

# **Multifunktionelle Radioliganden für das Prostata-spezifische Membranantigen**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von

Dipl. Chem. Tobias Stemler

Saarbrücken

2023

Tag des Kolloquiums: 07.12.2023

Dekan: Prof. Dr. Ludger Santen

Berichterstatter: Prof. Dr. Gregor Jung  
Prof. Dr. Christian Ducho

Vorsitz: Prof. Dr. Martin Van der Laan

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Mark Bartholomä

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2016 – April 2022 am Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Universität des Saarlandes unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gregor Jung sowie am Klinikum für Nuklearmedizin am Universitätsklinikum des Saarlandes unter Direktion von Herrn Prof. Dr. Samer Ezziddin durchgeführt.

**„Well, I believe in the love that you gave me I believe in the faith that can save me I believe in the hope and I pray that some day it may raise me above these badlands“**

Bruce Springsteen "Badlands" Song lyrics, Darkness on the Edge of Town (1978)

Meiner Schwester Franziska,  
Meinen Eltern Thomas und Claudia,  
Meinen Großeltern Edith und Werner, Felizitas und Gerhard

## Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) zählt zu einer der häufigsten Tumorentitäten bei Männern weltweit. Ein sehr innovativer Ansatz der Nuklearmedizin nutzt für die Diagnostik und die Therapie des PCa das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA), eines auf der Oberfläche der Tumorzellen überexprimiertes Protein, als spezifisches Target. Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich auf dieser Grundlage mit der Entwicklung neuartiger multifunktionaler PSMA-spezifischer Radiotracer.

Eines der beiden Teilprojekte befasste sich mit der Synthese, der Radiomarkierung und *in vitro* Evaluation von BODIPY-PSMA-Liganden als Radiotracer für die PET/CT- und Fluoreszenz Hybrid-Bildgebung. Nach Erstellung einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung konnte ein <sup>18</sup>F-markiertes BODIPY-PSMA-Konjugat als potentieller fluoreszierender PSMA-spezifischer Radiotracer für die duale Bildgebung beim Prostatakarzinom identifiziert werden.

Das zweite Teilprojekt beschäftigte sich mit der Darstellung von Dichelator PSMA-Liganden als radiohybride Verbindungen. In der vorliegenden Dissertation wurden dabei besonders die (radio)chemischen Grundlagen der selektiven Dualmarkierung einer Dichelatormodellverbindung untersucht. Nach erfolgreichem Nachweis dieses innovativen Konzepts gelang zusätzlich die Etablierung einer Syntheseroute eines Dichelator PSMA-Liganden, wodurch eine neuartige Plattform an Radiotracern erfolgreich generiert werden konnte.

## **Abstract**

Prostate cancer (PCa) is one of the most common tumor entities in men. A very innovative therapy approach in nuclear medicine uses the prostate specific membrane antigen (PSMA), a protein, which is overexpressed on the surface of PCa cells, as a specific molecular target. Based on this concept this project focused on the development of novel multifunctional PSMA-specific radioligands.

The first part of this thesis dealt with the synthesis, the radiolabeling and the *in vitro* evaluation of BODIPY-labeled PSMA ligands as radiotracers for PET/CT and fluorescence hybrid imaging. After establishing a structure-activity relationship a fluorine-18-labeled BODIPY-PSMA conjugate could be identified as a potential fluorescent PSMA-specific radiotracer for dual imaging of prostate cancer lesions.

The second part of this thesis focused on dichelator PSMA-ligands as radiohybrid compounds. In this dissertation, the (radio)chemical basics of the selective dual labeling using a dichelator model compound were investigated. After proofing this innovative concept, a synthesis route of a dichelator PSMA-ligand was established and tested in terms of its biological applicability, which enabled the generation of a novel platform of radiotracers.

## **Danksagungen**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gregor Jung für die Bereitschaft diese Arbeit unter seiner Betreuung anfertigen zu können. Ich bedanke mich für die Unterstützung, die stetige Diskussionsbereitschaft und die Freiheit meine eigenen Ideen verwirklichen zu dürfen. Herrn Prof. Dr. Christian Ducho danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Caroline Hoffmann und Herrn PD Dr. Elmar Krause für die erfolgreiche Zusammenarbeit, das kritische Hinterfragen verschiedener Sachverhalte und die zahlreichen Diskussionen im Rahmen unserer Kooperation.

Großer Dank gilt meinen Kollegen Herrn Dipl. Ing. Chem. Stephan Maus und Frau Dr. Andrea Schaefer-Schuler für die tolle Unterstützung im klinischen Arbeitsalltag. Ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Samer Ezziddin für die Möglichkeit große Teile dieser Arbeit in der Klinik für Nuklearmedizin anfertigen zu können und für das in mich gesetzte Vertrauen über die Jahre. Desweiteren gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und die Aufheiterung, auch in schwierigen Zeiten.

Mein größter Dank gebührt Herrn Dr. Mark Bartholomä für die einzigartige Betreuung, das Teilen seines Wissens, die vielen Ratschläge, die Heranführung an viele neue Arbeitstechniken, die Diskussionsbereitschaft für das Lösen von Problemen, fürs Zuhören als Freund bei privaten Problemen sowie ganz besonders für die freundschaftliche Zusammenarbeit, womit er mich auf den richtigen Weg geführt hat und somit maßgeblich zur erfolgreichen Anfertigung dieser Arbeit beitrug. Ich hoffe, dass diese tolle Zusammenarbeit noch viele Jahre bestehen wird und in Zukunft noch viele weitere spannende Projekte folgen werden!

## Inhaltsverzeichnis

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>1</b>    | <b>Theoretische Grundlagen</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1         | Das Prostataspezifische Membranantigen und seine Bedeutung beim Prostatakarzinom                               | 1         |
| 1.2         | PSMA-spezifische Radiotracer .....   | 7         |
| 1.2.1       | Einführung in die Nuklearmedizin .....   | 7         |
| 1.2.1.1     | Physikalische Grundlagen und nuklearmedizinische Verfahren bei onkologischen Fragestellungen.....              | 7         |
| 1.2.1.2     | Aufbau von Radiotracern.....   | 12        |
| 1.2.2       | Einführung in die Radiochemie – Grundlagen der Radiomarkierung .....   | 13        |
| 1.2.2.1     | Radiomarkierungen mit Metallen.....  | 13        |
| 1.2.2.2     | Radiomarkierungen mit Nichtmetallen .....  | 16        |
| 1.2.3       | Grundlagen PSMA-spezifischer Radiotracer .....   | 20        |
| 1.2.3.1     | PSMA-Liganden für die Bildgebung des PCa.....  | 22        |
| 1.2.3.2     | PSMA-Liganden für die Therapie des PCa.....  | 25        |
| 1.2.3.3     | Multimodale PSMA-Liganden .....  | 29        |
| 1.2.3.3.1   | Fluoreszierende PSMA-Radioliganden.....  | 29        |
| 1.2.3.3.2   | Radiohybrid-Liganden .....   | 32        |
| 1.2.3.3.2.1 | Charakteristika und allgemeiner Aufbau radiohybrider Tracer .....  | 32        |
| 1.2.3.3.2.2 | Radiohybride PSMA-Liganden .....   | 33        |
| <b>2</b>    | <b>Zielsetzung</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>3</b>    | <b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....   | <b>37</b> |
| 3.1         | BODIPY-PSMA-Liganden .....   | 37        |
| 3.1.1       | Synthese und Charakterisierung von BODIPY-PSMA-Biokonjugaten .....   | 40        |
| 3.1.2       | Radiomarkierung der BODIPY-PSMA-Liganden mittels <sup>19</sup> F/ <sup>18</sup> F-Isotopenaustausch.....       | 49        |
| 3.1.3       | Synthese und Radiomarkierung eines potentiellen radiohybriden BODIPY-PSMA-Liganden.....                        | 53        |
| 3.1.3.1     | Synthese von Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-BODIPY <b>12</b> .....   | 53        |
| 3.1.3.2     | <sup>18</sup> F- und <sup>177</sup> Lu-Markierung des potentiellen radiohybriden PSMA-Liganden <b>12</b> ..... | 56        |
| 3.1.4       | Stabilitätsuntersuchungen der BODIPY-PSMA-Liganden und der BODIPY-Carbonsäure <b>1</b> ..                      | 59        |
| 3.1.4.1     | Stabilitätsuntersuchungen unter den Bedingungen der Festphasensynthese.....                                    | 59        |
| 3.1.4.2     | Stabilitätsuntersuchungen unter den Bedingungen des <sup>19</sup> F/ <sup>18</sup> F-Isotopenaustausches....   | 61        |
| 3.1.4.3     | Stabilitätsuntersuchungen des radioaktivmarkierten BODIPY-PSMA-Liganden [ <sup>18</sup> F]F6 in PBS .....      | 65        |
| 3.1.5       | Log D <sub>oct/PBS</sub> -Bestimmung der radiomarkierten BODIPY-PSMA-Liganden .....                            | 66        |
| 3.1.6       | In vitro Evaluation der BODIPY-PSMA-Liganden <b>5, 6, 7, 8</b> und <b>12</b> .....                             | 67        |
| 3.1.6.1     | Bestimmung der PSMA-Affinität der BODIPY-PSMA-Liganden <b>5, 6, 7, 8</b> und <b>12</b> .....                   | 67        |
| 3.1.6.2     | Bestimmung der Tumorinternalisierung des BODIPY-PSMA-Liganden <b>6</b> .....                                   | 70        |
| 3.1.6.3     | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der PSMA-Internalisierung.....  | 71        |
| 3.1.6.3.1   | Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Liganden <b>5, 6, 7, 8</b> und <b>12</b> .....                  | 71        |
| 3.1.6.3.2   | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des BODIPY-PSMA-Liganden <b>6</b> .....                               | 73        |
| 3.1.6.3.3   | Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von <b>1</b> mittels FireFly-Laparoskop.....                        | 76        |
| 3.2         | Radiohybride PSMA-Liganden .....   | 78        |
| 3.2.1       | Synthese des Dichelatormodellkonstrukts NODIA-Me-Bz-DOTA .....   | 84        |
| 3.2.2       | Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung des Dichelator Modellliganden .....                           | 87        |
| 3.2.2.1     | Massenspektrometrische Untersuchungen der selektiven Metallkomplexierung von NODIA-Me-Bz-DOTA <b>16</b> .....  | 88        |
| 3.2.2.2     | Synthese heterodinuklearer Metallkomplexe vom Typ [CuLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)].....                                | 93        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 3.2.2.3     | UV/Vis-Spektroskopische Untersuchungen der regioselektiven Metallkomplexierung durch das Dichelatormodellkonstrukt <b>16</b> .....                 | 98         |
| 3.2.2.4     | NMR-spektroskopische Untersuchungen des Modellkonstruktes <b>16</b> und der Metallkomplexe <b>Lu16</b> sowie <b>ZnLu16</b> .....                   | 104        |
| 3.2.2.5     | EPR-spektroskopische Untersuchungen zum Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung.....  | 110        |
| 3.2.3       | Radiomarkierungsexperimente des Modellliganden NODIA-Me-Bz-DOTA <b>16</b> zum Nachweis der Doppelmarkierung mit entsprechenden Radionukliden ..... | 113        |
| 3.2.4       | Synthese und in vitro Evaluation eines Dichelator-PSMA-Liganden .....  | 125        |
| <b>4</b>    | <b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....  | <b>130</b> |
| <b>5</b>    | <b>Experimenteller Teil</b> .....  | <b>134</b> |
| 5.1         | Allgemeines.....   | 134        |
| 5.2         | Allgemeine Arbeitsvorschriften (AV) .....  | 136        |
| 5.3         | Syntheseteil.....  | 145        |
| 5.3.1       | Synthese der BODIPY-PSMA-Liganden .....  | 145        |
| 5.3.1.1     | Synthese der Liganden <b>5, 6, 7, 8</b> und <b>12</b> mittels kombinierter Syntheseroute .....   | 145        |
| 5.3.1.1.1   | Synthese des PSMA Bindemotivs Glu-CO-Lys mittels Festphasensynthese .....  | 145        |
| 5.3.1.1.2   | Finale Synthese der BODIPY-PSMA-Liganden <b>5, 6, 7, 8</b> und <b>12</b> .....   | 146        |
| 5.3.1.1.2.1 | Synthese Glu-CO-Lys-BODIPY <b>5</b> .....  | 146        |
| 5.3.1.1.2.2 | Synthese Glu-CO-Lys-Ahx-BODIPY <b>6</b> .....  | 147        |
| 5.3.1.1.2.3 | Synthese Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx-BODIPY <b>7</b> .....  | 148        |
| 5.3.1.1.2.4 | Synthese Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-BODIPY <b>8</b> .....  | 149        |
| 5.3.1.1.2.5 | Synthese Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-BODIPY <b>12</b> .....   | 151        |
| 5.3.1.1.2.6 | Synthese Glu-CO-Lys-Ahx-Dipyrrol <b>13</b> .....   | 152        |
| 5.3.1.2     | Synthese PSMA-Bindemotiv in Lösung .....   | 153        |
| 5.3.1.2.1   | Synthese Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)-ε-NHBOC <b>9</b> .....   | 153        |
| 5.3.1.2.2   | Synthese Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)-ε-NH <sub>2</sub> <b>10</b> .....  | 154        |
| 5.3.2       | Synthese Dichelator-PSMA-Liganden .....  | 155        |
| 5.3.2.1     | Synthese Dichelatormodellkonstrukt NODIA-Me-Bz-DOTA <b>16</b> .....  | 155        |
| 5.3.2.1.1   | Synthese NODIA-Me-Benzylamin <b>15</b> .....   | 155        |
| 5.3.2.1.2   | Synthese NODIA-Me-Bz-DOTA <b>16</b> .....  | 156        |
| 5.3.3       | Synthese der Metallkomplexe des Modellkonstruktes <b>16</b> .....  | 157        |
| 5.3.3.1     | Synthese der Cu-Komplexe <b>Cu16</b> und <b>Cu<sub>2</sub>16</b> .....   | 157        |
| 5.3.3.1.1   | Synthese von <b>Cu16</b> .....   | 157        |
| 5.3.3.1.2   | Synthese von <b>Cu<sub>2</sub>16</b> .....   | 157        |
| 5.3.3.2     | Synthese der Metallkomplexe vom Typ [Ln(NODIA-Me-Bz- DOTA)] / Ln <b>16</b> .....   | 158        |
| 5.3.3.2.1   | Synthese von <b>Lu16</b> .....   | 158        |
| 5.3.3.2.2   | Synthese von <b>La16</b> .....   | 159        |
| 5.3.3.2.3   | Synthese von <b>Tb16</b> .....   | 159        |
| 5.3.3.2.4   | Synthese von <b>Eu16</b> .....   | 160        |
| 5.3.3.2.5   | Synthese von <b>Gd16</b> .....   | 160        |
| 5.3.3.2.6   | Synthese von <b>Tm16</b> .....   | 161        |
| 5.3.3.3     | Synthese der heterodinuklearen Metallkomplexe vom Typ [MLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)] / MLn <b>16</b> .....  | 162        |
| 5.3.3.3.1   | Synthese von <b>CuLu16</b> .....   | 162        |
| 5.3.3.3.2   | Synthese von <b>CuLa16</b> .....   | 162        |
| 5.3.3.3.3   | Synthese von <b>CuTb16</b> .....   | 163        |
| 5.3.3.3.4   | Synthese von <b>CuEu16</b> .....   | 163        |
| 5.3.3.3.5   | Synthese von <b>CuGd16</b> .....   | 164        |
| 5.3.3.3.6   | Synthese von <b>CuTm16</b> .....   | 164        |
| 5.3.3.3.7   | Synthese von <b>ZnLu16</b> .....   | 165        |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| 5.3.3.4   | Synthese der Dichelator-PSMA-Liganden .....   | 166 |
| 5.3.3.4.1 | Synthese des Linkers Fmoc-Xylylendiamin <b>17</b> .....   | 166 |
| 5.3.3.4.2 | Synthese der Dichelator-PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-NODIA-Me <b>18</b> und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-Me <b>19</b> .....                  | 167 |
| 5.4       | Fluoreszenzspektroskopie und Stabilitätsuntersuchung der BODIPY-PSMA-Liganden ..  | 169 |
| 5.4.1     | Messung Absorptions-Emissionsspektren .....   | 169 |
| 5.4.2     | Stabilitätsuntersuchungen der BODIPY-PSMA-Liganden.....   | 169 |
| 5.4.2.1   | Stabilitätsuntersuchung BODIPY-Carbonsäure - Inkubation mit TFA .....   | 169 |
| 5.4.2.2   | Stabilitätsuntersuchung BODIPY-Carbonsäure - Inkubation mit SnCl <sub>4</sub> .....   | 169 |
| 5.5       | Spektroskopischer Nachweis der selektiven Metallkomplexierung Modellligand <b>16</b> ....   | 170 |
| 5.5.1     | Vorbereitung der Stammlösungen für die Massenspektroskopie.....   | 170 |
| 5.5.2     | Stammlösungen des Modelkonstruktes und der Metallkomplexe für die UV/Vis-Spektroskopie .....  | 172 |
| 5.5.3     | Stammlösungen des Modelkonstruktes und der Metallkomplexe für die EPR-Spektroskopie .....   | 173 |
| 5.5.4     | Synthese der Metallkomplexe für die NMR-Spektroskopie .....   | 173 |
| 5.6       | Radiolabeling der multifunktionellen PSMA-Liganden.....   | 174 |
| 5.6.1     | <sup>18</sup> F-Markierung der BODIPY-PSMA-Liganden.....  | 174 |
| 5.6.1.1   | Ansatz der Stammlösungen für die Durchführung des <sup>19</sup> F/ <sup>18</sup> F-Isotopenaustauschs der BODIPY-PSMA-Liganden .....                                | 174 |
| 5.6.1.2   | Durchführung des <sup>19</sup> F/ <sup>18</sup> F-Isotopenaustausch der BODIPY-PSMA-Liganden .....  | 174 |
| 5.6.1.3   | Bestimmung der Log D <sub>Oct/PBS</sub> Werte der BODIPY-PSMA-Liganden .....  | 175 |
| 5.6.1.4   | Ermittlung der PBS Stabilität von [ <sup>18</sup> F]F6 .....  | 175 |
| 5.6.1.5   | <sup>177</sup> Lu-Markierung des BODIPY-PSMA-Liganden <b>12</b> .....   | 176 |
| 5.6.2     | Radiomarkierungen Modelkonstrukt <b>16</b> .....  | 177 |
| 5.6.2.1   | <sup>64</sup> Cu- <sup>177</sup> Lu- <sup>225</sup> Ac-Markierung des Modellkonstrukts <b>16</b> .....  | 177 |
| 5.6.2.2   | Synthese der dualmarkierten Komplexe mittels Absättigung durch die entsprechenden nichtradioaktiven Metallsalze.....  | 179 |
| 5.6.3     | Verwendete Stammlösungen für in vitro Evaluation der BODIPY-PSMA-Liganden .....   | 181 |
| 5.6.3.1   | Stammlösungen der BODIPY-PSMA-Liganden für das kompetitive Bindungsassay .....  | 181 |
| 5.6.3.2   | Stammlösung und Durchführung der Zellinternalisierung von Ligand <b>6</b> .....   | 181 |
| 5.6.3.3   | Stammlösungen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der BODIPY PSMA Liganden.....   | 183 |
| 5.6.3.4   | Stammlösungen - In vitro Evaluation Dichelator PSMA-Liganden.....   | 183 |
| <b>6</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | 184 |
| <b>7</b>  | <b>Anhang</b> .....   | 199 |
| 7.1       | Spektroskopische Charakterisierung der multifunktionellen PSMA-Liganden.....  | 199 |
| 7.1.1     | Spektroskopische Charakterisierung der PSMA-Bindemotiv und BODIPY PSMA-Liganden .   | 199 |
| 7.1.2     | Spektroskopische Charakterisierung Bischelator PSMA-Liganden und der (heterodinuklearen) Metallkomplexe.....  | 217 |
| 7.1.2.1   | Spektroskopische Charakterisierung <b>16</b> .....  | 217 |
| 7.1.2.2   | Spektroskopische Charakterisierung der Metallkomplexe vom Typ [Ln(NODIA-Me-Bz-DOTA)] und der heterodiknuklearen Metallkomplexe vom Typ [MLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)]..... | 221 |
| 7.1.2.3   | Analytische HPLC heterodinukleare Metallkomplexe .....  | 230 |
| 7.2       | <i>In vitro</i> Evaluation der multifunktionellen PSMA-Liganden .....   | 233 |
| 7.2.1     | Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays der BODIPY-PSMA-Liganden .....   | 233 |
| 7.2.2     | Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays der Bischelator PSMA-Liganden.....   | 234 |
| 7.3       | Publikationen und Konferenzbeiträge .....   | 235 |
| 7.4       | Abbildungsverzeichnis .....   | 237 |

|     |                           |     |
|-----|---------------------------|-----|
| 7.5 | Tabellenverzeichnis ..... | 246 |
|-----|---------------------------|-----|

## Abkürzungsverzeichnis

|                        |   |
|------------------------|---|
| $\lambda_{\text{abs}}$ | Absorptionswellenlänge                                    |
| $\lambda_{\text{em}}$  | Emissionswellenlänge                                      |
| $\lambda_{\text{exc}}$ | Anregungswellenlänge                                      |
| °C                     | Grad Celsius  |
| 2-Nal                  | 2-Naphthylalanin  |
| 2-PMPA                 | 2-(Phosphonomethyl)pentandicarbonsäure                    |
| $A_m$                  | Molare Aktivität  |
| $A_s$                  | Spezifische Aktivität                                     |
| AA                     | Aminosäure, engl. amino acid                              |
| Abb.                   | Abbildung   |
| Abs.                   | Absorption  |
| Ahx                    | 6-Aminohexansäure   |
| Amc                    | trans-Aminomethylcyclohexylcarbonsäure                    |
| Aq.                    | Wässrig, engl. aqueous                                    |
| Äq.                    | Äquivalente   |
| a.u.                   | Willkürliche Einkeit, engl. arbitrary units               |
| BCR                    | Biochemisches Rezidiv beim Prostatakarzinom               |
| Ber.                   | Berechnet   |
| BFC                    | Bifunktionseller Chelator                                 |
| BOC                    | <i>tert.</i> Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe                |
| BODIPY                 | Borondipyrrromethan-Farbstoff                             |
| Bspw.                  | Beispeilsweise  |
| Bz                     | Benzyl  |
| c                      | Konzentration   |
| CDI                    | 1,1'-Carbonyldiimidazol                                   |
| CD <sub>3</sub> OD     | Deuteriertes Methanol, Lösungsmittel NMR-Spektroskopie    |
| CPS                    | Impulsrate, engl. counts per second                       |
| CV                     | Säulenvolumen Flash-Chromatographie, engl. column volume, |
| D <sub>2</sub> O       | Deuteriumoxid, Lösungsmittel NMR-Spektroskopie            |
| DAPI                   | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                               |

|                   |   |
|-------------------|---|
| DIPEA             | N,N'-Diisopropylethylamin   |
| DMF               | N,N'-Dimethylformamid   |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid  |
| DOOA              | 3,6-Dioxa-8-octanamin   |
| DOTA              | 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure  |
| DTPA              | Diethylentriaminpentaessigsäure   |
| Em.               | Emission  |
| FDG               | Fluordesoxyglucose  |
| Fmoc              | Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe   |
| g                 | Gramm   |
| GBq               | Giga-Bequerel   |
| GCPII             | Glutamatcarboxypeptidase II (= PSMA)  |
| Gef.              | Gefunden  |
| Glu-CO-Lys        | PSMA-Bindemotiv; Glutaminsäure-Lysin-Dimer  |
| H <sub>2</sub> O  | Wasser  |
| HATU              | <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorphosphat                                 |
| HBED-CC           | <i>N,N'</i> -bis[2-Hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl]ethyldiamin- <i>N,N'</i> -diessigsäure                                  |
| HPLC              | high pressure liquid chromatography   |
| IC <sub>50</sub>  | Mittlere inhibitorische Konzentration   |
| kDa               | Kilodalton  |
| K <sub>i</sub>    | Inhibitor-Konstante   |
| keV               | Kiloelektronenvolt  |
| Ln                | Lanthanoid  |
| LnCl <sub>3</sub> | Lanthanoid-Chlorid-Salz   |
| LOR               | line of response  |
| LR-ESI-MS         | Niedrigauflösende Elektronenspray Ionisations Massenspektroskopie, engl.<br>low resolution electrospray mass spectrometry |
| M                 | Molekulargewicht  |
| Min               | Minute  |
| m/z               | Masse zu Ladungs-Verhältnis; Massenspektroskopie  |
| MBq               | Mega-Bequerel   |
| mCRPC             | Metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom  |

|                 |  |
|-----------------|--|
| MeCN            | Acetonitril  |
| NAAG            | <i>N</i> -Acetylaspartylglutaminsäure  |
| Nat.            | natürlich; natürliches Isotop  |
| n               | Stoffmenge   |
| n.d.            | nicht bestimmt, engl. not determined   |
| nm              | Nanometer  |
| nM              | Nanomolar  |
| NODIA-Me        | 2-(4-((1-Methyl-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)methyl)-7-((1-methyl-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)methyl)-1,4,7-triazanonan-1-yl)essigsäure |
| NOTA            | 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure   |
| OH <sup>-</sup> | Hydroxy, Hydroxid-Anion  |
| PCa             | Prostatakarzinom   |
| PET/CT          | Positronenemissionstomographie / Computertomographie   |
| pM              | Picomolar  |
| PRLT            | Peptidrezeptor Radioligandentherapie   |
| PSA             | Prostata-spezifisches Antigen; Tumormarker   |
| PSMA            | Prostata-spezifisches Membranantigen   |
| RCY             | Radiochemische Ausbeute, engl. Radiochemical yield   |
| rhPSMA          | Radiohybride PSMA-Liganden   |
| RLT             | Radioligandentherapie  |
| SIM             | Lichtmikroskop, engl. structured illumination microscope   |
| sog.            | so genannt   |
| SPECT           | Einzelphotonenemissionstomographie-Computertomographie, engl. single photon emission computed tomography                                       |
| t <sub>R</sub>  | Retentionszeit   |
| Tab.            | Tabelle  |
| TACN            | Triazacyclononan   |
| TEA             | Tetraethylammonium   |
| Tert.           | Tertiär  |
| TETA            | 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-Tetraessigsäure  |
| Tf              | Triflat  |
| TIS             | Triisopropylsilan  |

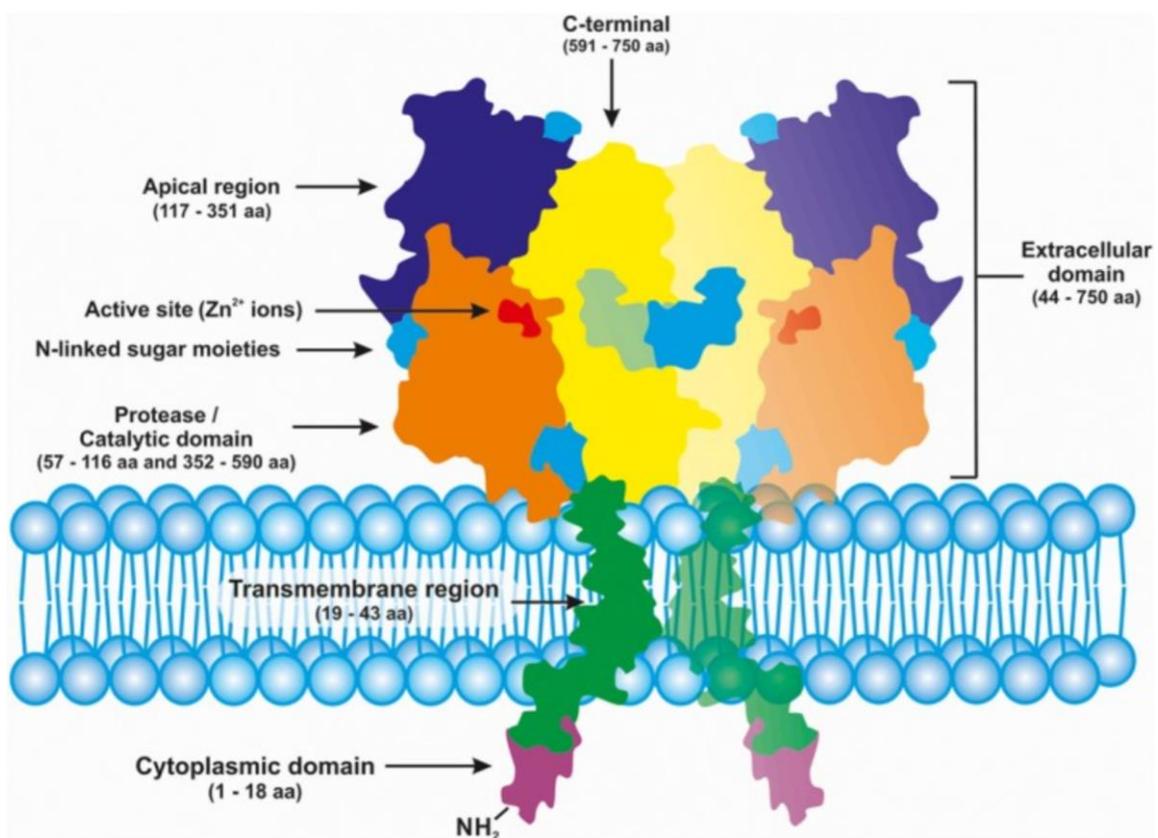
|      |   |
|------|---|
| TSTU | O-(N-succinimidyl)-N-N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat |
| u.a. | unter anderem   |
| w/o  | without   |
| ZNS  | Zentrales Nervensystem  |
| z.B. | Zum Beispiel  |

# 1 Theoretische Grundlagen

## 1.1 Das Prostataspezifische Membranantigen und seine Bedeutung beim Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) zählt zu einer der häufigsten Tumorentitäten bei Männern mit gleichzeitig steigender Inzidenz<sup>1</sup>. Die Einführung von Früherkennungsuntersuchungen sowie der Bestimmung laborchemischer Parameter, wie dem PSA-Wert, führten in den vergangenen zwei Dekaden zwar zu einem Anstieg der Lebenserwartung der betroffenen Patienten, dennoch kann das Patientenmanagement beim fortgeschrittenen (metastasierten) Prostatakarzinom bzw. biochemischen Rezidiv nach initialer kurativer Behandlung nach wie vor schwierig sein<sup>1-5</sup>. Die Nachfrage bezüglich neuer klinischer Bildgebungs- und Behandlungsmethoden ist in den vergangenen Jahren demnach kontinuierlich gestiegen<sup>1,2,6</sup>. Sehr innovative Ansätze für die Diagnostik und die Therapie des PCa mit aussichtsvollen Ergebnissen in der klinischen Anwendung nutzen nuklearmedizinische Verfahren<sup>7,8</sup>. Bei diesen Methoden werden dem Patienten radioaktiv markierte Inhibitoren, sogenannte Radiotracer, verabreicht, die an das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) binden. Dieses Antigen wird auf der Oberfläche von Prostatakarzinomzellen stark überexprimiert, was PSMA zu einer vielversprechenden Zielstruktur macht<sup>8-13</sup>. Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA, EC 3.4.17.21), ebenfalls bekannt als Glutamat-Carboxypeptidase II (GCP II), *N*-acetyl- $\alpha$ -linked acidic dipeptidase I (NAALADase I) oder Folat-Hydrolase I (FOLH I) ist ein transmembranständiges Typ-II-Glykoprotein aus der Superfamilie der zinkabhängigen Exopeptidasen, dessen Expression im Falle einer malignen Erkrankung der Prostata signifikant erhöht ist<sup>6,7,10</sup>. Das PSMA besitzt ein Molekulargewicht von 100 kDa und liegt als symmetrisches Dimer vor, dessen Primärstruktur aus 750 Aminosäuren aufgebaut ist. Die strukturelle Anordnung ist für ein transmembranständiges Protein vom Typ II charakteristisch<sup>10-12</sup>. Das Anordnungsmuster setzt sich aus einem N-terminalen cytoplasmatischen Schwanz (Aminosäure 1-18), einer membranüberspannenden Einzelhelix (Aminosäure 19-43) sowie einem großen extrazellulären Teil (Aminosäure 44-750) zusammen<sup>11</sup>. Der N-terminale GCPII-Schwanz interagiert mit mehreren Gerüstproteinen, beispielsweise Filamin A, Caveolin-1, Clathrin und Clathrin-Adapterprotein 2, welche u.a. eine Rolle im Rahmen der Peptidaseinternalisierung und des Peptidaserecyclings spielen<sup>11</sup>. Der Großteil des Proteins ist an der Oberfläche der Membran im Extrazellularraum angeordnet,

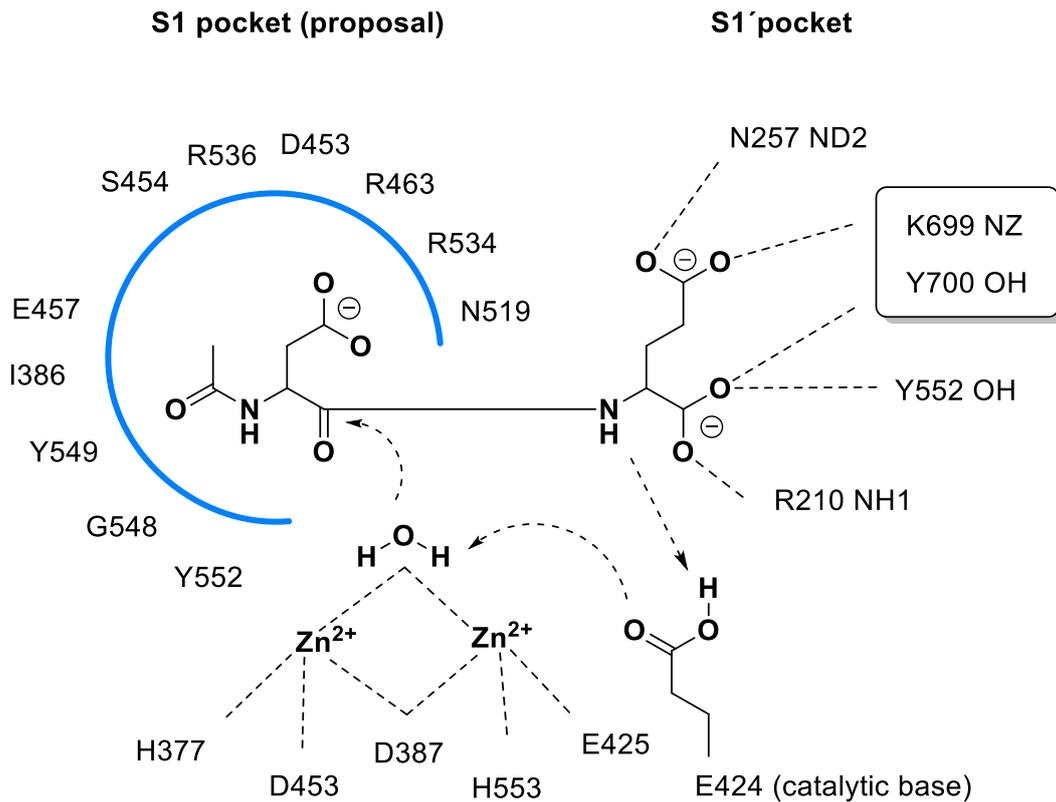
wo auch die Wechselwirkung mit den PSMA/GCP II-Substraten stattfindet<sup>11</sup>. Durch die Lösung der dreidimensionalen Struktur der humanen GCPII-Ektodomäne wurde festgestellt, dass der extrazelluläre Teil der GCPII aus drei verschiedenen Domänen besteht, welche sich über die Aminosäuren 57–116 und 352–590 (die Proteasedomäne), 117–351 (die apikale Domäne) sowie 591–750 (die C-terminale Domäne oder Dimerisierungsdomäne) erstrecken. Das Zusammenspiel der drei genannten Domänen ist für die Wechselwirkung mit den PSMA-Substraten von zentraler Bedeutung. Für die produktive Substratbindung und -verarbeitung ist zudem eine synergetische Wirkung dieser drei Domänen erforderlich, da mehrere Reste aus jeder Domäne zur Architektur des GCPII-Substratbindungstasche beitragen und an der Ligandenerkennung beteiligt sind (Abbildung 1)<sup>11,12</sup>.



**Abbildung 1** Schematische Struktur des Prostata-spezifischen Membranantigens (PSMA). Die große extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 44-750) des symmetrischen Dimers besteht aus der Proteasedomäne (orange, Aminosäuren 57-116; Aminosäuren 352-590), der apikalen Domäne (lila, Aminosäuren 117-351), der C-terminalen Domäne (gelb, Aminosäuren 591-750) sowie dem binuklearen aktiven Zentrum (rot). Die transmembranäre Region des Proteins ist in grün, die cytoplasmatische Domäne in rosa dargestellt<sup>11,14</sup>.

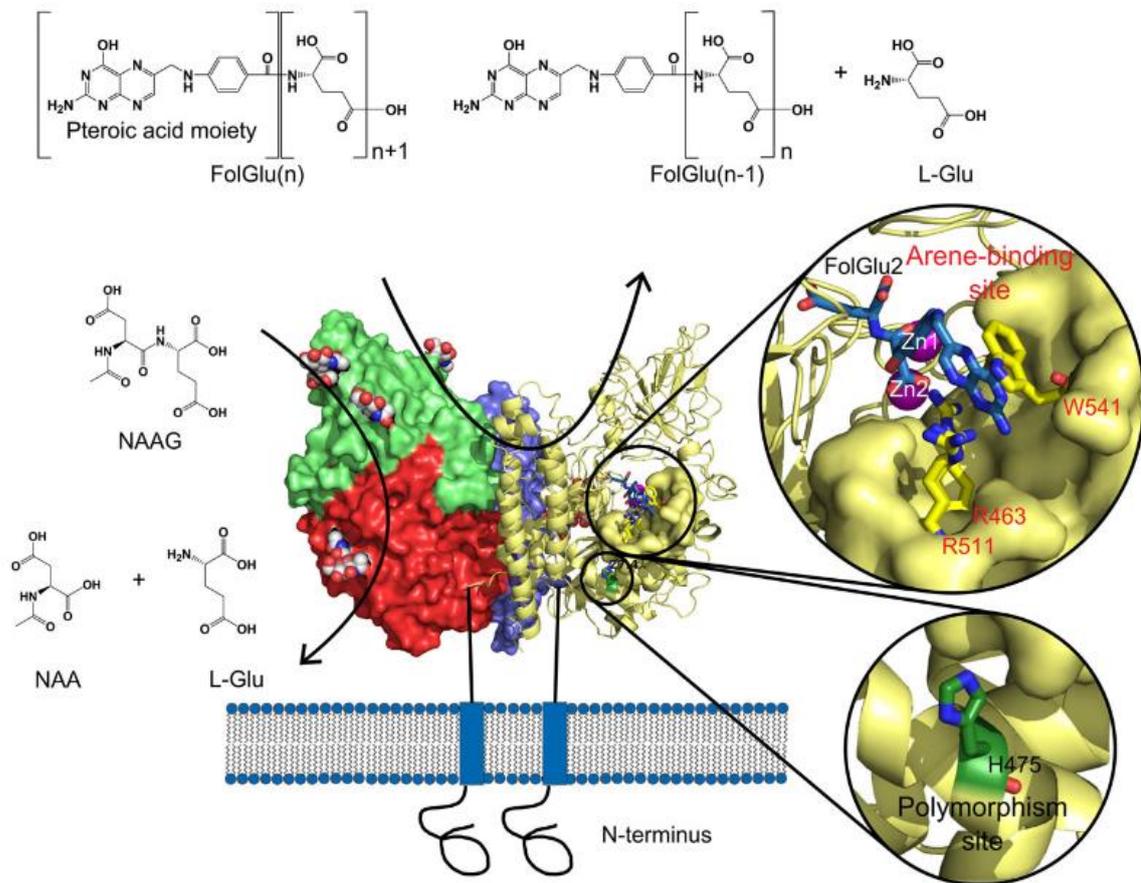
Ein wichtiger Bestandteil der Substratbindungstasche ist das aktive Zentrum der Carboxypeptidase, auch „PSMA active site“ genannt. Das aktive Zentrum des PSMA, welches

über einen ca. 20 Å langen Trichter von der Oberfläche des Proteins aus erreichbar ist, enthält zwei  $Zn^{2+}$ -Ionen, die über ein Wassermolekül asymmetrisch miteinander verbrückt und von den Seitenketten der Aminosäuren Histidin-377, Asparaginsäure-387, Glutaminsäure-425, Asparaginsäure-453 sowie Histidin-553 koordiniert sind<sup>10-12</sup>. Dieses binukleare Zinkzentrum ist für die hydrolytische Aktivität des PSMA unverzichtbar und unterteilt die Substratbindungstasche in zwei molekulare Taschen, die sog. S1 und die S1'-Bindungstasche<sup>11,13,15</sup>. Die S1'-Bindungstasche, die auch als Pharmakophortasche oder S1'pocket bezeichnet werden kann, weist eine sehr hohe Affinität für Glutamat bzw. für Substrate mit einer Glutamatfunktion auf, was bei Betrachtung der beiden PSMA-Substrate  $\alpha$ -N-Acetylaspartylglutaminsäure (NAAG) und Poly- $\gamma$ -Glutamat haltige Folate (FolGlu<sub>n</sub>), die beide einen C-terminalen Glutamatrest aufweisen, verdeutlicht wird<sup>11,16-18</sup>. Die Bindung der Substrate oder Inhibitoren wird zusätzlich durch den amphiphatischen Charakter der Bindungstasche, d.h. durch polare und gleichzeitig unpolare Wechselwirkungen, stabilisiert<sup>11,16,19</sup>. Die S1-Tasche des aktiven Zentrums weist eine Spezifität für negativ geladene Aminosäurereste auf, beispielsweise Aspartat sowie geringfügig sogar für Glutamat. Diese Spezifität resultiert aus dem sog. „Arginine-Patch“, der räumlichen Anordnung der Aminosäureseitenketten Arginin-534, Arginin-536 und Arginin-463<sup>11,20,21</sup>. Treten nun Substrate oder auch Inhibitoren mit dem aktiven Zentrum in Wechselwirkung, sind noch weitere Aminosäureseitenketten, wie Serin-454 auf der S1-Seite bzw. Tyrosin-700 auf der S1'-Seite, an der Bindung beteiligt (Abbildung 2)<sup>12</sup>.



**Abbildung 2** Wechselwirkung der S1 bzw. S1'-Pocket des katalytisch aktiven PSMA-Zentrums mit seinem natürlichen Substrat NAAG unter Beteiligung des binuklearen Zink-Zentrums sowie der verschiedenen Aminosäure-Seitenketten<sup>12</sup>.

Anhand der Kristallstruktur des PSMA konnte ein Vorschlag für den Mechanismus des katalytischen PSMA Prozesses postuliert werden. Das PSMA katalysiert dabei die hydrolytische Spaltung von  $\alpha$ -NAAG zu Glutaminsäure und  $\alpha$ -N-Acetylaspartat bzw. die hydrolytische Abspaltung von Glutaminsäure Poly- $\gamma$ -Glutamat haltiger Folate (Abbildung 3)<sup>10-12,22-24</sup>. Zunächst tritt hierbei das jeweilige Substrat mit der S1'- bzw. der S1-Pocket sowie den beiden Zinkionen des Metallzentrums in Wechselwirkung (Abbildung 2). Es folgt eine Deprotonierung des, die beiden  $Zn^{2+}$ -Ionen verbrückenden, Wassermoleküls, wodurch ein nukleophiler Angriff der resultierenden Hydroxyspezies am Kohlenstoffatom der Amid-Bindung des Substrates induziert wird. Der so entstehende tetraedrische/tetrahedrale Übergangszustand führt unter hydrolytischen Bedingungen im Folgenden zur Spaltung der Amidbindung, zur Produktfreisetzung und zur Rückbildung des katalytisch aktiven Zentrums (Abbildung 3)<sup>10</sup>.



**Abbildung 3** Einblick ins aktive Zentrum der GCP II im Rahmen der Substratspaltung. Spaltung des Substrats *N*-Acetylaspartylglutaminsäure (NAAG) zu *N*-Acetylaspartat (NAA) und *L*-Glutaminsäure (*L*-Glu) sowie hydrolytische Abspaltung von Glutaminsäure Poly- $\gamma$ -glutamathaltiger Folate (FolGlu(n) zu FolGlu(n-1) und *L*-Glu)<sup>24</sup>.

Physiologisch erfolgt die Expression des PSMA in den sekretorischen Epithelzellen der Prostata, den Speicheldrüsen und in der Niere<sup>11,12,25–28</sup>. Obwohl das hohe Expressionsniveau der GCP II beim fortgeschrittenem Prostatakrebs als hervorragendes Ziel für die PCa-Bildgebung/-Therapie dient, ist die physiologische Funktion in diesem Gewebe nicht bekannt. Analog dazu bleibt auch die physiologische Rolle in den Nieren und der (menschlichen) Neovaskulatur zu definieren<sup>11</sup>. Das Verständnis der natürlichen Funktion der GCP II ist Gegenstand aktueller Forschung<sup>11</sup>. Für die Rolle des PSMA im Rahmen des Prostatakarzinoms ist das Verständnis der auftretenden PSMA / GCP II-Expression entscheidend. Die GCP II-Expression steigt, ausgehend vom gesunden Organ durch die gutartige Prostatahyperplasie, über ein geringgradiges Adenokarzinom bis hin zur metastasierenden, androgenunabhängigen Erkrankungen stark an<sup>11,27,29,30</sup>. Die höchste PSMA-Expression wird in diesem Zusammenhang bei einer malignen Erkrankung der Prostata beobachtet<sup>11,27,29</sup>. Die PSMA-Expression kann hierbei ca. um einen Faktor 1000 erhöht sein und korreliert vor allem

mit prognostisch ungünstigen Faktoren, wie einer steigenden Tumoraggressivität und Kastrationsresistenz<sup>1,2,11,27,31,32</sup>. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass gerade einmal 5–10% der untersuchten PCa-Läsionen keine PSMA-Expression aufweisen<sup>1,33</sup>.

Diese Besonderheiten machen das PSMA zu einer idealen therapeutischen sowie diagnostischen Zielstruktur<sup>1,2,6,34–38</sup>.

## 1.2 PSMA-spezifische Radiotracer

### 1.2.1 Einführung in die Nuklearmedizin

#### 1.2.1.1 Physikalische Grundlagen und nuklearmedizinische Verfahren bei onkologischen Fragestellungen

Die Nuklearmedizin ist ein medizinisches Fachgebiet, das radioaktive Substanzen zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten einsetzt. Sie besteht aus zwei Teilgebieten: der Bildgebung und der Therapie. Das Ziel der nuklearmedizinischen Bildgebung besteht darin Informationen über den Funktionszustand eines Gewebes zu erhalten und Tumore zu erkennen. Das Ziel der nuklearmedizinischen Therapie ist die Behandlung dieser Krankheiten mittels zytotoxischer Strahlungsdosen. Beide Ziele erfordern Radionuklide mit unterschiedlichen Zerfallseigenschaften<sup>39</sup>. Radionuklide sind instabile Atomkerne, die sich unter Emission verschiedener Teilchen spontan umwandeln. Desweiteren können sie aus angeregten Kernzuständen unter Aussendung von Gammastrahlung in ihren Grundzustand übergehen. Beispiele für unterschiedliche Zerfallsarten von Radionukliden sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Menge eines radioaktiven Isotops wird als Aktivität bezeichnet. Ihre SI-Einheit Becquerel (Bq) ist definiert als ein Zerfall pro Sekunde, während die traditionelle Einheit Curie (Ci)  $3,7 \times 10^{10}$  Zerfällen pro Sekunde entspricht.

Eine weitere wichtige Größe radioaktiver Elemente ist die sog. Halbwertszeit  $t_{1/2}$ . Diese ist für jedes Radionuklid charakteristisch und gibt an nach welcher Zeit die Hälfte der zum Zeitpunkt  $t = 0$  vorhandenen Kerne zerfallen ist<sup>40,41</sup>.

**Tabelle 1** Physikalische Grundlagen unterschiedlicher radioaktiver Zerfallsarten<sup>40,41</sup>.

| Zerfallsart        | Emittierte Strahlung | Zerfallsgleichung  | Energiebereich |
|--------------------|----------------------|--|----------------|
| Alphazerfall       | $\alpha$             | ${}^A_ZX \rightarrow {}^{A-4}_{Z-2}X' + \alpha$                | 4-10 MeV       |
| Betazerfall        | $\beta^- (e^-)$      | ${}^A_ZX \rightarrow {}^A_{Z+1}X' + \beta^- (e^-) + \bar{\nu}$ | 0-4 MeV        |
| Positronenemission | $\beta^+ (e^+)$      | ${}^A_ZX \rightarrow {}^A_{Z-1}X' + \beta^+ (e^+) + \nu$       | 0-4 MeV        |
| Gammaemission      | $\gamma$             | ${}^A_ZX^* \rightarrow {}^A_ZX' + {}^0_0\gamma$                | 10 keV – 3 MeV |

Beim  $\alpha$ -Zerfall zerfällt das vorliegende Nuklid X in das Tochternuklid X' unter Emission eines  $\alpha$ -Teilchens, welches aus zwei Neutronen und zwei Protonen besteht und somit identisch mit

einem Heliumkern ist. Alle von einem bestimmten Radioisotop emittierten Alphateilchen haben die gleiche Energie. Die meisten zu findenden Alpha-Teilchen haben Energien im Bereich von etwa 4 bis 10 MeV. Aufgrund der relativ hohen Masse und kinetischen Energie haben Alphateilchen einen hohen linearen Energietransfer und folglich eine hohe ionisierende Wirkung. Die Reichweite eines Alpha-Teilchens im Gewebe beträgt lediglich wenige Mikrometer.

Beim Betaminuszerfall wandelt sich im Kern ein Neutron in ein Proton um. Bei diesem Umwandlungsprozess werden ein Betaminus-Teilchen ( $\beta^-$ ) / Elektron ( $e^-$ ) und ein Antineutrino  $\bar{\nu}$  emittiert. Die Emission von Betaminus-Teilchen führt dazu, dass Radionuklide mit einem Neutronenüberschuss Stabilität erreichen. Die Emission von Beta-Teilchen verringert die Anzahl der Neutronen um eins und erhöht die Anzahl der Protonen um eins, während die Atommassenzahl unverändert bleibt. Die Reichweite im Gewebe ist aufgrund der geringeren Masse im Vergleich zu Alphateilchen größer. Diese liegt je nach kinetischer Energie im Bereich von Millimeter bis wenigen Zentimetern<sup>42</sup>.

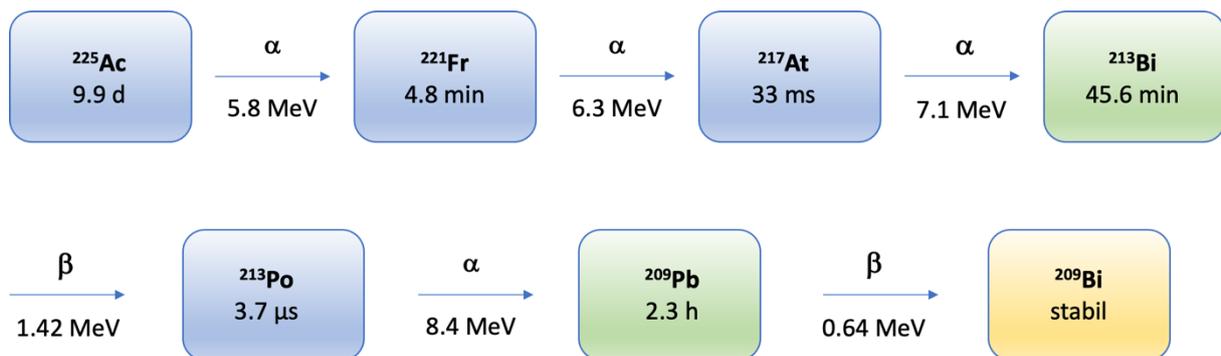
In Fällen, in denen sich zu viele Protonen im Kern befinden, kann es zur Positronenemission kommen. Es kommt zur Umwandlung eines Protons in ein Neutron unter Emission eines Positrons ( $\beta^+$  /  $e^+$ ) und eines Neutrinos  $\nu$ .

Der radioaktive Zerfall eines Kerns durch Alpha-, Beta- oder Positronenemission führt zur Emission von Energie, die aus den jeweiligen Veränderungen im Kern resultiert. Dadurch wird der Kern auf ein angeregtes Niveau angehoben. Keiner dieser angeregten Kerne kann in diesem hochenergetischen Zustand verbleiben. Kerne setzen diese Energie frei und kehren in den Grundzustand oder auf das niedrigstmögliche stabile Energieniveau zurück. Die freigesetzte Energie liegt in Form von Gammastrahlung (Hochenergiephotonen) vor und hat eine Energie, die der Änderung des Energiezustands des Kerns entspricht<sup>40,41</sup>. Beispiele für wichtige Radionuklide in der Nuklearmedizin, unter Angabe der Halbwertszeit und ihrer Zerfallsart, sind in Tabelle 2 gegeben.

**Tabelle 2** Beispiele klinisch eingesetzter Radionuklide, inklusive Halbwertszeit und Zerfallsart<sup>43-47</sup>.

| Radionuklid    | Halbwertszeit | Hauptzerfallsart |
|----------------|---------------|------------------|
| Kohlenstoff-11 | 20.38 min     | $\beta^+$        |
| Fluor-18       | 109.8 min     | $\beta^+$        |
| Kupfer-64      | 12.7 h        | $\beta^+$        |
| Kupfer-67      | 2.58 d        | $\beta^-$        |
| Gallium-68     | 67.7 min      | $\beta^+$        |
| Zirkonium-89   | 78.41 h       | $\beta^+$        |
| Yttrium-90     | 64.0 h        | $\beta^-$        |
| Technetium-99m | 6.01 h        | $\gamma$         |
| Indium-111     | 67.392 h      | $\gamma$         |
| Iod-131        | 8.02 d        | $\beta^-$        |
| Lutetium-177   | 6.647 d       | $\beta^-$        |
| Astat-211      | 7.2 h         | $\alpha$         |
| Bismut-213     | 45 min        | $\alpha$         |
| Radium-223     | 11.4 d        | $\alpha$         |
| Actinium-225   | 9.92 d        | $\alpha$         |

Bei massereichen Radionukliden, bspw. verschiedenen Uran-Isotopen, ist oftmals eine Abfolge von radioaktiven Zerfällen zu beobachten. Man spricht dann von einer sog. Zerfallsreihe. Abb. 4 zeigt ein Beispiel für die Zerfallsreihe des Alphaemitters Actinium-225 (einem Zerfallsprodukt einer der Plutonium-Neptunium-Reihe)<sup>48,49</sup>.

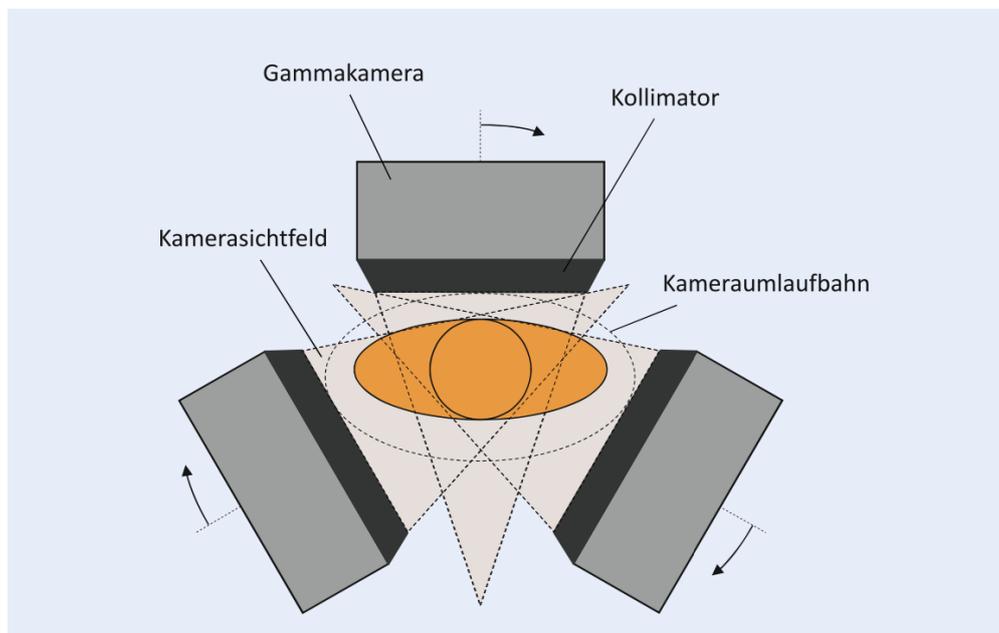


**Abbildung 4** Zerfallsreihe des Alphaemitters Actinium-225 unter Angabe der jeweiligen Tochternuklide inklusive Halbwertszeit und Energie der emittierten Teilchen<sup>50</sup>.

Wie bereits erwähnt, besteht die Nuklearmedizin aus zwei Teilgebieten: der Therapie sowie der Bildgebung. Für eine therapeutische Anwendung in der Nuklearmedizin werden aufgrund des höheren linearen Energietransfers Alpha- und Betastrahler eingesetzt. Prominente Beispiele hierfür sind der Betaemitter Lutetium-177 und der Alphaemitter Actinium-225. Bei

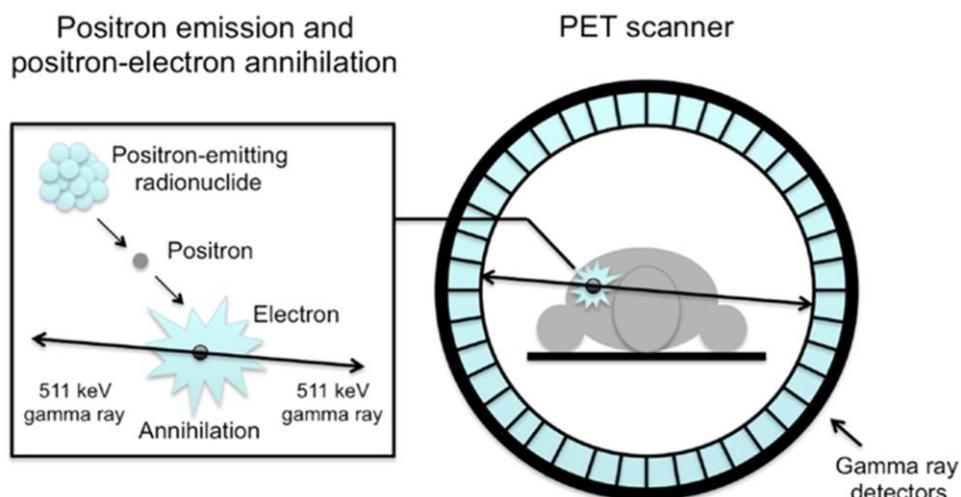
der Bildgebung werden entweder Positronenemitter oder  $\gamma$ -Strahler verwendet. In Abhängigkeit der verwendeten Radionuklide (Positronen- oder Gammaemitter) unterscheidet man zwei bildgebende Verfahren, die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bzw. die Einzelphotonen-Emissionstomographie (Single photon emission computed tomography, SPECT)<sup>39</sup>.

Für beide Untersuchungen wird dem Patienten zunächst der Radiotracer verabreicht. Für die SPECT/CT werden Gammastrahlen emittierende Radionuklide verwendet, deren Zerfall mit einer bzw. mehreren Gammakameras aufgezeichnet werden. Die Gammakameras bestehen aus Kollimatoren, Szintillationskristallen, Photomultipliern, Vorverstärkern sowie Impulsverarbeitungselektronik. Sie sind auf einer rotierenden Aufnahmeeinheit (Gantry) beweglich befestigt und rotieren um den Patienten, sodass eine Vielzahl von zweidimensionalen Aktivitätsverteilungen (sog. Projektionen) aus unterschiedlichen Projektionswinkeln aufgezeichnet werden kann. Wichtig für die Bildgebung von Gammastrahlern sind dabei die Kollimatoren, die dafür sorgen, dass nur senkrecht eintreffende Gammastrahlung detektiert wird. Ohne Kollimator ist eine räumlich aufgelöste Darstellung nicht möglich, da die Gammastrahlen ohne Ortsbezug auf den Kristall treffen würden<sup>40</sup>.



**Abbildung 5** Schematisches Funktionsprinzip einer SPECT-Untersuchung<sup>40</sup>.

Im Anschluss an die Datenaufnahme wird aus den Projektionen mittels Bildrekonstruktion (*Image Reconstruction*) die dreidimensionale Verteilung berechnet. Die SPECT liefert somit eine dreidimensionale Darstellung des Radiotracers *in vivo*<sup>40</sup>. In Kombination mit einem CT werden zusätzlich anatomische Informationen der Aktivitätsverteilung zugänglich<sup>40,51,52</sup>. Wichtige Radionuklide für die SPECT-Bildgebung sind Technetium-99m oder Indium-111<sup>40,44</sup>. Das zweite wichtige bildgebende Verfahren in der Nuklearmedizin, die Positronen-Emissions-Tomographie / Computertomographie (PET/CT), verwendet  $\beta^+$ -emittierende Radionuklide, wie z.B. Kohlenstoff-11, Fluor-18 oder Gallium-68. Beim  $\beta^+$ -Zerfall wird ein Positron emittiert, welches durch Wechselwirkung mit Materie seine kinetische Energie verringert und letztlich mit einem Elektron annihiliert. Dabei entstehen zwei hochenergetische  $\gamma$ -Quanten mit einer Energie von 511 keV, die in einem Winkel von ca. 180° voneinander ausgesandt werden. Die beiden Photonen werden dann von den ringförmig angeordneten PET-Detektoren detektiert. Treffen zwei Gammaquanten in einem bestimmten Zeitintervall auf zwei gegenüberliegende PET-Detektoren muss der Zerfall auf der entsprechenden Verbindungslinie (*line of response*, LOR) erfolgt sein (Abbildung 6)<sup>53–57</sup>.



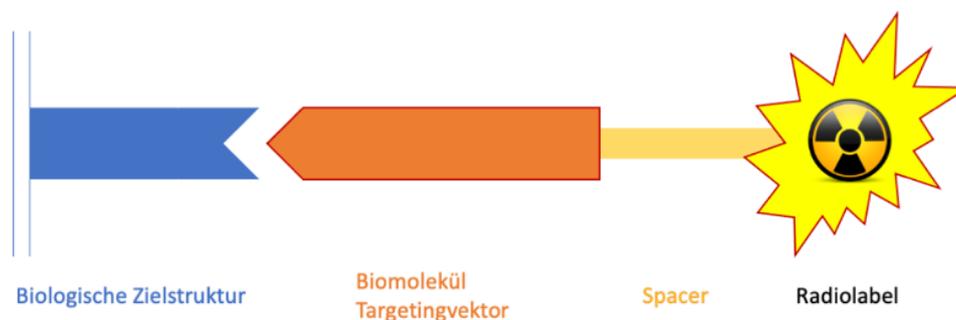
**Abbildung 6** Physikalisches Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie<sup>56</sup>.

Anhand der Verbindungslinien (*line of response*, LOR) zwischen den koinzident detektierten Gammaquanten kann so die räumliche Verteilung der radioaktiven Substanz bildlich dargestellt werden. In Kombination mit der CT werden auch mit diesem Hybrid-Bildgebungsverfahren, zusätzlich zur funktionellen PET-Bildgebung, anatomische Informationen erhalten<sup>54–57</sup>.

### 1.2.1.2 Aufbau von Radiotracern

Das in der Nuklearmedizin zu Grunde liegende Konzept ist das sogenannte Tracerprinzip. Radioaktivität kann hoch sensitiv detektiert werden. Dies erlaubt die Verwendung von sehr geringen Stoffmengen (nanomolarer bis pikomolarer Bereich), so dass durch die Verwendung von Radiotracern biologische Prozesse untersucht werden können, ohne diese zu beeinflussen<sup>39,54</sup>.

Im Allgemeinen bestehen zielspezifische Radiopharmaka aus einem sog. Radionuklid, einem Linker bzw. Spacer sowie dem tumorspezifischen Biomolekül, bspw. einem Peptid, einem niedermolekularen Inhibitor oder einem Antikörper<sup>6,31,53,58,59</sup> (Abbildung 7).



**Abbildung 7** Schematische Darstellung eines zielspezifischen Radiotracers in Wechselwirkung mit seiner biologischen Zielstruktur<sup>59</sup>.

Das Biomolekül bzw. der Targetingvektor sorgt für den Transport der Radionuklide zu den entsprechenden (tumorspezifischen) biologischen Zielstrukturen, wie z.B. überexprimierte Proteine oder auch verschiedene Rezeptoren und sorgen für die Anreicherung des gesamten Radiotracers an die krankheitsspezifischen Zielstrukturen<sup>6,31,59</sup>. Oftmals ist die Verwendung von einem Spacer bzw. Linker notwendig, um die Interaktion des Biomoleküls mit seiner Zielstruktur nicht zu beeinträchtigen. Darüberhinaus eignen sich die Linkerstrukturen zur Optimierung der pharmakologischen Eigenschaften von Radiotracern<sup>60</sup>. Das Radiolabel kann entweder aus einem nichtmetallischen oder einem metallischen Radionuklid bestehen. Bei Radiometallen ist oftmals auch die Verwendung eines bifunktionellen Chelators (BFC) notwendig (siehe 1.2.2).

Beispiele für Radiopharmaka in der nuklearmedizinischen Anwendung sind z.B. Fluor-18-Desoxyglucose ( $[^{18}\text{F}]\text{F-FDG}$ ), der Goldstandard für verschiedene onkologische

Fragestellungen im Rahmen der PET/CT-Bildgebung oder [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTATOC für die Bildgebung neuroendokriner Tumoren mittels PET/CT<sup>59</sup>.

### **1.2.2 Einführung in die Radiochemie – Grundlagen der Radiomarkierung**

Wichtige Größen in der Radiochemie bzw. in der Herstellung von Radiotracern sind die radiochemische Ausbeute (engl. radiochemical yield, RCY) und die spezifische Aktivität  $A_s$  sowie die molare Aktivität  $A_m$ .

