. In Abbildung 78 ist die schematische Grundstruktur der neuen Ligandklasse abgebildet.

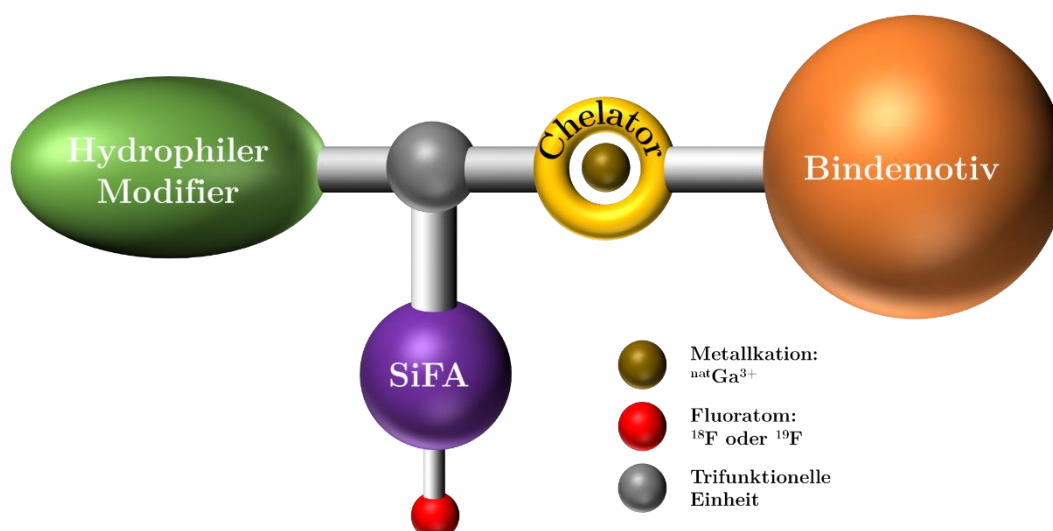


Abbildung 78: Schematische Struktur der DOTA-TATE-basierten Liganden bestehend aus hydrophilem Modifier (grün), SiFA-Baustein (lila) mit [¹⁸F]- oder [¹⁹F]Fluor (rot), Chelator (gelber Ring) mit Metallkation (ocker), SST₂ Bindemotiv (orange) und der trifunktionellen Einheit (grau).

Der Chelator (gelber Ring) dient hier nicht nur als hydrophiliesteigernde Einheit, sondern zugleich als Linker. Dementsprechend bleibt in allen Liganden DOTA-TATE (orange Sphäre und gelber Ring in Abbildung 78) als Grundstruktur erhalten. Das DOTA wird hierbei, relativ zum verknüpften Bindemotiv TATE, am Carboxylat in *trans*-Position des DOTA Chelators weiter funktionalisiert. Damit stehen zur Komplexierung von rh-Liganden dieses Typs, nur zwei freie Carboxylate des DOTA Chelators zur Verfügung. Die in dieser Reihe entwickelten Liganden sollen daher als stabile Ga-Komplexe evaluiert werden, für welche die verbleibende Hexakoordination ausreichend ist.

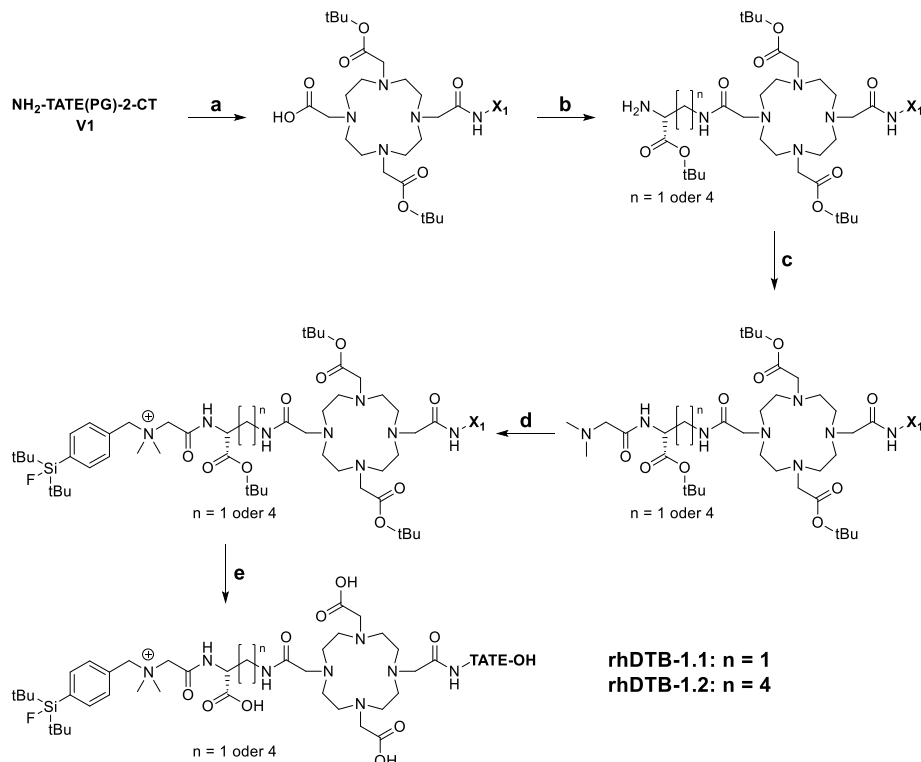
DOTA-TATE wurde als Grundstruktur gewählt, da die Literatur für diese Verbindung zeigt, dass die SST₂ Affinität durch die Komplexierung mit einem geeigneten Metallkation erhöht werden kann. So wird die Affinität von unkomplexiertem DOTA-TATE (IC₅₀ = 1.50 ± 0.40 nM) durch die Komplexierung mit Gallium auf 0.20 ± 0.04 nM erhöht.[54, 70] Weitere analoge Beispiele werden für

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

DOTA Derivate von SST₂ Agonisten in der Literatur beschrieben.[54, 191] Das Ziel dieses Teilprojekts ist, DOTA-TATE als Grundstruktur für neue Liganden zu nutzen und den verbrückenden Chelator mit Gallium zu komplexieren. Auf diese Weise soll die affinitätsoptimierte Konformation des [^{nat/68}Ga]Ga-DOTA-TATE optimal genutzt werden.[217, 218]

5.2 Synthese

Das synthetische Vorgehen für die Liganden rhDTB-1.1 und rhDTB-1.2, die keinen hydrophilen Modifizierer tragen, ist in Schema 12 dargestellt. Ausgehend von **V1** wurde zunächst das *trans*-geschützte DOTA(*t*Bu)₂ konjugiert. Das freie Carboxylat des Chelators wurde dann mit dem freien Amin der ungeschützten Seitenkette von Fmoc-D-Dap-*O*tBu oder Fmoc-D-Lys-*O*tBu verknüpft. Am *N*-Terminus dieser Aminosäure wurde Me₂-Gly-OH gebunden und anschließend die SiFA-Einheit durch nukleophile Substitution mit SiFA-Br aufgebaut. Abschließend erfolgte die Abspaltung vom Harz und die finale Entschützung.

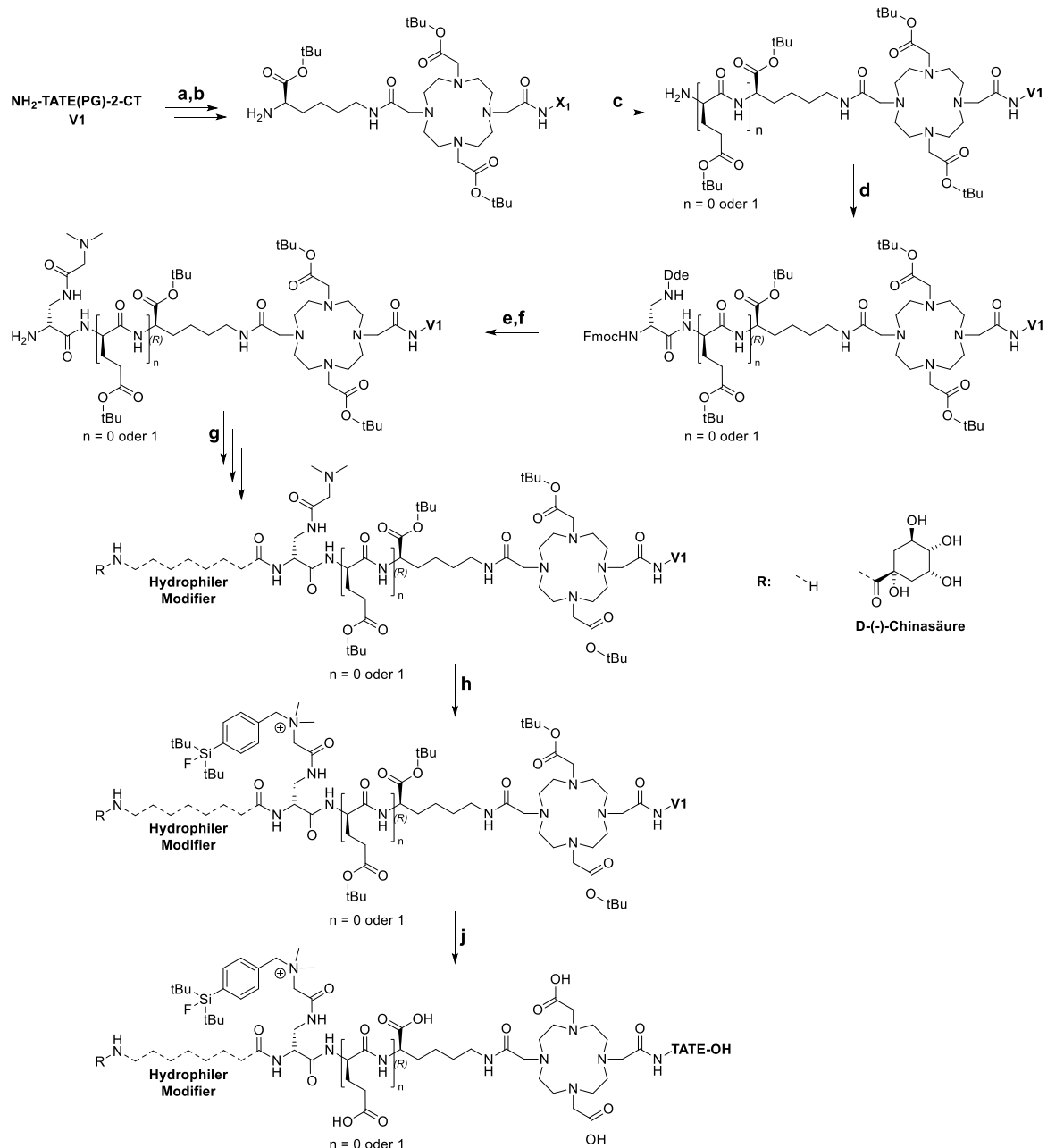


Schema 12: Synthese der DOTA-TATE basierten Liganden der 1. Generation ausgehend von NH₂-TATE(PG)-2-CT (**V1**). **a**) Konjugation von DOTA(*t*Bu)₂; **b**) Fmoc-D-Lys-*O*tBu oder Fmoc-D-Dap-*O*tBu; **c**) Me₂-Gly-OH; **d**) SiFA-Br; **e**) TFA, H₂O, TIPS.

rhDTB-1.1 und rhDTB-1.2 dienten als Testliganden, um die Tauglichkeit von DOTA als Linker zu prüfen. In Schema 13 ist die Synthese der übrigen rhDTB Liganden dargestellt, die zusätzlich mit einem hydrophilen Modifizierer versehen wurden. Ebenfalls ausgehend von **V1** wurde bei diesen Liganden nur Fmoc-D-Lys-*O*tBu eingesetzt. Danach wurden entweder Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH und Fmoc-D-Dap(Dde)-

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

OH oder nur Fmoc-D-Dap(Dde)-OH konjugiert. Nach der Dde-Entschützung wurde Me₂-Gly-OH an der D-Dap Seitenkette verknüpft. D-Dap diente als trifunktionelle Einheit. An der Seitenkette des D-Dap wurde der SiFA-Baustein verknüpft und am N-Terminus der hydrophile Modifier. Dieser setzte sich aus je drei Aminosäuren zusammen (Schema 13).



Schema 13: Synthese der DOTA-TATE basierten Liganden der 2. und 3. Generation ausgehend von NH₂-TATE(PG)-2-CT (**V1**). **a**) Konjugation von DOTA(tBu)₂; **b**) Fmoc-D-Lys-OtBu; **c**) Fmoc-D-Glu(tBu)-OH; **d**) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; **e**) Dde-Entschützung; **f**) Me₂-Gly-OH; **g**) Aufbau des hydrophilen Modifiers aus je drei gleichen oder verschiedenen Aminosäuren: Fmoc-D-Glu(tBu)-OH, Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Dap(Boc)-OH; **h**) SiFA-Br; **j**) TFA, H₂O, TIPS.

Eingesetzt wurden zum Aufbau des hydrophilen Modifiers die Aminosäuren D-Cit, D-Glu(tBu), D-Dap(Boc) und D-Lys(Boc). Einige Liganden wurden zusätzlich am N-Terminus des hydrophilen

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Modifiers mit D(-)-Chinasäure (Chs) verknüpft. Alle anderen Liganden lagen final mit freiem *N*-Terminus vor.

Nachdem mit Me₂-Gly und SiFA-Br die SiFA-Einheit aufgebaut wurde, wurden die Liganden mit TFA entschützt und vom Harz abgespalten. Welcher Ligand mit welchem hydrophilen Modifizier, mit oder ohne *N*-terminaler D(-)-Chinasäure und mit oder ohne zusätzlichem D-Glu hergestellt wurde, ist in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25: Strukturelemente der Liganden. **Ligand**: Bezeichnung des Liganden; **HM**: Hydrophiler Modifizier; **Linker**: Struktur des Linkers und des Chelators; **BM**: SST₂ Bindemotiv.

Ligand	HM	Linker	BM
rhDTB-2.1	D-Cit ₃	D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE
rhDTB-2.2	D-Glu-D-Cit ₂	D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE
rhDTB-2.3	D-Glu ₂ -D-Dap	D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE
rhDTB-2.4	D-Glu ₂ -D-Lys	D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE
rhDTB-2.5	D-Glu ₃	D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE
rhDTB-3.1	D-Glu ₃	D-Glu-D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE
rhDTB-3.2	Chs-D-Glu ₃	D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE
rhDTB-3.3	Chs-D-Glu-D-Cit ₂	D-Lys(<i>trans</i> -DOTA)	TATE

5.3 *In vitro* Evaluierung, HSA-Bindung und Hydrophilie

Alle Liganden wurden hinsichtlich ihrer *in vitro* Eigenschaften, HSA-Bindung und Hydrophilie untersucht. Dabei lagen alle Derivate als Ga-Komplex oder als umkomplexierte Variante mit freiem Chelator vor. Die Liganden werden mit [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 verglichen, da dieses aus der Reihe der linkerbasierten Liganden als vielversprechendste Verbindung hervorging.

5.3.1 DOTA-TATE basierte Liganden der 1. Generation: Proof-of-concept

Die Liganden rhDTB-1.1 und rhDTB-1.2 dienen als proof-of-concept Liganden. Durch diese soll evaluiert werden, ob der Chelator DOTA als Linker verwendet werden kann und in der SST₂ Bindetasche toleriert wird (vgl. Abbildung 79). Durch die Unterschiede in der Länge der D-Dap und D-Lys Seitenketten, soll bewertet werden ob sich der Abstand der SiFA-Einheit zum Bindemotiv auf die Affinitäten, Hydrophilie und HSA-Bindung auswirkt.

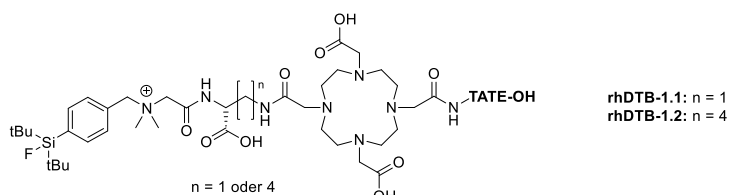


Abbildung 79: Strukturen der Liganden rhDTB-1.1 und rhDTB-1.2.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die erhobenen Daten sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Die mit Ga³⁺ komplexierten Liganden weisen mit IC₅₀ = 5.59 ± 1.38 nM ([^{18/19}F]Ga-rhDTB-1.1) und IC₅₀ = 5.69 ± 0.23 nM ([^{18/19}F]Ga-rhDTB-1.2) eine geringere Affinität auf als [^{nat/68}Ga]Ga-DOTA-TATE (IC₅₀ = 1.90 ± 0.07 nM). Die Funktionalisierung des DOTA an der *trans*-Position nimmt somit einen negativen Einfluss auf den IC₅₀. [217] Dennoch handelt es sich bei beiden Liganden um hoch affine Derivate, die hinsichtlich des IC₅₀ mit [^{18/19}F]SiTATE (IC₅₀ = 6.98 ± 0.61 nM) vergleichbar sind. Die Distanz des SiFAN⁺Gly zum Bindemotiv wirkt sich dabei nicht auf die Bindungseigenschaften der Liganden aus.

Da für die proof-of-concept Liganden auf den Einbau eines hydrophilen Modifiers verzichtet wurde, weisen beide Liganden einen für die *in vivo* Anwendung ungeeigneten LogD_{pH=7.4} auf. Die HSA-Bindung wurde mittels der HPAC Methode bestimmt und erweist sich für beide Liganden als hoch, verglichen mit Referenzverbindungen wie [^{18/19}F]SiTATE und [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Präklinische Daten von [^{18/19}F]Ga-rhDTB-1.1 und [^{18/19}F]Ga-rhDTB-1.2. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵I]-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD_{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); HSA-Bindung in % (HPAC); Nettoladung z.

Ligand	IC ₅₀ ± SD [nM]	LogD _{pH=7.4} ± SD	HSA Bindung %	z
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-1.1	5.59 ± 1.38	-1.03 ± 0.04	95.4	+1
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-1.2	5.69 ± 0.23	-1.19 ± 0.07	94.5	+1
[^{nat/68} Ga]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	-3.69[57]	88.9	0
[^{nat/177} Lu]Lu-DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	32.6	0
[^{18/19} F]SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	86.8	-1
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	90.2	-1

DOTA als Linker zwischen TATE und der SiFAN⁺Gly Einheit liefert Liganden von hoher Affinität zur Zielstruktur SST₂. Die Verwendung von D-Lys statt D-Dap zwischen DOTA und SiFAN⁺Gly nimmt keinen Einfluss auf den IC₅₀, LogD_{pH=7.4} Wert und die Bindung an HSA. Die Struktur von [^{18/19}F]Ga-rhDTB-1.2 dient als Grundlage für die Entwicklung einer 2. Generation DOTA-TATE basierter Liganden.

5.3.2 DOTA-TATE basierte Liganden der 2. Generation

Aufbauend auf [^{18/19}F]Ga-rhDTB-1.2 sollten in der 2. Generation der DOTA-TATE-basierten Liganden vordergründig die Lipophilie und die Bindung an HSA gesenkt werden.[216] Dazu wurde zunächst die SiFAN⁺Gly Einheit an das Seitenkettenamin eines nach dem D-Lys zusätzlich eingeführten D-Dap geknüpft. An den N-Terminus wurde ein hydrophiler Modifizier konjugiert. Dieser entspricht in allen Derivaten einem Tripeptid, welches sich aus verschiedenen Kombinationen von D-Dap, D-Lys, D-Cit

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

und D-Glu zusammensetzt. Die Strukturen der Liganden rhDTB-2.1, -2.2, -2.3, -2.4 und -2.5 sind in Abbildung 80 dargestellt.

Die Aminosäuren sollten durch ihre hydrophilen Seitenketten die Lipophilie des gesamten Liganden herabsenken. Die SiFAN⁺Gly Einheit wurde vom hydrophilen Chelator und dem hydrophilen Modifier strukturell umschlossen. Dies sollte einerseits die Hydrophilie steigern und andererseits die Bindung an HSA senken, indem die Zugänglichkeit des SiFA-Bausteins zur HSA-Bindetasche sterisch erschwert wird. Die Wahl der Aminosäuren für den hydrophilen Modifier folgte aus bisher nicht publizierten Erkenntnissen über den Zusammenhang zwischen der Affinität zu HSA und den zur SiFA-Einheit benachbarten Aminosäuren.

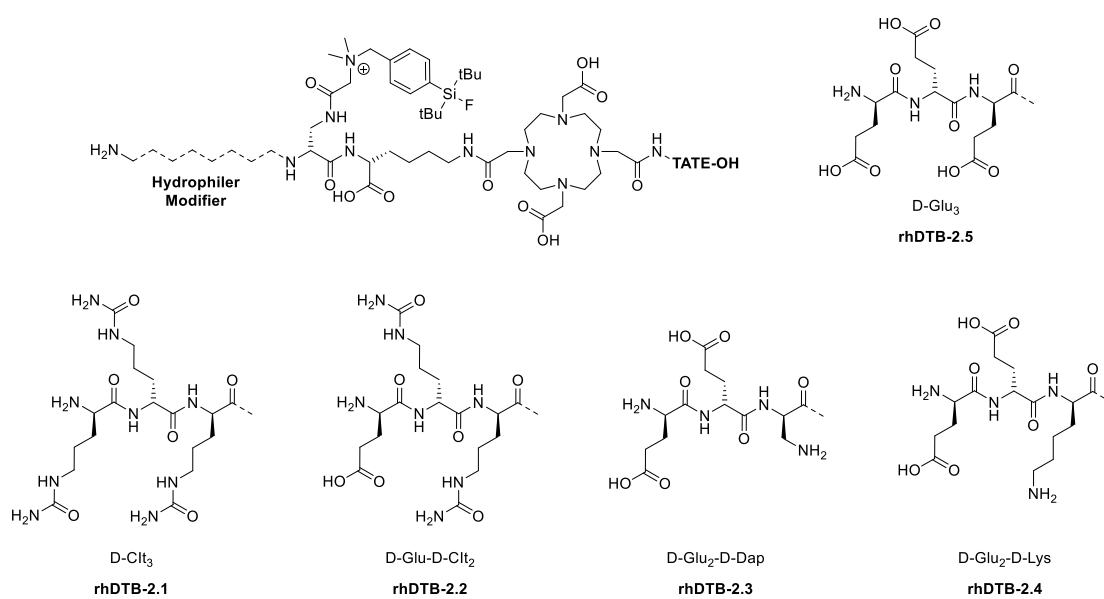


Abbildung 80: Strukturen der Liganden rhDTB-2.1, rhDTB-2.2, rhDTB-2.3, rhDTB-2.4 und rhDTB-2.5.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die *in vitro* Daten sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Präklinische Daten der DOTA-TATE basierten Liganden der 2. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: [^{125}I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $LogD_{pH=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [^{125}I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z .

Ligand	$IC_{50} \pm SD$ [nM]	$LogD_{pH=7.4}$ $\pm SD$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
Gallium komplexierter DOTA Chelator						
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-1.2	5.69 ± 0.23	-1.19 ± 0.07	–	94.5	–	+1
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.1	3.69 ± 0.54	-2.27 ± 0.04	536	98.8	6.66	+2
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.2	3.31 ± 0.51	-2.30 ± 0.03	550	94.3	6.02	+1
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.3	2.57 ± 0.20	-2.12 ± 0.06	619	96.0	6.68	+1
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.4	3.17 ± 0.56	-2.28 ± 0.04	841	92.7	6.79	+1
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.5	2.75 ± 0.20	-2.30 ± 0.04	357	84.8	7.07	-1
Unkomplexierter DOTA Chelator						
[$^{18/19}F$]rhDTB-2.1	9.24 ± 1.39	–	–	93.6	–	-1
[$^{18/19}F$]rhDTB-2.2	10.6 ± 1.01	–	–	84.7	–	-2
[$^{18/19}F$]rhDTB-2.3	7.38 ± 1.01	-1.96 ± 0.06	–	86.2	–	-2
[$^{18/19}F$]rhDTB-2.4	5.93 ± 1.14	-2.36 ± 0.03	–	83.9	–	-2
[$^{18/19}F$]rhDTB-2.5	12.1 ± 0.74	–	–	86.2	–	-4
Referenzen						
[$^{nat/68}Ga$]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	$-3.69[57]$	–	88.9	–	0
[$^{nat/177}Lu$]Lu-DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0
[$^{18/19}F$]SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
[$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18	-1

Die Einführung des hydrophilen Modifiers in die Struktur der 2. Generation DOTA-TATE basierter Liganden, verbessert die Affinitäten der Ga-Komplexe verglichen mit der Vorgänger Verbindung [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-1.2 ($IC_{50} = 5.69 \pm 0.23$ nM) (vgl. Abbildung 81). Die Liganden [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.1 bis [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.5 zeigen vielversprechende Affinitäten zwischen 2.57 ± 0.20 nM und 3.69 ± 0.54 nM. Damit weisen die DOTA-TATE basierten Liganden eine zur Lead-Compound [$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.2 ($IC_{50} = 3.01 \pm 0.03$ nM) vergleichbare Affinität und eine höhere Affinität als [^{18}F]SiTATE ($IC_{50} = 6.98 \pm 0.61$ nM) auf. Die Wahl der Aminosäuren im hydrophilen Modifier, nimmt keinen signifikanten Einfluss auf den IC_{50} . Daraus ist zu schließen, dass weitere strukturelle Variationen im hydrophilen Modifier ohne signifikante Beeinflussung der Affinität toleriert werden könnten. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Veränderung der relativen Position der SiFAN⁺Gly-Einheit verglichen

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

mit rhDTB-1.2 zu den gesteigerten Affinitäten der Liganden führte unabhängig von der Zusammensetzung des hydrophilen Modifiers.

Die Affinitäten der unkomplexierten Liganden sind in allen Fällen geringer als die der entsprechenden Ga-Komplexe ($IC_{50} = 5.93 \pm 1.14$ nM bis 12.1 ± 0.74 nM). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von *Reubi et al.*, sowohl für das Ligand-Paar DOTA-TATE ($IC_{50} = 1.5 \pm 0.4$ nM) und $[^{nat/68}Ga]Ga$ -DOTA-TATE ($IC_{50} = 0.2 \pm 0.04$ nM) als auch für DOTA-TOC ($IC_{50} = 14.0 \pm 2.6$ nM) und $[^{nat/68}Ga]Ga$ -DOTA-TOC ($IC_{50} = 2.5 \pm 0.5$ nM).[54] Aufgrund der insgesamt niedrigeren Affinitäten wurden die unkomplexierten Varianten bei der weiteren Optimierung nicht mehr berücksichtigt.

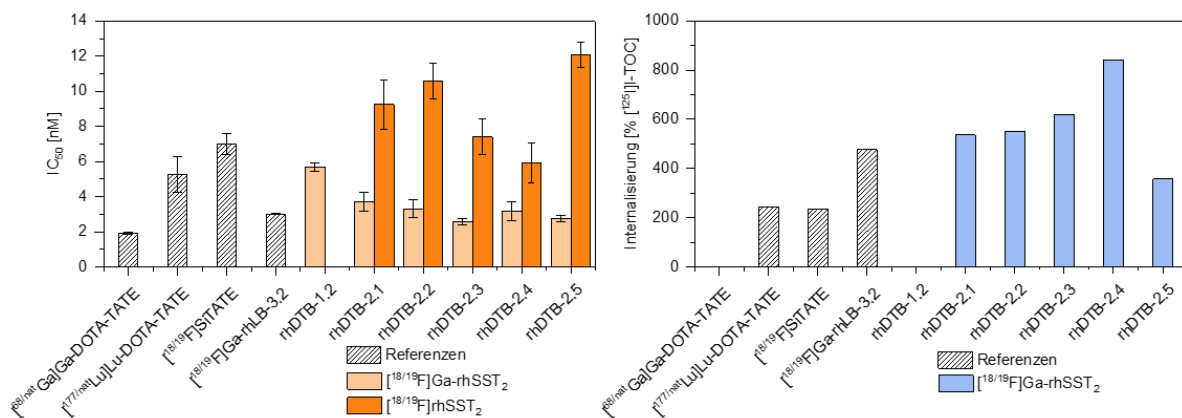


Abbildung 81: IC_{50} und Internalisierung der DOTA-TATE basierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}I]I$ -TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}I]I$ -TOC in % (nach 60 min).