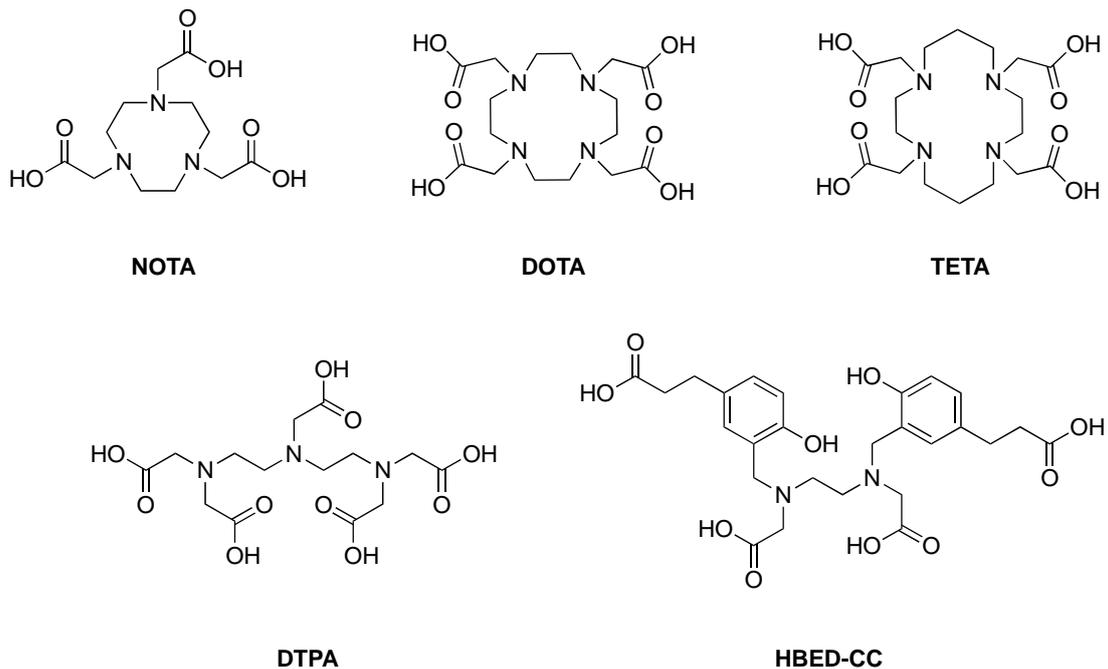
Die radiochemische Ausbeute ist definiert als die Aktivitätsmenge im Produkt, ausgedrückt als Prozentsatz der Ausgangsaktivität, die im betrachteten Prozess verwendet wird. Die Aktivitätsmenge des Radionuklids bezieht sich auf dasselbe Radionuklid und muss zum gleichen Zeitpunkt vor der Berechnung zerfallskorrigiert werden<sup>61</sup>.

Die spezifische Aktivität  $A_s$  ist eine weitere wichtige Größe in der Herstellung von Radiotracern. Sie gibt die Aktivität pro Gramm des eingesetzten Vorläufermoleküls an und wird gemessen in Bq/mg oder GBq/g. Die spezifische Aktivität ist nicht zu verwechseln mit der molaren Aktivität  $A_m$ . Diese gibt die Aktivität pro Stoffmenge des eingesetzten Vorläufermoleküls und wird gemessen in Bq/mol oder GBq/ $\mu$ mol<sup>61</sup>. In anderen Worten beschreibt die molare Aktivität das Verhältnis zwischen radioaktiv markierter und nichtradioaktiver Substanz. Die molare Aktivität ist eine wichtige Kenngröße, da nur bei ausreichend hoher molarer Aktivität das Tracerprinzip gültig ist. Dies bedeutet, dass Radiotracer nur bei ausreichend hoher molarer Aktivität an molekularen Prozessen teilnehmen können ohne diese zu beeinflussen<sup>62,63</sup>.

#### **1.2.2.1 Radiomarkierungen mit Metallen**

Für die Radiomarkierung von verschiedenen Targetingvektoren, in der Literatur auch oftmals als Radiolabeling bezeichnet, werden unterschiedliche Markierungsstrategien verfolgt. Diese richten sich nach den chemischen Eigenschaften des entsprechenden Radionuklids. Die verwendeten Radionuklide können, wie bereits in Kap. 1.2.1.1 erwähnt, radioaktive Isotope von Metallen, Halbmetallen oder Nichtmetallen sein<sup>64,65,66</sup>.

Wie unter 1.2.2 bereits erwähnt, kommen bei radiometallbasierten Radiopharmaka oftmals sogenannte BFCs (bifunktionelle Chelatoren) oftmals zum Einsatz, um eine stabile Metallkomplexierung zu gewährleisten. Prominente Beispiele für BFCs sind in Abb. 8 gezeigt.



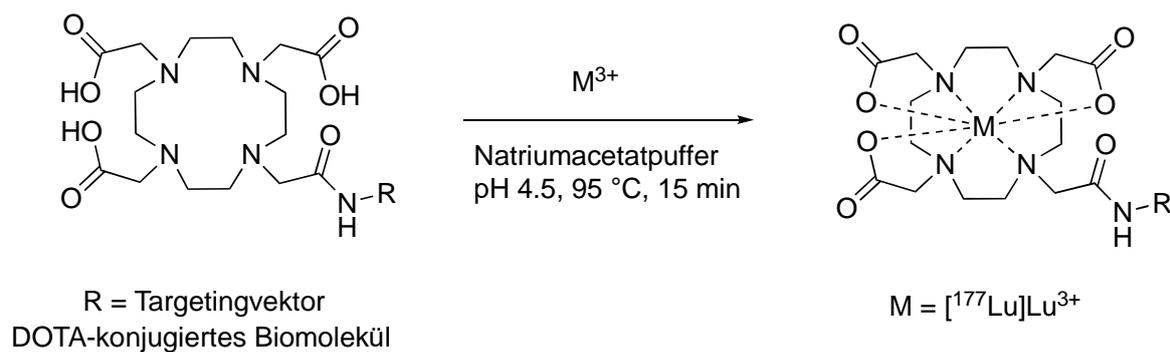
**Abbildung 8** Beispiele für verschiedener bifunktionelle Chelatoren (BFC) im Bereich der radiopharmazeutischen Chemie<sup>31,67,68</sup>.

Die Verwendung solcher Chelatoren ist von essentieller Bedeutung, denn das Biomolekül ist in der Regel nicht in der Lage das Radiometall stabil zu komplexieren. Der BFC ist somit ein wichtiger Baustein des nichtradioaktiven Vorläufermoleküls (Precursor). Typischerweise werden makrozyclische- oder azyclische Chelatoren verwendet, die über eine reaktive funktionelle Gruppe kovalent an die Targetingvektoren konjugiert werden. Wichtige Vertreter dieser Klasse sind die offenkettigen BFCs auf der Basis von Diethylenetriaminpentaessigsäure (DTPA) und *N,N'*-bis[2-Hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl]-ethylendiamin-*N,N'*-diessigsäure (HBED-CC) sowie die makrozyclischen Chelatoren 2,2',2''-(1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triyl)triessigsäure (NOTA) 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) oder 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure (TETA) (Abb. 8)<sup>31,44,59,66–69</sup>.

Radiometalle bieten gleich mehrere Vorteile. Bei der Mehrzahl an Elementen im Periodensystem handelt es sich um Metalle und somit ergibt sich im Vergleich zu Nichtmetallen eine größere Anzahl an medizinisch einsetzbaren Radionukliden. Zweitens handelt es sich bei der Markierung mit Radiometallkationen um eine Komplexbildungsreaktion, die 1) im wäßrigen Medium erfolgen (kann) und 2) sich häufig durch Reaktionsbedingungen (Temperaturen > 100 °C, physiologischer pH) auszeichnet, unter denen

der eingesetzte Precursor stabil ist. Drittens entstehen bei Komplexbildungsreaktionen in der Regel keine Nebenprodukte, so dass eine zeitintensive Aufreinigung des Endprodukts oftmals nicht notwendig ist. Viertens bieten BFCs, die in der Lage sind unterschiedliche Radiometalle stabil zu komplexieren, die Möglichkeit einen einzigen Markierungsvorläufer je nach medizinischem Bedarf (Bildgebung oder Therapie) in Kombination mit verschiedenen Radiometallen mit unterschiedlichen Zerfallsarten zu verwenden (siehe hierzu Tab.2). Man spricht dann auch von einem theranostischen Ansatz.

Da es während einer Komplexbildungsreaktion (in wässrigem Medium) häufig zur Freisetzung von Protonen kommt, werden für eine Radiomarkierung i.d.R. Pufferlösungen verwendet, beispielsweise ein (nicht toxischer) Natriumacetat- oder Ammoniumacetatpuffer<sup>6,69,70</sup>. In Abbildung 9 ist die Radiomarkierung eines DOTA-konjugierten Biomoleküls mit dem therapeutischen Betaemitter Lu-177 gezeigt.



**Abbildung 9** Schematische Darstellung der Metallkomplexierung eines DOTA-konjugierten Biomoleküls unter Angabe der notwendigen Markierungsbedingungen. Als Metallkation bzw. Radionuklid wurde als Beispiel  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$  verwendet<sup>6,69</sup>.

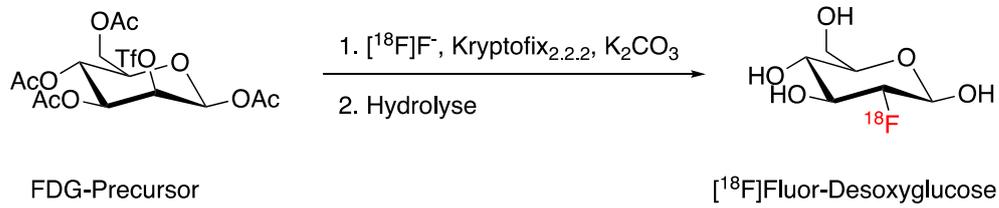
Gerade die makrozyklischen Grundkörper und ihre unterschiedlich substituierten Derivate zeichnen sich durch eine hohe thermodynamische Stabilität sowie kinetische Inertheit der Metallkomplexe aus und sind häufig die erste Wahl für die Entwicklung eines Radiopharmakons. Allerdings muss bei der Wahl eines geeigneten Chelators stets beachtet werden, dass die physikalischen Eigenschaften des Metallkomplexes, wie z.B. die Größe, Gesamtladung und Polarität, auch die Pharmakokinetik des gesamten Radiotracers beeinflussen können<sup>44,59,65,67,69</sup>.

### **1.2.2.2 Radiomarkierungen mit Nichtmetallen**

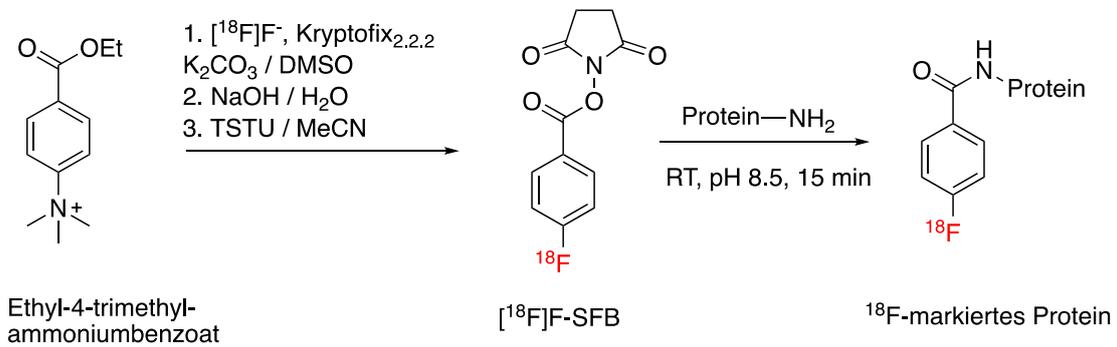
Werden für die Markierung eines Biomoleküls nicht metallische Radionuklide verwendet, erfolgt die Radiomarkierung nicht über eine Komplexbildungsreaktion. Im Falle von Fluor-18 beispielsweise sind viele radiochemische Methoden für eine Radiomarkierung bekannt. Oftmals erfolgt eine solche Markierung über eine nukleophile Substitution, mit Hilfe einer sog. prosthetischen Gruppe oder über einen radioaktiven Isotopenaustausch (Abb. 10)<sup>71</sup>.

### A Radiofluorierung mittels nukleophiler Substitution

Radiosynthese von [ $^{18}\text{F}$ ]Fluor-Deoxyglucose



### B Radiofluorierung unter Verwendung einer prosthetische Gruppe



### C Radiofluorierung mittels $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch



**Abbildung 10** Unterschiedliche Radiofluorierungsreaktionen. A) Radiosynthese von [ $^{18}\text{F}$ ]F-Deoxyglucose ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG). Nukleophile Substitution einer Triflatgruppe (OTf) des Acetatgeschützten FDG-Vorläufers durch ein  $^{18}\text{F}$ -Anion und anschließender Hydrolyse<sup>62,72</sup>. B) Radiosynthese von [ $^{18}\text{F}$ ]F-Fluorethyltyrosin ([ $^{18}\text{F}$ ]FET) über eine  $^{18}\text{F}$ -Fluorethylierung. Radiomarkierung mit Fluor-18 erfolgt in zwei Schritten über  $^{18}\text{F}$ -Fluoroethylsilylat (prosthetische Gruppe), ausgehend von Ethylenglycol-1,2-ditosylat<sup>73</sup>. C) Radiomarkierung der SiFA-Gruppe über einen  $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$ -Isotopenaustausch.

Die aliphatische nukleophile Substitution mit [<sup>18</sup>F]Fluorid ist eine der häufigsten Methoden, um sp<sup>3</sup>-hybridisierte <sup>18</sup>F-C-Bindungen zu knüpfen. Eine Komponente des verwendeten Vorläufermoleküls verfügt über eine geeignete Abgangsgruppe, die für den Austausch gegen [<sup>18</sup>F]Fluorid geeignet ist<sup>62</sup>. Zu diesen Abgangsgruppen zählen beispielsweise Triflat (OTf)-, Tosylat (OTs)- sowie Mesylat (OMs)-Gruppen oder auch Halogenide<sup>62,71</sup>. Ein wichtiges Beispiel ist die Radiosynthese von [<sup>18</sup>F]FDG, einem weltweit häufig eingesetzten PET-Radiotracer<sup>43,66</sup>. Für die [<sup>18</sup>F]FDG-Synthese erfolgt die Radiomarkierung über eine nukleophile Substitution der Triflatgruppe des Vorläufermoleküls 1,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-2-*O*-trifluormethanesulfonyl-β-D-mannopyranose mit [<sup>18</sup>F]Fluorid. Nach Hydrolyse der Schutzgruppen wird [<sup>18</sup>F]FDG in hohen radiochemischen Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten für die Anwendung am Patienten erhalten<sup>62,72</sup> (Abb.10 A).

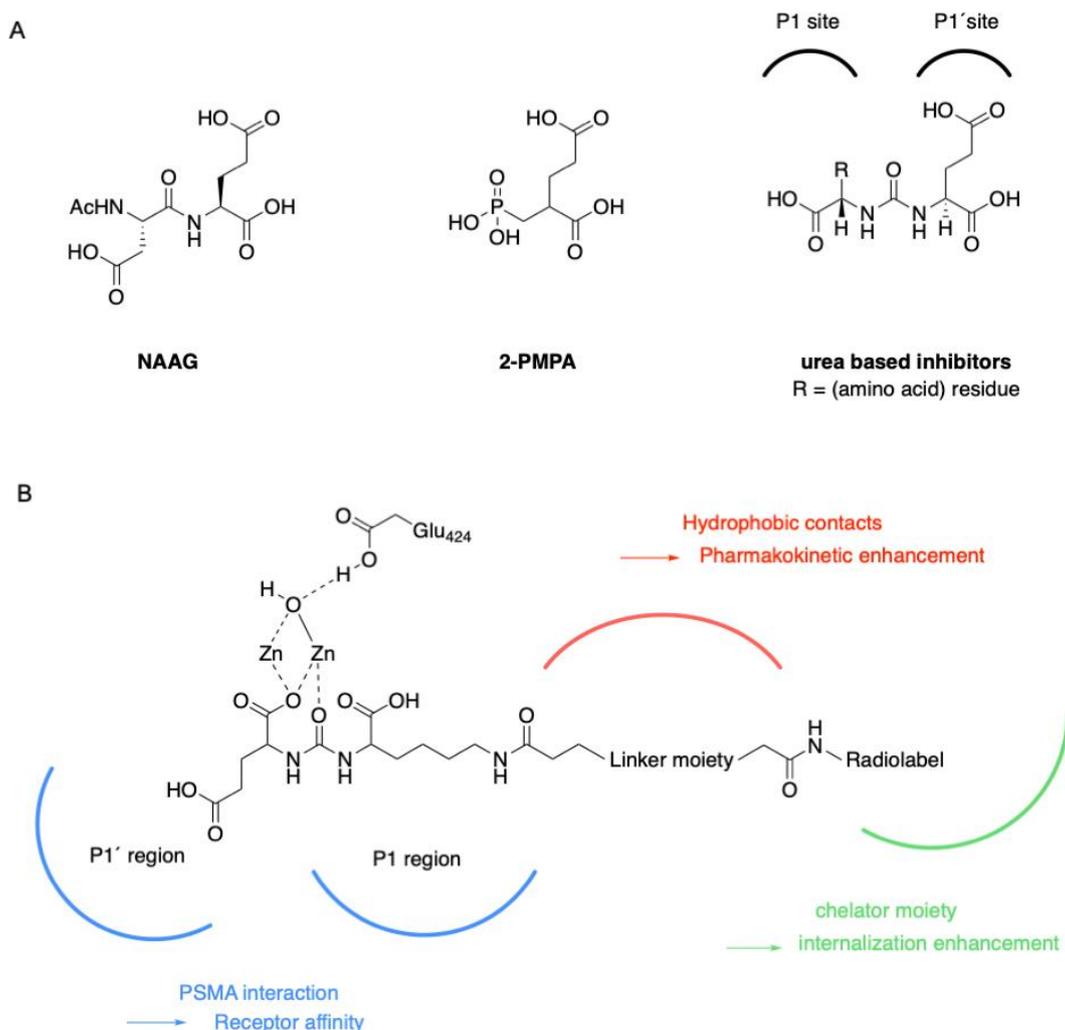
Obwohl die nukleophile Substitution eine der verlässlichsten Methoden für die Markierung mit F-18 ist, sind hierfür in der Regel hohe Temperaturen, stark basische Reaktionsbedingungen und toxische organische Lösungsmittel wie z.B. DMF notwendig<sup>72</sup>. Für manche Moleküle, wie Proteine oder Antikörper, sind derartige Reaktionsbedingungen ungeeignet<sup>74</sup>. In solchen Fällen werden oftmals sog. prosthetische Gruppen eingesetzt. Dies sind kleine organische Moleküle, die unter den harten Reaktionsbedingungen, die für die F-18 Markierung mittels nukleophiler Substitution notwendig sind, stabil sind. Sie verfügen i.d.R. zudem über einen Aktivester oder eine andere funktionelle Gruppe, wodurch nach erfolgter Radiomarkierung die Konjugation der <sup>18</sup>F-markierten prosthetischen Gruppe an das entsprechende Biomolekül unter milden Bedingungen erfolgt<sup>74</sup>. Ein Beispiel für die Verwendung einer prosthetischen Gruppe in der F-18-Radiochemie ist die in Abb. 10 B gezeigte <sup>18</sup>F-Markierung von Proteinen mit [<sup>18</sup>F]F-*N*-Succinimidyl-4-fluorobenzoat ([<sup>18</sup>F]F-SFB). Dazu wird in einer mehrstufigen Reaktion zunächst [<sup>18</sup>F]F-SFB ausgehend von Ethyl-4-trimethylammoniumbenzoat synthetisiert<sup>75</sup>. Anschließend erfolgt die Umsetzung der prosthetischen Gruppe mit dem Protein, bspw. HSA, Avidin oder IgG, unter milden Reaktionsbedingungen (Abb. 10 B)<sup>76</sup>.

Zudem kann eine Radiomarkierung mit Fluor-18 auch über einen Isotopenaustausch durchgeführt werden, bei dem ein nicht radioaktives Isotop gegen das entsprechende Radionuklid substituiert wird<sup>77</sup>. Ein Beispiel für eine solche Radiomarkierung ist der <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausch von siliziumbasierten Fluoridakzeptoren (SiFA) (Abb. 10 C)<sup>71,78</sup>. Ein weiteres Beispiel stellen BODIPY-Farbstoffe dar, die durch einen <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausch an

der  $\text{BF}_2$ -Gruppe radiomarkiert werden können<sup>71</sup>. Aufgrund der geringen Stoffmenge an F-18 wird hierbei nur ein F-19-Atom ausgetauscht<sup>79</sup>.

### 1.2.3 Grundlagen PSMA-spezifischer Radiotracer

Bereits in den neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden erste Versuche zur Synthese selektiver GCP II-Inhibitoren durchgeführt<sup>6,8,11,37,38</sup>. Diese frühen Vertreter, die trotz ihrer geringen Affinität die Grundlage für das weitere Inhibitor-Design bildeten, umfassten nicht hydrolysierbare NAAG-Analoga oder verschiedene Glutamatderivate<sup>11,80,81</sup>.



**Abbildung 11** A) Strukturformeln der PSMA-Inhibitoren NAAG, 2-PMPA und harnstoffbasierter Liganden<sup>3,82–85</sup>. B) Schematische Darstellung der Wechselwirkung eines harnstoffbasierten PSMA-Liganden mit dem aktiven Zentrum des PSMA<sup>86</sup>.

Die Forschung im Bereich Wirkstoffdesign erkannte in diesem Zusammenhang schnell, dass ein potentieller Inhibitor für eine erfolgreiche Inhibierung zwei strukturelle Anforderungen erfüllen muss. Diese sind zum einen eine Glutamatgruppe, welche an die C-terminale Glutamat-erkennungsstelle der Carboxypeptidase bindet und zum anderen eine Komponente für die Wechselwirkung mit den  $Zn^{2+}$ -Ionen des aktiven Zentrums. Unter Berücksichtigung dieser strukturellen Anforderungen gelang die Synthese des ersten potenten PSMA-Inhibitors

2-(Phosphonomethyl)pentandisäure (2-PMPA), der zusammen mit NAAG die Grundlage einer weiteren potenten Inhibitor-Klasse des PSMA bildet<sup>11,82,83</sup>(Abb. 5 A). Auf der Basis von NAAG bzw. verschiedener 2-PMPA Abkömmlinge konnten harnstoffbasierte Aminosäuredimere als passende Kandidaten für GCP II-Hemmung identifiziert werden<sup>11,82,87</sup>. Ein essentieller Unterschied der Harnstoffderivate im Vergleich zu NAAG und 2-PMPA besteht in der sog. P1-Teil (P1-moiety) des Inhibitors. Der P1- bzw. P1'-Teil (P1- bzw. P1'-site) des Inhibitors ist die Molekülkomponente, welche mit der S1- bzw. S1'-Teil (S1- bzw. S1'-site) des aktiven PSMA-Zentrums wechselwirkt und sich in direkter Nachbarschaft zur zinkchelatierenden Funktion befindet (Abb. 11 B)<sup>31,58,84,88</sup>. Harnstoffbasierte PSMA-Inhibitoren sind aus Glutaminsäure bzw. Glutamat (P1'-Teil) und beispielsweise Cystein, Lysin, Leucin oder Tyrosin (P1-Teil) bzw. Glutaminsäure aufgebaut<sup>3,11,84,87</sup>. In Analogie zu 2-PMPA und seinen Derivaten erfolgt auch bei den harnstoffbasierten Liganden die Bindung im aktiven Zentrum des PSMA in S1'-Position über die Glutamat-Funktion. Die Zink-Chelatierung erfolgt über das Carbonylsauerstoffatom der Harnstofffunktion sowie über die P1'-Glutamat Carboxyfunktion<sup>21,88</sup>. Für die Wechselwirkung mit dem S1-Teil des PSMA (S1 accessory pocket) ist der P1-Teil des Inhibitors verantwortlich. Der P1-Teil des Liganden, der idealerweise eine negativ geladene Gruppe aufweist, tritt dabei mit dem „Arginine patch“ der S1-Seite in Wechselwirkung<sup>12,16,20,21,85,88,89</sup>. durch das Zusammenspiel der Argininseitenketten Arginin-463 und Arginin-536 entsteht, der S1-site in Wechselwirkung. Der „Arginine patch“ im aktiven Zentrum des PSMA entsteht durch das Zusammenspiel der Argininseitenketten Arginin-463 und Arginin-536<sup>12,16,20,21,85,88,89</sup>. Die Möglichkeit der Modifikation der P1-Seitenkette ist die Grundlage für harnstoffbasierte PSMA-Inhibitoren für die Bildgebung und Therapie des PCa<sup>11,12,20,31,85,86,88</sup>. Ein zusätzliches Strukturmerkmal, das für das Inhibitor-Design verwendet wird, ist die „arene-binding site“. Diese befindet sich in der Nähe zum 20 Å langen Eingangstrichter des aktiven Zentrums und tritt bevorzugt mit lipophilen (aromatischen) Resten von PSMA-Liganden in Wechselwirkung<sup>21</sup>

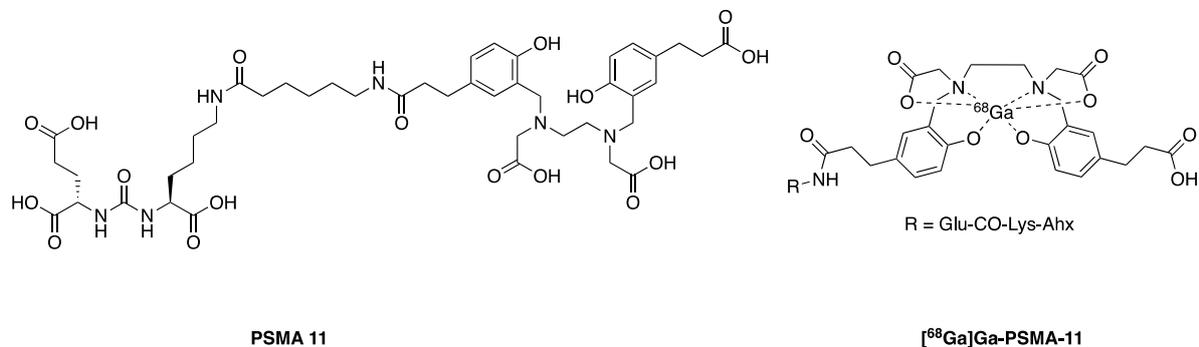
### 1.2.3.1 PSMA-Liganden für die Bildgebung des PCa

Nach Identifizierung von PSMA als vielversprechendes Target beim PCa wurden für die nicht invasive Bildgebung und die Therapie zunächst radiomarkierte Antikörper entwickelt. Für die SPECT-Bildgebung wurden die Indium-111-markierten monoklonalen Antikörper [<sup>111</sup>In]In-7E11-C5 (ProstaScint®) und [<sup>111</sup>In]In-J591 eingesetzt<sup>58,86,90,91</sup>. Für die Durchführung einer RLT wurden der Lutetium-177-markierte Antikörper [<sup>177</sup>Lu]Lu-J591 genutzt<sup>90,92</sup>. Hauptnachteile bei der Verwendung von Antikörpern waren allerdings die sehr lange Zirkulation im Blutkreislauf bzw. eine lange biologische Halbwertszeit von 3-4 Tagen und eine schlechte Tumorpenetration<sup>90</sup>. Harnstoffbasierte PSMA-Radioliganden haben gegenüber radioaktiv markierten Antikörpern einige Vorteile, z.B. ein schnelleres Auswaschen aus dem Blutpool sowie hohe Tumor-zu-Gewebe Verhältnisse. Sie werden folglich für die Bildgebung- und auch für die Therapie des PCa in der Nuklearmedizin bevorzugt<sup>8,86,90</sup>.

Für die SPECT-Bildgebung beim Prostatakarzinom werden PSMA-Radioliganden verwendet, die mit Gammaemittern markiert sind<sup>51,52</sup>. An dieser Stelle sind vor allem die zwei iodierten PSMA-Liganden [<sup>123</sup>I]I-MIP-1072 sowie [<sup>123</sup>I]I-MIP-1095 zu nennen, welche für die sog. first-in-man Evaluation hochaffiner PSMA-Liganden verwendet wurden<sup>93</sup>. Beide Inhibitoren zeigten ausgezeichnete pharmakokinetische sowie pharmakodynamische Eigenschaften und konnten erfolgreich für die Visualisierung von Weichteil- bzw. Knochenläsionen ausgehend vom metastasierten Prostatakarzinom eingesetzt werden<sup>93</sup>. Auch verschiedene Technetium-99m-markierte Inhibitoren zeigten in verschiedenen klinischen und präklinischen Studien großes Potential für die PSMA-vermittelte PCa-Bildgebung mittels SPECT<sup>94,95</sup>. Trotz Vorteilen, wie z.B. einer Exkretion des Tracers über die Nieren, ist die Anwendung von Technetium- oder Iod-markierten PSMA-Liganden im nuklearmedizinischen Alltag verschwindend gering. Die Gründe hierfür liegen besonders in der fehlenden Sensitivität und der damit verbundenen niedrigen räumlichen Auflösung von SPECT-Tracern<sup>96</sup>.

Deutlich sensitivere Ergebnisse bei der Bildgebung des PCa wurden mit PET/CT-Radiotracern erzielt. Der klinisch am häufigsten zum Einsatz kommende niedermolekulare PSMA-Ligand ist der harnstoffbasierte PSMA-Inhibitor PSMA-11 (Abbildung 12)<sup>2</sup>. Dieser Ligand basiert auf dem PSMA-Bindemotiv Glu-CO-Lys und enthält den lipophilen Linker 6-Aminohexansäure sowie den azyklischen bifunktionellen hexadentaten Chelator HBED-CC, der

als  $N_2O_4$ -Donor sehr stabile Komplexe mit  $Ga^{3+}$ , insbesondere in diesem Zusammenhang mit dem dreiwertigen Radiometall  $[^{68}Ga]Ga^{3+}$ , ausbildet<sup>31,97</sup> (Abbildung 12).

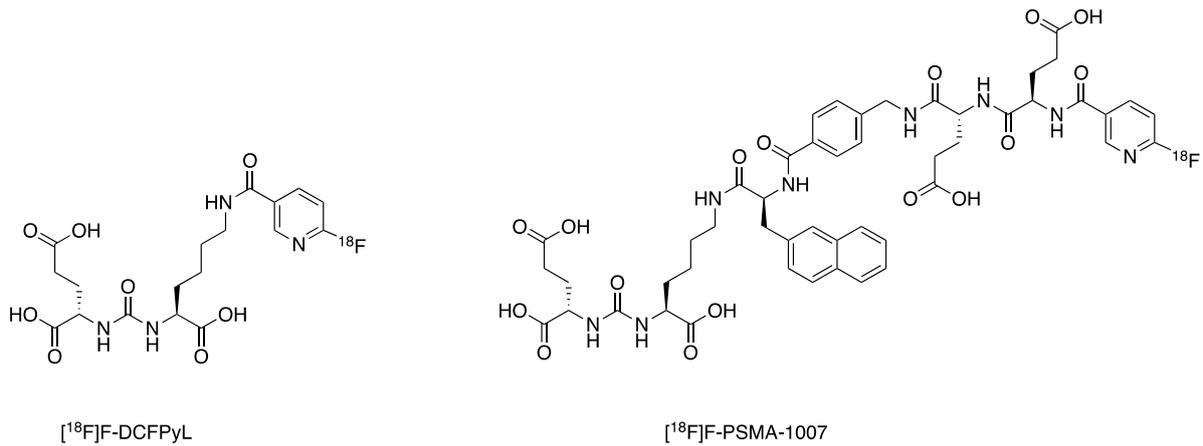


**Abbildung 12** Strukturformel von PSMA-11 und schematische Darstellung des Radiokomplexes  $[^{68}Ga]Ga$ -PSMA-11 für die PET/CT<sup>31,97</sup>.

Die Einführung von  $[^{68}Ga]Ga$ -PSMA-11 in die klinische Anwendung brachte bis dahin eine nicht erreichte Sensitivität und Spezifität in der Diagnostik mittels PET/CT-Bildgebung und hat mittlerweile einen enormen Einfluss auf die Diagnose, die Therapieplanung sowie auf die Therapieüberwachung beim PCa. Besonders beim biochemischen Rezidiv (BCR) ist es nach erfolgter initialer Therapie sehr wichtig exakte Informationen über die Tumorlokalisierung und Tumorausbreitung zu erhalten, was mit der konventionellen Bildgebung, vor allem bei niedrigen PSA-Werten, oftmals schwierig ist. Auch beim fortgeschrittenen Krankheitsbild ist diese genaue Tumorausbreitung/Tumorlokalisierung mittels PSMA-PET für eine mögliche PSMA-Liganden-Therapie von großer Bedeutung. Ebenfalls kann  $[^{68}Ga]Ga$ -PSMA-11 bzw. das PSMA-PET für die Detektion von Lymphknoten- und Knochenmetastasen verwendet werden<sup>1,2,98-100</sup>.

Neben  $[^{68}Ga]Ga$ -PSMA-11 werden auch Fluor-18-markierte Tracer eingesetzt. Obwohl  $[^{68}Ga]Ga$ -PSMA-11 als klinischer Goldstandard gilt, können auch Fluor-18-markierte PSMA-Inhibitoren Vorteile mit sich bringen. Fluor-18 besitzt eine deutlich geringere Positronen-Energie als Gallium-68 ( $E_{\beta^+}(Ga) = 1.90$  MeV,  $E_{\beta^+}(F) = 0.65$  MeV), was zu einer verbesserten räumlichen PET-Auflösung aufgrund der geringeren Reichweite der Positronen führt. Zudem besitzt Fluor-18 eine längere Halbwertszeit. Zusätzlich kann F-18 in Zyklotronen in großen Mengen hergestellt werden. Im Gegensatz zu dem  $^{68}Ge/^{68}Ga$  Generator kann so auch die Menge der produzierten Aktivität an die Zahl der vorgesehenen Untersuchungen angepasst

werden<sup>1,101–103</sup>. Neben den physikalischen sowie radiochemischen Aspekten unterscheiden sich Fluor-18-markierte PSMA-spezifische Radiotracer gegenüber Gallium-68-markierten Tracern auch in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften und sind beispielsweise vorteilhaft für die Detektion von Lokalrezidiven in der Prostataloge oder in der Detektion von Lebermetastasen. Beispiele für Fluor-18-markierte PSMA-Liganden in der klinischen Anwendung sind [<sup>18</sup>F]F-DCFPyL und [<sup>18</sup>F]F-PSMA-1007<sup>1,104,105</sup> (Abb. 13).

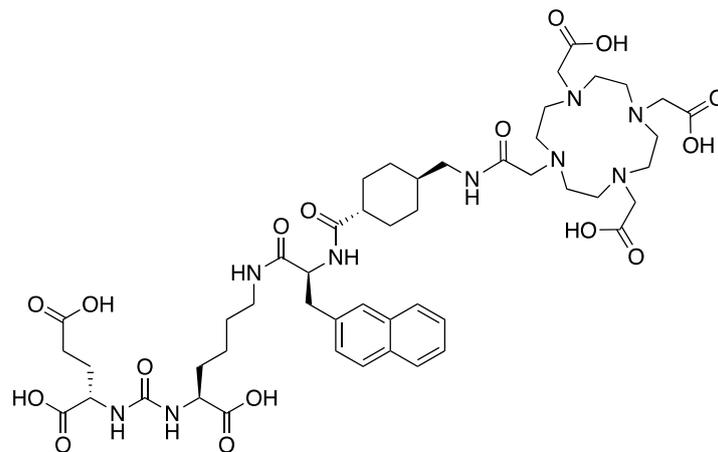


**Abbildung 13** Strukturformel der Fluor-18-markierten PSMA-Liganden [<sup>18</sup>F]F-DCFPyL und [<sup>18</sup>F]F-PSMA-1007<sup>104,105</sup>.

Für die Radiomarkierung dieser beiden PSMA-spezifischen Radiotracer mit Fluor-18 wird eine prosthetische Gruppe verwendet. Im Falle von PSMA-1007 erfolgt diese beispielsweise mit der prosthetischen Gruppe 6-[<sup>18</sup>F]Fluornicotinsäure, die als Tetrafluorphenol-Aktivester an den PSMA-Liganden gekoppelt wird<sup>104</sup>.

### 1.2.3.2 PSMA-Liganden für die Therapie des PCa

Die geringe Expression von PSMA in gesundem Gewebe bei gleichzeitiger Überexpression beim PCa bildete die Grundlage für die PSMA-spezifische Endoradiotherapie. Für diesen Behandlungsansatz kommen ebenfalls harnstoffbasierte peptidomimetische PSMA-Liganden zum Einsatz<sup>6</sup>. Diese werden dann mit  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Emittern, wie z.B. Actinium-225 und Lutetium-177 markiert<sup>64,106</sup>. Der am häufigsten klinisch eingesetzte Inhibitor ist der Ligand PSMA-617 (Abbildung 14). Dieser sog. theranostische, d.h. zu therapeutischen- und gleichzeitig diagnostischen Zwecken einsetzbare, Ligand PSMA-617 besteht aus drei Komponenten, dem Pharmakophor Glu-CO-Lys, dem Chelator DOTA, der sehr stabile Komplexe mit dreiwertigen therapeutisch relevanten Nukliden <sup>177</sup>Lu, <sup>90</sup>Y oder <sup>225</sup>Ac bildet und demnach optimal für die Verwendung im Bereich der Radionuklidtherapie ausbildet. Das PSMA-Bindemotiv und der Chelator werden bei dem Liganden PSMA-617 durch die hydrophoben Linkerfunktion 2-Naphthyl-L-alanin (2-Nal) und *trans*-Aminomethylcyclohexylcarbonsäure (*trans*-Amc) verknüpft.

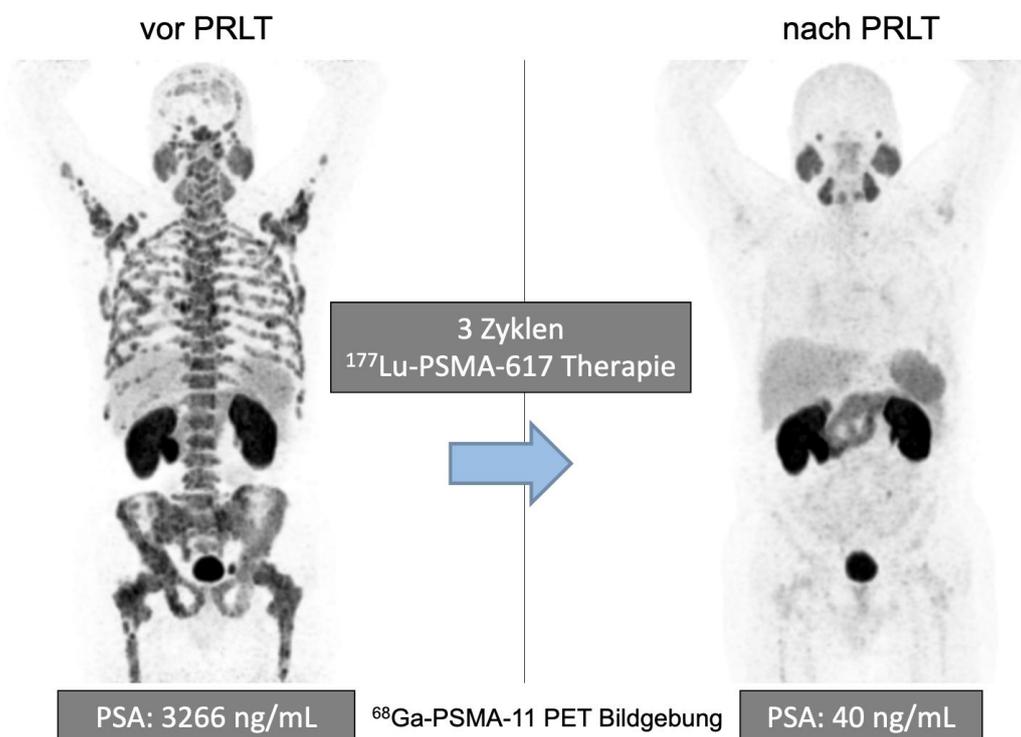


PSMA-617

**Abbildung 14** Strukturformel von PSMA-617.

Der Linker 2-Nal-Amc verknüpft dabei nicht nur das PSMA-Bindemotiv Glu-CO-Lys mit dem Chelator DOTA, sondern hat zudem großen Einfluss auf die Gesamtlipophilie des Radiotracers. Diese Linker sind wichtig für eine hohe PSMA-spezifische Tumoraufnahme und haben großen Einfluss auf die Pharmakokinetik sowie die Biodistribution des Radiotracers<sup>6,106</sup>. Auch im Falle von PSMA-617 wurden im Rahmen einer Struktur-Aktivitätsbeziehung verschiedene Linker getestet, um den geeigneten Kandidaten für die klinische Translation zu identifizieren. Dabei

hatten bereits kleine Modifikationen an der Struktur enorme Auswirkungen, sowohl auf die PSMA-Affinität und die spezifische Tumorinternalisierung als auch auf die Organverteilung. Der Linker 2-Nal-Amc zeigte in Kombination mit DOTA sowie dem PSMA-Bindemotiv Glu-CO-Lys letztendlich die besten Eigenschaften und wurde für die klinische Translation eingesetzt. Die Verwendung von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 in der Endoradiotherapie des PCa zeigt eine substantielle Wirksamkeit mit sehr geringen Nebenwirkungen und ist gerade für den Fall des mCRPC eine hervorragende Therapieoption<sup>8,35,36,38</sup> (Abb. 15).



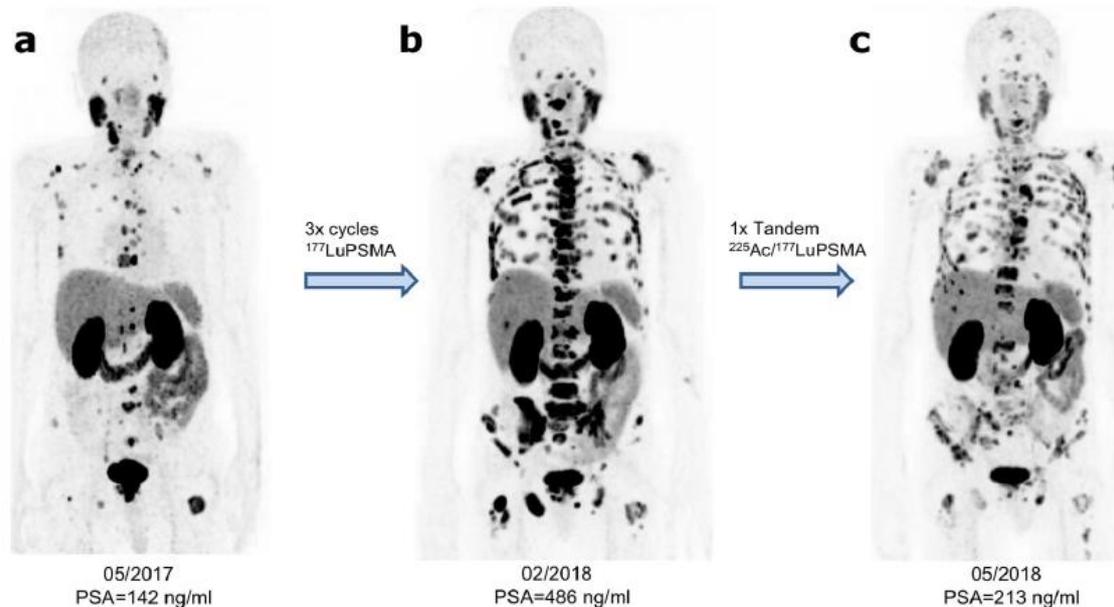
**Abbildung 15** Fallbeispiel eines 61-jährigen Patienten mit diffuser PCa-geschuldeter Knochenmetastasierung (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes). PET-Bildgebung mit [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-11 vor und nach drei Zyklen PRLT mit [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617. Die PET-Bildgebung nach RLT zeigt eine minimale Resterkrankung unter drastischer Reduktion des PSA-Wertes.

Ein Fallbeispiel für die Wirksamkeit der [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 Endoradiotherapie bei einem Patienten mit fortgeschrittenem PCa ist in Abb. 15 gegeben. Die PET-Bildgebung mit [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-11 zeigt nach drei Zyklen PRLT mit [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-617 eine drastische Remission der PCa-geschuldeten Tumorlast bei deutlicher Reduktion des PSA-Wertes.

Ein sehr wichtiger Punkt der PSMA-gerichteten Radioligandentherapie ist die Ermittlung der Dosimetrie. Darunter versteht man die Abschätzung der Strahlenbelastung des gesamten Organismus sowie einzelner Organe. Im Falle einer PSMA-gerichteten Radioligandentherapie mit [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 kann die physiologische Expression des PSMA in den Nieren und den Speicheldrüsen zu einer unerwünschten Strahlenexposition dieser Organe führen. Vor der allgemeinen Verwendung in der Klinik muss die Dosimetrie des Radiotracers bestimmt werden, um die optimale (patientenindividuelle) Aktivität zu ermitteln, die eine Tumorbestrahlung mit der maximal absorbierten Dosis ermöglicht, ohne dabei die empfohlenen Schwellenwerte für die Nieren sowie die Speicheldrüsen zu überschreiten<sup>107</sup>. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften von Lutetium-177 (10.4 % Emission eines Photons mit einer Energie von 208 keV) erfolgt die Dosimetrie während der [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 Endoradiotherapie mittels SPECT/CT-Bildgebung. So kann die absorbierte Dosis in den kritischen Organen und den Tumorkläsionen während des Zyklus abgeschätzt werden.

Trotz des guten Therapieansprechens bei der Behandlung mittels [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 können bei manchen Patienten nach mehreren Behandlungszyklen jedoch Resistenzen gegen die PSMA-vermittelte Radioligandentherapie mit Lu-177 auftreten<sup>64</sup>. Für derartige Patientengruppen erweist sich die PSMA-vermittelte Radioligandentherapie mit  $\alpha$ -Strahlern als nützliche Alternative<sup>64,106</sup>. Ein wichtiges Beispiel ist die Therapie mit [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617. Die kurze Reichweite von Alphastrahlung im menschlichen Gewebe von nur wenigen Zelldurchmessern (< 0,1 mm) ermöglicht die selektive Abtötung der Krebszellen unter Schonung des umliegenden gesunden Gewebes. Gleichzeitig ist die Energie des  $\alpha$ -Teilchens von mehreren MeV höher als die der  $\beta^-$ -Teilchen und führt zu einer hochwirksamen Zelltötung<sup>50,106</sup>. Ein großer Nachteil bei einer Therapie an [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 ist hingegen die beobachtete Mundtrockenheit als Nebenwirkung, die besonders bei hohen Aktivitäten des Radiotracers auftritt<sup>64</sup>. Um die Nebenwirkungen zu verringern und dennoch die physikalischen Eigenschaften der Alphastrahler auszunutzen, kann eine sog. Tandemtherapie durchgeführt werden. Hierbei wird ein Cocktail aus [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 und kleinen Aktivitäten an [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 appliziert. Dies hat den Vorteil, dass bei vergleichbarem Therapieansprechen zur [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 Monotherapie die Nebenwirkungen minimiert werden. Die Tandemtherapie zeigt ein enormes Potenzial in der Behandlung des mCRCP und kann bei einem Resistenz geschuldeten Progress durch die Emittierung der hochenergetischen  $\alpha$ -Partikel einen therapeutischen Effekt verursachen, bei gleichzeitiger Minimierung von

Nebenwirkungen<sup>64</sup>. Ein Beispiel für eine [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617/[<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 Tandemtherapie ist in Abb. 16 aufgeführt. Das Beispiel zeigt einen Patienten (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes) mit Progress der Erkrankung nach drei Therapiezyklen mit [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617. Nach Behandlung mit der [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617/[<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 Tandemtherapie konnte eine partielle Remission der Metastasierung erzielt werden.



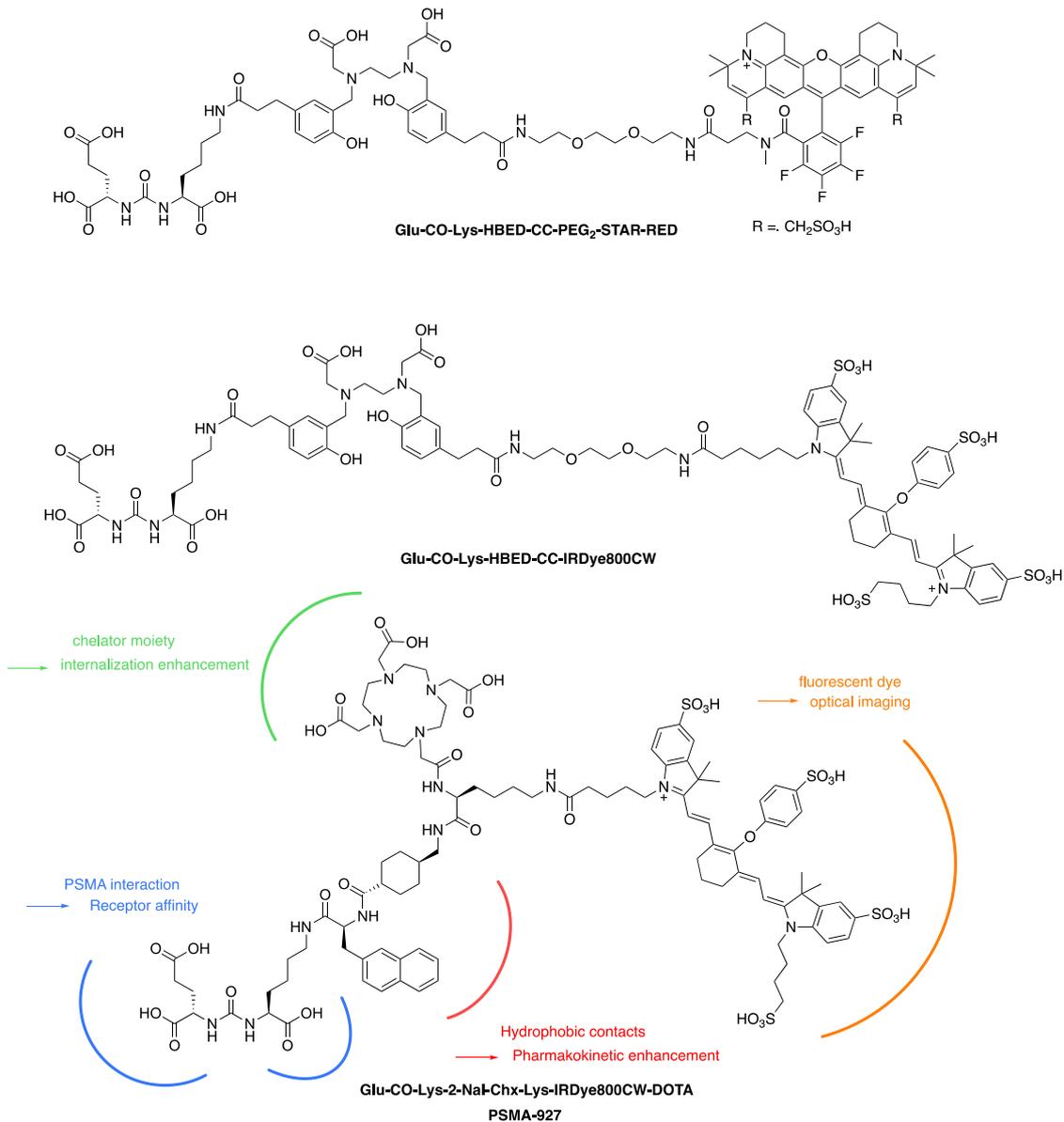
**Abbildung 16** PET-Bildgebung eines Patienten mit mCRPC nach [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617/[<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617-Tandemtherapie (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes). A) Tumorausbreitung vor [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 Monotherapie. B) Progression der Erkrankung nach 3 Zyklen [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 Monotherapie. C) Partielle Remission der Erkrankung nach [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617/[<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 Tandemtherapie<sup>64</sup>.

Ein weiterer Nachteil bei Therapien mit Actinium-225 ist allerdings, dass die Ermittlung der Dosimetrie mittels SPECT-Bildgebung aufgrund der fehlenden Gammaemission nicht möglich ist. Die Bestimmung der individuellen Strahlenbelastung jedes einzelnen Patienten ist allerdings gesetzlich vorgeschrieben. Aufgrund der wachsenden Anzahl an <sup>225</sup>Ac-markierten Tracern in der Nuklearmedizin sind daher Informationen über die Dosimetrie sehr wichtig, um die individuelle Strahlenbelastung ermitteln sowie die Therapie individuell für jeden Patienten planen zu können<sup>64</sup>. Derzeit wird die Dosimetrie von <sup>225</sup>Ac-markierten Radiotracern entweder aus Daten aus Tierversuchen extrapoliert und/oder aus den Dosimetriedaten von ähnlichen Radiotracern, hier z.B. [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617, abgeschätzt.

### **1.2.3.3 Multimodale PSMA-Liganden**

#### **1.2.3.3.1 Fluoreszierende PSMA-Radioliganden**

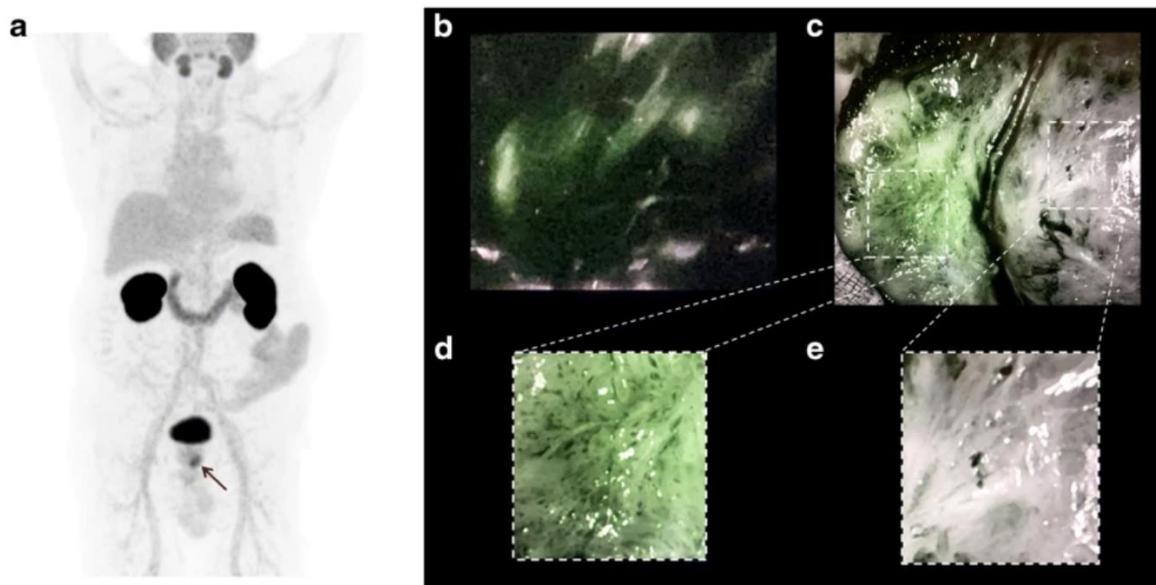
Eine neuartige Klasse an PSMA-Radiotracer sind sog. multimodale PSMA-Liganden, welche durch ihre chemische Struktur eine weitere medizinische Anwendung ermöglichen. Wichtige Beispiele für solche multimodalen Verbindungen sind fluoreszierende PSMA-Liganden. Diese sind aus einem PSMA-gerichteten Vektor, einem BFC für die Markierung mit Radiometallen sowie zusätzlich aus einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff aufgebaut und kombinieren die Vorteile der Fluoreszenzbildgebung mit denen nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren (Abb. 17)<sup>108</sup>.



**Abbildung 17** Strukturformeln der hybriden PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-HBED-CC-PEG<sub>2</sub>-STAR-RED<sup>109</sup>, Glu-CO-Lys-HBED-CC-IRDye800CW<sup>108</sup> und Glu-CO-Lys-2-Nal-Chx-Lys-IRDye800CW-DOTA<sup>110</sup>.

Insbesondere bei metastasierten Prostatakarzinom können solche fluoreszierende PSMA-Radioliganden während einer Lymphadenektomie für die chirurgische Resektion von PSMA-positiven Lymphknotenmetastasen eingesetzt werden. Die exakte Lokalisation solcher Lymphknotenmetastasen während der Operation stellt oftmals aufgrund vorangegangener Operationen (Prostatektomie) eine Herausforderung dar, da sich hierdurch die Lage der Lymphknoten stark ändern kann<sup>108,111</sup>. Die genaue Erkennung und vollständige Resektion von Tumorgewebe ist jedoch für den Behandlungserfolg von großer Bedeutung. Mit einem PSMA-spezifischen Radiotracer können Lymphknotenmetastasen bereits jetzt mittels PET vor der

Operation lokalisiert werden, allerdings gestaltet sich die vollständige Resektion aller Metastasen trotzdem noch schwierig. Fluoreszierende PSMA-Radioliganden erlauben dem Operateur dann zusätzlich mittels fluoreszierender Operationssonden die visuelle Detektion der Lymphknotenmetastasen sowie die Diskriminierung zwischen gesundem und tumorösem Gewebe. Ein Beispiel für einen fluoreszierenden PSMA-Liganden, mit dem das Prinzip der PET-Fluoreszenz Hybridbildgebung auch im Patienten gezeigt werden konnte, ist der PSMA-gerichtete Radiotracer PSMA-914 (Glu-CO-Lys-(HE)<sub>3</sub>-HBED-CC-IRDyeCW800, H = Histidin, E = Glutaminsäure) (Abb. 18)<sup>111</sup>.



**Abbildung 18** Fallbeispiel für PET/CT-Fluoreszenz-Hybrid-Bildgebung eines Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom. A) Präoperative PET/CT Bildgebung mit [<sup>68</sup>Ga]Ga-Glu-CO-Lys-(HE)<sub>3</sub>-HBED-CC-IRDye800CW ([<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-914) 1 h nach Injektion mit starker Anreicherung im Tumor (Pfeil). B) Visualisierung Primärtumor nach Anreicherung von PSMA-914 im Rahmen der DaVinci-assistierte Fluoreszenz gesteuerte chirurgische Resektion (Gabe von nicht radioaktivem Ga-PSMA-917 am Folgetag). C) *Ex situ* Fluoreszenzdetektion nach Tumorresektion. D) + E) Kontrast zwischen bösartigem (grün fluoreszierend) und gutartigem Gewebe (kein optisches Signal)<sup>111</sup>.

[<sup>68</sup>Ga]Ga-PSMA-914 zeigte 1 h nach intravenöser Gabe im Rahmen der präoperativen PET/CT-Bildgebung eine spezifische Anreicherung des Radiotracers und somit eine genaue Lokalisation des Tumors. 24 h nach der präoperativen PET/CT-Bildgebung erfolgte nach erneuter Gabe des nicht radioaktiv markierten Precursors PSMA-914 die daVinci-assistierte Fluoreszenz gesteuerte Tumorresektion. Die konsekutive *ex situ* Fluoreszenzdetektion zeigte einen hohen Kontrast zum umgebenden gesunden Gewebe und bildete die Grundlage für die daVinci-assistierte chirurgische Resektion des verbliebenen PSMA-positiven Gewebes<sup>111</sup>. Mit

diesem Liganden konnten im Rahmen der PET-Fluoreszenz Hybridbildung die Limitationen der beiden Bildgebenden Verfahren, bspw. die geringe Gewebeeindringtiefe der optischen Fluoreszenzbildgebung, überwunden werden<sup>108,112,113</sup>.

### **1.2.3.3.2 Radiohybrid-Liganden**

#### **1.2.3.3.2.1 Charakteristika und allgemeiner Aufbau radiohybrider Tracer**

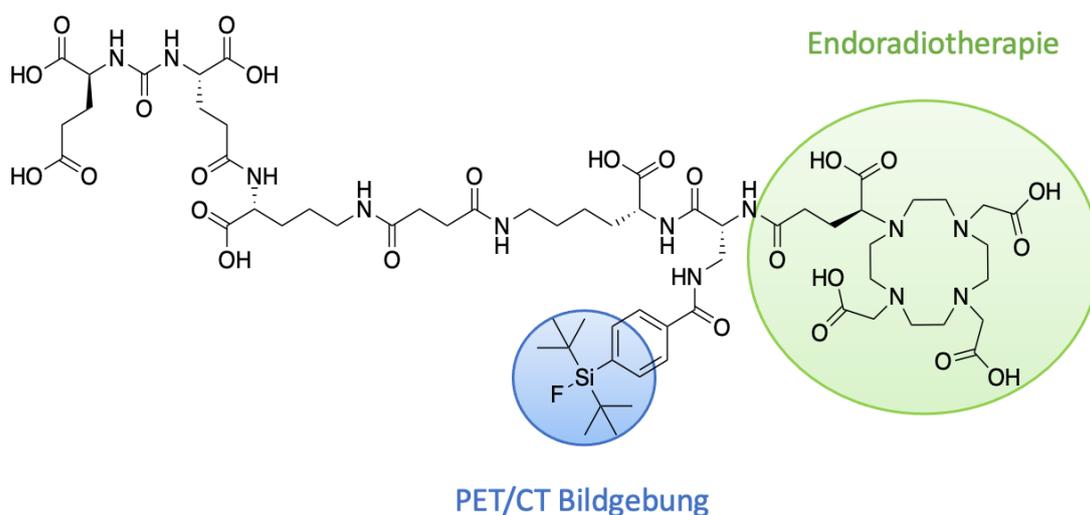
Radiohybrid-Liganden sind eine neuartige Klasse an Radiotracern, die kontinuierlich an Bedeutung gewinnt. Sie sind durch die strukturelle Besonderheit charakterisiert, dass sie mit zwei unterschiedlichen Radionukliden markiert werden können. Dies erlaubt sogenannte theranostische Anwendungen, d.h. eine Bildgebung als auch eine Endoradiotherapie mit einer einzigen Verbindung. Je nach Anwendung wird die Verbindung dann mit einem diagnostischen oder einem therapeutischen Radionuklid markiert, wohingegen die zweite Funktion mit einem nichtradioaktiven Isotop markiert wird. Der entscheidende Vorteil liegt in der identischen Summen- und Strukturformel der diagnostischen und therapeutischen Substanz, so dass beide Verbindungen ebenfalls eine identische Bioverteilung aufweisen<sup>101,102</sup>. Ein wichtiges Beispiel sind radiohybride PSMA-Liganden, die aus dem Komplexbildner DOTAGA und einem Fluoridakzeptor aufgebaut sind (siehe Kap. 1.2.3.3.2.2)<sup>101,102,114</sup>.

Neben den Radiohybrid-Liganden auf der Basis von einem Metallchelator und einem Fluorid-Akzeptor können Radiohybrid-Liganden auch zwei unterschiedliche Metallchelatoren enthalten. In der Literatur sind solche Konstrukte mit zwei Komplexbildnern bisher wenig beschrieben<sup>115–118</sup>. So hat Wienhoff *et al.* ein Bombesinderivat beschrieben, welches die beiden Komplexbildner DOTA und NOTA enthält und mit dem Betaemitter <sup>90</sup>Y und dem Positronenemitter <sup>64</sup>Cu markiert ist<sup>115</sup>. Allerdings erfolgte kein Nachweis über die regioselektive Komplexierung der beiden Radiometalle. In der Arbeit von Wurzer *et al.* wurde ein Konstrukt entwickelt, welches einen auf Cyclen und einen zweiten auf TACN Basis Komplexbildner in einem Molekül vereint<sup>116</sup>. Die Chelatoren beinhalten weitere Modifikationen an den beiden Makrozyklen mit Phosphinatarmen, die insbesondere für die Komplexierung von dreiwertigem Gallium geeignet sind. Die untersuchte Metallkombination war Bi-213 (Alphaemitter,  $t_{1/2} = 46$  min) und Ga-68 (Positronenemitter,  $t_{1/2} = 68$  min). Analog zu dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz besitzt <sup>213</sup>Bi keine Gammaemissionen, die eine Bestimmung der Dosimetrie mittels bildgebenden Verfahren ermöglichen würden. In diesem Fall erfolgt dann die Bildgebung mittels PET unter Verwendung von Ga-68. Allerdings ist dieser

Ansatz aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von Ga-68 und der schlechten Komplexeigenschaften der verwendeten Chelatoren für  $^{64}\text{Cu}$  für  $^{225}\text{Ac}$ -basierte Therapeutika, wie in dieser Arbeit angestrebt, ungeeignet. Ein weiteres Beispiel von Notni *et al.* vereint ebenfalls zwei Chelatoren in einem Molekül, allerdings lag in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Entwicklung einer PET/MRT Sonde auf Basis von nichtradioaktivem  $\text{Gd}^{3+}$  als MRT Kontrastmittel und Ga-68 als PET Isotop<sup>117</sup>. In einer weiteren Arbeit von Kumar *et al.* wurden in dendrimeren Strukturen verschiedene Chelatoren in einem Konstrukt vereint, ebenfalls mit dem Ziel der Entwicklung einer PET/MRT Sonde<sup>118</sup>. Hervorzuheben ist, dass in keiner der Arbeiten die regioselektive Komplexierung der beiden (Radio)metalle nachgewiesen wurde und das Radionuklidpaar Ac-225/Cu-64 nicht untersucht wurde.

### 1.2.3.3.2 Radiohybride PSMA-Liganden

Wie in Kap. 1.2.3.3.2.1 bereits beschrieben, gewinnen radiohybride PSMA-Liganden (rhPSMA) zunehmend an Bedeutung, da sie, aufgrund der identischen Summen- und Strukturformel, theranostische Anwendungen erlauben<sup>101,102</sup>. Dies ist derzeit beim Prostatakarzinom nicht der Fall, da für die Diagnostik  $^{68}\text{Ga}$ -markiertes PSMA-11 und für die Therapie  $^{177}\text{Lu}$ -markiertes PSMA-617 eingesetzt wird. Ein Vertreter dieser neuen Generation an Radiotraceren ist der radiohybride Ligand rhPSMA-7.3 (Abb. 19).