Alle Ga-komplexierten Liganden der 2. Generation weisen eine moderate bis hohe Internalisierungsrate auf (357 – 841% nach 60 min) (vgl. Abbildung 81). Dabei übertreffen sie die Internalisierung von $[^{18/19}F]Si$ TATE (236% nach 60 min) und internalisieren in einer ähnlichen Größenordnung wie die linkerbasierte Referenz $[^{18/19}F]Ga$ -rhLB-3.2 (477% nach 60 min). Ein Zusammenhang zwischen der Affinität und der Internalisierungsrate wird für diese Liganden nur teilweise beobachtet.[57] Für die Liganden $[^{18/19}F]Ga$ -rhDTB-2.1, -2.2 und -2.3 wird die Zunahme der SST_2 Affinität durch eine Steigerung der Internalisierungsrate widerspiegelt. Die hohe Internalisierungsrate für $[^{18/19}F]Ga$ -rhDTB-2.4 (841% nach 60 min) und der vergleichsweise geringe Wert für $[^{18/19}F]Ga$ -rhDTB-2.5 (357% nach 60 min) korrelieren jedoch nicht mit den entsprechenden IC_{50} Daten. Aufgrund dieser mangelnden Konsistenz der Daten, wurde die Internalisierungsrate bei der Ligandauswahl für die Biodistribution nicht berücksichtigt.

Wie beabsichtigt führt der Einbau eines hydrophilen Modifiers für die Ga-Komplexe zu einer Verbesserung des $LogD_{pH=7.4}$ Wertes um eine Größenordnung, verglichen mit $[^{18/19}F]Ga$ -rhDTB-1.2 ($LogD_{pH=7.4} = -1.19 \pm 0.07$) (vgl. Abbildung 82). Alle fünf Derivate sind hydrophiler als $[^{18/19}F]Si$ TATE ($LogD_{pH=7.4} = -1.27 \pm 0.07$). Zusätzlich wird, verglichen mit der linkerbasierten Referenz $[^{18/19}F]Ga$ -rhLB-3.2 ($LogD_{pH=7.4} = -2.00 \pm 0.12$) eine geringe Steigerung der Hydrophilie erreicht.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In der Reihe der unkomplexierten Liganden zeigen $[^{18/19}\text{F}]\text{rhDTB-2.3}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{rhDTB-2.4}$ die höchsten Affinitäten zur Zielstruktur. Daher wurde für diese Liganden zusätzlich die Lipophilie evaluiert. Die $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ Werte sind für $[^{18/19}\text{F}]\text{rhDTB-2.3}$ ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -1.96 \pm 0.06$) und $[^{18/19}\text{F}]\text{rhDTB-2.4}$ ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.36 \pm 0.03$) vergleichbar zu den respektiven Ga-Komplexen. Demnach ist die Komplexierung für die Hydrophilie des Liganden nur von untergeordneter Bedeutung. Ein unerwartetes Ergebnis, da in der Literatur gegenteilige Beobachtungen beschrieben werden.[151, 182]

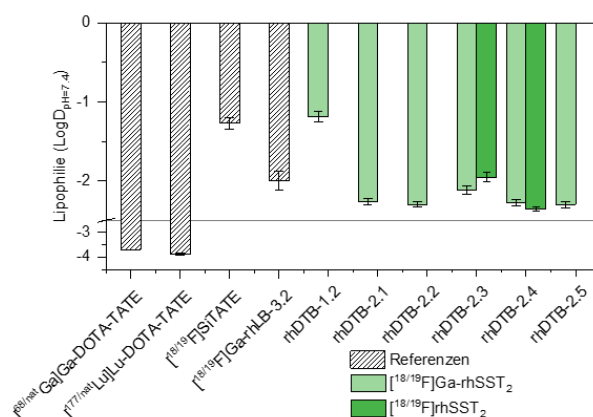


Abbildung 82: Lipophilie der DOTA-TATE basierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$).

Zur Bestimmung der HSA-Bindung wurden alle $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga}$ -Liganden sowohl mit der HPAC als auch der AMSEC Methode untersucht (vgl. Abbildung 83). Mit der HPAC Methode werden große Unterschiede zwischen der HSA-Bindung der Liganden, zwischen 84.8% und 98.8%, verzeichnet. Die HSA-Bindungen von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ (94.3%), $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.3}$ (96.0%) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.4}$ (92.7%) sind vergleichbar mit $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-1.2}$ (94.5%). Für $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.1}$ (98.8%) ist die höchste Affinität zu HSA in dieser Reihe von Verbindungen zu beobachten. Die Verwendung von D-Cit₃ als hydrophilem Modifier erhöht bei den DOTA-TATE basierten Liganden die HSA-Bindung signifikant. Dies deckt sich mit früheren Beobachtungen zur Verwendung des Chelators DOTAM (vgl. 4.4.4 Variation des Chelators). Der Amid-basierte Chelator erhöht in der HPAC Methode die HSA-Bindung signifikant. Im Fall von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.1}$ wird die HSA-Bindung, durch die zu Amidene strukturell ähnlichen Urea-Funktionalitäten des Citrullins, erhöht. Die Verwendung von D-Glu₃ in $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ führt zu einer Senkung der HSA-Bindung auf 84.8%. Dieser Ligand ist die einzige Verbindung in dieser Reihe, die eine niedrigere HSA-Bindung als $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ (86.8%) oder $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ (90.2%) aufweist. Insgesamt stehen diese Ergebnisse im Kontrast zur Literatur, in der Carboxylate als Elemente beschrieben wurden, mit denen die HSA-Bindung gesteigert wird.[211, 219] Besonders ausgeprägt zeigt sich der Kontrast zwischen den HSA-Bindungen von mit Ga^{3+} komplexierten und unkomplexierten Derivaten. Mit $[^{18/19}\text{F}]\text{rhDTB-2.5}$ als Ausnahme, zeigen die unkomplexierten Derivate $[^{18/19}\text{F}]\text{rhDTB-2.1}$ (93.6%), -2.2 (84.7%), -2.3 (86.2%)

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

und -2.4 (83.9%) deutlich niedrigere %-Bindungen an HSA als ihre mit Gallium komplexierten Analoga.

Für die Ga-komplexierten Derivate wurde zusätzlich das apparente Molekulargewicht mittels der AMSEC Methode bestimmt. Die AMSEC Methode liefert für die Derivate [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhDTB-2.1 bis [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhDTB-2.5 Werte zwischen 6.02 kDa und 7.07 kDa. Damit erweisen sich die Liganden der in der AMSEC Methode als insgesamt weniger affin zu HSA, als [$^{18/19}\text{F}$]SiTATE mit 6.96 kDa und [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLB-3.2 mit 8.18 kDa.

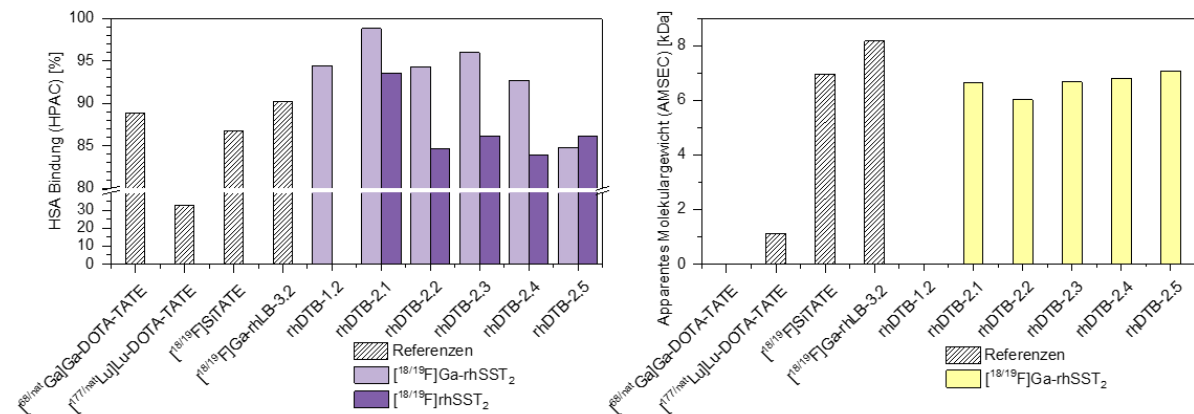


Abbildung 83: HSA-Bindung der DOTA-TATE basierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).

Diese Beobachtung steht in starkem Kontrast zu den zuvor beschriebenen Resultaten der HPAC Methode. Während die apparenten Molekulargewichte insgesamt eine sehr niedrige HSA-Bindung zeigen, decken dieselben Liganden in der HPAC Methode ein breites Spektrum von hoher ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhDTB-2.1) bis niedriger ([$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhDTB-2.5) Bindung an HSA ab.

Die Ergebnisse der AMSEC Methode lassen auf eine sehr niedrige Affinität zu HSA schließen. Allerdings lassen sich mit dieser Methode nur Molekulargewichte von >6.5 kDa abbilden (vgl. Materialien und Methoden). Die hier evaluierten Liganden liegen nahe bei oder sogar unterhalb dieses Grenzwerts. Es wird daher angenommen, dass die Liganden der 2. Generation DOTA-TATE-basierter Derivate eine sehr niedrige Affinität zu HSA aufwiesen, wie mit der AMSEC Methode dargestellt. Tendenzen hinsichtlich des Einflusses bestimmter Modifikationen sollten jedoch aus den Ergebnissen der HPAC Methode abgelesen werden. Die mittels HPAC generierten Daten, liegen innerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierung (vgl. Materialien und Methoden). Dieses Vorgehen ist nicht ideal, weshalb in künftigen Projekten beide Methoden tiefergehend evaluiert und validiert werden sollten.

Die Liganden der 2. Generation DOTA-TATE-basierter Derivate erweisen sich als hochaffin zu SST₂ und zeigen hohe Internalisierungsraten. Sie verfügen grundsätzlich über eine geeignete Hydrophilie und auf Basis der kombinierten Ergebnisse von HPAC und AMSEC lässt sich eine niedrige Affinität zu HSA schließen. Die Untersuchung der unkomplexierten Derivate liefert aufgrund des Verlusts an Affinität zur Zielstruktur keine geeigneten Kandidaten für die *in vivo* Anwendung, weshalb dieser

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ansatz nicht weiterverfolgt wird. Dennoch bestätigen diese Liganden die Wichtigkeit der Ga-Komplexierung hinsichtlich der SST₂ Affinität und zeigen ebenso einen deutlichen Einfluss des Komplexierungszustands auf die HSA-Bindung.

Die Liganden [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 und [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 wurden für eine Biodistribution im Mausmodell ausgewählt. Die Derivate wurden vor allem aufgrund ihrer unterschiedlichen HSA-Bindungen in der HPAC Methode gewählt. Da beide Liganden vergleichbare IC₅₀ und LogD_{pH=7.4} Werte aufweisen, sollen im Rahmen der *in vivo* Untersuchung vor allem die Auswirkung der unterschiedlich starken Bindung an HSA bewertet werden.

5.3.3 DOTA-TATE basierte Liganden der 3. Generation

In der 3. Generation der DOTA-TATE-basierten Liganden werden zweierlei Modifikationen eingeführt. Die bereits vorgestellten Liganden [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 und [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 dienen dabei als Vorgängerstrukturen. Die erste Modifikation ist die N-terminale Konjugation von Chinasäure (Chs). Diese Hydroxycarbonsäure soll durch seine Vielzahl an Hydroxyeinheiten, die Lipophilie der Liganden senken.[187, 220] Das Hinzufügen von Chs an rhDTB-2.2 und rhDTB-2.5 liefert die Liganden rhDTB-3.3 und rhDTB-3.2 (vgl. Abbildung 84).

Die zweite Modifikation wird nur auf rhDTB-2.5 der 2. Generation angewandt. Verglichen mit den übrigen Liganden der 2. Generation, weist [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 in der HPAC Methode eine niedrige Affinität zu HSA auf. Es wird daher vermutet, dass die Carboxygruppen des hydrophilen Modifiers die SiFAN⁺Gly-Einheit abschirmen und so die Bindung an HSA verringern. Benachbart zu SiFAN⁺Gly in C-terminaler Richtung, wird zudem eine weitere Carbonsäure in Form einer Glutaminsäure eingebaut. Auf diese Weise soll der Effekt der reduzierten HSA-Bindung weiter verstärkt werden. Die Struktur des resultierenden Liganden rhDTB-3.1 ist in Abbildung 84 gezeigt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

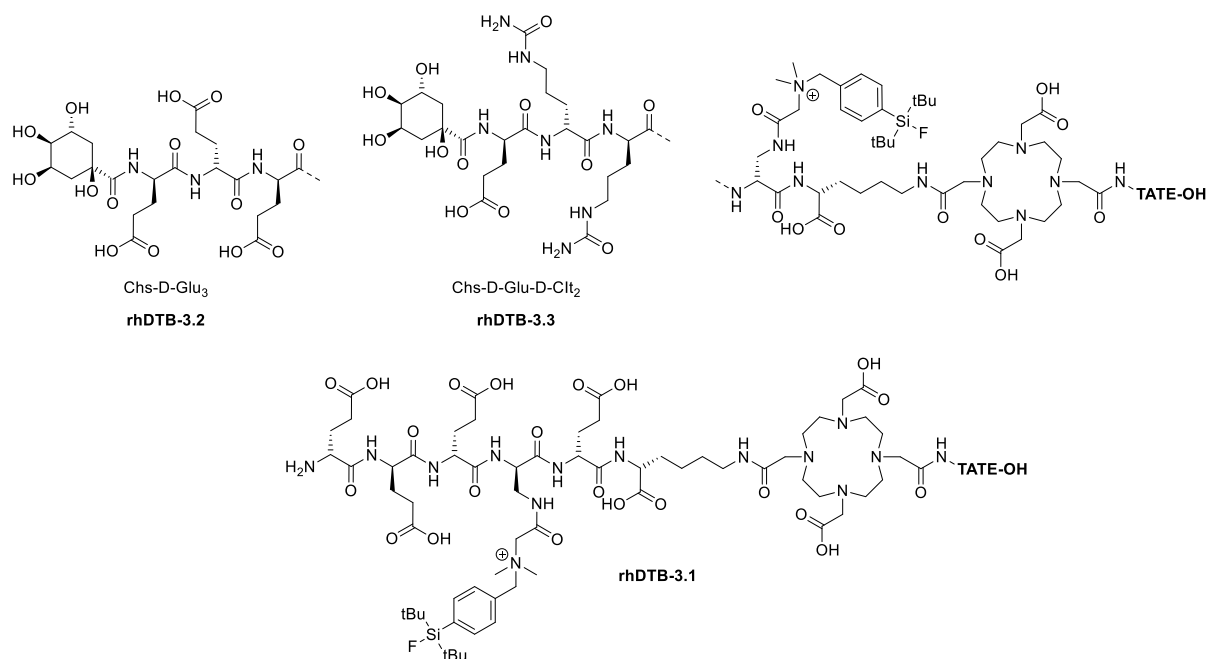


Abbildung 84: Strukturen der Liganden rhDTB-3.2, rhDTB-3.3 und rhDTB-3.1.

Die *in vitro* Daten sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Präklinische Daten der DOTA-TATE basierten Liganden der 3. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: [^{125}I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $LogD_{pH=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [^{125}I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.

Ligand	$IC_{50} \pm SD$ [nM]	$LogD_{pH=7.4}$ $\pm SD$	Internalisierung %	HSA Bindung %	MW_{app} [kDa]	z
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.2	3.31 ± 0.51	-2.30 ± 0.03	550	94.3	6.02	+1
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.5	2.75 ± 0.20	-2.30 ± 0.04	357	84.8	7.07	-1
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-3.1	4.06 ± 0.22	-2.07 ± 0.04	707	85.0	5.69	-2
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-3.2	5.62 ± 0.25	-2.28 ± 0.04	335	84.6	7.04	-2
[$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-3.3	9.17 ± 1.15	-2.12 ± 0.03	474	91.7	5.13	0
[$^{nat/68}Ga$]Ga-DOTA-TATE	1.90 ± 0.07	-3.69[57]	–	88.9	–	0
[$^{nat/177}Lu$]Lu-DOTA-TATE	5.24 ± 1.01	3.88 ± 0.03	245	32.6	1.12	0
[$^{18/19}F$]SiTATE	6.98 ± 0.61	-1.27 ± 0.07	236	86.8	6.96	-1
[$^{18/19}F$]Ga-rhLB-3.2	3.01 ± 0.03	-2.00 ± 0.12	477	90.2	8.18	-1

Die Einführung der Chinasäure führt zu einer Verringerung der SST₂ Affinität ([$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-3.3: $IC_{50} = 9.17 \pm 1.15$ nM; [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-3.2: $IC_{50} = 5.62 \pm 0.25$ nM) verglichen mit den entsprechenden Vorläuferliganden [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.2 ($IC_{50} = 3.31 \pm 0.51$ nM) und [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.5 ($IC_{50} = 2.75 \pm 0.20$ nM) (vgl. Abbildung 85). Die Einführung einer weiteren Glutaminsäure in [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-3.1 verringert die Affinität zur Zielstruktur ($IC_{50} = 4.06 \pm 0.22$ nM) verglichen mit [$^{18/19}F$]Ga-rhDTB-2.5, allerdings nur geringfügig. In allen drei Fällen lassen sich diese

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Veränderungen mit dem Nettoladungskonzept in Zusammenhang bringen.[186, 193] Schon für andere Liganden wurde beobachtet, dass das Hinzufügen von negativen Ladungen in Form von Carbonsäuren ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.1}$) den IC_{50} verschlechtern kann (vgl. 3. *Linkerfreie rhSST₂-Liganden*). Auch das Entfernen positiv geladener Amine wie die *N*-Termini in $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{rhDTB-3.3}$, können für den Verlust an SST_2 Affinität verglichen mit $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$, verantwortlich sein.

Die Internalisierungsraten der mit Chs modifizierten Derivate $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.2}$ (335% nach 60 min) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.3}$ (474% nach 60 min) sind geringfügig niedriger als die der strukturell verwandten Derivate $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ (357% nach 60 min) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ (550% nach 60 min). Die Einführung der Chinasäure nimmt demnach keinen Einfluss auf die Internalisierungsrate. Das zusätzliche Glutamat in $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.1}$ hingegen sorgt für eine erhöhte Internalisierungsrate von 707% nach 60 min.

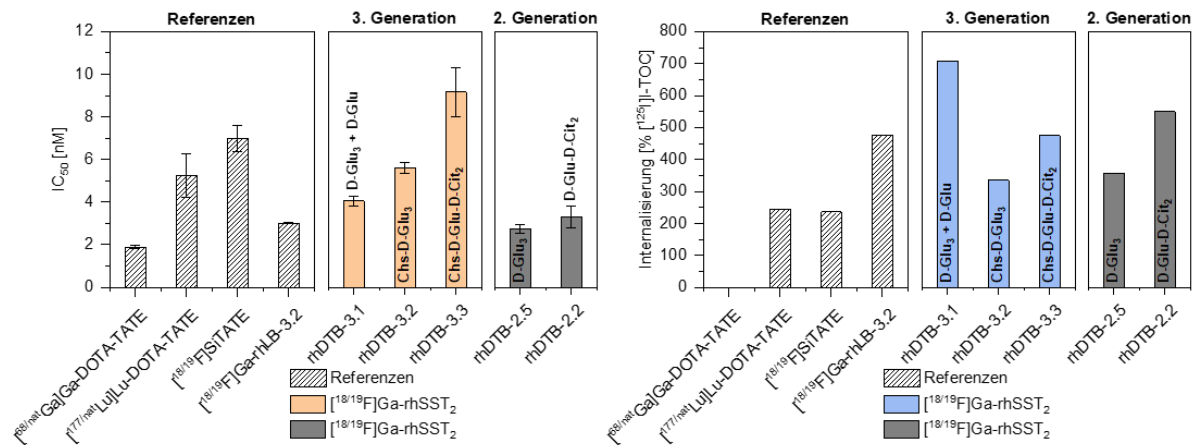


Abbildung 85: IC_{50} und Internalisierung der DOTA-TATE basierten Liganden der 3. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{-TOC}$) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{-TOC}$ in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des hydrophilen Modifiers.

Insgesamt sind die DOTA-TATE-basierten Derivate der 3. Generation hinsichtlich ihrer SST_2 Affinität vergleichbar mit $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ ($\text{IC}_{50} = 6.98 \pm 0.61$ nM), aber der Affinität des linkerbasierten Liganden $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ ($\text{IC}_{50} = 3.01 \pm 0.03$ nM) unterlegen. Die Einführung von Chs oder eines zusätzlichen Glutamats führt zu einer Senkung der SST_2 -Affinität. Im Gegensatz dazu übertreffen die Internalisierungsraten die Referenz $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ (236% nach 60 min) und sind vergleichbar oder sogar höher als die des Linkerbasierten Liganden $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ (477% nach 60 min).

Der mit Chs modifizierte Ligand $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.3}$ zeigt in der HPAC Methode eine HSA-Bindung von 91.7%. Die Einführung der Chinasäure senkt damit die Bindung an HSA verglichen mit dem Vorgänger-Derivat $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ (94.3%) (vgl. Abbildung 86). Die analoge Einführung von Chs in $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ (84.8%) nimmt hingegen keinen Einfluss auf die HSA Affinität, da $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.2}$ einen vergleichbaren Wert von 84.6% zeigt. Der Einbau einer zusätzlichen Glutaminsäure in $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ sollte die HSA-Bindung des resultierenden

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

[^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.1 (85.0%) weiter senken, jedoch ist keine Veränderung der HSA-Bindung zu beobachten.

Die AMSEC Methode bestätigt die Ergebnisse der HPAC Methode für die Chs modifizierten Derivate. [^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.3 weist mit einem apparenten Molekulargewicht von 5.13 kDa einen niedrigeren Wert auf als der Vorgänger [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 (MW_{app} = 6.02 kDa). [^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.2 und [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 zeigen wiederum vergleichbare Werte von 7.04 kDa und 7.07 kDa. Für den Liganden [^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.1 hingegen zeichnet sich in der AMSEC Methode ein anderer Trend ab. Mit einem apparenten Molekulargewicht von 5.69 kDa weist dieser Ligand eine geringere HSA-Bindung auf als das Vorgänger-Derivat [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 (MW_{app} = 7.07 kDa).

Die Affinität zu HSA durch eine weitere Glutaminsäure zu senken, war der AMSEC Methode zu Folge erfolgreich. Die Ergebnisse der zwei Methoden weichen in dieser Hinsicht jedoch voneinander ab, weshalb der Einfluss dieser Modifikation nicht final bewertet werden kann. Auch hier muss bedacht werden, dass die AMSEC Methode nur Molekulargewicht von >6.5 kDa abbilden kann (vgl. Materialien und Methoden). Im Gesamtbild jedoch, ist der Einfluss der neuen Modifikationen auf die Affinität zu HSA, eher gering.

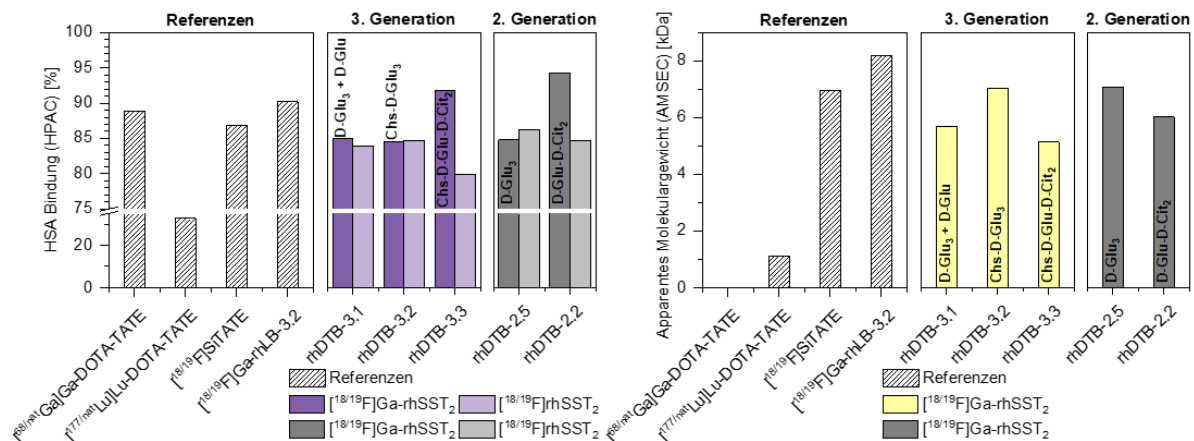


Abbildung 86: HSA-Bindung der DOTA-TATE basierten Liganden der 3. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des hydrophilen Modifiers.

Die Einführung der Chinasäure sollte die Hydrophilie der Liganden erhöhen. Dennoch zeigen die Chs tragenden Liganden [^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.2 (LogD_{pH=7.4} = -2.28 ± 0.04) und [^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.3 (LogD_{pH=7.4} = -2.12 ± 0.03) keine verbesserten LogD_{pH=7.4} Werte gegenüber den Vorgänger Liganden [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 (LogD_{pH=7.4} = -2.30 ± 0.04) und [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 (LogD_{pH=7.4} = -2.30 ± 0.03). Der Literatur folgend, sollte die Einführung eines Kohlenhydrats wie Chs, die Hydrophilie erhöhen.[188] Dieses Konzept konnte für die Klasse der DOTA-TATE basierten Liganden nicht erfolgreich angewendet werden (vgl. Abbildung 87). Ebenfalls außerhalb der Erwartungen liegt der LogD_{pH=7.4} Wert von [^{18/19}F]Ga-rhDTB-3.1 (LogD_{pH=7.4} = -2.07 ± 0.04). Trotz

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

einer zusätzlichen Glutaminsäure,[196] erweist sich dieser Ligand sogar als lipophiler als sein Vorläufer $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$.

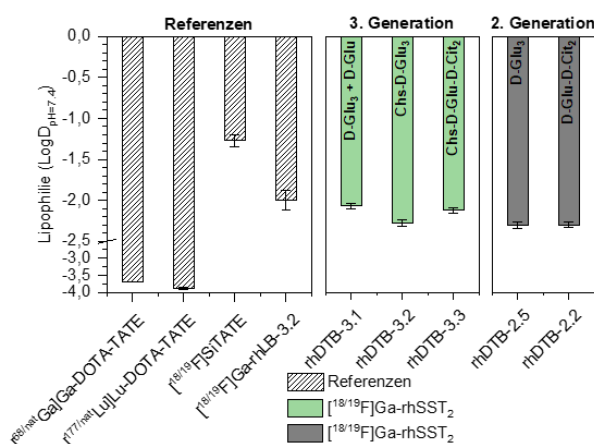


Abbildung 87: Lipophilie der DOTA-TATE basierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanoll und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$).

Die vorgestellten Liganden übertreffen die Hydrophilie von $[^{18/19}\text{F}]\text{SiTATE}$ ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -1.27 \pm 0.07$) und sind vergleichbar mit der Hydrophilie von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.00 \pm 0.12$). Dennoch wurde das Ziel der gesteigerten Hydrophilie nicht erreicht. Die Liganden der 3. Generation DOTA-TATE-basierter Derivate waren hinsichtlich der *in vitro* Daten vergleichbar mit den jeweiligen Vorgänger-Liganden. Daher werden $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.1}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-3.3}$ für weitere Evaluierungen nicht berücksichtigt.

5.4 *In vivo* Biodistribution

$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ und $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ wurden für eine Biodistributionsstudie an AR42J-Tumor tragenden Mäusen ausgewählt. Zusätzlich wurde $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ einer Kompetitions-Studie unterzogen. Dabei erfolgte eine zeitgleiche Injektion des Radiopharmakons mit $20 \mu\text{g}$ TOC, um die Spezifität der Anreicherung in SST_2 exprimierendem Gewebe zu bestätigen.

$[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ zeigen vergleichbare IC_{50} Daten ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$: $\text{IC}_{50} = 3.31 \pm 0.51 \text{ nM}$; $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$: $\text{IC}_{50} = 2.75 \pm 0.20 \text{ nM}$) und ähnliche Lipophilien ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$: $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.30 \pm 0.03$; $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$: $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.30 \pm 0.04$). Die HSA-Bindung, bestimmt mittels der HPAC Methode, zeigt hingegen deutliche Unterschiede ($[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2} = 94.3\%$; $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5} = 84.8\%$).

Die Daten der Biodistributionen 1 h p.i., sind in Abbildung 88 und Tabelle 29 vergleichend zu $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ und $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ dargestellt. Die Tumoranreicherungen von $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ ($27.9 \pm 4.78 \text{ \%ID/g}$) und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ ($18.6 \pm 6.18 \text{ \%ID/g}$) unterscheiden sich stark. Da IC_{50} und Lipophilie vergleichbar sind, ist dieses Verhalten auf die Unterschiede in der %-Bindung an HSA zurückzuführen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Kombination aus niedriger Bindung an HSA und hoher Hydrophilie führt für [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.5 zu einer schnellen, renalen Exkretion. Die schnelle Ausscheidung hat durch eine verkürzte Zirkulation im Blutkreislauf eine verringerte Tumorakkumulation zur Folge. Diese Hypothese wird gestützt, da [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 trotz vergleichbarer HSA-Bindung, eine geringere Tumorakkumulation als [¹⁸F]SiTATE (22.7 ± 2.68 %ID/g) aufweist. In [¹⁸F]SiTATE wird eine hohe Lipophilie ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -1.27 \pm 0.07$) mit einer niedrigen HSA-Bindung (HPAC = 86.8%) kombiniert. Die Exkretion von [¹⁸F]SiTATE wird, trotz der niedrigen HSA-Affinität, durch die erhöhte Lipophilie verzögert. Dies führt wiederum zu einer höheren Tumoranreicherung. Wird jedoch eine geringe Lipophilie mit einer ebenfalls geringen Lipophilie kombiniert, könnte dies in einer geringeren Tumoranreicherung resultieren (vgl. [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5). Gestützt wird dies durch den mehr als zweifach erhöhte Blutakkumulation von [¹⁸F]SiTATE, die aus einer verzögerten Exkretion resultiert ([¹⁸F]SiTATE = 0.81 ± 0.11 %ID/g; [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.5 = 0.32 ± 0.11 %ID/g).

Der Ligand [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 weist eine höhere HSA-Bindung als [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 auf und liefert eine höhere Tumorakkumulation ([^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 = 27.9 ± 4.78 %ID/g). Die Kombination aus geringer Lipophilie aber erhöhter Bindung an HSA ist hierfür verantwortlich. Die daraus resultierende längere Zirkulation im Blut, sorgt wiederum für eine erhöhte Akkumulation in SST₂ exprimierenden Gewebestrukturen wie Tumor, Magen ([^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 = 13.4 ± 1.60 %ID/g; [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 = 6.46 ± 1.00 %ID/g), Pankreas ([^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 = 31.5 ± 2.32 %ID/g; [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 = 11.5 ± 2.32 %ID/g) und Nebennieren ([^{18/19}F]Ga rhDTB 2.2 = 4.35 ± 0.69 %ID/g; [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 = 1.52 ± 0.21 %ID/g). Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass die Akkumulation im Blut für [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.2 (0.39 ± 0.19 %ID/g) und [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.5 (0.32 ± 0.11 %ID/g) vergleichbar ist. Bei einer längeren Zirkulation, sollte dieser Wert für [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.2 erhöht sein. Daher lässt sich das unterschiedliche Verhalten dieser beiden Liganden nicht abschließend klären.

Im Vergleich mit der Lead-Compound [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 lässt sich dennoch für beide Liganden ein positives Fazit ziehen. [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.2 zeigt tendenziell niedrigere Tumor/Organ Verhältnisse (vgl. Tabelle 29). Allerdings zeichnet sich dieser Ligand auch durch die hohe Akkumulation in SST₂ exprimierenden Organen aus. Die Anwendung dieses Liganden im humanen Modell sollte in Erwägung gezogen werden, um zu evaluieren, wie sich diese spezifische Kombination aus HSA-Bindung und Lipophilie im Menschen auswirkt. [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.5 zeigt eine niedrigere Tumorakkumulation als [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2, liefert aber dennoch vergleichbare oder sogar höhere Tumor/Organ Verhältnisse. Daraus könnte in der PET-Bildgebung ein verbesserter Kontrast resultieren, der die schwächere Tumoranreicherung kompensiert. Auch hier wäre eine Anwendung am Menschen von Interesse.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

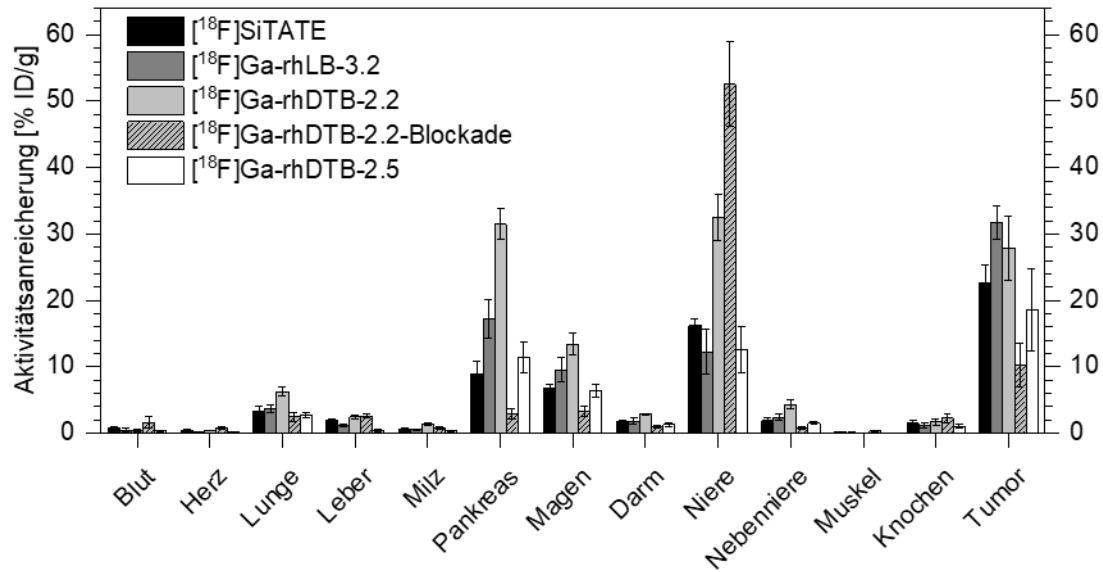


Abbildung 88: Biodistribution von $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$ ($n = 5$), $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ ($n = 4$), $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ ($n = 3$), $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$ ($n = 5$), und Blockadestudie von $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$ ($n = 3$) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert \pm SD).

Tabelle 29: **A:** Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert \pm SD). **B:** Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.

A		$[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2-Blockade}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$
	%ID/g					
	Blut	0.81 \pm 0.11	0.50 \pm 0.21	0.39 \pm 0.19	1.63 \pm 0.89	0.32 \pm 0.11
	Herz	0.47 \pm 0.06	0.27 \pm 0.03	0.33 \pm 0.01	0.77 \pm 0.24	0.18 \pm 0.05
	Lunge	3.38 \pm 0.62	3.73 \pm 0.57	6.29 \pm 0.65	2.47 \pm 0.70	2.73 \pm 0.46
	Leber	1.97 \pm 0.25	1.22 \pm 0.18	2.43 \pm 0.36	2.62 \pm 0.28	0.40 \pm 0.12
	Milz	0.66 \pm 0.08	0.55 \pm 0.06	1.31 \pm 0.20	0.86 \pm 0.23	0.35 \pm 0.07
	Pankreas	8.94 \pm 1.98	17.3 \pm 2.87	31.5 \pm 2.32	2.96 \pm 0.74	11.5 \pm 2.32
	Magen	6.75 \pm 0.58	9.54 \pm 1.83	13.4 \pm 1.60	3.29 \pm 0.76	6.46 \pm 1.00
	Darm	1.67 \pm 0.21	1.84 \pm 0.45	2.87 \pm 0.15	0.99 \pm 0.20	1.30 \pm 0.25
	Niere	16.3 \pm 1.00	12.3 \pm 3.40	32.6 \pm 3.50	52.6 \pm 6.37	12.5 \pm 3.50
	Nebenniere	1.89 \pm 0.37	2.39 \pm 0.53	4.35 \pm 0.69	0.84 \pm 0.17	1.52 \pm 0.21
	Muskel	0.15 \pm 0.02	0.10 \pm 0.03	0.06 \pm 0.00	0.35 \pm 0.10	0.04 \pm 0.02
	Knochen	1.54 \pm 0.34	1.23 \pm 0.41	1.70 \pm 0.45	2.26 \pm 0.70	1.05 \pm 0.30
	Tumor	22.7 \pm 2.68	31.8 \pm 2.49	27.9 \pm 4.78	10.3 \pm 3.26	18.6 \pm 6.18

B		$[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.2-Blockade}$	$[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-2.5}$
	Tumor/Organ					
	/Blut	28.1	63.2	72.3	6.31	58.1
	/Herz	48.6	117.5	84.9	13.3	101
	/Lunge	6.72	8.53	4.43	4.17	6.83
	/Leber	11.5	26.1	11.5	3.94	46.8
	/Milz	34.2	57.5	21.3	12.1	52.9
	/Pankreas	2.54	1.84	0.89	3.48	1.62
	/Magen	3.37	3.33	2.08	3.14	2.89
	/Darm	13.6	17.3	9.73	10.5	14.4
	/Niere	1.40	2.59	0.86	0.20	1.49
	/Nebenniere	12.0	13.3	6.41	12.3	12.2
	/Muskel	150.7	305.9	460.2	29.3	419.5
	/Knochen	14.7	25.8	16.4	4.56	17.8

6. Radiofluorierung mit [¹⁸F]Fluorid

6.1 Manuelle Radiofluorierung von SiFA-Liganden

Die ersten Fluorierungen von SiFA-Derivaten mit [¹⁸F]Fluorid wurden von *Schirmacher et al.* beschrieben. In diesen ersten Arbeiten wurde das wässrige [¹⁸F]Fluorid mittels Acetonitril azeotrop getrocknet.[102, 124, 130] Um diesen zeitintensiven Syntheseschritt zu umgehen, wurde von *Wessmann et al.* die sogenannte *Munich Methode* entwickelt.[159] *Kostikov et al.* gelang es später, die *Munich Methode* auf die Radiofluorierung von SiFA-Liganden anzuwenden.[160] Das wässrige [¹⁸F]Fluorid wird dabei auf einer Carbonat-basierten Anionenaustausch-Kartusche (SAX Kartusche; QMA Carbonat) immobilisiert. Die Kartusche wird durch Flutung mit Luft und trockenem Acetonitril getrocknet und das [¹⁸F]Fluorid wird mittels einer Lösung aus [K⁺ ⊂ 2.2.2]OH⁻ Kryptand in trockenem Acetonitril eluiert. Die stark basische Lösung wird durch Zugabe einer definierten Menge Oxalsäure neutralisiert. Ein zwingend notwendiger Schritt vor der Zugabe des SiFA-Liganden, da die SiFA-Einheit in basisch-wässriger Umgebung hydrolysiert. Nach der Zugabe des SiFA-Liganden verläuft die Reaktion bei Raumtemperatur. Nach der Aufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE-Kartusche), kann der gelöste Radioligand isoliert werden.[103, 160]

Das klinisch angewandte [¹⁸F]SiTATE wird mittels der beschriebenen Methodik mit [¹⁸F]Fluorid markiert.[131, 139, 157] Im Zuge der Automatisierung der Radiomarkierung wurde jedoch die Instabilität des peptidischen SiTATE im direkten Kontakt mit Oxalsäure beschrieben.[143] Um dieses Problem zu umgehen, wird in dieser Arbeit eine mildere Fluorierungsmethode angewandt, die am Lehrstuhl für pharmazeutische Radiochemie der Technischen Universität München (TUM) entwickelt wurde (*nicht publizierte Resultate nach Di Carlo et al.*). Diese benötigt weder die stark basische [K⁺ ⊂ 2.2.2]OH⁻ Kryptand Lösung, noch die Oxalsäure. Das Vorgehen ist in Abbildung 89 dargestellt.

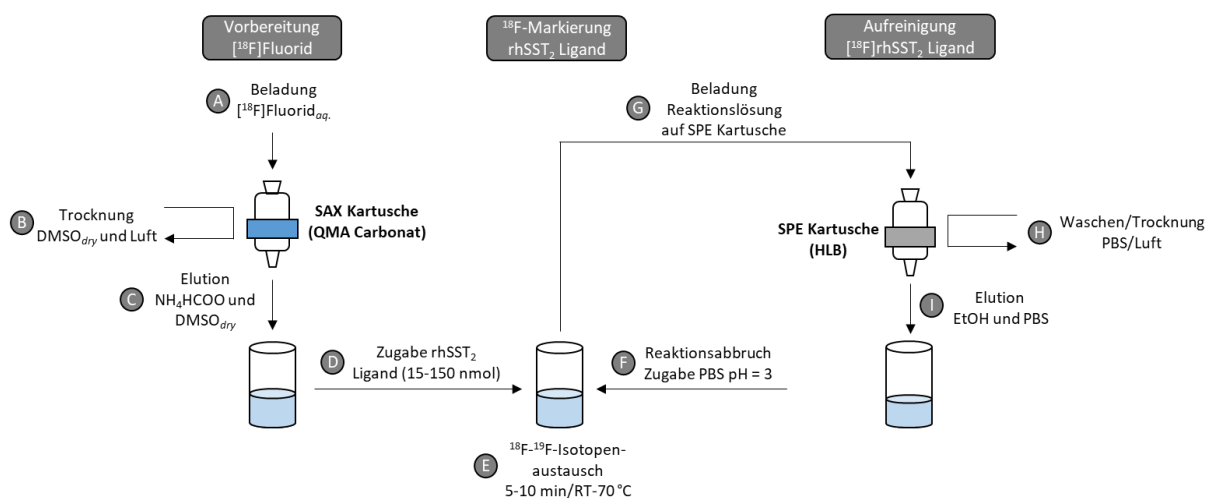


Abbildung 89: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Fluorierungsmethode, angelehnt an das Vorgehen in der *Munich Methode*.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ähnlich wie in der *Munich Methode*, wird das [^{18}F]Fluorid_{aq.} auf einer Anionenaustausch Kartusche (QMA Carbonat) immobilisiert (**A**). Anschließend erfolgt die Trocknung mittels trockenem DMSO (**B**). Die Elution (**C**) erfolgt mit Ammoniumformiat (NH_4HCOO) gelöst in trockenem DMSO. Zu dieser Lösung werden 15 bis 150 nmol des in trockenem DMSO gelösten SiFA-Liganden gegeben (**D**). Die Reaktion kann sowohl bei Raumtemperatur als auch bei erhöhter Temperatur (bis zu 70 °C) erfolgen und wird üblicherweise nach 5 bis 10 min abgebrochen (**E**). Der Isotopenaustausch (**F**) wird durch die starke Verdünnung mit PBS (pH = 3) gestoppt. Um den ^{18}F -Liganden von nicht inkorporiertem [^{18}F]Fluorid zu trennen, wird dieser auf einer SPE-Kartusche (Oasis HLB, 30 mg Sorbens) immobilisiert (**G**). Die Kartusche wird mit PBS gewaschen und mit Luft getrocknet (**H**) und der Ligand final mit einer Mischung aus EtOH und PBS oder EtOH und H_2O eluiert (**I**).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die QMA Carbonat Kartusche mit 40 mg NH_4HCOO in 500 μL DMSO_{dry} eluiert. Dabei wird [^{18}F]Fluorid mit einer Extraktionseffizienz von $87.6 \pm 4.7\%$ gewonnen. Für die *Munich Methode* werden höhere Werte von $>95\%$ erreicht.[157] Die neue Methode erweist sich in dieser Hinsicht als weniger effizient, allerdings wird mit der gegebenen Extraktionseffizienz dennoch eine ausreichend hohe molare Aktivität erzeugt.

6.2 Optimierung des Isotopenaustauschs

Die Isotopenaustauschreaktion wurde hinsichtlich der Parameter Zeit, Temperatur und Stoffmenge des zu markierenden Liganden optimiert. Die Optimierungen wurden beispielhaft am linkerbasierten Liganden [^{18}F]Ga-rhLB-3.1 durchgeführt, da vor allem die linkerbasierten Derivate für eine potentielle humane Anwendung von Interesse sind. Ausgegangen wurde dabei von den zuvor etablierten Grundbedingungen (*nicht publizierte Resultate*): 5 min Reaktionsdauer, 30 nmol zu markierender Ligand und Reaktion bei Raumtemperatur. Die eingesetzte Menge [^{18}F]Fluorid wurde bei allen Optimierungsschritten, soweit möglich, konstant gehalten und lag zum Zeitpunkt der jeweiligen Reaktion bei 50 – 60 MBq. Die [^{18}F]Fluorid Inkorporation wurde aus der Reaktionslösung mittels Radio-Dünnschichtchromatographie ermittelt. Dabei wurde jede Variation von Reaktionszeit, Temperatur und eingesetzter Peptidstoffmenge zweifach durchgeführt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet. Die Radiochemische Reinheit wurde nach der Aufreinigung *via* SPE-Kartusche (HLB, 30 mg Sorbensmenge) mittels RP-HPLC ermittelt.

6.2.1 Reaktionszeit

Zunächst wurde die Reaktionszeit des [^{18}F]Fluorid mit [^{19}F]Ga-rhLB-3.1 optimiert. Dazu wurden 30 nmol des Liganden bei Raumtemperatur (25 °C) für 1, 3, 5, 10, 15 und 30 min mit [^{18}F]Fluorid inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 90 graphisch dargestellt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

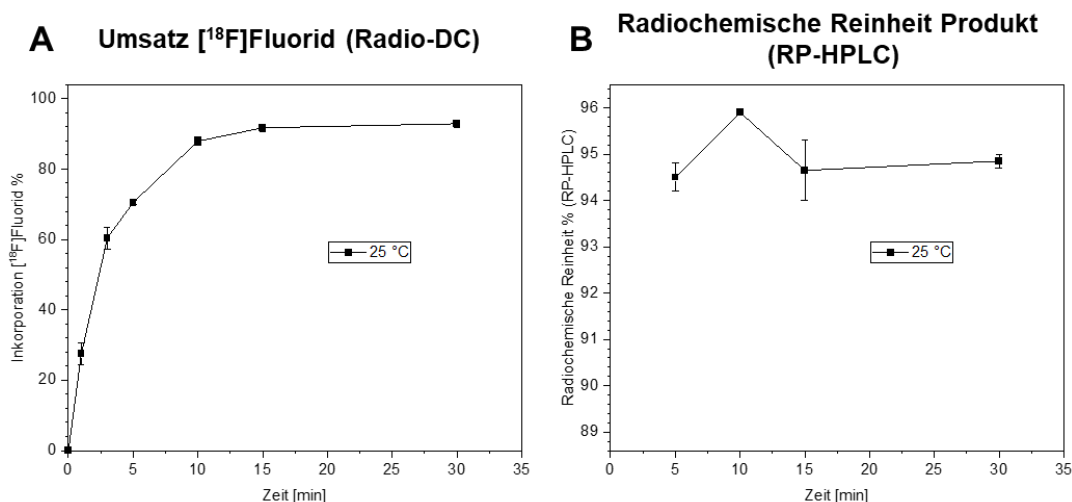


Abbildung 90: **A:** [¹⁸F]Fluorid Inkorporation in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit in min bei 25 °C (x-Achse). Bestimmt mittels Radio-Dünnschichtchromatographie. **B:** radiochemische Reinheit in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit in min bei 25 °C (x-Achse). Bestimmt mittels RP-HPLC.

Der Umsatz der [¹⁸F]Fluorid Inkorporation erreicht bereits nach 10 bis 15 min ein Maximum von 88 bis 92% und liegt nach nur 5 min Reaktionszeit bereits bei 71%. Wie zuvor in 4.4.2 *Markierungschemie und mechanistische Aspekte* beschrieben, begründet sich dieser schnelle Isotopenaustausch in der niedrigen Aktivierungsenergie ($E_a = 65.6 \text{ kJ/mol}$) und dem hohen präexponentiellen Faktor A ($A = 7.6 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). [127] Der präexponentielle Faktor A beschreibt die Kollisionsfrequenz zweier Reaktanden und stellt damit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Reaktion dar. [128] Zusätzlich werden für alle untersuchten Zeitpunkte hohe Radiochemische Reinheiten von durchschnittlich $95.0 \pm 0.7\%$ erreicht.

Verglichen mit der Literatur verlaufen die Radiomarkierungen der hier vorgestellten Liganden unter ähnlichen Bedingungen. *Kostikov et al.* erreichen ein Maximum der RCY zwar bereits nach 3 – 5 min, jedoch wird in deren Arbeit der reine SiFAN⁺ Baustein, ohne peptidischen Ligand, eingesetzt. [127] Die Vermutung liegt nahe, dass das Peptid aufgrund seiner Sterik Einfluss auf den Umsatz nimmt. *Lindner et al.* beschreiben für ihre SiFA-RGD Derivate Umsätze von 75 – 95% nach 15 min bei Raumtemperatur (25 nmol Peptid), [141] und *Wängler et al.* erreichen für ihre Octreotate-Liganden nach 5 min bei Raumtemperatur 40 – 60% Umsatz (10 – 25 nmol). [140]

Da ¹⁸F eine geringe Halbwertszeit von nur 109.7 min aufweist, ist eine möglichst schnelle Reaktionsdurchführung zu bevorzugen. [83] Aus diesem Grund wurden sowohl 5 als auch 10 min Reaktionszeit für weitere Optimierungen gewählt. Eine Reaktionszeit von 15 min wurde nicht weiterverfolgt, da die Umsatzsteigerung gegenüber 10 min vernachlässigbar ist und eher den Nachteil einer längeren Syntheszeit und einer geringeren A_m birgt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.2.2 Reaktionstemperatur

Basierend auf den Ergebnissen zur Variation der Reaktionszeit, wurden für Reaktionen mit einer Dauer von 5 und 10 min der Einfluss verschiedene Reaktionstemperaturen untersucht. Dazu wurden 30 nmol [¹⁹F]Ga-rhLB-3.1 eingesetzt und bei Raumtemperatur (25 °C), 40 °C, 55 °C und 70 °C für jeweils 5 und 10 min mit [¹⁸F]Fluorid inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 91 graphisch dargestellt.

Die Temperatur nimmt sowohl bei 5 als auch bei 10 min Reaktionszeit deutlichen Einfluss auf die [¹⁸F]Fluorid Inkorporation. Die Durchführung bei 40 °C erhöht den Umsatz bereits signifikant im Vergleich zur Reaktion bei Raumtemperatur und liefert bei 10 min Reaktionszeit den bisher höchsten Wert von 95.4 ± 0.2%. Erst ab einer Temperatur von 55 °C ist zwischen den Umsätzen bei 5 und 10 min kein Unterschied mehr feststellbar. Gleichzeitig bleibt die radiochemische Reinheit zwischen 25 °C und 55 °C weiterhin hoch und liegt durchschnittlich bei 95.5 ± 0.6%. Erst bei einer Temperatur von 70 °C nimmt die radiochemische Reinheit ab. Die erhöhte Temperatur führt zu einer Zersetzung des Peptids, wodurch in der RP-HPLC Fragmente zu beobachten sind. Gleichzeitig nimmt auch die Inkorporationseffizienz des [¹⁸F]Fluorid ab. Es ist denkbar, dass es bei erhöhter Reaktionstemperatur zu einer teilweisen Zersetzung des SiFA-Bausteins kommt, wodurch die [¹⁸F]Fluorid-Inkorporation wieder gesenkt wird.

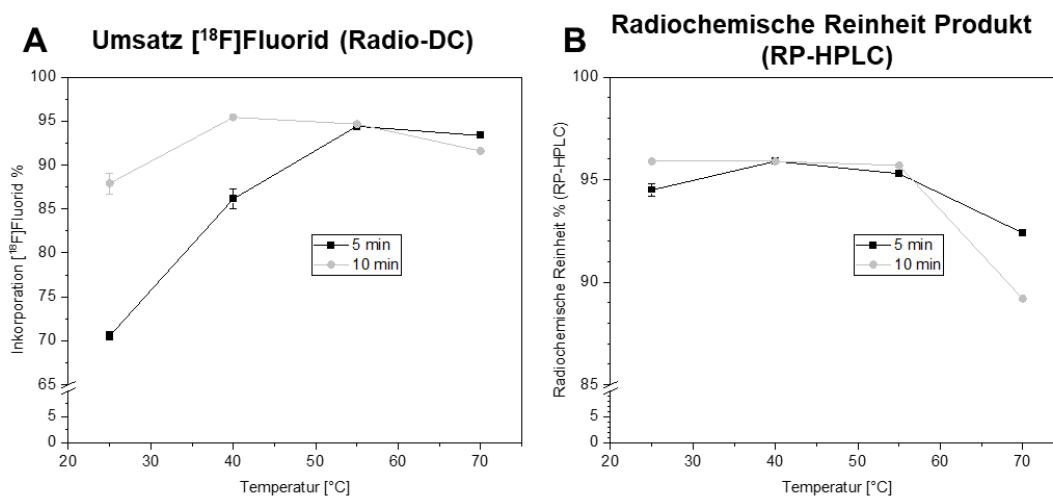


Abbildung 91: **A:** [¹⁸F]Fluorid Inkorporation in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in °C für 5 und 10 min Reaktionszeit (x-Achse). Bestimmt mittels Radio-Dünnschichtchromatographie. **B:** radiochemische Reinheit in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in °C für 5 und 10 min Reaktionszeit (x-Achse). Bestimmt mittels RP-HPLC.

Die Kombinationen aus 5 min Reaktionszeit bei 55 °C und 10 min bei 40 °C liefern hohe Umsätze von 94.4 ± 0.3% und 95.4 ± 0.2%. Diese Werte übertreffen die [¹⁸F]Fluorid Inkorporation mittels der *Munich Methode*. Für diese wurden Werte von 87 ± 9% beschrieben.[182] Ob eine erhöhte Temperatur von 55 °C, von dem zu markierenden Peptid toleriert wird, muss individuell untersucht werden.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.2.3 Stoffmenge des rhSST₂-Liganden

Abschließend wurde der Einfluss verschiedener Stoffmengen des Liganden auf die [¹⁸F]Fluorid Inkorporation untersucht. Dazu wurden 5, 15, 30 und 50 nmol [¹⁹F]Ga-rhLB-3.1 eingesetzt und bei Raumtemperatur (25 °C) für 5 min zur Reaktion belassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 92 graphisch dargestellt.

Zwischen 5 und 30 nmol des Liganden ergibt sich für die [¹⁸F]Fluorid Inkorporation ein annähernd linearer Verlauf. Auf dieser Gerade führt eine Verdoppelung der Stoffmenge annähernd zu einer Verdoppelung der [¹⁸F]Fluorid Inkorporation. Daraus resultiert eine gleichbleibende molare Aktivität. Erst ab einer Stoffmenge von 50 nmol geht die Gerade in einen kurvenähnlichen Verlauf über.

In der Literatur werden für verschiedene SiFA-Derivate für 25 nmol des zu markierenden Liganden zwischen 60% und 95% [¹⁸F]Fluorid-Inkorporation beschrieben.[103, 140, 141] Aus Abbildung 92 lassen sich für 25 nmol etwa 60% Inkorporation ablesen. Dies liegt im Vergleich zur Literatur zwar am unteren Rand der beschriebenen Werte, aber dennoch in einer vergleichbaren Größenordnung.