**Abbildung 19** Strukturformel des radiohybriden PSMA-Liganden rhPSMA-7.3<sup>101</sup>. In Blau: SiFA-Gruppe zur Markierung mit Fluor-18 für die PET/CT-Bildgebung. In Grün: DOTAGA-Chelator zur Komplexierung von Radiometallen für die Endoradiotherapie.

Der radiohybride PSMA-Ligand rhPSMA-7.3 ist zum einen aus dem Radionuklidchelator DOTAGA aufgebaut, der die Komplexierung verschiedener therapeutischer Radiometalle, wie Actinium-225 oder Lutetium-177 bzw. mit deren nicht radioaktiven Isotopen ermöglicht. Außerdem enthält er den Organosilizium basierten Fluoridakzeptor (SiFA), der über einen Fluor-19/Fluor-18-Isotopenaustausch die Radiomarkierung mit Fluor-18 erlaubt (vgl. Kap. 1.2.2.2). Für die PET/CT-Bildgebung wird rhPSMA-7.3 mit dem Positronenemitter Fluor-18 und dem stabilen Isotopen von Lutetium-177  $^{nat}\text{Lu}$  markiert. Für die Endoradiotherapie erfolgt die Radiomarkierung mit dem Betaemitter  $^{177}\text{Lu}$  und dem stabilen Fluor-19. Sowohl [ $^{18}\text{F}$ ,  $^{nat}\text{Lu}$ ]-markierte PSMA-Ligand für die Diagnostik als auch der [ $^{19}\text{F}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ]-markierte Radiohybrid für die Therapie haben somit eine identische Strukturformel und folglich auch eine identische Bioverteilung<sup>101,102</sup>.

## 2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Entwicklung von multifunktionellen PSMA-spezifischen Radiotraceren. Diese können aufgrund ihrer chemischen Struktur gleichzeitig für nuklearmedizinische und weitere medizinische Anwendungen genutzt werden. Wichtige Beispiele sind zum einen fluoreszierende PSMA-Liganden, die die Vorteile der Fluoreszenzbildgebung mit denen nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren kombinieren und zum anderen radiohybride PSMA-Liganden, welche für theranostische Anwendungen genutzt werden können.

Das erste Ziel der Arbeit war die Entwicklung von bimodalen PSMA-spezifischen Radiotraceren für die PET/Fluoreszenz-Bildgebung auf der Basis von BODIPY-Farbstoffen. Diese können durch einen  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch gleichzeitig sowohl als Fluoreszenzfarbstoff als auch als Radiolabel eingesetzt werden. Eine solche Verbindung würde analog zu den in Abschnitt 1.2.3.3.1 gezeigten Beispielen eine prächirurgische PET-Bildgebung als auch eine fluoreszenzassistierte Lymphadenektomie ermöglichen. Aufgrund der Sensitivität der BODIPY Farbstoffe gegenüber sauren und basischen Reaktionsbedingungen sollten geeignete Syntheserouten für die Darstellung von BODIPY-PSMA-Liganden etabliert werden. In einer Struktur-Aktivitätsstudie sollten dann hochaffine BODIPY-PSMA-Liganden als Kandidaten für weitere Charakterisierungen im Tiermodell identifiziert werden. Weiterhin sollten diese Verbindungen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, PSMA-vermittelter Zellinternalisierung und Stabilität sowie hinsichtlich ihrer Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

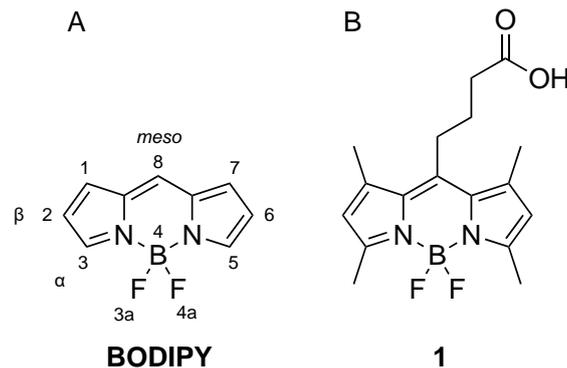
In einem zweiten Teil sollten dann radiohybride Konstrukte ähnlich zu den in Abschnitt 1.2.3.3.2 beschriebenen Verbindungen entwickelt werden. Im Gegensatz zu dem bereits in der Literatur beschriebenen Ansatz sollten in dieser Arbeit Radiohybridliganden entwickelt werden, die mit zwei Radiometallen markiert werden können. Die Kombination von zwei Chelateinheiten bzw. Radiometallen ermöglicht nicht nur ein breiteres Anwendungsspektrum solcher Konstrukte, sondern ebenfalls bisher nicht realisierbare Anwendungen. Die Herausforderung hierbei besteht in der regioselektiven Komplexierung der beiden Metalle durch den jeweiligen Chelator, um die Bildung eines homogenen radioaktivmarkierten Produkts sicherzustellen. Für den in dieser Arbeit verfolgten Ansatz sollte dazu zunächst ein

Dichelatormodellkonstrukt synthetisiert werden, um die regioselektive Komplexierung der Metallkationen (auf nichtradioaktiver und radioaktiver Ebene) mittels verschiedener spektroskopischer Verfahren nachzuweisen. Zuletzt sollte zur Identifizierung eines hochaffinen PSMA-spezifischen Radiohybridliganden auf Basis von zwei Chelatoren ebenfalls eine Struktur-Aktivitätsstudie durchgeführt werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 BODIPY-PSMA-Liganden

Eine vielversprechende Gruppe von Fluorophoren für die Fluoreszenzbildgebung in der Medizin ist die Farbstoffklasse auf Basis des 4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacens (Difluorbor-Dipyrromethen = BODIPY) Grundgerüsts (Abb. 20)<sup>119–121</sup>.



**Abbildung 20** A) Strukturformel und IUPAC-Nomenklatur des BODIPY-Grundgerüsts<sup>121</sup>. B) Strukturformel der BODIPY-Carbonsäure **1**.

BODIPY-Farbstoffe wurden erstmals von Treibs und Kreuzer, ausgehend von 2,4-Dimethylpyrrol synthetisiert und gewannen seitdem stets an Bedeutung<sup>122</sup>. Sie sind charakterisiert durch einzigartige chemische, physikalische sowie spektroskopische Eigenschaften wie z.B. den hohen molaren Absorptionskoeffizienten, hohen Quantenausbeuten, Fluoreszenzlebenszeiten im Bereich von Nanosekunden, geringen Stokes-Verschiebungen und die hohe Photostabilität<sup>121,123–127</sup>. Das zunehmende Interesse an diesen Fluorophoren hat zu einer genaueren Untersuchung der Chemie des BODIPY-Kerns selbst geführt und gezeigt, dass strukturelle Modifizierungen am Grundgerüst in  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder *meso*-Position die chemischen, physikalischen bzw. spektroskopischen Eigenschaften stark beeinflussen können. Besonders aromatische Substituenten in der 3,5-Position haben aufgrund der Erweiterung des aromatischen Systems eine erhebliche Auswirkung auf die spektroskopischen und photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors. Solche Substituenten können u.a. durch die Knoevenagel-Kondensation aromatischer Aldehyde mit einer aciden Methylgruppe oder durch eine Palladium katalysierte Kreuzkupplung zwischen einem elektronenarmen halogenierten BODIPY-Kern mit dem entsprechenden Nukleophil

eingeführt werden. Diese Modifikation führt zu einer bathochromen Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima bis hin zum Nahinfrarot Bereich (NIR-Bereich) des elektromagnetischen Spektrums. Darüber hinaus können durch synthetische Kernmodifikationen unterschiedliche funktionelle Gruppen eingefügt werden, die eine Konjugation des Farbstoffes, bspw. über eine Carbonsäurefunktion in *meso*-Position, an weitere Biomoleküle erlaubt<sup>121,123</sup>. BODIPY-basierte Sensoren für die biomedizinische Forschung wurden erfolgreich zur spezifischen Bildgebung subzellulärer Kompartimente, als sensitive Bildgebungssonden für verschiedene tumorassoziierte Rezeptoren oder überexprimierte Zielproteine sowie zum Screening wichtiger Biomoleküle für die selektive Bildgebung und Visualisierung biologischer Prozesse eingesetzt<sup>119,128–131</sup>.

Eine weitere Besonderheit dieser Stoffklasse ist die Möglichkeit den Positronenemitter Fluor-18 durch einen Lewis-Säure-katalysierten <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausch an der Bordifluoridgruppe einzuführen, was BODIPY-Farbstoffe zu verheißungsvollen Fluorophoren für die Entwicklung von dualen PET/CT-Tracern macht<sup>77</sup>. Im Gegensatz zu herkömmlichen Ansätzen, bei denen sowohl der Fluoreszenzfarbstoff als auch das Radiolabel kovalent an den Zielvektor kovalent gebunden werden müssen (vgl. Kap. 1.2.3.3.1), vereint der BODIPY-Farbstoff beide Möglichkeiten in einem Molekül. Der Isotopenaustausch erfolgt dabei direkt durch die Umsetzung des BODIPY-Fluorophors mit einer Lewis-Säure und azeotrop getrocknetem [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup> mit einem organischen Gegenion wie z.B. dem Tetrabutylammoniumkation. Andere Ansätze zur Radiomarkierung substituieren zunächst ein Fluoratom gegen eine OH- oder OTf-Funktion gefolgt von der Umsetzung mit [<sup>18</sup>F]F/KHF<sub>2</sub> bzw. trägerfreiem (non carrier added, n.c.a.) [<sup>18</sup>F]F<sup>-</sup>. Dieses Prinzip wurde in verschiedenen präklinischen Arbeiten bereits erfolgreich demonstriert<sup>77</sup>. Liu *et al.* beispielsweise entwickelten einen Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen BODIPY-RGD-Tracer, der nach absolviertem <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausch sowohl in *ex vivo* Fluoreszenzuntersuchungen als auch in microPET-Studien für die duale Bildgebung des humanen Glioblastoms in U87-Xenografttragenden Mäusen verwendet wurde<sup>77</sup>. Auch für die Entwicklung von bimodalen PSMA-Inhibitoren wurden BODIPY-Fluorophore bereits verwendet<sup>132</sup>. Alquicer *et al.* berichteten über den mit einem BODIPY-PSMA-Ligand Glu-CO-Lys-X-TMR, der zur Identifizierung neuer GCP-II-gerichteter Liganden mittels einem Hochdurchsatz Fluoreszenzpolarisationsassays verwendet wurde<sup>133</sup>. Son *et al.* entwickelten ein PSMA-Konjugat auf Basis des NIR-Farbstoffs BODIPY<sub>650/665</sub> mit einer etwa zehnfach geringeren Affinität als der potente PSMA-Inhibitor ZJ-

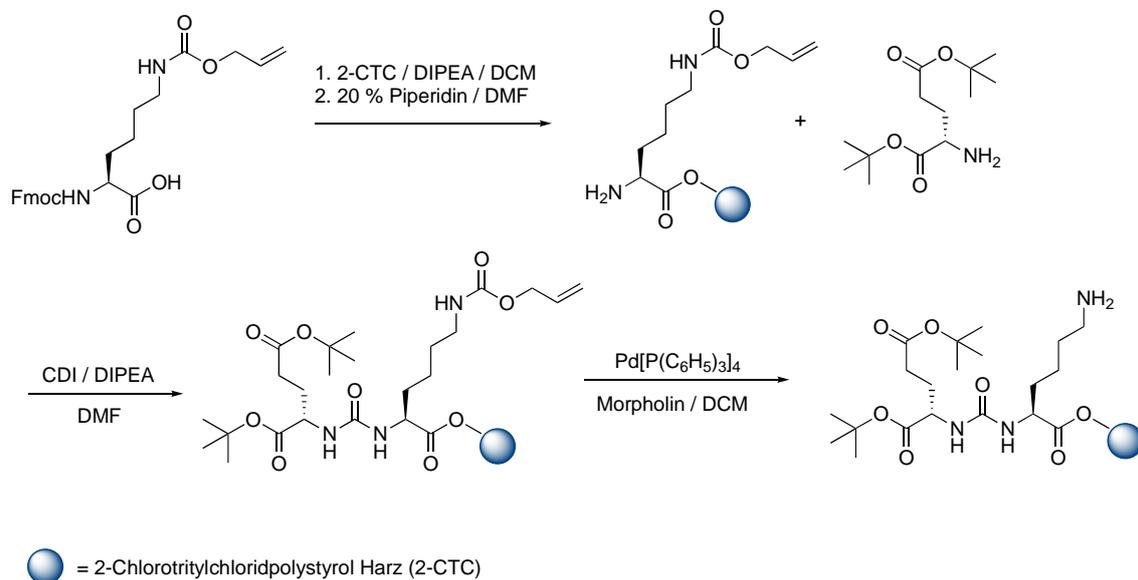
43. Das BODIPY-PSMA-Konjugat zeigte eine spezifische Aufnahme in PSMA-exprimierenden Zellen und ermöglichte mit Hilfe der optischen Fluoreszenzbildgebung die Visualisierung von PSMA-positiven Tumoren im Mausmodell<sup>134</sup>.

Ein <sup>18</sup>F-markiertes BODIPY-PSMA-Konjugat wurde, nach aktuellem Wissensstand, allerdings in der Literatur noch nicht beschrieben. Als Farbstoff für das vorliegende Projekt wurde der BODIPY-Farbstoff **1** verwendet (Abb. 20 B), der im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Biophysikalische Chemie von Herrn Prof. Dr. Jung der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Farbstoff **1** ist für die Entwicklung von hybriden PSMA-spezifischen Radiotracer sehr vorteilhaft, da er gleichzeitig Radiolabel/Fluoreszenzfarbstoff (s.o.) und, aufgrund seiner chemischen Struktur, an verschiedene Biomoleküle konjugiert werden.

Für die Synthese der BODIPY-PSMA-Konjugate wurden in diesem Projekt, neben dem Farbstoff **1**, das PSMA-Bindemotiv Glu-CO-Lys und die Spacer der klinisch eingesetzten PSMA-spezifischen Radiotracer PSMA-11 sowie PSMA-617 verwendet (vgl. Kap. 1.2.3.1 und 1.2.3.2).

### 3.1.1 Synthese und Charakterisierung von BODIPY-PSMA-Biokonjugaten

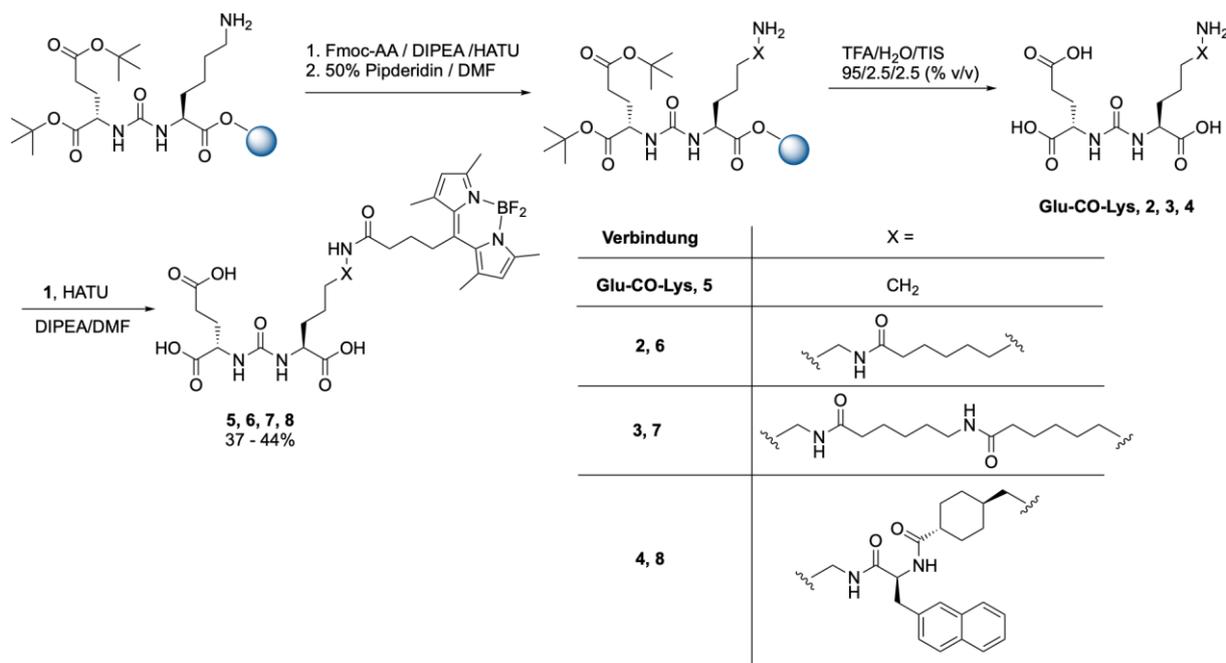
Für die Darstellung von BODIPY-PSMA Radiotraceren erfolgte zunächst die Synthese des PSMA-Bindemotivs Glu-CO-Lys mittels Festphasensynthese (engl. solid phase peptide synthesis, SPPS) unter Verwendung eines 2-Chlorotrylchlorid Harzes (2-CTC). Diese Methode besticht durch die Möglichkeit der einfachen Abtrennung von Reagenzien und den damit schnellen Aufbau von Molekülstrukturen im Gegensatz zur herkömmlichen Synthese in Lösung. Die Durchführung erfolgte in Analogie zu Eder *et al.* mit leichten Modifikationen, bspw. der Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) für die Knüpfung der Harnstoffgruppe anstelle von Triphosgen (Abb. 21)<sup>31,135</sup>.



**Abbildung 21** Festphasensynthese des geschützten PSMA-Bindemotivs.

Zunächst erfolgt die Immobilisierung des *N*- $\alpha$ -Fmoc-*N*- $\epsilon$ -Alloc-L-Lysins durch Reaktion der freien Carbonsäurefunktion mit der 2-Chlorotrylchlorid Funktion des 2-CTC Harzes unter basischen Bedingungen. Nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe in  $\alpha$ -Position erfolgt die CDI-vermittelte Knüpfung der Harnstoff-Bindung<sup>135</sup>. Nach vollständigem Eduktumsatz wurde die gebildete Acyl-Imidazol Zwischenstufe, welche massenspektrometrisch als Kation mit einem  $m/z$  für  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 354.1$  nachgewiesen wurde, unter basischen Konditionen mit der 2-CTC immobilisierten Startaminosäure *N*- $\epsilon$ -Alloc-L-Lysin umgesetzt. Anschließend erfolgte die Pd-katalysierte Entfernung der Alloc-Schutzgruppe in  $\epsilon$ -Position durch die Verwendung von  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$  und Morpholin als Nukleophil. Zur Überprüfung der Entschützung bzw. der

Reaktion wurde ein Teil des Harz-immobilisierten zweifach *tert.*butyl-geschützten PSMA-Bindemotivs durch Inkubation in einer 1 % TFA-Lösung in Dichlormethan abgespalten und ein Aliquot per Massenspektrometrie untersucht. Dabei wurde ein Kation der Masse  $[M + H]^+ = 432.3 \text{ m/z}$  identifiziert, welche dem zweifach *tert.*Butyl-geschützten Harnstoffderivat entspricht. Das Harz wurde danach für die Einführung unterschiedlicher Spacer mittels Folgereaktionen mit Fmoc-geschützten Aminosäurederivaten verwendet (Abb. 22).



**Abbildung 22** Allgemeine Syntheseroute der in dieser Arbeit entwickelten BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7** und **8**.

Für die Darstellung der BODIPY-PSMA-Biokonjugate wurde eine Kombination aus Festphasensynthese und Kopplung in Lösung gewählt. Für die Synthese PSMA-spezifischer Radiotracer mittels Festphasensynthese erfolgt im letzten Schritt der Syntheseroute die Abspaltung vom Harz sowie die Hydrolyse der *tert.*Butylester, unter stark sauren Reaktionsbedingungen. Studien von Romyantsev *et al.* zeigten allerdings, dass es bei BODIPY-Farbstoffen in stark sauren Medien zu einer partiellen Abspaltung der BF<sub>2</sub>-Gruppe des BODIPY-Grundgerüsts kommen kann<sup>136</sup>. Es führt zur Löschung der Fluoreszenz und eine Radiomarkierung mittels <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausches kann ebenfalls nicht mehr durchgeführt werden.

Folglich erfolgte die Kopplung der verschiedenen Fmoc-geschützten Linker mittels Festphasensynthese und die finale Konjugation der BODIPY-Carbonsäure **1** in Lösung. Die Kopplungsreaktionen der Fmoc-geschützten Linker erfolgten in Analogie zu den Arbeiten von Eder *et al.* mit *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorphosphat (HATU) als Kopplungsreagenz. Für die Erstellung einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung neuartiger PSMA-Konjugate wurden vier unterschiedliche Linker/Spacer zwischen PSMA-Bindemotiv und Fluorophor hergestellt. Um einen Einblick über den optimalen Abstand zwischen der Glu-CO-Lys-Einheit und dem BODIPY-Farbstoff **1** zu erhalten, wurden entweder kein Spacer, ein oder zwei 6-Aminohexansäurereste (Ahx) eingeführt. Für das vierte Derivat wurde der 2-Naphthylalanin-aminomethylcyclohexylsäure (2-Nal-Amc) Spacer in Analogie zu PSMA-617 verwendet.

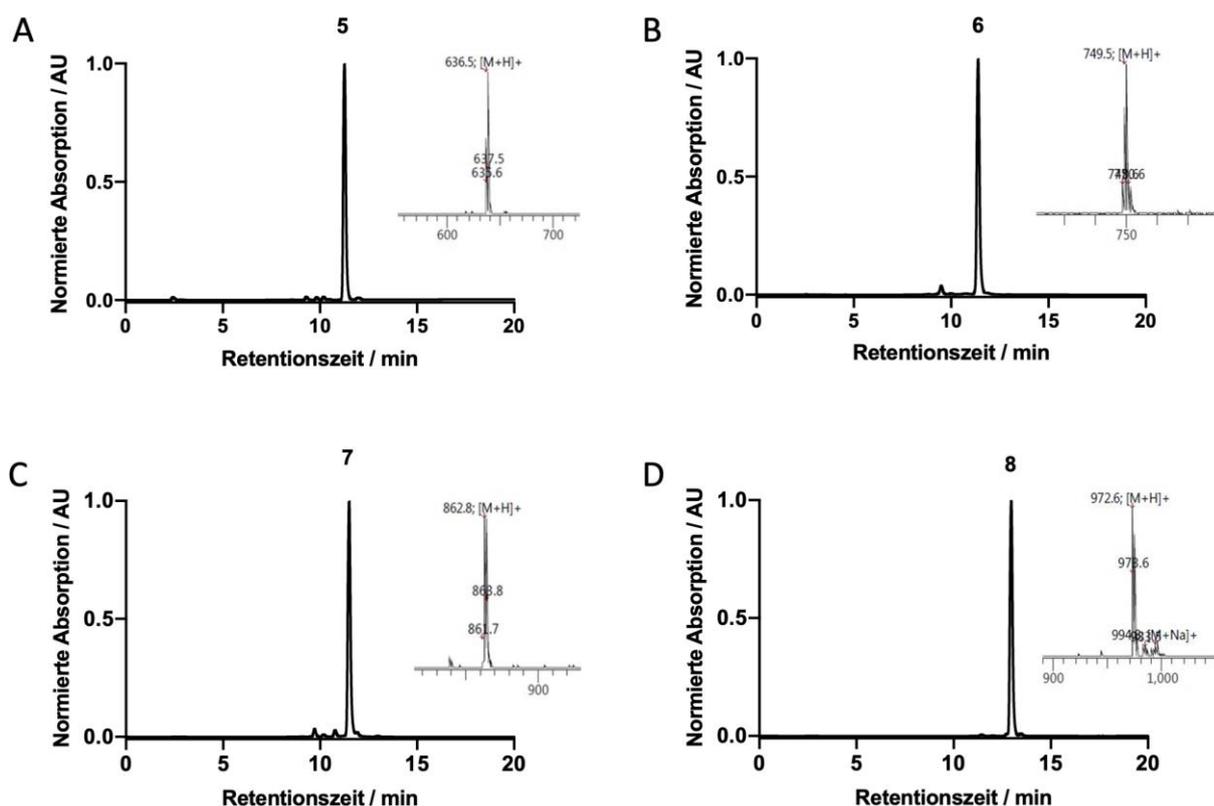
Nach der Linker-Konjugation erfolgte die Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin. Danach wurden die verschiedenen Harze zur Abspaltung und Hydrolyse der tert.-Butylester mit einem Cocktail aus TFA:Triisopropylsilan:H<sub>2</sub>O (95: 2.5: 2.5, % v/v) für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und die peptidomimetischen Vorstufen der BODIPY-PSMA-Liganden Glu-CO-Lys, **2**, **3** und **4** mittels Diethylether ausgefällt. Das Lösungsmittel wurde anschließend dekantiert und die Reinheit der Zwischenstufen massenspektrometrisch bestimmt. Für alle Zwischenstufen wurde dabei eine ausreichende Reinheit für die BODIPY-Konjugation in Lösung beobachtet (Tabelle 3).

**Tabelle 3** Massenspektrometrische Überprüfung der peptidomimetischen BODIPY-PSMA-Vorstufen mit unterschiedlichen Spacern.

| Verbindung                    | LR-ESI-MS m/z für [M + H] <sup>+</sup> |
|-------------------------------|--|
| Glu-CO-Lys                    | Ber.: 320.1, Gef.: 320.2               |
| Glu-CO-Lys-Ahx <b>2</b>       | Ber.: 433.2, Gef.: 433.3               |
| Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx <b>3</b>   | Ber.: 546.3, Gef.: 546.6               |
| Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc <b>4</b> | Ber.: 656.3, Gef.: 656.5               |

Für die Synthese der BODIPY-PSMA-Biokonjugate wurde danach in einem typischen Reaktionsschritt BODIPY-Carbonsäure **1** in DMF vorgelegt und die Carbonsäurefunktion mit HATU/DIPEA aktiviert. Besonders wichtig war dabei, dass im Gegensatz zur Festphasensynthese kein Überschuss an HATU/DIPEA zugegeben wurde, da Nebenreaktionen

der freien Glutaminsäure- bzw. Lysin-Carbonsäuregruppen von Glu-CO-Lys, **2**, **3** oder **4** durch eine Aktivierung mit einem HATU-Überschuss erwartet wurden. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die aktivierte BODIPY-Carbonsäure **1** zu den Zwischenstufen Glu-CO-Lys, **2**, **3** bzw. **4** gegeben und die Reaktionsmischung für zwei weitere Stunden bei dieser Temperatur inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion durch die Zugabe von Wasser wurde eine Aufreinigung der Konjugate mittels semipräparativer HPLC durchgeführt. Die Biokonjugate wurden anschließend, ausgehend von der eingesetzten Stoffmenge der Vorläufer Glu-CO-Lys, **2**, **3** sowie **4**, in Ausbeuten von 37 – 44 % isoliert. Die Charakterisierung der Konjugate Glu-CO-Lys-BODIPY **5**, Glu-CO-Lys-Ahx-BODIPY **6**, Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx-BODIPY **7** und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-BODIPY **8** erfolgte per Massenspektrometrie, analytischer RP-HPLC und NMR-Spektroskopie (Tabelle 4). Die entsprechenden HPLC-Chromatogramme mit den dazugehörigen Massenspektren sind in Abb. 23 aufgeführt. Die Retentionszeiten der Liganden Glu-CO-Lys-BODIPY **5**, Glu-CO-Lys-Ahx-BODIPY **6**, Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx-BODIPY **7** und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-BODIPY **8** stiegen dabei mit zunehmender Spacerlänge bzw. mit steigender Lipophilie erwartungsgemäß an.



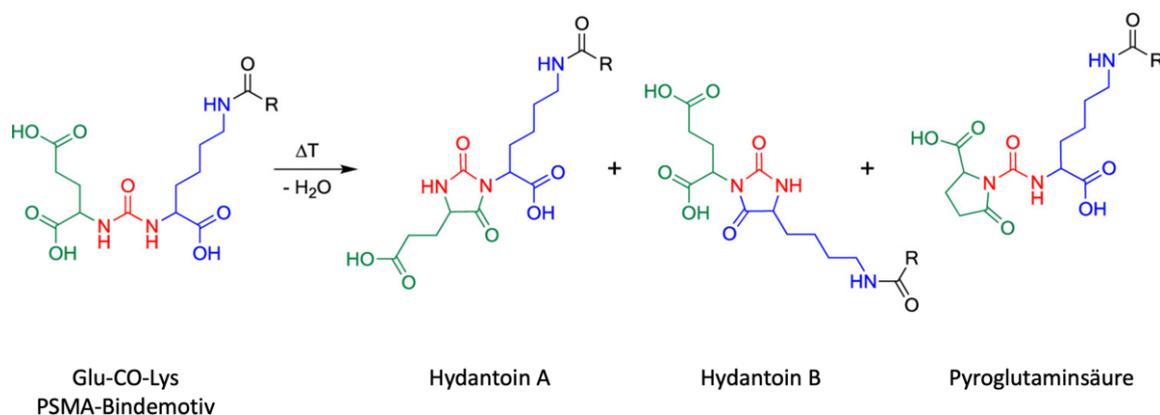
**Abbildung 23** Analytische HPLC-Chromatogramme der BODIPY-PSMA-Liganden bei einer Wellenlänge von 490 nm, Eingesetzt: LR-ESI-(+)-Spektren der jeweiligen Liganden. A) **5**, B) **6**, C) **7**, D) **8**.

**Tabelle 4** MS-Charakterisierung, HPLC-Retentionszeiten und Ausbeuten der BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7** und **8**.

| Verbindung | LR-ESI-MS m/z für       | Retentionszeit analytische | Ausbeute |
|------------|-------------------------|----------------------------|----------|
|            | [M + H] <sup>+</sup>    | HPLC                       |          |
| <b>5</b>   | Ber.: 636.3 Gef.: 636.5 | 11.26 min                  | 38 %     |
| <b>6</b>   | Ber.: 749.4 Gef.: 749.7 | 11.39 min                  | 39 %     |
| <b>7</b>   | Ber.: 862.5 Gef.: 862.8 | 11.50 min                  | 37 %     |
| <b>8</b>   | Ber.: 972.5 Gef.: 972.6 | 12.96 min                  | 44 %     |

Auch die <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigten alle erwarteten Signale. Im <sup>19</sup>F-NMR der Liganden **5**, **6**, **7**, und **8** wurde zudem das charakteristische Signal der beiden Fluoratome bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = -148$  ppm gefunden. Es konnte somit gezeigt werden, dass die BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7**, und **8** über eine kombinierte Syntheseroute aus Festphasensynthese und lösungsbasierter Kopplung von **1** unter basischen Bedingungen erfolgreich hergestellt wurden.

Obwohl die finalen Biokonjugate **5**, **6**, **7**, und **8** über die beschriebene kombinierte Syntheseroute in hoher Reinheit isoliert werden konnten, wurden dennoch zwei Nachteile festgestellt. Zum einen wurde während der semipräparativen Aufreinigung Bildung von Nebenprodukten beobachtet und zum anderen wurden die Liganden in niedrigen Ausbeuten erhalten. Als Hauptverunreinigungen wurden dabei die BF<sub>2</sub>-freien- Liganden identifiziert. Daneben wurden Nebenprodukte der Literatur bekannten intramolekularen Kondensationsreaktion des PSMA-Bindemotivs gefunden<sup>137</sup>. Hierbei reagiert jeweils eine der Carbonsäuren mit der Harnstoffgruppe unter Wasserabspaltung, was zur Bildung von energetisch bevorzugten Fünfringen führt (Abb. 24).

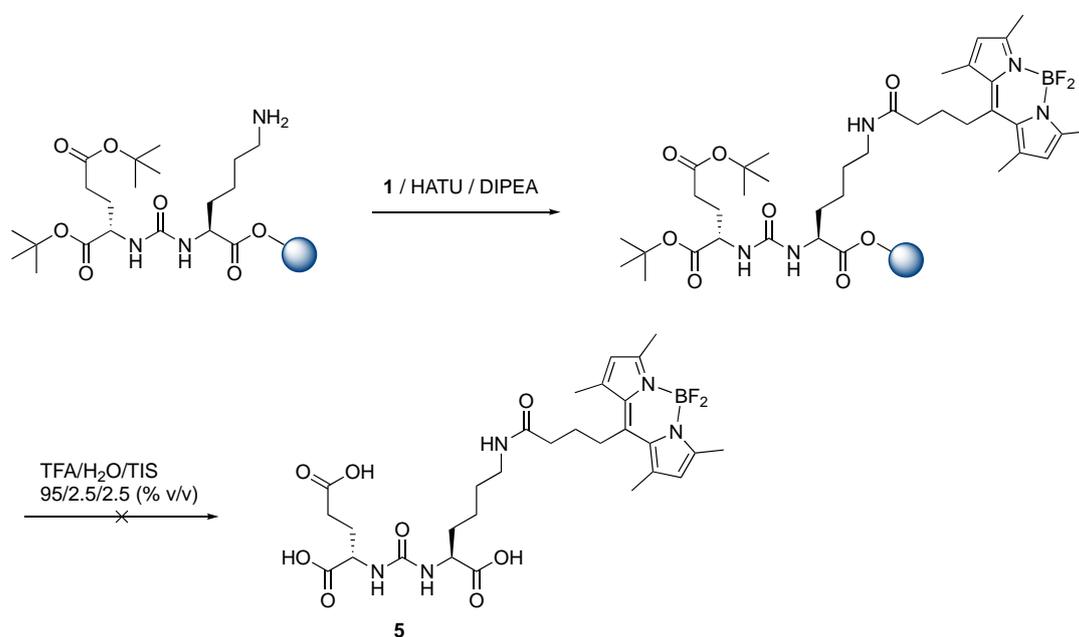


**Abbildung 24** Thermisch induzierte Bildung von Zyklisierungsprodukten des PSMA-Bindemotivs durch eine intramolekulare Kondensationsreaktion. Ausgehend von Glu-CO-Lys werden zyklisierte Produkte aufgebaut aus Hydantoin A, Hydantoin B und Pyroglutaminsäure gebildet.

Obwohl diese drei unterschiedlichen Zyklisierungsprodukte bevorzugt bei erhöhten Temperaturen entstehen, wurden während der semipräparativen Aufreinigung der Biokonjugate **5**, **6**, **7**, und **8** verschiedene Fraktionen isoliert, die in massenspektrometrischen Untersuchungen eine Massendifferenz von  $m/z = -18$  zeigten, was auf die obigen Kondensationsreaktionen hinwies. Auch die Bildung von verschiedenen Nebenprodukten aufgrund einer möglichen Aktivierung der freien Carbonsäuren des PSMA-Bindemotivs durch HATU, trotz der äquimolar eingesetzten Stoffmenge, konnte nicht ausgeschlossen werden<sup>138</sup>.

Die Bildung von Nebenprodukten und die damit verbundene geringe Ausbeute der Biokonjugate gab Anlass eine zweite alternative Syntheseroute auf Basis der

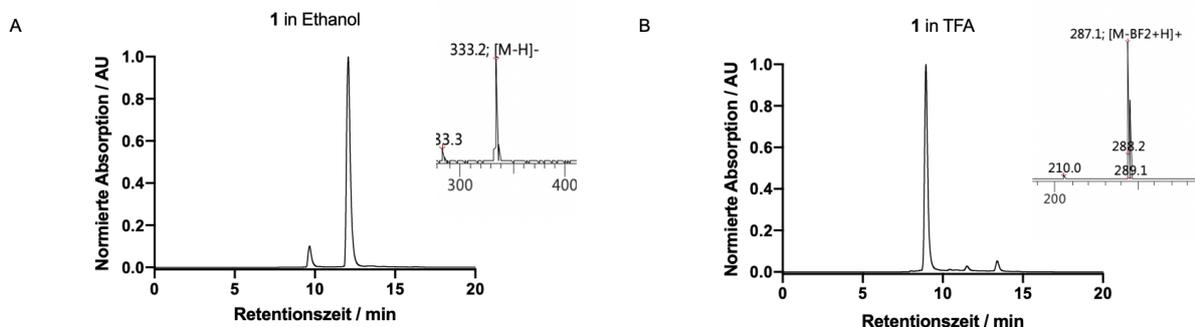
Festphasensynthese zu untersuchen. Eine harzbasierte Syntheseroute würde dabei die Bildung von zyklisierten bzw. HATU-basierten Nebenprodukten verhindern. Zwar zeigten Studien von Rumyantsev *et al.*, eine  $\text{BF}_2$ -Abspaltung des BODIPY-Grundgerüsts im sauren Medium<sup>136</sup>, die Zersetzung des Farbstoffs wurde unter diesen Bedingungen im Rahmen der Festphasensynthese jedoch nach aktuellem Wissensstand noch nicht beschrieben. Auch für die verwendete BODIPY-Carbonsäure **1** wurden bis dato keine Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Durch die Festphasensynthese könnte die Bildung der beobachteten Nebenprodukte unter Umständen minimiert werden. Die Darstellung der Liganden mittels Festphasensynthese wurde zunächst am strukturell einfachsten Liganden Glu-CO-Lys-BODIPY **5** untersucht (Abb. 25).



**Abbildung 25** Versuche zur Darstellung des BODIPY-PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-BODIPY **5** mittels Festphasensynthese.

Nach Aufarbeitung und Entfernung des Überschusses der BODIPY/HATU Mischung, wurde eine Testabspaltung mit 1 % TFA in Dichlormethan durchgeführt und anschließend die Probe mittels MS untersucht. Im LR-ESI-(+)-Spektrum konnte der zweifach tert. Butyl-geschützte Ligand **5** identifiziert werden. Es folgte die Abspaltung und gleichzeitige Entschützung durch Inkubation mit TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ /TIS (95/2.5/2.5 % v/v). Die massenspektrometrische Untersuchung der Reaktionsmischung zeigte die Bildung des  $\text{BF}_2$ -freien Liganden **5-BF<sub>2</sub>** mit einem berechneten Kation der Masse  $[\text{M} + \text{H} - \text{BF}_2]^+ = 588.0 \text{ m/z}$ . Das intakte Produkt **5** konnte unter diesen Bedingungen nicht identifiziert werden. Aufgrund der beobachteten Instabilität des BODIPY Chromophors und der Abspaltung von Bordifluorid während der tert. Butylester-

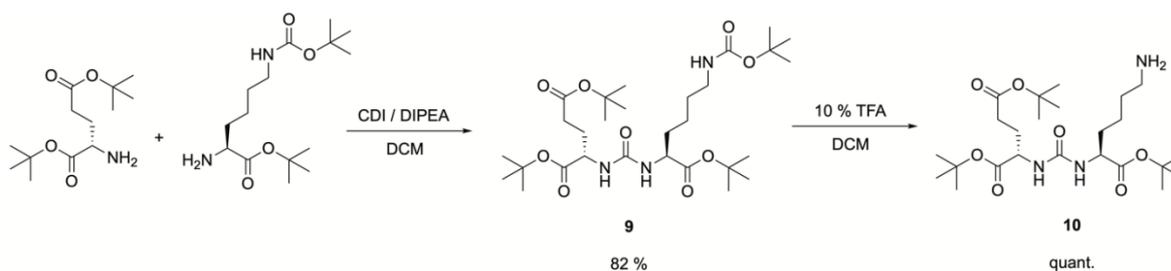
Entschützung wurde die Zersetzung des BODIPY-Farbstoffes **1** genauer untersucht. Dazu wurde BODIPY **1** in 100 %iger TFA inkubiert und den Reaktionsverlauf per MS und analytischer HPLC überprüft (Abb. 26).



**Abbildung 26** A). Analytisches HPLC-Chromatogramm bei  $\lambda = 490$  nm von **1** in EtOH, eingesetzt: LR-ESI(-)-Spektrum von **1**. B). Analytisches HPLC-Chromatogramm von **1** nach Inkubation in TFA für 2 h, eingesetzt: LR-ESI(+)-Spektrum von **1**.

Wie aus Abb. 26 ersichtlich wird, war eine Änderung der Retentionszeit von **1** nach Inkubation in 100 % TFA für 2 h ersichtlich. In Ethanol zeigte das HPLC-Chromatogramm einen Peak bei 12.1 min, der der Carbonsäure **1** entspricht. Zusätzlich war zu einem geringen Anteil ein Nebenprodukt bei 8.94 min zu erkennen, welches nach der Inkubation in 100 % TFA die Hauptfraktion darstellte. Das Nebenprodukt wurde anschließend per MS charakterisiert. Es zeigte sich dabei ein Massenunterschied von  $m/z = -48$  im Vergleich zur Masse von **1** ( $m/z = 333.2$ ), was den Verlust der  $\text{BF}_2$ -Einheit bestätigte (Abbildung 26). Der intakte Farbstoff **1** wurde nach der Inkubation in TFA nicht mehr detektiert. Die Zersetzung des Farbstoffes **1** in saurem Medium wurde zum Anlass genommen, die Stabilität der BODIPY-Carbonsäure genauer zu untersuchen (Kap. 3.1.5, vide infra).

Parallel zur Ligandensynthese unter den Bedingungen der Festphasensynthese wurde auch eine lösungsbasierte Syntheseroute für die Biokonjugate untersucht, um eventuell höhere Ausbeuten zu erhalten. Diese startete mit der Darstellung des PSMA-Bindemotivs Glu-CO-Lys, ausgehend von den geschützten Aminosäurederivaten L-Glutaminsäure-di-*tert.*-butylester und N- $\epsilon$ -BOC-L-Lysin-O-*tert.*-butylester (Abb. 27).



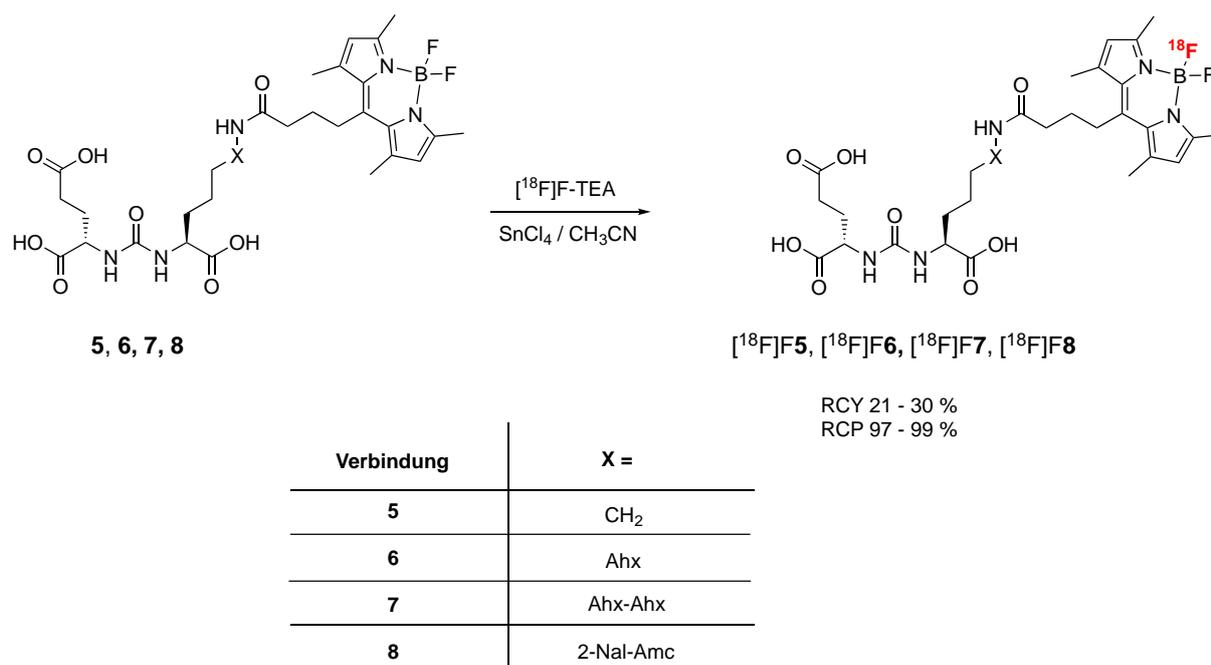
**Abbildung 27** Synthese des geschützten PSMA-Bindemotivs **9** und der dazugehörigen BOC-entschützten Zwischenstufe **10** in Lösung.

In Analogie zur Festphasensynthese erfolgte auch hier zunächst die Knüpfung der Harnstoffbindung zwischen den geschützten Aminosäuren unter Verwendung von CDI als Kopplungsreagenz. Die beiden Aminosäuren wurden für die Knüpfung in Lösung in äquimolaren Stoffmengen eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h und anschließender säulenchromatographischer Reinigung wurde das BOC- und *tert.*-Butylester geschützte PSMA-Bindemotiv **9** in einer guten Ausbeute von 82 % isoliert. Die Wahl der *tert.*-Butylester und BOC-Schutzgruppe hat dabei zwei wichtige Vorteile. Beide Schutzgruppen sind säurelabil, während die Harnstoff-Funktion unter den Entschützungsbedingungen stabil ist. Die Entschützung der BOC-Schutzgruppe erfolgte unter Verwendung einer 10 %igen Trifluoressigsäurelösung in Dichlormethan. Die vollständige Abspaltung der BOC-Schutzgruppe erfolgte nach 15 Minuten, während die *tert.*-Butylester geschützten Carbonsäuren von **9** intakt blieben. Die Ausgangsverbindung **10** wurde ohne Aufarbeitungsschritte in quantitativer Ausbeute als TFA-Salz isoliert. Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen von **9** und **10** zeigten alle erwarteten charakteristischen Signale.

Aufgrund der zwischenzeitlichen Beobachtungen bei der Festphasensynthese und den Ergebnissen der HPLC-Untersuchungen von **1** wurde dieser Syntheseweg nicht weiterverfolgt. Zwar könnte diese Syntheseroute zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute der Vorstufen führen, die Entschützung der *tert.*-Butylester im finalen Schritt könnte analog zur Festphasensynthese allerdings auch zu einer säureinduzierten Abspaltung von BF<sub>2</sub> des Farbstoffes führen.

### 3.1.2 Radiomarkierung der BODIPY-PSMA-Liganden mittels $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch

Die  $^{18}\text{F}$ -Radiomarkierungen der BODIPY-PSMA-Konjugate erfolgten mittels  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch, wobei ein  $^{19}\text{F}$ -Atom der  $\text{BF}_2$ -Einheit des BODIPY-Farbstoffes durch die Reaktion mit  $^{18}\text{F}$ -TEA (Tetraethylammoniumfluorid) unter Zugabe von Zinn(IV)chlorid als Lewis-Säure gegen ein  $^{18}\text{F}$ -Atom ausgetauscht wurde. Die Aufreinigung der radiomarkierten Produkte erfolgte über eine  $\text{C}_{18}$ -Sep Pak Kartusche (Waters, USA). Diese Kartuschen werden häufig für die Aufreinigung von Radioliganden verwendet. Für eine typische  $^{18}\text{F}$ -Markierung wurden in Analogie zu den Arbeiten von Liu *et al.* 0.37  $\mu\text{mol}$  des BODIPY-PSMA-Liganden mit  $\text{SnCl}_4$  und  $^{18}\text{F}$ -TEA umgesetzt<sup>77,132</sup>. Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur und anschließender Aufreinigung mittels  $\text{C}_{18}$ -Kartusche wurden alle  $^{18}\text{F}$ -markierten Liganden in hohen radiochemischen Reinheiten (*radiochemical purity*, RCP) von 97-99 % und moderaten radiochemischen Ausbeuten (*radiochemical yield*, RCY) von 21–30 % isoliert (Abb. 28).



**Abbildung 28** Radiomarkierung der BODIPY-PSMA-Liganden via  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch.

Im ersten Schritt des  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch wurde zunächst das radioaktive Fluor-18-Anion aufgearbeitet, welches nach seiner Produktion an einem Zyklotron in einer, mit  $^{18}\text{O}$ - $\text{H}_2\text{O}$  angereicherten, wässrigen Lösung vorliegt. Die Aufarbeitung erfolgte unter Verwendung einer Anionentauscher-Kartusche (Waters Accel Plus QMA Cartridge Light).  $^{18}\text{F}$ -Fluorid wurde zunächst auf der Kartusche adsorbiert und von der wässrigen Lösung

separiert. Das Fluoridanion wurde durch die Separation von Wasser für die Trocknung mittels azeotroper Destillation vorbereitet. Tetraethylammoniumbicarbonat (TEAB) wurde für die Elution verwendet. Dabei wird das auf der Kartusche retardierte  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  durch das Bicarbonat-Anion eluiert. Wichtig für den Isotopenaustausch ist, dass  $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$  bzw.  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  vollständig getrocknet wird. In Anwesenheit von Wasser wird das Fluoridanion von einer Hydrathülle umgeben, wodurch die Nukleophilie verloren geht und der Isotopenaustausch nicht ablaufen kann. Zur vollständigen Elution der QMA-Kartusche erfolgte danach ein weiterer Spülschritt mit trockenem Acetonitril. Die besten Ausbeuten wurden dabei unter Verwendung eines Acetonitril:Wasser Gemisches (95:5, % v/v), gefolgt von einem Spülschritt mit 100 % Acetonitril erzielt. Bezogen auf die eingesetzte QMA-adsorbierte Startaktivität konnten so Elutionsausbeuten von 97-99 % erzielt werden. Die Verwendung anderer Gemische bzw. von 100 % Acetonitril führte zu einer unvollständigen Elution (Tabelle 5)<sup>139</sup>.

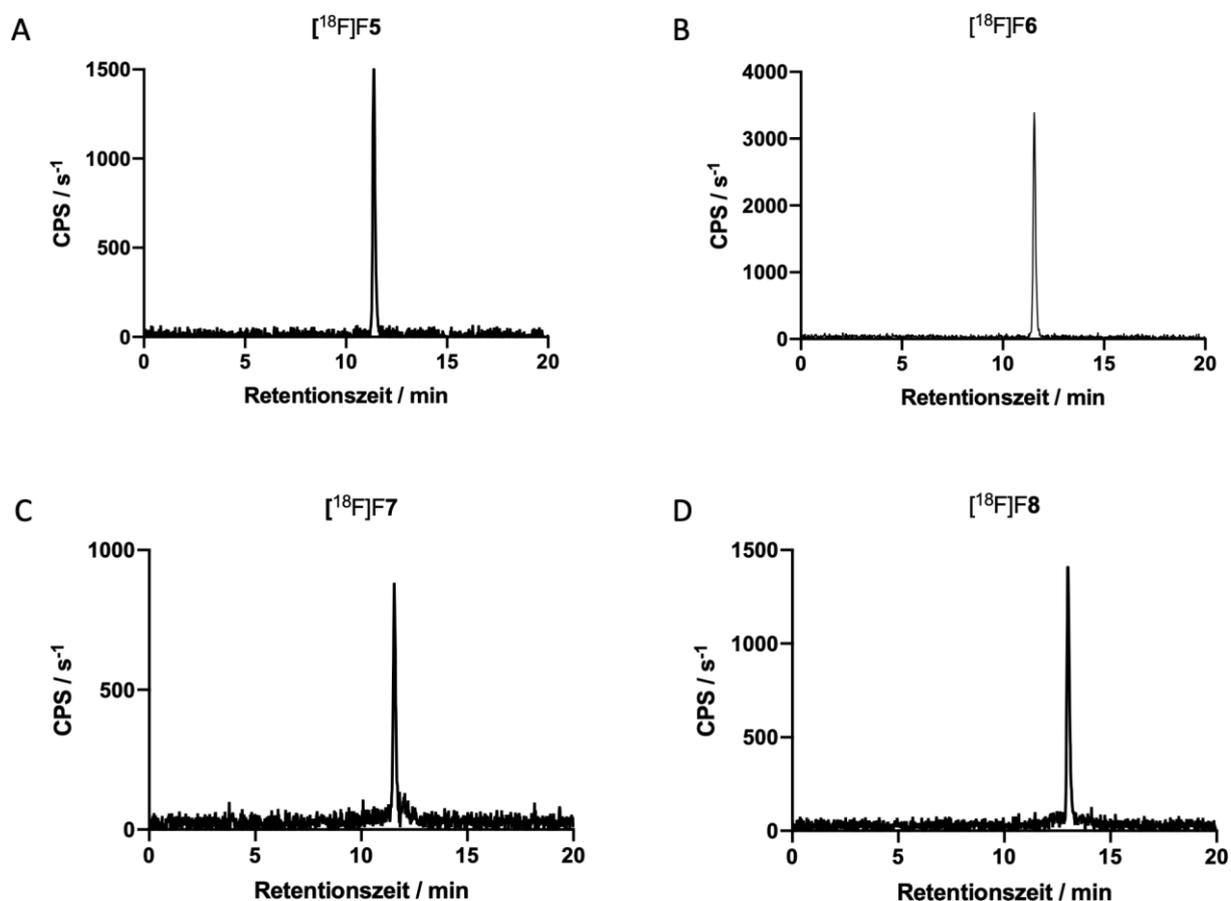
**Tabelle 5** Ausbeuten von  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  nach Aufreinigung der eingesetzten QMA-adsorbierten Startaktivität an F-18.

| Startaktivität QMA | MeCN:H <sub>2</sub> O-Gemisch / % | Eluierte Aktivität<br>$[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$ | Elutionsausbeute<br>/ % |
|--------------------|-----------------------------------|---|-------------------------|
|                    | v/v                               |   |                         |
| 5,2 GBq            | 50:50                             | 2,6 GBq   | 50                      |
| 5,9 GBq            | 70:30                             | 4,5 GBq   | 76                      |
| 5,5 GBq            | 80:20                             | 4.1 GBq   | 75                      |
| 5,2 GBq            | 90:10                             | 4,7 GBq   | 90                      |
| 5,2 GBq            | 95:5                              | 5,1 GBq   | 99                      |
| 5,7 GBq            | 100:0                             | 2,7 GBq   | 48                      |

Die Trocknung von  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  wurde nach Elution über eine mehrmalige azeotrope Destillation mit einem kleinen Volumen an trockenem Acetonitril unter einem Argonstrom durchgeführt. Anschließend wurde das getrocknete  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  in trockenem Acetonitril aufgenommen (Volumenaktivität  $\sim 2$  GBq/mL) und die benötigte Aktivität für den Isotopenaustausch entnommen. Ausgehend von der eingesetzten Startaktivität an  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  wurden für die finale Durchführung des  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch nach erfolgter azeotroper Trocknung 40 – 50 % (zerfallskorrigiert) der Aktivität an  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  erhalten. Kleinere Ausbeuteverluste können durch die manuelle Durchführung der azeotropen Destillation erklärt werden.

Ein wichtiger Parameter für den Isotopenaustausch war der molare Überschuss an  $\text{SnCl}_4$ . Eine verlässliche Radiomarkierung wurde erst ab 100 äq.  $\text{SnCl}_4$  erzielt. Geringere Äquivalente führten zu radiochemischen Ausbeuten von  $< 5\%$ . Die Erhöhung der Stoffmenge führte zu einer Steigerung der Markierungsausbeute auf 21-30 %<sup>77</sup>. Die größten radiochemischen Ausbeuten wurden mit einem  $\text{SnCl}_4$ -Überschuss von 200 Äquivalenten und einer Ligand-Stoffmenge von 0.37  $\mu\text{mol}$  erzielt. Die eingesetzte Aktivität an  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  lag typischerweise im Bereich von 500 – 800 MBq.

Im nächsten Schritt wurde eine Aufreinigungsmethode etabliert, um nicht umgesetztes  $[^{18}\text{F}]\text{F-TEA}$  sowie anfallende Nebenprodukte, anorganische Salze sowie (toxische) Acetonitrilreste zu entfernen und somit eine ausreichende radiochemische Reinheit für die *in vitro/in vivo* Evaluation zu gewährleisten. Die Aufreinigung erfolgte über eine  $\text{C}_{18}$ -SepPak Kartusche. Der (lipophile) Radioligand wird dabei von den  $\text{C}_{18}$ -Ketten der Kartusche adsorbiert, während ungebundene Aktivität sowie Puffersalze durch Waschen, i.d.R. Wasser oder 0.9 %ige NaCl-Lösung, abgetrennt werden können. Das Produkt wird nach den Waschschritten mit einem geeigneten Elutionsmittel, wie z.B. wässriges Ethanol, von der  $\text{C}_{18}$ -Kartusche eluiert. Im Falle eines  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch der Liganden **5**, **6**, **7**, und **8** unter Verwendung großer molarer Überschüsse an  $\text{SnCl}_4$  führt die Beendigung der Reaktion mit Wasser zur Bildung von verschiedenen Zinnoxiden. Die Zinnoxide vom Typ  $\text{SnO}_x$  sind allerdings schwer bzw. unlöslich und machen eine verlässliche  $\text{C}_{18}$ -Kartuschenaufreinigung aufgrund der unlöslichen Hydroxide unmöglich. Durch Zugabe einer 0.1 M NaOH-Lösung zur wässrigen Radiomarkierungslösung konnten die unlöslichen  $\text{SnO}_x$ -Salze allerdings aufgelöst werden und so über die  $\text{C}_{18}$ -Kartusche abgetrennt werden. Anschließendes Spülen der Kartusche mit Wasser, gefolgt von 50% Ethanol, führte dann zu einer Produktelution mit einer RCP von  $>99\%$  für  $[^{18}\text{F}]\text{F5}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F7}$  und  $[^{18}\text{F}]\text{F8}$  und moderaten radiochemischen Ausbeuten. Die Ergebnisse der Radio-HPLC der Liganden  $[^{18}\text{F}]\text{F5}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F7}$  und  $[^{18}\text{F}]\text{F8}$  nach erfolgter  $\text{C}_{18}$ -Aufreinigung sind Abb. 29 dargestellt.



**Abbildung 29** Radio-HPLC Chromatogramme der radiomarkierten PSMA-Liganden nach erfolgter C<sub>18</sub>-Aufreinigung A) [<sup>18</sup>F]F5, B) [<sup>18</sup>F]F6, C) [<sup>18</sup>F]F7, D) [<sup>18</sup>F]F8.

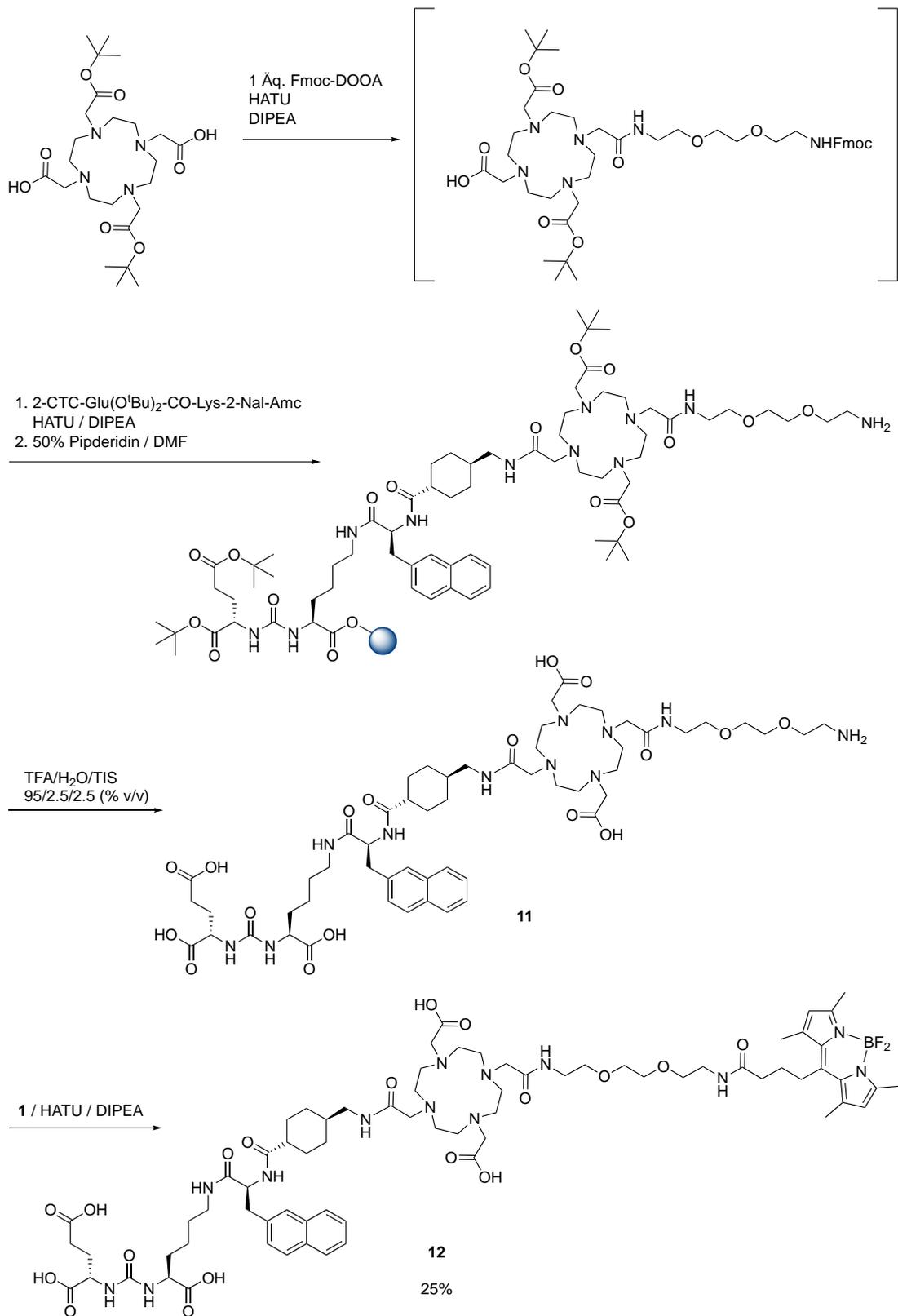
Für die BODIPY-PSMA-Liganden wurden mittels <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausch moderate molare Aktivitäten von 0.7 MBq/nmol erreicht, die für eine *in vitro* Evaluation ausreichend waren. Ähnliche Werte wurden auch in den Studien von Liu *et al.* für BODIPY-RGD-Peptide beobachtet<sup>132</sup>. In Analogie zu Liu *et al.*, wurden Variationen der Reaktionsparameter des Isotopenaustauschs, bspw. eine Erhöhung der Stoffmenge an Lewis-Säure sowie der Reaktionstemperatur, durchgeführt. Eine Steigerung der molaren Aktivität wurde in diesen Experimenten jedoch nicht beobachtet.

### 3.1.3 Synthese und Radiomarkierung eines potentiellen radiohybriden BODIPY-PSMA-Liganden

#### 3.1.3.1 Synthese von Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-BODIPY 12

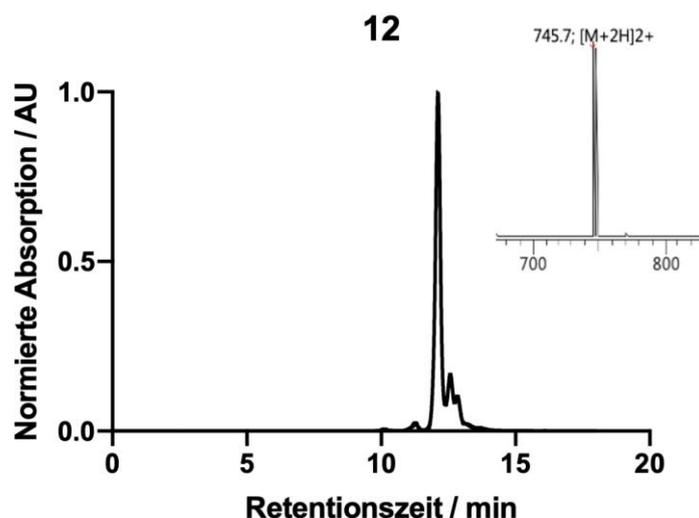
Nach erfolgreicher Synthese und Charakterisierung der ersten Serie an Liganden mittels kombinierter Syntheseroute wurde sich zudem mit der Darstellung eines potentiellen radiohybriden BODIPY-PSMA-Liganden beschäftigt, der zusätzlich zur dualen Funktionalität des BODIPY-Fluorophors noch mit dem Metallchelator DOTA versehen ist. Dieser eröffnet die Möglichkeit einer Markierung mit metallischen Radionukliden und kann in Kombination mit der  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch des Fluorophors potentiell auch als Radiohybrid eingesetzt werden. Somit würde dieser BODIPY-PSMA-Ligand sowohl in der Endoradiotherapie mittels Ac-225/Lu-177 als auch zur PET/CT-Bildgebung mittels F-18 bei identischer Summenformel ermöglichen. Hierzu wurde die Carbonsäure **1** über einen PEG-Spacer an den klinisch eingesetzten Radiotracer PSMA-617 gekoppelt.

Für die Synthese des PSMA-Liganden **12** wurde aufgrund der Labilität des Farbstoffes gegenüber sauren Reaktionsbedingungen (Kap. 3.1.1) ebenfalls eine kombinierte Syntheseroute aus Festphase und Lösung gewählt (Abb. 30)<sup>108,109,140</sup>. Die Synthese des Liganden startete ausgehend von dem kommerziell erhältlichen, zweifach *trans*-geschützten DOTA-di-*tert*.butylester.