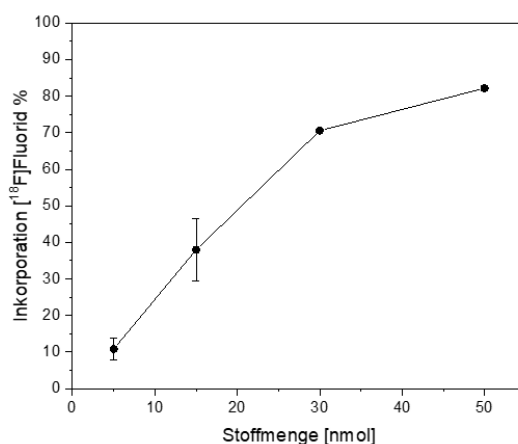


Abbildung 92: [¹⁸F]Fluorid Inkorporation in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffmenge des Peptids in nmol (x-Achse). Bestimmt mittels Radio-Dünnschichtchromatographie.

Im Labormaßstab bleiben 30 nmol auch weiterhin die bevorzugte Stoffmenge für die rhSST₂-Liganden. Die A_m ist für 30 nmol Ligand vergleichbar mit Einsatz geringerer Stoffmengen aber die Inkorporationseffizienz des [¹⁸F]Fluorids ist mit $70.6 \pm 0.5\%$ höher. Da auf diesem Weg weniger [¹⁸F]Fluorid benötigt wird, ist dieses Vorgehen, im Rahmen der präklinischen Evaluierung, zu bevorzugen. Es gilt zu beachten, dass in diesen Studien geringe Mengen [¹⁸F]Fluorid eingesetzt wurden (50 – 60 MBq). Für eine humane Anwendung werden üblicherweise 3 – 7 GBq benötigt.[103] Für diese hohen Startaktivitäten muss die optimale Ligandstoffmenge neu ermittelt werden.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

6.2.4 Fazit der Optimierungen

Die verschiedenen Optimierungen zeigen, dass Reaktionszeit, Temperatur und die Stoffmenge des Liganden Einfluss auf die Effizienz der Radiomarkierung nehmen. Im Labormaßstab erweisen sich 30 nmol des Liganden als praktikabel. Bei der Reaktionszeit und der Temperatur liefern vor allem die Kombinationen aus 5 min bei 55 °C und 10 min bei 40 °C die vielversprechendsten Werte für die [¹⁸F]Fluorid Inkorporation. Da diese Optimierungen erst am Ende dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden die Fluorierungen im Allgemeinen dennoch bei Raumtemperatur und mit nur 5 min Reaktionszeit durchgeführt.

6.3 Optimierung der finalen Kartuschenreinigung

Die Reinigung mittels Festphasenextraktion an einer SPE-Kartusche ist ein entscheidender Schritt in der ¹⁸F-Markierung. Wird der Ligand nicht auf der Kartusche retentiert oder kann durch die falsche Wahl des Elutionsmittels nicht mehr von der Kartusche eluiert werden, sinkt die radiochemische Ausbeute erheblich. *Wurzer et al.* etablierten für die rhPSMA-Liganden bereits die Oasis HLB Kartusche (30 mg Sorbens).[151, 182] Daher findet diese auch in dieser Arbeit Anwendung.

In einer ersten Optimierung wurde [¹⁸F]Ga-rhLF-9 mit [¹⁸F]Fluorid radiomarkiert. 30 nmol des Liganden wurden für 5 min bei 70 °C mit [¹⁸F]Fluorid inkubiert. Nach der Beladung der HLB Kartusche wurde unter anderem das von *Wurzer et al.* beschriebene Elutionsmittelgemisch EtOH/H₂O 1/1 (v/v) eingesetzt.[151, 182] Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 dargestellt.

Mit diesem Gemisch können jedoch nur 3% des Liganden von der Kartusche isoliert werden (Eintrag 1). Eine Erhöhung des EtOH Anteils auf 70% liefert 26% Elutionseffizienz und für 90% EtOH werden 30% Elutionseffizienz erreicht (Einträge 2 und 3). Eine analoge Testreihe mit MeCN und H₂O in den gleichen Verhältnissen führt zu einer maximalen Elutionseffizienz von nur 13% (Einträge 4 – 6). Da MeCN aufgrund seiner Toxizität für eine *in vivo* Anwendung problematisch ist, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.[221]

Tabelle 30: Variation des Elutionsmittels bei der Aufreinigung von [¹⁸F]Ga-rhLF-9 mittels Festphasenextraktion.

Nr.	Elutionsmittel (300 µL)	Volumen-Anteile v/v	Elutionseffizienz [¹⁸ F]Ga-rhLF-9 in %
1	EtOH/H ₂ O	1/1 v/v	3
2	EtOH/H ₂ O	7/3 v/v	26
3	EtOH/H ₂ O	9/1 v/v	30
4	MeCN/H ₂ O	1/1 v/v	2
5	MeCN/H ₂ O	7/3 v/v	13
6	MeCN/H ₂ O	9/1 v/v	2

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Hinblick auf die *in vivo* Anwendung ist die Wahl des organischen Lösemittels eingeschränkt. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe unter anderem der wässrige Anteil im Gemisch variiert. Diese Testreihe wurde mit [¹⁸F]Ga-rhLF-4 als Ligand durchgeführt (Tabelle 31). Für Einträge 7 bis 9 wurde die Reaktionslösung jeweils auf eine HLB Kartusche beladen, während für Eintrag 10 eine Oasis C18 Kartusche (105 mg Sorbens) zum Einsatz kam. Als Referenzpunkt wurde für Eintrag 7 erneut mit EtOH/H₂O 1/1 (v/v) eluiert, wobei nur 2% des immobilisierten Liganden isoliert werden können. In einem zweiten Test wurde PBS anstelle von H₂O eingesetzt. Die in dieser Arbeit entwickelten rhSST₂-Liganden weisen im Allgemeinen eine Vielzahl geladener Aminosäuren auf. Durch die Salze in der PBS-Lösung sollte die starke Wechselwirkung zwischen diesen Aminosäuren und dem Kartuschenmaterial aufgebrochen werden. Auch in diesem Fall wird nur eine geringe Elutionseffizienz von 10% erreicht (Eintrag 8.1) und auch nach 3-maliger Elution mit je 300 µL wird dieser Wert auf nur insgesamt 49% erhöht (Eintrag 8.2). In einem weiteren Versuch wurde die Elutionsrichtung geändert. Bisher verlief der Volumenstrom durch die Kartusche für Beladung, Spülschritt und Elution in derselben Richtung. Für Eintrag 9 hingegen, wurde die Elution entgegen der Beladungsrichtung durchgeführt. Dies liefert für die Elutionseffizienz den bisher höchsten Wert von 68%. Der gleiche Versuch wurde auch mit einer Oasis C18 Kartusche (105 mg Sorbens) durchgeführt. Dies resultiert jedoch nur in 27% Elutionseffizienz.

Tabelle 31: Variation des Elutionsmittels, der SPE-Kartusche und der Elutionsrichtung bei der Aufreinigung von [¹⁸F]Ga-rhLF-4 mittels Festphasenextraktion.

Nr.	Elutionsmittel (300 µL)	Volumen-Anteile v/v	SPE-Kartusche	Elutionsrichtung	Elutionseffizienz [¹⁸ F]Ga-rhLF-4 in %
7	EtOH/H ₂ O	1/1 v/v	Oasis HLB (30 mg)	Standard	2
8.1	EtOH/PBS	1/1 v/v	Oasis HLB (30 mg)	Standard	10
8.2	EtOH/PBS (900 µL)	1/1 v/v	Oasis HLB (30 mg)	Standard	49
9	EtOH/PBS	1/1 v/v	Oasis HLB (30 mg)	Invers	68
10	EtOH/PBS	1/1 v/v	Oasis C18 (105 mg)	Invers	27

Eine letzte Optimisierungsrunde wurde mit [¹⁸F]SiTATE als Ligand durchgeführt (Tabelle 32). Einträge 1 – 6 in Tabelle 30 zeigen, dass ein höherer Anteil EtOH die Elutionseffizienz teilweise erhöht. Dies wurde auf das EtOH/PBS Gemisch angewandt. Für EtOH/PBS 1/1 (v/v) werden 59% des Liganden von der HLB Kartusche isoliert (Eintrag 11). Durch Erhöhung des EtOH-Anteils (Eintrag 12) wird die bisher höchste Elutionseffizienz von 92% erreicht. Eine weitere Erhöhung auf 80% EtOH war nicht möglich, da die Salze der Pufferlösung als Feststoff ausfielen.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 32: Variation des Elutionsmittels bei der Aufreinigung von [¹⁸F]SiTATE mittels Festphasenextraktion.

Nr.	Elutions-Mittel (300 µL)	Volumen-Anteile v/v	SPE-Kartusche	Elutionsrichtung	Elutionseffizienz [¹⁸ F]SiTATE in %
11	EtOH/PBS	1/1 v/v	Oasis HLB (30 mg)	Standard	59
12	EtOH/PBS	7/3 v/v	Oasis HLB (30 mg)	Standard	92

Beim Vergleich von Tabelle 31 mit Tabelle 32 fällt auf, dass für Eintrag 11 ([¹⁸F]SiTATE) und Eintrag 9 ([¹⁸F]Ga-rhLF-9) vergleichbare Elutionseffizienzen von 59% und 68% erreicht wurden. Allerdings musste für [¹⁸F]SiTATE nicht die inverse Elution angewendet werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die inverse Elution nur bei stark positiv geladenen Liganden wie [¹⁸F]Ga-rhLF-4 oder [¹⁸F]Ga-rhLF-9 angewendet werden muss. Die freien Amine der Ornithin-Seitenketten oder die Guanidin-Funktionalitäten der Arginine in [¹⁸F]Ga-rhLF-6 wechselwirken stärker mit der Kartuschenmatrix als andere Funktionalitäten. Liganden mit einer geringen Zahl an positiven Ladungen können in Standardrichtung eluiert werden.

Die Aufreinigung mittels SPE-Kartusche ist bei rhSST₂-Liganden mit einer Oasis HLB (30 mg Sorbens) durchzuführen. Je nach Ladungszustand des Liganden muss die Elutionsrichtung relativ zur Beladungsrichtung umgekehrt werden. Final wird EtOH/PBS in einem Volumenverhältnis von 7/3 (v/v) als ideales Elutionsmittel identifiziert.

6.4 Radiosynthese der verschiedenen rhSST₂-Ligandklassen

Die Radiosynthese der in dieser Arbeit vorgestellten Liganden erfolgte analog zu dem unter 6.1 *Manuelle Radiofluorierung von SiFA-Liganden* beschriebenen allgemeinen Vorgehen. Für die linkerfreien Liganden wurde bevorzugt eine Reaktionszeit von 5 min und eine Reaktionstemperatur von 70 °C gewählt. Um einer potentiellen Zersetzung bei hohen Temperaturen vorzubeugen, wurden die Synthesen der linkerbasierten und DOTA-TATE-basierten Liganden bei Raumtemperatur mit einer Reaktionszeit von 5 min durchgeführt. Die eingesetzte Stoffmenge der Liganden betrug zwischen 10 und 30 nmol.

In Tabelle 33 sind die Resultate der Fluorierungen als Mittelwerte angegeben. Dabei sind die Daten der linkerfreien Liganden, der linkerbasierten Liganden der 2. Generation, der linkerbasierten Liganden der 3. Generation und der DOTA-TATE-basierten Derivate mit einer Standardabweichung angegeben. Auf diese Weise sollen Unterschiede zwischen den Ligandklassen sichtbar werden.

Die radiochemischen Ausbeuten (RCY) sind sowohl zerfallskorrigiert (d.c) als auch nicht zerfallskorrigiert (n.d.c) dokumentiert. Die radiochemische Reinheit (RCP) wurde einerseits per Radiodünnschichtchromatographie (DC) andererseits per RP-HPLC ermittelt. In der DC ist freies [¹⁸F]Fluorid detektierbar, falls dieses während der Kartuschen Reinigung nicht abgetrennt wurde. Mittels der RP-HPLC können hingegen peptidische Verunreinigungen oder Zersetzungsprodukte

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

detektiert werden. Die A_m ist in GBq/ μ mol angegeben. Da es hier zu starken Schwankungen kam, wird kein Mittelwert gebildet, sondern der minimal und maximal erreichte Wert angegeben.

Tabelle 33: Ergebnisse der [^{18}F]Fluorierungen. Angegeben sind die radiochemischen Ausbeuten (RCY) und die radiochemischen Reinheiten (RCP) als Mittelwerte über die gesamte Ligandklasse mit Standardabweichung (SD). Die RCY wurde sowohl nicht zerfallskorrigiert (n.d.c.) als auch zerfallskorrigiert (d.c.) ermittelt. Die RCP wurde mittels Radio-Dünnschichtchromatographie (DC) und Radio-RP-HPLC (HPLC) bestimmt. Die molare Aktivität (A_m) ist in GBq/ μ mol als min. – max. Spanne angegeben.

Ligand Gruppe	RCY \pm SD (n.d.c) %	RCY \pm SD (d.c) %	RCP \pm SD (DC) %	RCP \pm SD (HPLC) %	A_m min. – max. (n.d.c) [GBq/μmol]
Linkerfrei	23.7 \pm 11.4	32.7 \pm 15.3	96.0 \pm 4.7	95.5 \pm 4.1	0.03 – 43.5
linkerbasiert 2. Gen.	27.7 \pm 8.1	38.9 \pm 8.0	98.8 \pm 0.6	94.5 \pm 5.6	0.7 – 12.9
linkerbasiert 3. Gen.	26.1 \pm 9.7	39.2 \pm 9.4	99.1 \pm 0.4	96.8 \pm 2.0	0.5 – 21.9
DOTA-TATE-basiert	19.4 \pm 10.7	25.5 \pm 12.5	97.7 \pm 1.3	94.1 \pm 2.7	0.2 – 17.5

Die radiochemischen Ausbeuten weisen für die linkerbasierten Liganden und die linkerfreien Liganden ähnliche Werte auf. Im Gegensatz dazu liefern die ^{18}F -Markierungen der DOTA-TATE-basierten Derivate grundsätzlich geringere Ausbeuten. Möglicherweise ist die SiFA-Einheit in den DOTA-TATE-basierten Liganden sterisch weniger zugänglich, wodurch der Isotopenaustausch langsamer und weniger effizient verläuft. Eine längere Reaktionszeit bei erhöhter Temperatur wäre für diese Ligandklasse eine geeignete Anpassung. In der Literatur werden für die radiochemische Ausbeute manueller Synthesen von SiFA-Liganden RCY Werte zwischen 38 und 62% angegeben.[131, 140, 141, 151, 182] Die in dieser Arbeit erzielten, geringeren Ausbeuten lassen sich jedoch, mittels der bereits vorgestellten Optimierungsmöglichkeiten, erhöhen. Die radiochemischen Reinheiten sind insgesamt zufriedenstellend. [^{18}F]Fluorid wird mittels der SPE-Kartusche erfolgreich abgetrennt und auch die Reinheit erreicht in der RP-HPLC zumeist 95%.

Die molare Aktivität hingegen unterliegt starken Schwankungen. In Abbildung 93 **A** sind die molaren Aktivitäten (n.d.c) aller durchgeführten Radiomarkierungen absteigend sortiert. In Teilgraphik **B** sind die jeweils eingesetzten Mengen an [^{18}F]Fluorid in derselben Reihenfolge dargestellt. Die Trends in beiden Graphiken sind ähnlich, wohingegen die radiochemischen Ausbeuten (**C**) in dieser Sortierung keinem erkennbaren Trend folgen. Daraus ergibt sich, dass die molare Aktivität stark von der eingesetzten Menge an [^{18}F]Fluorid abhängt und Schwankungen der radiochemischen Ausbeuten eine untergeordnete Rolle spielen. Für [^{18}F]AmBF₃-TATE oder [^{18}F]SiTATE werden in manuellen Synthesen A_m von >111 GBq/ μ mol und 44 – 63 GBq/ μ mol erreicht.[131, 153] Die in dieser Arbeit erreichten A_m liegen unterhalb dieser Literaturwerte. Allerdings ist anzunehmen, dass die A_m , durch den Einsatz größerer Mengen an [^{18}F]Fluorid, gesteigert werden kann.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

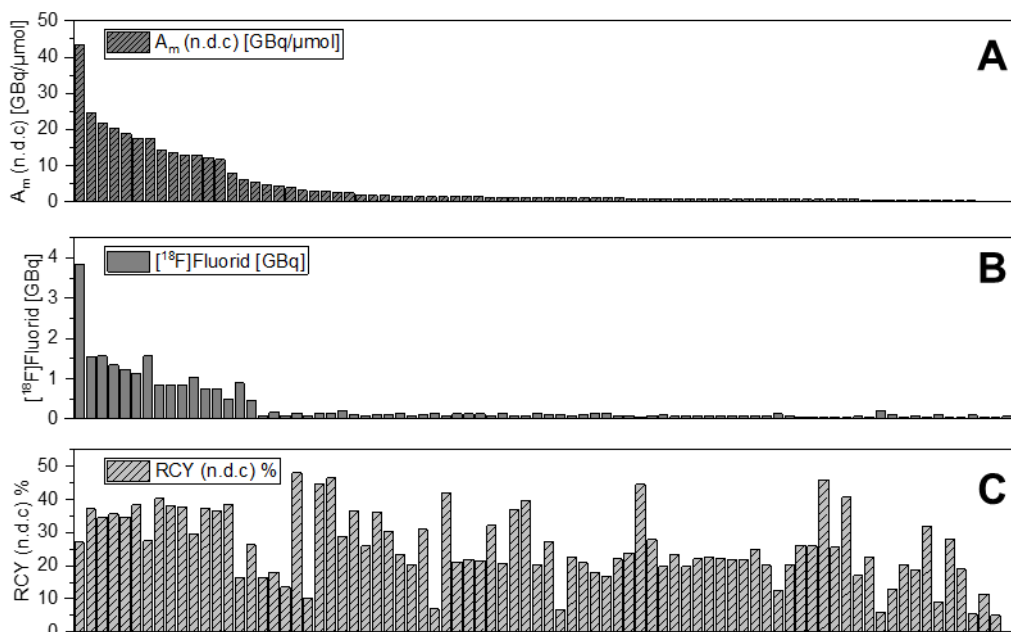


Abbildung 93: **A:** molare Aktivität in GBq/μmol. Jeder Balken entspricht dem Fluorierungsergebnis eines bestimmten Liganden. Sortiert von der höchsten A_m bis zur niedrigsten. **B:** Jeweils eingesetzte Menge $[^{18}\text{F}]$ Fluorid in GBq. Sortierung analog zur der Anordnung in **A**. **C:** Radiochemische Ausbeute (RCY n.d.c.) in %. Sortierung analog zur der Anordnung in **A**.

In Tabelle 34 bis Tabelle 37 sind die Daten zur RCY, RCP und A_m aufgelistet. Diese befinden sich im Anhang und dienen als Übersichts- und Referenztabellen und werden daher nicht detailliert besprochen. Die relevanten Informationen wurden bereits als Mittelwerte über die jeweilige Ligandklasse in Tabelle 33 dargestellt und diskutiert.

IV. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde eine neue Gruppe SST₂-adressierender Radiopharmazeutika entwickelt. Die radiohybriden SST₂-Liganden (rhSST₂) wurden strukturell entwickelt, synthetisiert und präklinisch evaluiert. Es wurden verschiedene Klassen von rhSST₂ Liganden erhalten, die grundlegende Strukturelemente teilen. Dazu gehört das SST₂ Bindemotiv (TATE oder JR11), ein hydrophiler Modifier und die radiohybride Einheit. Letztere setzte sich aus einem Chelator und einem Silizium-Fluor-Akzeptor (SiFA) zusammen.[151] Der Chelator wurde mit einem Metallkation komplexiert, wobei die rhSST₂ Liganden dieser Arbeit ausschließlich mit $[^{18}\text{F}]$ Fluor radiomarkiert wurden, während der Metall-Chelator-Komplex ein stabiles Isotop beinhaltet. Grundsätzlich wäre jedoch eine Radiomarkierung durch Komplexierung des Chelators mit einem Radiometall möglich. In Abhängigkeit von der Wahl des Chelators im jeweils betrachteten Derivat, wäre neben der PET-Diagnostik mittels ^{18}F auch PET-Diagnostik mit ^{68}Ga , SPECT-Diagnostik mittels ^{111}In oder eine Radioligandtherapie mittels ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{225}Ac oder ^{212}Pb möglich. Im Fokus dieser Arbeit stand jedoch die Entwicklung eines $[^{18}\text{F}]$ F-SST₂-Liganden, um Alternativen für etablierte ^{68}Ga -Gallium Liganden wie $[^{68}\text{Ga}]$ Ga-DOTA-TATE zu bieten. Daher wurden die Liganden als nicht-radioaktive Ga, Lu oder Pb Liganden präklinisch evaluiert.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

In der Klasse der linkerfreien Liganden zeigte das Derivat [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 vielversprechende *in vitro* Daten. Die Affinität zu SST₂ (IC₅₀ = 6.01 ± 0.62 nM) war vergleichbar mit der ebenfalls SiFA-basierten Literaturreferenz [^{18}F]SiTATE (IC₅₀ = 6.98 ± 0.61 nM). Die Hydrophilie konnte durch die Verwendung des Chelators R-DOTAGA und des D-Orn basierten hydrophilen Modifiers gegenüber [^{18}F]SiTATE sogar geringfügig gesteigert werden (LogD_{pH=7.4}: [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 = -1.43 ± 0.08; [^{18}F]SiTATE = -1.27 ± 0.07). Dennoch wies dieser neue Ligand im *in vivo* Mausversuch eine signifikante hepatobiliäre Exkretion auf. Die HSA-Bindung konnte daraufhin als weiterer wichtiger Parameter in der Entwicklung von rhSST₂-Liganden identifiziert werden. Diese war in der AMSEC Methode für [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 um Faktor 3.5 höher als für [^{18}F]SiTATE. Aus den Daten der linkerfreien Liganden ließ sich daher ein Zusammenhang zwischen HSA Bindung, Lipophilie und der Ausscheidung über die Leber ableiten. Während für [^{18}F]SiTATE die moderate Hydrophilie durch eine geringe Affinität zu HSA kompensiert wird, führt die Kombination aus moderater Hydrophilie und einer hohen Affinität zu HSA für [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 zu einem verstärktem Transport in die Leber. Zur Senkung der hepatobiliären Exkretion wird in der Literatur vor allem die Steigerung der Hydrophilie beschrieben.[141, 151] Dieser Ansatz scheiterte für die linkerfreien Liganden jedoch aufgrund des Nettoladungskonzepts. [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4 wies durch den Orn-basierten hydrophilen Modifier eine positive Nettoladung aus. Wurden die Ornithine durch hydrophilere Aspartate ausgetauscht, senkte dies den LogD_{pH=7.4}, aber gleichzeitig führte die niedrigere Nettoladung zu einer geringeren Affinität zu SST₂. [186, 193]

Die Klasse der linkerbasierten Liganden trug diesem Umstand Rechnung, indem zwischen SST₂ Bindemotiv und der rh-Einheit ein Linker eingebracht wurde. Es wurden verschiedene Generationen der linkerbasierten Liganden entwickelt. In der 2. Generation wurde benachbart zum SiFA-Baustein ein D-Dap eingebaut. Die positive Ladung des freien Amins der Seitenkette steigerte einerseits die Affinität zu SST₂, indem die Nettoladung erhöht wurde. Andererseits sollte dieses primäre Amin das quartäre Amin in der SiFAN⁺-Einheit des [^{18}F]SiTATE nachahmen, da postuliert wurde, dass dieses für die niedrige Affinität zu HSA verantwortlich war. Das Derivat [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLB-2.1 ging aus dieser Generation als besonders vielversprechend hervor. Trotz eines D-Asp basierten hydrophilen Modifiers und einer negativen Gesamtladung wies dieses Derivat eine hohe Affinität von IC₅₀ = 11.2 ± 1.04 nM auf. Zusätzlich sorgten die Carboxylate im hydrophilen Modifier für eine gesteigerte Hydrophilie (LogD_{pH=7.4} = -2.11 ± 0.04) verglichen mit [^{18}F]SiTATE oder [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4. Die HSA Bindung veränderte sich relativ zu den Derivaten der linkerfreien Klasse jedoch kaum und lieferte in der AMSEC Methode Werte von MW_{app} ~ 20 kDa. Die gesenkte Lipophilie genügte jedoch um die hepatobiliäre Exkretion in der Biodistribution in Mäusen signifikant zu senken. Dies reichte dennoch nicht aus um die Tumor/Organ Verhältnisse von [^{18}F]SiTATE zu übertreffen. Die 2. Generation linkerbasierter Liganden zeichnete sich damit vor allem durch niedrige IC₅₀ Werte zwischen 3.64 nM und 23.6 nM aus. Zusätzlich wurden moderate bis hohe Hydrophilien erreicht die zwischen LogD_{pH=7.4} = -1.58 und -2.41 lagen. Die HSA Bindung war jedoch mit MW_{app} = 15.5 – 25.0 kDa immer noch stark erhöht.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

In der 3. Generation wurde daher der SiFA-Baustein optimiert. Statt der SiFA-Benzoesäure wurde SiFAN⁺Gly eingesetzt. Dieses trug wie [¹⁸F]SiTATE ein quartäres Amin statt einem D-Dap in Nachbarschaft zum SiFA-Aromaten. Die HSA Bindungen wurden für diese Generation erheblich gesenkt und es wurden Werte zwischen $MW_{app} = 4.36$ kDa und $MW_{app} = 13.7$ kDa erreicht, wobei die meisten Derivate Werte von <10 kDa aufwiesen. Es wurde postuliert, dass es in der HSA-Bindetasche zwischen dem quartären Amin und der ebenfalls positiv geladenen Seitenkette der HSA Aminosäure R₄₁₀, zu einer Abstoßung kommt, wodurch die Affinität zu HSA gesenkt wird.[211, 215] Insbesondere Derivat [^{18/19}F]Ga-rhLB-3.2 zeichnete sich durch vielversprechende *in vitro* Daten aus. Die hohe SST₂ Affinität ($IC_{50} = 3.01 \pm 0.03$), die hinreichende Hydrophilie ($\text{LogD}_{\text{pH}=7.4} = -2.00 \pm 0.12$) und die niedrige Bindung an HSA ($MW_{app} = 8.18$), führten in Biodistributionsstudien an Mäusen zu einer hohen Tumorakkumulation und gesteigerten Tumor/Organ Verhältnissen verglichen mit [¹⁸F]SiTATE. Diese vielversprechenden Ergebnisse machen aus [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 einen potentiellen Kandidaten für eine Anwendung am Menschen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies nicht mehr durchgeführt.

Als letzte Klasse der rhSST₂ Liganden wurden die DOTA-TATE-basierten Derivate hergestellt. Hier konnte erfolgreich ausgenutzt werden, dass der Ga-DOTA Komplex in Ga-DOTA-TATE die Affinität positiv beeinflusst. Die Verwendung von DOTA als Linker und der anschließenden Komplexierung mit Ga lieferte Liganden von hoher Affinität zu SST₂. Die Derivate [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.2 und [^{18/19}F]Ga-rhDTB-2.5 waren dabei besonders vielversprechend. Im *in vivo* Mausversuch zeigten beide Derivate eine geringere Tumorakkumulation als [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2. [¹⁸F]Ga-rhDTB-2.2 wies daher tendenziell geringere Tumor/Organ Verhältnisse auf, zeigte aber auch eine unerwartet hohe Anreicherung in SST₂ exprimierenden Organen. [¹⁸F]Ga-DTB-2.5 wies ebenfalls eine geringere Tumorakkumulation auf, wies aber zu [¹⁸F]Ga-rhLB-3.2 vergleichbare oder sogar höhere Tumor/Organ Verhältnisse auf. Dies könnte sich in der PET-Diagnostik vorteilhaft auf den Kontrast auswirken. Beide Derivate wurden daher als vielversprechende Kandidaten für eine *in vivo* Anwendung am Menschen betrachtet.

Neben der Optimierung der rh-Einheit wurden innerhalb der einzelnen Ligandklassen auch andere Optimierungen vorgenommen. So konnte auf die *in vitro* Parameter gezielt Einfluss genommen werden. Beispielsweise durch die Variation des Chelators, des hydrophilen Modifiers, der räumlichen Orientierung der rh-Einheit oder durch Art und Länge des Linkers, um nur einige strukturelle Optimierungen zu nennen. Damit liefert diese Arbeit ein Portfolio an Informationen, die für die Entwicklung weiterer SST₂ Liganden herangezogen werden kann.

Die Radiomarkierung mittels [¹⁸F]Fluorid wurde anhand verschiedener Derivate optimiert. Dabei wurde in 10 min Reaktionszeit eine ¹⁸F Inkorporation von bis zu 95% erreicht. Insbesondere die finale Aufreinigung des Radiopeptids mittels SPE-Kartusche musste optimiert werden. Eine hohe Zahl positiv geladener Aminosäuren im Peptid, wie in [¹⁸F]Ga-rhLF-4 der Fall, führte zu einer starken Retention auf der Kartusche. Durch inverse Elution gepaart mit der Verwendung von EtOH und PBS als

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Elutionsmittel, konnten diese Probleme gelöst werden. Die radiochemischen Ausbeuten (n.d.c.) waren für alle Ligandklassen durchschnittlich geringer als 30%. Durch eine Reihe an Optimierungsversuchen bezüglich Reaktionszeit, Reaktionstemperatur und eingesetzter Peptidstoffmenge, konnte jedoch ein enormes Verbesserungspotential gezeigt werden. Die radiochemischen Reinheiten waren hoch und lagen durchschnittlich bei mindestens 94%. Vor allem die molaren Aktivitäten unterlagen starken Schwankungen, so wurden beispielsweise für die linkerbasierten Liganden A_m zwischen 0.5 GBq/ μ mol und 21.9 GBq/ μ mol erreicht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Unterschiede vor allem auf die eingesetzte Menge an [^{18}F]Fluorid zurückzuführen sind. Dennoch müsste die Radiosynthese für eine humane Anwendung weiter optimiert werden, um eine ausreichend hohe spezifische Aktivität zu erzielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden radiohybride SST₂ Liganden entwickelt, die sich durch eine hohe Affinität zur Zielstruktur und niedrigen LogD Werten mit geringer Bindung an HSA, auszeichnen. Dabei wurde in der Biodistribution im Mausmodell die Referenz [^{18}F]SiTATE sowohl hinsichtlich der absoluten Tumoranreicherung, als auch im Hinblick auf die Tumor-zu-Organ Verhältnisse übertroffen. Diese vielversprechenden Ergebnisse fordern eine Untersuchung der neuen Liganden in einer Human-Studie. Die neuen rhSST₂ Liganden könnten die Diagnostik mittels PET optimieren und für die Patienten zu einer besseren Prognose führen.

V. Anhang

1. Abkürzungen

%ID/g	Prozent der injizierten Dosis je Gramm	HFIP	Hexafluorisopropanol
[¹⁸ F]FTMS	[¹⁸ F]Fluortrimethylsilan	HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
1-Nal	1-Naphthylalanin	HWZ	Halbwertszeit
2-CT	2-Chlorotrityl	IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
2-CTC	2-Chlorotrityl Chlorid	<i>J</i>	Kopplungskonstante
3-BzThi	3-Benzothienylalanin	JR11	H-L-Phe(4 Cl)- <i>cyclo</i> (D-Cys-L-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-D-Tyr-NH ₂
A	präexponentieller Faktor	K'	Kapazitätsfaktor
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift	keV	Kiloelektronenvolt
Ac	Acetyl	<i>l</i>	L-Isomer, Belegungsdichte
Acm	Acetamidomethyl	LogD	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
A _m	Molare Aktivität	M	Molekulargewicht
Aph	4-Aminophenylalanin	m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
Aph(Cbm)	4-(Carbamoylamino)phenylalanin	MeCN	Acetonitril
Äq.	Äquivalent	MeOH	Methanol
Ar	Aromatisch	<i>m_{exact}</i>	Berechnete Masse
AR42J	Zellen des Ratten Pankreaskarzinoms	<i>m_{found}</i>	Experimentel bestimmte Masse
BASS	H-L-Phe(4 NO ₂)- <i>cyclo</i> (D-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-D-Tyr-NH ₂	mo	months
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	nat	Natürliche Isotopen Zusammensetzung
BOC	H-D-Phe- <i>cyclo</i> (L-Cys-L-BzThi-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr(ol)	NEC	Neuroendokrines Karzinom
C ₁₈	Octadecyl Modifizierung des RP-HPLC Säulenmaterials	NEN	Neuroendokrine Neoplasie
CHO	Chinese Hamster Ovary	NET	Neuroendokriner Tumor
CT	Computertomographie	NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
D	D-Isomer	NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
Dap	Diaminopropionsäure	NMR	Kernresonanzspektroskopie
DC	Dünnschichtchromatographie	NOC	H-D-Phe- <i>cyclo</i> (L-Cys-L-1-Nal-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys
DCM	Dichlormethan	NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure
Dde	2-Actetyldimedon	Nt	<i>N</i> -terminale Position
DFO	Desferrioxamin	OI	Optical Imaging
DFT	Dichtefunktionaltheorie	Orn	Ornithin
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid	OS	Overall survival
DIPEA	Diisopropylethylamin	Oxyma	Ethylcyanohydroxyiminoacetat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	p.i.	post Injektion
DMSO	Dimethylsulfoxid	Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
DO3AM	2-(4,7,10-Tris(2-amino-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)essigsäure	PCC	Pyridiniumchlorochromat
DOTA	2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetrayl)tetraessigsäure	PEG ₁₂	Polyethylenglycol mit 12 Repetitionseinheiten
DOTA(<i>t</i> Bu) ₃	2-(4,7,10-Tris(2-(<i>tert</i> -butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)essigsäure	PET	Positronen-Emissions-Tomographie
DTPA	Diethylenetriaminpentaessigsäure	Pfp	Pentafluorphenyl
E _a	Aktivierungsenergie	PG	Schutzgruppe (fasst alle im Peptid enthaltenen Schutzgruppen zusammen)
EDDA/HYNIC	Ethylenediamin- <i>N,N'</i> -diessigsäure/Hydrazinonikotinamid	Pma	Phosphonomethylalanin
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations Massenspektrometrie	PPh ₃	Triphenylphosphin
Et ₂ O	Diethylether	Pya	3-Pyridylalanin
EtOAc	Ethylacetat	<i>R/S</i> -DOTAGA(<i>t</i> Bu) ₄	5-(<i>Tert</i> -butoxy)-5-oxo-4-(4,7,10-tris(2-(<i>tert</i> -butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)pentansäure
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl	RCC	Radiochemical Conversion
GBq	Gigabecquerel	R _f	Retentionsfaktor
GH	Growth Hormone	RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
GIT	Gastrointestinaltrakt	RT	Raumtemperatur
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor	SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
		SiFA	Silizium Fluor Akzeptor

V. ANHANG

SiFA-A SiFA-Aldehyd	<i>t</i> BuOH <i>tert</i> -Butanol
SiFA-BA SiFA-Benzoesäure	THF Tetrahydrofuran
SiFA-Br SiFA-Bromid	TIPS <i>Triisopropylsilan</i>
SiFAN ⁺ <i>N</i> -(4-(<i>Di-tert</i> -butylfluorosilyl)benzyl)-2-hydroxy- <i>N,N</i> -dimethylethylammonium	TMD Transmembrandomäne
Sk Seitenkettenposition	TOC H-D-Phe- <i>cyclo</i> (L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr(ol)
SPECT Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie	t_R Retentionszeit
SPPS Festphasenpeptidsynthese	Trt Trityl
SST Somatostatin Rezeptor, Somatostatin	UV Ultraviolettes Licht
SST ₂ Somatostatinrezeptor 2	ÜZ Überlebenszeit
TATE <i>Tyr</i> ³ -Octreotate, H-D-Phe- <i>cyclo</i> (L-Cys-L-Tyr-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Cys)-L-Thr-OH	<i>v/v</i> Volumenanteil
TBDMS <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl	VIS Sichtbares Licht
TBq <i>Terrabecquerels</i> , Terabecquerel	Xaa Aminosäure
TBTU <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluorborat	Δ <i>G</i> freie Gibbs-Energie
<i>t</i> Bu <i>tert</i> -Butyl	λ Wellenlänge
<i>t</i> BuLi <i>tert</i> -Butyllithium	E β_{max} Maximale Positronenenergie

2. Referenzen

1. La Rosa S, Uccella S. Classification of neuroendocrine neoplasms: lights and shadows [eng]. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020; doi:10.1007/s11154-020-09612-2.
2. Klöppel G. Neuroendokrine Neoplasien. *Wien klin Mag.* 2020; doi:10.1007/s00740-019-00325-0.
3. Rindi G, Inzani F. Neuroendocrine neoplasm update: toward universal nomenclature [eng]. *Endocr Relat Cancer.* 2020; doi:10.1530/ERC-20-0036.
4. Asa SL, Mete O, Cusimano MD, McCutcheon IE, Perry A, Yamada S, et al. Pituitary neuroendocrine tumors: a model for neuroendocrine tumor classification [eng]. *Mod Pathol.* 2021; doi:10.1038/s41379-021-00820-y.
5. Livolsi VA. Neuroendocrine Tumors of the Thyroid and Their Mimics [eng]. *Endocr Pathol.* 2021; doi:10.1007/s12022-021-09672-3.
6. Asa SL, Mete O. Parathyroid Neuroendocrine Neoplasms. In: Asa SL, La Rosa S, Mete O, editors. *The spectrum of neuroendocrine neoplasia: A practical approach to diagnosis, classification and therapy.* Cham: Springer International Publishing; 2021. pp. 137–50.
7. Asioli S. Skin Neuroendocrine Neoplasms. In: Asa SL, La Rosa S, Mete O, editors. *The spectrum of neuroendocrine neoplasia: A practical approach to diagnosis, classification and therapy.* Cham: Springer International Publishing; 2021. pp. 335–56.
8. Valea A, Sandru F, Albu SE, Dumitrascu MC, Terzea D, Stanescu AMA, et al. Skin involvement in neuroendocrine neoplasia. *Ro J Med Pract.* 2020; doi:10.37897/RJMP.2020.1.7.
9. Kasajima A, Konukiewitz B, Oka N, Suzuki H, Sakurada A, Okada Y, et al. Clinicopathological Profiling of Lung Carcinoids with a Ki67 Index 20 [eng]. *Neuroendocrinology.* 2019; doi:10.1159/000495806.
10. Fazio N, Ungaro A, Spada F, Cella CA, Pisa E, Barberis M, et al. The role of multimodal treatment in patients with advanced lung neuroendocrine tumors [eng]. *J Thorac Dis.* 2017; doi:10.21037/jtd.2017.06.14.
11. Tsang JY, Tse GM. Breast cancer with neuroendocrine differentiation: an update based on the latest WHO classification [eng]. *Mod Pathol.* 2021; doi:10.1038/s41379-021-00736-7.
12. Baldys-Waligórska A, Nowak A. Neuroendocrine neoplasms of the digestive system- current classification and terminology. *Nowotwory. Journal of Oncology.* 2021; doi:10.5603/NJO.2021.0005.
13. Howitt BE, Kelly P, McCluggage WG. Pathology of Neuroendocrine Tumours of the Female Genital Tract [eng]. *Curr Oncol Rep.* 2017; doi:10.1007/s11912-017-0617-2.
14. Uccella S, Mathias-Guiu X, La Rosa S. Genitourinary Neuroendocrine Neoplasms. In: Asa SL, La Rosa S, Mete O, editors. *The spectrum of neuroendocrine neoplasia: A practical approach to diagnosis, classification and therapy.* Cham: Springer International Publishing; 2021. pp. 301–33.
15. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, et al. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States [eng]. *JAMA Oncol.* 2017; doi:10.1001/jamaoncol.2017.0589.
16. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors [eng]. *Cancer.* 2003; doi:10.1002/cncr.11105.
17. Sackstein PE, O'Neil DS, Neugut AI, Chabot J, Fojo T. Epidemiologic trends in neuroendocrine tumors: An examination of incidence rates and survival of specific patient subgroups over the past 20 years [eng]. *Semin Oncol.* 2018; doi:10.1053/j.seminoncol.2018.07.001.

18. Man D, Wu J, Shen Z, Zhu X. Prognosis of patients with neuroendocrine tumor: a SEER database analysis [eng]. *Cancer Manag Res*. 2018; doi:10.2147/CMAR.S174907.
19. Taal BG, Visser O. Epidemiology of neuroendocrine tumours [eng]. *Neuroendocrinology*. 2004; doi:10.1159/000080731.
20. Bosquet C, Castaño JP, Csaba Z, Culler M, Dournaud P, Epelbaum J, et al. Somatostatin receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *GtoPdb CITE*. 2019; doi:10.2218/gtopdb/F61/2019.4.
21. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone [eng]. *Science*. 1973; doi:10.1126/science.179.4068.77.
22. Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A. N-terminally extended somatostatin: The primary structure of somatostatin-28. *FEBS Letters*. 1980; doi:10.1016/0014-5793(80)81310-X.
23. Esch F, Böhlen P, Ling N, Benoit R, Brazeau P, Guillemin R. Primary structure of ovine hypothalamic somatostatin-28 and somatostatin-25 [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; doi:10.1073/pnas.77.11.6827.
24. Günther T, Tulipano G, Dournaud P, Bousquet C, Csaba Z, Kreienkamp H-J, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature [eng]. *Pharmacol Rev*. 2018; doi:10.1124/pr.117.015388.
25. Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med*. 1983; doi:10.1056/NEJM198312153092406.
26. Reichlin S. Somatostatin (second of two parts) [eng]. *N Engl J Med*. 1983; doi:10.1056/NEJM198312223092506.
27. Meyerhof W, Paust HJ, Schönrock C, Richter D. Cloning of a cDNA encoding a novel putative G-protein-coupled receptor expressed in specific rat brain regions [eng]. *DNA Cell Biol*. 1991; doi:10.1089/dna.1991.10.689.
28. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; doi:10.1073/pnas.89.1.251.
29. Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, et al. Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase [eng]. *Mol Endocrinol*. 1992; doi:10.1210/mend.6.12.1337145.
30. Yamada Y, Kagimoto S, Kubota A, Yasuda K, Masuda K, Someya Y, et al. Cloning, functional expression and pharmacological characterization of a fourth (hSSSTR4) and a fifth (hSSSTR5) human somatostatin receptor subtype [eng]. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; doi:10.1006/bbrc.1993.2122.
31. Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schüle R. Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; doi:10.1073/pnas.90.9.4196.
32. Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, et al. Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28 [eng]. *Mol Pharmacol*. 1994;45(3):417–27.
33. Alexander SP, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors [eng]. *Br J Pharmacol*. 2017; doi:10.1111/bph.13878.
34. Patel YC, Greenwood M, Kent G, Panetta R, Srikant CB. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation [eng]. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; doi:10.1006/bbrc.1993.1412.
35. Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Höllt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSSTR2B). *FEBS Letters*. 1992; doi:10.1016/0014-5793(92)81122-3.
36. Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. *Life Sciences*. 1995; doi:10.1016/0024-3205(95)02082-T.
37. Patel YC. Somatostatin and its receptor family [eng]. *Front Neuroendocrinol*. 1999; doi:10.1006/frne.1999.0183.
38. Cervia D, Bagnoli P. An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology [eng]. *Pharmacol Ther*. 2007; doi:10.1016/j.pharmthera.2007.06.010.
39. Ben-Shlomo A, Melmed S. Pituitary somatostatin receptor signaling [eng]. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; doi:10.1016/j.tem.2009.12.003.
40. Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study [eng]. *Endocr J*. 2005; doi:10.1507/endocrj.52.605.
41. Hankus J, Tomaszewska R. Neuroendocrine neoplasms and somatostatin receptor subtypes expression [eng]. *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2016; doi:10.5603/NMR.2016.0022.
42. Mizutani G, Nakanishi Y, Watanabe N, Honma T, Obana Y, Seki T, et al. Expression of Somatostatin Receptor (SSTR) Subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in Neuroendocrine Tumors Using Real-time RT-PCR Method and Immunohistochemistry [eng]. *Acta Histochem Cytochem*. 2012; doi:10.1267/ahc.12006.
43. Reubi JC, Schaer JC, Markwalder R, Waser B, Horisberger U, Laissue J. Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance [eng]. *Yale J Biol Med*. 1997;70(5-6):471–9.
44. Hofland LJ, Lamberts SWJ. Somatostatin receptors and disease: Role of receptor subtypes. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996; doi:10.1016/S0950-351X(96)80362-4.
45. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands [eng]. *Eur J Nucl Med*. 2001; doi:10.1007/s002590100541.
46. Rivier J, Brazeau P, Vale W, Guillemin R. Somatostatin analogs. Relative importance of the disulfide bridge and of the Ala-Gly side chain for biological activity [eng]. *J Med Chem*. 1975; doi:10.1021/jm00236a001.
47. Brazeau P, Vale W, Rivier J, Guillemin R. Acylated des-[Ala1-Gly2]-somatostatin analogs: Prolonged inhibition of growth hormone secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974; doi:10.1016/0006-291X(74)90326-X.

48. Veber DF, Holly FW, Nutt RF, Bergstrand SJ, Brady SF, Hirschmann R, et al. Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size [eng]. *Nature*. 1979; doi:10.1038/280512a0.
49. Veber DF, Freidlinger RM, Perlow DS, Paleveda WJ, Holly FW, Strachan RG, et al. A potent cyclic hexapeptide analogue of somatostatin [eng]. *Nature*. 1981; doi:10.1038/292055a0.
50. Rivier J, Brown M, Vale W. D-Trp8-somatostatin: An analog of somatostatin more potent than the native molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975; doi:10.1016/S0006-291X(75)80208-7.
51. Arison BH, Hirschmann R, Veber DF. Inferences about the conformation of somatostatin at a biologic receptor based on NMR studies. *Bioorganic Chemistry*. 1978; doi:10.1016/0045-2068(78)90035-4.
52. Lewis I, Bauer W, Albert R, Chandramouli N, Pless J, Weckbecker G, et al. A novel somatostatin mimic with broad somatotropin release inhibitory factor receptor binding and superior therapeutic potential [eng]. *J Med Chem*. 2003; doi:10.1021/jm021093t.
53. Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, et al. SMS 201-995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sciences*. 1982; doi:10.1016/0024-3205(82)90087-X.
54. Reubi JC, Schär JC, Waser B, Wenger S, Heppeler A, Schmitt JS, et al. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use [eng]. *Eur J Nucl Med*. 2000; doi:10.1007/s002590050034.
55. Antunes P, Ginj M, Zhang H, Waser B, Baum RP, Reubi JC, et al. Are radiogallium-labelled DOTA-conjugated somatostatin analogues superior to those labelled with other radiometals? [eng]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007; doi:10.1007/s00259-006-0317-x.
56. Fani M, Nicolas GP, Wild D. Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy [eng]. *J Nucl Med*. 2017; doi:10.2967/jnumed.116.186783.
57. Schottelius M, Šimeček J, Hoffmann F, Willibald M, Schwaiger M, Wester H-J. Twins in spirit - episode I: comparative preclinical evaluation of (68)GaDOTATATE and (68)GaHA-DOTATATE [eng]. *EJNMMI Res*. 2015; doi:10.1186/s13550-015-0099-x.
58. Ginj M, Schmitt JS, Chen J, Waser B, Reubi J-C, Jong M de, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of somatostatin-based radiopeptides [eng]. *Chem Biol*. 2006; doi:10.1016/j.chembiol.2006.08.012.
59. Ginj M, Chen J, Walter MA, Eltschinger V, Reubi JC, Maecke HR. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy [eng]. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1136-45.
60. Cascato R, Ercegyi J, Waser B, Piccand V, Mäcke HR, Rivier JE, et al. Design and in vitro Characterization of Highly Sst2-selective Somatostatin Antagonists Suitable for Radio-Targeting [eng]. *J Med Chem*. 2008; doi:10.1021/jm701618q.
61. Ginj M, Zhang H, Waser B, Cascato R, Wild D, Wang X, et al. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; doi:10.1073/pnas.0607761103.
62. Bass RT, Buckwalter BL, Patel BP, Pausch MH, Price LA, Strnad J, et al. Identification and characterization of novel somatostatin antagonists [eng]. *Mol Pharmacol*. 1996;50(4):709-15.
63. Hocart SJ, Jain R, Murphy WA, Taylor JE, Coy DH. Highly potent cyclic disulfide antagonists of somatostatin [eng]. *J Med Chem*. 1999; doi:10.1021/jm9806289.
64. Krenning EP, Breeman WAP, Kooij PPM, Lameris JS, Bakker WH, Koper JW, et al. LOCALISATION OF ENDOCRINE-RELATED TUMOURS WITH RADIOIODINATED ANALOGUE OF SOMATOSTATIN. *The Lancet*. 1989; doi:10.1016/S0140-6736(89)91258-0.
65. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, et al. Somatostatin receptor scintigraphy with ¹¹¹In-DTPA-D-Phe1- and ¹²³I-Tyr3-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients [eng]. *Eur J Nucl Med*. 1993; doi:10.1007/bf00181765.
66. Bakker WH, Albert R, Bruns C, Breeman WAP, Hofland LJ, Marbach P, et al. [¹¹¹In-DTPA-D-Phe1]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sciences*. 1991; doi:10.1016/0024-3205(91)90052-D.
67. Bakker WH, Krenning EP, Reubi J-C, Breeman WAP, Setyono-Han B, Jong M de, et al. In vivo application of [¹¹¹In-DTPA-D-Phe1]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sciences*. 1991; doi:10.1016/0024-3205(91)90053-E.
68. Smith-Jones PM, Stolz B, Bruns C, Albert R, Reist HW, Fridrich R, et al. Gallium-67/gallium-68-DFO-octreotide--a potential radiopharmaceutical for PET imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis and radiolabeling in vitro and preliminary in vivo studies [eng]. *J Nucl Med*. 1994;35(2):317-25.
69. Otte A, Jermann E, Behe M, Goetze M, Bucher HC, Roser HW, et al. DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy [eng]. *Eur J Nucl Med*. 1997; doi:10.1007/BF00879669.
70. Jong M de, Bakker WH, Krenning EP, Breeman WA, van der Pluijm ME, Bernard BF, et al. Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of DOTA0,d-Phe1,Tyr3octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy [eng]. *Eur J Nucl Med*. 1997; doi:10.1007/BF00881807.
71. SomaKit TOC | European Medicines Agency. 2021.000Z. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2018/208700Orig1s000ltr.pdf. Accessed 27 Jul 2021.768Z.
72. FDA. Ga-68-DOTATOC for IV injection.
73. Johnbeck CB, Knigge U, Kjær A. PET tracers for somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors: current status and review of the literature [eng]. *Future Oncol*. 2014; doi:10.2217/fon.14.139.
74. Lutathera | European Medicines Agency. 2021.000Z. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/lutathera#authorisation-details-section>. Accessed 27 Jul 2021.769Z.

75. Hennrich U, Kopka K. Lutathera®: The First FDA- and EMA-Approved Radiopharmaceutical for Peptide Receptor Radionuclide Therapy [eng]. Pharmaceuticals (Basel). 2019; doi:10.3390/ph12030114.
76. Hubalewska-Dydejczyk A, Fröss-Baron K, Mikołajczak R, Maecke HR, Huszno B, Pach D, et al. ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-octreotate scintigraphy, an efficient method for the detection and staging of carcinoid tumours: results of 3 years' experience [eng]. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2006; doi:10.1007/s00259-006-0113-7.
77. Gohlke S, Wester H-J, Bruns C, Stöcklin G. (2-[¹⁸F]fluoropropionyl-(d)phe1)-octreotide, a potential radiopharmaceutical for quantitative somatostatin receptor imaging with PET: Synthesis, radiolabeling, in vitro validation and biodistribution in mice. Nucl Med Biol. 1994; doi:10.1016/0969-8051(94)90161-9.
78. Notni J, Wester H-J. Re-thinking the role of radiometal isotopes: Towards a future concept for theranostic radiopharmaceuticals [eng]. J Labelled Comp Radiopharm. 2018; doi:10.1002/jlcr.3582.
79. Pauwels E, Cleeren F, Tshibangu T, Koole M, Serdons K, Dekervel J, et al. ¹⁸FAlF-NOTA-octreotide PET imaging: biodistribution, dosimetry and first comparison with ⁶⁸GaGa-DOTATATE in neuroendocrine tumour patients [eng]. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2020; doi:10.1007/s00259-020-04918-4.
80. Ilhan H, Lindner S, Todica A, Cyran CC, Tiling R, Auernhammer CJ, et al. Biodistribution and first clinical results of ¹⁸F-SiFAlin-TATE PET: a novel ¹⁸F-labeled somatostatin analog for imaging of neuroendocrine tumors [eng]. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2019; doi:10.1007/s00259-019-04501-6.
81. Serdons K, Verbruggen A, Bormans GM. Developing new molecular imaging probes for PET [eng]. Methods. 2009; doi:10.1016/j.ymeth.2009.03.010.
82. Conti M, Eriksson L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion [eng]. EJNMMI Phys. 2016; doi:10.1186/s40658-016-0144-5.
83. Bé M-M. Table of radionuclides [eng]. Monographie BIPM. Vol. 1. Sèvres: BIPM; 2004.
84. Bé M-M. Table of radionuclides [eng]. Monographie BIPM. Vol. 7. Sèvres: BIPM; 2013.
85. Bé M-M. Table of radionuclides [eng]. Monographie BIPM. Vol. 8. Sèvres: BIPM; 2016.
86. Kuker R, Szejnberg M, Gulec S. I-124 Görüntüleme ve Dozimetri. [I-124 Imaging and Dosimetry] [eng]. Mol Imaging Radionucl Ther. 2017; doi:10.4274/2017.26.suppl.07.
87. Müller C, Domnanich KA, Umbricht CA, van der Meulen NP. Scandium and terbium radionuclides for radiotheranostics: current state of development towards clinical application. BJR. 2018; doi:10.1259/bjr.20180074.
88. Wester HJ, Schottelius M. Fluorine-18 labeling of peptides and proteins [eng]. Ernst Schering Res Found Workshop. 2007; doi:10.1007/978-3-540-49527-7_4.
89. Sanchez-Crespo A. Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography [eng]. Appl Radiat Isot. 2013; doi:10.1016/j.apradiso.2012.06.034.
90. Maecke HR, André JP. ⁶⁸Ga-PET radiopharmacy: A generator-based alternative to ¹⁸F-radiopharmacy [eng]. Ernst Schering Res Found Workshop. 2007; doi:10.1007/978-3-540-49527-7_8.
91. Coenen HH. Fluorine-18 labeling methods: Features and possibilities of basic reactions [eng]. Ernst Schering Res Found Workshop. 2007; doi:10.1007/978-3-540-49527-7_2.
92. Guillaume M, Luxen A, Nebeling B, Argentini M, Clark JC, Pike VW. Recommendations for fluorine-18 production. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes. 1991; doi:10.1016/0883-2889(91)90179-5.
93. Cai L, Lu S, Pike VW. Chemistry with [¹⁸F]Fluoride Ion. Eur. J. Org. Chem. 2008; doi:10.1002/ejoc.200800114.
94. Ajenjo J, Destro G, Cornelissen B, Gouverneur V. Closing the gap between ¹⁹F and ¹⁸F chemistry [eng]. EJNMMI Radiopharm Chem. 2021; doi:10.1186/s41181-021-00143-y.
95. Jacobson O, Kiesewetter DO, Chen X. Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes [eng]. Bioconjug Chem. 2015; doi:10.1021/bc500475e.
96. Mu L, Höhne A, Schubiger PA, Ametamey SM, Graham K, Cyr JE, et al. Silicon-based building blocks for one-step ¹⁸F-radiolabeling of peptides for PET imaging [eng]. Angew Chem Int Ed Engl. 2008; doi:10.1002/anie.200705854.
97. Al-Hunuti MH, Lu S, Pike VW, Lepore SD. Enhanced Nucleophilic Fluorination and Radiofluorination of Organosilanes Appended with Potassium-Chelating Leaving Groups [eng]. Journal of Fluorine Chemistry. 2014; doi:10.1016/j.jfluchem.2013.12.005.
98. Ting R, Adam MJ, Ruth TJ, Perrin DM. Arylfluoroborates and alkylfluorosilicates as potential PET imaging agents: high-yielding aqueous biomolecular ¹⁸F-labeling [eng]. J Am Chem Soc. 2005; doi:10.1021/ja053293a.
99. Ting R, Harwig C, dem Keller U auf, McCormick S, Austin P, Overall CM, et al. Toward ¹⁸F-labeled aryltrifluoroborate radiotracers: in vivo positron emission tomography imaging of stable aryltrifluoroborate clearance in mice [eng]. J Am Chem Soc. 2008; doi:10.1021/ja802734t.
100. Li Y, Guo J, Tang S, Lang L, Chen X, Perrin DM. One-step and one-pot-two-step radiosynthesis of cyclo-RGD-(¹⁸F)-aryltrifluoroborate conjugates for functional imaging [eng]. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2013;3(1):44–56.
101. Li Y, Liu Z, Harwig CW, Pourghasian M, Lau J, Lin K-S, et al. (¹⁸F)-click labeling of a bombesin antagonist with an alkyne-(¹⁸F)-ArBF(3) (-): in vivo PET imaging of tumors expressing the GRP-receptor [eng]. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2013;3(1):57–70.
102. Schirmacher R, Bradtmöller G, Schirmacher E, Thews O, Tillmanns J, Siessmeier T, et al. ¹⁸F-labeling of peptides by means of an organosilicon-based fluoride acceptor [eng]. Angew Chem Int Ed Engl. 2006; doi:10.1002/anie.200600795.
103. Wängler C, Niedermoser S, Chin J, Orchowski K, Schirmacher E, Jurkschat K, et al. One-step (¹⁸F)-labeling of peptides for positron emission tomography imaging using the SiFA methodology [eng]. Nat Protoc. 2012; doi:10.1038/nprot.2012.109.
104. Liu Z, Pourghasian M, Radtke MA, Lau J, Pan J, Dias GM, et al. An organotrifluoroborate for broadly applicable one-step ¹⁸F-labeling [eng]. Angew Chem Int Ed Engl. 2014; doi:10.1002/anie.201406258.