**Abbildung 30** Syntheseroute des BODIPY-PSMA-Liganden **12** basierend auf PSMA-617.

Zunächst wurde DOTA-*trans*-di-*tert*.butylester mit einem Äquivalent Fmoc-1-Amino-3,6-dioxa-8-octanamin (Fmoc-DOOA) unter Zugabe von HATU/DIPEA umgesetzt. Als Hauptprodukt dieser Reaktion wurde die Bildung eines einfach konjugierten Amids (DOTA-di-*tert*.butylester-Fmoc-DOOA) beobachtet. Als Nebenprodukt bildete sich das entsprechende zweifache konjugierte Amid zu ca. 5 %. Nach vollständigem Eduktumsatz wurde die freie Carbonsäurefunktion der Zwischenstufe erneut mit HATU/DIPEA aktiviert und mit 0.25 Äquivalenten an 2-Chlorotriityl-immobilisiertem, geschütztem Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc umgesetzt. Das Nebenprodukt aus der vorangegangenen Reaktion DOTA(Fmoc-DOOA)<sub>2</sub> war unter diesen Bedingungen unreaktiv und konnte nach Beendigung der Reaktion zwischen dem Harz und DOTA-Fmoc-DOOA durch mehrfaches Waschen leicht entfernt werden. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe mittels 50 % Piperidin erfolgte die Harzabspaltung und *tert*-Butylester Entschützung mittels eines TFA/H<sub>2</sub>O/TIS Cocktails gemäß der Synthese-Route der BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7** und **8**. Der Vorläufer **11** wurde anschließend als TFA-Salz mittels Fällungsreaktion isoliert und mit **1**, HATU und DIPEA zu Ligand **12** umgesetzt. Der BODIPY-PSMA-Ligand **12** wurde, bezogen auf **11**, in einer Ausbeute von 25 % isoliert. Die Charakterisierung erfolgte mittels Massenspektrometrie und analytischer HPLC. Bei der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm drei Peaks gemessen. Der Hauptpeak bei  $t_R = 11.58$  min wurde eingesammelt und mittels Massenspektroskopie charakterisiert. Das gemessene LR-ESI-(+)-Spektrum zeigte dabei das erwartete  $m/z$  für  $[M + 2H]^{2+} = 745.7$  (Abb. 31).



**Abbildung 31** HPLC-Chromatogramm des BODIPY-PSMA-Liganden **12**, Eingesetzt: LR-ESI-(+)-Spektrum des Peaks bei einer Retentionszeit von  $t_R = 11.58$  min, der **12** entspricht.

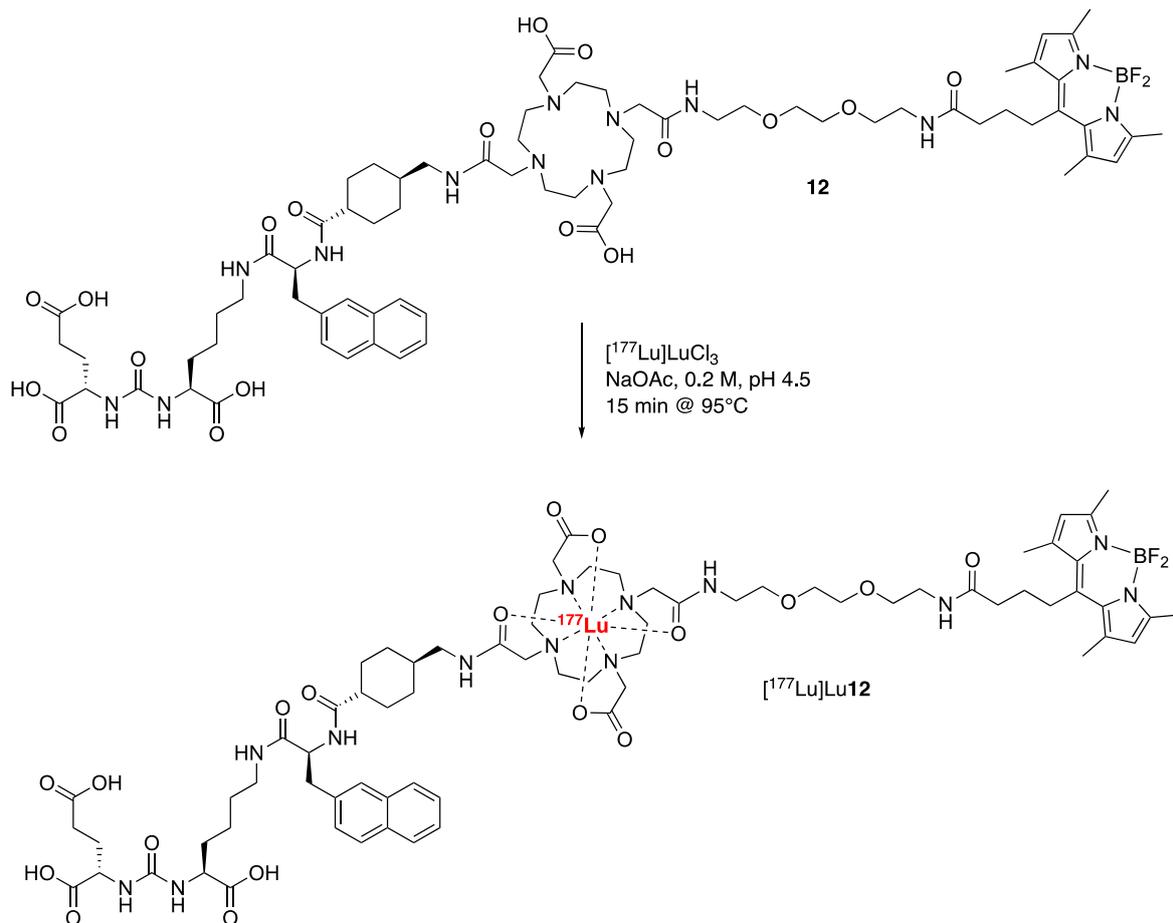
**Tabelle 6** Massenspektrometrische Charakterisierung und die HPLC-Retentionszeit des potentiellen radiohybriden PSMA-Ligand **12**.

| Verbindung | LR-ESI-MS m/z für       | Retentionszeit analytische |
|------------|-------------------------|----------------------------|
|            | $[M+2H]^{2+}$           | HPLC                       |
| <b>12</b>  | Ber.: 745.3 Gef.: 745.7 | 11.58 min                  |

### 3.1.3.2 $^{18}\text{F}$ - und $^{177}\text{Lu}$ -Markierung des potentiellen radiohybriden PSMA-Liganden **12**

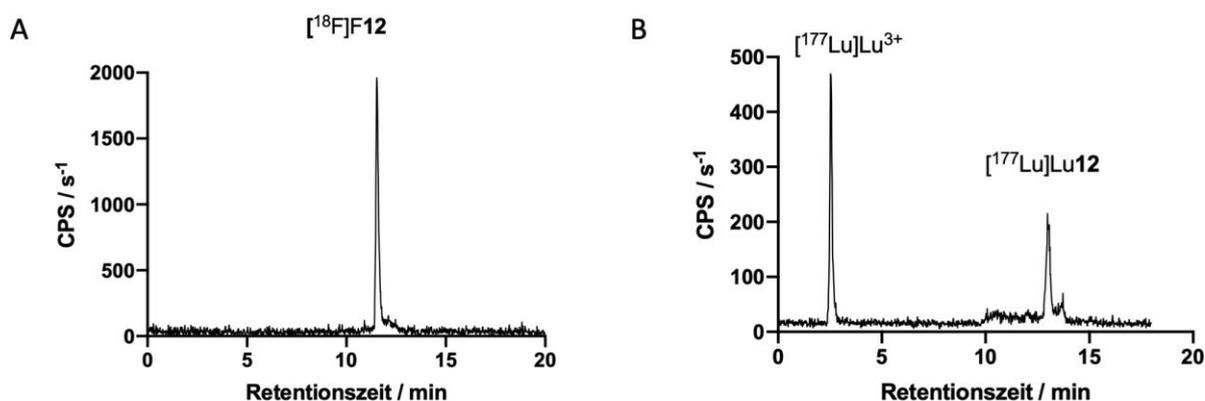
Radiohybride PSMA-Liganden sind durch die Möglichkeit charakterisiert, mit zwei unterschiedlichen Radionukliden bei identischer Summenformel markiert werden zu können. Auch das Konjugat **12** kann aufgrund des BODIPY-Farbstoffes und dem Metallkomplexbildner DOTA sowohl mit F-18 für die PET-Diagnostik als auch mit therapeutischen Radiometallen, wie z.B. Lu-177 oder Ac-225, markiert werden.

Die Radiomarkierung des BODIPY-PSMA-Liganden **12** mit F-18 erfolgte über einen  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch gemäß Kap. 3.1.2. Das entsprechende Radiochromatogramm nach  $\text{C}_{18}$ -Aufreinigung ist in Abb. 33 A gegeben. Das  $^{18}\text{F}$ -markierte Produkt eluierte bei einer Retentionszeit von 11.53 min mit einer RCP von 97 %. Nach erfolgreicher Darstellung von  $[^{18}\text{F}]\text{F12}$  in hoher radiochemischer Reinheit und moderaten radiochemischen Ausbeuten von 25 %, wurde auch die Radiomarkierung mit Radiometallen, hier beispielhaft für das therapeutische Radionuklid Lutetium-177, untersucht (Abb. 32).



**Abbildung 32** Radiomarkierung des PSMA-Liganden **12** mit  $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  in Natriumacetatpuffer (pH 4.5) bei 95 °C und einer Inkubationszeit von 15 min.

Die Radiomarkierung mit Lu-177 wurde in 1 M Natriumacetatpuffer (pH 4.5) durchgeführt, da der pH-Bereich für die Radiomarkierung mit  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$  optimal ist. Zudem ist dieser Markierungspuffer, wie in Kapitel 1.2 bereits erwähnt, biokompatibel und wird routinemäßig in der Produktion von Radiotracer in der Klinik eingesetzt.



**Abbildung 33** Radio-HPLC des radiohybriden Liganden **12** A) nach der  $^{18}\text{F}$ -Markierung ( $\text{C}_{18}$ -Aufreinigung und B) nach Inkubation mit  $^{177}\text{Lu}$ ]LuCl<sub>3</sub> in Natriumacetatpuffer für 15 min bei 95 °C.

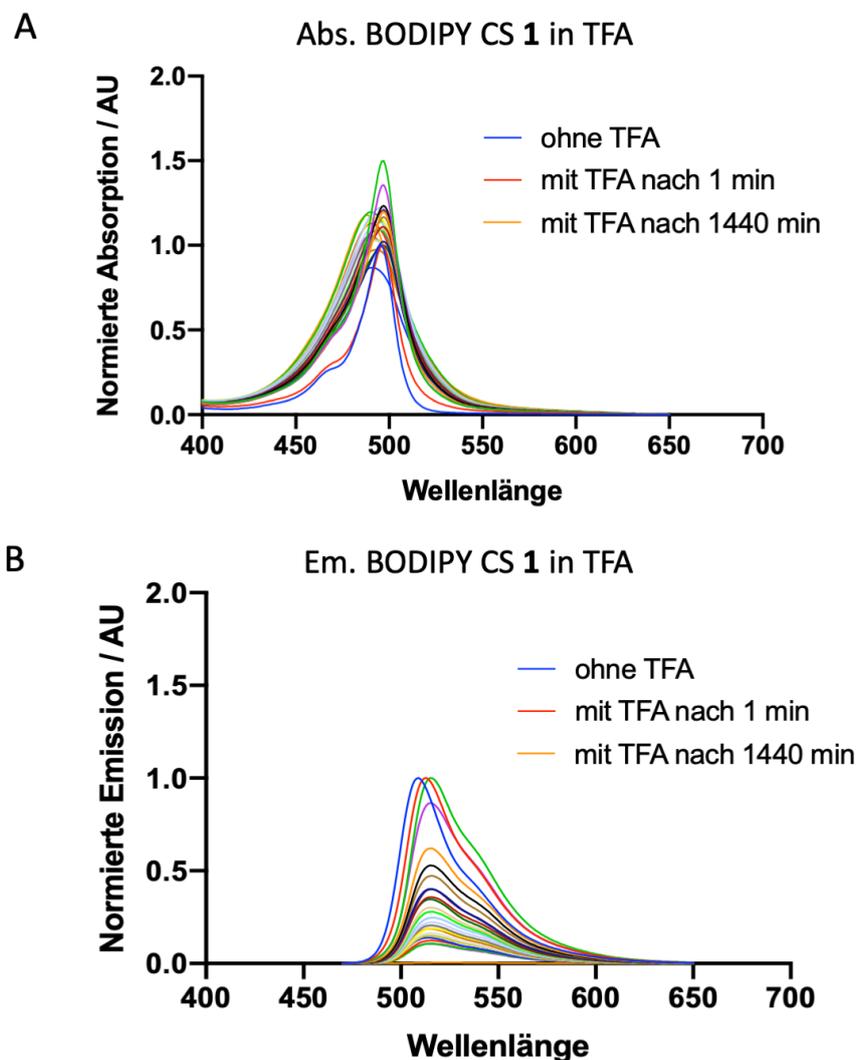
Für die Radiomarkierung des radiohybriden Liganden **12** wurde unter Verwendung von 1 nmol Ligand und einer Aktivität von 25 MBq  $^{177}\text{Lu}$ ]LuCl<sub>3</sub> bei 95 °C für 15 min kein vollständiger Umsatz beobachtet (Abb. 33 B). Wie aus dem Radiochromatogramm in Abbildung 33 B ersichtlich, wurde das Produkt lediglich zu 35% gebildet ( $t_R = 13.1$  min). Bei einer Retentionszeit von  $t_R = 2.53$  min eluiert das ungebundene Lu-177. Das ungebundene  $^{177}\text{Lu}$ ]Lu<sup>3+</sup> kann mittels Aufreinigung über eine  $\text{C}_{18}$ -Kartusche problemlos abgetrennt werden. Da ansonsten keine weiteren radioaktiven Nebenprodukte entstanden sind, stellt Ligand **12** ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung von neuartigen Radiohybridliganden dar. Sowohl eine Radiomarkierung mit dem nicht-metallischen Positronenemitter Fluor-18 als auch mit dem metallischen Radionuklid wie Lu-177 konnten erfolgreich gezeigt werden.

Da der Ligand **12** sowohl mit F-18 als auch mit metallischen Radionukliden markiert werden konnte, könnte er somit zukünftig für die Ermittlung der Dosimetrie einer Ac-225 Therapie mittels PET eingesetzt werden (vgl. Kap. 4, *vide infra*).

### 3.1.4 Stabilitätsuntersuchungen der BODIPY-PSMA-Liganden und der BODIPY-Carbonsäure 1

#### 3.1.4.1 Stabilitätsuntersuchungen unter den Bedingungen der Festphasensynthese

Da in saurem Medium eine Zersetzung des BODIPY-Farbstoffes beobachtet werden konnte (vgl. Kap. 3.1.1), wurde die Auswirkung der TFA-Inkubation auf die Fluoreszenzeigenschaften genauer untersucht. Hierzu wurde Verbindung **1** in 95 % TFA inkubiert und die Proben über einen Zeitraum von 24 h fluoreszenzspektroskopisch analysiert (Abbildung 34). Diese Arbeiten wurden von Frau Dr. Caroline Hoffmann (AK Jung, Biophysikalische Chemie, UdS) durchgeführt.

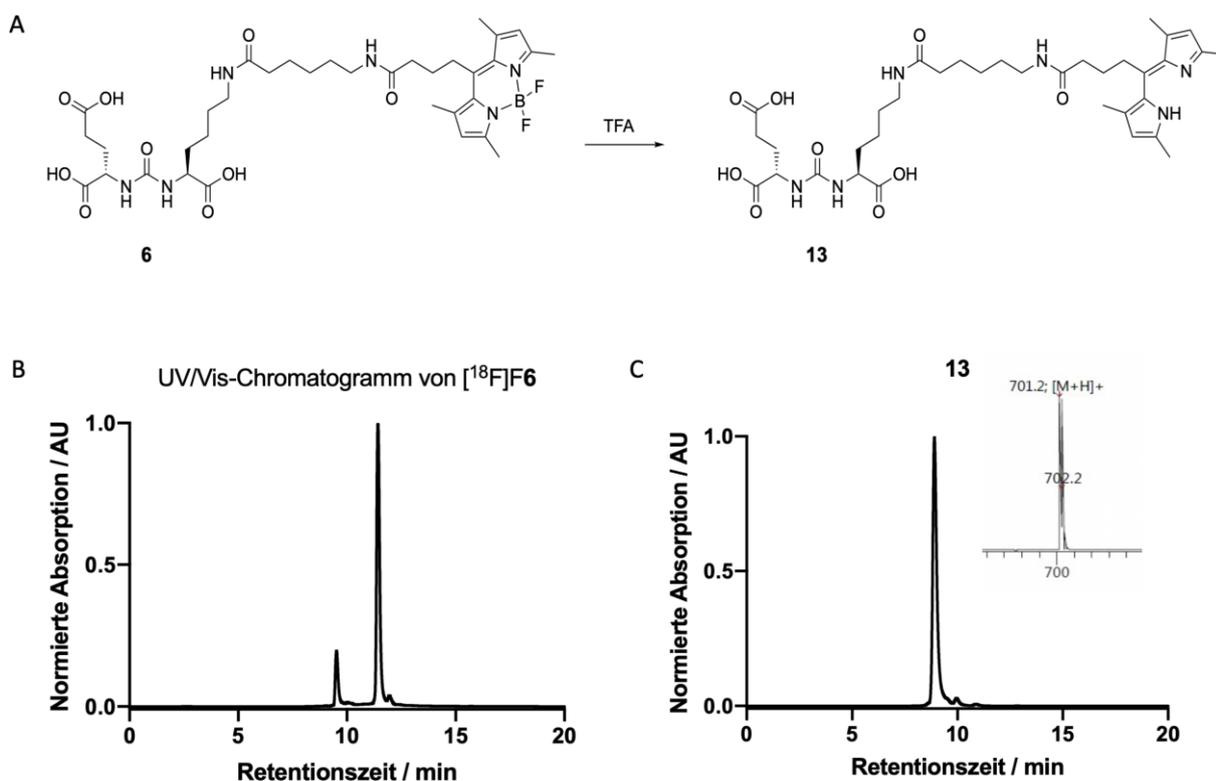


**Abbildung 34** A) Zeitlicher Verlauf der Absorptionsspektren von **1** während Inkubation in 100% TFA. B) Zeitlicher Verlauf der Emissionsspektren von **1** während Inkubation in TFA.

Während die Absorptionsspektren von **1** in TFA lediglich zu einer kleinen Blauverschiebung der Maxima von  $\lambda_{\text{abs}} = 496 \text{ nm}$  zu  $\lambda_{\text{abs}} = 488 \text{ nm}$  führten (Abbildung 34 A), wurde eine signifikante Änderung der entsprechenden Emissionsspektren festgestellt. Bereits nach einigen Sekunden wurde eine leichte Rotverschiebung von  $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$  zu  $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$  beobachtet (Abbildung 34 B), die wahrscheinlich auf die Protonierung eines Stickstoffatoms des BODIPY-Kerns zurückzuführen ist. Innerhalb von 2 h wurde eine stetige Abnahme der Emissionsintensität beobachtet, die vermutlich eine Folge des protonenvermittelten Verlusts der  $\text{BF}_2$ -Einheit ist. Nach 24 h war die vollständige Löschung der Fluoreszenz zu beobachten, während die Absorptionsintensität sich nicht mehr merklich veränderte. Eine von Dr. Caroline Hoffmann durchgeführte Auftragung der Emissionsintensität gegen die Zeit ergab eine Zerfallskurve aus der durch einen biexponentiellen Fit zwei kinetische Zerfallskonstanten  $k_1 = 0.168 \pm 0.011 \text{ min}^{-1}$  und  $k_2 = 0.018 \pm 0.006 \text{ min}^{-1}$  erhalten wurden. Für die entsprechenden Halbwertszeiten von **1** in TFA wurden  $t_1 = 4.1 \pm 0.3 \text{ min}$  und  $t_2 = 37.9 \pm 9.4 \text{ min}^{-1}$  berechnet. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Ergebnissen von Rumyantsev et al., der einen zweistufigen Dissoziationsprozess von BODIPY-Komplexen mit einer schnellen Protonierung des BODIPY-Kerns gefolgt von einer langsamen Freisetzung der  $\text{BF}_2$ -Einheit postulierte<sup>136,141</sup>. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es zwar zu einer vollständigen Freisetzung der  $\text{BF}_2$ -Einheit kommt, allerdings kann die Fluoreszenz durch die Zugabe eines Überschusses an Bortrifluoretherat wieder hergestellt werden (Dissertation Frau Dr. C. Hoffmann)<sup>142</sup>. Die Stabilitäts- und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von **1** zusammen mit den Beobachtungen der Festphasensynthese von Ligand **5** aus Kapitel 3.1.1 zeigten, dass eine Syntheseroute mittels Festphase für BODIPY-PSMA Radiotracer nicht genutzt werden kann. Auch unter den Bedingungen der Festphasensynthese kam es zur Abspaltung des  $\text{BF}_2$ -Kerns des BODIPY-Farbstoffes **1** und damit zur Löschung der Fluoreszenz.

### 3.1.4.2 Stabilitätsuntersuchungen unter den Bedingungen des $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausches

Obwohl die  $^{18}\text{F}$ -markierten Liganden nach  $\text{C}_{18}$ -Aufreinigung in hoher radiochemischer Reinheit vorlagen, wurde im UV-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 490 nm die Bildung eines Nebenproduktes von  $\sim 5\text{-}10\%$  beobachtet (vgl. Kap. 3.1.2). Aufgrund der sauren Bedingungen des radioaktiven Isotopenaustausches (pH 1-2) wurde postuliert, dass es sich auch hier um die jeweiligen  $\text{BF}_2$ -freien Liganden handelt (siehe Kap. 3.1.1 und Kap. 3.1.4.1). Um das Nebenprodukt zu identifizieren, erfolgte am Beispiel von Ligand **6**, die gezielte Herstellung des  $\text{BF}_2$ -freien Konjugates **13** durch Umsetzung mit 100 % TFA gefolgt von Untersuchungen mittels analytischer HPLC (Abb. 35).

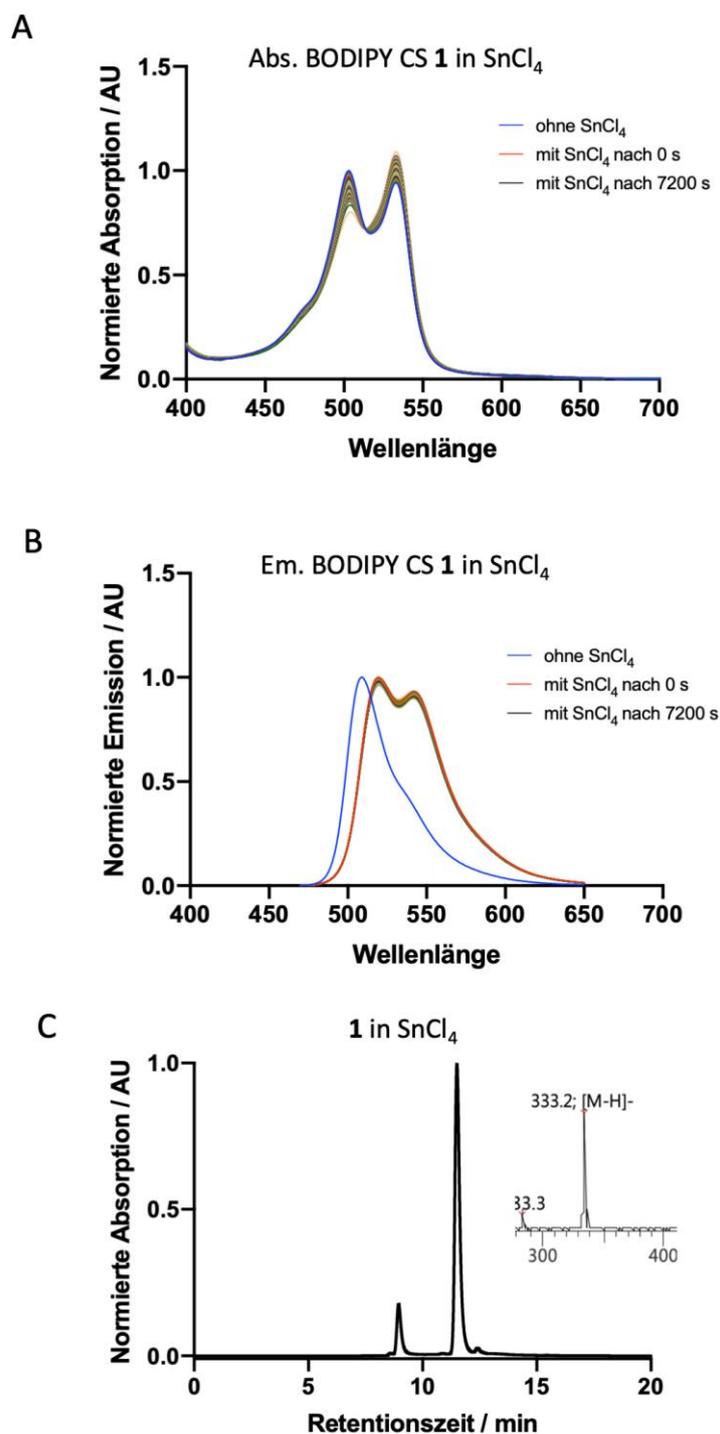


**Abbildung 35** A) Synthese des  $\text{BF}_2$ -freien BODIPY-PSMA-Liganden **13**, B) UV/Vis-Chromatogramm von  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$  nach der Radiomarkierung mittels  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch bei einer Wellenlänge von 490 nm. UV/Vis-Chromatogramm des analytischen HPLC-Laufs von **13** bei einer Wellenlänge von 490 nm, eingesetzt: LR-ESI-(+)-Spektrum von **13**.

Sowohl das UV/Vis-Chromatogramm als auch die Massenspektren konnten die Bildung des  $\text{BF}_2$ -freien Liganden **13** bestätigen. Im UV/Vis-Chromatogramm von  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$  wurden bei 490 nm zwei Peaks bei einer Retentionszeit von 11.4 min und 8.9 min detektiert. Nach der gezielten  $\text{BF}_2$ -Abspaltung durch Inkubation von **6** in TFA wurde in der HPLC lediglich ein Peak gefunden,

dessen Retentionszeit von 8.9 min mit der 10 %igen Verunreinigung aus Abb. 35 B übereinstimmte. Der Peak wurde eingesammelt und im LR-ESI-(+)-Spektrum die BF<sub>2</sub>-freie Verbindung **13** mit einem m/z = 701.2 gefunden. Dieses Nebenprodukt konnte durch eine HPLC-Aufreinigung erfolgreich abgetrennt werden, so dass für weitere Experimente die Verbindung [<sup>18</sup>F]F6 in hoher Reinheit eingesetzt werden konnte.

Da auch während des radioaktiven Isotopenaustausches in Gegenwart von SnCl<sub>4</sub> die Bildung BF<sub>2</sub>-freier Konjugate als Nebenprodukte beobachtet wurde, wurden in Analogie zu den in Kap. 3.1.4.1 beschriebenen Stabilitätsuntersuchungen von **1**, der Einfluss der Lewis-Säure auf den BODIPY-Chromophor näher untersucht. Hierzu wurde die Carbonsäure **1** in einer SnCl<sub>4</sub>/MeCN-Lösung gelöst und anschließend der Reaktionsverlauf mittels Fluoreszenzspektroskopie und Massenspektrometrie untersucht (vgl. Dissertation, Frau Dr. Caroline Hoffmann, Uds)<sup>142</sup> (Abb. 36).



**Abbildung 36** Stabilitätsuntersuchungen BODIPY **1** in Gegenwart von SnCl<sub>4</sub> A). Zeitlicher Verlauf Absorptionsspektren von **1**. B) Verlauf der Emissionsspektren von **1**. C) Analytischer HPLC-Lauf von **1** nach Inkubation mit SnCl<sub>4</sub> für 15 min, eingesetzt: LR-ESI(-)-Spektrum von **1** nach Inkubation mit SnCl<sub>4</sub>; berechnetes m/z für C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>BF<sub>2</sub>: 333.17, gefunden: 333.2.

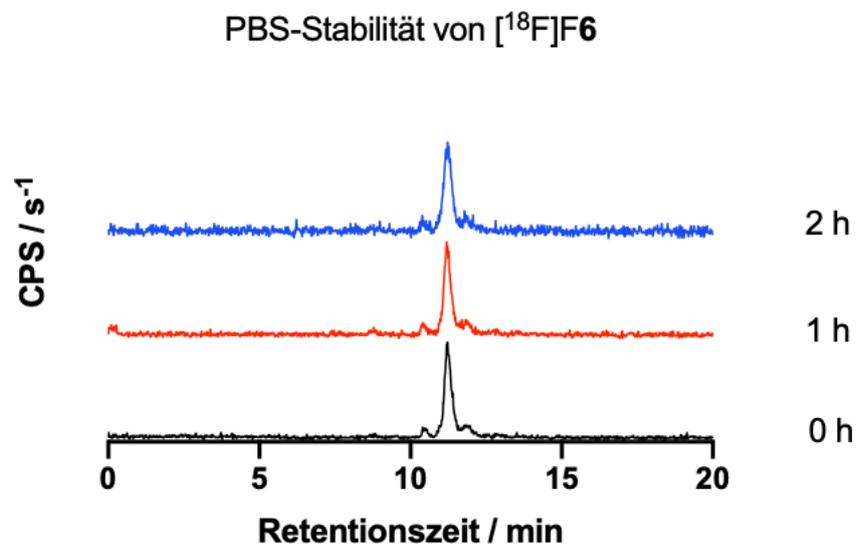
Die entsprechenden Emissionsspektren in Abb. 36 zeigen bereits unmittelbar nach der Zugabe der Lewis-Säure eine deutliche bathochrome Verschiebung des Maximums von  $\lambda_{em} = 509$  nm zu  $\lambda_{em} = 520$  nm im Vergleich zur intakten Carbonsäure **1**. Außerdem wurde eine zweite

Emissionsbande bei  $\lambda_{em} = 545$  nm beobachtet, die auf ein Anregungsmaximum bei  $\lambda_{exc} = 530$  nm zurückzuführen ist (Abb. 36 B). Eine ähnliche Beobachtung wurde für die entsprechenden Absorptionsspektren gemacht. Auch hier kommt es zu einer anfänglichen Rotverschiebung und Bildung einer zweiten Absorptionsbande, welche im Laufe der Messungen leicht variierte (Abb. 36 A). Diese Veränderungen könnten auf die Bildung einer Zwischenstufe zwischen der Lewis-Säure und den Fluoratomen von **1** zurückgeführt werden<sup>143</sup>. Andere mögliche Erklärungen könnte die Substitution von Fluorid durch Chlorid oder eine Insertion von  $SnCl_x$  sein<sup>142</sup>. Derartige Zwischenstufen oder Substitutionen konnten massenspektrometrisch allerdings nicht gezeigt werden (Abb. 36 C).

Zusammenfassend kommt es in Gegenwart von  $SnCl_4$  nicht zu einer signifikanten Zersetzung des Fluorophors. Sowohl die ausgeprägte spektrale Verschiebung als auch die erhaltene Fluoreszenz deuten auf ein intaktes Chromophor mit einem verbrückenden Heteroatom zwischen den beiden Pyrroleinheiten hin.

### 3.1.4.3 Stabilitätsuntersuchungen des radioaktivmarkierten BODIPY-PSMA-Liganden $[^{18}\text{F}]\text{F6}$ in PBS

Im Anschluss an die Stabilitätsuntersuchungen der BODIPY-Carbonsäure **1** (Kap. 3.1.4.1 und Kap. 3.1.4.2) wurde die Stabilität eines radioaktiv markierten BODIPY-PSMA-Liganden am Beispiel von  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$  untersucht. Hierzu wurde  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$  für 2 h in PBS-Puffer (pH 7.4) bei Raumtemperatur inkubiert und nach 1 und 2 h ein Aliquot mittels Radio-HPLC analysiert (Abb. 37).



**Abbildung 37** HPLC-Chromatogramme der Stabilitätsuntersuchung von  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$  in PBS bei Raumtemperatur direkt nach der Radiomarkierung, 1 h und 2 h.

Nach Inkubation der Probe in PBS für 2 h betrug die radiochemische Reinheit immer noch > 97 %, was auf eine ausreichend hohe Stabilität des Radiotracers hinwies. Eine wichtige Erkenntnis für die folgenden *in vitro* Experimente war demnach, dass es nach erfolgter Bildung des radiomarkierten Produktes zu keiner weiteren Zersetzung von  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$  kam.

### 3.1.5 Log $D_{Oct/PBS}$ -Bestimmung der radiomarkierten BODIPY-PSMA-Liganden

Ein wichtiger Indikator für die Bioverteilung ist die Lipophilie von Radiotraceren. Ein Maß für die Lipophilie ist der sogenannte Verteilungskoeffizient  $\log D_{Oct/PBS}$  zwischen PBS und 1-Octanol. In Tabelle 7 sind die entsprechenden  $\log D_{Oct/PBS}$ -Werte von [ $^{18}\text{F}$ ]F5, [ $^{18}\text{F}$ ]F6, [ $^{18}\text{F}$ ]F7, [ $^{18}\text{F}$ ]F8 und [ $^{18}\text{F}$ ]F12 sowie [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-11 zusammen mit den entsprechenden HPLC-Retentionszeiten aufgeführt<sup>108,144</sup>.

**Tabelle 7** HPLC Retentionszeiten und  $\log D_{Oct/PBS}$  Werte der Biokonjugate [ $^{18}\text{F}$ ]F5, [ $^{18}\text{F}$ ]F6, [ $^{18}\text{F}$ ]F7, [ $^{18}\text{F}$ ]F8 und [ $^{18}\text{F}$ ]F12 zusammen mit der Referenzverbindung [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-11.

| Ligand                         | Analytische HPLC, Retentionszeit | Lipophilie bestimmt als $\log D$ in 1-Octanol/PBS |
|--------------------------------|----------------------------------|---|
| [ $^{18}\text{F}$ ]F5          | 11.26 min                        | -2.26 $\pm$ 0.02                                  |
| [ $^{18}\text{F}$ ]F6          | 11.39 min                        | -1.99 $\pm$ 0.11                                  |
| [ $^{18}\text{F}$ ]F7          | 11.50 min                        | -1.35 $\pm$ 0.01                                  |
| [ $^{18}\text{F}$ ]F8          | 12.96 min                        | -1.14 $\pm$ 0.06                                  |
| [ $^{18}\text{F}$ ]F12         | 11.53 min                        | -1.29 $\pm$ 0.01                                  |
| [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-11 | n.d.                             | -2.91 <sup>108</sup>                              |

In der Reihe der  $^{18}\text{F}$ -markierten Verbindungen [ $^{18}\text{F}$ ]F5 sowie [ $^{18}\text{F}$ ]F6, [ $^{18}\text{F}$ ]F7, [ $^{18}\text{F}$ ]F8 und [ $^{18}\text{F}$ ]F12 nahmen die  $\log D_{Oct/PBS}$ -Werte mit zunehmender Länge der Linker und somit mit dem Anteil an aliphatischen Resten zu. Die Ergebnisse sind in Einklang mit den Retentionszeiten der analytischen RP-HPLC. Die Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]F5, ohne Spacer, war die hydrophilste Verbindung, während die Einführung zusätzlicher Ahx-Spacer zu einer allmählichen Erhöhung der Lipophilie für [ $^{18}\text{F}$ ]F6 bzw. [ $^{18}\text{F}$ ]F7 führte. Wie erwartet, zeigte Verbindung [ $^{18}\text{F}$ ]F8 aufgrund des 2-Nal-Amc-Spacers den höchsten  $\log D_{Oct/PBS}$ -Wert in dieser Serie. Für den Radioliganden [ $^{18}\text{F}$ ]F12 nahm die Lipophilie aufgrund des polaren Chelators DOTA sowie des PEG-Spacers ab. Im Vergleich zum klinischen Goldstandard [ $^{68}\text{Ga}$ ]Ga-PSMA-11 waren alle BODIPY-PSMA-Liganden deutlich lipophiler. Dennoch lagen sie in einem akzeptablen Bereich für PSMA-spezifische Radiotracer.

### 3.1.6 *In vitro* Evaluation der BODIPY-PSMA-Liganden 5, 6, 7, 8 und 12.

#### 3.1.6.1 Bestimmung der PSMA-Affinität der BODIPY-PSMA-Liganden 5, 6, 7, 8 und 12.

Um zu untersuchen, ob die BODIPY-Biokonjugate **5**, **6**, **7**, **8** und **12** an das PSMA binden, wurden in einem kompetitiven Bindungsassay die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) in der PSMA-positiven Zelllinie LNCaP bestimmt. Die Durchführung des kompetitiven Bindungsassays erfolgte in Analogie zu Lämpchen *et al.* unter Verwendung von [ $^{177}$ Lu]Lu-PSMA-617 als Radioligand, der in einer molaren Aktivität von 20 MBq/nmol hergestellt wurde<sup>144</sup>. Bei diesem Versuch werden zunehmende Konzentrationen der zu testenden nichtradioaktiven Verbindungen zusammen mit dem Radioliganden inkubiert. Im Anschluss wird die zellgebundene Aktivität gegen die Konzentration aufgetragen. Der  $IC_{50}$ -Wert gibt die Konzentration an, bei der 50% der maximal gebundenen Aktivität verdrängt wurde. Zusätzlich zu den BODIPY-PSMA-Liganden wurde der klinische Goldstandard PSMA-11 als Kontrolle unter identischen Bedingungen getestet. Dies ermöglicht die Erstellung einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung, um den Einfluss der verschiedenen Linker auf die Bindungsaffinität zu ermitteln.

**Tabelle 8**  $IC_{50}$ -Werte [nM] der Liganden **5**, **6**, **7**, **8**, **12**, **13** und der Kontrolle PSMA-11 in LNCaP Zellen unter Verwendung von [ $^{177}$ Lu]Lu-PSMA-617 als Radioligand.

| Ligand         | $IC_{50}$ / nM |
|----------------|----------------|
| <b>5</b>       | 187.6 ± 0.5    |
| <b>6</b>       | 21.5 ± 0.1     |
| <b>7</b>       | 96.4 ± 0.2     |
| <b>8</b>       | 124 ± 0.2      |
| <b>12</b>      | 166 ± 0.5      |
| <b>13</b>      | > 1000         |
| <b>PSMA 11</b> | 18.4 ± 0.2     |

In der Serie der PSMA-Konjugate mit unterschiedlicher Spacerlänge (Verbindungen **5-8**) zeigte Verbindung **6** mit einem Ahx-Spacer zwischen dem Bindemotiv Glu-CO-Lys und dem BODIPY-Farbstoff die höchste Affinität mit einem  $IC_{50} = 21.5 \pm 0.1$  nM, die vergleichbar mit der von PSMA-11 ( $IC_{50} = 18.4 \pm 0.2$  nM) ist (Tabelle 8). Unter Verwendung der Cheng-Prusoff-

Gleichung<sup>145</sup> wurde eine Inhibitorkonstante von  $K_i = 19.6$  nM für **6** berechnet, die mit der  $K_i$  für  $^{nat}\text{Ga}$ -PSMA-11 mit 12.0 nM vergleichbar ist<sup>31</sup>. Die vergleichbare PSMA-Affinität von **6** und PSMA-11 kann durch die strukturelle Analogie zwischen den beiden Liganden erklärt werden. Sowohl der BODIPY-Grundkörper als auch der Chelator HBED-CC enthalten aromatische lipophile Ringsysteme, die für eine optimale Wechselwirkung mit der S1-Tasche und der S1-Bindetasche des aktiven Zentrums von PSMA notwendig sind<sup>11,12,31,88</sup>. Weiterin verfügen beide Liganden über einen Ahx-Linker zwischen dem PSMA-Bindungsmotiv und dem Chromophor bzw. dem Chelator HBED-CC. Dieser Abstand ist offensichtlich optimal, um eine gute Wechselwirkung des lipophilen aromatischen BODIPY-Grundgerüsts bzw. Chelators HBED-CC mit der arene-binding site, einer Bindestelle des aktiven Zentrums in der Nähe des Eintrittstunnels der PSMA-Bindetasche, zu erzielen<sup>21,88</sup>. Für Verbindung **5** bzw. für Verbindung **7** nahmen die Bindungsaffinitäten signifikant ab ( $187.6 \pm 0.5$  nM bzw.  $96.4 \pm 0.2$  nM). Die geringere Affinität von Ligand **5** lässt sich durch einen zu geringen Abstand zwischen dem PSMA-Bindungsmotiv Glu-CO-Lys und dem BODIPY-Farbstoff erklären, der eine optimale Wechselwirkung mit der PSMA-Bindetasche anscheinend verhindert<sup>11,12,21,88</sup>. Im Falle von Ligand **7** führt die Einführung von zwei Ahx Spacern ebenfalls zu einer geringeren PSMA-Affinität, was darauf hindeutete, dass dieser Abstand möglicherweise zu groß für eine optimale Wechselwirkung des lipophilen BODIPY-Farbstoffs mit der lipophilen S1 Tasche des PSMA (S1 accessory pocket) ist<sup>11,12,21,88</sup>.

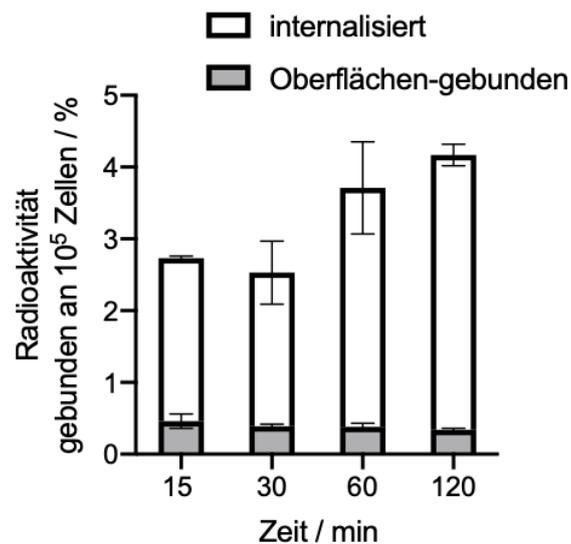
Neben der Spacerlänge wurde ebenfalls die Zusammensetzung des Spacers untersucht. Zur Variation des Spacers wurde auch der 2-Nal-Amc-Linker des PSMA-spezifischen Radiotracers PSMA-617 zwischen dem PSMA-Bindemotiv und dem Farbstoff verwendet. Studien von Benesova *et al.* zeigten bereits, dass der 2-Nal-Amc-Spacer vorteilhaft mit dem hydrophoben „Arginine patch“ der S1-Tasche interagiert und auch der Abstand zwischen dem PSMA-Bindungsmotiv und dem Chelator bei PSMA-617 optimal ist<sup>6,58</sup>. Allerdings zeigte Verbindung **8** mit dem 2-Nal-Amc-Spacer verglichen mit PSMA-11 überraschenderweise eine wesentlich geringere Affinität mit einem  $\text{IC}_{50} = 124.0 \pm 0.2$  nM. Im Fall von **8** könnte die niedrige Affinität auf die hohe Gesamtlipophilie zurückzuführen sein (vgl. Tabelle 12). Wie aus den Bestimmungen der Verteilungskoeffizienten hervorgeht, führt die Kombination des lipophilen Linkers mit dem lipophilen BODIPY-Farbstoff zu einer deutlichen Erhöhung der Gesamtlipophilie von Verbindung **8** ( $\log D_{oct/PBS} [^{18}\text{F}]\text{F8} = -1.14 \pm 0.06$ )<sup>6,58,88</sup>. Auch für Verbindung **12** wurde verglichen mit PSMA-11 eine deutlich geringere Bindungsaffinität

ermittelt ( $IC_{50} = 166 \pm 0.5$  nM). Dieser  $IC_{50}$ -Wert war trotz der strukturellen Analogie zu PSMA-617, mit identischem 2-Nal-Amc-Spacer sowie dem Chelator DOTA, um ca. einen Faktor 10 größer als der  $IC_{50}$ -Wert von PSMA-11. Auch diese Verbindung **12** ist sehr lipophil mit einem vergleichbaren Verteilungskoeffizienten zu Ligand **8** (Tabelle 8), was möglicherweise ebenfalls die niedrige Affinität erklärt. Ein weiterer, möglicher Grund könnte der Amino-3,6-dioxa-8-octanamin Linker zwischen dem Chelator DOTA und dem BODIPY-Farbstoff sein, der die Interaktion des Liganden mit dem PSMA nachteilig beeinflusst.

Zuletzt wurde noch die PSMA-Affinität des  $BF_2$ -freien Analogon von **6** bestimmt. Wie in Abschnitt 3.1.2.2 gezeigt, entsteht diese Verunreinigung bei der  $^{18}F$ -Markierung und könnte somit bei der Bindung mit PSMA mit dem eigentlichen Radiotracer konkurrieren. Dies könnte zu einer partiellen Blockierung von PSMA und folglich zu einer unzureichenden Bindung der Radiotracer führen. Interessanterweise nahm die Bindungsaffinität von **13** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $> 1$   $\mu M$  jedoch deutlich ab, was darauf hinweist, dass das  $BF_2$ -freie Nebenprodukt **13** nicht um die Bindung des Radiotracers [ $^{18}F$ ]F6 an PSMA konkurriert (Tabelle 8). Die Bindung des Radiotracers wird folglich nicht negativ beeinflusst.

### 3.1.6.2 Bestimmung der Tumorinternalisierung des BODIPY-PSMA-Liganden 6

Da PSMA-spezifische Radiotracer nach Bindung an PSMA von der Tumorzelle internalisiert werden<sup>109</sup>, wurden im Anschluss an das kompetitive Bindungsassay Internalisierungsexperimente der BODIPY-PSMA-Liganden in LNCaP-Zellen durchgeführt. Die PSMA-vermittelte Internalisierung wurde lediglich für den Liganden [<sup>18</sup>F]F6 untersucht, da dieser in der Reihe der untersuchten BODIPY-PSMA-Liganden der einzige mit einer ausreichend hohen Bindungsaffinität war. Zur Ermittlung der Internalisierung wurde [<sup>18</sup>F]F6 über einen Zeitraum von 120 min in LNCaP-Zellen inkubiert. Zur Ermittlung der zelloberflächengebundenen Aktivität wurden die Zellen nach Entfernen der Inkubationslösung mit einer sauren Glycinlösung gewaschen und danach die Zellen durch die Zugabe von einer NaOH-Lösung lysiert. Beide Lösungen wurden in Countingtubes überführt und in einem Gammacounter die oberflächengebundene und internalisierte Aktivität gemessen. Um die PSMA-spezifische Zellinternalisierung zu bestimmen, wurden zusätzliche Blockierungsexperimente in Gegenwart eines Überschusses an 2-PMPA durchgeführt<sup>31,108</sup>. Die Durchführung der Internalisierungsexperimente wurde mit einer Stoffmenge von 10 pmol [<sup>18</sup>F]F6 durchgeführt. Um den zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurde der prozentual internalisierte Anteil des Radioliganden nach 15, 30, 60 und 120 min bestimmt. Die entsprechenden prozentualen Anteile sind in Abb. 38 dargestellt.



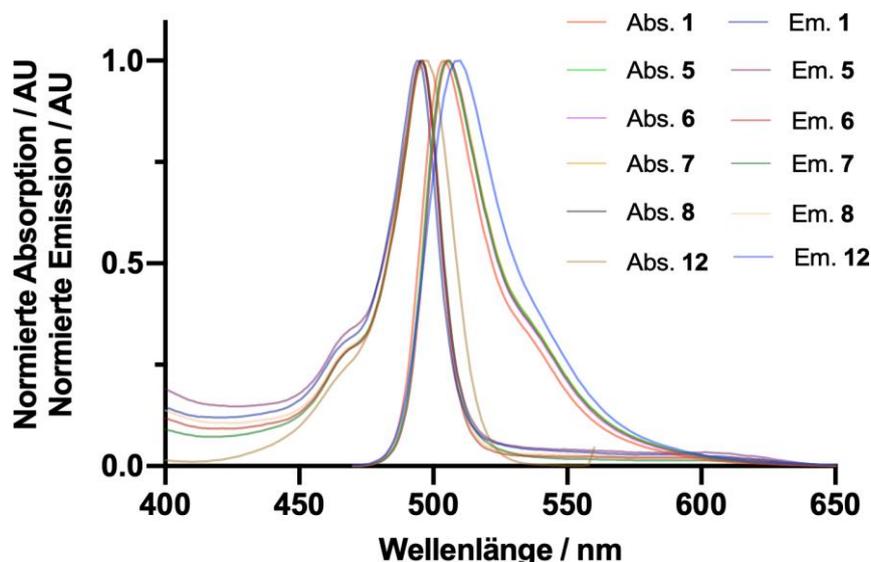
**Abbildung 38** PSMA-vermittelte Internalisierung und PSMA- Zelloberflächenbindung von [<sup>18</sup>F]F6 bei Raumtemperatur nach 15, 30, 60 und 120 min. Die PSMA-vermittelte Internalisierung wurde mittels Blockingstudien mit 2-PMPA sichergestellt.

Wie erwartet, war eine graduelle Zunahme der PSMA-vermittelten Internalisierung von [<sup>18</sup>F]F6 mit steigender Inkubationszeit zu beobachten. Nach 15 und 30 min wurden 2.24 % bzw. 2.17 % (P < 0.0057) des Radioliganden internalisiert, die nach 60 min weiter auf 3.3 % (P < 0.0015) anstiegen. Das Maximum wurde nach 120 min mit 3.83 % (P < 0.0002) erreicht. Gegenüber der PSMA-vermittelten Internalisierung anderer PSMA-Liganden lag dieser Wert in einem vergleichbaren Bereich<sup>58</sup>. Im Gegensatz dazu blieb der spezifisch oberflächengebundene Anteil von [<sup>18</sup>F]F6 im Verlauf des Experiments, mit einem Wert von ca. 0.5 %, im Wesentlichen konstant. Für alle Zeitpunkte war die PSMA-vermittelte Internalisierung von [<sup>18</sup>F]F6 statistisch signifikant (P < 0.05).

### 3.1.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der PSMA-Internalisierung

#### 3.1.6.3.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Liganden 5, 6, 7, 8 und 12

Nach erfolgter Synthese, Charakterisierung und Radiomarkierung der BODIPY-PSMA-Liganden 5, 6, 7, 8 und 12 wurden in Kooperation mit Frau Dr. Caroline Hoffmann (AK Jung, Biophysikalische Chemie, UdS) fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der jeweiligen Liganden durchgeführt, um den Einfluss der Biokonjugation auf die Fluoreszenzeigenschaften des BODIPY-Farbstoffs hat (Abb. 39). Hierfür wurden die Absorptions- ( $\lambda_{abs}$ ), Anregungs- ( $\lambda_{exc}$ ) bzw. Emissionswellenlängen ( $\lambda_{em}$ ) sowie die Fluoreszenzquantenausbeute ( $\phi_{Fl}$ ) und die Fluoreszenzlebensdauer ( $\tau_{Fl}$ ) gemessen (Tabelle 9).



**Abbildung 39** Normierte Absorptions- und Emissionsspektren von 1, 5, 6, 7, 8 und 12.

**Tabelle 9** Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7**, **8** und **12** im Vergleich mit der Carbonsäure **1**.

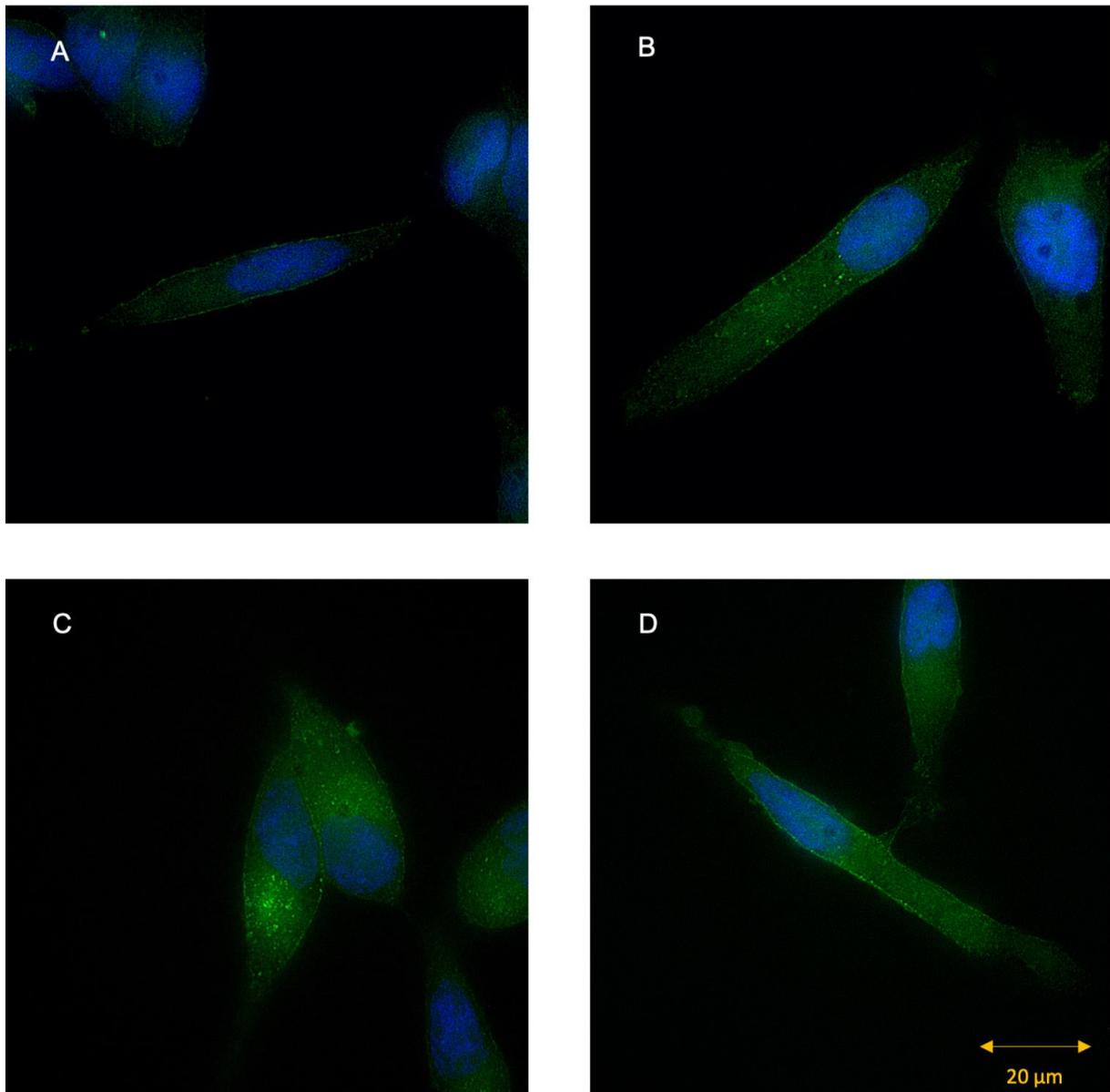
| Verbindung | $\lambda_{abs}$ / nm | $\lambda_{exc}$ / nm | $\lambda_{em}$ / nm | $\varphi_{FI}$ / % | $\tau_{FI}$ / ns |
|------------|----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| <b>1</b>   | 494                  | 496                  | 505                 | 75 ± 5             | 6.3 ± 0.1        |
| <b>5</b>   | 495                  | 496                  | 506                 | 81 ± 5             | 5.9 ± 0.1        |
| <b>6</b>   | 496                  | 496                  | 506                 | 86 ± 5             | 6.1 ± 0.1        |
| <b>7</b>   | 496                  | 496                  | 506                 | 81 ± 5             | 6.2 ± 0.1        |
| <b>8</b>   | 496                  | 495                  | 504                 | 81 ± 5             | 6.1 ± 0.1        |
| <b>12</b>  | 496                  | n.d.                 | 510                 | n.d.               | n.d.             |

Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 9 und Abbildung 39 ersichtlich ist, hatte die Konjugation der peptidomimetischen Targetingvektoren an **1** keinen Einfluss auf die Absorptions- und Emissionsmaxima von **5**, **6**, **7**, **8** und **12**. Die entsprechenden Absorptionsmaxima lagen im Bereich von  $\lambda_{abs} = 494$ -496 nm und die Emissionsmaxima bei  $\lambda_{em} = 504$ -506 nm. Für die Anregungswellenlängen  $\lambda_{exc}$  wurde ebenfalls kein Einfluss beobachtet. Im Falle der Fluoreszenzquantenausbeute  $\varphi_{FI}$  wurde für die Liganden **5**, **6**, **7** und **8** ein schwacher Anstieg von 75 % auf 81 % und für Ligand **9** auf 86 % verzeichnet. Dieser beobachtete Anstieg kann dadurch erklärt werden, dass die Carbonsäure von **1** bei den Biokonjugaten in eine Peptidbindung umgewandelt wurde und somit nicht mehr als negativ geladenes Carboxylat vorliegen kann. Auch die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{FI}$  der BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7**, **8** wurde nicht beeinflusst mit einer Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_{FI}$  in einem vergleichbaren Bereich von wenigen Nanosekunden (Tabelle 9 /Abbildung 39). Für Verbindung **12** wurden keine Fluoreszenzquantenausbeute  $\varphi_{FI}$  und Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{FI}$  bestimmt.

Anhand der ermittelten fluoreszenzspektroskopischen Daten wurde festgestellt, dass die Konjugation von **1** an die peptidomimetischen Targetingvektoren die Fluoreszenzeigenschaften vernachlässigbar beeinflusst. Somit konnten die BODIPY-PSMA-Konjugate für weitere Experimente mittels *in vitro* Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

### 3.1.6.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des BODIPY-PSMA-Liganden **6**

Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften der BODIPY-Farbstoffe konnte die PSMA-vermittelte Internalisierung von **6** ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch in LNCaP Zellen untersucht werden. Neben den Internalisierungsexperimenten mit der radioaktivmarkierten Verbindungen [<sup>18</sup>F]F**6**, die lediglich Informationen über den internalisierten Anteil geben, liefern diese Experimente darüber hinaus wichtige Informationen über die zelluläre Verteilung der BODIPY-PSMA-Liganden, die bis zu dem Zeitpunkt unbekannt waren. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem SIM Mikroskop. Für die Anregung des Zellkerns spezifischen Farbstoffes DAPI wurde ein 405 nm Laser und für den BODIPY-PSMA Liganden **6** ein 488 nm-Laser verwendet. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 15, 30 und 60 min bei einer finalen Konzentration des Liganden von c = 20 nM.

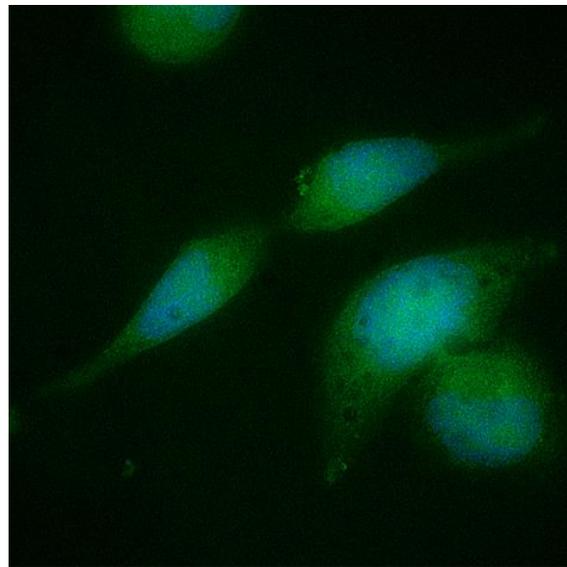


**Abbildung 40** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des BODIPY-PSMA-Liganden **6**. SIM-Aufnahmen des zeitlichen Verlaufs der Internalisierung von **6** ( $c = 20 \text{ nM}$ ) in PSMA-positiven LNCaP-Zellen nach einer Inkubationszeit von 15 (A), 30 (B) min, 1 h (C) und 1 h bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (D)<sup>146</sup>.

Abb. 40 zeigt das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des BODIPY-PSMA-Liganden **6**. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde eine signifikante Akkumulation von **6** in der Zellmembran der LNCaP-Zellen gefunden (Abbildung 40 A). Zu späteren Zeitpunkten (30 min und 1 h) wurde eine zunehmende Anzahl intrazellulärer Fraktionen hoher Intensität festgestellt (Abb. 40 B + C). Bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde lediglich eine Akkumulation von **6** an der Zellmembran beobachtet (Abb. 40 D), da bei dieser Temperatur kein aktiver Transport des Liganden in die Zelle stattfinden kann.

Die Ergebnisse stimmen mit denen von Eder *et al.* überein, die parallel zu unseren Arbeiten das subzelluläre Verhalten bimodaler PSMA-Inhibitoren durch STED-Nanoskopie genauer untersuchten<sup>109</sup>. Die Internalisierung von Verbindung **6** erfolgte vermutlich über Clathrin-coated Pits und anschließender Endozytose nach Wechselwirkung mit PSMA<sup>99</sup>.

Um die Spezifität der Oberflächenbindung und Internalisierung von **6** zu demonstrieren, wurden ebenfalls Blockierungsstudien unter Verwendung von 2-PMPA durchgeführt, wobei weder eine Membrananreicherung noch eine Internalisierung von **6** beobachtet wurde. Wie aus Abb. 41 ersichtlich, wurde lediglich eine schwache Autofluoreszenz der Zellkompartimente beobachtet.



**Abbildung 41** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Ligand **6** in LNCaP Zellen in Gegenwart des Inhibitors 2-PMPA.

Zusammenfassend standen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen im Einklang mit den Internalisierungsexperimenten mit [<sup>18</sup>F]F6 und bestätigten die erwartete Akkumulation sowie PSMA-vermittelte Internalisierung in LNCaP-Zellen. Mit diesen Ergebnissen konnten wichtige Erkenntnisse über die zelluläre Verteilung von **6** gewonnen werden. Darüberhinaus deuteten die Ergebnisse auf die Eignung von **6** für die fluoreszenzbasierte Resektion von Tumorgeweben beim PCa hin.

### 3.1.6.3.3 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von **1** mittels FireFly-Laparoskop

Ein fluoreszenzbasiertes bildgebendes Verfahren, das bei einem PCa bzw. bei PSMA-positiven befallenen Lymphknoten eingesetzt wird, ist die DaVinci-assistierte fluoreszenzgesteuerte chirurgische Resektion von Gewebe. PSMA-spezifische Liganden sind, wie in Kapitel 1.2.4 bereits erläutert, für dieses minimal-invasive Verfahren i.d.R. mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, dessen Emissionsmaximum sich im Nahinfrarotbereich befindet, wodurch ein klarer Kontrast zwischen krankem und gesundem Gewebe erzielt werden kann<sup>108</sup>. Die Detektion bzw. Anregung des angereicherten Farbstoffes erfolgt dabei mit einem FireFly Laparoskop und ist somit an spezielle technische Gegebenheiten geknüpft<sup>147</sup>. Um zu untersuchen, ob der BODIPY Ligand **6** mit diesen technischen Anforderungen kompatibel war, wurden Echtzeitaufnahmen mit einem FireFly Laparoskop durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob der BODIPY-Farbstoff trotz seiner niedrigeren Anregungswellenlänge bzw. Emissionswellenlänge im Vergleich zu den konventionell verwendeten NIR-Farbstoffen mit einem FireFly Laparoskop angeregt werden kann. Für die Echtzeitaufnahmen wurde allerdings nicht der Ligand **6** sondern, aufgrund der Einfachheit die BODIPY-Carbonsäure **1** in Ethanol verwendet, da sich die Fluoreszenzeigenschaften von **1** und **6** nicht merklich voneinander unterscheiden (Kap. 3.1.6.3.1).



**Abbildung 42** Echtzeitaufnahmen verschiedener Konzentrationen der BODIPY-Carbonsäure **1** in EtOH am DaVinci-Roboter mit einem FireFly Laparoskop. Konzentrationen von links nach rechts: 14, 1.4, 0.14, 0.014 und 0.0014  $\mu\text{mol/mL}$ .

Abb. 42 zeigt die Echtzeitaufnahme der Anregung von **1** mit dem FireFly Laparoskop des DaVinci-Roboters (Klinikum für Urologie, Universitätsklinikum des Saarlandes). Eindeutig zu erkennen ist, dass **1** mit dem FireFly Laparoskop trotz der suboptimalen Anregungswellenlänge der BODIPY-Farbstoffe von ca. 490 nm im Gegensatz zu den klinisch eingesetzten Nahinfrarotfarbstoffen (Anregungswellenlängen > 700 nm)<sup>148</sup> sehr gut angeregt werden konnte. Es wurden dabei Konzentrationen von 14 – 0.0014 µmol/mL untersucht. Während bei einer Konzentration von 14 µmol/mL (Abb. 42, links) möglicherweise ein Quenching der Fluoreszenz aufgrund der hohen Konzentration des Farbstoffes beobachtet wurde, wurde bei Konzentrationen von 1.4 µmol/mL (Abb. 42 mitte) und 0.14 µmol/mL (Abb. 42, zweites Glas von rechts) ein intensives Signal detektiert. Somit konnte erfolgreich die Eignung der BODIPY-Farbstoffe im Allgemeinen und des BODIPY-PSMA-Liganden **6** für die DaVinci-assistierte Firefly Laparoskopie nachgewiesen werden.

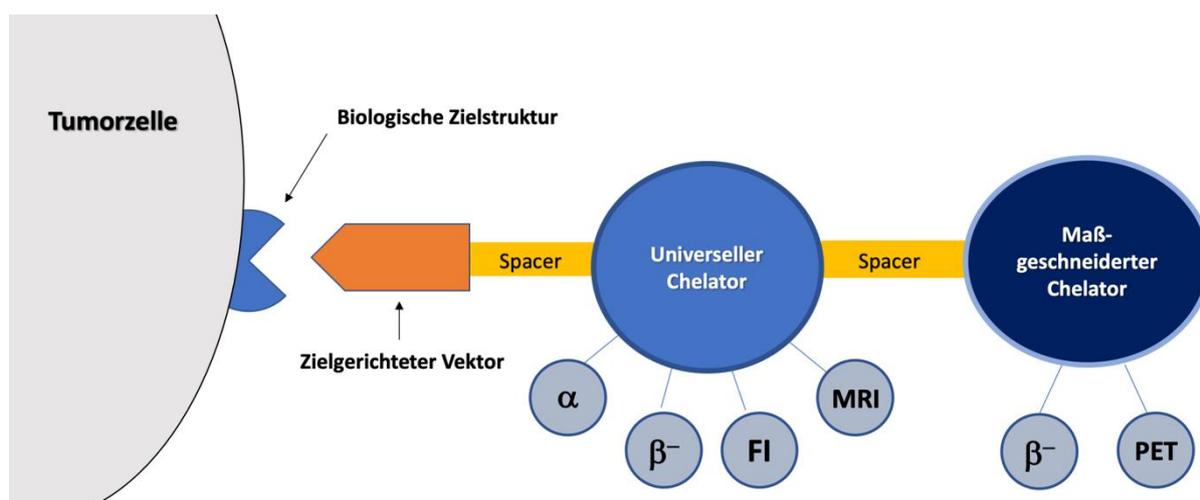
Zusammenfassend konnten durch die *in vitro* Evaluationen der BODIPY-PSMA-Ligand **6** als vielversprechenden Kandidaten für eine klinische Translation identifiziert werden. Zum einen besitzt dieser Ligand eine vergleichbare Affinität zu PSMA wie die derzeit klinisch eingesetzte Verbindung PSMA-11. In Internalisierungsexperimenten konnte eine PSMA-vermittelte hohe Akkumulation in der Zelle nachgewiesen werden. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen konnte die Bindung an die Zellmembran und die anschließende Internalisierung erfolgreich visualisiert werden. Diese Ergebnisse machen den BODIPY-PSMA-Liganden zu einem vielversprechenden bimodalen Kandidaten für die klinische Translation. Derzeit wird die Bioverteilung der Verbindung im Tiermodell untersucht.