105. Bernard-Gauthier V, Bailey JJ, Liu Z, Wängler B, Wängler C, Jurkschat K, et al. From Unorthodox to Established: The Current Status of (18)F-Trifluoroborate- and (18)F-SiFA-Based Radiopharmaceuticals in PET Nuclear Imaging [eng]. *Bioconjug Chem.* 2016; doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00560.
106. Kumar K, Ghosh A. 18F-AIF Labeled Peptide and Protein Conjugates as Positron Emission Tomography Imaging Pharmaceuticals [eng]. *Bioconjugate Chem.* 2018; doi:10.1021/acs.bioconjchem.7b00817.
107. McBride WJ, Sharkey RM, Karacay H, D'Souza CA, Rossi EA, Laverman P, et al. A novel method of 18F radiolabeling for PET [eng]. *J Nucl Med.* 2009; doi:10.2967/jnumed.108.060418.
108. D'Souza CA, McBride WJ, Sharkey RM, Todaro LJ, Goldenberg DM. High-yielding aqueous 18F-labeling of peptides via Al18F chelation [eng]. *Bioconjugate Chem.* 2011; doi:10.1021/bc200175c.
109. Shetty D, Choi SY, Jeong JM, Lee JY, Hoigebazar L, Lee Y-S, et al. Stable aluminium fluoride chelates with triazacyclononane derivatives proved by X-ray crystallography and 18F-labeling study. *Chem. Commun.* 2011; doi:10.1039/c1cc13151f.
110. Luo Y-R. *Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies.* CRC Press; 2007.
111. Allred AL, Rochow EG. A scale of electronegativity based on electrostatic force. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry.* 1958; doi:10.1016/0022-1902(58)80003-2.
112. Rosenthal MS, Bosch AL, Nickles RJ, Gatley SJ. Synthesis and some characteristics of no-carrier added [18F]fluorotrimethylsilane. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes.* 1985; doi:10.1016/0020-708X(85)90094-8.
113. Bernard-Gauthier V, Wängler C, Schirmacher E, Kostikov A, Jurkschat K, Wängler B, et al. ¹⁸F-labeled silicon-based fluoride acceptors: potential opportunities for novel positron emitting radiopharmaceuticals [eng]. *Biomed Res Int.* 2014; doi:10.1155/2014/454503.
114. Huheey JE, Keiter EA, Keiter RL. *Anorganische Chemie: Prinzipien von Struktur und Reaktivität* [ger]. 4th ed. De Gruyter Studium. Berlin: de Gruyter; 2012.
115. Gens TA, Wethongton JA, Brosi AR. The Exchange of F 18 between Metallic Fluorides and Silicon Tetrafluoride. *J. Phys. Chem.* 1958; doi:10.1021/j150570a030.
116. Poole RT, Winfield JM. Radiotracers in fluorine chemistry. Part IV. Fluorine-18 exchange between labelled alkylfluorosilanes and fluorides, or fluoride methoxides, of tungsten(VI), molybdenum(VI), tellurium(VI), and iodine(V). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1976; doi:10.1039/DT9760001557.
117. Winfield JM. Preparation and use of 18-fluorine labelled inorganic compounds. *Journal of Fluorine Chemistry.* 1980; doi:10.1016/S0022-1139(00)85145-3.
118. Cacace F, Speranza M, Wolf AP, Fowler JS. Labelling of fluorinated aromatics by isotopic exchange with [18F]fluoride. *J Label Compd Radiopharm.* 1981; doi:10.1002/jlcr.2580181203.
119. Farrokhzad S, Diksic M. The syntheses of no-carrier-added and carrier-added 18F-labelled haloperidol. *J Label Compd Radiopharm.* 1985; doi:10.1002/jlcr.2580220713.
120. Kilbourn MR, Welch MJ, Dence CS, Tewson TJ, Saji H, Maeda M. Carrier-added and no-carrier-added syntheses of [18F]spiroperidol and [18F]haloperidol. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes.* 1984; doi:10.1016/0020-708X(84)90101-7.
121. Schirmacher R, Bernard-Gauthier V, Schirmacher E, Bailey JJ, Jurkschat K, Wängler C, et al. Silicon-based 18F-radiopharmaceuticals. In: *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals.* Elsevier; 2019. pp. 551–74.
122. Choudhry U, Martin KE, Biagini S, Blower PJ. A49 Alkoxy silane groups for instant labelling of biomolecules with 18F. *Nuclear Medicine Communications.* 2006;27(3).
123. Höhne A, Yu L, Mu L, Reiher M, Voigtman U, Klar U, et al. Organofluorosilanes as model compounds for 18F-labeled silicon-based PET tracers and their hydrolytic stability: experimental data and theoretical calculations (PET = positron emission tomography) [eng]. *Chemistry.* 2009; doi:10.1002/chem.200802437.
124. Schirmacher E, Wängler B, Cypriak M, Bradtmöller G, Schäfer M, Eisenhut M, et al. Synthesis of p -(Di- tert -butyl[18 F]fluorosilyl)benzaldehyde ([18 F]SiFA-A) with High Specific Activity by Isotopic Exchange: A Convenient Labeling Synthon for the 18 F-Labeling of N-amino-oxy Derivatized Peptides. *Bioconjugate Chem.* 2007; doi:10.1021/bc700195y.
125. Brefort JL, Corriu RJP, Guerin C, Henner BJL, Wong Chi Man WWC. Pentacoordinated silicon anions: synthesis and reactivity. *Organometallics.* 1990; doi:10.1021/om00157a016.
126. Corriu RJP. Hypervalent species of silicon: structure and reactivity. *Journal of Organometallic Chemistry.* 1990; doi:10.1016/0022-328X(90)83007-7.
127. Kostikov AP, Iovkova L, Chin J, Schirmacher E, Wängler B, Wängler C, et al. N-(4-(di-tert-butyl[18F]fluorosilyl)benzyl)-2-hydroxy-N,N-dimethylethylammonium bromide ([18F]SiFAN+Br⁻): A novel lead compound for the development of hydrophilic SiFA-based prosthetic groups for 18F-labeling. *Journal of Fluorine Chemistry.* 2011; doi:10.1016/j.jfluchem.2010.10.008.
128. Atkins PW, Paula J de. *Physical chemistry for the life sciences* [eng]. 2nd ed. Oxford: Oxford Univ. Press; 2011.
129. Block D, Coenen HH, Stöcklin G. The N.C.A. nucleophilic 18F-fluorination of 1,N-disubstituted alkanes as fluoroalkylation agents. *J Label Compd Radiopharm.* 1987; doi:10.1002/jlcr.2580240904.
130. Iovkova L, Wängler B, Schirmacher E, Schirmacher R, Quandt G, Boening G, et al. para-Functionalized aryl-di-tert-butylfluorosilanes as potential labeling synthons for (18)F radiopharmaceuticals [eng]. *Chemistry.* 2009; doi:10.1002/chem.200802266.
131. Niedermoser S, Chin J, Wängler C, Kostikov A, Bernard-Gauthier V, Vogler N, et al. In Vivo Evaluation of ¹⁸F-SiFAlin-Modified TATE: A Potential Challenge for ⁶⁸Ga-DOTATATE, the Clinical Gold Standard for Somatostatin Receptor Imaging with PET [eng]. *J Nucl Med.* 2015; doi:10.2967/jnumed.114.149583.

132. Iovkova L, Könnig D, Wängler B, Schirmmacher R, Schoof S, Arndt H-D, et al. SiFA-Modified Phenylalanine: A Key Compound for the Efficient Synthesis of 18F-Labelled Peptides. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2011; doi:10.1002/ejic.201100142.
133. Wängler B, Quandt G, Iovkova L, Schirmmacher E, Wängler C, Boening G, et al. Kit-Like 18 F-Labeling of Proteins: Synthesis of 4-(Di- tert -butyl[18 F]fluorosilyl)benzenethiol (Si[18 F]FA-SH) Labeled Rat Serum Albumin for Blood Pool Imaging with PET. *Bioconjugate Chem.* 2009; doi:10.1021/bc800413g.
134. Wängler B, Kostikov AP, Niedermoser S, Chin J, Orchowski K, Schirmmacher E, et al. Protein labeling with the labeling precursor (18)FSiFA-SH for positron emission tomography [eng]. *Nat Protoc.* 2012; doi:10.1038/nprot.2012.111.
135. Kostikov AP, Chin J, Orchowski K, Schirmmacher E, Niedermoser S, Jurkschat K, et al. Synthesis of (18)FSiFB: a prosthetic group for direct protein radiolabeling for application in positron emission tomography [eng]. *Nat Protoc.* 2012; doi:10.1038/nprot.2012.110.
136. Rosa-Neto P, Wängler B, Iovkova L, Boening G, Reader A, Jurkschat K, et al. [18 F]SiFA-isothiocyanate: A New Highly Effective Radioactive Labeling Agent for Lysine-Containing Proteins. *ChemBioChem.* 2009; doi:10.1002/cbic.200900132.
137. Wängler C, Kostikov A, Zhu J, Chin J, Wängler B, Schirmmacher R. Silicon-[18F]Fluorine Radiochemistry: Basics, Applications and Challenges. *Applied Sciences.* 2012; doi:10.3390/app2020277.
138. Gower-Fry L, Kronemann T, Dorian A, Pu Y, Jaworski C, Wängler C, et al. Recent Advances in the Clinical Translation of Silicon Fluoride Acceptor (SiFA) 18F-Radiopharmaceuticals [eng]. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; doi:10.3390/ph14070701.
139. Litau S, Niedermoser S, Vogler N, Roscher M, Schirmmacher R, Fricker G, et al. Next Generation of SiFAlin-Based TATE Derivatives for PET Imaging of SSTR-Positive Tumors: Influence of Molecular Design on In Vitro SSTR Binding and In Vivo Pharmacokinetics [eng]. *Bioconjug Chem.* 2015; doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00510.
140. Wängler C, Waser B, Alke A, Iovkova L, Buchholz H-G, Niedermoser S, et al. One-step ¹⁸F-labeling of carbohydrate-conjugated octreotate-derivatives containing a silicon-fluoride-acceptor (SiFA): in vitro and in vivo evaluation as tumor imaging agents for positron emission tomography (PET) [eng]. *Bioconjug Chem.* 2010; doi:10.1021/bc100316c.
141. Lindner S, Michler C, Leidner S, Rensch C, Wängler C, Schirmmacher R, et al. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of SiFA-tagged bombesin and RGD peptides as tumor imaging probes for positron emission tomography [eng]. *Bioconjug Chem.* 2014; doi:10.1021/bc400588e.
142. Dialer LO, Selivanova SV, Müller CJ, Müller A, Stellfeld T, Graham K, et al. Studies toward the development of new silicon-containing building blocks for the direct (18)F-labeling of peptides [eng]. *J Med Chem.* 2013; doi:10.1021/jm400857f.
143. Lindner S, Simmet M, Gildehaus FJ, Jurkschat K, Wängler C, Wängler B, et al. Automated production of 18FSiTATE on a Scintomics GRP™ platform for PET/CT imaging of neuroendocrine tumors [eng]. *Nucl Med Biol.* 2020; doi:10.1016/j.nucmedbio.2020.07.008.
144. Höhne A, Mu L, Honer M, Schubiger PA, Ametamey SM, Graham K, et al. Synthesis, 18F-labeling, and in vitro and in vivo studies of bombesin peptides modified with silicon-based building blocks [eng]. *Bioconjugate Chem.* 2008; doi:10.1021/bc800157h.
145. Iovkova-Berends L, Wängler C, Zöllner T, Höfner G, Wanner KT, Rensch C, et al. t-Bu₂SiF-Derivatized D₂-Receptor Ligands: The First SiFA-Containing Small Molecule Radiotracers for Target-Specific PET-Imaging. *Molecules.* 2011; doi:10.3390/molecules16097458.
146. Hazari PP, Schulz J, Vimont D, Chadha N, Allard M, Szlosek-Pinaud M, et al. A new SiF-Dipropargyl glycerol scaffold as a versatile prosthetic group to design dimeric radioligands: synthesis of the (18) FBMPPSiF tracer to image serotonin receptors [eng]. *ChemMedChem.* 2014; doi:10.1002/cmdc.201300458.
147. Oh SW, Wurzer A, Teoh EJ, Oh S, Langbein T, Krönke M, et al. Quantitative and Qualitative Analyses of Biodistribution and PET Image Quality of a Novel Radiohybrid PSMA, 18F-rhPSMA-7, in Patients with Prostate Cancer [eng]. *J Nucl Med.* 2020; doi:10.2967/jnumed.119.234609.
148. Eiber M, Kroenke M, Wurzer A, Ulbrich L, Jooß L, Maurer T, et al. 18F-rhPSMA-7 PET for the Detection of Biochemical Recurrence of Prostate Cancer After Radical Prostatectomy [eng]. *J Nucl Med.* 2020; doi:10.2967/jnumed.119.234914.
149. Kroenke M, Wurzer A, Schwamborn K, Ulbrich L, Jooß L, Maurer T, et al. Histologically Confirmed Diagnostic Efficacy of 18F-rhPSMA-7 PET for N-Staging of Patients with Primary High-Risk Prostate Cancer [eng]. *J Nucl Med.* 2020; doi:10.2967/jnumed.119.234906.
150. Wurzer A, Di Carlo D, Herz M, Richter A, Robu S, Schirmmacher R, et al. Automated synthesis of [18F]Ga-rhPSMA-7/-7.3: results, quality control and experience from more than 200 routine productions. *EJNMMI radiopharm. chem.* 2021; doi:10.1186/s41181-021-00120-5.
151. Wurzer A, DiCarlo D, Schmidt A, Beck R, Eiber M, Schwaiger M, et al. Radiohybrid ligands: a novel tracer concept exemplified by 18F- or 68Ga-labeled rhPSMA-inhibitors [eng]. *J Nucl Med.* 2019; doi:10.2967/jnumed.119.234922.
152. Roxin Á, Zhang C, Huh S, Lepage M, Zhang Z, Lin K-S, et al. A Metal-Free DOTA-Conjugated 18F-Labeled Radiotracer: 18FDOTA-AMBF3-LLP2A for Imaging VLA-4 Over-Expression in Murine Melanoma with Improved Tumor Uptake and Greatly Enhanced Renal Clearance [eng]. *Bioconjug Chem.* 2019; doi:10.1021/acs.bioconjchem.9b00146.
153. Liu Z, Pourghiasian M, Bénard F, Pan J, Lin K-S, Perrin DM. Preclinical evaluation of a high-affinity 18F-trifluoroborate octreotate derivative for somatostatin receptor imaging [eng]. *J Nucl Med.* 2014; doi:10.2967/jnumed.114.137836.

154. Laverman P, McBride WJ, Sharkey RM, Eek A, Joosten L, Oyen WJG, et al. A novel facile method of labeling octreotide with (18F)-fluorine [eng]. *J Nucl Med*. 2010; doi:10.2967/jnumed.109.066902.
155. Lisova K, Sergeev M, Evans-Axelsson S, Stuparu AD, Beykan S, Collins J, et al. Microscale radiosynthesis, preclinical imaging and dosimetry study of [18F]AMBF3-TATE: A potential PET tracer for clinical imaging of somatostatin receptors. *Nucl Med Biol*. 2018; doi:10.1016/j.nucmedbio.2018.04.001.
156. Lau J, Pan J, Rousseau E, Uribe CF, Seelam SR, Sutherland BW, et al. Pharmacokinetics, radiation dosimetry, acute toxicity and automated synthesis of 18FAMBF3-TATE [eng]. *EJNMMI Res*. 2020; doi:10.1186/s13550-020-0611-9.
157. Lindner S, Wängler C, Bailey JJ, Jurkschat K, Bartenstein P, Wängler B, et al. Radiosynthesis of 18FSiFAlin-TATE for clinical neuroendocrine tumor positron emission tomography [eng]. *Nat Protoc*. 2020; doi:10.1038/s41596-020-00407-y.
158. Tshibangu T, Cawthorne C, Serdons K, Pauwels E, Gsell W, Bormans G, et al. Automated GMP compliant production of 18FAIF-NOTA-octreotide [eng]. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2020; doi:10.1186/s41181-019-0084-1.
159. Wessmann SH, Henriksen G, Wester H-J. Cryptate mediated nucleophilic 18F-fluorination without azeotropic drying [eng]. *Nuklearmedizin*. 2012; doi:10.3413/Nukmed-0425-11-08.
160. Kostikov AP, Chin J, Orchowski K, Niedermoser S, Kovacevic MM, Aliaga A, et al. Oxalic acid supported Si-18F-radiofluorination: one-step radiosynthesis of N-succinimidyl 3-(di-tert-butyl18Ffluorosilyl)benzoate (18FSiFB) for protein labeling [eng]. *Bioconjug Chem*. 2012; doi:10.1021/bc200525x.
161. Goffin K. Al18F-NOTA-octreotide and 18F-SiFAlin-TATE: two 'new kids on the block' in somatostatin receptor imaging [eng]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019; doi:10.1007/s00259-019-04474-6.
162. Long T, Yang N, Zhou M, Chen D, Li Y, Li J, et al. Clinical Application of 18F-AIF-NOTA-Octreotide PET/CT in Combination With 18F-FDG PET/CT for Imaging Neuroendocrine Neoplasms [eng]. *Clin Nucl Med*. 2019; doi:10.1097/RLU.0000000000002578.
163. Pauwels E, Cleeren F, Tshibangu T, Koole M, Serdons K, Dekervel J, et al. Al18F-NOTA-octreotide: first comparison with 68Ga-DOTATATE in a neuroendocrine tumour patient [eng]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019; doi:10.1007/s00259-019-04425-1.
164. Hou J, Long T, He Z, Zhou M, Yang N, Chen D, et al. Evaluation of 18F-AIF-NOTA-octreotide for imaging neuroendocrine neoplasms: comparison with 68Ga-DOTATATE PET/CT [eng]. *EJNMMI Res*. 2021; doi:10.1186/s13550-021-00797-4.
165. Long T, Hou J, Yang N, Zhou M, Li Y, Li J, et al. Utility of 18F-AIF-NOTA-octreotide PET/CT in the localization of Tumor-Induced Osteomalacia [eng]. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021; doi:10.1210/clinem/dgab258.
166. Hou J, Long T, Yang N, Chen D, Zeng S, Zheng K, et al. Biodistribution of 18F-AIF-NOTA-octreotide in Different Organs and Characterization of Uptake in Neuroendocrine Neoplasms [eng]. *Mol Imaging Biol*. 2021; doi:10.1007/s11307-021-01628-7.
167. Ilhan H, Todica A, Lindner S, Boening G, Gosewisch A, Wängler C, et al. First-in-human 18F-SiFAlin-TATE PET/CT for NET imaging and theranostics [eng]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019; doi:10.1007/s00259-019-04448-8.
168. Beyer L, Gosewisch A, Lindner S, Völter F, Mittlmeier LM, Tiling R, et al. Dosimetry and optimal scan time of [18F]SiTATE-PET/CT in patients with neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021; doi:10.1007/s00259-021-05351-x.
169. Fujii N, Otaka A, Funakoshi S, Bessho K, Watanabe T, Akaji K, et al. Studies on peptides. CLI. Syntheses of cystine-peptides by oxidation of S-protected cysteine-peptides with thallium(III) trifluoroacetate [eng]. *Chem Pharm Bull*. 1987; doi:10.1248/cpb.35.2339.
170. Andreu D, Albericio F, Solé NA, Munson MC, Ferrer M, Barany G. Formation of disulfide bonds in synthetic peptides and proteins [eng]. *Methods Mol Biol*. 1994; doi:10.1385/0-89603-273-6:91.
171. Wester H-J, Schottelius M, Scheidhauer K, Reubi J-C, Wolf I, Schwaiger M. Comparison of radioiodinated TOC, TOCA and Mtr-TOCA: the effect of carbohydration on the pharmacokinetics [eng]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002; doi:10.1007/s00259-001-0669-1.
172. Weisen M, Schottelius M, Simecek J, Baum RP, Yildiz A, Beykan S, et al. 68Ga- and 177Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies [eng]. *J Nucl Med*. 2015; doi:10.2967/jnumed.115.158550.
173. Sosabowski JK, Mather SJ. Conjugation of DOTA-like chelating agents to peptides and radiolabeling with trivalent metallic isotopes [eng]. *Nat Protoc*. 2006; doi:10.1038/nprot.2006.175.
174. Kunert J-P, Fischer S, Wurzer A, Wester H-J. Albumin-Mediated Size Exclusion Chromatography: The Apparent Molecular Weight of PSMA Radioligands as Novel Parameter to Estimate Their Blood Clearance Kinetics [eng]. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022; doi:10.3390/ph15091161.
175. Yamazaki K, Kanaoka M. Computational prediction of the plasma protein-binding percent of diverse pharmaceutical compounds [eng]. *J Pharm Sci*. 2004; doi:10.1002/jps.20059.
176. Valko K, Nunhuck S, Bevan C, Abraham MH, Reynolds DP. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity [eng]. *J Pharm Sci*. 2003; doi:10.1002/jps.10494.
177. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2012; doi:10.1016/j.jscs.2010.12.006.
178. Isidro-Llobet A, Alvarez M, Albericio F. Amino acid-protecting groups [eng]. *Chem Rev*. 2009; doi:10.1021/cr800323s.
179. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids [eng]. *Int J Pept Protein Res*. 1990; doi:10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x.

180. Montalbetti CAGN, Falque V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*. 2005; doi:10.1016/j.tet.2005.08.031.
181. Han Y, Albericio F, Barany G. Occurrence and Minimization of Cysteine Racemization during Stepwise Solid-Phase Peptide Synthesis(1),(2) [eng]. *J Org Chem*. 1997; doi:10.1021/jo9622744.
182. Wurzer A. Novel Structural Concepts for the Development of complex-based Radiopharmaceuticals and Ligand Systems: Dissertation. Technische Universität München; 2019.
183. Díaz-Mochón JJ, Bialy L, Bradley M. Full orthogonality between Dde and Fmoc: the direct synthesis of PNA--peptide conjugates [eng]. *Org Lett*. 2004; doi:10.1021/ol049905y.
184. Augustyns K, Kraas W, Jung G. Investigation on the stability of the Dde protecting group used in peptide synthesis: migration to an unprotected lysine [eng]. *J Pept Res*. 1998; doi:10.1111/j.1399-3011.1998.tb00630.x.
185. Ashworth IW, Cox BG, Meyrick B. Kinetics and mechanism of N-Boc cleavage: evidence of a second-order dependence upon acid concentration [eng]. *J Org Chem*. 2010; doi:10.1021/jo101767h.
186. Schottelius M, Rau F, Reubi JC, Schwaiger M, Wester H-J. Modulation of pharmacokinetics of radioiodinated sugar-conjugated somatostatin analogues by variation of peptide net charge and carbonylation chemistry [eng]. *Bioconjug Chem*. 2005; doi:10.1021/bc0499228.
187. Wester H-J, Schottelius M, Poethko T, Bruus-Jensen K, Schwaiger M. Radiolabeled carbohydrate somatostatin analogs: a review of the current status [eng]. *Cancer Biother Radiopharm*. 2004; doi:10.1089/108497804323072011.
188. Schottelius M, Wester H-J, Reubi JC, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M. Improvement of Pharmacokinetics of Radioiodinated Tyr 3 -Octreotide by Conjugation with Carbohydrates. *Bioconjugate Chem*. 2002; doi:10.1021/bc0200069.
189. Fani M, Del PL, Abiraj K, Mansi R, Tamma ML, Cescato R, et al. PET of somatostatin receptor-positive tumors using ⁶⁴Cu- and ⁶⁸Ga-somatostatin antagonists: the chelate makes the difference. *J Nucl Med*. 2011; doi:10.2967/jnumed.111.087999.
190. Petrou C, Magafa V, Nikolopoulou A, Pairas G, Nock B, Maina T, et al. Synthesis and sst(2) binding profiles of new Tyr(3)octreotate analogs [eng]. *J Pept Sci*. 2008; doi:10.1002/psc.989.
191. Schottelius M, Reubi JC, Eltschinger V, Schwaiger M, Wester H-J. N-terminal sugar conjugation and C-terminal Thr-for-Thr(ol) exchange in radioiodinated Tyr3-octreotide: effect on cellular ligand trafficking in vitro and tumor accumulation in vivo [eng]. *J Med Chem*. 2005; doi:10.1021/jm040794i.
192. Fani M, Braun F, Waser B, Beetschen K, Cescato R, Ercegyi J, et al. Unexpected sensitivity of sst2 antagonists to N-terminal radiometal modifications [eng]. *J Nucl Med*. 2012; doi:10.2967/jnumed.112.102764.
193. Seelig J, Nebel S, Ganz P, Bruns C. Electrostatic and nonpolar peptide-membrane interactions. Lipid binding and functional properties of somatostatin analogues of charge z = +1 to z = +3 [eng]. *Biochemistry*. 1993; doi:10.1021/bi00088a025.
194. Tugyi R, Uray K, Iván D, Fellingner E, Perkins A, Hudecz F. Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; doi:10.1073/pnas.0407677102.
195. Pahari S, Sun L, Alexov E. PKAD: a database of experimentally measured pKa values of ionizable groups in proteins [eng]. *Database (Oxford)*. 2019; doi:10.1093/database/baz024.
196. Du Q-S, Li D-P, He W-Z, Chou K-C. Heuristic molecular lipophilicity potential (HMLP): lipophilicity and hydrophilicity of amino acid side chains [eng]. *J Comput Chem*. 2006; doi:10.1002/jcc.20369.
197. Hamley IW. PEG-peptide conjugates [eng]. *Biomacromolecules*. 2014; doi:10.1021/bm500246w.
198. Fahnauer M. Design, Synthese und Evaluierung von innovativen Fluor-basierten Somatostatinrezeptor-Liganden: Master's Thesis. Technische Universität München; 2018.
199. Brandt M, Cardinale J, Giammei C, Guarrochena X, Hapfl B, Jouini N, et al. Mini-review: Targeted radiopharmaceuticals incorporating reversible, low molecular weight albumin binders. *Nucl Med Biol*. 2019; doi:10.1016/j.nucmedbio.2019.01.006.
200. Akizawa H, Arano Y, Mifune M, Iwado A, Saito Y, Mukai T, et al. Effect of molecular charges on renal uptake of ¹¹¹In-DTPA-conjugated peptides. *Nucl Med Biol*. 2001; doi:10.1016/S0969-8051(01)00241-4.
201. Akizawa H, Uehara T, Arano Y. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins [eng]. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; doi:10.1016/j.addr.2008.04.005.
202. Olson RE, Christ DD. Chapter 33. Plasma Protein Binding of Drugs. In: *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Elsevier; 1996. pp. 327–36.
203. Smith DA, Di L, Kerns EH. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery [eng]. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; doi:10.1038/nrd3287.
204. Design and Preclinical Evaluation of an Albumin-Binding PSMA Ligand for ⁶⁴Cu-Based PET Imaging [en]. *Molecular Pharmaceutics*; doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00712.
205. Mengxin Xu, Pu Zhang, Jie Ding, Junyi Chen, Li Huo, Zhibo Liu. Albumin Binder–Conjugated Fibroblast Activation Protein Inhibitor Radiopharmaceuticals for Cancer Therapy [en]. *Journal of Nuclear Medicine*. 2022; doi:10.2967/jnumed.121.262533.
206. Tian R, Jacobson O, Niu G, Kiesewetter DO, Wang Z, Zhu G, et al. Evans Blue Attachment Enhances Somatostatin Receptor Subtype-2 Imaging and Radiotherapy [eng]. *Theranostics*. 2018; doi:10.7150/thno.23491.
207. Kratochwil NA, Huber W, Müller F, Kansy M, Gerber PR. Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. *Biochem Pharmacol*. 2002; doi:10.1016/s0006-2952(02)01074-2.
208. Davis RA, Hausner SH, Harris R, Sutcliffe JL. A Comparison of Evans Blue and 4-(p-Iodophenyl)butyryl Albumin Binding Moieties on an Integrin $\alpha\beta6$ Binding Peptide [eng]. *Pharmaceutics*. 2022; doi:10.3390/pharmaceutics14040745.

209. Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery [eng]. *Expert Opin Drug Discov.* 2007; doi:10.1517/17460441.2.1.51.
210. Weisen M, Simecek J, Schottelius M, Schwaiger M, Wester H-J. Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer [eng]. *EJNMMI Res.* 2014; doi:10.1186/s13550-014-0063-1.
211. Ghuman J, Zunsain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin [eng]. *J Mol Biol.* 2005; doi:10.1016/j.jmb.2005.07.075.
212. Dos Santos JC, Schäfer M, Bauder-Wüst U, Lehnert W, Leotta K, Morgenstern A, et al. Development and dosimetry of ²⁰³Pb/²¹²Pb-labelled PSMA ligands: bringing "the lead" into PSMA-targeted alpha therapy? [eng]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2019; doi:10.1007/s00259-018-4220-z.
213. Zhu W, Cheng Y, Wang X, Yao S, Jia R, Xu J, et al. Head-to-head comparison of ⁶⁸Ga-DOTA-JR11 and ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT in patients with metastatic, well-differentiated neuroendocrine tumors: a prospective study [eng]. *J Nucl Med.* 2019; doi:10.2967/jnumed.119.235093.
214. Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin [eng]. *IUBMB Life.* 2005; doi:10.1080/15216540500404093.
215. Dumelin CE, Trüssel S, Buller F, Trachsel E, Bootz F, Zhang Y, et al. A portable albumin binder from a DNA-encoded chemical library [eng]. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2008; doi:10.1002/anie.200704936.
216. Lennard Wendlinger. Neue radiohybride PET-Tracer für das Imaging neuroendokriner Tumore: Novel radiohybrid PET-Tracers for imaging of neuroendocrine tumors. Technische Universität München; 2020.
217. Ghosh SC, Rodriguez M, Carmon KS, Voss J, Wilganowski NL, Schonbrunn A, et al. A Modular Dual-Labeling Scaffold That Retains Agonistic Properties for Somatostatin Receptor Targeting [eng]. *J Nucl Med.* 2017; doi:10.2967/jnumed.116.187971.
218. Ghosh SC, Hernandez Vargas S, Rodriguez M, Kossatz S, Voss J, Carmon KS, et al. Synthesis of a Fluorescently Labeled ⁶⁸Ga-DOTA-TOC Analog for Somatostatin Receptor Targeting [eng]. *ACS Med Chem Lett.* 2017; doi:10.1021/acsmchemlett.7b00125.
219. Zorzi A, Linciano S, Angelini A. Non-covalent albumin-binding ligands for extending the circulating half-life of small biotherapeutics [eng]. *Medchemcomm.* 2019; doi:10.1039/c9md00018f.
220. Jensen KJ, Brask J. Carbohydrates in Peptide and Protein Design. *Biopolymers.* 2005; doi:10.1002/bip.20300.
221. Anderson B. *Encyclopedia of Toxicology* [eng]. 2nd ed. Burlington: Elsevier Science; 2005.

3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mittleres Überleben in Monaten in Abhängigkeit von Lokalisation des Primärtumors und Fortschritt der Tumorerkrankung (<i>local, regional, distant</i>) (OS = overall survival; mo = months). Abbildung adaptiert von <i>Dasari et al.</i> [15]	9
Abbildung 2: Sequenzen von SRIF-14 und SRIF-28 (Säuger). Jede Sphäre entspricht einer Aminosäure die durch die Angabe des Dreibuchstabencodes definiert wird; orange: identisch in beiden Peptiden; grau: Aminosäuren nur in SRIF-28 enthalten. Abbildung adaptiert von <i>Günther et al.</i> [21–24]	9
Abbildung 3: Sequenz von SRIF-14. Gelb und grau: nicht für die biologische Aktivität erforderlich; grün und blau: Stabilisation der Konformation der pharmakophoren Einheit; orange und rot: pharmakophore Einheit.[24]	12
Abbildung 4: Chemische Strukturen einer Auswahl von agonistischen (Bild oben und Tabelle mitte) und antagonistischen (Bild unten) SST Bindemotiven. Agonisten: die jeweiligen Strukturen von Octreotid,[53] TOC,[54] TATE,[54] NOC,[55] NOC-ATE,[55] BOC[55] und BOC-ATE[55] sind der Tabelle zu entnehmen. Antagonisten: die rot markierten Stereozentren sind relativ zu den Agonisten invertiert.[56]	13
Abbildung 5: Strukturen einiger klinisch angewandter Radiopharmazeutika für Diagnostik und Therapie. Die Strukturen der Bindemotive Octreotid, TOC, TATE und NOC sind dem Kapitel 2.4 <i>Ligand Entwicklung</i> zu entnehmen.	15
Abbildung 6: Übersicht über die Radiosynthesen mittels [¹⁸ F]Fluorid (links in der Abbildung) und eine Auswahl an entsprechenden prosthetischen Gruppen (rechts in der Abbildung, Moleküle 1 – 13) die zur Erzeugung von Si-F, B-F oder Al-F Bindungen eingesetzt werden können. A [¹⁸ F]Si-F durch nukleophile Substitution an Alkoxysilanen; Beispiele 1 und 2 . B [¹⁸ F]Si-F durch Isotopenaustausch; Beispiele 3 und 4 . C A [¹⁸ F]B-F durch nukleophile Substitution an Borsäureestern; Beispiele 5 – 7 . D [¹⁸ F]B-F durch Isotopenaustausch an Trifluorboraten; Beispiele 8 – 10 . E [¹⁸ F]Al-F durch Bildung von [¹⁸ F]Al-F ²⁺ und anschließender Komplexierung mittels geeignetem Chelator; Beispiele für mögliche Chelatoren 11 – 12 . Abbildung adaptiert von <i>Bernard-Gauthier et al.</i> und <i>Kumar et al.</i> [105, 106]	21
Abbildung 7: Von <i>Schirrmacher et al.</i> entwickelte SiFA-Bausteine. Pfeile implizieren eine von links nach rechts steigende Hydrolysestabilität der [¹⁸ F]Si-F-Bindung in humanem Serum.[102]	23
Abbildung 8: Von <i>Schirrmacher et al.</i> beschriebener Isotopenaustausch an [¹⁹ F]tBu ₂ PhSiF.[102]	24
Abbildung 9: Reaktionsmechanismus des Isotopenaustauschs. Postuliert für die SiFA-Strukturen Ph ₃ SiF, tBuPh ₂ SiF und tBu ₂ PhSiF (allgemeingültig für alle SiFA-Bausteine).[124]	24
Abbildung 10: A Energetisches Profil für den Isotopenaustausch an SiFAN ⁺ . Aktivierungsenergie E _a und der präexponentielle Faktor A, berechnet aus mittels des Arrhenius-Plots. B Reaktionsgleichung für die nukleophile Substitution von Ethylenglykol-di-p-tosylat. Aktivierungsenergie E _a und der präexponentielle Faktor A, berechnet mittels des Arrhenius-Plots.[127]	25

V. ANHANG

Abbildung 11: Auswahl an SiFA-Bausteinen, basierend auf dem <i>t</i> Bu ₂ PhSiF Grundmotiv, die vor allem in der Peptidsynthese Anwendung finden.[124, 127, 130–132].....	26
Abbildung 12: Auswahl an SiFA-Bausteinen, basierend auf dem <i>t</i> Bu ₂ PhSiF Grundmotiv, die vor allem in der Proteinmarkierung Anwendung finden.[130, 133–136].....	27
Abbildung 13: Entwicklung von SiTATE ausgehend von SiFA-TATE (14).[131, 139].....	29
Abbildung 14: Chemische Struktur eines exemplarischen Integrin-Liganden nach <i>Lindner et al.</i> , basierend auf dem klassischen RGD-Motiv. Lila markierte Bereiche dienen zur Steigerung der Hydrophilie.[141].....	30
Abbildung 15: Chemische Struktur eines exemplarischen GRPr-Liganden nach <i>Dialer et al.</i> , basierend auf dem klassischen Bombesin-Motiv. Lila markierte Bereiche dienen zur Steigerung der Hydrophilie.[142].....	30
Abbildung 16: Chemische Struktur von [¹⁸ F]BMPP-SiF, einem niedermolekularen, dimeren Liganden für den D2-Rezeptor.[146].....	30
Abbildung 17: Chemische Struktur von [¹⁸ F][^{nat} Ga]Ga-rhPSMA-7. Lila markierte Bereiche dienen zur Steigerung der Hydrophilie.[151].....	31
Abbildung 18: Strukturen der ¹⁸ F-markierten SST ₂ -Liganden [¹⁸ F]SiTATE, [¹⁸ F]AmBF ₃ -TATE und [¹⁸ F]AIF-NOTA-Octreotid.[131, 153, 154].....	32
Abbildung 19: PET-Bildgebung von [¹⁸ F]AmBF ₃ -TATE in AR42J-Tumor tragenden Mäusen 60 min p.i. t = Tumor, k = Niere, g = Darm, b = Blase. Einheit der Legende in %ID/g.	34
Abbildung 20: Vergleichende PET/CT-Bildgebung von [⁶⁸ Ga]DOTA-TATE (A) und [¹⁸ F]SiTATE (B) in AR42J-Tumor tragenden Mäusen, 80-90 min p.i).[116].....	34
Abbildung 21: PET/CT-Bildgebung von [¹⁸ F]AIF-NOTA-Octreotid in AR42J-Tumor tragenden Mäusen, 120 min p.i., T = Tumor, N = Niere, D = Darm. Keine Skalierung angeben.[139].....	35
Abbildung 22: PET-Scan von [⁶⁸ Ga]DOTA-TATE und [¹⁸ F]AIF-NOTA-Octreotid in einem männlichen Patienten mit rektalem NET und diffusen Metastasen.[147].....	36
Abbildung 23: Vergleichender PET-Scan von [¹⁸ F]SiTATE und [⁶⁸ Ga]DOTA-TOC in einem männlichen Patienten mit einem NET unbekanntem Ursprungs. [153].....	37
Abbildung 24: Konzeptionelle Darstellung des radiohybrid-Konzepts.[151].....	39
Abbildung 25: Kalibriergerade der Superdex 75 Increase Gelfiltrationssäule, bestimmt mittels eines niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrierungskit. MW: Molekulargewicht [Da]; t _R : experimentelle Retentionszeit; V: Elutionsvolumen; K _{av} : Partitionskoeffizient.	100
Abbildung 26: Exemplarische Korrelation der neun Referenzsubstanzen in OriginPro 2016G.....	102
Abbildung 27: Schematische Struktur der linkerfreien rhSST ₂ -Liganden bestehend aus hydrophilem Modifier (grün), SiFA-Baustein (lila) mit [¹⁸ F]- oder [¹⁹ F]Fluor (rot), Chelator (gelber Ring) mit Metallkation (ocker), SST ₂ Bindemotiv (orange) und den trifunktionellen Einheiten (grau).	111
Abbildung 28: Logarithmische Auftragung der IC ₅₀ Werte in nM (y-Achse) gegen die jeweilige Nettoladung z des Liganden (X-Achse). Datenpunkte schwarz: Daten der linkerfreien rhSST ₂ -Liganden; Datenpunkte grau: Daten der Referenzen.	119
Abbildung 29: Biodistribution von [¹⁸ F]SiTATE (n = 5), [¹⁸ F]Ga-rhLF-4 (n = 5) und [¹⁸ F]Ga-rhLF-9 (n = 4) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0,05 – 0,15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). A : Graphische Darstellung. B : Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD).....	120
Abbildung 30: Schematische Struktur der linkerbasierten rhSST ₂ -Liganden bestehend aus SiFA-Baustein (lila) mit [¹⁸ F]- oder [¹⁹ F]Fluor (rot), Chelator (gelber Ring) mit Metallkation (ocker), hydrophilem Modifier (grün), Linker (blau), SST ₂ Bindemotiv (orange) und der trifunktionellen Einheit (grau).	124
Abbildung 31: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden.....	125
Abbildung 32: Struktur der radiohybriden Einheit der 1. Generation linkerbasierter Liganden.	127
Abbildung 33: A : Graphische Darstellung der möglichen Strukturelemente der linkerbasierten Liganden der 1. Generation. B : Auflistung der Strukturelemente der Liganden. Ligand : Bezeichnung des Liganden; Nt : N-terminale Modifikation; Sk : Modifikation der Seitenkette des D-Dap; Linker : Strukturelement des Linkers.	128
Abbildung 34: Struktur des Liganden rhLB-1.9.	128
Abbildung 35: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden der 1. und der 2. Generation. Lila: SiFA-Aromat; grün: positive Ladung benachbart zum SiFA-Aromat.....	130
Abbildung 36: Strukturen der Liganden rhLB-2.1, rhLB-2.2 und rhLB-2.3.....	132
Abbildung 37: IC ₅₀ und Internalisierung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min).....	133
Abbildung 38: Lipophilie der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8).	134
Abbildung 39: HSA-Bindung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC).	135
Abbildung 40: Biodistribution von [¹⁸ F]SiTATE (n = 5), [¹⁸ F]Ga-rhLB-2.1 (n = 5) und [¹⁸ F]Pb-rhLB-2.3 (n = 5) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0,05 – 0,15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). A : Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 170 %ID/g). B : Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). D : Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.	136

V. ANHANG

Abbildung 41: Zusammenhang zwischen der Lipophilie (y_1 -Achse), der <i>in vivo</i> Akkumulation in der Mausleber in %ID/g (x-Achse) und dem apparenten Molekulargewicht in kDa (y_2 -Achse).....	137
Abbildung 42: Struktur der Liganden rhLB-2.2, rhLB-2.4 und rhLB-2.5.....	138
Abbildung 43: IC ₅₀ und Internalisierung für die Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min).....	139
Abbildung 44: Lipophilie für die Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8).....	139
Abbildung 45: HSA-Bindung für die Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC).....	140
Abbildung 46: Strukturen der Liganden rhLB-2.6, rhLB-2.9, rhLB-2.10, rhLB-2.8, rhLB-2.1 und rhLB-2.7.	141
Abbildung 47: IC ₅₀ und Internalisierung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min).....	142
Abbildung 48: Lipophilie der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8).	143
Abbildung 49: HSA-Bindung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC).....	143
Abbildung 50: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden von der 1. bis zur 3. Generation. Lila: SiFA-Aromat; grün: positive Ladung benachbart zum SiFA-Aromat.	146
Abbildung 51: Strukturen der Liganden rhLB-3.1, rhLB-3.2, rhLB-3.3 und rhLB-3.4.	148
Abbildung 52: IC ₅₀ und Internalisierung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des jeweiligen Linkers. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.....	149
Abbildung 53: Lipophilie der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des jeweiligen Linkers. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.	150
Abbildung 54: HSA-Bindung der Linker Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC). Unten: HSA-Bindung in % (HPAC). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des jeweiligen Linkers. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.	151
Abbildung 55: Biodistribution von [¹⁸ F]SiTATE (n = 5), [¹⁸ F]Ga-rhLB-2.1 (n = 5), [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.1 (n = 4), [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.2 (n = 4) und Blockadestudie von [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.1 (n = 2) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). A: Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 160 %ID/g). B: Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 40 %ID/g). C: Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). D: Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.	153
Abbildung 56: Strukturen der Liganden rhLB-3.1, rhLB-3.2, rhLB-3.5 und rhLB-3.6.	155
Abbildung 57: IC ₅₀ und Internalisierung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Chelator. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.	157
Abbildung 58: HSA-Bindung der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC). Unten: HSA-Bindung in % (HPAC). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Chelator. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.	158
Abbildung 59: Lipophilie der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Chelator. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.	159
Abbildung 60: Strukturelemente der Liganden und tabellarische Auflistung der jeweils verwendeten Strukturelemente. Ligand: Bezeichnung des Liganden; Nt: N-terminale Modifikation; Sk: Modifikation der Seitenkette des D-Dap; R: gewählte Aminosäure für den verlängerten hydrophilen Modifizier.	160
Abbildung 61: IC ₅₀ und Internalisierung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger hydrophiler Modifizier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der N-terminal verknüpften SiFAN ⁺ Gly Einheit. Rechts: Daten der über die Seitenkette verknüpften SiFAN ⁺ Gly Einheit.....	162
Abbildung 62: HSA-Bindung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC). Unten: HSA-Bindung in % (HPAC). Beschriftung der	

V. ANHANG

einzelnen Balken: jeweiliger hydrophiler Modifizier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der <i>N</i> -terminal verknüpften SiFAN ⁺ Gly Einheit. Rechts: Daten der über die Seitenkette verknüpften SiFAN ⁺ Gly Einheit.....	163
Abbildung 63: Lipophilie der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger hydrophiler Modifizier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der <i>N</i> -terminal verknüpften SiFAN ⁺ Gly Einheit. Rechts: Daten der über die Seitenkette verknüpften SiFAN ⁺ Gly Einheit.....	164
Abbildung 64: Biodistribution von [¹⁸ F]SiTATE (n = 5), [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.2 (n = 4), [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.8 (n = 4) und [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.9 (n = 4) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). A: Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 90 %ID/g). B: Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 40 %ID/g). C: Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). D: Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.....	166
Abbildung 65: Strukturen der Liganden rhLB-3.2, rhLB-3.13 und rhLB-3.14.	167
Abbildung 66: IC ₅₀ und Internalisierung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Unten: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: hydrophiler Modifizier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.....	168
Abbildung 67: Lipophilie der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8). Beschriftung der einzelnen Balken: hydrophiler Modifizier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.....	169
Abbildung 68: HSA-Bindung der Variation des hydrophilen Modifiers von linkerbasierten Liganden der 3. Generation. Oben: HSA-Bindung in % (HPAC). Unten: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC). Beschriftung der einzelnen Balken: hydrophiler Modifizier. Links: Daten wichtiger Referenzverbindungen. Mitte: Daten der 3. Generation. Rechts: Daten der 2. Generation.....	170
Abbildung 69: Strukturen der Liganden rhLB-3.2 und rhLB-3.15.	171
Abbildung 70: Biodistribution von [¹⁸ F]SiTATE (n = 5), [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.2 (n = 4) und [¹⁸ F]Ga-rhLB-3.15 (n = 5) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert ± SD). A: Graphische Darstellung der Aktivitätsanreicherung (Skalierung bis 35 %ID/g). B: Tabellarische Darstellung der Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). C: Tabellarische Darstellung der Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.....	174
Abbildung 71: Postulierte Bindung verschiedener Aromaten und des SiFA-Aromaten basierend auf den Publikationen von <i>Ghuman et al.</i> und <i>Dumelin et al.</i> [211, 215].....	175
Abbildung 72: Strukturen der radiohybriden Einheiten der linkerbasierten Liganden von der 1. bis zur 4. Generation. Lila: SiFA-Aromat; grün: positive Ladung benachbart zum SiFA-Aromat.	176
Abbildung 73: Strukturen der Liganden rhLB-4.1, rhLB-4.2, rhLB-4.3 und rhLB-4.4.	176
Abbildung 74: Postulierte Bindung der linkerbasierten Liganden der 4. Generation in die HSA-Bindetasche.	177
Abbildung 75: IC ₅₀ und Internalisierung der Liganden der 4. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Aufbau der SiFA-Einheit.	180
Abbildung 76: Lipophilie der Liganden der 4. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8). Beschriftung der einzelnen Balken: jeweiliger Aufbau der SiFA-Einheit.....	180
Abbildung 77: HSA-Bindung der Liganden der 4. Generation. Oben: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC) in zwei Skalierungen von 0 – 11 kDa und 6 – 10 kDa. Unten: HSA-Bindung in % (HPAC) in zwei Skalierungen von 0 – 100% und 80 – 92%.	181
Abbildung 78: Schematische Struktur der DOTA-TATE-basierten Liganden bestehend aus hydrophilem Modifizier (grün), SiFA-Baustein (lila) mit [¹⁸ F]- oder [¹⁹ F]Fluor (rot), Chelator (gelber Ring) mit Metallkation (ocker), SST ₂ Bindemotiv (orange) und der trifunktionellen Einheit (grau).....	183
Abbildung 79: Strukturen der Liganden rhDTB-1.1 und rhDTB-1.2.....	186
Abbildung 80: Strukturen der Liganden rhDTB-2.1, rhDTB-2.2, rhDTB-2.3, rhDTB-2.4 und rhDTB-2.5.....	188
Abbildung 81: IC ₅₀ und Internalisierung der DOTA-TATE-basierten Liganden der 2. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min).....	190
Abbildung 82: Lipophilie der DOTA-TATE-basierten Liganden der 2. Generation. Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8).	191
Abbildung 83: HSA-Bindung der DOTA-TATE-basierten Liganden der 2. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC).....	192
Abbildung 84: Strukturen der Liganden rhDTB-3.2, rhDTB-3.3 und rhDTB-3.1.	194
Abbildung 85: IC ₅₀ und Internalisierung der DOTA-TATE-basierten Liganden der 3. Generation. Links: Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3). Rechts: Internalisierung des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des hydrophilen Modifiers.....	195

V. ANHANG

Abbildung 86: HSA-Bindung der DOTA-TATE basierten Liganden der 3. Generation. Links: HSA-Bindung in % (HPAC). Rechts: Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC). Beschriftung der einzelnen Balken: Struktur des hydrophilen Modifiers.....	196
Abbildung 87: Lipophilie der DOTA-TATE basierten Liganden der 3. Generation. Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$).....	197
Abbildung 88: Biodistribution von [^{18}F]SiTATE ($n = 5$), [^{18}F]Ga-rhLB-3.2 ($n = 4$), [^{18}F]Ga-rhDTB-2.2 ($n = 3$), [^{18}F]Ga-rhDTB-2.5 ($n = 5$), und Blockadestudie von [^{18}F]Ga-rhDTB-2.2 ($n = 3$) in AR42J Tumor-tragenden, weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (1 h p.i.; 0.05 – 0.15 nmol; 1 – 20 MBq). Die Aktivitätsanreicherung ist in Prozent der injizierten Dosis je Gramm (%ID/g) angegeben (Mittelwert \pm SD).....	199
Abbildung 89: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Fluorierungsmethode, angelehnt an das Vorgehen in der <i>Munich Methode</i>	200
Abbildung 90: A: [^{18}F]Fluorid Inkorporation in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit in min bei 25 °C (x-Achse). Bestimmt mittels Radio-Dünnschichtchromatographie. B: radiochemische Reinheit in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit in min bei 25 °C (x-Achse). Bestimmt mittels RP-HPLC.....	202
Abbildung 91: A: [^{18}F]Fluorid Inkorporation in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in °C für 5 und 10 min Reaktionszeit (x-Achse). Bestimmt mittels Radio-Dünnschichtchromatographie. B: radiochemische Reinheit in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in °C für 5 und 10 min Reaktionszeit (x-Achse). Bestimmt mittels RP-HPLC.....	203
Abbildung 92: [^{18}F]Fluorid Inkorporation in % (y-Achse) in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffmenge des Peptids in nmol (x-Achse). Bestimmt mittels Radio-Dünnschichtchromatographie.....	204
Abbildung 93: A: molare Aktivität in GBq/ μmol . Jeder Balken entspricht dem Fluorierungsergebnis eines bestimmten Liganden. Sortiert von der höchsten A_m bis zur niedrigsten. B: Jeweils eingesetzte Menge [^{18}F]Fluorid in GBq. Sortierung analog zur der Anordnung in A . C: Radiochemische Ausbeute (RCY n.d.c.) in %. Sortierung analog zur der Anordnung in A	209
Abbildung 94: Statisches $\mu\text{PET/CT}$ Imaging; maximale Intensitätsprojektionen (MIP) 1 h p.i. A: [^{18}F]SiTATE; B: [^{18}F]Ga-rhLB-2.1. Pfeile indizieren Organe von besonderem Interesse (durchgängig: Tumor; gepunktet: Nieren).....	232
Abbildung 95: Statisches $\mu\text{PET/CT}$ Imaging; maximale Intensitätsprojektionen (MIP) 1 h p.i. A: [^{18}F]SiTATE; B: [^{18}F]Ga-rhLB-3.2; C: [^{18}F]Ga-rhLB-3.8; D: [^{18}F]Ga-rhLB-3.9. Pfeile indizieren Organe von besonderem Interesse (durchgängig: Tumor; gepunktet: Nieren; Striche: Leber/Darm).....	232
Abbildung 96: Statisches $\mu\text{PET/CT}$ Imaging; maximale Intensitätsprojektionen (MIP) 1 h p.i. A: [^{18}F]SiTATE; B: [^{18}F]Ga-rhLB-3.15. Pfeile indizieren Organe von besonderem Interesse (durchgängig: Tumor; gepunktet: Nieren; Striche: Leber/Darm).....	233