### 3.2 Radiohybride PSMA-Liganden

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein PSMA-spezifischer Radiohybridligand entwickelt werden. Im Gegensatz zu den in Kapitel 2 beschriebenen Ansätzen, bei denen ein Metallchelator für die Markierung mit therapeutischen Metallradionukliden mit einer Möglichkeit zur Radiomarkierung mit F-18 kombiniert wurden, sollte hier ein Radiohybridligand auf Basis von zwei Metallchelatoren entwickelt werden. Ein solcher Radiohybridligand ist äußerst flexibel einsetzbar. Aufgrund der Möglichkeit verschiedenste (Radio)metallkombinationen verwenden zu können werden zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten (vide infra) eröffnet, die mit den bereits beschriebenen Ansätzen nicht realisierbar sind.

Die Herausforderung bei der Entwicklung von Radiohybridliganden auf Basis von zwei Radiometallen liegt in deren regioselektiven Komplexierung in dem jeweiligen dafür vorgesehenen Chelator. Hierfür müssen die Chelatoren die entsprechenden (Radio)metalle mit hoher Selektivität binden, da es ansonsten zu einer prozentualen Verteilung der Metalle zwischen den beiden Komplexbildner kommen kann, was wiederum die jeweilige Radiomarkierung nachteilig beeinflussen kann. Bereits bei „normalen“ Radiomarkierungen, d.h. bei der Komplexierung von lediglich einem Radiometall durch einen Chelator (vgl. Radiomarkierungen PSMA-11 und PSMA-617, Abschnitt 1.2.2.1) führen bereits kleinste (nichtradioaktive) Metallverunreinigungen aufgrund der niedrigen Stoffmengen an entsprechendem Radiometall bei der Markierung in der Regel zu keinem bzw. unvollständigem Umsatz.

Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz kombiniert einen universellen Chelator, der in der Lage ist verschiedenste (Radio)metalle zu komplexieren, mit einem maßgeschneiderten, hochselektiven Komplexbildner für  $\text{Cu}^{2+}$  Kationen. Das Grundprinzip für einen zielspezifischen Radiohybridliganden auf Basis von zwei Metallchelatoren ist in Abb. 43 schematisch dargestellt. Als universeller Chelator wurde der Ligand DOTA in Abb. 44 A gewählt. Dieser bildet mit einer Vielzahl an medizinisch relevanten Metallkationen sehr stabile Komplexe und ist folglich für die Entwicklung von Radiotracer häufig die erste Wahl<sup>67</sup>. Wichtige Vertreter dabei sind die Positronenemitter Ga-68, die therapeutischen Radionuklide Y-90, Lu-177 und Ac-225 sowie die nichtradioaktiven Lanthanoide Gd für die Magnetresonanztomographie (MRT) sowie die lumineszierenden Eu, Tb oder Tm zur Fluoreszenzbildgebung<sup>112</sup>.

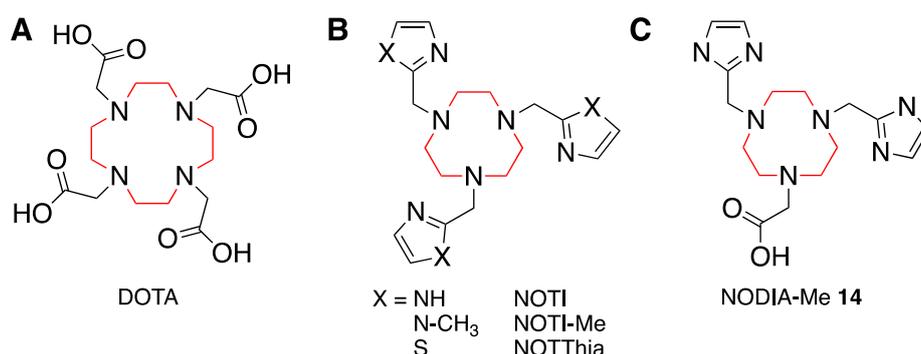


**Abbildung 43** Schematischer Aufbau eines multifunktionellen heterodinuklearen Radiohybridliganden. Orange: Biovektor zur spezifischen Bindung an Tumorzellen. Gelb: Spacer. Hellblau: Universeller Chelator für die Komplexbildung verschiedener (Radio)metalle, z.B. Alpha- und Betaemitter zur Therapie, lumineszierende Metallkationen für Fluoreszenzbildgebung (engl.: fluorescence imaging = FI) oder MR-aktive Metallkationen (engl.: magnetic resonance imaging = MRI). Dunkelblau: Maßgeschneiderter Chelator für  $\text{Cu}^{2+}$  entweder für die PET-Diagnostik mit  $^{64}\text{Cu}$  oder Therapie mit  $^{67}\text{Cu}$ . Verschiedene (Radio)metallkombinationen erlauben potentiell zahlreiche medizinische Anwendungen.

Als  $\text{Cu}^{2+}$ -spezifischer Ligand wurde der BFC NODIA-Me **14** (engl.: 2-(4,7-bis((1-methyl-1H-imidazol-2-yl)methyl)-1,4,7-triazolan-1-yl)acetic acid) gewählt (Abb. 44 C). Dieser wurde erstmals in der Arbeitsgruppe Bartholomä dargestellt und zeichnet sich durch seine hervorragenden Komplexbildungseigenschaften für  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen aus. Der Ligand NODIA-Me **14** ist Teil einer in der Arbeitsgruppe Bartholomä entwickelten Chelatorplattform, die sich durch hervorragende Komplexbildungseigenschaften für  $\text{Cu}^{2+}$ -Kationen auszeichnet<sup>144,149,150</sup>. Zur Chelatorplattform zählen ebenfalls die dreifach derivatisierten Liganden NOTI (engl.: 1,4,7-Tris((1H-imidazol-2-yl)methyl)-1,4,7-triazolan), NOTI-Me (engl.: 1,4,7-Tris((1-methyl-1H-imidazol-2-yl)methyl)-1,4,7-triazolan) und NOTThia (engl.: 1,4,7-Tris(thiazol-2-ylmethyl)-1,4,7-triazolan) in Abb. 44 B.

Das  $\text{Cu}^{2+}$  Kation besitzt eine relativ schnelle Ligandenaustauschgeschwindigkeit und neigt daher häufig zur Transchelation bzw. zur Dekomplexierung *in vivo*, wodurch besondere Anforderungen an kupferspezifische Chelatoren gestellt werden<sup>151,152</sup>. Nach dem HSAB-Prinzip (hard and soft acids and bases) besitzt das intermediäre  $\text{Cu}^{2+}$  Kation eine ausgeprägte Präferenz für intermediäre Stickstoffdonoren und bildet mit entsprechenden Liganden Komplexe mit hoher thermodynamischer Stabilität. Die Chelatorplattform basiert auf dem Makrozyklus 1,4,7-Triazacyclononan (TACN), der aufgrund seiner geometrischen Anordnung

der drei Stickstoffatome eine optimale faciale Koordination an das  $\text{Cu}^{2+}$ -Kation ermöglicht<sup>151,152</sup>. Die von  $\text{Cu}^{2+}$  bevorzugte penta- bzw. hexadentate Koordination wird durch drei zusätzliche Stickstoffdonoren von fünfgliedrigen Azaheterozyklen, wie Thiazol und Imidazol, erreicht (Abb. 44). Anhand von Einkristallröntgenstrukturanalysen entsprechender Komplexe konnte nachgewiesen werden, dass das  $\text{Cu}^{2+}$  Kation eine hohe Affinität zu den aromatischen Stickstoffdonoren des Thiazols und Imidazols aufweist, was der Grund für die sehr guten Komplexierungseigenschaften dieser Chelatorklasse ist<sup>151,152</sup>.



**Abbildung 44** Strukturformeln von A) DOTA, B) der TACN-basierten Cu-spezifischen Chelatoren NOTI, NOTI-Me sowie NOTThia und C) des TACN-basierten Cu-spezifischen BFCs NODIA-Me 14.

Eine Besonderheit der Chelatoren ist die schnelle Komplexbildungskinetik. Diese ermöglicht die quantitative Bildung entsprechender  $\text{Cu}^{2+}$  Komplexe bereits bei Raumtemperatur. Im Gegensatz hierzu werden für die Komplexbildung des Liganden DOTA erhöhte Temperaturen benötigt<sup>67,149,153</sup>. Mit Cu-64 erfolgt die Komplexbildung der  $\text{Cu}^{2+}$ -spezifischen Liganden bei Raumtemperatur in weniger als einer Minute in quantitativen radiochemischen Ausbeuten mit hohen molaren Aktivitäten von bis zu 180 MBq/nmol<sup>149,152–154</sup>. Einmal gebildet, zeichnen sich die entsprechenden  $\text{Cu}^{2+}$  Komplexe durch eine hohe thermodynamische und kinetische Stabilität aus. Zum Beispiel wurden in Serumstabilitätsuntersuchungen und Kupfer-Austausch-Experimenten keine signifikanten Transchelationen bzw. Dekomplexierungen festgestellt<sup>149,152–154</sup>. Die hohe Stabilität der Cu-Komplexe gepaart mit der schnellen Komplexbildung bei Raumtemperatur sind somit ein Alleinstellungsmerkmal, welches die regioselektive Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  ermöglichen soll.

Die Kombination eines universellen Chelators (DOTA) mit einem  $\text{Cu}^{2+}$ -spezifischen Chelator (NODIA-Me) bietet die Möglichkeit mehrere interessante Metallkombinationen in einem

Radiotracer zu vereinen und somit mit einer einzigen Verbindung eine Vielzahl von medizinischen Anwendungen zu ermöglichen (Tabelle 10).

**Tabelle 10** Anwendungsmöglichkeiten von Radiohybridliganden auf Basis von zwei (unterschiedlichen) Chelatoren durch verschiedene Metallkombinationen.

| Nuklide für Cu <sup>2+</sup> -spezifische Chelatoren | (Radio)metalle für DOTA (und Derivate)                                    | Anwendung  |
|--|---|--|
| <sup>64</sup> Cu (PET)                               | <sup>225</sup> Ac (Alpharadiotherapie)                                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosimetrie der <sup>225</sup>Ac</li> </ul> Radiotherapie mittels PET <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosimetrie der <sup>225</sup>Ac/<sup>67</sup>Cu dualen Radiotherapie</li> </ul> |
| <sup>67</sup> Cu (Betaradiotherapie)                 | <sup>225</sup> Ac (Alpharadiotherapie)                                    | Duale Radiotherapie (Alpha + Beta)   |
| <sup>67</sup> Cu (Betaradiotherapie)                 | <sup>177</sup> Lu, <sup>90</sup> Y, <sup>161</sup> Tb (Betaradiotherapie) | Duale Radiotherapie (2 x beta)   |
| <sup>64</sup> Cu (PET)                               | <sup>nat</sup> Gd (MRI)   | Bimodale PET/MRI Probe   |
| <sup>64</sup> Cu (PET)                               | <sup>nat</sup> Eu, <sup>nat</sup> Yb, etc. (Fluoreszenz)                  | Bimodale PET/Fluoreszenz Probe   |
| <sup>64</sup> Cu (PET)                               | <sup>nat</sup> Lu   | “Standard” PET Bildgebung  |
| <sup>nat</sup> Cu                                    | <sup>177</sup> Lu (Betaradiotherapie)                                     | “Standard” Radiotherapie   |
| <sup>nat</sup> Cu                                    | <sup>225</sup> Ac (Alpharadiotherapie)                                    | Zielgerichtete Alphatherapie   |

Die wichtigste Kombination ist das Cu-64/Ac-225 Paar, das erstmals die Messung der Dosimetrie von <sup>225</sup>Ac-markierten Radiopharmaka durch PET-Bildgebung ermöglichen würde. Aufgrund fehlender Gammaemissionen können Dosimetriedaten für <sup>225</sup>Ac-markierte Radiopharmaka nicht direkt gemessen werden. Stattdessen wird die Dosimetrie entweder aus Tierdaten extrapoliert und/oder anhand verwandter Verbindungen, die mit einem Gammaemittierenden Isotop markiert sind, abgeschätzt (vgl. Kap. 1.2.3.2). Die Dosimetriedaten sind jedoch sehr wichtig, um eine unerwünschte Radiotoxizität von gesundem Gewebe zu vermeiden und die gezielte Alpha-Therapie durch Individualisierung der applizierten Dosis zu optimieren. Durch den oben beschriebenen Ansatz von Radiohybridliganden mit zwei Chelatoren könnten diese Informationen leicht durch eine quantitative PET-Bildgebung

erhalten werden. Aufgrund der zunehmenden Anzahl von Radioligandentherapien unter Verwendung von  $^{225}\text{Ac}$  ist daher die Möglichkeit, die Bioverteilung, Tumorverweildauer und Clearance entsprechender Radiopharmaka durch PET zu überwachen, von großem klinischem Interesse. Der Ansatz würde auch eine personalisierte zielgerichtete Alpha-Therapie mit individualisierten Therapiedosen basierend auf den PET-Scans ermöglichen.

Aufgrund der vergleichbaren Beta-Energie von Lu-177 und Cu-67 kann das Cu-67/Ac-225 Paar für die Tandemtherapie dienen; eine Behandlungsoption, die sich in der Klinik unter Verwendung von  $^{225}\text{Ac}$ - und  $^{177}\text{Lu}$ -markiertem PSMA-617 (siehe Kap. 1.2.3.2) als sehr vielversprechend erwiesen hat. Außerdem kann die Dosimetrie für der Cu-67/Ac-255 Tandemtherapie aus den Cu-64/Ac-225 PET-Daten berechnet werden.

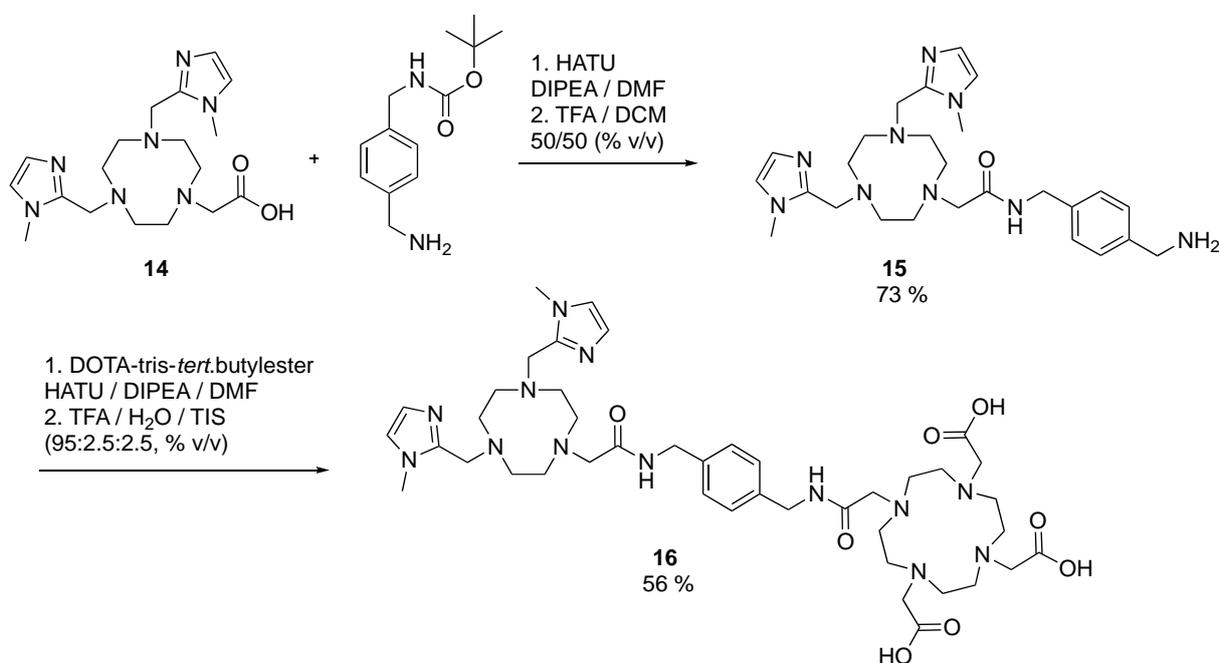
Eine weitere bisher nicht untersuchte Anwendung des Ansatzes ist die Kombination zweier beta-emittierender Radionuklide zur gezielten Strahlentherapie. Dies könnte durch Kombinieren von Cu-67 mit entweder Lu-177, Tb-161 oder Y-90 erreicht werden. Das Cu-67/Lu-177 Paar würde zwei therapeutische Radionuklide mit ähnlichen Beta-Energien und damit vergleichbarer Gewebepenetration für die Behandlung von Mikrometastasen kombinieren. Ein weiteres interessantes Radionuklidpaar wäre Cu-67 und Tb-161, die zwei Betaemitter mit niedrigen Betaenergien, aber mit zusätzlichen Auger-Elektronen von Tb-161 kombinieren<sup>155</sup>. Im Gegensatz dazu würde das Cu-67/Y-90 Paar zwei Radionuklide mit unterschiedlichen Betaenergien vereinen. Während Cu-67 für Tumordurchmesser von 1,2–3,0 mm optimal ist, liegt die optimale Läsionsgröße für die Behandlung mit Y-90 bei 28–42 mm<sup>156</sup>. Dies kann insbesondere für die Behandlung von Tumoren mit hoher intratumoraler Heterogenität auf genetischer, epigenetischer und phänotypischer Ebene von Vorteil sein. Diese Metallkombinationen würden zukünftige Studien zur therapeutischen Wirksamkeit dieser bisher nicht untersuchten dualen Beta-Strahlentherapie ermöglichen.

Die Kombination des PET-Isotops Cu-64 mit nicht radioaktiven Lanthanoiden wie Eu, Yb usw. bietet Zugang zu bimodalen Sonden für die kombinierte PET/Fluoreszenz-Bildgebung. Insbesondere bei der Lymphadenektomie wird heutzutage eine präoperative PET-Bildgebung routinemäßig durchgeführt, um die Lokalisation von metastasierten Lymphknoten zu erleichtern. Eine entsprechende bimodale Sonde würde dann zusätzlich dem Chirurgen während der Operation bei der Lokalisierung von Krebsgewebe durch Fluoreszenz helfen, beispielsweise unter Verwendung der Firefly-Technik des Da Vinci-Chirurgiesystems (vgl. Abschnitt 1.2.3.3.1). Wie oben erwähnt, sind solche bimodalen Sonden derzeit Teil intensiver

Forschung, da sie einen großen Nutzen für mCRPC-Patienten bieten. Mit der kürzlichen Einführung klinischer PET/MRT-Scanner sind auch entsprechende bimodale Sonden von großem Interesse. Durch die Kombination von Cu-64 mit  $^{nat}\text{Gd}$  sind solche Sonden auch für unseren Ansatz zugänglich, obwohl sie aufgrund der unterschiedlichen benötigten Stoffmengen an Kontrastmitteln, die derzeit mehrere Größenordnungen auseinander liegen, eine untergeordnete Rolle spielen. Dennoch sind wissenschaftliche und technologische Fortschritte nicht absehbar und klinische Anwendungen solcher bimodaler Sonden könnten in (naher) Zukunft möglich werden. Schließlich kann der Dual-Labeling-Ansatz auch für „Standard“-Anwendungen in der Nuklearmedizin wie PET-Bildgebung und gezielte Radioligandentherapie eingesetzt werden, bei der ein Radionuklid mit einem zweiten nicht radioaktiven Metallkation kombiniert wird, ähnlich dem oben beschriebenen Ansatz von Radiohybridliganden.

### 3.2.1 Synthese des Dichelatormodellkonstrukts NODIA-Me-Bz-DOTA

Für den Nachweis einer regioselektiven Metallkomplexierung für die Entwicklung eines radiohybriden PSMA-spezifischen Radiotracers wurde ein entsprechendes Dichelatormodellkonstrukt hergestellt (Abb. 44), welches, wie zuvor beschreiben, die Chelatoren DOTA und NODIA-Me **14** beinhaltet. Die Synthese des Modellkonstrukts startete ausgehend von **14** und dem Linker 1-(*N*-BOC-Aminomethyl)-4-aminomethylbenzol (Abb. 45). Der Linker 1,4-Xylylendiamin wurde gewählt, um eine eventuelle Wechselwirkung der beiden Chelatoren bei der Komplexbildung aufgrund der Starrheit des planaren Benzolrings zu minimieren.

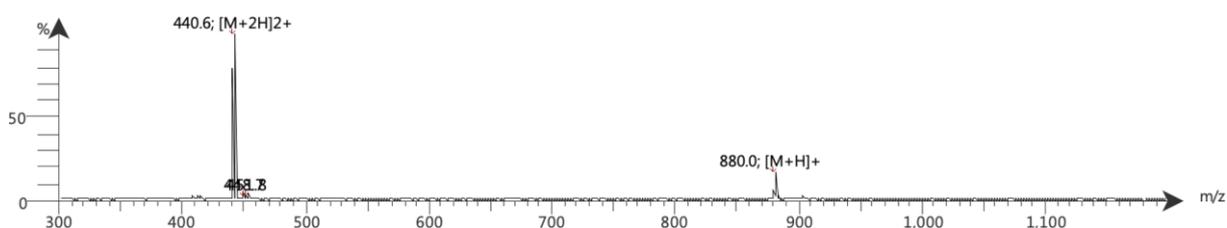


**Abbildung 45** Synthese des Dichelator Modellliganden **16** ausgehend von NODIA-Me **14**.

Für die Darstellung von NODIA-Me-Benzylamin **15** wurde zunächst die BOC-geschützte Zwischenstufe 1-(*N*-BOC-Aminomethyl)-4-aminomethylbenzol synthetisiert. Die Kopplung an NODIA-Me **14** erfolgte in DMF unter Verwendung von HATU. Nach vollständigem Eduktumsatz wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser beendet, das Lösungsmittel entfernt und die BOC-Schutzgruppen durch Zugabe einer TFA/Dichlormethan Lösung (50:50, % v/v) abgespalten. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel entfernt und **15** über eine RP-C<sub>18</sub>-Säule unter Verwendung eines Wasser/Acetonitril Gradienten aufgereinigt. Das gewünschte Produkt NODIA-Me-Benzylamin **15** konnte unter diesen Bedingungen in einer Ausbeute von 73 %

isoliert werden. Im  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  von **15** wurden alle charakteristischen Signale gefunden. Auch die LR-ESI(+)-Spektren zeigten, dass das Produkt **15** in hoher Reinheit für die folgende DOTA-Kopplung vorlag (Abb. 45).

Nach Charakterisierung von NODIA-Me-Bz **15** erfolgte im zweiten Schritt die Kopplung mit dem dreifach geschützten DOTA-Derivat DOTA-tris-*tert*.butylester in DMF mittels HATU. Nach erfolgter Aufreinigung wurde NODIA-Me-Bz-DOTA **16** in einer Ausbeute von 56 % isoliert. Die Charakterisierung des Modellkonstruktes **16** erfolgte mittels Massenspektroskopie, analytischer HPLC und NMR-Spektroskopie.



**Abbildung 46** LR-ESI(+)-Spektrum des Modellliganden **16**.

Abb. 46 zeigt das entsprechende LR-ESI(+)-Spektrum mit den erwarteten  $m/z$  für den Modellliganden **16** mit  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 880.0$  sowie für  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+} = 440.6$ . Anhand von 1D- und 2D-NMR Spektroskopie konnte Verbindung **16** eindeutig charakterisiert werden. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind die beiden Singulets der aromatischen Imidazolprotonen bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 6.98$  und  $6.83$  ppm, die aromatischen Protonen des Benzolrings bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 7.3 - 7.24$  ppm, die  $\text{CH}_2$ -Gruppen des Benzylamin Linkers sowie die beiden Methylgruppen der Imidazole bei einer chemischen Verschiebung  $\delta = 3.54$  ppm zu sehen. Die beiden  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Imidazolsubstituenten bilden ein Singulett bei  $3.45$  ppm. Die Methylengruppen der Essigsäuresubstituenten der beiden Chelatoren wurden bei den chemischen Verschiebungen  $\delta = 3.23, 3.18$  sowie bei  $3.00$  und  $2.88$  ppm in Form breiter Singulets gefunden. Die makrozyklischen  $\text{CH}_2$ -Gruppen von DOTA und NODIA-Me **14** traten in Form einer Vielzahl von Multipletts im Bereich  $\delta = 2.75 - 2.15$  ppm auf. Auch im  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektrum wurden alle erwarteten Signale identifiziert.

Besonders wichtig im Rahmen der Synthese bzw. Aufreinigung von NODIA-Me-Bz **15** und NODIA-Me-Bz-DOTA **16** war die Verwendung von Umkehrphasensäulen (RP- $\text{C}_{18}$ -Säulen), da bei einer Normalphasensäule ( $\text{SiO}_2$ /Kielselgel) enorme Ausbeuteverluste beobachtet

wurden. Gerade für die erste Stufe der Syntheseroute konnte durch die säulenchromatographische Reinigung, trotz des vollständigen Umsatzes der Edukte, lediglich eine Ausbeute von 38 % erzielt werden. Die Zugabe von 1 % DIPEA zur mobilen Phase konnte die Ausbeute zwar leicht steigern, eine vollständige Elution des Produktes **15** wurde allerdings nicht beobachtet. Zudem wurde mit zunehmender Polarität des Eluenten vermehrt Verunreinigungen der Produktfraktion bzw. eine nicht ausreichende Trennung der Fraktionen beobachtet. Gegebenenfalls können die Ausbeuteverluste auf eine Wechselwirkung des Chelators mit der stationären Phase während der säulenchromatographischen Aufreinigung erklärt werden. Die Wechselwirkung zwischen den stark basischen Aminengruppen des TACN-Rings und Imidazolresten des Chelators und  $\text{SiO}_2$  wäre eine mögliche Erklärung für die beobachteten Ausbeuteverluste.

Zusammenfassend wurde erstmalig ein Modellkonstrukt synthetisiert, welches es aufgrund des maßgeschneiderten  $\text{Cu}^{2+}$ -spezifischen BFC NODIA-Me **14** und des universellen BFC DOTA ermöglicht, die regioselektive Komplexbildung von zwei Metallkationen genauer zu untersuchen. Das Dichelator Modellkonstrukt **16** konnte so in einer Gesamtausbeute von 56 % synthetisiert werden.

### 3.2.2 Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung des Dichelator Modellliganden

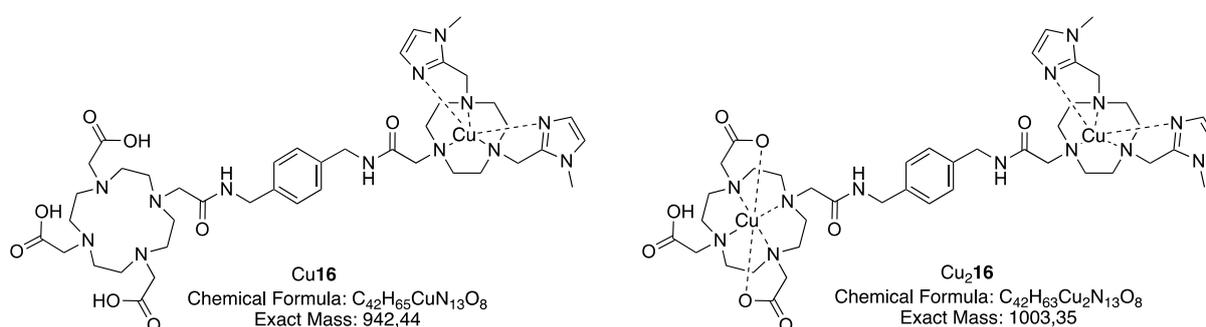
Die regioselektive Komplexbildung von zwei unterschiedlichen Übergangs- bzw. Lanthanoid/Actinoidkationen in einem Molekül unter Verwendung von zwei makrozyklischen Liganden ist in der Literatur zum aktuellen Zeitpunkt nicht beschrieben (vgl. Kap. 3.2).

Die Probleme, die mit einer Markierung von literaturbekannten BFCs mit zwei unterschiedlichen Metallkationen einhergehen, sind in der Regel eine gemischte Komplexbildung bzw. eine prozentuale Verteilung der einzelnen Metalle im jeweiligen BFC, wodurch es bspw. zu einer unvollständigen (Radio)markierung kommen kann. Durch die Synthese des Modellkonstrukts NODIA-Me-Bz-DOTA **16**, das aus dem universellen Chelator DOTA sowie NODIA-Me **14** aufgebaut ist, könnte die chemoselektive bzw. regioselektive Doppelmarkierung, aufgrund der hohen Spezifität von **14** gegenüber Cu, erstmals ermöglicht werden.

Zum Nachweis der (Regio)selektivität von  $\text{Cu}^{2+}$  bzw. der angesprochenen Metallkationen vom Typ  $\text{M}^{3+}$  (Kap. 3.2) erfolgten im folgenden Kapitel Untersuchungen der Komplexbildung von **16** mittels Massenspektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie, EPR-Spektroskopie sowie NMR-Spektroskopie. Die Untersuchungen erfolgten zunächst unter Verwendung der nicht radioaktiven Metalle, da diese in äquimolaren Stoffmengen eingesetzt werden können.

### 3.2.2.1 Massenspektrometrische Untersuchungen der selektiven Metallkomplexierung von NODIA-Me-Bz-DOTA **16**

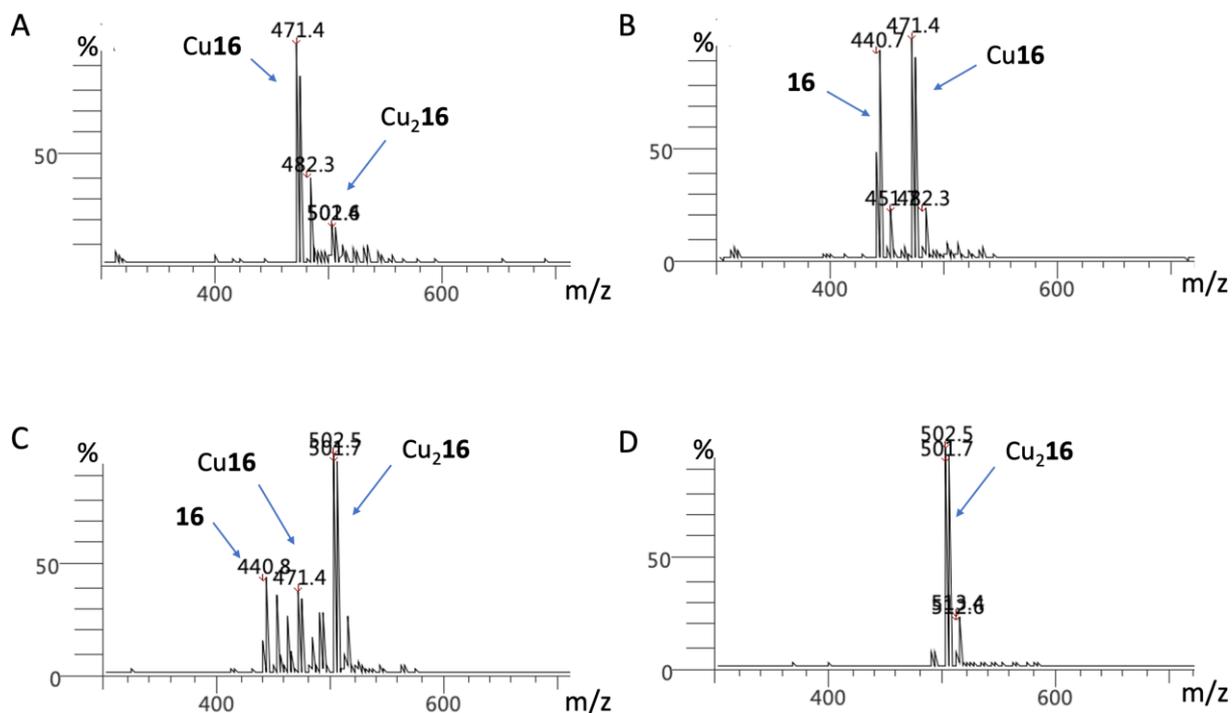
Um einen Einblick über die Komplexbildungseigenschaften des neuartigen Dichelator Modellliganden NODIA-Me-Bz-DOTA **16** zu erhalten, wurden anfänglich massenspektrometrische Untersuchung durchgeführt. Es wurde dabei zunächst überprüft, ob es bei Zugabe von  $^{nat}\text{Cu}^{2+}$  zu NODIA-Me-Bz-DOTA **16** zur Bildung von mono- bzw. -dinuklearen Kupferkomplexen oder sogar eines Gemisches aus **Cu16** und **Cu<sub>2</sub>16** kommt.



**Abbildung 47** Schematische Darstellung der zwei potentiell gebildeten  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe des Modellkonstruktes **Cu16** und **Cu<sub>2</sub>16** unter Angabe der Summenformel und der exakten Masse. Die Ladungen der Komplexe sind aus Gründen der Einfachheit nicht angegeben.

Hierzu wurde der Ligand **16** in unterschiedlichen wässrigen Lösungen vorgelegt (*vide infra*), mit einer wässrigen  $\text{CuCl}_2$  titriert und die Komplexbildung massenspektrometrisch untersucht (Abb. 48).

Für die erste Titrationsreihe wurde 0.1 M HCl (pH 1) als Lösungsmittel für die Komplexbildungsreaktion verwendet. Unter diesen stark sauren Bedingungen ist die Bildung eines  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ -Komplexes wahrscheinlich erschwert, während vorangegangene Untersuchungen von Bartholomä *et al.* zeigten, dass sich Komplexe zwischen  $\text{Cu}^{2+}$  und NODIA-Me **14** bereits bei pH 1 bilden bzw. stabil sind<sup>152</sup>.



**Abbildung 48** A) LR-ESI(+)-Spektrum von **16** bei pH 1 nach der Zugabe von 1.0 Äq.  $\text{CuCl}_2$ . Beobachtet wurde die Bildung des Komplexes **Cu16** mit  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+} = 471.4$  und  $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+} = 482.3$  sowie des Komplexes **Cu<sub>2</sub>16** mit  $[2\text{M}+\text{H}]^{2+} = 502.6$ . B) LR-ESI(+)-Spektrum von **16** nach Zugabe von 0.6 Äq.  $\text{CuCl}_2$ . C) LR-ESI(+)-Spektrum von **16** nach Zugabe von 1.0 Äq.  $\text{CuCl}_2$  bei pH 5.4. D) C) LR-ESI(+)-Spektrum von **16** nach Zugabe von 2.0 Äq.  $\text{CuCl}_2$  bei pH 5.4.

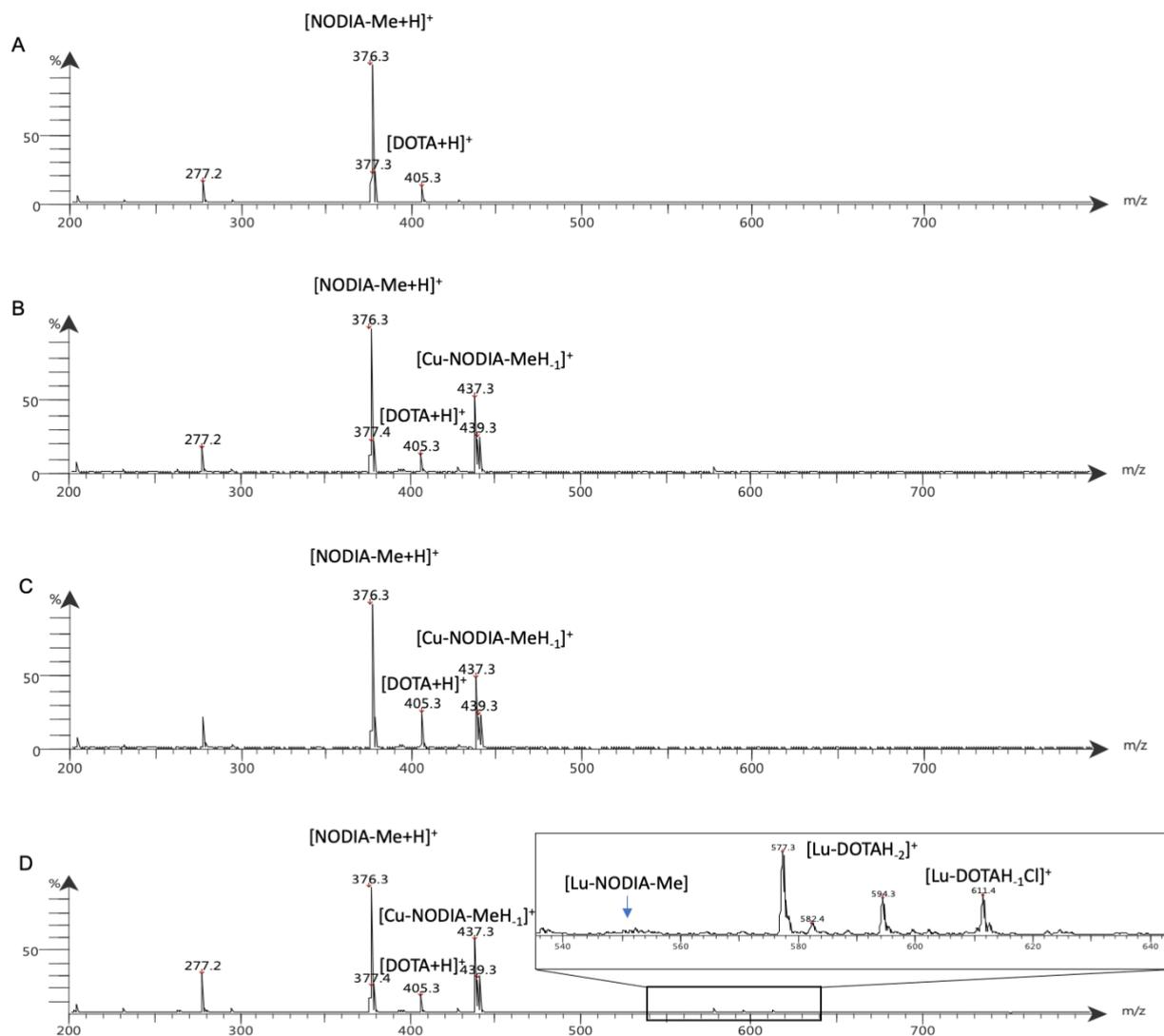
Abb. 48 A zeigt das LR-ESI(+)-Spektrum nach der Zugabe von 1.0 Äquivalenten  $\text{CuCl}_2$  zu **16** bei pH 1. Unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen wurde der mononukleare Cu-Komplex **Cu16** ( $m/z = 471.1$ ) als Hauptprodukt beobachtet wurde. Desweiteren konnten bei einer Masse von  $m/z = 482.3$  der Peak für das Natriumsalz des Kupferkomplex gefunden werden. Zu einem geringen prozentualen Anteil wurde zudem der Peak für **Cu<sub>2</sub>16** bei  $m/z = 502.6$  gefunden. Die Bildung **Cu<sub>2</sub>16** war in diesem Zusammenhang möglicherweise einem leichten Überschuss an  $\text{CuCl}_2$  geschuldet. Bei geringeren Äquivalenten an  $\text{Cu}^{2+}$  wurde der dinukleare **Cu<sub>2</sub>16** Komplex in 0.1 M HCl nicht gebildet. Von 0.2 – 0.8 Äquivalenten  $\text{Cu}^{2+}$  wurde neben dem zweifach protonierten freien Liganden **16** mit  $m/z = 440.7$  ausschließlich die Zunahme an **Cu16** beobachtet (Abb. 48 B). Aus diesem Experiment wurde deutlich, dass bei pH 1 keine signifikante Bildung von **Cu<sub>2</sub>16** erfolgte. Daraus lässt sich schließen, dass der Cu(DOTA) Komplex sich unter stark sauren Bedingungen nicht merklich bildet.

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Komplexbildung zwischen **16** und  $\text{Cu}^{2+}$  zu untersuchen, wurden ebenfalls Titrations in Ammoniumacetatpuffer bei pH 5.4 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert war ein anderes Verhalten zu beobachten. Bereits bei weniger als einem Äquivalent an  $\text{Cu}^{2+}$  wurde sowohl die Bildung von  $\text{Cu16}$  als auch von  $\text{Cu}_2\mathbf{16}$  beobachtet (Abb. 48 C). Bei einem Äquivalent wurde ein Gemisch aus freiem Ligand **16** und dessen Natriumaddukt,  $\text{Cu16}$  und  $\text{Cu}_2\mathbf{16}$  gefunden. Als Hauptprodukt bildete sich der dinukleare  $\text{Cu}_2\mathbf{16}$  Komplex mit  $m/z = 502.7$  (Abb. 48 C). Nach der Zugabe von zwei Äquivalenten wurde unter diesen Reaktionsbedingungen ausschließlich der dinukleare  $\text{Cu}_2\mathbf{16}$  Komplex gebildet (Abb. 48 D).

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der postulierten pH-Abhängigkeit der Komplexbildung von DOTA und NODIA-Me **14**. Bei pH 5.4 bildet sich der  $\text{Cu}(\text{DOTA})$  Komplex bereits bei Raumtemperatur und führt daher zur Bildung von mehreren Kupferspezies. Diese Reaktionsbedingungen sind demnach ungeeignet für die regio- bzw. chemoselektive Bildung eines mononuklearen Kupferkomplexes des Modellliganden **16**.

Bei einem pH-Wert von 1 konnte hingegen die fast exklusive Bildung von  $\text{Cu16}$  beobachtet werden, während der dinukleare Komplex  $\text{Cu}_2\mathbf{16}$  sich lediglich zu einem sehr geringen Anteil bildete. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte so erstmalig die chemoselektive Bildung eines mononuklearen Kupferkomplexes unter Verwendung eines Dichelatormodellkonstrukts gezeigt werden.

Um die Selektivität des BFCs NODIA-Me **14** für  $\text{Cu}^{2+}$  gegenüber DOTA zu demonstrieren, wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt. In diesem Versuch wurde eine äquimolare Mischung der Chelatoren NODIA-Me **14** und DOTA mit den Metallkationen  $\text{Cu}^{2+}$  sowie  $\text{Lu}^{3+}$  unter verschiedenen Reaktionsbedingungen bei pH 5.4 inkubiert und anschließend die Komplexbildung massenspektrometrisch untersucht (Abb. 49).



**Abbildung 49** Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung der selektiven Metallkomplexierung zwischen den Chelatoren DOTA und NODIA-Me **14** mit den Metallsalzen CuCl<sub>2</sub> bzw. LuCl<sub>3</sub> bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. A) LR-ESI(+)-Spektrum der beiden freien Liganden vor Inkubation mit Metallsalzen. B) LR-ESI(+)-Spektrum nach Zugabe von 1 Äq. Cu<sup>2+</sup>. C) LR-ESI(+)-Spektrum der beiden Chelatoren nach Zugabe von 1 Äq. Cu<sup>2+</sup> und 1 Äq. Lu<sup>3+</sup> bei Raumtemperatur. D). LR-ESI(+)-Spektrum der beiden Chelatoren nach (gleichzeitiger) Zugabe von 1 Äq. Cu<sup>2+</sup> und 1 Äq. Lu<sup>3+</sup> nach Inkubation bei 95 °C.

Abb. 49 A zeigt das LR-ESI(+)-Spektrum der Mischung der beiden BFC DOTA und NODIA-Me **14** in Ammoniumacetat vor der Inkubation mit den Metallsalzen. Wie aus Abbildung 49 B ersichtlich, wurde nach Zugabe eines Äquivalents CuCl<sub>2</sub> ausschließlich der [Cu(NODIA-Me)] Komplex Cu**14** gebildet (m/z = 437.3). Die Bildung von [Cu(DOTA)], wurde unter den vorliegenden Markierungsbedingungen (Inkubationszeit < 1 min, Raumtemperatur, pH 5.4) nicht beobachtet. Im Anschluss wurde ein Äquivalent LuCl<sub>3</sub> bei Raumtemperatur dazu gegeben und per Massenspektrometrie untersucht (Abbildung 49 C). Es wurde keine

Änderung festgestellt, was darauf schliessen lässt, dass für die Bildung von  $\text{Lu}^{3+}$  Komplexen, insbesondere des  $\text{Lu}(\text{DOTA})$  Komplexes, erhöhte Temperaturen notwendig sind. Im Anschluss wurde das Gemisch für 15 min bei 95 °C erhitzt (Abbildung 49 D). Nach Erwärmen des Gemisches wurde die Bildung des  $\text{Lu}(\text{DOTA})$ -Komplex ( $m/z = 577.3$ ) sowie des  $[\text{Lu}(\text{DOTA})\text{Cl}]$  Komplexes mit einem  $m/z = 611.4$  beobachtet. Eine Transchelatierung wurde weder für den  $\text{Cu}(\text{NODIA-Me})$  noch für den  $\text{Lu}(\text{DOTA})$  Komplex beobachtet, was für die Stabilität der beiden Komplexe spricht. Im LR-ESI-(+)-Spektrum wurde weder der  $\text{Cu}(\text{DOTA})$  Komplex mit einem  $m/z = 464.1$  noch der  $[\text{Lu}(\text{NODIA-Me})]$  Komplex mit einem  $m/z = 551.2$  gefunden. Wie somit aus den Spektren hervorging, wurden hauptsächlich der **Cu14** und der  $[\text{Lu}(\text{DOTA})]$ -Komplex gebildet, bei gleichzeitigem Ausbleiben der Transchelation von  $\text{Cu}^{2+}$  zu DOTA bzw. von  $\text{Lu}^{3+}$  zu NODIA-Me, was die selektive Komplexierung der beiden Metallkationen in dem jeweiligen BFC bestätigte.

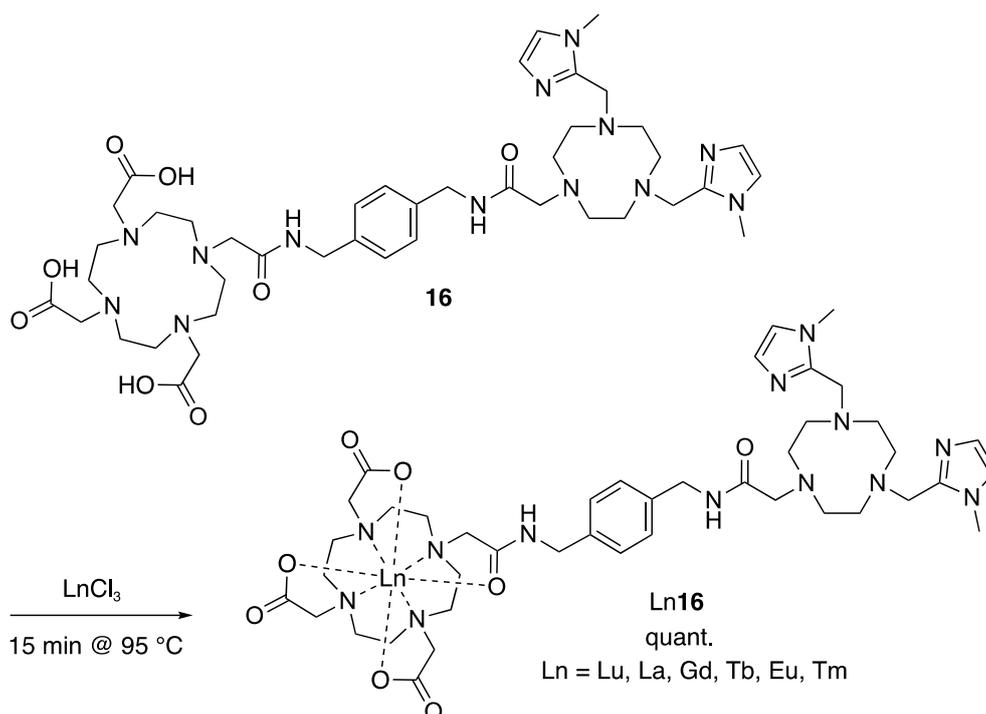
Durch die massenspektrometrischen Untersuchungen konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die chemoselektive Bildung des mononuklearen Kupferkomplexes **Cu16** unter geeigneten Reaktionsbedingungen möglich ist. In einem weiteren Experiment mit einer äquimolaren Mischung an DOTA und NODIA-Me **14** konnte zudem gezeigt werden, dass  $\text{Cu}^{2+}$  bevorzugt durch NODIA-Me **14** gebunden wird, wohingegen das sterisch anspruchsvollere  $\text{Lu}^{3+}$  Kation exklusiv durch den BFC DOTA komplexiert wird. Diese Ergebnisse bildeten im Folgenden die Grundlage für die Synthese heterodinuklearer Metallkomplexe unter Verwendung des Dichelatormodellkonstrukts.

### 3.2.2.2 Synthese heterodinuklearer Metallkomplexe vom Typ [CuLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)]

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Metallkomplexierung von Dichelator Modellkonstrukts **16** mit  $\text{Cu}^{2+}$  zeigten, dass bei pH 1 die Bildung des mononuklearen Kupferkomplexes beobachtet wurde, während bei pH 5.4 die Bildung eines Gemisches aus  $\text{Cu16}$  und  $\text{Cu}_2\mathbf{16}$  erfolgte. In einem weiteren Experiment mit einem äquimolaren Gemisch an DOTA und NODIA-Me **14** wurde bei pH 5.4 die selektive Bildung der Metallkomplexe [Lu(DOTA)] und [Cu(NODIA-Me)] nachgewiesen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse und den Arbeiten von Wienhoff<sup>115</sup>, Wurzer<sup>116</sup> oder Notni *et al.*<sup>117</sup> wurde in diesem Kapitel untersucht, ob eine selektive Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ln}^{3+}$  auch unter Verwendung des Dichelatormodellkonstruktes **16** beobachtet wird. In Analogie zu den Arbeiten von Wienhoff *et al.* erfolgte zunächst die Umsetzung von **16** mit  $\text{Ln}^{3+}$  bei erhöhter Temperatur, gefolgt von der Zugabe von  $\text{CuCl}_2$  bei Raumtemperatur<sup>115</sup>. Bei der umgekehrten Reihenfolge (Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  bei Raumtemperatur gefolgt von der  $\text{Ln}^{3+}$  Komplexierung bei erhöhter Temperatur) könnte es eventuell zu einer Transchelatierung des  $\text{Cu}^{2+}$  während des Heizschrittes kommen, da bei pH 5.4 die Bildung des dinuklearen  $\text{Cu}^{2+}$  Komplexes  $\text{Cu}_2\mathbf{16}$  beobachtet wurde (siehe Kapitel 3.2.2.1). Durch die obige Reihenfolge sollte so zunächst der BFC DOTA mit  $\text{Ln}^{3+}$  erhöhter Temperatur beladen werden, gefolgt von der Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  bei Raumtemperatur.

Für die Untersuchung der Komplexbildung wurde das Dichelatormodellkonstrukt **16** in Ammoniumacetatpuffer (1 M, pH 5.4) gelöst, 2 Äquivalente des entsprechenden Lanthanoidsalzes  $\text{LnCl}_3$  zugegeben und für 15 min bei 95 °C inkubiert (Abb. 50). Direkt nach Beendigung der Reaktionszeit wurde der Markierungsansatz über eine  $\text{C}_{18}$  Sep Pak Kartusche aufgereinigt und charakterisiert. Als Lanthanoide wurden die medizinisch interessanten  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  und  $\text{Tm}^{3+}$ , das MR-aktive  $\text{Gd}^{3+}$  sowie  $\text{Lu}^{3+}$  gewählt. Da vom Alphaemitter  $^{225}\text{AcAc}^{3+}$  kein stabiles Isotop bekannt ist, wurde zudem die Komplexbildung mit Lanthan untersucht, da das  $\text{La}^{3+}$ -Kation aufgrund der Actinoidenkontraktion einen vergleichbaren Ionenradius zu  $^{225}\text{AcAc}^{3+}$  besitzt.



**Abbildung 50** Synthese der Lanthanoidkomplexe vom Typ [Ln(NODIA-Me-Bz-DOTA)]/ Ln**16**.

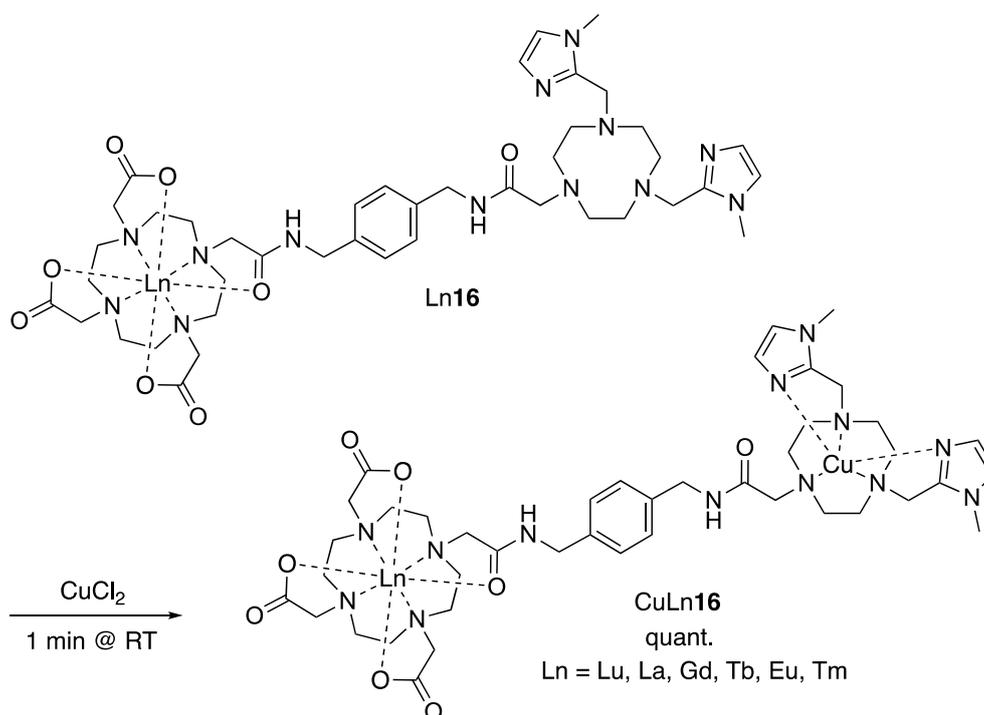
**Tabelle 11** Auflistung der theoretischen und gemessenen Massen, der HPLC-Retentionszeiten der [Ln(NODIA-Me-Bz-DOTA)]/ Ln**16** Komplexe nach erfolgter C<sub>18</sub>-Sep Pak Aufreinigung.

| Komplex      | Theoretische<br>Summenformel                                      | LR-ESI-MS m/z für [M + H] <sup>+</sup> und<br>[M + 2H] <sup>2+</sup> | Retentionszeit<br>analytische HPLC |
|--------------|---|--|------------------------------------|
| Lu <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> Lu | Ber.: 1052.4, 526.6 Gef.: 1052.4, 526.7                              | 8.43 min                           |
| La <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> La | Ber.: 1016.4, 508.7 Gef.: 1016.8, 508.8                              | 8.32 min                           |
| Gd <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> Gd | Ber.: 1035.4, 518.2 Gef.: 1035.4, 517.7                              | 8.23 min                           |
| Tb <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> Tb | Ber.: 1036.4, 518.7 Gef.: 1036.4, 518.7                              | 8.13 min                           |
| Eu <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> Eu | Ber.: 1030.4, 515.7 Gef.: 1030.1, 515.3                              | 8.12 min                           |
| Tm <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> Tm | Ber.: 1046.4, 523.7 Gef.: 1046.4, 523.7                              | 8.23 min                           |

Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde ausschließlich die chemoselektive Bildung der jeweiligen mononuklearen Ln-Komplexe beobachtet. Die berechneten und gemessenen m/z Verhältnisse der Komplexe sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Bildung der Komplexe vom Typ Ln<sub>2</sub>**16** wurde nicht beobachtet, was mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Vorversuche aus Kap 3.2.2.1 im Einklang stand. Auch die Inkubation von **16** mit 5 Äquivalenten LnCl<sub>3</sub> führte nicht zur Bildung der homodinuklearen Metallkomplexe, was mittels analytischer HPLC und Massenspektrometrie bestätigt werden konnte. Für alle Komplexe wurden im LR-

ESI-(+)-Spektrum dabei die jeweiligen berechneten Massen  $m/z$  für  $[M + H]^+$  und  $[M + 2H]^{2+}$  gefunden (Tabelle 11). Alle Produkte wurden in quantitativer Ausbeute isoliert.

Nachdem unter den angegebenen Reaktionsbedingungen (pH 5.4, 1 M Ammoniumacetat-puffer, Inkubation für 15 min bei 95 °C) die chemoselektive Bildung der mononuklearen Lanthanoidkomplexen beobachtet werden konnte, wurde anschließend die Komplexbildung zwischen Ln16 und  $Cu^{2+}$  untersucht. Hierzu wurde Ln16 ebenfalls in Ammoniumacetatpuffer vorgelegt und anschließend 1.5 Äquivalente  $CuCl_2$  bei Raumtemperatur zugegeben (Abb. 51).



**Abbildung 51** Synthese der heterodinuklearen Metallkomplexe vom Typ  $[CuLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)] / CuLn16$  ausgehend von Ln16.

**Tabelle 12** Auflistung der theoretischen und gemessenen Massen, der HPLC-Retentionszeiten der [CuLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)] / CuLn**16** Komplexe nach erfolgter C<sub>18</sub>-Sep Pak Aufreinigung.

| Komplex        | Theoretische Summenformel   | LR-ESI-MS m/z für<br>M <sup>2+</sup> | Retentionszeit HPLC |
|----------------|---|--------------------------------------|---------------------|
| CuLu <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> LuCu | Ber.: 557.2 Gef.: 557.6              | 10.4 min            |
| CuLa <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> LaCu | Ber.: 539.2 Gef.: 539.5              | 10.9 min            |
| CuTb <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> TbCu | Ber.: 549.2 Gef.: 548.8              | 11.2 min            |
| CuEu <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> EuCu | Ber.: 546.2 Gef.: 546.0              | 11.0 min            |
| CuGd <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> GdCu | Ber.: 548.7 Gef.: 548.2              | 10.9 min            |
| CuTm <b>16</b> | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub> TmCu | Ber.: 554.2 Gef.: 554.5              | 11.2 min            |

Die massenspektrometrische Charakterisierung dieser Metallkomplexierung zeigte ausschließlich die chemoselektive Bildung der heterodinuklearen Komplexe vom Typ CuLn**16**. In Tabelle 12 sind die berechneten und gemessenen m/z Verhältnisse der entsprechenden Komplexe aufgeführt. Die Bildung der Komplexe Cu**16** und Cu<sub>2</sub>**16** wurde nicht beobachtet. Die Bildung von lediglich einer Spezies konnte ebenfalls mittels analytischer HPLC nachgewiesen werden.

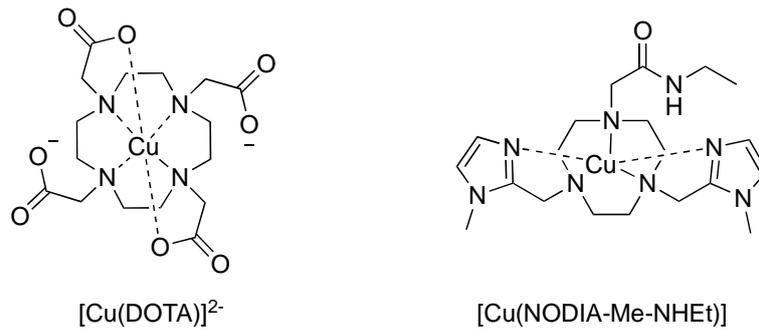
Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel erstmalig die chemoselektive Bildung heterodinuklearer Metallkomplexe unter Verwendung des Dichelator Modellkonstruktes beobachtet. Auf Basis der massenspektrometrischen Untersuchungen aus Kapitel 3.2.2.1 erfolgte dazu zunächst die Synthese der mononuklearen Lanthanoidkomplexe Ln**16** in Ammoniumacetat-Puffer bei pH 5.4. Nach anschließender Zugabe von CuCl<sub>2</sub> konnten die heterodinuklearen Komplexe CuLn**16** in quantitativer Ausbeute isoliert werden. Weder die Untersuchungen der Metallkomplexe mittels analytischer HPLC noch die massenspektrometrischen Daten zeigten die Bildung von Nebenprodukten, bspw. Ln<sub>2</sub>**16**, Cu**16** oder Cu<sub>2</sub>**16**.

Obwohl die chemoselektive Darstellung der heterodinuklearen Komplexe CuLn**16** in diesem Kapitel erfolgreich nachgewiesen werden konnte, konnte keine Aussage über die regioselektive Komplexierung der Metallkationen getroffen werden. Zwar legten die durchgeführten Experimente, zusammen mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.2.1, die

Vermutung nahe, dass die Metallkomplexierung der Lanthanoidkationen durch den BFC DOTA und die von  $\text{Cu}^{2+}$  durch NODIA-Me erfolgte, ein eindeutiger Nachweis für die regioselektive Komplexierung der jeweiligen Metallkationen ist durch diese Methoden nicht möglich. Daher wurden weitere spektroskopische Untersuchungen mittels UV/Vis, NMR und EPR Spektroskopie durchgeführt, um die regioselektive Komplexbildung zu bestätigen.

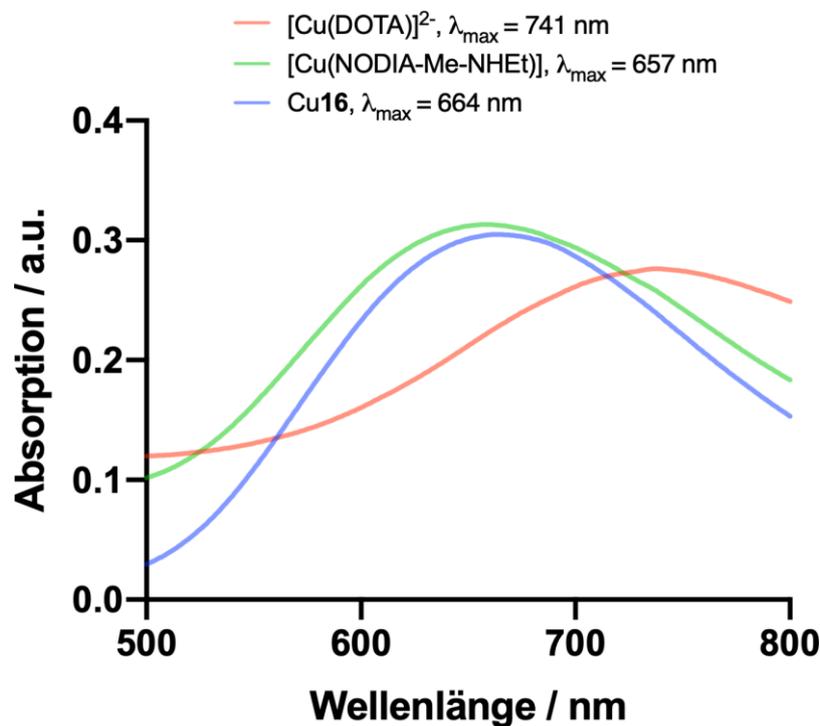
### 3.2.2.3 UV/Vis-Spektroskopische Untersuchungen der regioselektiven Metallkomplexierung durch das Dichelatormodellkonstrukt **16**

In den Kapiteln 3.2.2.1 und 3.2.2.2 wurde die chemoselektive Bildung des mono-Kupferkomplexes Cu**16** bzw. der heterodinuklearen Metallkomplexe CuLn**16** beobachtet. Dennoch konnte durch die massenspektrometrischen Untersuchungen noch keine Aussagen über die regioselektive Komplexierung der Metallkationen Cu<sup>2+</sup> und Ln<sup>3+</sup> getroffen werden. Eine Möglichkeit die regioselektive Bindung der Metallkationen im jeweiligen Komplexbildner zu bestätigen, ist die UV/Vis-Spektroskopie. Metallkomplexe mit Cu<sup>2+</sup>-Kationen zeigen, je nach Koordinationssphäre, im Bereich von 550-780 nm eine für den d-d-Übergang charakteristische Absorption und können somit spektroskopisch charakterisiert werden. Um die regioselektive Metallkomplexierung im Modellkonstrukt **16** nachzuweisen, wurden zunächst die Cu-Komplexe von DOTA und NODIA-Me **14** als auch des Ethylamids von **14** NODIA-Me-NHEt hergestellt<sup>149</sup>. Das entsprechende Amid von NODIA-Me wurde hergestellt, um die Konjugation an einen Zielvektor über eine Peptidbindung zu imitieren. Im Falle von NODIA-Me **14** kann die freie Carbonsäure an der Komplexbildung teilnehmen, was zu einer Änderung des Absorptionsmaximums führen kann. Die maximale Absorptionswellenlänge des d-d-Übergangs der Komplexe [Cu(DOTA)]<sup>2-</sup> sowie TACN-basierten Cu-Komplexen mit Imidazolsubstituenten (Abb. 52) sind literaturbekannt und unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen Koordinationssphäre von Cu<sup>2+</sup> und den damit verbundenen unterschiedlichen Absorptionsmaxima für den d-d-Übergang deutlich voneinander<sup>152</sup>. Somit können die entsprechenden UV/Vis Spektren als Referenz für den Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung im Modellliganden **16** eingesetzt werden<sup>144,151</sup>.



**Abbildung 52** Schematische Darstellung der Kupferkomplexe [Cu(DOTA)]<sup>2-</sup> und [Cu(NODIA-Me-NHEt)], die als Referenz der UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen verwendet wurden.