4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht einiger Tumorerkrankungen und entsprechender SST Expression nach <i>Reubi et al.</i> [45].....	11
Tabelle 2: Liste gängiger Isotope für die Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie. Die Liste bietet nur einen grundlegenden Überblick und stellt nicht die Gesamtheit aller zur Verfügung stehenden β^+ -Emitter dar. Die physikalisch-chemischen Daten wurden unter anderem der <i>Table of Radionuclides</i> des <i>Bureau International des Poids et Mesures</i> entnommen.[82–87].....	17
Tabelle 3: Mögliche Produktionswege zur Gewinnung von [^{18}F]. Die Tabelle gibt nur einen Überblick, für einen vollständigen Überblick, siehe <i>Guillaume et al.</i> [91, 92, 94].....	19
Tabelle 4: Vergleichende Auflistung der <i>in vitro</i> Parameter und der <i>in vivo</i> Mausdaten der [^{18}F]fluorierten SST ₂ -Liganden [^{18}F]AmBF ₃ -TATE, [^{18}F]SiTATE und [^{18}F]AlF-NOTA-Octreotid.[131, 153, 154] Zusätzlich sind die analogen Daten des klinischen Standards [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE angegeben. Einerseits aus einer eigenständigen Publikation von <i>Schottelius et al.</i> ,[57] andererseits wurden einige der Parameter ebenfalls in der [^{18}F]SiTATE Publikation nach <i>Niedermoser et al.</i> bestimmt [131].....	33
Tabelle 5: Ergebnisse der [^{18}F]Fluorierungen von AmBF ₃ -TATE, SiTATE und NOTA-Octreotid. Zugrundeliegende Publikationen sind der Spalte <i>Ref.</i> zu entnehmen.....	35
Tabelle 6: Referenzsubstanzen für die Kalibrierung in der HPAC Methode.[175, 176].....	101
Tabelle 7: Präklinische Daten verschiedener SST ₂ Bindemotive und deren DOTA-Derivate. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [^{125}I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu [^{125}I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).....	109
Tabelle 8: Strukturelemente der linkerfreien Liganden. Ligand: Bezeichnung des Liganden; Nt: N-terminale Modifikation; HM: Hydrophiler Modifizier; SiFA-Einheit: Struktur der SiFA-Einheit; Chelator-Einheit: Struktur der Chelator Einheit; BM: SST ₂ Bindemotiv.....	115
Tabelle 9: Präklinische Daten von [$^{18/19}\text{F}$]Ga- und [$^{18/19}\text{F}$]Lu-rhLF-1 und rhLF-2. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [^{125}I]I-TOC) als Mittelwert \pm SD ($n = 3$); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD ($n = 6 - 8$); Nettoladung z	115
Tabelle 10: Präklinische Daten von [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-3, [$^{18/19}\text{F}$]rhLF-4, [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-4, [$^{18/19}\text{F}$]Lu-rhLF-4, [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-5, [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-6 und [$^{18/19}\text{F}$]Ga-rhLF-7. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [^{125}I]I-	

V. ANHANG

TOC) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Nettoladung z.....	116
Tabelle 11: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-4}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-8}$ – $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-11}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Nettoladung z.....	118
Tabelle 12: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-4}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLF-9}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	122
Tabelle 13: Auflistung der möglichen Linker und hydrophilen Modifier (HM) für die linkerbasierten Liganden.	126
Tabelle 14: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.1}$ – $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-1.9}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); HSA-Bindung in % (HPAC); Nettoladung z.....	129
Tabelle 15: Präklinische Daten der Chelator Variation von linkerbasierten Liganden der 2. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	132
Tabelle 16: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.4}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.5}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	138
Tabelle 17: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.6}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.7}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.8}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.9}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.10}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierung des Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	141
Tabelle 18: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.1}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.3}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.4}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	148
Tabelle 19: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.1}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Pb-rhLB-3.5}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Pb-rhLB-3.6}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	156
Tabelle 20: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.7}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.8}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.9}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.10}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.11}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.12}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	161
Tabelle 21: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.13}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.14}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	167
Tabelle 22: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.15}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.....	172
Tabelle 23: Auflistung der Strukturelemente der Liganden. Ligand: Bezeichnung des Liganden; Nt: N-terminale Modifikation; Sk: Modifikation der Seitenkette des D-Dap; HM: Hydrophiler Modifier; BM: SST ₂ Bindemotiv.....	179
Tabelle 24: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-3.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-4.1}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-4.2}$, $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-}/[^{18/19}\text{F}]\text{Lu-rhLB-4.3}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhLB-4.4}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$ in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW_{app} in [kDa] (AMSEC).....	179
Tabelle 25: Strukturelemente der Liganden. Ligand: Bezeichnung des Liganden; HM: Hydrophiler Modifier; Linker: Struktur des Linkers und des Chelators; BM: SST ₂ Bindemotiv.....	186
Tabelle 26: Präklinische Daten von $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-1.1}$ und $[^{18/19}\text{F}]\text{Ga-rhDTB-1.2}$. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC_{50} in nM (Referenz: $[^{125}\text{I}]\text{I-TOC}$) als Mittelwert \pm SD (n = 3); Lipophilie $\text{LogD}_{\text{pH}=7.4}$ (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert \pm SD (n = 6 – 8); HSA-Bindung in % (HPAC); Nettoladung z.....	187

V. ANHANG

Tabelle 27: Präklinische Daten der DOTA-TATE basierten Liganden der 2. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.	189
Tabelle 28: Präklinische Daten der DOTA-TATE basierten Liganden der 3. Generation. Halbmaximale inhibitorische Konzentration IC ₅₀ in nM (Referenz: [¹²⁵ I]I-TOC) als Mittelwert ± SD (n = 3); Lipophilie LogD _{pH=7.4} (Verteilungskoeffizient in 1-Oktanol und PBS) als Mittelwert ± SD (n = 6 – 8); Internalisierte Aktivität des untersuchten Liganden in die Zelle relativ zu [¹²⁵ I]I-TOC in % (nach 60 min); HSA-Bindung in % (HPAC); Apparentes Molekulargewicht MW _{app} in [kDa] (AMSEC); Nettoladung z.	194
Tabelle 29: A: Aktivitätsanreicherung in %ID/g (Mittelwert ± SD). B: Tumor/Organ Verhältnisse, bestimmt aus der Aktivitätsanreicherung in %ID/g.....	199
Tabelle 30: Variation des Elutionsmittels bei der Aufreinigung von [¹⁸ F]Ga-rhLF-9 mittels Festphasenextraktion.	205
Tabelle 31: Variation des Elutionsmittels, der SPE-Kartusche und der Elutionsrichtung bei der Aufreinigung von [¹⁸ F]Ga-rhLF-4 mittels Festphasenextraktion.....	206
Tabelle 32: Variation des Elutionsmittels bei der Aufreinigung von [¹⁸ F]SiTATE mittels Festphasenextraktion.	207
Tabelle 33: Ergebnisse der [¹⁸ F]Fluorierungen. Angegeben sind die radiochemischen Ausbeuten (RCY) und die radiochemischen Reinheiten (RCP) als Mittelwerte über die gesamte Ligandklasse mit Standardabweichung (SD). Die RCY wurde sowohl nicht zerfallskorrigiert (n.d.c.) als auch zerfallskorrigiert (d.c.) ermittelt. Die RCP wurde mittels Radio-Dünnschichtchromatographie (DC) und Radio-RP-HPLC (HPLC) bestimmt. Die molare Aktivität (A _m) ist in GBq/μmol als min. – max. Spanne angegeben.	208
Tabelle 34: Resultate der Radiofluorierungen der linkerfreien Liganden.	230
Tabelle 35: Resultate der Radiofluorierungen der linkerbasierten Liganden der 2. Generation.....	230
Tabelle 36: Resultate der Radiofluorierungen der linkerbasierten Liganden der 3. Generation.....	231
Tabelle 37: Resultate der Radiofluorierungen der DOTA-TATE basierten Liganden.	231

5. Schemenverzeichnis

Schema 1: Synthesestrategie für die Herstellung von SiFA-Bromid (SiFA-Br) und SiFA-Benzoesäure (SiFA-BA).....	45
Schema 2: Reaktionsmechanismus der Boc-Entschützung von D-Trp(Boc).[185]	104
Schema 3: Synthese verschiedener SST ₂ Bindemotive am Harz. a) Belegung von 2-CTC Harz mit Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH; b) Fmoc-L-Cys(Acm)-OH; c) Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH; d) Fmoc-L-Lys(Boc)OH; e) Fmoc-D-Trp(Boc)-OH; f) Fmoc-L-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH (V1), Fmoc-L-1-Nal-OH (V2), Fmoc-L-3-BzThi-OH (V3), Fmoc-L-Pya-OH (V4), Fmoc-L-His(Trt)-OH (V5); g) Fmoc-L-Cys(Acm)-OH; h) Fmoc-D-Phe-OH; i) Bildung der Disulfidbrücke mit Tl(TFA) ₃ . Orange markierte Strukturelemente entsprechen säurelabilen Schutzgruppen.....	106
Schema 4: Synthese von JR11 am Harz. a) Belegung von RA Harz mit Fmoc-D-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH; b) Fmoc-L-Cys(Acm)-OH; c) Fmoc-L-Thr(<i>t</i> Bu)-OH; d) Fmoc-L-Lys(Boc)OH; e) Fmoc-D-Aph(Cbm)-OH; f) Fmoc-L-Aph(Hor)-OH; g) Fmoc-D-Cys(Acm)-OH; h) Fmoc-L-Phe(4-Cl)-OH; i) Bildung der Disulfidbrücke mit Tl(TFA) ₃ . Orange markierte Strukturelemente entsprechen säurelabilen Schutzgruppen.....	107
Schema 5: Synthese der linkerfreien Liganden rhLF-1 bis rhLF-2 ausgehend von NH ₂ -TATE(PG)-2-CT (V1). a) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; b) Dde-Entschützung; c) Konjugation des Chelators; d) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; e) Dde-Entschützung; f) Konjugation von SiFA-BA; g) Aufbau des hydrophilen Modifiers aus je zwei gleichen Aminosäuren: Fmoc-D-Asp(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-D-Ser(<i>t</i> Bu)-OH, Fmoc-D-Orn(Boc)-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Pma(<i>t</i> Bu) ₂ -OH; h) N-terminale Acetylierung mit Ac ₂ O; j) Fmoc-PEG ₁₂ -OH; k) TFA, H ₂ O, TIPS. Orange markierte Strukturelemente entsprechen säurelabilen Schutzgruppen.....	112
Schema 6: Entschützung der verwendeten Chelatoren DOTA, R-DOTAGA und DOTAM. DOTAM wurde ungeschützt in der Peptidsynthese eingesetzt.	113
Schema 7: Synthese des Bausteins 22 : a) Belegung von 2-CTC Harz mit Fmoc-D-Asp-OrBu; b) Konjugation von SiFA-BA; c) HFIP, DCM. Synthese der Liganden rhLF-10 und rhLF-11 ausgehend von NH ₂ -TATE(PG)-2-CT (V1); d) Dde-D-Dap(Fmoc)-OH; e) Dde-Entschützung; f) Konjugation von R-DOTAGA(<i>t</i> Bu) ₄ ; g) Dde-D-Dap(Fmoc)-OH; h) Dde-Entschützung; j) Konjugation von SiFA-BA oder Baustein 22 ; k) Konjugation von Baustein 23 ; l) TFA, H ₂ O, TIPS.....	114
Schema 8: Allgemeines Syntheschema der linkerbasierten Liganden. Ausgehend von V1 wird zunächst der geschützte Linker aufgebaut. Anschließend erfolgt der Aufbau des geschützten hydrophilen Modifiers. Im letzten Schritt wird die radiohybride Einheit aufgebaut. Sk = Seitenkettenposition der trifunktionellen Einheit D-Dap; Nt = N-terminale Position des D-Dap.	126
Schema 9: Synthese der linkerbasierten Liganden der 2. Generation ausgehend von NH ₂ -Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)- V1 . a) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH, b) Dde-Entschützung; c) Konjugation des Chelators; d) Fmoc-D-Dap(Boc)-OH; e) Konjugation von SiFA-BA; f) TFA, H ₂ O, TIPS.	131
Schema 10: Synthese der linkerbasierten Liganden der 3. Generation ausgehend von NH ₂ -Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)- V1 . a) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; b) Dde-Entschützung; c) Me ₂ -Gly-OH; d) Konjugation von DOTA(<i>t</i> Bu) ₃ e) SiFA-Br; f) TFA, H ₂ O, TIPS.....	147

V. ANHANG

- Schema 11: Synthese der linkerbasierten Liganden der 4. Generation ausgehend von NH₂-Hydrophiler-Modifier(PG)-Linker(PG)-**V1**. **a**) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; **b**) Dde-Entschützung; **c**) Konjugation von DOTA(*t*Bu)₃; **d**) Fmoc-D-Dap(Boc)-OH; **e**) Fmoc-Gly-OH; **f**) Me₂-Gly-OH; **g**) SiFA-Br; **h**) TFA, H₂O, TIPS. 178
- Schema 12: Synthese der DOTA-TATE basierten Liganden der 1. Generation ausgehend von NH₂-TATE(PG)-2-CT (**V1**). **a**) Konjugation von DOTA(*t*Bu)₂; **b**) Fmoc-D-Lys-*O**t*Bu oder Fmoc-D-Dap-*O**t*Bu; **c**) Me₂-Gly-OH; **d**) SiFA-Br; **e**) TFA, H₂O, TIPS. 184
- Schema 13: Synthese der DOTA-TATE basierten Liganden der 2. und 3. Generation ausgehend von NH₂-TATE(PG)-2-CT (**V1**). **a**) Konjugation von DOTA(*t*Bu)₂; **b**) Fmoc-D-Lys-*O**t*Bu; **c**) Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH; **d**) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH; **e**) Dde-Entschützung; **f**) Me₂-Gly-OH; **g**) Aufbau des hydrophilen Modifiers aus je drei gleichen oder verschiedenen Aminosäuren: Fmoc-D-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-D-Cit-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Dap(Boc)-OH; **h**) SiFA-Br; **j**) TFA, H₂O, TIPS. 185

6. Ergänzende Daten

Tabelle 34: Resultate der Radiofluorierungen der linkerfreien Liganden.

Ligand	RCY ± SD (n.d.c) %	RCY ± SD (d.c) %	RCP ± SD (DC) %	RCP ± SD (HPLC) %	A _m min. – max. (n.d.c) [GBq/μmol]
[^{18/19} F]Lu-rhLF-1	5.0	6.6			0.07
[^{18/19} F]Lu-rhLF-2 (n = 5)	28.2 ± 12.5	38.6 ± 17.5	94.9 ± 5.0	91.0 ± 3.0	0.20 – 0.95
[^{18/19} F]Lu-rhLF-3	19.0	26.8	95.0	99.9	0.27
[^{18/19} F]Ga-rhLF-4 (n = 3)	27.0 ± 1.5	35.9 ± 4.0	95.5 ± 0.4	95.3 ± 1.6	0.74 – 43.5
[^{18/19} F]Ga-rhLF-5	30.4	39.2	99.9	97.9	1.67
[^{18/19} F]Ga-rhLF-6	28.0	39.7	95.1	99.2	0.39
[^{18/19} F]Ga-rhLF-7	22.6	36.5	n.d	98.7	1.15
[^{18/19} F]Ga-rhLF-8	n.d.	n.d	83.9	99.9	n.d
[^{18/19} F]Ga-rhLF-9 (n = 2)	18.9 ± 18.2	24.7 ± 23.4	99.9	98.9	0.03 – 24.6
[^{18/19} F]Ga-rhLF-10	27.2	34.1	98.9	91.3	1.20
[^{18/19} F]Ga-rhLF-11	32.1	40.3	99.4	93.1	1.34

Tabelle 35: Resultate der Radiofluorierungen der linkerbasierten Liganden der 2. Generation.

Ligand	RCY ± SD (n.d.c) %	RCY ± SD (d.c) %	RCP ± SD (DC) %	RCP ± SD (HPLC) %	A _m min. – max. (n.d.c) [GBq/μmol]
[^{18/19} F]Ga-rhLB-2.1 (n = 3)	39.8 ± 3.4	50.0 ± 5.4	98.8	97.2	2.87 – 12.9
[^{18/19} F]Lu-rhLB-2.2	23.4	43.5	97.5	98.7	1.48
[^{18/19} F]Pb-rhLB-2.3 (n = 2)	27.1 ± 0.8	32.6 ± 1.2	n.d.	95.7 ± 0.6	0.92 – 5.27
[^{18/19} F]Ga-rhLB-2.5	21.7	34.6	98.7	96.7	0.75
[^{18/19} F]Ga-rhLB-2.7	25.9	34.2	99.1	96.6	1.73
[^{18/19} F]Ga-rhLB-2.8	20.5	32.5	98.7	95.2	0.72
[^{18/19} F]Ga-rhLB-2.9	22.7	36.7	99.3	96.0	0.79
[^{18/19} F]Ga-rhLB-2.10	17.0	31.5	99.4	79.1	1.09

V. ANHANG

Tabelle 36: Resultate der Radiofluorierungen der linkerbasierten Liganden der 3. Generation.

Ligand	RCY ± SD (n.d.c) %	RCY ± SD (d.c) %	RCP ± SD (DC) %	RCP ± SD (HPLC) %	A _m min. – max. (n.d.c) [GBq/μmol]
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.1	22.0	40.8	99.2	90.9	1.37
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.1 (n = 4)	34.4 ± 11.1	41.2 ± 13.0	98.9 ± 0.4	95.6 ± 1.9	2.75 – 11.7
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.2 (n = 2)	38.8 ± 3.2	45.2 ± 2.7	99.4 ± 0.1	97.3 ± 0.7	1.37 – 20.4
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.3	22.1	42.0	99.2	99.1	0.81
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.3	10.3	23.5	n.d.	n.d.	3.02
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.4	20.1	38.6	99.4	99.9	0.73
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.4	39.8	48.0	99.0	94.9	1.28
[^{18/19} F]Pb-rhLB-3.5	20.4	25.3	99.9	97.1	1.44
[^{18/19} F]Pb-rhLB-3.6 (n = 2)	28.1 ± 6.6	45.6 ± 3.6	99.3 ± 0.1	98.4 ± 1.5	1.34 – 18.9
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.7	19.7	36.9	99.1	97.5	0.82
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.7	36.5	49.1	n.d.	n.d.	1.91
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.8	22.1	41.6	98.8	98.0	0.98
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.8 (n = 2)	37.2 ± 1.2	47.0 ± 1.5	99.4	95.8	1.73 – 17.6
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.9	17.0	32.2	98.8	99.9	0.64
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.9 (n = 2)	25.5 ± 9.1	39.1 ± 2.1	99.5	95.1	4.78 – 21.9
[^{18/19} F]Lu-rhLB-3.10	23.5	44.7	99.4	96.5	0.86
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.10	13.5	30.6	n.d.	n.d.	3.95
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.11 (n = 2)	23.4 ± 2.6	43.1 ± 5.0	98.8 ± 0.4	97.4 ± 0.3	0.68 – 1.32
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.12	26.2	38.8	99.3	96.6	0.69
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.13	21.2	48.5	99.5	95.5	1.37
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.14	4.9	11.3	98.2	98.3	1.12
[^{18/19} F]Ga-rhLB-3.15 (n = 2)	25.0 ± 4.7	32.4 ± 2.3	98.9 ± 0.2	95.8 ± 0.1	0.53 – 12.9
[^{18/19} F]Ga-rhLB-4.4	22.6	33.5	99.1	99.9	0.59

Tabelle 37: Resultate der Radiofluorierungen der DOTA-TATE basierten Liganden.

Ligand	RCY ± SD (n.d.c) %	RCY ± SD (d.c) %	RCP ± SD (DC) %	RCP ± SD (HPLC) %	A _m min. – max. (n.d.c) [GBq/μmol]
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-1.1	18.5	24.8	98.8	89.1	0.52
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-1.2	19.8	27.8	97.5	92.9	0.86
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-2.1	5.4	8.3	96.7	95.8	0.24
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-2.2 (n = 3)	26.9 ± 11.2	32.1 ± 12.3	98.1 ± 0.7	95.7 ± 0.2	0.58 – 17.5
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-2.3 (n = 2)	25.9 ± 5.1	33.7 ± 7.2	96.1	95.5	1.14 – 1.44
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-2.4 (n = 2)	10.9 ± 1.8	15.9 ± 2.2	94.8	95.2	0.43 – 0.72
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-2.5 (n = 2)	30.9 ± 7.1	41.4 ± 3.5	97.5 ± 0.5	95.3 ± 2.1	0.96 – 13.7
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-3.1	18.1	22.5	99.4	97.2	4.53
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-3.2	6.63	9.62	99.1	89.8	1.15
[^{18/19} F]Ga-rhDTB-3.3	6.99	10.5	98.5	89.8	1.41

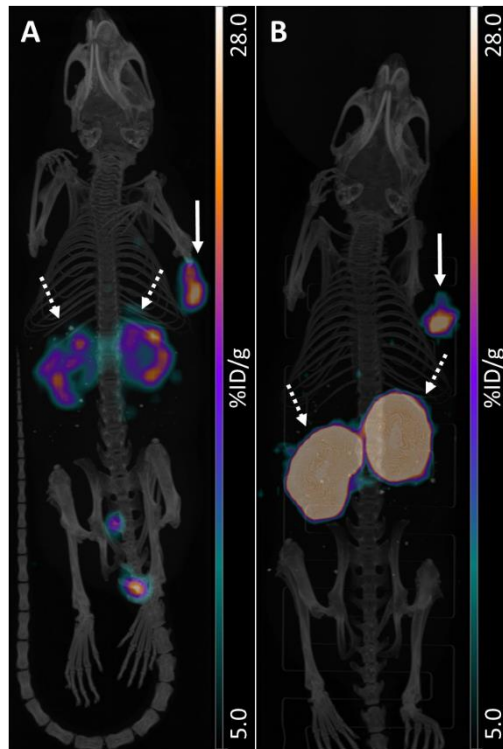


Abbildung 94: Statisches μ PET/CT Imaging; maximale Intensitätsprojektionen (MIP) 1 h p.i.. **A:** $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$; **B:** $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-2.1}$. Pfeile indizieren Organe von besonderem Interesse (durchgängig: Tumor; gepunktet: Nieren).

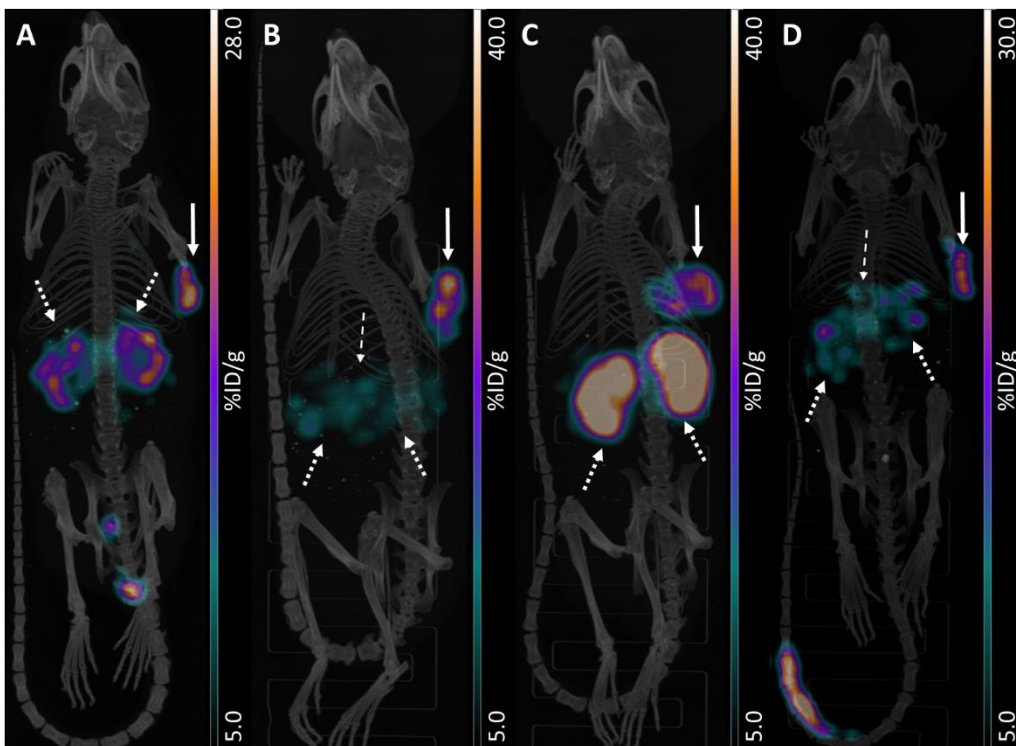


Abbildung 95: Statisches μ PET/CT Imaging; maximale Intensitätsprojektionen (MIP) 1 h p.i.. **A:** $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$; **B:** $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.2}$; **C:** $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.8}$; **D:** $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.9}$. Pfeile indizieren Organe von besonderem Interesse (durchgängig: Tumor; gepunktet: Nieren; Striche: Leber/Darm).

V. ANHANG

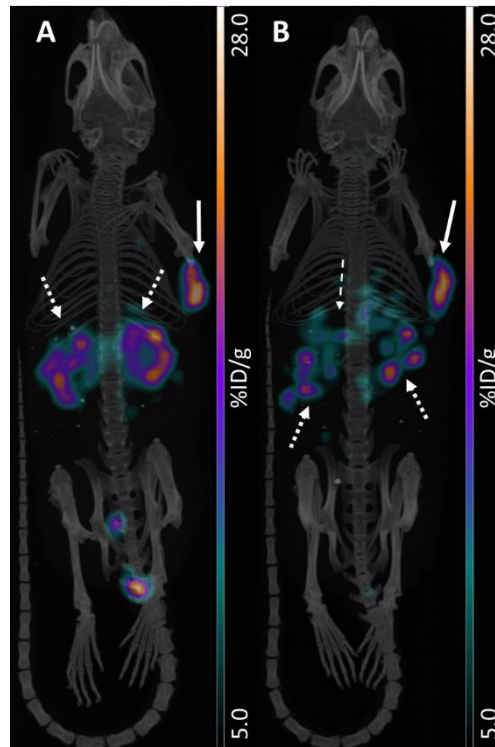


Abbildung 96: Statisches $\mu\text{PET}/\text{CT}$ Imaging; maximale Intensitätsprojektionen (MIP) 1 h p.i.. **A:** $[^{18}\text{F}]\text{SiTATE}$; **B:** $[^{18}\text{F}]\text{Ga-rhLB-3.15}$. Pfeile indizieren Organe von besonderem Interesse (durchgängig: Tumor; gepunktet: Nieren; Striche: Leber/Darm).

7. Danksagung

Ich danke Prof. Wester für die Betreuung dieser Arbeit während meiner Tätigkeit am Lehrstuhl für pharmazeutische Radiochemie. Vielen Dank für die Möglichkeit zu forschen und die Bereitstellung aller nötigen Mittel und Werkzeuge und die fachliche Beratung.

Ein großes Dankeschön an Prof. Schottelius, nicht nur für die spontane Übernahme der Prüfungsverantwortlichkeit, sondern auch für den fachlichen Austausch und die lachenden Unterhaltungen während der gemeinsamen Zeit am Lehrstuhl.

Vielen Dank auch an Dr. Beck und Dr. Urtz-Urban, sowie natürlich Tanja und Jana, für die verlässliche Unterstützung bei allen Tierexperimenten.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Christine Winkler und bei den Herren Größlhuber und Matheis, sowie dem gesamten Strahlenschutz. Ohne die zuverlässige Unterstützung bei organisatorischen, handwerklichen oder Kontaminationsproblemen, wäre die Arbeit am Lehrstuhl nicht so glatt gelaufen.

Ganz besonders bedanke ich mich natürlich bei Vroni, Wu, Daniel, Markus, JP, Basti, Thomas, Leon, Nadine, Sandra, Sebi, Franzi, Jana und Tanja. Ich blicke auf viele Jahre harmonischer und freundschaftlicher Arbeit und erbitterter Kicker-Turniere zurück. Ohne euch und die zuverlässige Unterstützung, wäre das Ganze nicht möglich gewesen.

Ein spezieller Dank geht natürlich an Matthias. Du und Alexander Markus habt mich durch die Promotion begleitet. Mit vielen Litern Kaffee, Wein und düsterem Humor, haben wir die Zeit halbwegs heil überstanden. Vielen Dank für deine Nüchternheit in (fast) allen Lebenslagen.

Vielen herzlichen Dank an alle meine Freunde und Gini im speziellen (Vino is life), an die Crem, an den Konrad Clan und an die Roths.

Abschließend ein großer und wichtiger Dank an meine Eltern Ika und Rene und an meine Tante Bettina: Ihr habt mich durch all die Jahre des Studiums und der Promotion begleitet, mich unterstützt, meine Launen ertragen und auch finanziert. Wir haben es endlich geschafft! Ich danke euch von Herzen.