Für den Vergleich der Absorptionsmaxima wurden die Komplexe des Dichelatormodellkonstrukts Cu16 und CuLu16, nach den Vorschriften aus Kapitel 3.2.2.1 bzw. 3.2.2., hergestellt. Durch den Vergleich mit [Cu(DOTA)]<sup>2-</sup> bzw. [Cu(NODIA-Me-NHEt)] können dann Rückschlüsse auf die Koordinationssphäre des Cu<sup>2+</sup> gewonnen werden. Vor den jeweiligen Messungen erfolgte die Charakterisierung der Komplexe mittels Massenspektrometrie.



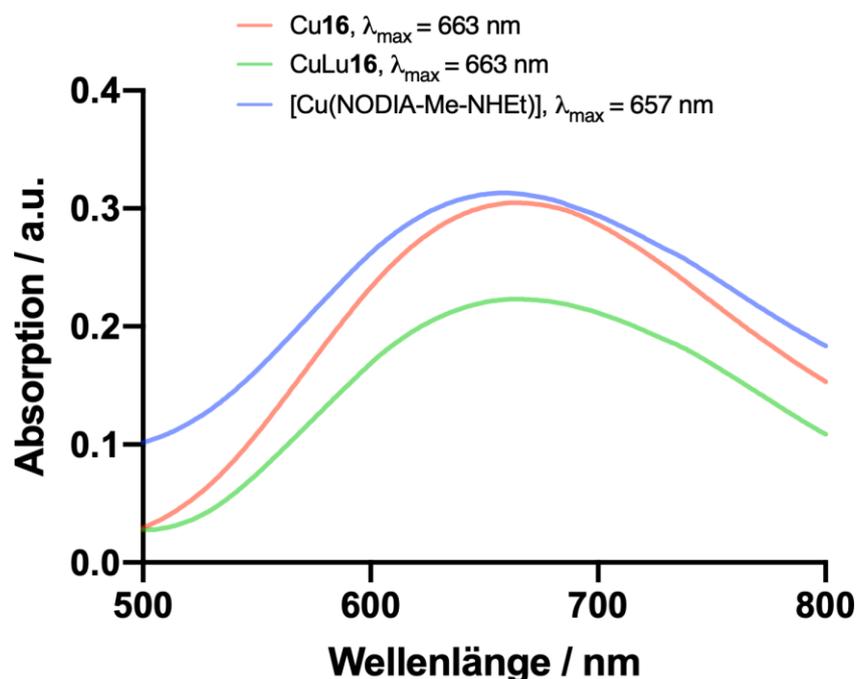
**Abbildung 53** Vergleich der UV/Vis-Spektren der Komplexe [Cu(DOTA)]<sup>2-</sup> (rot), [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (grün) und Cu16 (blau) in wässriger Lösung (c = 5 mM).

Abb. 53 zeigt die Absorptionsmaxima für die d-d-Übergänge der Komplexe  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ ,  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$  und **Cu16**. Die jeweiligen Absorptionsmaxima lagen bei  $\lambda_{max} = 657 \text{ nm}$  für  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$ , bei  $\lambda_{max} = 741 \text{ nm}$  für  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$  und bei  $\lambda_{max} = 664 \text{ nm}$  für **Cu16**. Die beobachteten Absorptionsmaxima von **Cu16** und  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$  standen im Einklang mit den bereits publizierten Daten von Bartholomä *et al.*<sup>152</sup>. Wie daraus hervorgeht, wurden sowohl für  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$  als auch für **Cu16** ähnliche Absorptionsmaxima für den d-d-Übergang gefunden, während das Maximum für den d-d-Überhang des  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]$ -Komplex bei wesentlich höheren Wellenlängen beobachtet wurde.

Da die Synthese des Komplexes **Cu16** in Kapitel 3.2.2.1 in 0.1 M HCl erfolgte, wurden die Absorptionsmaxima nicht nur in Wasser, sondern auch in 0.1 M HCl gemessen, um zu Einfluss des Lösungsmittels bzw. des pH-Wertes zu untersuchen. Auch in 0.1 M HCl wurden für **Cu16** und  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$  identische Wellenlängen für das Absorptionsmaximum gefunden, während das Absorptionsmaximum von  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$  bei deutlich höheren Wellenlängen lag. Die jeweiligen Absorptionsmaxima in 0.1 M HCl waren bei  $\lambda_{max} = 657 \text{ nm}$  für  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$ , bei  $\lambda_{max} = 708 \text{ nm}$  für  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$  und bei  $\lambda_{max} = 661 \text{ nm}$  für **Cu16** (Tabelle 13).

Der Vergleich der Absorptionsmaxima von  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$ ,  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$  und **Cu16** legte somit nahe, dass die Komplexbildung des  $\text{Cu}^{2+}$ -Kations regioselektiv im NODIA-Me Teil des Dichelatormodellkonstruktes erfolgte.

Eine identische Beobachtung konnte die Absorptionsmaxima der d-d-Übergänge zwischen  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$ , **Cu16** und **CuLu16** gemacht werden (Abb. 54).



**Abbildung 54** Vergleich der UV/Vis-Spektren der Komplexe [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (blau), CuLu16 (grün) und Cu16 (rot) in wässriger Lösung ( $c = 5$  mM).

Die Absorptionsmaxima in wässriger Lösung lagen bei  $\lambda_{\max} = 657$  nm für [Cu(NODIA-Me-NHEt)], bei  $\lambda_{\max} = 663$  nm für CuLu16 und bei  $\lambda_{\max} = 664$  nm für Cu16 (Tabelle 13).

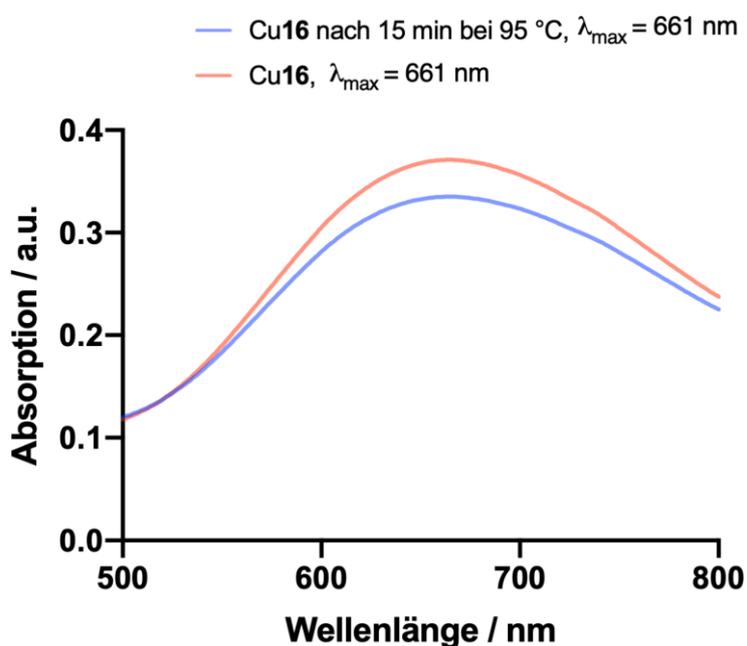
**Tabelle 13** Absorptionsmaxima der d-d Übergänge der untersuchten Kupferkomplexe [Cu(DOTA)]<sup>2-</sup>, [Cu(NODIA-Me-NHEt)] und Cu16 in verschiedenen Lösungsmitteln.

| Komplex                  | Lösungsmittel    | $\lambda_{\max}$ d-d-Übergang |
|--------------------------|------------------|-------------------------------|
| [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> | 0.1 M HCl        | 708 nm                        |
| [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> | H <sub>2</sub> O | 741 nm                        |
| [Cu(NODIA-Me-NHEt)]      | 0.1 M HCl        | 657 nm                        |
| [Cu(NODIA-Me-NHEt)]      | H <sub>2</sub> O | 657 nm                        |
| Cu16                     | 0.1 M HCl        | 661 nm                        |
| Cu16                     | H <sub>2</sub> O | 664 nm                        |
| CuLu16                   | H <sub>2</sub> O | 663 nm                        |

Sowohl für Cu16 als auch für CuLu16 wurde folglich kein signifikanter Unterschied der Absorptionsmaxima zu [Cu(NODIA-Me-NHEt)] beobachtet. Somit konnte in diesem Experiment nachgewiesen werden, dass die Komplexierung des Lu<sup>3+</sup> durch das

Dichelatormodellkonstrukt **16** keinen Einfluss auf die Bindung des  $\text{Cu}^{2+}$  hatte. Dies bestätigt sowohl die regioselektive Komplexierung des  $\text{Cu}^{2+}$  im NODIA-Me Teil als auch die regioselektive Chelation des  $\text{Lu}^{3+}$  im DOTA Teil des Modellkonstrukts. Zusätzlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es zu keiner Transchelation zwischen den beiden Metallkationen kommt.

Um eine mögliche Transchelatierung des  $\text{Cu}^{2+}$ -Kations vom BFC NODIA-Me zum BFC DOTA des Modellkonstruktes **16** vollends auszuschließen, wurde Cu**16** hergestellt, das UV/Vis-Spektrum aufgenommen und anschließend die Probe für 15 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurde erneut das UV/Vis-Spektrum aufgenommen, um zu überprüfen, ob eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen erfolgte (Abb. 55).



**Abbildung 55** UV/Vis-Spektren von Cu**16** vor (rot) und nach (blau) Inkubation bei 95 °C.

Sowohl vor als auch nach der Inkubation bei 95 °C lag das beobachtete Maximum für den d-d-Übergang bei einer Wellenlänge von 661 nm. Eine Transchelatierung des  $\text{Cu}^{2+}$ -Kations vom BFC NODIA-Me Teil zum BFC DOTA Teil des Modellkonstruktes **16** konnte somit ausgeschlossen werden, was auf eine höhere thermodynamische oder kinetische Stabilität des Cu(NODIA-Me) Komplexes im Vergleich zum Cu(DOTA) Komplex hindeutet.

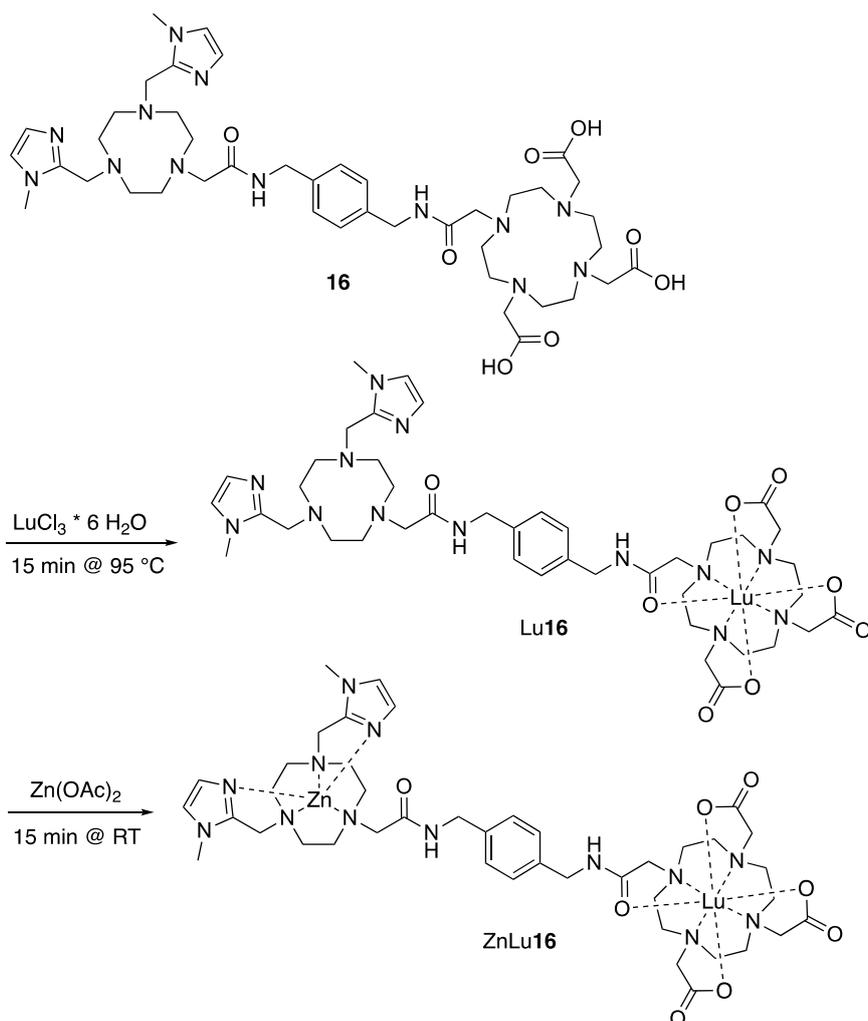
Obwohl die Komplexierung von zwei unterschiedlichen Metallen in einem Dichelatorsystem bereits literaturbekannt ist<sup>115-118</sup> (vgl. Kap. 3.2), lieferten die in dieser Arbeit durchgeführten UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen erstmalig den eindeutigen Nachweis einer regioselektiven Metallkomplexierung. Die Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  erfolgt eindeutig im NODIA-Me Teil und von  $\text{Lu}^{3+}$  im DOTA Teil des Modellkonstruktes **16**. Für die d-d-Übergänge von **Cu16**, **CuLu16** und  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$  wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet, während das Absorptionsmaximum von  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$  bei deutlich höheren Wellenlängen gefunden wurde.

### 3.2.2.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen des Modellkonstruktes **16** und der Metallkomplexe **Lu16** sowie **ZnLu16**

In Kapitel 3.2.2.3 konnte die regioselektive Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  im NODIA-Me Teil des Modellkonstruktes **16** mittels UV/Vis-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit die regioselektive Bindung der Metallkationen zu bestätigen, ist die Charakterisierung der Komplexe mittels NMR-Spektroskopie.

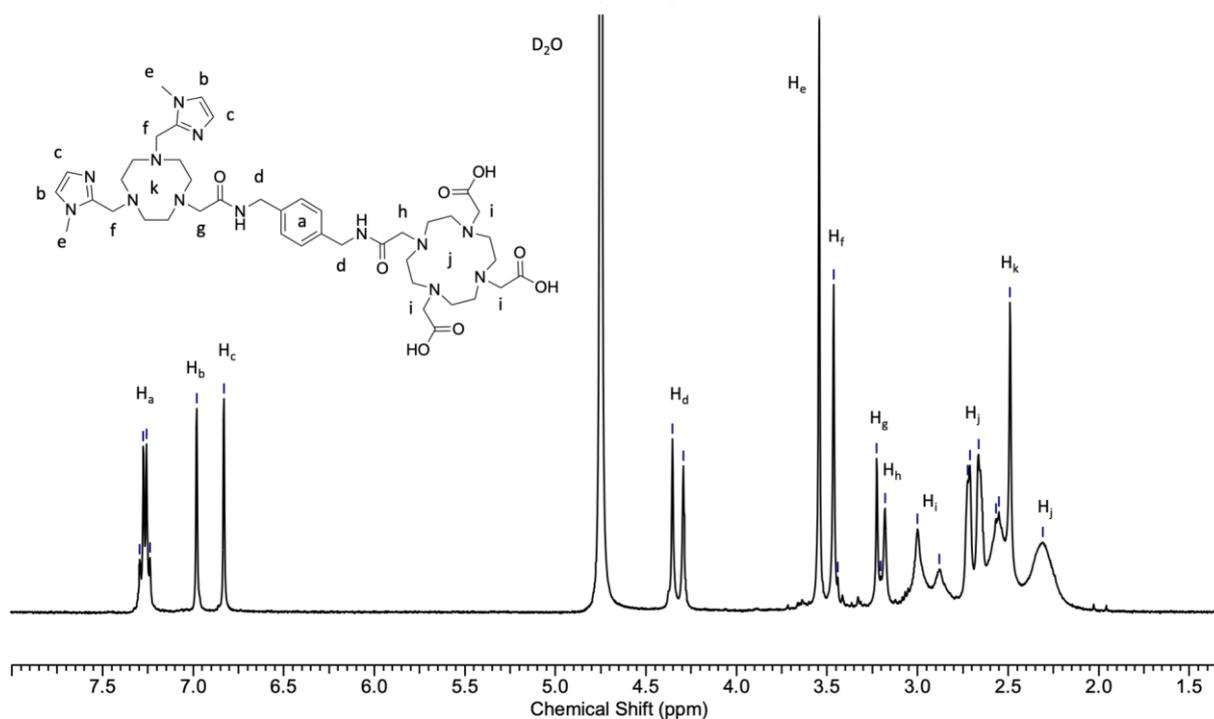
Grundlage für dieses Experiment bildete die NMR-spektroskopische Untersuchung des BFC NODIA-Me **14** bzw. seines Zinkkomplexes von Bartholomä *et al.*. Diese zeigten beim Vergleich der NMR-Spektren des metallfreien Liganden und des Zn-Komplexes eine eindeutige Verschiebung der Imidazolresonanzen im aromatischen Bereich<sup>149</sup>. Es wurde der  $\text{Zn}^{2+}$ -Komplex anstelle des  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes verwendet, da dieser aufgrund der  $d^{10}$ -Elektronenkonfiguration diamagnetisch und somit für eine Untersuchung mittels NMR geeignet ist<sup>149</sup>.

Auch der Nachweis der regioselektiven Komplexierung des  $\text{Zn}^{2+}$ -Kations im NODIA-Me Teil von **16** könnte somit anhand dieser Signalaufspaltung nachgewiesen werden. Für die Untersuchungen der regioselektiven Metallkomplexierung mittels NMR-Spektroskopie wurden dafür zunächst, gemäß Kapitel 3.2.2.2, die beiden Metallkomplexe **Lu16** und **ZnLu16** synthetisiert (Abb. 56).



**Abbildung 56** Synthese der Metallkomplexe Lu16 und ZnLu16 für die NMR-Spektroskopie.

Nach erfolgter Synthese wurden die Komplexe mittels 1D und 2D-NMR-Spektroskopie untersucht und mit denen des metallfreien Modellkonstruktes **16** (vgl. Abb. 57) verglichen.

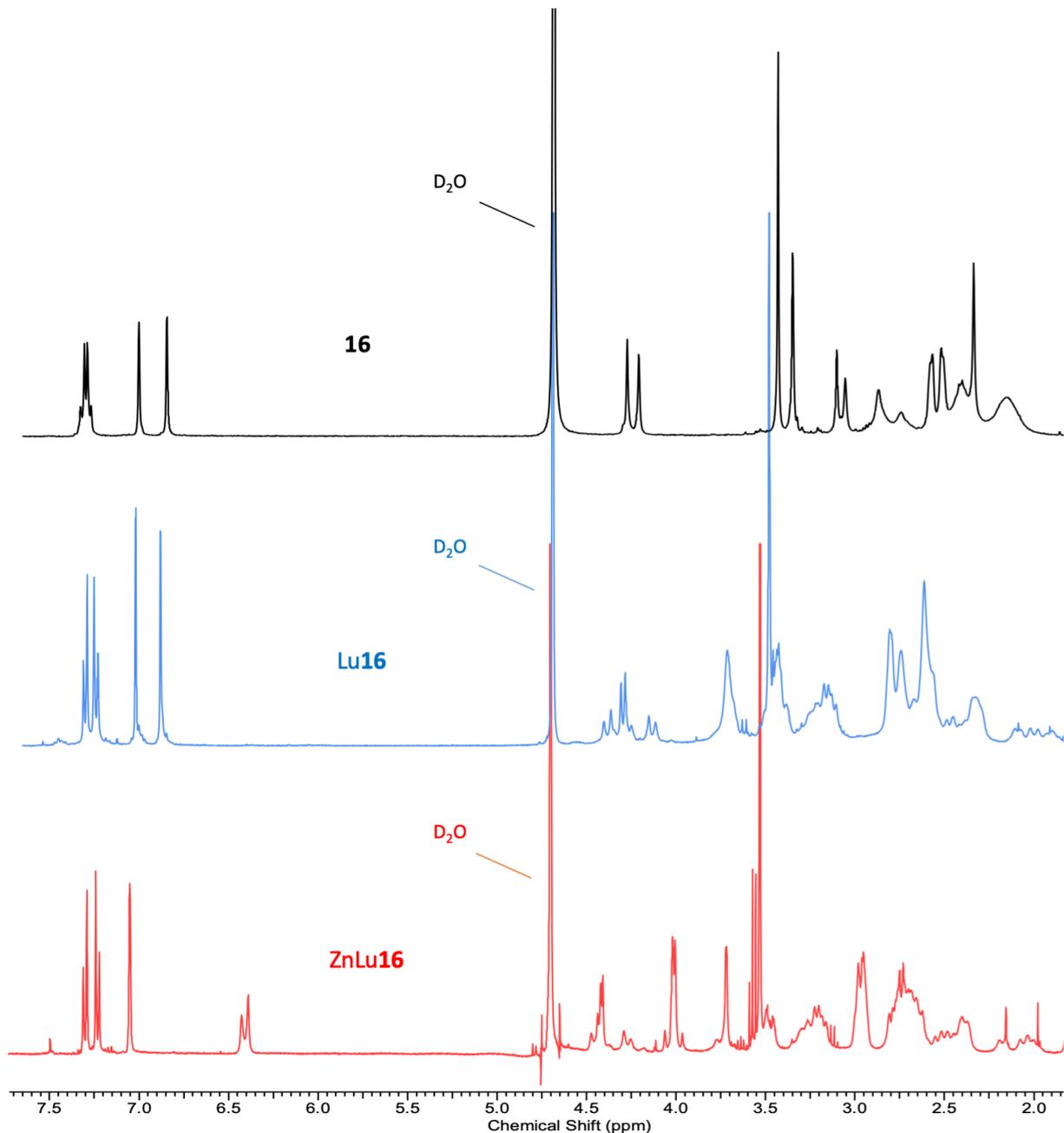


**Abbildung 57**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von **16** in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{pH} > 12$ ) unter Zuordnung der entsprechenden Signale.

Abb. 57 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Modellkonstruktes **16**. Die eindeutige Zuordnung der Signale erfolgte mittels 2D-NMR-Spektroskopie. Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden für das Modellkonstrukt **16** im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum alle erwarteten Signale gefunden. Charakteristisch waren die beiden Singulets der aromatischen Imidazolprotonen bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 6.98$  ( $\text{H}_b$ ) und  $6.83$  ppm ( $\text{H}_c$ ), die aromatischen Protonen des Benzolrings bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 7.3 - 7.24$  ppm ( $\text{H}_a$ ), die  $\text{CH}_2$ -Gruppen des Benzylamin Linkers ( $\delta = 7.3 - 7.24$  ppm), die beiden Methylgruppen der Imidazole bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 3.54$  ppm ( $\text{H}_e$ ) und die  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Imidazolsubstituenten bei  $3.45$  ppm ( $\text{H}_f$ ). Die Methylengruppen der Essigsäureamide von NODIA-Me und DOTA wurden bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta = 3.23$  ( $\text{H}_g$ ) sowie  $3.18$  ppm ( $\text{H}_h$ ) gefunden. Die  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Essigsäuresubstituenten von DOTA traten in Form eines Multipletts bei  $3.00 - 2.88$  ppm ( $\text{H}_i$ ) auf. Die makrozyklischen  $\text{CH}_2$ -Gruppen von DOTA und NODIA-Me **14** waren in Form von Multipletts im Bereich  $\delta = 2.75 - 2.15$  ppm ( $\text{H}_j + \text{H}_k$ ) zu sehen (Abb. 57).

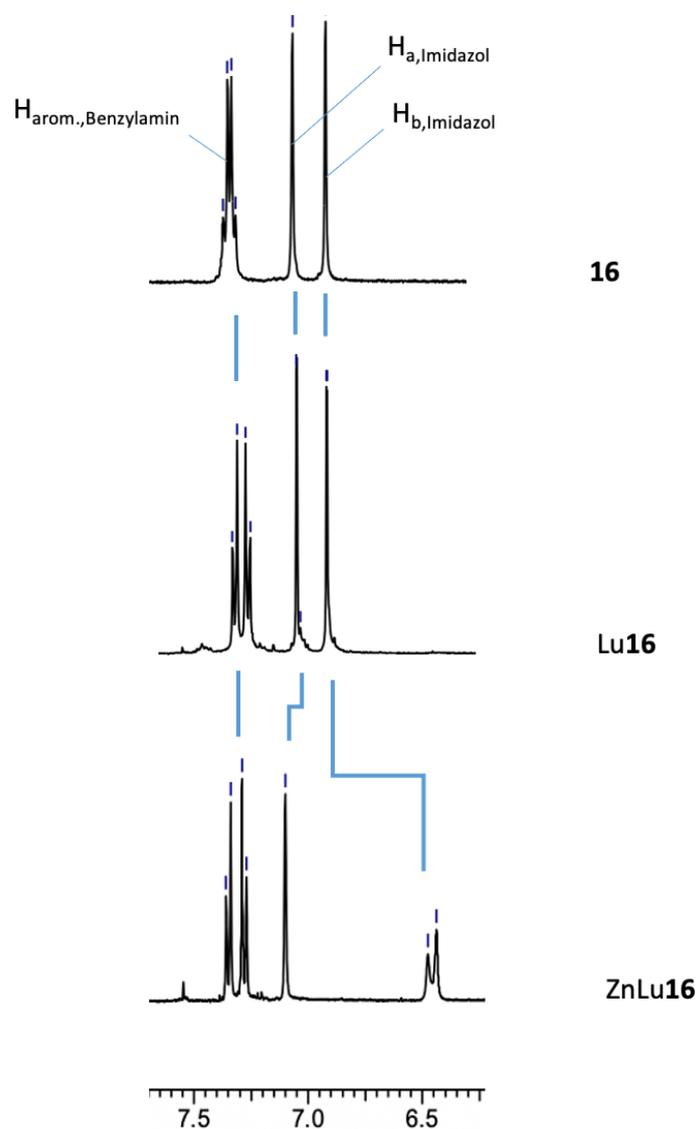
Abb. 58 zeigt die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **16**, Lu**16** und ZnLu**16**. Eine eindeutige Zuordnung aller NMR-Signale für die beiden Metallkomplexe war nicht möglich. Sowohl für

Lu**16** als auch für ZnLu**16** war die Signalintensität der HH- bzw. CH-Kopplungen in den 2D-NMR Spektren nicht ausreichend, um diese eindeutig zuordnen zu können. Lediglich für die Signale für die aromatischen Protonen des Xylylendiamin-Linkers sowie für die aromatischen Protonen der Methylimidazole **16** war eine exakte Zuordnung der Resonanzen mittels 2D-NMR Spektren möglich.



**Abbildung 58** Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des Modellkonstruktes **16** (schwarz) mit denen der Metallkomplexe Lu**16** (blau) und ZnLu**16** (rot) in D<sub>2</sub>O (pH >12).

Der Vergleich des aromatischen Bereichs von **16** und Lu**16** in Abb. 58 bzw. Abb. 59 zeigt, dass nach Komplexierung des Lu<sup>3+</sup>-Kations keine Aufspaltung der beiden Singulets der Imidazolprotonen zu sehen war (Imidazolprotonen **16**  $\delta = 6.98$  und  $6.83$  ppm, Imidazolprotonen Lu**16**  $\delta = 7.03$  und  $6.90$  ppm) (siehe S. 104). Folglich erfolgt die Komplexierung von Lu<sup>3+</sup> im DOTA Teil. Erst nach Komplexierung des Zn<sup>2+</sup>-Kations wurde im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von ZnLu**16** eine Verschiebung der Imidazolresonanzen zu höherem Feld beobachtet (Imidazolprotonen ZnLu**16**  $\delta = 7.10$  und  $6.48$ - $6.44$  ppm).



**Abbildung 59** Ausschnitt aus dem aromatischen Bereich der <sup>1</sup>H-NMR Spektren von **16**, Lu**16** und ZnLu**16**.

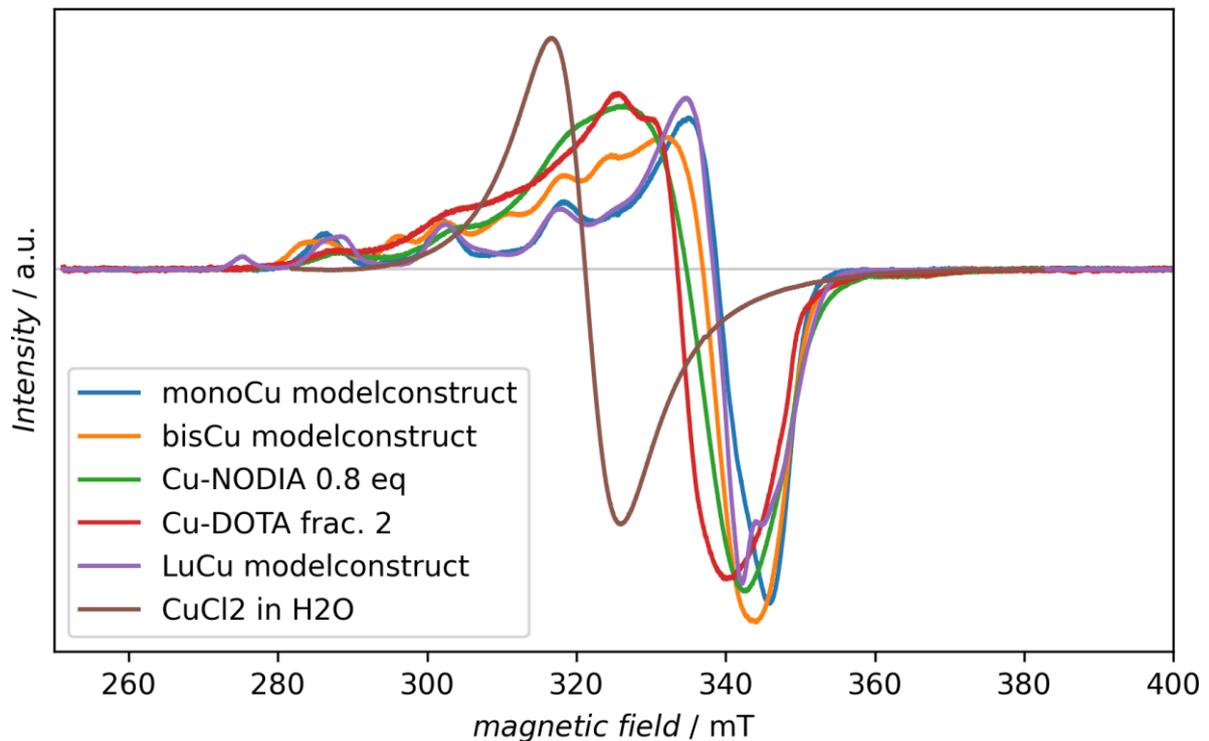
Der Vergleich bestätigt die regioselektive Bindung des Zn<sup>2+</sup> im NODIA-Me Teil des Modellkonstrukts. Die Ergebnisse der NMR Experimente standen mit den Beobachtungen der

UV/Vis-Spektroskopie im Einklang. Normalerweise führt eine Metallkoordination zu einer Verschiebung benachbarter Protonenresonanzen aufgrund der elektronenziehenden Wirkung des positiv geladenen Metallkations zu tieferem Feld. Im Falle der Cu<sup>2+</sup>-spezifischen Liganden aus der Gruppe Bartholomä zeigt sich aufgrund des Anisotropieeffekts der aromatischen Imidazolreste allerdings eine Verschiebung zu höherem Feld<sup>149</sup>.

### 3.2.2.5 EPR-spektroskopische Untersuchungen zum Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung

Ein weiteres Verfahren zum Nachweis der regioselektiven Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  und dreiwertigen Lanthanoidkationen stellt die EPR-Spektroskopie dar. Anhand von EPR-spektroskopischen Messungen von paramagnetischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexen (Elektronenkonfiguration  $3d^9$ ) können wichtige Erkenntnisse über Geometrie der entsprechenden Komplexe gewonnen werden. Die Koordinationssphäre des  $\text{Cu}^{2+}$ -Ions beeinflusst die elektronischen Eigenschaften des  $\text{Cu}^{2+}$ -Ions und folglich den Grundzustand und die Reihenfolge der Energieniveaus der d-Orbitale<sup>157-159</sup>. Beispielsweise ist der Grundzustand einer quadratischen Pyramide für Cu(II)-Komplexe  $d_{x^2-y^2}$ , während für einen trigonalen bipyramidalen Komplex der Grundzustand  $d_{z^2}$  beobachtet wird. Mittels EPR-Spektroskopie können derartige Koordinationsgeometrien anhand der sog. Hyperfeinstruktur des Spektrums sowie der Werte für den g-Faktor (g-Tensor) voneinander unterschieden werden. Der g-Faktor (Landé-Faktor) ist ein quantitatives Maß für das magnetische Moment des Moleküls und reagiert auf Änderungen in der elektronischen Struktur des Komplexes<sup>157-159</sup>. Auch  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$  bzw.  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$  können mittels EPR-Spektroskopie unterschieden werden, da für beide Komplexe eine unterschiedliche Geometrie aufweisen<sup>157-159</sup>. Somit sollte die regioselektive Komplexierung des  $\text{Cu}^{2+}$  Kations durch EPR-spektroskopische Messungen nachgewiesen werden können.

Hierzu wurden die Metallkomplexe Cu**16**, Cu<sub>2</sub>**16**,  $[\text{Cu}(\text{NODIA-Me-NHEt})]$ ,  $[\text{Cu}(\text{DOTA})]^{2-}$  und CuLu**16** mittels EPR-Spektroskopie charakterisiert. Zusätzlich wurde eine wässrige Lösung von  $\text{CuCl}_2$  untersucht, um eine Referenz für das unkomplexierte  $\text{Cu}^{2+}$ -Kation unter den Messbedingungen zu erhalten. Die Durchführung der Messungen und Auswertungen der Daten erfolgte in Kooperation mit Frau M. Schröder (AK Prof. Dr. C. Kay, Physikalische Chemie, Universität des Saarlandes). Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 80 K. Der pH-Wert der jeweiligen Lösungen der Metallkomplexe betrug pH 7. Die Berechnung bzw. mathematische Ermittlung der g-Werte aus den Spektren wurde im Falle dieser Messungen allerdings nicht durchgeführt.



**Abbildung 60** Vergleich der EPR-Spektren der Cu-Komplexe Cu $\mathbf{16}$ , Cu $\mathbf{216}$ , [Cu(DOTA)] $^{2-}$ , [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (Cu-NODIA 0.8 eq), CuLu $\mathbf{16}$  und CuCl $_2$  in H $_2$ O. Blau: EPR-Spektrum von Cu $\mathbf{16}$  (monoCu modelconstruct). Orange: EPR-Spektrum von Cu $\mathbf{216}$  (bisCu modelconstruct). Grün: EPR-Spektrum von [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (Cu-NODIA 0.8 eq), Rot: EPR-Spektrum von [Cu(DOTA)] $^{2-}$  (Cu-DOTA frac. 2). Lila: EPR-Spektrum von CuLu $\mathbf{16}$  (LuCu modelconstruct). Braun: EPR-Spektrum von CuCl $_2$  in H $_2$ O.

Abb. 60 zeigt die EPR-Spektren von Cu $\mathbf{16}$ , Cu $\mathbf{216}$ , CuLu $\mathbf{16}$  und [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (Cu-NODIA 0.8 eq), [Cu(DOTA)] $^{2-}$  (Cu-DOTA frac. 2) und CuCl $_2$ . Entscheidend bei der Betrachtung der Hyperfeinstruktur zum Nachweis der spezifischen Metallkomplexierung waren folgende Beobachtungen. Der Vergleich zwischen den EPR-Spektren von Cu $\mathbf{16}$  (Abb. 60, monoCu modelconstruct, blau) und CuLu $\mathbf{16}$  (Abb. 60, LuCu modelconstruct, lila) zeigte, dass für beide Metallkomplexe identische Signale bei  $\sim 280$  mT,  $\sim 300$  mT,  $\sim 320$  mT und  $\sim 340$  mT in der Hyperfeinstruktur beobachtet wurden, welche auf die Kopplung mit dem Kernspin von Cu ( $I = 3/2$ ;  $2I+1$  Signale) zurückzuführen waren<sup>160</sup>. Diese Signale in der Hyperfeinstruktur wurden ebenfalls für [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (Abb. 60, Cu-NODIA, grün) gefunden. Auch im Vergleich der Spektren von Cu $\mathbf{16}$  und CuLu $\mathbf{16}$  mit dem EPR-Spektrum von Cu $\mathbf{216}$  (Abb. 60, bisCu modelconstruct, orange) wurden diese Signale bei  $\sim 280$  mT,  $\sim 300$  mT und  $\sim 320$  mT beobachtet. Zusätzliche Signale im EPR-Spektrum von Cu $\mathbf{216}$ , die auf die Komplexierung von Cu $^{2+}$  im DOTA Teil von  $\mathbf{16}$  zurückzuführen waren, wurden bei  $\sim 290$  mT,  $\sim 310$  mT und  $\sim 330$  mT gefunden. Diese zusätzlichen Signale stimmten mit den Signalen der Spektren von

[Cu(DOTA)]<sup>2-</sup> (Abb. 60, Cu-DOTA, rot) bei pH 7 überein und wurden in den EPR-Spektren von Cu**16**, CuLu**16** sowie [Cu(NODIA-Me-NHEt)] nicht beobachtet. Die identische Hyperfeinstruktur der Spektren von Cu**16** und CuLu**16** war dennoch lediglich ein Indiz für die regioselektive Komplexierung von Cu<sup>2+</sup> im NODIA-Me Teil von **16**, da keine Berechnung der entsprechenden Werte für die g-Tesoren erfolgte. Obwohl ähnliche Beobachtungen wie in Kap. 3.2.2.3 gemacht wurden, konnte kein eindeutiger Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung mittels EPR-Spektroskopie erbracht werden.

Im Anschluss wurden Markierungsexperimente mit den entsprechenden Radionukliden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die selektive Doppelmarkierung ebenfalls mit den entsprechenden radioaktiven Isotopen auf der Tracerebene realisiert werden kann.

### 3.2.3 Radiomarkierungsexperimente des Modellliganden NODIA-Me-Bz-DOTA **16** zum Nachweis der Doppelmarkierung mit entsprechenden Radionukliden

Die regiosektive Metallkomplexierung der Metallkationen  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Ln}^{3+}$  durch das Dichelatormodellkonstrukt **16** konnte mittels UV/Vis- und NMR- eindeutig gezeigt werden (vgl. Kap. 3.2.2.3, 3.2.2.4 und 3.2.2.5).

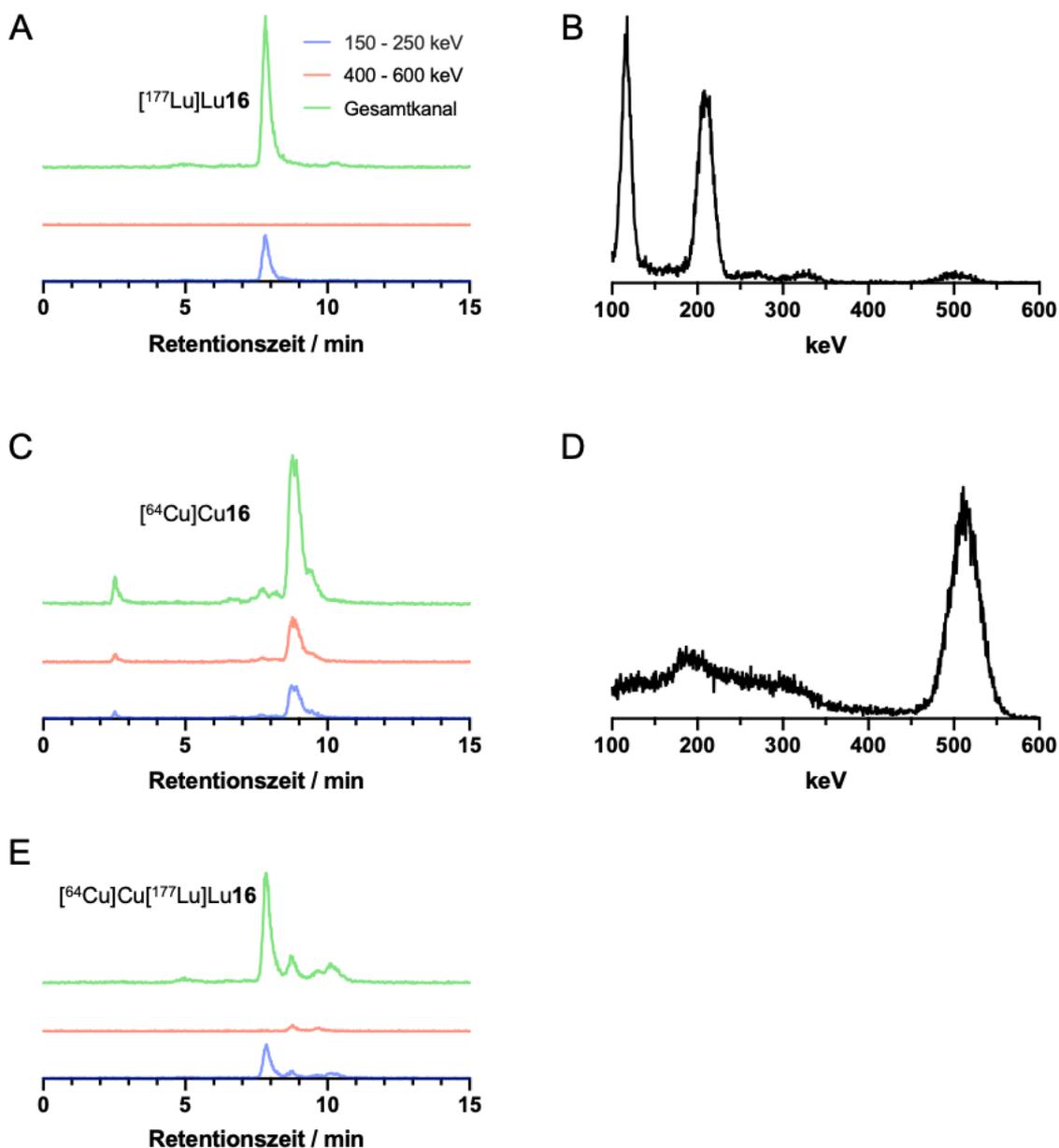
Das Ziel dieses Projektes war die Entwicklung eines radiohybriden PSMA-spezifischen Radiotracers unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Metallchelatoren. Dies ermöglicht die Kombination verschiedenster Metallkationen und eröffnet somit zahlreiche medizinische Anwendungen eines einzigen Radiotracers (vgl. Kapitel 3.2). Nach dem erstmaligen Nachweis der regioselektiven Komplexierung von zwei unterschiedlichen Metallen wurden nun Radiomarkierungsexperimente mit dem Modellkonstrukt **16** durchgeführt. Wie in Kapitel 3.2 erläutert, ist die Ermittlung der Dosimetrie einer Radioligandentherapie von essentieller Bedeutung, um eine optimale Balance zwischen Strahlenbelastung und Behandlungserfolg zu gewährleisten. Die Ermittlung der Dosimetrie von  $^{225}\text{Ac}$ -basierten Therapien ist physikalisch nicht möglich (vgl. Kap. 1.2.3.2 und Kap. 3.2). Ein möglicher Lösungsansatz wäre die Bestimmung der Ac-225 Dosimetrie mittels PET Bildgebung, in dem man beide Radionuklide in einem Molekül vereint. Folglich wurden hierzu zwei unterschiedliche Kombinationen an Radionukliden untersucht. Zum einen wurde die Kombination Cu-64 für die PET und Ac-225 für die Therapie und zum anderen das Cu-64 und Lu-177 Paar verwendet. Aufgrund der fehlenden Gammaemission des Ac-225 ist eine Detektion mit herkömmlichen Detektoren und Messgeräten nicht möglich, so dass aus Gründen der Einfachheit als Alternative die Kombination Cu-64 / Lu-177 verwendet wurde.

Der Positronenemitter Cu-64 emittiert Gammaphotonen mit einer Energie von 511 keV, wohingegen die Gammaemissionen des Lu-177 bei 113 und 208 keV liegen. Die Analyse der Radiomarkierung erfolgte per Radio-HPLC unter gleichzeitiger Verwendung drei unterschiedlicher Energiekanäle: einem offenen Gesamtkanal (gesamter keV-Bereich), einem Kanal für den Energiebereich 150-250 keV (Lu-177 Fenster) sowie dem Kanal für den Energiebereich 400-600 keV (Cu-64 Fenster).

Zunächst wurde die Komplexbildung zwischen dem Dichelatormodellkonstrukt **16** und  $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  sowie  $^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  untersucht (beide in 0.04 M HCl). Dazu wurde **16** in Ammoniumacetat-Puffer (pH 5.4) vorgelegt und mit  $^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  für 15 min bei 95 °C inkubiert.

Das entsprechende Radio-HPLC Chromatogramm ist in Abb. 61 A gegeben. Das  $^{177}\text{Lu}$ -markierte Modellkonstrukt besitzt eine Retentionszeit von  $t_R = 7.9$  min. Um die Fraktion im Detail zu charakterisieren, wurde diese eingesammelt und mittels Gammaskopie gemessen. Das dazugehörige Gammaskopie der Fraktion in Abb. 60 B zeigt eindeutig die beiden Gammamissionen des Lu-177. Als nächstes wurde **16** ebenfalls in Ammoniumacetat-Puffer, allerdings bei Raumtemperatur, mit Cu-64 umgesetzt. Die  $^{64}\text{Cu}$ -markierte Verbindung eluiert bei  $t_R = 9.0$  min (Abb. 61 C). Das dazugehörige Gammaskopie in Abb. 61 D zeigt die typische Gammaemission eines Positronenemitters. Ferner wird aus Abb. 61 D ebenfalls ersichtlich, dass es beim  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Modellkonstrukt im Lu-177 Messfenster des Gammadetektors ebenfalls ein Signal detektiert wurde, was auf die niederenergetische Bremsstrahlung zurückzuführen ist. Im Anschluss wurde das Modellkonstrukt unter identischen Bedingungen zuerst mit  $^{177}\text{Lu}$  bei erhöhter Temperatur umgesetzt und anschließend nach Abkühlen der Markierungslösung  $^{64}\text{Cu}$  bei Raumtemperatur zugegeben. Das entsprechende HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 61 E aufgeführt. Nach der Doppelmarkierung wurde die Bildung eines Gemisches aus mindestens drei radioaktiven Spezies vorgefunden. Die Retentionszeiten der drei radioaktiven Hauptfraktionen lagen bei  $t_R = 7.9$  min, bei  $t_R = 9.0$  min sowie bei  $t_R = 10.2$  min. Offensichtlich bildete sich ein Gemisch aus  $^{177}\text{Lu}$ -,  $^{64}\text{Cu}$ - und einer dritten Species, bei der es sich vermutlich um das dualmarkierte Modellkonstrukt mit einer Retentionszeit von  $t_R = 10.2$  min handelte. Eine graphische Darstellung der Radiomarkierungsreaktionen ist in Abb. 61 gegeben.

Um die Zusammensetzung der neuen Fraktion bei  $t_R = 10.2$  min genauer zu untersuchen, wurde hier ebenfalls das entsprechende Gammaskopie der Fraktion aufgenommen, welches sowohl die Gammaphotonen des Cu-64 mit der Energie von 511 keV als auch die beiden Emissionen des Lu-177 bei der Energie von 113 keV und 209 keV enthielt (In Abb. 61 nicht aufgeführt).



**Abbildung 61** Radio-HPLC der Markierung von Ligand **16** mit (A)  $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  und (B) entsprechendem Gammاسpektrum der Fraktion bei  $t_R = 7.9$  min. (C) Markierung mit  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  und (D) entsprechendem Gammاسpektrum bei  $t_R = 9.0$  min. (E) Dualmarkierung von **16** mit beiden Radionukliden wurde in den drei Energiekanälen die Bildung von mindestens drei radioaktivmarkierten Hauptprodukten beobachtet. Die Retentionszeiten der Hauptfraktionen lagen bei  $t_R = 7.9$  min,  $9.0$  min und  $10.2$  min.

Für die Radiomarkierung wurde 1 nmol an Dichelatormodellkonstrukt mit ca. 80 MBq Cu-64 und 130 MBq Lu-177 markiert. Es ergibt sich daraus eine molare Aktivität bezogen auf Cu-64 von 80 MBq/nmol und auf Lu-177 von 130 MBq/nmol, die beide in einem hohen Bereich liegen, d.h. auch auf der Tracerebene scheinen beide Radiometalle ebenfalls vom jeweiligen

Chelator regioselektiv komplexiert zu werden. Wäre dies nicht der Fall, könnten die hohen molaren Aktivitäten nicht erreicht werden.

Die Bildung mehrerer radioaktiver Spezies kann durch die niedrigen Stoffmengen an beiden Radiometallen erklärt werden<sup>79</sup>. Die Stoffmenge an Radiometall kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$A = 1.32 \cdot 10^{16} \cdot \frac{m}{t_{1/2} \cdot M}$$

$A$ : Aktivität in Bq

$m$ : Masse in g

$t_{1/2}$ : Halbwertszeit in Jahren

$M$ : relative Atommasse in g/mol

Nach Einsetzen von  $n = M/m$  ergibt sich:

$$A = 1.32 \cdot 10^{16} \cdot \frac{n}{t_{1/2}}$$

$n$ : Stoffmenge

Nach Umstellen zur Berechnung der Stoffmenge:

$$n = \frac{A \cdot t_{1/2}}{1.32 \cdot 10^{16}}$$

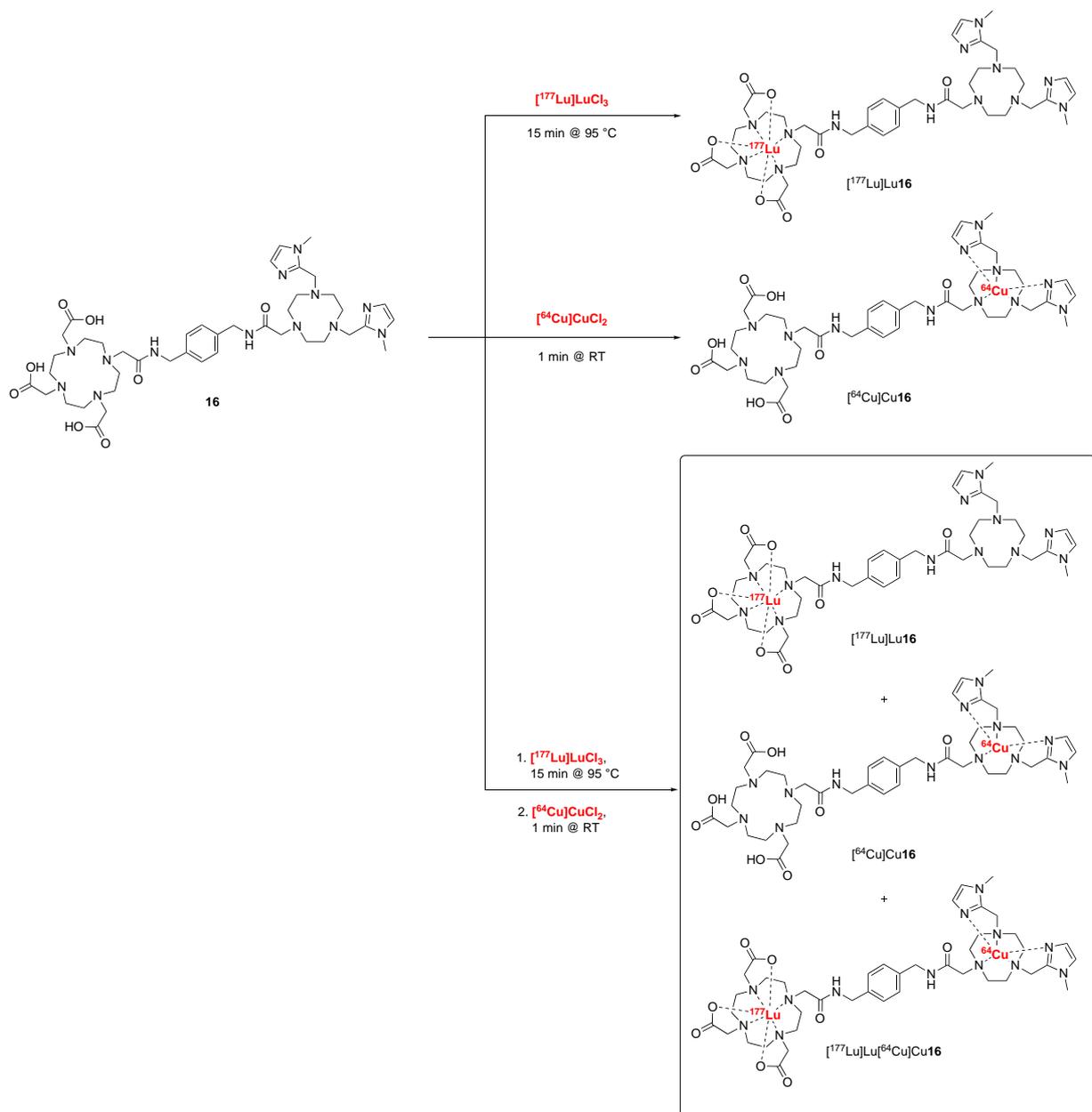
Für Cu-64 ( $t_{1/2} = 12.7$  h) folgt:

$$n = \frac{80 \cdot 10^6 \text{ Bq} \cdot 0.00145 \text{ a}}{1.32 \cdot 10^{16}} = \frac{116000}{1.32 \cdot 10^{16}} = 8.788 \cdot 10^{-12} \text{ mol} = 0.0087 \text{ nmol}$$

Und für Lu-177 ( $t_{1/2} = 6.644$  d) ergibt sich eine Stoffmenge von:

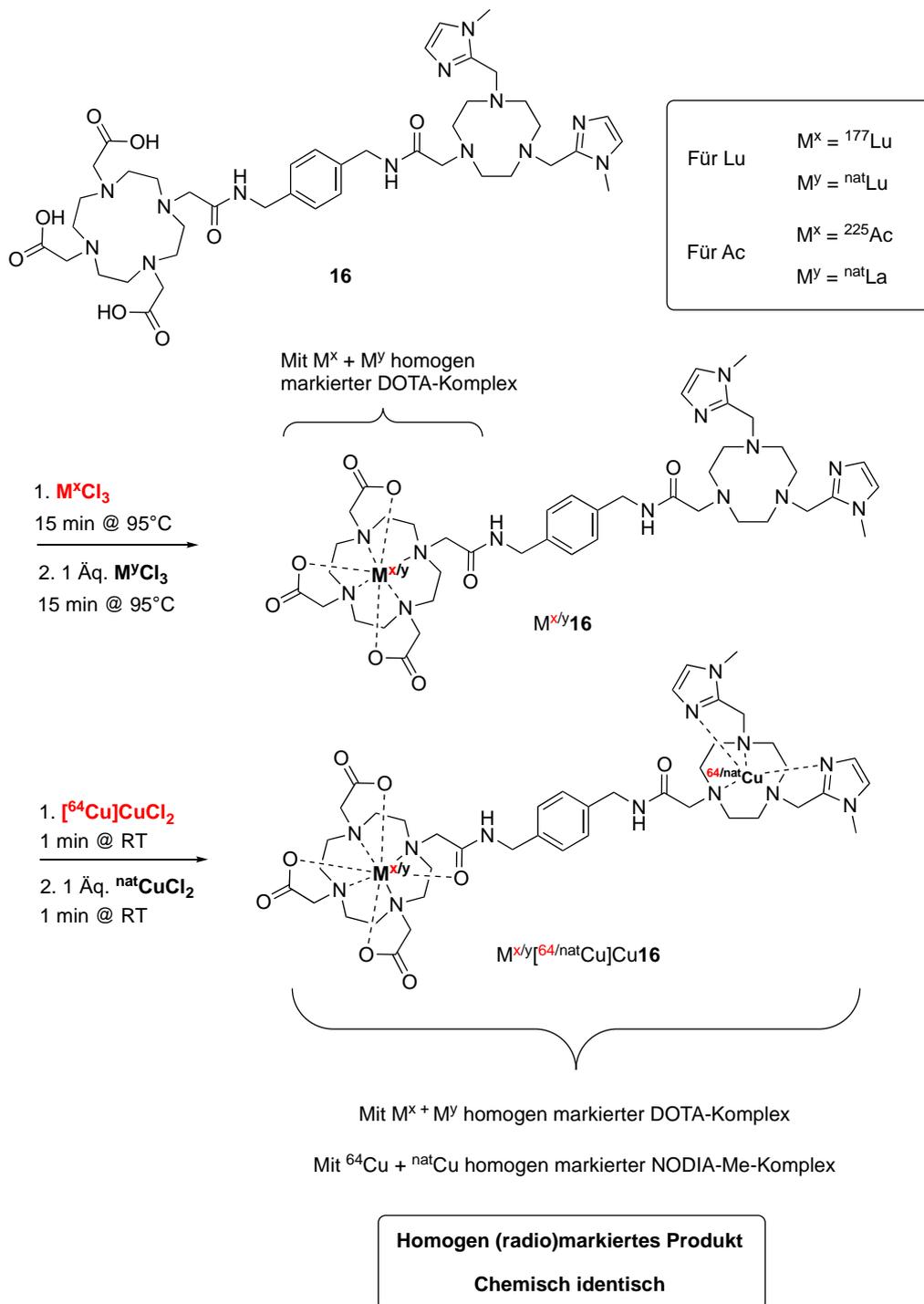
$$n = \frac{130 \cdot 10^6 \text{ Bq} \cdot 0.01820 \text{ a}}{1.32 \cdot 10^{16}} = \frac{2366000}{1.32 \cdot 10^{16}} = 1.792 \cdot 10^{-10} \text{ mol} = 0.1792 \text{ nmol}$$

Daraus ergibt sich, dass nur ca. 18% des Modellkonstrukts mit Lu-177 und ca. 0.9% mit Cu-64 markiert sind. Lediglich 0.15% des Dichlatorsmodellkonstruktes ist mit beiden Radiometallen markiert. Dies steht auch im Einklang mit den Peakflächen im entsprechenden HPLC-Chromatogramm in Abb. 61 E. Das Ergebnis dieser Radiomarkierung ist in Abb. 62 dargestellt.



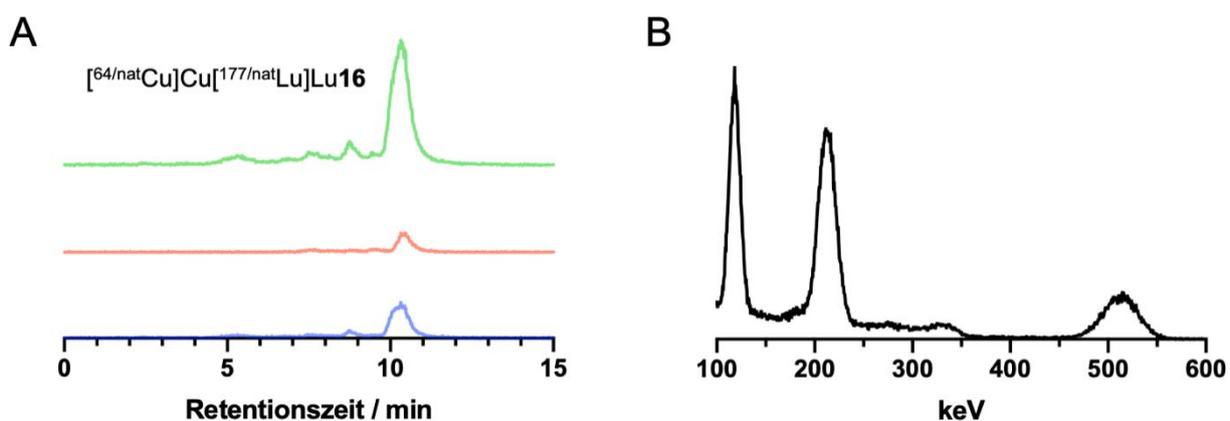
**Abbildung 62** Ergebnis der Radiomarkierung von Ligand **16** mit mit  $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ . Schematische Darstellung der Radiokomplexe nach Inkubation mit den jeweiligen Radiometall.

Um ein einheitliches dualmarkiertes Produkt zu erhalten, müssen offensichtlich beide Chelatoren vollständig mit dem entsprechenden Metall beladen werden. Hierzu wurden im nächsten Schritt entsprechende Stoffmengen der beiden nicht radioaktiven Metallsalze hinzugegeben. Das allgemeine Vorgehen für die Synthese der dualmarkierten (Radio)komplexe ist in Abb. 63 dargestellt.



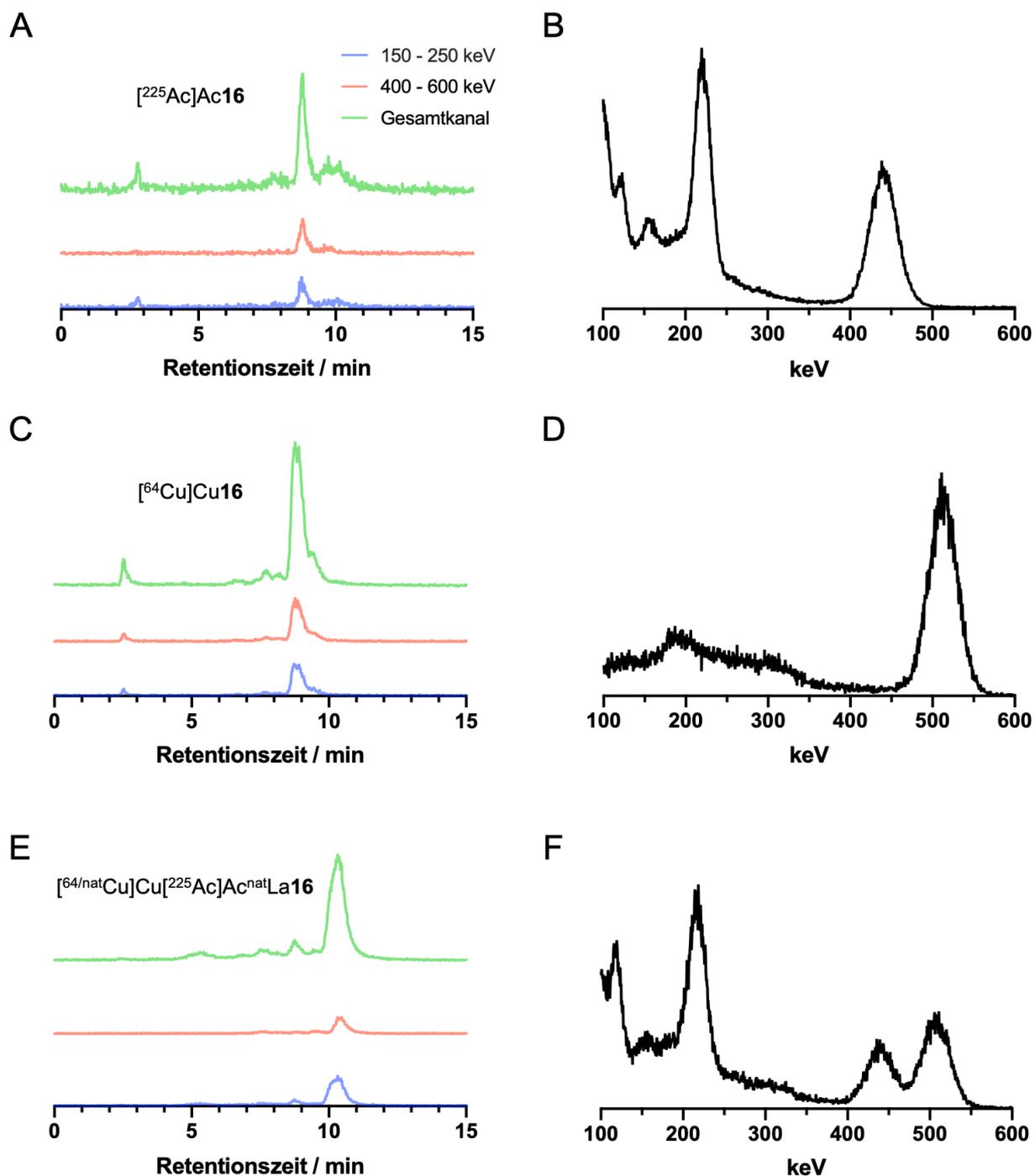
**Abbildung 63** Syntheseroute der selektiv dualmarkierten Radiokomplexe.

Dazu erfolgte zunächst die Umsetzung von **16** mit  $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  für 15 min bei 95 °C. Anschließend wurde 1 Äq.  $^{\text{nat}}\text{LuCl}_3$  zugegeben und erneut für 15 min bei 95 °C geheizt, um den Liganden DOTA mit  $\text{Lu}^{3+}$  Kationen abzusättigen. Im nächsten Schritt wurde die Probe auf RT abgekühlt und  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  zugegeben. Zuletzt erfolgte die Zugabe von  $^{\text{nat}}\text{CuCl}_2$ . Nach Inkubation für eine weitere Minute erfolgte die Aufreinigung der Reaktionsmischung mittels  $\text{C}_{18}$ -Sep Pak Kartusche. Anschließend wurde ein Aliquot entnommen und mittels Radio-HPLC untersucht. Das entsprechende HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 64 A gegeben. Im Gegensatz zur Radiomarkierung ohne Absättigung mit nichtradioaktiven Metallsalzen (siehe Abb. 61) wurde hier lediglich die Bildung eines einzelnen Peaks mit einer Retentionszeit von  $t_R = 10.2$  min beobachtet. Diese wurde eingesammelt und mittels Gammaskopie vermessen. Das dazugehörige Gammaspektrum in Abb. 64 B zeigt sowohl die charakteristischen Gammaquanten von  $^{64}\text{Cu}$  bei einer Energie von  $E_\gamma = 511$  keV als auch von  $^{177}\text{Lu}$  bei einer Energie von  $E_\gamma = 208$  keV und 113 keV. Dies belegt eindeutig die Dualmarkierung des Metallkonstrukts mit beiden Radiometallen. Es konnte somit erfolgreich gezeigt werden, dass durch die Zugabe der nichtradioaktiven Metallkationen das dualmarkierte, homogene Produkt  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$  erhalten werden konnte. Durch die Verwendung von  $^{\text{nat}}\text{Lu}/^{\text{nat}}\text{Cu}$  konnte somit ein homogen (radio)markiertes bzw. der chemisch identische dualmarkierte Komplex  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$  synthetisiert werden.



**Abbildung 64** Ergebnis der Radiomarkierung von **16** mit  $^{177}\text{Lu}$  und  $^{64}\text{Cu}$  nach erfolgter Absättigung der beiden Chelatoreinheiten mit nichtradioaktivem  $\text{Lu}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ . A). Radiochromatogramm von  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$  mit  $t_R = 10.2$  min. B) Gammaskopie von  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$  mit den charakteristischen Energien von Cu-64 (511 keV) und Lu-177 (113 und 209 keV).

Nachdem die Dualmarkierung von **16** mit Cu-64/Lu-177 gezeigt werden konnte, wurde im Anschluss die Nuklidkombination Cu-64/Ac-225 untersucht. In Analogie zur Synthese von  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$  erfolgte auch hier zunächst die Inkubation von **16** mit  $[^{225}\text{Ac}]\text{AcCl}_3$ . Das entsprechende Radiochromatogramm ist in Abb. 65 A gezeigt. Das  $^{225}\text{Ac}$ -markierte Modellkonstrukt eluiert mit einer Retentionszeit von  $t_R = 9.0$  min. Das Gammaspektrum des Peaks bei  $t_R = 9.0$  min in Abb. 65 B enthält die charakteristischen Gammaemissionen der Tochternuklide des Actiniums-225, Fr-221 (219 keV) und Bi-213 (440 keV). Daneben ist ein Peak nach der Totzeit des HPLC-Systems bei  $t_R = 2.9$  min zu sehen. Normalerweise werden ungebundene Radiometalle von der Umkehrphasensäule nicht retardiert und eluieren nach der Totzeit des Systems. In diesem Fall handelt es sich allerdings nicht um nicht gebundenes Ac-225. Wie bereits in Kapitel 3.2 erwähnt, besitzt Ac-225 selbst keine Gammaemissionen und kann deshalb nur indirekt über seine Tochternuklide Fr-221 mit einer Emission bei 219 keV und Bi-213 mit einer Emission bei 440 keV nachgewiesen werden. Darüber hinaus gibt es bei Alphaemittern den sogenannten „Recoil-Effekt“, der den Rückstoß bezeichnet, den ein Atomkern beim radioaktiven Zerfall aufgrund der Impulserhaltung erfährt. Die Energie des Recoil-Effekts ist um einige Größenordnungen größer als die Energie von koordinativen Bindungen, was zu einem „Herausschlagen“ des Ac-225 aus dem Chelator führt. Bei dem Peak bei  $t_R = 2.9$  min handelt es sich folglich um durch den Zerfall des Ac-225 freigesetzte Tochternuklide. In Abb. 65 C+D ist zum Vergleich erneut das Radiochromatogramm und das entsprechende Gammaspektrum des  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Modellkonstrukts aufgeführt. Um ein homogenes Produkt zu erhalten, wurde analog zu den Markierungen mit Cu-64 und Lu-177 die beiden Chelatoren mit den entsprechenden nichtradioaktiven Metallen abgesättigt. Da  $^{225}\text{Ac}$  kein stabiles Isotop besitzt, wurde hier  $^{\text{nat}}\text{LaCl}_3$  als Surrogat für Actinium verwendet. Die Charakterisierung mittels Radio-HPLC ergab ebenfalls einen Peak bei  $t_R = 10.2$  min (siehe Abb. 65 E). Das Gammaspektrum der eingesammelten Fraktion enthielt die charakteristischen Signale für die Gammaphotonen der  $^{225}\text{Ac}$ -Tochternuklide  $^{221}\text{Fr}$  ( $E_\gamma = 219$  keV) und  $^{213}\text{Bi}$  ( $E_\gamma = 440$  keV) sowie des  $^{64}\text{Cu}$  ( $E_\gamma = 511$  keV). Zusammen mit der Retentionszeit bestätigt dies eindeutig die Bildung des dualmarkierten Modellkonstrukts  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{\text{nat}}\text{La16}$ .



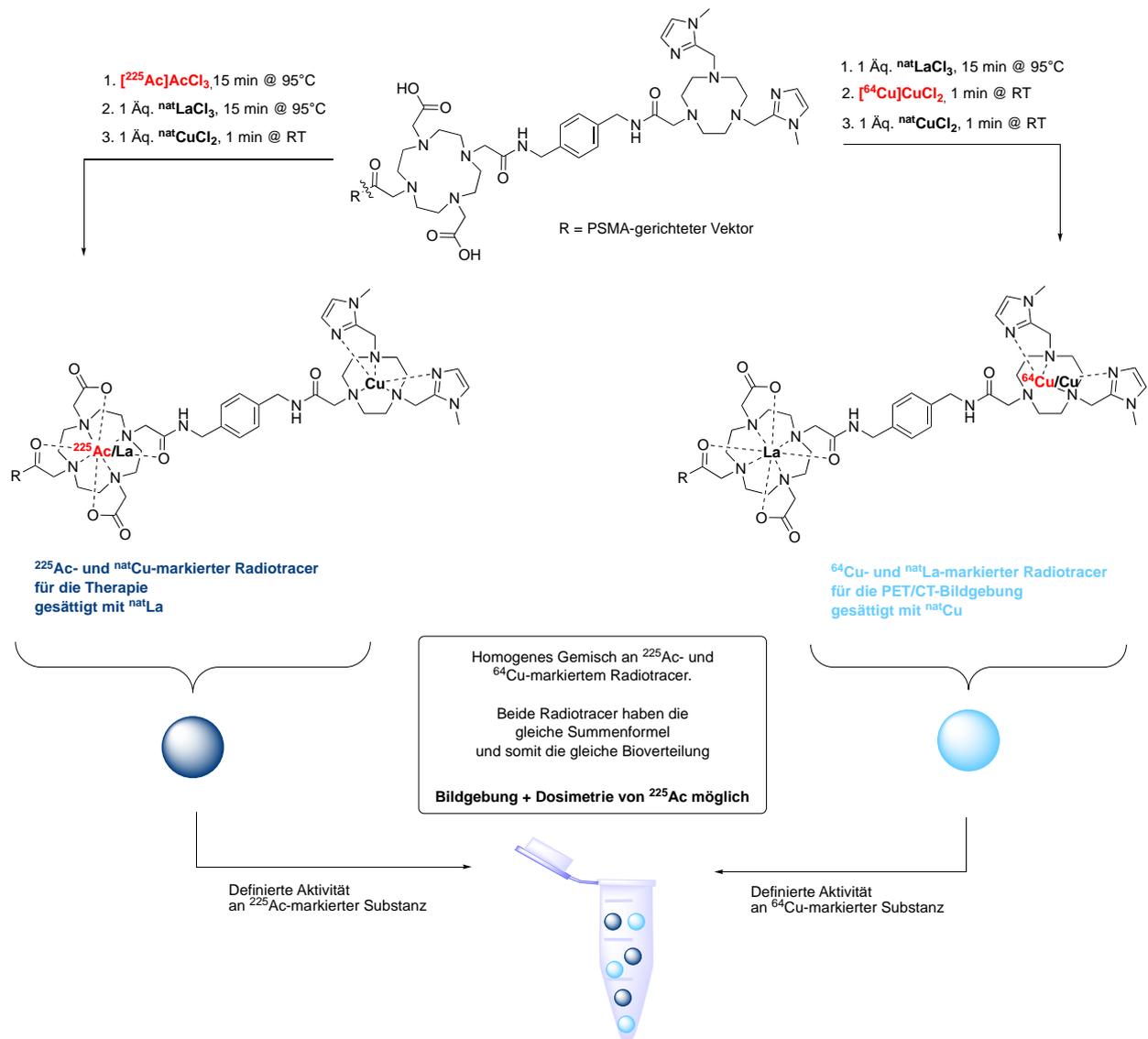
**Abbildung 65** Ergebnis der Radiomarkierung von **16** mit  $^{225}\text{Ac}$  und  $^{64}\text{Cu}$  nach erfolgter Absättigung der beiden Chelatoreinheiten mit nichtradioaktivem  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$ . A). Radiochromatogramm von  $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac16}$  mit  $t_{\text{R}} = 8.0$  min. B) Gammاسpektrum von  $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac16}$  mit den charakteristischen Energien der aus dem Zerfall von Ac-225 entstehenden Tochternuklide Fr-221 (219 keV) und Bi-213 (440 keV) C) Radiochromatogramm von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu16}$  mit Produktes  $t_{\text{R}} = 9.0$  min. D) Gammاسpektrum von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu16}$  mit der charakteristischen Energien von 511 keV. E) Radiochromatogramm von  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{\text{nat}}\text{La16}$  mit  $t_{\text{R}} = 10.2$  min. F) Gammاسpektrum von  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{\text{nat}}\text{La16}$  mit den charakteristischen Energien von Fr-221 (219 keV), Bi-213 (440 keV) und Cu-64 (511 keV).

Zusammenfassend konnte trotz der relativ niedrigen Wahrscheinlichkeit in diesem Kapitel erstmalig die Bildung einer dualmarkierten Verbindung anhand des Dichelatormodellkonstrukts mit zwei unterschiedlichen Radiometallen erfolgreich nachgewiesen werden. Zwar wurde nach Markierung mit beiden Radiometallen kein homogenes Produkt erhalten, sondern stattdessen die Bildung einer Mischung aus  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu16}$ ,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu16}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177}\text{Lu}]\text{Lu16}$  beobachtet. Allerdings konnte durch die Zugabe an stöchiometrischen Mengen an den entsprechenden nichtradioaktiven Metallsalzen ein homogener, dualmarkierter Komplex erhalten werden. Sowohl für das Radiometallpaar  $^{64}\text{Cu}/^{177}\text{Lu}$  als auch für  $^{64}\text{Cu}/^{225}\text{Ac}$  wurde dabei die Bildung von  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$  bzw.  $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{\text{nat}}\text{La16}$  mittels Radio-HPLC und Gammaskopie nachgewiesen. Die Identifikation der dualmarkierten bzw. homogen markierten Produkte bildete somit die (radiochemische) Grundlage für die Entwicklung eines radiohybriden PSMA-Liganden für die PET/CT-Bildgebung von Ac-225.

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit eine Dualmarkierung erfolgreich etabliert werden konnte, ist ein solcher Ansatz aus mehreren Gründen für den zukünftigen Einsatz in der Klinik nicht praktikabel. Erstens, wie oben diskutiert, entsteht bei der Radiomarkierung kein homogenes Produkt, so dass bei jeder einzelnen Herstellung eine Absättigung der beiden Chelatoren durchgeführt werden müsste. Zweitens ist die Messung der Aktivität der dualmarkierten Verbindungen mit Aktivimetern nicht mehr möglich, da in solchen Geräten lediglich die Impulse gemessen werden, die dann mit hinterlegten Parametern (Kalibrierfaktoren) in die entsprechende Aktivitätsmenge des gemessenen Radionuklids umgerechnet werden. Da die detektierten Impulse der beiden Radionuklide nicht voneinander unterschieden werden können, kann keine verlässliche Messung der Aktivitäten mehr erfolgen. Die exakte Bestimmung der verabreichten Aktivität ist allerdings von essentieller Bedeutung für die klinische Anwendung, da z.B. nur dann eine Quantifizierung anhand der Bilddaten erfolgen kann oder die Dosimetrie berechnet werden kann.

Ein praktikabler Ansatz wäre es analog zu den in Kapitel 1.2.3.3.2 beschriebenen Ansätzen von Radiohybridliganden ein Chelator radioaktiv zu markieren, während der zweite mit dem nichtradioaktiven Metall beladen wird und dann eine Mischung der beiden Substanzen zu verabreichen. Da alle Verbindungen eine identische Summenformel aufweisen, besitzen diese auch eine identische Bioverteilung. Für die anfänglich erwähnte Ermittlung der Dosimetrie von  $^{225}\text{Ac}$ -markierten Radiotherapeutika mittels PET könnte unter

Verwendung eines Dichelator PSMA-Liganden, wie in Abb. 66 dargestellt, durchgeführt werden. Zunächst würde die Synthese des  $^{225}\text{Ac}/^{nat}\text{Cu}$ -markierten Liganden für die Therapie und des  $^{nat}\text{La}/^{64}\text{Cu}$ -markierten Liganden für die Bildgebung erfolgen. Durch Absättigung der Proben mit den jeweiligen nicht radioaktiven Metallen würde die identische Summenformel der Radiotracer und somit eine gleichbleibende Bioverteilung der Radiohybride sichergestellt werden. Für die Applikation am Patienten kann anschließend ein Gemisch der Radiohybride mit einer definierten Aktivität an  $^{225}\text{Ac}$ -markiertem sowie  $^{64}\text{Cu}$ -markiertem Liganden hergestellt werden. Da sich die Radiotracer aufgrund ihrer identischen Zusammensetzung im Körper gleich verhalten und kann durch den mit  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Radiohybrid die Bioverteilung des  $^{225}\text{Ac}$ -markierten Liganden mittels PET/CT-Bildgebung visualisiert und quantifiziert werden.

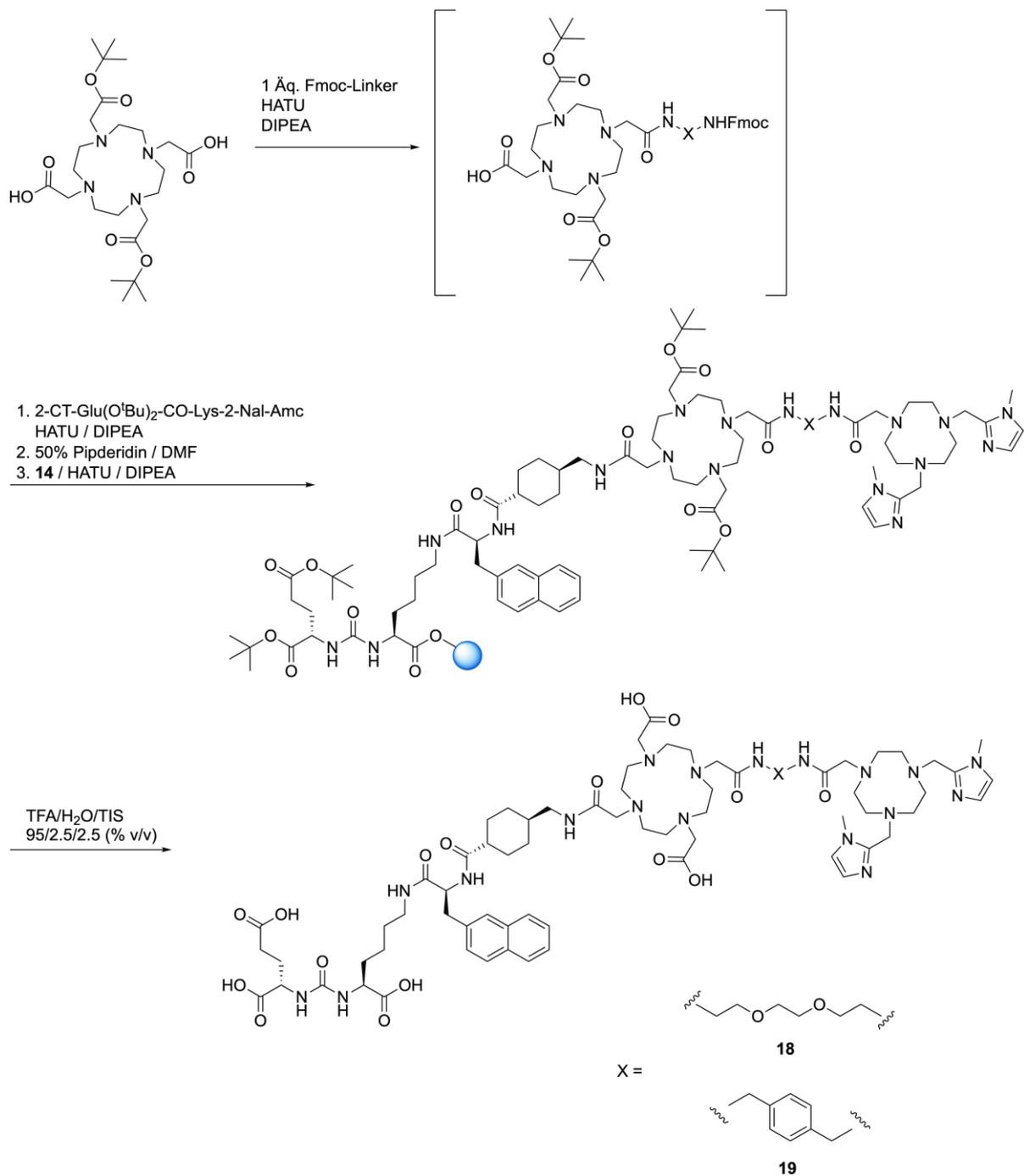


**Abbildung 66** Synthese radiohybrider PSMA-spezifischer Tracer für die Bildgebung  $^{225}\text{Ac}$ -markierten Radiotracer mittels PET. Herstellung eines Gemisches bestehend aus dem  $^{64}\text{Cu}$ -markierten und dem  $^{225}\text{Ac}$ -markierten Ligand mit einer definierten Aktivität. Aufgrund der identischen Summenformel (durch Absättigung mit nichtradioaktiven Metallen) haben beide Radiotracer die gleiche Bioverteilung, wodurch die PET-Bildgebung von Actinium-225 ermöglicht werden kann.

### 3.2.4 Synthese und *in vitro* Evaluation eines Dichelator-PSMA-Liganden

Diese Ergebnisse aus vgl. Kap. 3.2.2.3, 3.2.2.4 und 3.2.2.5 bilden die (radio)chemischen Grundlagen für die Darstellung der Bioverteilung bzw. für die Berechnung der patientenindividuellen Dosimetrie eines <sup>225</sup>Ac-markierten PSMA-Liganden.

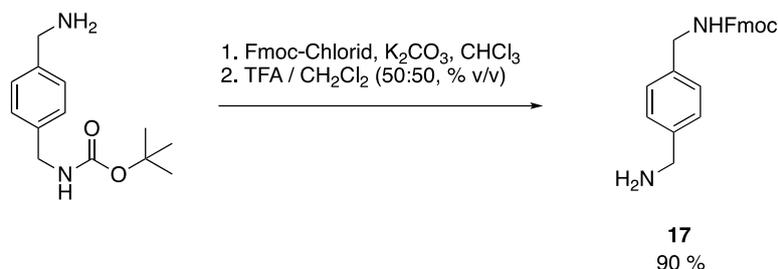
Um nun das Konzept der selektiven Doppelmarkierung auf Basis des Dichelatormodellkonstruktes **16** auf PSMA-spezifische Radiotracer zu übertragen, erfolgte in diesem Kapitel die Darstellung eines Dichelator PSMA-Liganden, aufgebaut aus den beiden BFCs DOTA und NODIA-Me (Abb. 67). Die Synthese dieses Liganden erfolgte in Analogie zur Synthese des potentiellen radiohybriden BODIPY-PSMA-Liganden **13** ausgehend von DOTA-di-*tert.*butylester<sup>108,109,140</sup> (vgl. Kap. 3.1.1.2).



**Abbildung 67** Synthese der Dichelator PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-PEG-NODIA-Me **18** und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-Me **19** ausgehend von DOTA-di-*tert*.butylester.

Abb. 67 zeigt die Synthese der beiden Dichelator PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-PEG-NODIA-Me **18** und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-Me **19**. Die Synthese erfolgte durch eine Kombination aus Festphasensynthese und lösungsbasierter Reaktion. Das PSMA-Bindemotiv Glu-CO-Lys sowie der Spacer 2-Nal-Amc wurden aufgrund der bekannten PSMA-Affinität nicht variiert. Um den Einfluss des Linkers zwischen den beiden BFCs auf die Target-Affinität des Biokonjugates zu untersuchen, wurden die Linker DOOA und Xylylendiamin gewählt. Die beiden Linker unterscheiden sich in ihrer Polarität, was die Bindungsaffinität von PSMA-spezifischen Radiotraceren beeinflussen kann (vgl. Kap. 3.1.3).

Da der Fmoc-geschützte Linker Fmoc-Xylylendiamin **17**, im Unterschied zu Fmoc-DOOA nicht kommerziell erhältlich war, erfolgte die Synthese ausgehend von 1-(*N*-BOC-aminomethyl)-4-(aminomethyl)benzol (Abb. 68)<sup>161</sup>.



**Abbildung 68** Synthese des Fmoc-geschützten Linkers Fmoc-Xylylendiamin **17** ausgehend von 1-(*N*-BOC-aminomethyl)-4-(aminomethyl)benzol.

Für die zweistufige Reaktion wurde 1-(*N*-BOC-aminomethyl)-4-(aminomethyl)benzol zunächst mit Fmoc-Chlorid in Chloroform umgesetzt und anschließend die BOC-Schutzgruppe mittels 50 % TFA in Dichlormethan abgespalten. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **17** in einer Ausbeute von 90 % isoliert.

Für die Synthese der Dichelator PSMA-Liganden (Abb. 67) wurde zunächst eine Carbonsäuregruppe von DOTA-di-*tert*.butylester mittels HATU/DIPEA aktiviert und danach ein Äquivalent des Fmoc-geschützten Linkers (Fmoc-DOOA bzw. **17**) zugegeben. Nach vollständigem Eduktumsatz wurden erneut HATU/DIPEA zugegeben und die Reaktionsmischung mit dem Harz-immobilisierten Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc. Im Anschluss erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, gefolgt von der Konjugation von NODIA-Me **14** mittels HATU/DIPEA. Nach gleichzeitiger Entschützung und Abspaltung vom Harz wurden nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC die beiden Dichelator PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-NODIA-Me **18** und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-

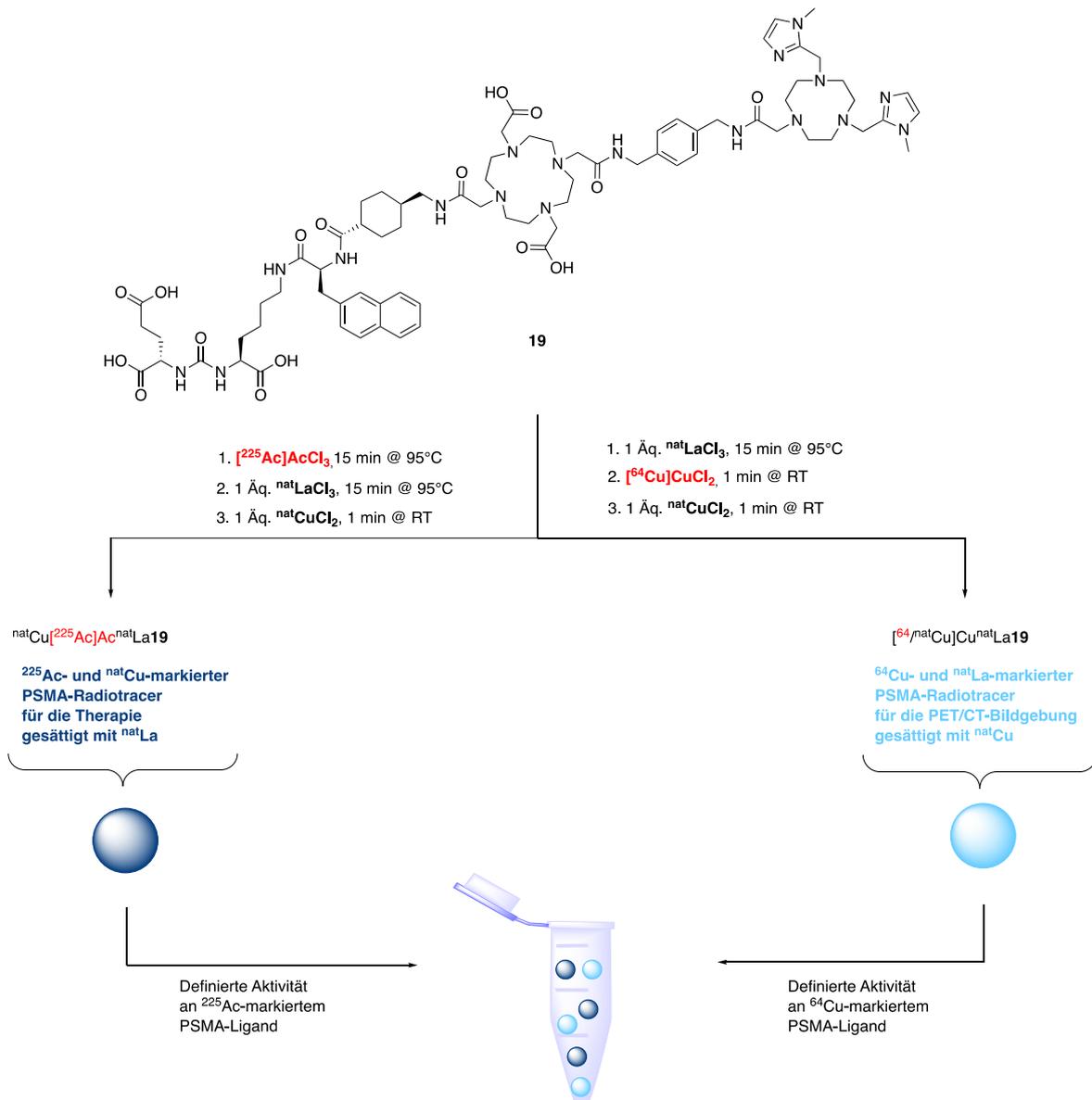
Me **19** in einer Ausbeute von ca. 5 %, isoliert. Beide Verbindungen wurden per Massenspektrometrie sowie analytischer HPLC charakterisiert. In Tab. 14 sind die berechneten und gemessenen m/z-Werte aufgeführt.

**Tabelle 14** Zusammenfassung der massenspektrometrischen Charakterisierung der *in vitro* Evaluation der PSMA-Liganden **18** und **19**. Die IC<sub>50</sub>-Werte [nM] der Liganden **18** und **19** wurden in einem kompetitiven Bindungsassay unter Verwendung von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 als Radioligand bestimmt.

| Verbindung  | LR-ESI-MS m/z für [M + H] <sup>+</sup> ,<br>[M + 2H] <sup>2+</sup> und [M + 3H] <sup>3+</sup> | IC <sub>50</sub> / nM |
|---|---|-----------------------|
| Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-<br>DOOA-NODIA-Me <b>18</b> | Ber.: 1529.8, 765.4, 510.6,<br>Gef.: 766.2, 511.1   | 931.7 ± 0.1           |
| Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-<br>XDA-NODIA-Me <b>19</b>  | Ber.: 1517.8, 759.4, 506.6,<br>Gef.: 1518.4, 759.8, 506.9                                     | 53.2 ± 0.1            |

Im Anschluss wurde die PSMA Affinität der beiden Dichelatorstrukture in Analogie zu den IC<sub>50</sub>-Bestimmungen Kapitel 3.1.3 bestimmt. Der Ligand **18** zeigte einen IC<sub>50</sub>-Wert von IC<sub>50</sub> = 931.7 ± 0.1 nM und der Ligand **19** den Wert von IC<sub>50</sub> = 53.2 ± 0.1 nM. Verglichen mit PSMA-11 (IC<sub>50</sub> = 18.4 ± 0.2, Kapitel 3.1.3) zeigte **18** eine deutlich niedrigere PSMA-Affinität. Infolge einer Substitution des PEG-Linkers konnte die PSMA-Affinität der synthetisierten Liganden jedoch erheblich gesteigert werden. Durch Verwendung eines Xylylendiamin-Linkers im Falle von **19** konnte dabei eine PSMA-Affinität erzielt werden, die vergleichbar mit der klinisch eingesetzten Verbindung PSMA-11 war.

Zusammenfassend konnte erstmalig ein hochaffiner PSMA-Radiohybridligand, der zwei BFCs enthält, dargestellt werden. Mit den etablierten Grundlagen, wie der Nachweis einer regioselektiven Metallkomplexierung und einer selektiven Dualmarkierung mit zwei Radiometallen durch das Modellkonstrukt **16**, steht nun mit dem hochaffinen PSMA-Liganden **19** eine Verbindung zur Verfügung, die neben den in Kapitel 3.2 beschriebenen Anwendungen potentiell für die Ermittlung der Bioverteilung/Dosimetrie von <sup>225</sup>Ac-markierten Radiotraceren beim fortgeschrittenem Prostatakarzinom verwendet werden kann. Bezogen auf Abb. 66 könnte diese folgendermaßen durchgeführt werden (Abb. 67).



**Abbildung 69** Radiomarkierung des radiohybriden PSMA-Ligand **19** mit Ac-225 und Cu-64. Herstellung eines Gemisches bestehend aus dem <sup>64</sup>Cu-markierten und dem <sup>225</sup>Ac-markiertem Ligand mit einer definierten Aktivität für die Ermittlung der Bioverteilung des <sup>225</sup>Ac-markiertem Liganden <sup>nat</sup>Cu[<sup>225</sup>Ac]Ac<sup>nat</sup>La<sup>19</sup>.

#### 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Dissertation befasste sich mit der Entwicklung multifunktionaler PSMA-spezifischer Radiotracer. Das erste Teilprojekt beschäftigte sich mit der Identifizierung eines hochaffinen BODIPY-PSMA-Liganden für die PET/Fluoreszenz-Bildgebung beim Prostatakarzinom. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte ein PSMA-spezifischer Radiohybridligand auf Basis von zwei Metallchelatoren entwickelt werden, der aufgrund verschiedenster (Radio)metallkombinationen eine Vielzahl an bisher nicht realisierbaren (medizinischen) Anwendungen ermöglicht, bspw. die Bildgebung und Dosimetrie eines  $^{225}\text{Ac}$ -markierten Radiotracers.

Für die Identifizierung eines hochaffinen BODIPY-PSMA-Liganden wurde zunächst eine Ligandenbibliothek synthetisiert. Die Synthese des PSMA-Bindemotivs Glu-CO-Lys und die Spacerkonjugation der verschiedenen Derivate erfolgte mittels Festphasensynthese. Die BODIPY-Konjugation wurde nach der durchgeführten Schutzgruppenabspaltung in Lösung durchgeführt. Die anschließende semipräparative Aufreinigung lieferte die BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7**, **8** und **12** in Ausbeuten von 37 - 44 %. Auf der Basis des BFC DOTA erfolgte zusätzlich die Synthese des PSMA-Liganden **12**, der aufgrund des BODIPY-Farbstoffes und des Chelators, potentiell auch als Radiohybridligand eingesetzt werden kann.

Nach fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen und Charakterisierung der Konjugate wurden die BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7**, **8** und **12** mit F-18 markiert. Die Markierung erfolgte über einen Lewis-Säure-katalysierten  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch unter Verwendung von  $\text{SnCl}_4$ . Nach einer Sep Pak  $\text{C}_{18}$ -Aufreinigung wurden die PSMA-Liganden  $^{18}\text{F}$ **5**,  $^{18}\text{F}$ **6**,  $^{18}\text{F}$ **7**,  $^{18}\text{F}$ **8** und  $^{18}\text{F}$ **12** in einer radiochemischen Reinheit von > 99 % und in einer moderaten spezifischen Aktivität von maximal 0.7 MBq / nmol erhalten. Zusätzlich konnte Ligand **12** mit Lu-177 markiert werden. Durch die Darstellungen von  $^{18}\text{F}$ **12** und  $^{177}\text{Lu}$ **12** wurde somit demonstriert, dass **12** als potentieller radiohybrider PSMA-Ligand verwendet werden kann.

Nach der Radiomarkierung wurde die PSMA-Affinität der Liganden durch ein kompetitives Bindungsassay in PSMA-positiven LNCaP-Zellen bestimmt. Verbindung **6** zeigte dabei die höchste Affinität vergleichbar mit dem klinischen eingesetzten Liganden PSMA-11. Die PSMA-Affinität der Liganden **5**, **7**, **8** und **12** war verglichen mit PSMA-11 wesentlich niedriger, wodurch diese für weitere *in vitro* sowie fluoreszenzmikroskopische

Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Darauf folgende Internalisierungsexperimente des  $^{18}\text{F}$ -markierten BODIPY-PSMA-Liganden [ $^{18}\text{F}$ ]F6 in LNCaP-Zellen zeigte eine zunehmende PSMA-vermittelte Internalisierung über den Zeitraum von 1 h. Der prozentuale Höchstwert an internalisiertem [ $^{18}\text{F}$ ]F6 lag bei 3.83 %. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Ergebnisse der Internalisierung bestätigt. Zu frühen Zeitpunkten wurde dabei die Lokalisation von **6** in der Zellmembran und zu späteren Zeitpunkten auch in subzellulären Kompartimenten gefunden. Dies stand im Einklang mit den Arbeiten von Eder *et al.*<sup>108,109</sup>. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der BODIPY-PSMA-Ligand **6** bzw. BODIPY-Carbonsäure **1** die technischen Voraussetzungen des FireFly Laparoscops erfüllte, womit die Verwendung am DaVinci-Chirurgiesystem möglich ist.

Zusammenfassend wurde ein BODIPY-PSMA-Ligand mit hoher Affinität identifiziert, der für die potentielle Anwendung als duale Bildgebungssonde für Prostatakrebs eingesetzt werden kann. Nachfolgende Experimente werden sich zum einem mit der Steigerung der molaren Aktivität des  $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausches und zum anderen mit der *in vivo* Evaluation des hochaffinen Liganden **6** beschäftigen. Der Fokus wird dabei zunächst auf der Untersuchung der Bioverteilung im Tiermodell sowie auf der Bildgebung im Xenografttragenden Mausmodell mit [ $^{18}\text{F}$ ]F6 liegen.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte für die Identifizierung eines hochaffinen PSMA-spezifischen Radiohybridliganden auf Basis von zwei Metallchelatoren zunächst der Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung (auf radioaktiver und nichtradioaktiver Ebene). Dazu wurde initial ein Dichelatormodellkonstrukt, aufgebaut aus den BFCs NODIA-Me und DOTA, synthetisiert. Das Modellkonstrukt NODIA-Me-Bz-DOTA **16** wurde in einer Gesamtausbeute von 56 % isoliert. Auf Basis von massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgte danach die (chemoselektive) Synthese des mononuklearen Cu-Komplexes Cu**16**, der mononuklearen Lanthanoidkomplexe Ln**16** und der heterodinuklearen Komplexe vom Typ CuLn**16**. Die regioselektive Metallkomplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  im NODIA-Me Teil und Kationen vom Typ  $\text{Ln}^{3+}$  im DOTA Teil des Modellkonstruktes **16** wurde danach mittels UV/Vis-Spektroskopie belegt. Für die d-d-Übergänge von Cu**16**, CuLn**16** und [Cu(NODIA-Me-NHET)] wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet, während das Absorptionsmaximum des [Cu(DOTA)]<sup>2+</sup>-Komplexes bei deutlich höheren Wellenlängen gefunden wurde. Anschließend NMR-

spektroskopische Untersuchungen des metallfreien Dichelatormodellkonstruktes **16** und den beiden Metallkomplexen Lu**16** sowie ZnLu**16** zeigten ebenfalls, dass die regioselektive Komplexierung des Zn<sup>2+</sup> vom NODIA-Me Teil und die Bindung von Lu<sup>3+</sup> im DOTA Teil des Modellkonstruktes **16** erfolgte. Der Vergleich des aromatischen Bereichs der NMR-Spektren von **16** und Lu**16** zeigte, dass nach Komplexierung des Lu<sup>3+</sup>-Kations keine Aufspaltung der beiden Singulets der Imidazolprotonen zu sehen war und erst nach Komplexierung des Zn<sup>2+</sup>-Kations im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von ZnLu**16** eine Verschiebung der Imidazolresonanzen zu höherem Feld beobachtet werden konnte. Zusätzlich erfolgte eine EPR-spektroskopische Untersuchung der regioselektiven Metallkomplexierung. Da für die untersuchten Komplexe jedoch keine Werte für die entsprechenden g-Tensoren berechnet wurden, konnten diese nicht zum Nachweis der regioselektiven Metallkomplexierung verwendet werden.

Nachdem die regioselektive Metallkomplexierung mittels UV/Vis-Spektroskopie und NMR-Spektroskopie gezeigt wurde, erfolgten Radiomarkierungen unter Verwendung des Modellkonstruktes **16**. Auch auf radioaktiver Ebene konnte in dieser Arbeit erstmalig die Bildung des dualmarkierten Dichelatormodellkonstruktes mit zwei unterschiedlichen Radiometallen erfolgreich nachgewiesen werden. Durch die Zugabe an stöchiometrischen Mengen an den entsprechenden nichtradioaktiven Metallsalzen wurde in diesen Experimenten ein homogener, dualmarkierter Komplex erhalten. Sowohl für das Radiometallpaar Cu-64/Lu-177 als auch für Cu-64/Ac-225 wurde dabei die Bildung von [<sup>64</sup>/<sub>nat</sub>Cu]Cu[<sup>177</sup>/<sub>nat</sub>Lu]Lu**16** bzw. [<sup>64</sup>/<sub>nat</sub>Cu]Cu[<sup>225</sup>Ac]Ac<sup>nat</sup>La**16** mittels Radio-HPLC und Gammaskopie nachgewiesen. Die Identifikation der dualmarkierten bzw. homogen markierten Produkte bildete somit die (radiochemische) Grundlage für die Entwicklung eines radiohybriden PSMA-Liganden für die PET/CT-Bildgebung von Ac-225. Nachdem die (regio)selektive Dualmarkierung erstmalig sowohl auch auf nichtradioaktiver als auch auf radioaktiver Ebene demonstriert wurde, erfolgte zuletzt die Synthese von Dichelator PSMA-Liganden. Dabei konnte mit Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-Me **19** ein hochaffiner Ligand identifiziert werden, der eine vergleichbare Affinität wie PSMA-11 aufwies.

Für die erfolgreiche klinische Translation eines Radiohybridliganden auf Basis von zwei Chelatoren wird in naher Zukunft zunächst die Radiomarkierung des Liganden **19** mit Cu-64/Lu-177 als auch für Cu-64/Ac-225 untersucht. In Analogie zum hochaffinen BODIPY-PSMA-

Liganden **6** wird ein weiterer Bestandteil von Folgeprojekten danach die Untersuchung der Bioverteilung und die Bildung des Radiohybridliganden **19** im Mausmodell sein.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeines

Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Sigma-Aldrich, Carbolution, Iris Biotech, Carl Roth, ABX advanced biochemical compounds GmbH sowie TCI Europe erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Fluor-18 wurde von Life Radiopharma Fcon GmbH (Holzhausen a.d. Heide, Deutschland) erhalten.  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  wurde von der Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie der Eberhard-Karls-Universität (Tübingen, Deutschland) bezogen.  $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$  und  $[^{225}\text{Ac}]\text{AcCl}_3$  wurden von ITM Medical Isotopes GmbH (München, Deutschland) bezogen. Die HPLC-Messungen erfolgten an einem Shimadzu LC-20AT System, ausgestattet mit SPD-20A UV Detektor (UV Detektion bei 220 nm, 254 nm oder 490 nm) sowie einem Raytest Ramona Radioaktivitätsdetektor (Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland). Die analytischen HPLC-Läufe wurden unter Verwendung einer Pronotsil-Säule (250 x 4 mm, 120-5-C18, AQ 5.0  $\mu\text{m}$ ) und einer Phenomenex Jupiter-Säule (LC Column 250 x 4 mm, 4.0  $\mu\text{m}$  90 A Proteo) durchgeführt. Die Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie erfolgte an einem Biotage Isolera One System unter Verwendung einer Biotage Sfür C<sub>18</sub> D-Säule (100 Å, 30  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt. Aufreinigungen mittels semipräparativer HPLC wurden mit einem Rigol HPLC System und einem Rigol UV Detektor der Firma Techlab in Kombination mit einer VDSpher 100 C<sub>18</sub>-E Säule (250 x 20 mm) durchgeführt. Die Laufmittelgradienten der Flash-Chromatographie sowie der analytischen und der semipräparativen HPLC-Läufe setzten sich aus den Lösungsmitteln A = H<sub>2</sub>O (0.1 % TFA) sowie B = Acetonitril (0.1 % TFA) zusammen und sind für die jeweiligen Verbindungen mit den entsprechenden Flussraten, Retentionszeiten, Syntheseausbeuten und Charakterisierungsdaten im experimentellen Teil aufgelistet. Die Laufmittelgradienten unter Verwendung der Flash-Chromatographie wurden in CV (column volumes) angegeben. Analytische Dünnschichtchromatographie (Thin Layer Chromatography, TLC) wurde auf Silicagel beschichteten Aluminiumplatten durchgeführt (40 x 80 nm, Machery-Nagel). Für die Aufnahme der niedrig aufgelösten Massenspektren (low resolution massspectrometry, (+)-LR-ESI-MS) wurde ein Advion expression CMS System verwendet. NMR Spektren wurden in D<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O/40 % NaOD, DMSO-d<sub>6</sub> sowie CD<sub>3</sub>OD bei Raumtemperatur mit einem Bruker BioSpin Avance II Spektrometer (400, 376 oder 100 MHz) aufgenommen. Chemische Verschiebungen  $\delta$  sind in parts per million (ppm), relativ zu Trimethylsilan (TMS) angegeben. Die Multiplizität der Signale ist wie folgt beschreiben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett,

m = Multiplett. Für die Lyophilisation der Verbindungen wurde ein Christ Alpha 1-2 LD plus Lyophilisator verwendet. UV/Vis Spektren wurden mit einem JASCO V-650 Absorptionsspektrometer aufgenommen. Fluoreszenz- und Anregungsspektren wurden an einem JASCO Fluoreszenzspektrophotometer (DP-6500) detektiert. Für alle spektroskopischen Messungen wurden Polystyrolküvetten (Länge der Küvette: 1 cm, Sarstedt) verwendet mit einer Probenkonzentration im mikromolaren Bereich. Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten und der jeweiligen Lebenszeiten erfolgte im Rahmen der Promotion von Frau Dr. C. Hoffmann M.Sc. (AK Prof. Dr. G. Jung, Biophysikalische Chemie, UdS)<sup>163</sup>. Alle Instrumente zur Detektion von radioaktiven Zerfallsprozessen wurden in Anlehnung an ein bereits publiziertes Standard Routineprotokoll kalibriert<sup>163</sup>. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit einem ISOMED 2010-Aktivimeter (Nuklear-Medizintechnik, Dresden, Germany). Für die akkurate Quantifizierung der Radioaktivität wurden alle Proben für 1 min mit einem kalibrierten Hidex Gamma Counter gemessen. Die dynamischen Energiefenster lagen bei 400–600 keV für Fluor-18 und Kupfer-64, 100-250 keV für Lutetium-177 sowie Actinium-225 (Francium-221). Im Falle von Actinium-225-markierten Proben wurde die Probe zusätzlich im Energiefenster von Bismut-213 (400-600 keV) gemessen. Statistische Analysen (Student's t-test, confidence interval 95 %) wurden unter Verwendung von GraphPad Prism Version 7.0 durchgeführt. Die Messungen der EPR-Spektren erfolgten in Kooperation mit Frau M. Schröder (AK Prof. Dr. C. Kay, Physikalische Chemie, UdS). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Herrn PD Dr. E. Krause (AK Prof. Dr. Rettig, cellular neurophysiology, CIPMM, UdS) unter Verwendung eines SIM Mikroskops (Carl Zeiss Elyra PS 1) und eines 63x Objektivs (nA 1.43) durchgeführt. DAPI wurde mit einem 405 nm Laser angeregt. Die Rohdaten wurden mit der Zen2012 Software (Carl Zeiss) prozessiert und für die Präsentation mit ImageJ (v 1.53) analysiert und bearbeitet.

## 5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AV)

### AV 1 - Fmoc-Entschützung – Festphasensynthese

Das entsprechende Harz wird in einer Piperidin:DMF-Lösung (50/50, % v/v) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach abfiltriert, mit DMF (3 x 10 mL) sowie Diethylether (3 x 10 mL) gewaschen und getrocknet.

### AV 2 - Alloc-Entschützung

Das entsprechende Harz wird in Dichlormethan aufgenommen und unter Lichtausschluss mit einer Lösung aus Tetrakispladiumtriphenylphosphin (0.3 äq.) in Dichlormethan versetzt. Anschließend wird Morpholin (15 äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird das Harz abfiltriert, mit Dichlormethan (3 x 10 mL), einer Natriumdiethyldithiocarbamat Trihydrat Lösung in DMF (3 x 10 mL), DMF (3 x 10 mL) sowie Diethylether (3 x 10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

### AV 3 - Aminosäure/Linker-Konjugation

Das entsprechende Harz wird in DMF aufgenommen und anschließend eine Lösung aus der entsprechenden Fmoc-geschützten Aminosäure/Linker (4 äq.), HATU (3.6 äq.) sowie DIPEA (8 äq.) in DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wird im Folgenden für 2 h bei Raumtemperatur gerührt, danach das Harz abfiltriert und mit DMF (3 x 10 mL) sowie Diethylether (3 x 10 mL) gewaschen. Für jede weitere Aminosäurekopplung wird anschließend die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (AV 1) und die Kopplungsreaktion wiederholt.

#### **AV 4 - Tert.butylester-Entschützung und Harzabspaltung**

Das entsprechende Harz wird in einer TFA:TIS:H<sub>2</sub>O-Lösung (95/2.5/2.5, % v/v) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, das Filtrat danach bei - 20 °C zu Diethylether getropft, der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert und für die Aufreinigung an der Luft getrocknet.

#### **AV 5 - SepPak C<sub>18</sub>-Kartuschen Aufreinigung**

Für jede Aufreinigung erfolgt zunächst das Vorkonditionieren der C<sub>18</sub>-Kartusche (SepPak Plus Short C18, Waters). Die Kartusche wird dazu zunächst mit Ethanol (5 mL), Wasser (10 mL) und Luft (10 mL) gespült. Die Probe wird danach langsam auf die Kartusche aufgebracht und mit Wasser (10 mL) gespült. Anschließend erfolgt die Elution der Zielverbindung durch langsames Spülen der Kartusche mit 50 % aq. Ethanol (2 x 1 mL).

#### **AV 6 - Zellkultur - Inkulturnahme und Mediumwechsel**

Die PSMA-positiven LNCaP Zellen (DSMZ, Braunschweig, Germany) werden bei 37 °C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre (RPMI-Medium mit 10 % Fötalem Kälberserum und 1 % 100 mM Natriumpyruvat) kultiviert.

#### **AV 7 – Zellkultur - Passage und Ermittlung der Zellzahl**

Für die Passage der Zellen wird das Kultiviermedium abgesaugt und der Zellrasen mit kaltem PBS (10 mL) gespült. Nach dem Absaugen der PBS-Lösung, erfolgt die Ablösung der Zellen durch die Inkubation des Zellrasens mit Trypsin (3 mL) für 3 min bei 37 °C. Danach werden 7 mL Kultiviermedium zugegeben und die Zellsuspension homogenisiert. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer<sup>164</sup>. Dazu werden 50 µL der Zellsuspension und 450 µL einer Trypanblau-Lösung vermischt und 10 µL der Suspension in die Zählkammer gegeben. Das Zählen der Zellen erfolgt danach mit einem Lichtmikroskop (Fa. Leitz, Labovert).

## AV 8 – Zellkultur – Kompetitives Bindungsassay / IC<sub>50</sub>-Bestimmung

Die Herstellung des für die Ermittlung der PSMA-Affinität benötigten PSMA-Inhibitors [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 erfolgt nach der Anleitung von Lämpchen *et al.*.

### Ansatz PSMA-617 Markierungslösung

Konzentration der Markierungslösung  $c = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$

Dazu wird PSMA-617 (500  $\mu\text{g}$ , 479 nmol) in 479  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O gelöst

### Ansatz Natriumacetatpuffer pH 4.5 (1 M)

Lösung A

4.102 g Natriumacetat

50 mL H<sub>2</sub>O ultrapur

Lösung B

2.85 mL Essigsäure

50 mL H<sub>2</sub>O ultrapur

Nach Herstellung der beiden Lösungen werden 25 mL der Lösung A mit 25 mL der Lösung B gemischt. Anschließend wird der pH-Wert überprüft.

**Tabelle 15** Pipettierschema für die Synthese von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617.

| Verbindung  | Volumen           |
|---|-------------------|
| PSMA-617  | 2 $\mu\text{L}$   |
| [ <sup>177</sup> Lu]LuCl <sub>3</sub> in 0.04 M HCl | 6 $\mu\text{L}$   |
| Natriumacetatpuffer, pH 4.5                         | 244 $\mu\text{L}$ |

Für die Radiomarkierung wird PSMA-617 in Natriumacetatpuffer vorgelegt, anschließend [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl (molare Aktivität  $\sim 15 \text{ MBq}/\text{nmol}^{-1}$ ) zugegeben und für 15 min bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss wird die Markierungslösung abgekühlt, ein Aliquot entnommen und die radiochemische Reinheit mittels Radio-HPLC überprüft.

### Ansatz PSMA-11 Stammlösung

Konzentration der Stammlösung  $c = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$

Dazu wird PSMA-11 (1.00 mg, 1.06  $\mu\text{mol}$ ) in 1056  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst

### Durchführung Assay

Die LNCaP Zellen werden nach erfolgter Passage sowie nach Ermittlung der Zellzahl zunächst in einer mit poly-L-Lysin gecoateten 24-Well-Platte ausgesät ( $\sim 2 \times 10^5$  Zellen pro Well) und für 24 h bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Der Überstand wird am nächsten Tag abgesaugt und 250  $\mu\text{L}$  frisches Zellmedium pro Well vorgelegt. Die zu testende Substanz wird in acht Verdünnungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt und jeweils der Radioligand ( $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ ) zugegeben (Tab. 16). Als Kontrolle wird PSMA-11 verwendet.

**Tabelle 16** Allgemeines Ansatz- und Pipettierschema der Konzentrationsreihe der zu testenden Liganden im kompetitiven Bindungsassay.

| <b>Probenlösung</b> | <b>Ansatz</b>   | <b>Konzentration</b> |
|---------------------|---|----------------------|
| <b>L1</b>           | 6 $\mu\text{L}$ Stock + 994 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ | 6000 nM              |
| <b>L2</b>           | 100 $\mu\text{L}$ L1 + 900 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  | 600 nM               |
| <b>L3</b>           | 100 $\mu\text{L}$ L2 + 900 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  | 60 nM                |
| <b>L4</b>           | 100 $\mu\text{L}$ L3 + 900 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  | 6 nM                 |
| <b>L5</b>           | 100 $\mu\text{L}$ L4 + 900 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  | 0.6 nM               |
| <b>L6</b>           | 100 $\mu\text{L}$ L5 + 900 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  | 0.06 nM              |
| <b>L7</b>           | 100 $\mu\text{L}$ L6 + 900 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  | 0.006 nM             |
| <b>L8</b>           | 100 $\mu\text{L}$ L7 + 900 $\mu\text{L}$ PBS + 1 $\mu\text{L}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$  | 0.0006 nM            |

Nach Zugabe des Radioliganden werden die Probelösungen gut gevortext und jeweils 50  $\mu\text{L}$  in die vorbereiteten Wells pipettiert. Das finale Volumen beträgt 300  $\mu\text{L}$ /Well (Tab. 17).

**Tabelle 17** Pipettierschema der Wellplatten für das Bindungsassay. Die Durchführung erfolgte in dreifacher Ausführung.

| Well | Volumen Probe | Volumen<br>Medium | Endvolumen | Endkonzentration<br>Ligand |
|------|---------------|-------------------|------------|----------------------------|
| 1    | 50 µL L1      | 250 µL            | 300 µL     | 1000 nM                    |
| 2    | 50 µL L2      | 250 µL            | 300 µL     | 100 nM                     |
| 3    | 50 µL L3      | 250 µL            | 300 µL     | 10 nM                      |
| 4    | 50 µL L4      | 250 µL            | 300 µL     | 1 nM                       |
| 5    | 50 µL L5      | 250 µL            | 300 µL     | 0.1 nM                     |
| 6    | 50 µL L6      | 250 µL            | 300 µL     | 0.01 nM                    |
| 7    | 50 µL L7      | 250 µL            | 300 µL     | 0.001 nM                   |
| 8    | 50 µL L8      | 250 µL            | 300 µL     | 0.0001 nM                  |

Nach Zugabe der Probenlösungen werden die Well-Plates für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, der Überstand anschließend entfernt, mit eiskaltem PBS (3 x 500 µL) gewaschen und 0.1 M NaOH (2 x 1 mL) zum Lysieren der Zellen zugegeben. Die gebundene bzw. internalisierte Aktivität des entstandenen Zelllysats wird anschließend am Gamma-Counter gemessen und berechnet als prozentual gebundene Radioaktivität / 10<sup>5</sup> LNCaP-Zellen. Die erhaltenen Daten mittels nicht-linearer Regression (GraphPad Prism) ausgewertet, um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) zu berechnen. Die Experimente wurden zweimal in dreifacher Ausführung durchgeführt.

## AV 9 – Zellkultur - Zellinternalisierung

### Ansatz 2-PMPA Blockierlösung für Zellinternalisierung

Zunächst wird die 2-PMPA-Stammlösung angesetzt:

Konzentration der Stammlösung  $c = 1 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$

Dazu wird 2-PMPA (5 mg, 22,11 µmol) in 22.1 µL H<sub>2</sub>O gelöst.

Für die Blockierlösung erfolgte danach eine 1:1000-Verdünnung der 2-PMPA Stammlösung. 1 µL der 2-PMPA Stammlösung ( $c = 1 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ ) wird dazu mit 999 µL PBS-Puffer verdünnt. Von

dieser Lösung der Konzentration  $c = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$  wurden  $200 \mu\text{L}$  pro Well für die Blockierungsexperimente verwendet.

### Ansatz des radiomarkierten PSMA-Liganden

Die Durchführung des Zellinternalisierungsassays erfolgt unter Verwendung des jeweiligen radiomarkierten Liganden. Die Ansätze und die Durchführung der Radiomarkierung für die jeweiligen Liganden ist in den entsprechenden Kapiteln detailliert aufgeführt.

### Durchführung Zellinternalisierung

Für die Internalisierungsexperimente werden LNCaP-Zellen in einer Dichte von  $10^6$  Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausplattiert und für 24 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  inkubiert (in RPMI-Medium). Nach 24 h wird das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen ( $2 \times 1 \text{ mL}$ ) und danach  $1.2 \text{ mL}$  PBS pro Well vorgelegt. Es folgt die Zugabe des radiomarkierten Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen ( $100 \mu\text{L}$ , finale Stoffmenge Ligand  $1 - 10 \text{ pmol}$  je nach Experiment, vgl. Kap. 5.6.3.2, vide infra) und das Einstellen des finalen Volumens auf  $1.5 \text{ mL}$  pro Well mit PBS. Zur Bestimmung des nicht spezifischen Anteils an Radioaktivität wird zuvor ein Überschuss an 2-PMPA Lösung ( $200 \mu\text{L}$ , finale Konzentration  $c = 1 \mu\text{M}$ ) in ausgewählte Kontrollwells pipettiert. Die Inkubation des Radioliganden erfolgt für 30 min bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zusätzlich wird ein Experiment bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Internalisierung wird nach den ausgewählten Zeitpunkten (15 min, 30 min, 1 h und 2 h) durch die Entnahme des Mediums gestoppt, der Zellrasen anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen und der membrangebundene Radioligand durch Waschen mit  $0.1 \text{ M}$  Glycinpuffer ( $\text{pH } 2.8$ ,  $2 \times 1 \text{ mL}$ ) entfernt. Danach werden die Zellen mit  $1 \text{ M}$  NaOH ( $2 \times 1 \text{ mL}$ ) aufgelöst und die Intensität an aufgenommenem Radioligand der einzelnen Fraktionen (Überstand nach Inkubation, Membrangebundener Anteil und internalisierter Anteil) am Hidex Gamma-Counter gemessen berechnet als prozentual gebundene Radioaktivität /  $10^5$  LNCaP-Zellen.

## AV 10 – Zellkultur - Objektträger-Präparation Mikroskopie

Die Ansätze der Stammlösungen der jeweiligen Liganden ist in entsprechenden Kapiteln detailliert aufgeführt.

### Ansatz Paraformaldehyd-Lösung

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 16 % Paraformaldehyd-Ampulle | 10 mL   |
| 10 x PBS                     | 4 ml  |
| 3.81 mg MgCl <sub>2</sub>    | Endkonzentration von MgCl <sub>2</sub> in der<br>Paraformaldehyd-Lösung: c = 1 mM   |
| 4.44 mg CaCl <sub>2</sub>    | Endkonzentration von CaCl <sub>2</sub> in der<br>Paraformaldehyd-Lösung: c = 1.8 mM |

Auffüllen auf 40 ml bidestilliertem Wasser

### Ansatz 2-PMPA Blockierlösung für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen

Zunächst wurde die 2-PMPA-Stammlösung angesetzt (vgl. AV 9):

Konzentration der Stammlösung c = 1 µmol/µL

Dazu wurde 2-PMPA (5 mg, 22,11 µmol) in 22.1 µL H<sub>2</sub>O gelöst.

Es folgt eine 1:1000-Verdünnung der 2-PMPA Stammlösung. 1 µL der 2-PMPA-Stammlösung (c = 1 µmol/µL) wird dazu mit 999 µL PBS-Puffer verdünnt. Von dieser Lösung der Konzentration c = 1 nmol/µL werden 40 µL pro Well für die Blockierungsexperimente im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

### Durchführung Objektträger-Präparation

Für die Vorbereitung der Objektträger für die Fluoreszenzmikroskopie werden die verwendeten LNCaP-Zellen zunächst passagiert und 10<sup>5</sup>-Zellen auf einem poly-L-Lysin gecoateten Coverslip (25 mm) in einer 6-Well Platte ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wird anschließend entfernt und der Coverslip mit eiskaltem PBS

gewaschen. Danach werden 2 mL PBS pro Well vorgelegt, anschließend der PSMA-Ligand (finale Konzentration 20 nM pro Well) zugegeben und bei RT für 15 min, 30 min sowie für 60 min inkubiert. Chemische Blockingstudien werden durch die Inkubation mit 2-PMPA (finale Konzentration 20 mM pro Well) für 30 min durchgeführt. Zusätzlich erfolgt ein biologisches Blocking-Experiment bei 4 °C.

Nach der Inkubation werden die Zellen gewaschen und mit einer Paraformaldehyd-Lösung (4 %, in PBS, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub> and 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>) für 15 min fixiert. Nach zwei anschließenden Waschschritten mit PBS sowie H<sub>2</sub>O erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidino-2-diphenylindol Dihydrochlorid (DAPI) durch die Inkubation mit 2 Tropfen NucBlue™ Fixed Cell Stain ReadyProbes™ in einem Gesamtvolumen von 2 mL H<sub>2</sub>O. Die Fixierung der Coverslips auf dem Objektträger erfolgte mit einem Tropfen Pro-Long Diamond Antifade Mountant pro Coverslip. Die Coverslips wurden anschließend bei 4 °C für die Mikroskopie gelagert. Die Membrananreicherung wurde mit einem SIM Mikroskop (Carl Zeiss Elyra PS.1 microscope) unter Verwendung eines 63 x Objektivs (nA 1.43) untersucht. DAPI wurde dabei mit einem 405 nm Laser, BODIPY Liganden mit einem 488 nm Laser angeregt. Die erhaltenen Rohdaten wurden anschließend mit der Zen2012 Software (Carl Zeiss) bearbeitet und anschließend mit ImageJ v. 1.53 post-prozessiert.

### **AV 11 - Allgemeine Vorschrift der BODIPY-Konjugation in Lösung**

Nach erfolgter Linkerkonjugation (AV 3) und Harz-Abspaltung (AV 4) der Vorläufer Glu-CO-Lys, **2**, **3**, **4** und **11** erfolgt die BODIPY-Konjugation in Lösung. Dazu wird bei RT eine Lösung bestehend aus BODIPY **1** (1 äq), HATU (1 äq) und DIPEA (2 äq) in trockenem DMF (1 mL – 2 mL) zu der Precursorlösung (Glu-CO-Lys, **2**, **3**, **4**, **11**) (1 äq) in DMF getropft. Die orangefarbene Lösung wird für 2 h bei RT gerührt, danach mit Wasser (+ 0.1 % TFA) gequenchet und mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt.

Auswertung der NMR-Spektren erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. C. Hoffmann MSc. (AK Prof. Dr. G. Jung, Biophysikalische Chemie, UdS)

## **AV 12 – Synthese der Metallkomplexe vom Typ [Ln(NODIA-Me-Bz-DOTA)]**

### Ansatz Ammoniumacetat-Puffer pH 5.4 (0.5 M)

1.927 g Ammoniumacetat

400  $\mu$ L Essigsäure

50 mL H<sub>2</sub>O ultrapur

1.927 g Ammoniumacetat werden in 40 mL H<sub>2</sub>O ultrapur gelöst und 400  $\mu$ L Essigsäure zugegeben. Anschließend wird mit H<sub>2</sub>O ultrapur auf 50 mL aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert.

### Synthese Metallkomplexe

NODIA-Me-Bz-DOTA **16** wird in Ammoniumacetatpuffer (pH 5.4) (500  $\mu$ L) gelöst und anschließend LnCl<sub>3</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O (1.1 äq.) in Ammoniumacetatpuffer (500  $\mu$ L) zugegeben. Die farblose Lösung wird anschließend für 15 min bei 95 °C inkubiert, danach gemäß AV 5 aufgereinigt und getrocknet.

## **AV 13 – Synthese der heterodinuklearen Metallkomplexe vom Typ [MLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)]**

[Ln(NODIA-Me-Bz-DOTA)] / Ln**16** wird in Ammoniumacetatpuffer (pH 5.4) (500  $\mu$ L) gelöst und anschließend MX<sub>2</sub> (M = Cu, Zn; X = Cl, Acetat) (1.1 äq.) in Ammoniumacetatpuffer (500  $\mu$ L) zugegeben. Die Lösung wird anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach gemäß AV 5 aufgereinigt und getrocknet.

## 5.3 Syntheseteil

### 5.3.1 Synthese der BODIPY-PSMA-Liganden

#### 5.3.1.1 Synthese der Liganden 5, 6, 7, 8 und 12 mittels kombinierter Syntheseroute

##### 5.3.1.1.1 Synthese des PSMA Bindemotivs Glu-CO-Lys mittels Festphasensynthese

Die Synthese des PSMA-Bindemotivs erfolgte nach einer modifizierten Anleitung von Eder *et al.*<sup>31</sup>.

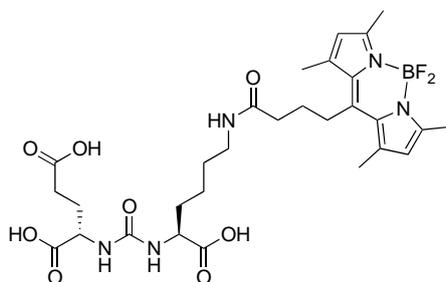
Das 2-Chlor-Tritylchlorid-Harz (5 g, 5.505 mmol, 1.01 mmol / g Harz) wird für 45 min in trockenem Dichlormethan (100 mL) inkubiert. Danach wird eine Lösung aus Fmoc-*L*-Lys(Alloc)-OH (2.74 g, 6.06 mmol) und DIPEA in Dichlormethan (20 mL) langsam zugegeben (Rauchentwicklung) und die Suspension für 24 h bei RT gerührt. Nach anschließendem Abfiltrieren und Waschen des Harzes mit Dichlormethan (50 mL) erfolgt die Inkubation mit einer Dichlormethan:Methanol:DIPEA-Lösung (200 mL, 85/10/5, % v/v) für 2 h bei RT, um nicht abreagierte Chlorotrylchlorid-Reste zu blockieren. Im Anschluß erfolgt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (AV 1).

Für die Knüpfung der Harnstoffbindung wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol (8 äq., 6.55 g, 40.4 mmol) bei – 10 °C in Dichlormethan gelöst und bei dieser Temperatur eine Lösung aus *L*-Glutaminsäure-di-*tert*.butylester (4 äq., 5.98 g, 20.2 mmol) sowie DIPEA (2.87 g, 3.87 mL, 22.2 mmol) in Dichlormethan (20 mL) innerhalb 1 h zugetropft. Die farblose Lösung wurde für 1 h bei – 10 °C gerührt, danach auf RT gebracht und für weitere 3 h gerührt. Die Lösung wird anschließend mit Wasser (2 x 100 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (2 x 100 mL) gewaschen, die vereinigten org. Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei pH 12 zum Harz gegeben. Die Suspension wird im Anschluß für 16 h bei RT gerührt, das Harz danach abfiltriert und mit Dichlormethan (3 x 10 mL) sowie Diethylether (3 x 10 mL) gewaschen. Nach erfolgter Knüpfung der Harnstoffbindung erfolgt zuletzt die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe (AV 2).

### 5.3.1.1.2 Finale Synthese der BODIPY-PSMA-Liganden 5, 6, 7, 8 und 12

#### 5.3.1.1.2.1 Synthese Glu-CO-Lys-BODIPY 5

Die Synthese erfolgte gemäß AV 11 ausgehend von Glu-CO-Lys (100 mg, 0.082 mmol), BODIPY-Carbonsäure **1** (28 mg, 0.082 mmol), HATU (31 mg, 0.082 mmol) und DIPEA (21 mg, 29  $\mu\text{L}$ , 0.164 mmol). Gradient (Semipräparative HPLC): 0-15 min 50 % B auf 60 % B mit einer Flussrate von 7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeiten:  $t_R$  (Semipräparative HPLC): 11.75 min, Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-15 min 95 % B, 15-17 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .  $t_R$  (Analytische HPLC): 11.26 min, Ausbeute: 20 mg (0.031 mmol, 38 %) eines orangefarbenen Feststoffes.

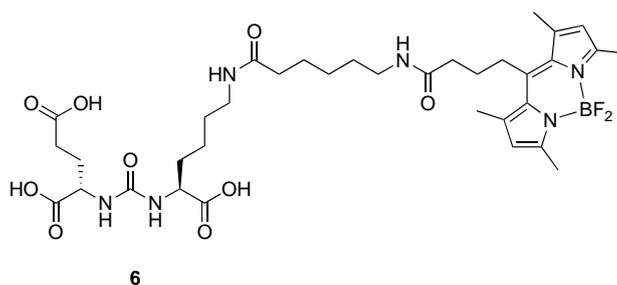


5

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  = 6.14 (s, 2H, 2xCH), 4.29 (2xdd,  $^3J_{\text{cis}}$  = 5.02 Hz,  $^3J_{\text{trans}}$  = 8.53 Hz,  $^3J_{\text{cis}}$  = 4.77 Hz,  $^3J_{\text{trans}}$  = 8.28 Hz, 2H, 2xCCH) 3.19 (td,  $^2J$  = 1.25 Hz,  $^3J$  = 7.03 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.02-3.07 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.46 (s, 6H, 2x $\text{CH}_3$ ), 2.44 (s, 6H, 2x $\text{CH}_3$ ), 2.38-2.43 (m, 4H, 2x $\text{CH}_2$ ), 2.11-2.17 (m, 1H, CH), 1.83-1.95 (m, 4H, 2xCH,  $\text{CH}_2$ ), 1.62-1.69 (m, 1H, CH), 1.51-1.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.41-1.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  = 176.6, 175.0, 155.1, 154.9, 154.1, 147.2, 142.6, 132.6, 122.9, 54.1, 53.7, 40.2, 37.2, 31.2, 30.0, 29.4, 29.0, 28.7, 23.9, 16.7, 14.6 ppm.  **$^{19}\text{F-NMR}$  (377 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  = -148.29 (m, 2F,  $\text{BF}_2$ ) ppm. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für  $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_8\text{BF}_2^+$ : 636.3, gefunden: 636.5.

### 5.3.1.1.2.2 Synthese Glu-CO-Lys-Ahx-BODIPY 6

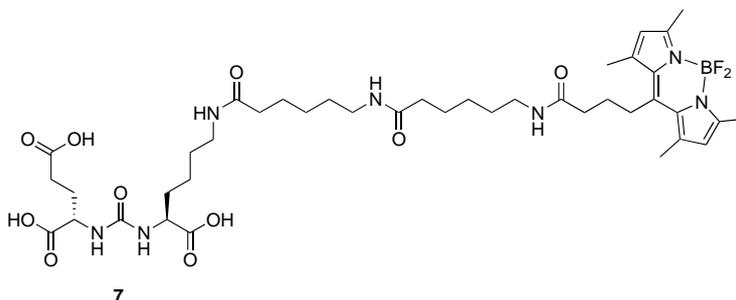
Die Synthese der peptidomimetischen Vorstufe **2** erfolgte gemäß AV 3/AV 4 ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys (1 g, 1.01 mmol), Fmoc-Aminohexansäure (1.43 g, 4.04 mmol), HATU (1.38 g, 3.64 mmol) und DIPEA (1.04 g, 1.41 mL, 8.08 mmol). Die BODIPY-Konjugation erfolgt gemäß AV 11 ausgehend von Glu-CO-Lys-Ahx **2** (100 mg, 0.068 mmol), BODIPY-Carbonsäure **1** (23 mg, 0.068 mmol), HATU (26 mg, 0.068 mmol) und DIPEA (18 mg, 24 µL, 0.136 mmol). Gradient (Semipräparative HPLC): 0-15 min 50 % B auf 60 % B mit einer Flussrate von 7 mL·min<sup>-1</sup>. Retentionszeiten: t<sub>R</sub> (Semipräparative HPLC): 11.80 min. Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-15 min 95 % B, 15-17 min 95 % B mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>. t<sub>R</sub> (Analytische HPLC): 11.39 min, Ausbeute: 20 mg (0.027 mmol, 39 %) eines orangefarbenen Feststoffes.



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 6.14 (s, 2H, 2xCH), 4.24-4.33 (2xddd, 2x <sup>3</sup>J<sub>cis</sub> = 5.02 Hz, 2x <sup>3</sup>J<sub>trans</sub> = 8.53 Hz, 2H, 2xCH), 3.18 (t, <sup>3</sup>J = 6.78 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.13 (t, <sup>3</sup>J = 6.78 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.03-3.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (s, 12H, 4xCH<sub>3</sub>), 2.36-2.41 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.15-2.21 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.84-1.95 (m, 4H, 2xCH, CH<sub>2</sub>), 1.58-1.66 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.48-1.55 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 1.33-1.42 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 176.6, 176.3, 175.0, 160.3, 155.4, 147.4, 147.1, 142.6, 132.8, 122.9, 54.1, 53.3, 40.5, 40.2, 37.2, 37.1, 33.3, 31.2, 30.2, 30.0, 29.4, 29.0, 28.7, 27.7, 26.8, 24.1, 16.7, 14.6 ppm. **<sup>19</sup>F-NMR (377 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = -148.01 (m, 2F, BF<sub>2</sub>) ppm. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>BF<sub>2</sub><sup>+</sup>: 749.4, gefunden: 749.7.

### 5.3.1.1.2.3 Synthese Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx-BODIPY 7

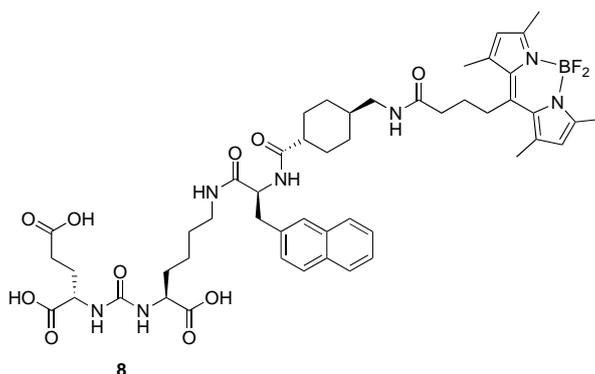
Die Synthese der peptidomimetischen Vorstufe **3** erfolgt gemäß der Allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys (1 g, 1.01 mmol), Fmoc-Aminohexansäure (1.43 g, 4.04 mmol), HATU (1.38 g, 3.64 mmol) und DIPEA (1.04 g, 1.41 mL, 8.08 mmol). Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (AV 1) erfolgt die zweite Linkerkonjugation ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys-Ahx (1 g, 1.01 mmol), Fmoc-Aminohexansäure (1.43 g, 4.04 mmol), HATU (1.38 g, 3.64 mmol) und DIPEA (1.04 g, 1.41 mL, 8.08 mmol). Die BODIPY-Konjugation erfolgt gemäß AV 11 ausgehend von Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx **3** (100 mg, 0.062 mmol), BODIPY-Carbonsäure **1** (21 mg, 0.062 mmol), HATU (24 mg, 0.062 mmol) und DIPEA (16 mg, 22 µL, 0.124 mmol). Gradient (Semipräparative HPLC): 0-15 min 25 % B auf 95 % B mit einer Flussrate von 6 mL·min<sup>-1</sup>. Retentionszeiten: t<sub>R</sub> (Semipräparative HPLC): 9.43 min. Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-15 min 95 % B, 15-17 min 95 % B mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>. t<sub>R</sub> (Analytische HPLC): 11.50 min. Ausbeute: 20 mg (0.023 mmol, 37 %) eines orangefarbenen Feststoffes.



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 6.14 (s, 2H, 2xCH), 4.24-4.26 (m, 1H, CH), 4.31-4.32 (m, 1H, CH), 3.11-3.20 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 3.02-3.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.46 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 2.44 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 2.36-2.40 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.16-2.19 (m, 5H, CH, 2xCH<sub>2</sub>), 1.89-1.96 (m, 4H, 2xCH, CH<sub>2</sub>), 1.60-1.62 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.48-1.53 (m, 8H, 4xCH<sub>2</sub>), 1.32-1.36 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 174.6, 174.5, 173.5, 173.4, 153.7, 140.8, 131.2, 131.1, 121.2, 120.1, 51.4, 38.0, 35.5, 35.4, 29.4, 28.0, 27.6, 27.1, 26.9, 26.7, 26.0, 25.6, 25.1, 24.8, 21.8, 14.6, 12.4 ppm. **<sup>19</sup>F-NMR (377 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = -148.72 (m, 2F, BF<sub>2</sub>) ppm. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für C<sub>41</sub>H<sub>63</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>BF<sub>2</sub><sup>+</sup>: 862.5, gefunden: 862.8.

#### 5.3.1.1.2.4 Synthese Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-BODIPY 8

Die Synthese der peptidomimetischen Vorstufe **4** erfolgt gemäß der Allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys (1 g, 1.01 mmol), Fmoc-2-*L*-Naphthylalanin (1.77 g, 4.04 mmol), HATU (1.38 g, 3.64 mmol) und DIPEA (1.04 g, 1.41 mL, 8.08 mmol). Nach Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe (AV 1) erfolgt die zweite Linkerkonjugation ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys-2-Nal (1 g, 1.01 mmol), Fmoc-*trans*-Aminomethylcyclohexansäure (1.53 g, 4.04 mmol), HATU (1.38 g, 3.64 mmol) und DIPEA (1.04 g, 1.41 mL, 8.08 mmol). Die BODIPY-Konjugation erfolgt gemäß AV 11 ausgehend von Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc **4** (100 mg, 0.058 mmol), BODIPY-Carbonsäure **1** (19 mg, 0.058 mmol), HATU (22 mg, 0.058 mmol) und DIPEA (15 mg, 20 µL, 0.116 mmol). Gradient (Semipräparative HPLC): 0-15 min 50 % B auf 95 % B mit einer Flussrate von 7 mL·min<sup>-1</sup>. Retentionszeiten: t<sub>R</sub> (Semipräparative HPLC): 9.40 min. Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-15 min 95 % B, 15-17 min 95 % B mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>. t<sub>R</sub> (Analytische HPLC): 12.96 min. Ausbeute: 25 mg (0.026 mmol, 44 %) eines orangefarbenen Feststoffes.

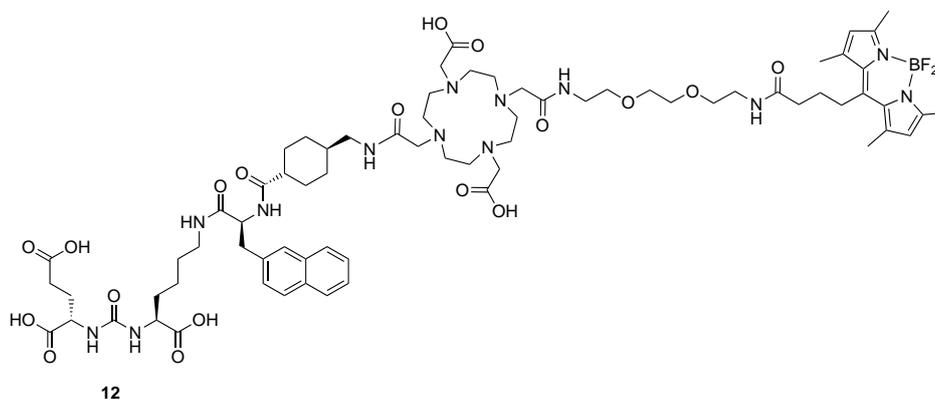


**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 7.74-7.78 (m, 3H, 3xAr-CH), 7.66 (s, 1H, Ar-CH), 7.37-7.41 (m, 3H, 3xAr-CH), 6.14 (s, 2H, 2xCH), 4.64-4.69 (dd, <sup>3</sup>J = 6.72 Hz, <sup>3</sup>J = 8.80 Hz, 1H, CH) 4.29-4.33 (dd, <sup>3</sup>J = 4.89 Hz, <sup>3</sup>J = 8.44 Hz, 1H, CH), 4.17-4.20 (dd, <sup>3</sup>J = 4.52 Hz, <sup>3</sup>J = 8.31 Hz, 1H, CH), 3.24 (2xd, <sup>3</sup>J = 6.85 Hz, <sup>3</sup>J = 6.48 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.12 (t, <sup>3</sup>J = 6.36 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.99-3.04 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.45 (2xs, 12H, 4xCH<sub>3</sub>), 2.36-2.41 (m, 5H, CH, 2xCH<sub>2</sub>), 2.09-2.18 (m, 2H, 2xCH), 1.86-1.94 (m, 3H, CH, CH<sub>2</sub>), 1.77-1.80 (m, 2H, 2xCH), 1.66-1.72 (m, 2H, 2xCH), 1.52-1.58 (m, 2H, 2xCH), 1.33-1.39 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>), 0.89-0.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 175.8, 173.2, 154.1, 153.6, 145.5, 140.8, 134.4, 133.3, 132.4, 130.8, 129.2, 128.6, 127.4, 126.7, 122.9, 121.1, 56.0, 54.0, 53.2, 46.3, 44.1, 39.7, 39.1, 38.8, 37.6, 36.7, 31.6, 29.4, 28.7, 28.4, 24.4, 16.7, 14.6

ppm.  **$^{19}\text{F-NMR}$  (377 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta = -148.01$  (m, 2F,  $\text{BF}_2$ ) ppm. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für  $\text{C}_{50}\text{H}_{65}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{BF}_2^+$ : 972.48, gefunden: 972.6.

### 5.3.1.1.2.5 Synthese Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-BODIPY 12

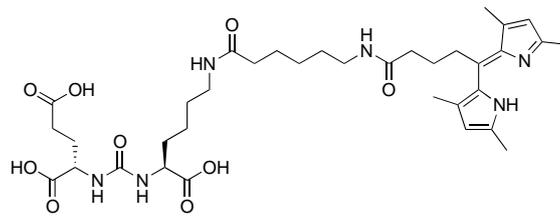
DOTA-di-*tert*.butylester (250 mg, 0.48 mmol) wurde in DMF (10 mL) unter Ultraschall gelöst und anschließend HATU (164 mg, 0.43 mmol) sowie DIPEA (124 mg, 167  $\mu$ L, 0.96 mmol) zugegeben. Die gelbe Lösung wird für 5 min inkubiert und danach bei pH 12 eine Lösung aus Fmoc-DOOA (197 mg, 0.48 mmol) und DIPEA (124 mg, 167  $\mu$ L, 0.96 mmol) in DMF (5 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird im Folgenden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Monoaktivierung von DOTA-di-*tert*.butylester erfolgt die Synthese des Liganden gemäß der Allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys-2-Nal-Amc (106 mg, 0.11 mmol), HATU (164 mg, 0.44 mmol) und DIPEA (124 mg, 167  $\mu$ L, 0.88 mmol). Die BODIPY-Konjugation erfolgt gemäß der Allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 11 ausgehend von Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA **11** (25 mg, 0.021 mmol), BODIPY-Carbonsäure **1** (7 mg, 0.021 mmol), HATU (8 mg, 0.021 mmol) und DIPEA (5 mg, 8  $\mu$ L, 0.042 mmol). Gradient (Semipräparative HPLC): 5 % auf 95 % B in 20 min mit einer Flussrate von 6 mL·min<sup>-1</sup>. Retentionszeiten:  $t_R$  (Semipräparative HPLC): 10.8 min. Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-15 min 95 % B, 15-17 min 95 % B mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>.  $t_R$  (Analytische HPLC): 11.58 min. Ausbeute: 7.94 mg (5.33  $\mu$ mol, 25 %) eines orangefarbenen Feststoffes.



**LR-ESI-MS** berechnet  $m/z$  für C<sub>72</sub>H<sub>106</sub>N<sub>13</sub>O<sub>18</sub>BF<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 745.3 gefunden: 745.7.

### 5.3.1.1.2.6 Synthese Glu-CO-Lys-Ahx-Dipyrrol 13

Glu-CO-Lys-Ahx-BODIPY 6 (10 mg, 13.3  $\mu\text{mol}$ ) wird in 95 % TFA (2 mL) gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach erfolgter Inkubation wird die Reaktionsmischung gemäß der Allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 5 aufgereinigt. Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-15 min 95 % B, 15-17 min 95 % B mit einer Flussrate von 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. Retentionszeit  $t_R$  (Analytische HPLC): 8.91 min, Ausbeute: 14.3 mg (13.3  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines rötlichen Öls.



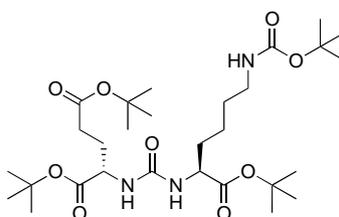
13

**LR-ESI-MS** berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{35}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_9^+$ : 701.3, gefunden: 701.2.

### 5.3.1.2 Synthese PSMA-Bindemotiv in Lösung

#### 5.3.1.2.1 Synthese Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys(O<sup>t</sup>Bu)-ε-NHBOC 9

1,1'-Carbonyldiimidazol (6.55 g, 40.4 mmol) wird bei – 10 °C in Dichlormethan gelöst und bei dieser Temperatur eine Lösung aus L-Glutaminsäure-di-*tert*.butylester Hydrochlorid (5.98 g, 20.2 mmol) sowie DIPEA (2.87 g, 3.87 mL, 22.2 mmol) in DCM innerhalb 1 h zugetropft. Die farblose Lösung wird für 1 h bei – 10 °C gerührt, danach auf RT gebracht und für 3 h gerührt. Die Lösung wird anschließend mit Wasser (2 x 100 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (2 x 100 mL) gewaschen, die vereinigten org. Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das farblose Harz wird anschließend in frischem Dichlormethan (10 mL) aufgenommen und anschließend eine Lösung aus N<sub>ε</sub>-BOC-L-Lysin-*tert*.butylester Hydrochlorid (6.84 g, 20.2 mmol) sowie DIPEA (3.92 g, 5.28 mL, 30.3 mmol) in Dichlormethan (20 mL) binnen 30 min zugetropft. Die farblose Lösung wird danach für 16 h bei Raumtemperatur gerührt, danach mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2 x 100 mL) sowie Wasser (2 x 100 mL) gewaschen, die vereinigten org. Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der gelbliche Rückstand wird anschließend säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, n-Hexan:Ethylacetat 2:1 + 1 % DIPEA, R<sub>f</sub> 0.6). Ausbeute: 9.75 g (16.6 mmol, 82 %) eines farblosen Feststoffes.

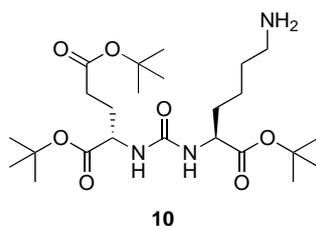


9

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ = 6.73 (t, 1H, J = 5.5 Hz, NHBOC), 6.27 (2xddd, J = 15.1, 8.3 Hz, 2H, 2xNH urea) 4.00 (m, 2H, 2xCCH), 2.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.21 (m, 2H, 2xCH<sub>2</sub>), 1.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.66 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.39 (s, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> *tert*.butyl), 1.36 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> BOC), 1.27 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 172.7, 172.3, 171.8, 157.6, 156.0, 81.0, 80.7, 80.2, 77.8, 53.5, 52.6, 39.9, 39.7, 32.2, 31.2, 29.5, 28.7, 28.0, 22.7, 16.7, 14.6 ppm. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für C<sub>29</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>: 588.4, gefunden: 717.7 ([M + H + DIPEA]<sup>+</sup>).

### 5.3.1.2.2 Synthese Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys(O<sup>t</sup>Bu)-ε-NH<sub>2</sub> 10

Verbindung **9** (5.00 g, 8.50 mmol) wird in einer 10 %igen TFA:Dichlormethan-Lösung (20 mL) gelöst und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die klare Lösung wird anschließend mit Wasser (2 x 20 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der farblose Rückstand getrocknet. Ausbeute: 4.15 g (8.50 mmol, quant.) eines farblosen Öls.



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 6.33 (2xdd, *J* = 10.0, 8.5 Hz, 2H, 2xNH urea), 4.00 (m, 2H, 2xCCH), 2.75 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.22 (m, 2H, 2xCH<sub>2</sub>), 1.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.57 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 1.39 (s, 27H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> *tert*.butyl), 1.31 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 172.6, 172.4, 171.9, 157.7, 81.1, 80.9, 80.3, 53.4, 52.6, 39.9, 39.7, 31.9, 31.3, 28.1, 27.0, 22.6 ppm. **LR-ESI-MS** berechnet *m/z* für C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>: 488.4, gefunden: 488.

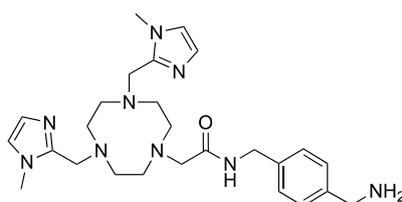
## 5.3.2 Synthese Dichelator-PSMA-Liganden

### 5.3.2.1 Synthese Dichelatormodellkonstrukt NODIA-Me-Bz-DOTA 16

#### 5.3.2.1.1 Synthese NODIA-Me-Benzylamin 15

Die Synthese von NODIA-Me erfolgt gemäß der bereits publizierten Vorschrift von Bartholomä *et al.*<sup>149</sup>.

Für die Synthese des Bichelatormodellkonstruktes wird im ersten Schritt der zweistufigen Synthese NODIA-Me \* 5 Cl (650 mg, 1.18 mmol) in DMF (10 mL) unter Ultraschall gelöst, mit DIPEA auf pH 7 eingestellt, danach HATU (448 mg, 1.18 mmol) und DIPEA (305 mg, 0.41 mL, 2.39 mmol) zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird 1-(*N*-BOC-aminomethyl)-4-(aminomethyl)benzol (279 mg, 1.18 mmol) zugegeben und die Lösung für 3 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird mit Toluol coevaporiert, der gelbe Rückstand ohne weitere Aufreinigung in einer TFA:DCM-Lösung (10 mL, 50:50, % v/v) gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt, das orangefarbene Öl in wenig Wasser gelöst und mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt. Gradient (Flash-Chromatographie): 0 % B 2 CV, 0 % B auf 100 % B in 6 CV, 100 % B 2 CV mit einer Flussrate von 25 mL·min<sup>-1</sup>. Elution des Produktes: 40 % B. Ausbeute: 425 mg (0.86 mmol, 73 %) eines farblosen Feststoffes.

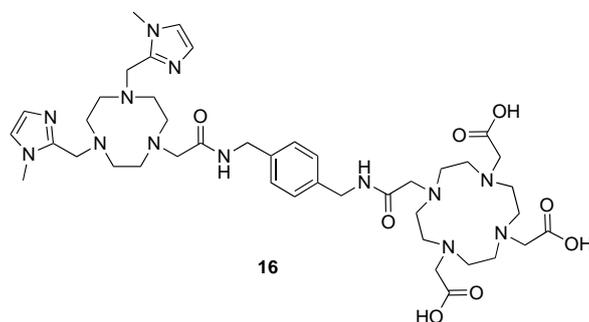


15

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 7.31 (m, 4H, 4xH-Benzyl), 7.02 (d, 2H,  $J$  = 1.0 Hz, 2xH-Imidazol) 6.85 (d, 2H,  $J$  = 1.3 Hz, 2xH-Imidazol), 4.39 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>-Xylylendiamin), 3.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.67 (s, 10H, 2xCH<sub>3</sub>-Imidazol + 2xCH<sub>2</sub>-Imidazol), 2.79 (m, 8H, 4xCH<sub>2</sub>-Makrozyklus), 2.61 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>-Makrozyklus) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 212.9, 210.2, 178.1, 172.26, 145.2, 137.9, 127.8, 121.9, 120.5, 106.3 82.5, 73.2, 68.2, 60.4, 52.8, 47.6-47.4, 42.2, 32.2, 21.9 ppm. **LR-ESI-MS** berechnet  $m/z$  für C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>9</sub>O<sup>+</sup>: 494.3, gefunden: 494.0 und 247.5 ([M + 2H]<sup>2+</sup>).

### 5.3.2.1.2 Synthese NODIA-Me-Bz-DOTA 16

Im ersten Schritt der zweistufigen Synthese wird DOTA-tris-*tert.*butylester (430 mg, 0.75 mmol) in DMF (5 mL) gelöst, HATU (285 mg, 0.75 mmol) sowie DIPEA (193 mg, 0.26 mL, 1.50 mmol) zugegeben und die gelbe Lösung für 5 min bei RT gerührt. Anschließend wird NODIA-Me-Benzylamin **15** (370 mg, 0.75 mmol) in DMF (5 mL) gelöst, mit DIPEA auf pH 7 eingestellt und zur aktivierten Carbonsäure zugegeben. Die Lösung wird anschließend für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird mit Toluol coevaporiert, der gelbe Rückstand ohne weitere Aufreinigung in einer TFA:H<sub>2</sub>O:TIS-Lösung (10 mL, 95:2.5:2.5, % v/v) gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, das gelbe Öl in wenig Wasser gelöst und mittels Flash-Chromatographie aufgereinigt. Gradient (Flash-Chromatographie): 0 % B 2 CV, 0 % B auf 100 % B in 6 CV, 100 % B 2 CV mit einer Flussrate von 25 mL·min<sup>-1</sup>. Elution des Produktes: 45 % B. Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>. *t<sub>R</sub>* (Analytische HPLC): 6.95 min. Ausbeute: 370 mg (0.42 mmol, 56 %) eines farblosen Feststoffes.



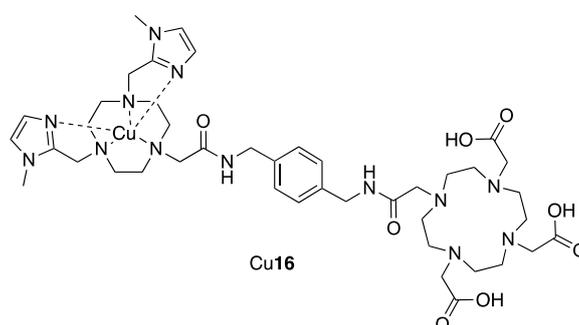
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 7.27 (m, 4H, 4xH-Benzyl), 6.98 (s, 2H, 2xH-Imidazol) 6.83 (s, 2H, 2xH-Imidazol), 4.36 (m, 4H, 2xCH<sub>2</sub>-Xylylendiamin), 4.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.54 (s, 6H, 2xCH<sub>3</sub>), 3.46 (s, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 3.23 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.23 (s, br, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.00 (s, br, 4H, 2xCH<sub>2</sub>), 2.88 (s, br, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.66-2.71 (m, 8H, 4xCH<sub>2</sub>-Makrozyklus), 2.56 (m, 6H, 3xCH<sub>2</sub>-Makrozyklus), 2.49 (m, 2H, 2xCH<sub>2</sub>-Makrozyklus), 2.31 (m, 8H, 4xCH<sub>2</sub>-Makrozyklus) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 201.8, 180.0, 173.3, 163.2, 146.0, 137.8, 136.8, 127.9, 125.6, 117.8, 87.5, 69.3, 59.1, 52.3, 50.9, 42.5, 32.7, 18.6 ppm. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für C<sub>42</sub>H<sub>66</sub>N<sub>13</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>: 880.5, gefunden: 880.0 und 440.6 ([M + 2H]<sup>2+</sup>).

### 5.3.3 Synthese der Metallkomplexe des Modellkonstruktes 16

#### 5.3.3.1 Synthese der Cu-Komplexe Cu16 und Cu<sub>2</sub>16

##### 5.3.3.1.1 Synthese von Cu16

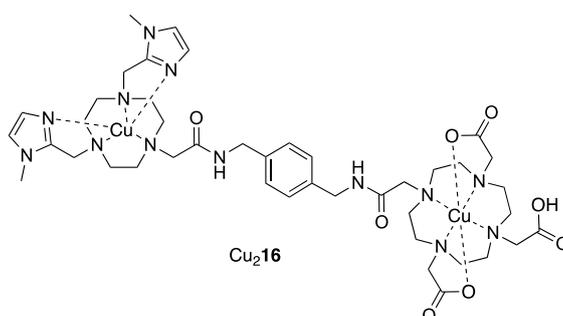
NODIA-Me-Bz-DOTA **16** (20 mg, 23  $\mu$ mol) wird in 0.1 M HCl (500  $\mu$ L) gelöst und anschließend CuCl<sub>2</sub> (3.1 mg, 23  $\mu$ mol) in 0.1 M HCl (500  $\mu$ L) zugegeben. Nach 5 min wurde der Komplex gemäß AV 5 aufgereinigt und getrocknet. Ausbeute: 22 mg (23  $\mu$ mol, quant.) eines blauen Feststoffes.



LR-ESI-MS berechnet m/z für C<sub>42</sub>H<sub>65</sub>N<sub>13</sub>O<sub>8</sub>Cu<sup>2+</sup>: 471.2, gefunden: 471.4

##### 5.3.3.1.2 Synthese von Cu<sub>2</sub>16

NODIA-Me-Bz-DOTA **16** (20 mg, 23  $\mu$ mol) wird in Ammoniumacetatpuffer (pH 5.4) (500  $\mu$ L) gelöst und anschließend CuCl<sub>2</sub> (6.2 mg, 46  $\mu$ mol) in Ammoniumacetatpuffer (500  $\mu$ L) zugegeben. Nach 5 min wurde der Komplex gemäß AV 5 aufgereinigt und getrocknet. Ausbeute: 23 mg (23  $\mu$ mol, quant.) eines blauen Feststoffes.



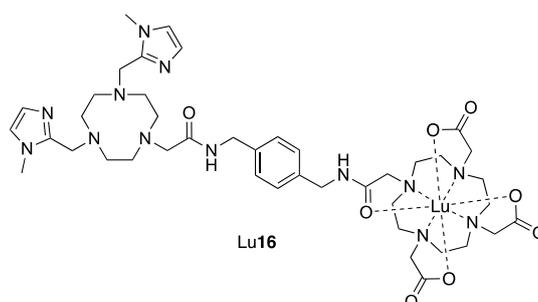
LR-ESI-MS berechnet m/z für C<sub>42</sub>H<sub>64</sub>N<sub>13</sub>O<sub>8</sub>Cu<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 501.7, gefunden: 501.7.

### 5.3.3.2 Synthese der Metallkomplexe vom Typ [Ln(NODIA-Me-Bz- DOTA)] / Ln16

NODIA-Me-Bz-DOTA **16** wurde in Ammoniumacetatpuffer (pH 5.4) (500  $\mu$ L) gelöst und anschließend  $\text{LnCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (1.1 äq.) in Ammoniumacetatpuffer (500  $\mu$ L) zugegeben. Die farblose Lösung wird anschließend für 15 min bei 95 °C inkubiert, danach gemäß AV 5 aufgereinigt und im Vakuum getrocknet.

#### 5.3.3.2.1 Synthese von Lu16

Die Synthese erfolgt gemäß AV 12 ausgehend von **16** (20 mg, 23  $\mu$ mol) und  $\text{LuCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (10 mg, 25.3  $\mu$ mol). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .  $t_R$  (Analytische HPLC): 8.43 min. Ausbeute: 24 mg (23  $\mu$ mol, quant.) eines farblosen Feststoffes.



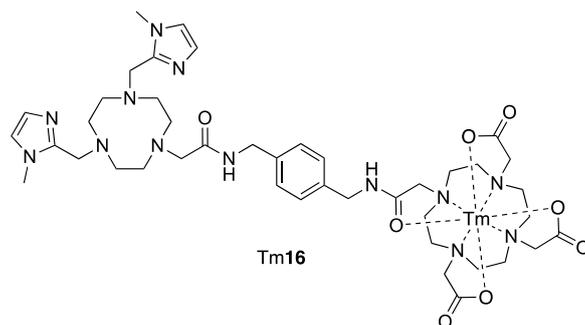
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  = 7.28 (m, 4H, 4xH-Benzyl), 7.03 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 2H, 2xH-Imidazol) 6.90 (d,  $J$  = 1.1 Hz, 2H, 2xH-Imidazol), 4.46 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -Xylylendiamin), 4.34 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -Xylylendiamin), 4.21 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ -Xylylendiamin ) 3.79 (s, br, 4H), 3.57 (s, 6H), 3.51 (m, 4H), 3.26 (m, 6H), 2.87 (m, 8H), 2.74 (m, 10H), 2.66-2.71 (m, 8H), 2.56 (m, 6H), 2.56 (m, 2H), 2.31 (m, 8H), 2.44 (s, br, 4H), 2.20 (s, br, 4H) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  = 211.2, 202.2, 181.4, 180.8, 144.6, 137.4, 128.2, 127.9, 126.3, 97.2, 80.6, 65.5, 55.7, 55.2, 42.6, 32.7, 23.2 ppm. **LR-ESI-MS** berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{Lu}^+$ : 1052.4, gefunden: 1052.2 und 526.6 ( $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ ).





### 5.3.3.2.6 Synthese von Tm16

Die Synthese erfolgt gemäß AV 12 ausgehend von **16** (20 mg, 23  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{TmCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (9.7 mg, 25.3  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeit:  $t_R$  (Analytische HPLC): 8.23 min. Ausbeute: 24 mg (23  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines farblosen Feststoffes.

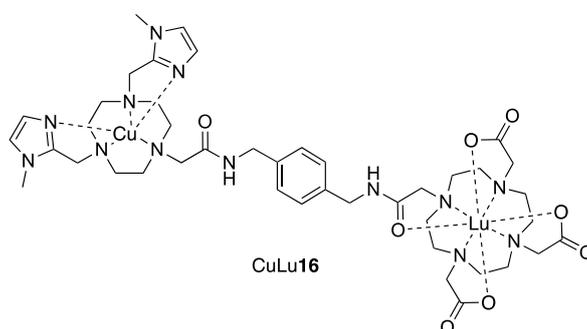


**LR-ESI-MS** berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{Tm}^+$ : 1046.42, gefunden: 1046.8 und 515.3 ( $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ )

### 5.3.3.3 Synthese der heterodinuklearen Metallkomplexe vom Typ [MLn(NODIA-Me-Bz- DOTA)] / MLn16

#### 5.3.3.3.1 Synthese von CuLu16

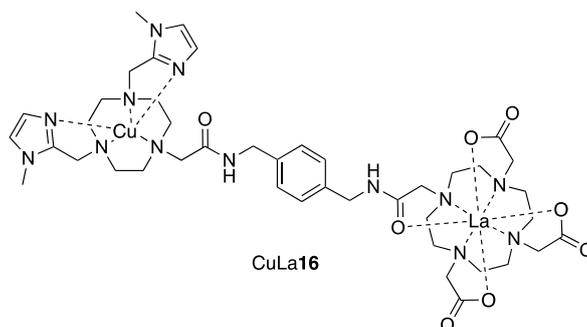
Die Synthese erfolgt gemäß AV 13 ausgehend von Lu16 (20 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{CuCl}_2$  (3 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeit:  $t_R$  (Analytische HPLC): 10.4 min. Ausbeute: 21 mg (19  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines blauen Feststoffes.



LR-ESI-MS berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{CuLu}^{2+}$ : 557.2, gefunden: 557.6

#### 5.3.3.3.2 Synthese von CuLa16

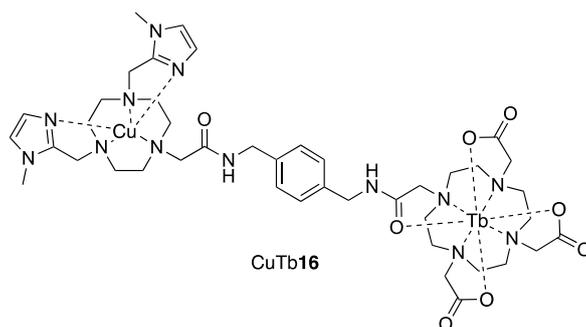
Die Synthese erfolgt gemäß AV 13 ausgehend von La16 (20 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{CuCl}_2$  (3 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeit:  $t_R$  (Analytische HPLC): 10.9 min. Ausbeute: 21 mg (23  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines blauen Feststoffes.



LR-ESI-MS berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{CuLa}^{2+}$ : 539.2, gefunden: 539.6.

### 5.3.3.3 Synthese von CuTb16

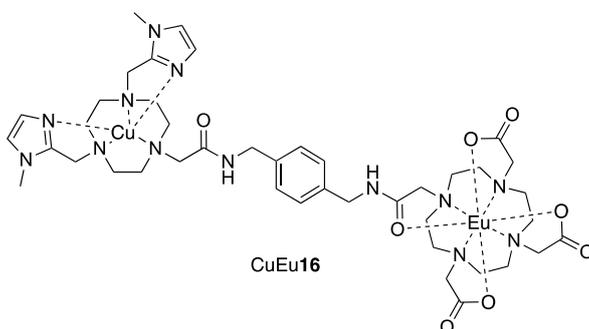
Die Synthese erfolgt gemäß AV 13 ausgehend von Tb16 (20 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{CuCl}_2$  (3 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeit:  $t_R$  (Analytische HPLC): 11.2 min. Ausbeute: 21 mg (23  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines blauen Feststoffes.



LR-ESI-MS berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{CuTb}^{2+}$ : 549.1, gefunden: 548.8

### 5.3.3.4 Synthese von CuEu16

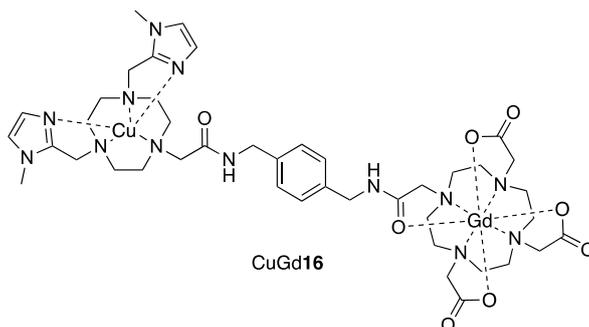
Die Synthese erfolgt gemäß AV 13 ausgehend von Eu16 (20 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{CuCl}_2$  (3 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeit:  $t_R$  (Analytische HPLC): 11.0 min. Ausbeute: 21 mg (23  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines blauen Feststoffes.



LR-ESI-MS berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{CuEu}^{2+}$ : 546.2, gefunden: 546.0.

### 5.3.3.3.5 Synthese von CuGd16

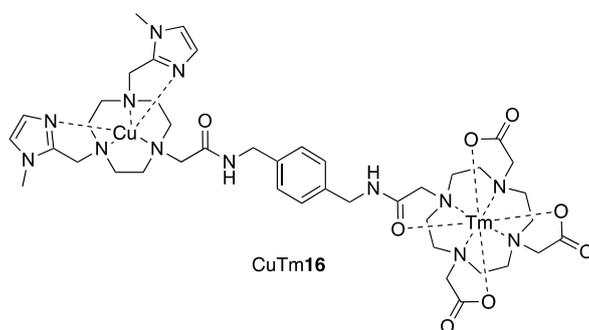
Die Synthese erfolgt gemäß AV 13 ausgehend von Gd16 (20 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{CuCl}_2$  (3 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeit:  $t_R$  (Analytische HPLC): 10.9 min. Ausbeute: 21 mg (23  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines blauen Feststoffes.



LR-ESI-MS berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{CuGd}^{2+}$ : 548.7, gefunden: 548.2.

### 5.3.3.3.6 Synthese von CuTm16

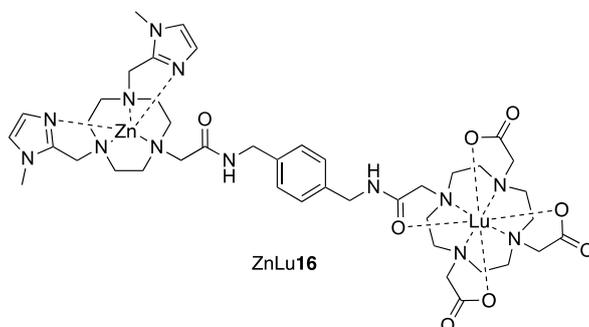
Die Synthese erfolgt gemäß AV 13 ausgehend von Tm16 (20 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{CuCl}_2$  (3 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B mit einer Flussrate von 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Retentionszeit:  $t_R$  (Analytische HPLC): 11.2 min. Ausbeute: 21 mg (23  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines blauen Feststoffes.



LR-ESI-MS berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{CuTm}^{2+}$ : 554.2, gefunden: 554.5

### 5.3.3.3.7 Synthese von ZnLu16

Die Synthese erfolgt gemäß AV 13 ausgehend von Lu16 (20 mg, 19  $\mu\text{mol}$ ) und  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (5 mg, 21  $\mu\text{mol}$ ). Ausbeute: 21 mg (23  $\mu\text{mol}$ , quant.) eines farblosen Feststoffes.



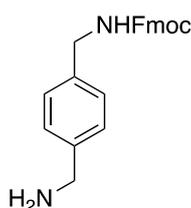
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  = 7.32 (m, 4H, 4xH-Benzyl), 7.10 (s, 2H, 2xH-Imidazol) 6.44 (m, 2H, 2xH-Imidazol), 4.49 (s, br, 1H), 4.46 (d,  $J$  = 5 Hz, 2H), 4.34 (s, br, 1H) (d,  $J$  = 5.3 Hz, 4H), 3.77 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 2H), 3.58 (s, 6H), 3.53 (m, 2H), 3.26 (m, 6H), 3.01 (m, 6H), 2.76 (m, 12H), 2.56 (s, br, 6H), 2.12 (m, 4H) ppm.  **$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  = 214.4, 195.8, 180.8, 173.0, 168.8, 162.8, 146.2, 136.4, 126.3, 123.9, 123.8, 117.8, 98.7, 91.9, 75.9, 68.9, 63.2, 58.2, 51.9, 43.6, 32.0, 23.2 ppm. **LR-ESI-MS** berechnet  $m/z$  für  $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{N}_{13}\text{O}_8\text{ZnLu}^{2+}$ : 558.7, gefunden: 558.5.

### 5.3.3.4 Synthese der Dichelator-PSMA-Liganden

#### 5.3.3.4.1 Synthese des Linkers Fmoc-Xylylendiamin 17

Die Synthese des Fmoc-geschützten Linkers erfolgte in Analogie zur Patentschrift von Wester *et al.*<sup>162</sup>.

In einer zweistufigen Synthese wird Fmoc-Chlorid (1.09 g, 4.23 mmol), gelöst in Chloroform (10 mL), bei 0 °C zu einer Suspension aus 1-(N-BOC-aminomethyl)-4-(aminomethyl)benzol (1 g, 4.23 mmol) und K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.64 g, 4.65 mmol) in Chloroform (10 mL) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 16 h bei Raumtemperatur gerührt, der Feststoff danach abfiltriert und die farblose Lösung mit Wasser (2 x 25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Der farblose ölige Rückstand wird anschließend in Dichlormethan (10 mL) gelöst und Trifluoressigsäure (10 mL) zugegeben. Die farblose Lösung wird danach für 16 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel anschließend destillativ entfernt. Der erhaltene blass gelbe Feststoff wird anschließend ohne weitere Aufreinigung für die Festphasensynthese verwendet. Ausbeute: 1.36 g (3.81 mmol, 90 %) eines blass gelben Feststoffes.



17

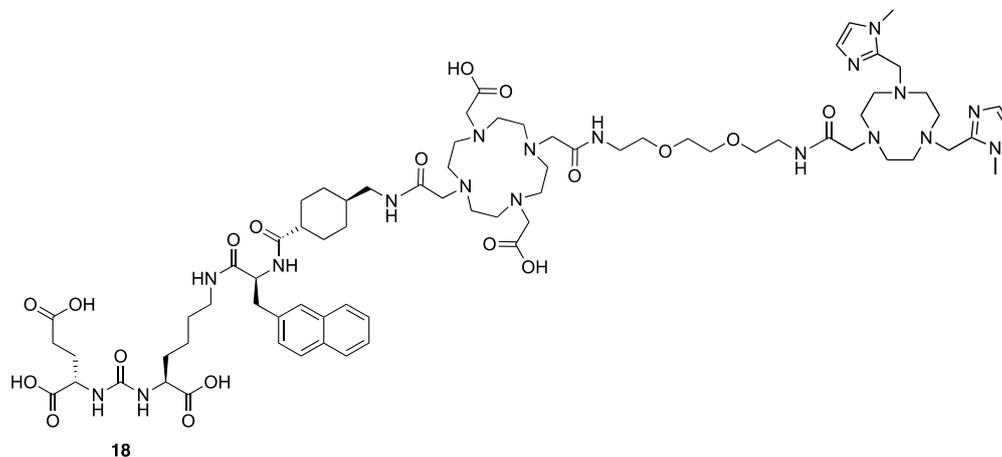
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 8.26 (s, br, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.87 (m, 2H, 2xH-Fmoc), 7.69 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 2xH-Fmoc), 7.41 (m, 4H, 4xH-Xylylendiamin), 7.33 (m, 2H, 2xH-Fmoc), 7.24 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H, 2xH-Fmoc), 4.36 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.22 (t,  $2 \times J$  = 6.8 Hz, 6.8 Hz, 1H, CH-Fmoc), 4.18 (d,  $J$  = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 4.0 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHCO) ppm. **<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 159.1, 158.8, 158.4, 156.9, 144.3, 141.2, 140.7, 132.8, 129.3, 128.1, 127.6, 127.5, 125.6, 120.6, 118.2, 115.3, 65.8, 54.0, 47.3, 43.8, 42.4 ppm. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 359.2, gefunden: 359.2

### 5.3.3.4.2 Synthese der Dichelator-PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-NODIA-Me 18 und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-Me 19

DOTA-Di-*tert*.Butylester (250 mg, 0.48 mmol) wird in DMF (10 mL) unter Ultraschall gelöst und anschließend mit HATU (164 mg, 0.43 mmol) sowie DIPEA (124 mg, 167  $\mu$ L, 0.96 mmol) versetzt. Die gelbe Lösung wird für 5 min inkubiert und danach bei pH 12 eine Lösung des Fmoc-geschützten Linkers (1 äq.) und DIPEA (2 äq.) in DMF (5 mL) zugetropft. Die Reaktionslösung wird im Folgenden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Monoaktivierung von DOTA-di-*tert*.butylester erfolgt die Synthese des Liganden gemäß der Allgemeinen Arbeitsvorschrift AV 3 ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys-2-Nal-Amc (120 mg, 0.12 mmol), HATU (46 mg, 0.12 mmol) und DIPEA (31 mg, 42  $\mu$ L, 0.24 mmol). Nach Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe (AV 1) erfolgte die Kopplung des Chelators gemäß AV 3.

#### Synthese von Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA-NODIA-Me 18

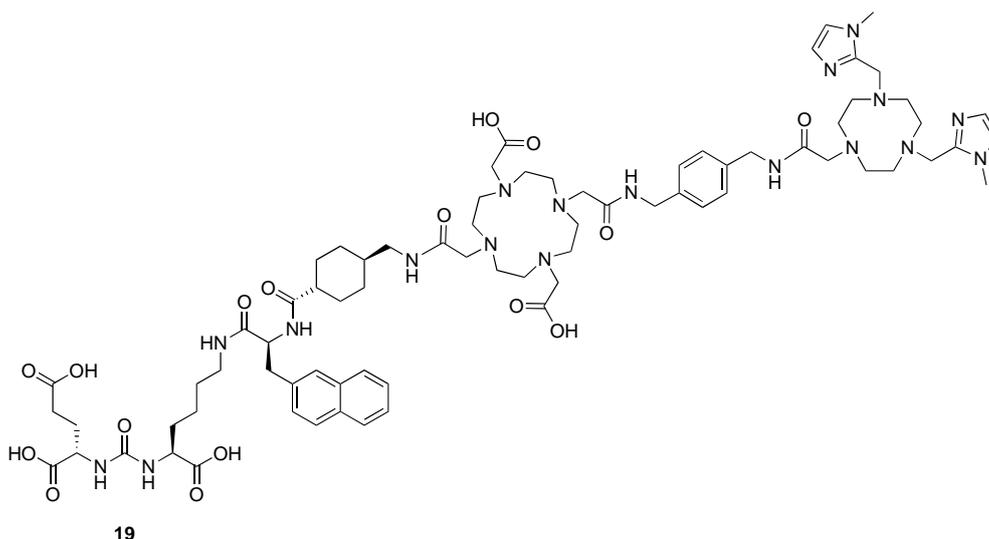
Die Linker-Konjugation erfolgt gemäß der Vorschrift aus Kap. 5.3.3.4.2 ausgehend von Fmoc-DOOA \* HCl (195 mg, 0.48 mmol). Die Chelator-Konjugation erfolgt gemäß der Vorschrift aus Kap. 5.3.3.4.2 ausgehend von Harz-immobilisiertem Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-DOOA (120 mg, 0.12 mmol), NODIA-Me 14 (45 mg, 0.12 mmol), HATU (46 mg, 0.12 mmol) und DIPEA (73 mg, 98  $\mu$ L, 564  $\mu$ mol). Gradient (Semipräparative HPLC): 0-20 min 5 % B auf 95 % B mit einer Flussrate von 6 mL·min<sup>-1</sup>. Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B.



Retentionszeiten:  $t_R$  (Semipräparative HPLC): 10.8 min,  $t_R$  (Analytische HPLC): 9.43 min.  
Ausbeute: 3.5 mg (2.26  $\mu\text{mol}$ , 15 %) eines farblosen Feststoffes. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für  $\text{C}_{73}\text{H}_{113}\text{N}_{18}\text{O}_{18}^+$ : 1529.8, gefunden: 766.2 ( $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ ) und 511.0 ( $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ ).

### Synthese von Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-Me **19**

Die Linker-Konjugation erfolgt gemäß der Vorschrift aus Kap. 5.3.3.4.2 ausgehend von Fmoc-XDA **17** (172 mg, 0.48 mmol). Die Chelator-Konjugation erfolgt gemäß der Vorschrift aus Kap. 5.3.3.4.2 ausgehend von Harz-immobilisiertem  $\text{Glu}(\text{O}^t\text{Bu})_2\text{-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA}(\text{O}^t\text{Bu})_2\text{-XDA}$  (120 mg, 0.12 mmol), NODIA-Me **14** (45 mg, 0.12 mmol), HATU (46 mg, 0.12 mmol) und DIPEA (73 mg, 98  $\mu\text{L}$ , 564  $\mu\text{mol}$ ). Gradient (Semipräparative HPLC): 0-20 min 5 % B auf 95 % B mit einer Flussrate von 6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Gradient (Analytische HPLC): 0-1 min 5 % B, 1-14 min 95 % B, 14-15 min 95 % B.



Retentionszeiten:  $t_R$  (Semipräparative HPLC): 10.8 min,  $t_R$  (Analytische HPLC): 9.43 min.  
Ausbeute: 3.5 mg (2.26  $\mu\text{mol}$ , 15 %) eines farblosen Feststoffes. **LR-ESI-MS** berechnet m/z für  $\text{C}_{73}\text{H}_{113}\text{N}_{18}\text{O}_{18}^+$ : 1529.8, gefunden: 766.2 ( $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ ) und 511.0 ( $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ )

## **5.4 Fluoreszenzspektroskopie und Stabilitätsuntersuchung der BODIPY-PSMA-Liganden**

Die Messung der Absorptions- und Emissionsspektren von **5**, **6**, **7**, **8** und **12** sowie die Aufnahme der Spektren für die Stabilitätsuntersuchungen von **1** wurden in Kooperation mit Frau Dr. C. Hoffmann MSc (AK Prof. Dr. G. Jung, Biophysikalische Chemie, UdS).

### **5.4.1 Messung Absorptions-Emissionsspektren**

Für die Messungen der Absorptions wird jeweils eine 1  $\mu$ M Lösung der Liganden in Acetonitril/Wasser (50/50, % v/v) hergestellt.

### **5.4.2 Stabilitätsuntersuchungen der BODIPY-PSMA-Liganden**

#### **5.4.2.1 Stabilitätsuntersuchung BODIPY-Carbonsäure - Inkubation mit TFA**

Die BODIPY-Carbonsäure **1** (1 mg) wird für die Überprüfung der Farbstoffstabilität mittels analytischer HPLC in TFA (1 mL) gelöst und für 2 h bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation werden für die HPLC-Läufe ein Aliquot (20  $\mu$ L) entnommen, die erhaltenen Fraktionen aufgesammelt und per MS analysiert.

#### **5.4.2.2 Stabilitätsuntersuchung BODIPY-Carbonsäure - Inkubation mit SnCl<sub>4</sub>**

Die BODIPY-Carbonsäure **1** (1 mg) wird für die Überprüfung der Farbstoffstabilität mittels analytischer HPLC in einer 1 M SnCl<sub>4</sub>-Lösung in Acetonitril (1 mL) gelöst und für 30 min bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation werden für die HPLC-Läufe ein Aliquot (20  $\mu$ L) entnommen, die erhaltenen Fraktionen aufgesammelt und per MS analysiert.

## 5.5 Spektroskopischer Nachweis der selektiven Metallkomplexierung Modellligand 16

### 5.5.1 Vorbereitung der Stammlösungen für die Massenspektroskopie

Zunächst werden die Stammlösungen des Liganden und des Metallsalzes hergestellt:

Stammlösung NODIA-Me-Bz-DOTA **16**:

**16** 130 mg (0.15 mmol) gelöst in 1000  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ,  $c = 0.00015 \text{ mmol}/\mu\text{L}$

Stammlösung  $\text{CuCl}_2$ :

$\text{CuCl}_2$  2.1 mg (0.015 mmol) gelöst in 1000  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ,  $c = 0.000015 \text{ mmol}/\mu\text{L}$

#### Pipettierschema und Durchführung

Ligand **16** (1  $\mu\text{L}$ ) wurde im jeweiligen Lösungsmittel ((1) 0.1 M HCl, (2) Ammoniumacetatpuffer) vorgelegt und im Anschluss mit unterschiedlichen Äquivalenten (0.1 bis 1 Äq. und 2 äq.) an Metallsalz titriert (Tab. 18). Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgt anschließend mit jeweils 1  $\mu\text{L}$  der Reaktionsmischung.

**Tabelle 18** Pipettierschema für massenspektrometrische Untersuchung der Bildung der Cu-Komplexe des Modellliganden

| Messung | Volumen 16<br>$c = 0.00015$<br>$\text{mmol}/\mu\text{L}$ | Volumen $\text{CuCl}_2$<br>$c = 0.000015$<br>$\text{mmol}/\mu\text{L}$ | Äquivalente<br>Metall | Volumen an<br>Lösungsmittel | Gesamtvolumen     |
|---------|--|--|-----------------------|-----------------------------|-------------------|
| 1       | 1 $\mu\text{L}$  | 1 $\mu\text{L}$  | 0.1                   | 98 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 2       | 1 $\mu\text{L}$  | 2 $\mu\text{L}$  | 0.2                   | 97 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 3       | 1 $\mu\text{L}$  | 3 $\mu\text{L}$  | 0.3                   | 96 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 4       | 1 $\mu\text{L}$  | 4 $\mu\text{L}$  | 0.4                   | 95 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 5       | 1 $\mu\text{L}$  | 5 $\mu\text{L}$  | 0.5                   | 94 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 6       | 1 $\mu\text{L}$  | 6 $\mu\text{L}$  | 0.6                   | 93 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 7       | 1 $\mu\text{L}$  | 7 $\mu\text{L}$  | 0.7                   | 92 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 8       | 1 $\mu\text{L}$  | 8 $\mu\text{L}$  | 0.8                   | 91 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |
| 9       | 1 $\mu\text{L}$  | 9 $\mu\text{L}$  | 0.9                   | 90 $\mu\text{L}$            | 100 $\mu\text{L}$ |

|           |      |       |     |       |        |
|-----------|------|-------|-----|-------|--------|
| <b>10</b> | 1 µL | 10 µL | 1.0 | 89 µL | 100 µL |
| <b>11</b> | 1 µL | 20 µL | 2.0 | 79 µL | 100 µL |

Herstellung der äquimolaren Mischung der Chelatoren NODIA-Me **14** und DOTA für die massenspektrometrische Untersuchung

|  |                    |
|--|--------------------|
| NODIA-Me <b>14</b>                     | 37.5 mg (0.1 mmol) |
| DOTA                                   | 40.4 mg (0.1 mmol) |
| CuCl <sub>2</sub>                      | 13.4 mg (0.1 mmol) |
| LuCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O | 38.9 mg (0.1 mmol) |

Durchführung

NODIA-Me **14** (37.5 mg, 0.1 mmol) und DOTA (40.4 mg, 0.1 mmol) werden in jeweils 500 µL Ammoniumacetatpuffer gelöst und danach eine 1:1-Mischung hergestellt (Gesamtvolumen 1 mL). Anschließend wird bei RT CuCl<sub>2</sub> (13.4 mg, 0.1 mmol) gelöst in in Ammoniumacetatpuffer (250 µL) zugegeben, ein Aliquot (1 µL) entommen und mittels MS untersucht. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von einem Äq. LuCl<sub>3</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O (38.9 mg, 0.1 mmol) in Ammoniumacetatpuffer (250 µL). Nach Inkubation für 5 min bei RT wird ein weiteres Aliquot (1 µL) entommen und mittels MS untersucht. Zuletzt wird die Reaktionsmischung für 15 min bei 95 °C inkubiert, danach auf RT abgekühlt und erneut mittels MS untersucht.

### 5.5.2 Stammlösungen des Modelkonstruktes und der Metallkomplexe für die UV/Vis-Spektroskopie

Für die UV/Vis-Spektroskopie wurden eine Modellkonstrukt-Stammlösungen sowie Referenz-Chelator-Stammlösungen in einer Konzentration von  $c = 10 \text{ nmol}/\mu\text{L}$  angesetzt.

|               |  |
|---------------|--|
| <b>16</b>     | 62 mg (0.7 mmol) gelöst in 7 mL H <sub>2</sub> O   |
| NODIA-Me-NHET | 28.0 mg (0.7 mmol) gelöst in 7 mL H <sub>2</sub> O |
| DOTA          | 28.2 mg (0.7 mmol) gelöst in 7 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>Lu16</b>   | 74.0 mg (0.7 mmol) gelöst in 7 mL H <sub>2</sub> O |

Die Cu-Stammlösung für die Titration wurde in einer Konzentration von  $c = 100 \text{ mM}$  angesetzt

|                   |   |
|-------------------|---|
| CuCl <sub>2</sub> | 13.4 mg gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
|-------------------|---|

**Tabelle 19** Pipettierschema UV/Vis-spektroskopische Untersuchung Ligand **16**.

| Messung   | Volumen<br>Komplex-<br>Stammlösung /<br>$\mu\text{L}$ | Volumen<br>Lösungsmittel /<br>$\mu\text{L}$ | Gesamtvolumen<br>/ $\mu\text{L}$ | Volumen Cu-<br>Stammlösung /<br>$\mu\text{L}$ |
|-----------|---|---|----------------------------------|---|
| <b>1</b>  | 500   | 500   | 1000                             | -   |
| <b>2</b>  | 500   | 490   | 1000                             | 10  |
| <b>3</b>  | 500   | 480   | 1000                             | 20  |
| <b>4</b>  | 500   | 470   | 1000                             | 30  |
| <b>5</b>  | 500   | 460   | 1000                             | 40  |
| <b>6</b>  | 500   | 450   | 1000                             | 50  |
| <b>7</b>  | 500   | 440   | 1000                             | 60  |
| <b>8</b>  | 500   | 430   | 1000                             | 70  |
| <b>9</b>  | 500   | 420   | 1000                             | 80  |
| <b>10</b> | 500   | 410   | 1000                             | 90  |
| <b>11</b> | 500   | 400   | 1000                             | 100   |

### 5.5.3 Stammlösungen des Modelkonstruktes und der Metallkomplexe für die EPR-Spektroskopie

Die Messungen und Simulation der EPR-Spektren erfolgten in Kooperation mit Frau M. Schröder (AK Prof. Dr. C. Kay, Physikalische Chemie, Uds)

Für alle Messungen wird eine 5 mM-Lösung in H<sub>2</sub>O der jeweiligen Metallkomplexe hergestellt.

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>16</b>                | 4.40 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>Cu16</b>              | 4.71 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>Cu<sub>2</sub>16</b>  | 5.02 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>Lu16</b>              | 5.26 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>Tb16</b>              | 5.18 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>Eu16</b>              | 5.15 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>Gd16</b>              | 5.17 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| <b>CuLu16</b>            | 5.57 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| [Cu(NODIA-Me-NHEt)]      | 2.33 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |
| [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> | 2.32 mg (5.00 µmol) gelöst in 1 mL H <sub>2</sub> O |

### 5.5.4 Synthese der Metallkomplexe für die NMR-Spektroskopie

Die Metallkomplexe für die NMR-Spektroskopie wurden die Komplexe Lu**16** (Kapitel 5.3.3.2.1) und ZnLu**16** (Kapitel 5.3.3.3.7) gemäß AV 12 sowie AV 13 hergestellt. Das Modellkonstrukt wurde gemäß Kapitel 5.3.2 synthetisiert.

Die Komplexe wurden für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen in 40 % NaOD in D<sub>2</sub>O aufgenommen.

## 5.6 Radiolabeling der multifunktionellen PSMA-Liganden

### 5.6.1 <sup>18</sup>F-Markierung der BODIPY-PSMA-Liganden

#### 5.6.1.1 Ansatz der Stammlösungen für die Durchführung des <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustauschs der BODIPY-PSMA-Liganden

Für die Radiomarkierung werden für alle BODIPY-PSMA-Biokonjugate Stammlösungen in einer Konzentration von  $c = 0.0037 \text{ M}$  angesetzt.

|           |  |
|-----------|--|
| <b>5</b>  | 2.35 mg (3.70 $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 1000 $\mu\text{L}$ Acetonitril |
| <b>6</b>  | 2.77 mg (3.70 $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 1000 $\mu\text{L}$ Acetonitril |
| <b>7</b>  | 3.19 mg (3.70 $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 1000 $\mu\text{L}$ Acetonitril |
| <b>8</b>  | 3.60 mg (3.70 $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 1000 $\mu\text{L}$ Acetonitril |
| <b>12</b> | 5.50 mg (3.70 $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 1000 $\mu\text{L}$ Acetonitril |

#### 1 M Zinn(IV)chlorid-Stammlösung

Zinn(IV)chlorid      260 mg (117  $\mu\text{L}$ , 1 mmol), gelöst unter Argon in trockenem Acetonitril

#### 5.6.1.2 Durchführung des <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausch der BODIPY-PSMA-Liganden

Alle [<sup>18</sup>F]F-Radiomarkierungen werden manuell durchgeführt. Das in [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O-irradiertem Wasser gelöste [<sup>18</sup>F]Fluorid-Anion wird dazu zunächst auf einer Anionentauscher-Kartusche (Accel Plus QMA Cartridge Light, Waters) fixiert und von [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O-irradiertem Wasser durch Spülen mit Luft (10 mL) abgetrennt. Die [<sup>18</sup>F]Fluorid beladene QMA-Kartusche wird danach auf ein Wheaton-Vial transferiert und mit einer Tetraethylammoniumbicarbonatlösung (TEAB) (25 mg) in 95 % Acetonitril (1 mL) sowie mit Acetonitril (1 mL) gewaschen. Das Wheaton-Vial wird im Heizblock platziert und [<sup>18</sup>F]F-TEA durch azeotropische Destillation mit trockenem Acetonitril (3 x 2 mL) unter einem leichten Argonstrom getrocknet. Für einen typischen Lewis-Säure-katalysierten <sup>19</sup>F/<sup>18</sup>F-Isotopenaustausch wird die SnCl<sub>4</sub> Stammlösung (37  $\mu\text{L}$ , 37  $\mu\text{mol}$ ) zum jeweiligen Biokonjugat (100  $\mu\text{L}$ , 0.37  $\mu\text{mol}$ ) in trockenem Acetonitril gegeben, danach gevortext und anschließend [<sup>18</sup>F]F-TEA (100  $\mu\text{L}$ , ~ 500 MBq) zugegeben. Die fluoreszierende Lösung wird danach für 15 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird der

Markierungsansatz mit 0.1 M NaOH (4 mL) gequenchet und analog AV 5 aufgereinigt. Die erzielte radiochemische Reinheit für  $[^{18}\text{F}]\text{F5}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F7}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F8}$  und  $[^{18}\text{F}]\text{F12}$  lag bei > 99 % mit radiochemischen Ausbeuten (RCY) von 20 – 30 %. Die durchschnittlichen molaren Aktivitäten  $A_m$  des Isotopenaustausches lagen bei  $\sim 0.7 \text{ MBq}\cdot\text{nmol}^{-1}$ .

#### **5.6.1.3 Bestimmung der Log $D_{\text{Oct/PBS}}$ Werte der BODIPY-PSMA-Liganden**

Für die log  $D_{\text{Oct/PBS}}$  Messungen werden 1–2 MBq  $[^{18}\text{F}]\text{F5}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F7}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{F8}$  und  $[^{18}\text{F}]\text{F12}$  in 10  $\mu\text{L}$  50 % wässrigem Ethanol zu einem Gemisch bestehend aus PBS (490  $\mu\text{L}$ ) und 1-Octanol (500  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Die Probe wurde für 30 min bei RT inkubiert, anschließend für 5 min bei 13,200 rpm zentrifugiert, danach 100  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Phasen entnommen und am Gammacounter gemessen. Die Experimente wurden in triplicate durchgeführt.

#### **5.6.1.4 Ermittlung der PBS Stabilität von $[^{18}\text{F}]\text{F6}$**

Für jedes Experiment werden ca. 5 MBq (10  $\mu\text{L}$ )  $[^{18}\text{F}]\text{F6}$  zu PBS (90  $\mu\text{L}$ ) pipettiert. Zu ausgewählten Zeitpunkten wird ein 20  $\mu\text{L}$  Aliquot entnommen und per HPLC analysiert. Der prozentuale Anteil an intaktem Liganden wird anschließend basierend auf den HPLC-Chromatogrammen berechnet. Die Experimente wurden in triplicate durchgeführt.

### 5.6.1.5 <sup>177</sup>Lu-Markierung des BODIPY-PSMA-Liganden **12**

Für die Radiomarkierung wurden für alle BODIPY-PSMA-Biokonjugate eine Stammlösung in einer Konzentration von  $c = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$  angesetzt. Auch für die Inkubation von **12** in H<sub>2</sub>O und Natriumacetatpuffer bei 95 °C zur Stabilitätsuntersuchung wurde ein Aliquot dieser Stammlösung verwendet.

**12** 2.00 mg (1.43  $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 1434  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O

[<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl ca. 1 MBq/ $\mu\text{L}$

#### Pipettierschema und Durchführung der Radiomarkierung

- 2  $\mu\text{L}$  **12** (2 nmol)
- 21  $\mu\text{L}$  [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> (22 MBq) in 0.04 M HCl
- 102  $\mu\text{L}$  Natriumacetatpuffer pH 4.5

Ligand **12** (2 nmol) wird in Natriumacetatpuffer gelöst und anschließend ein Aliquot [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl zugegeben. Die Markierungslösung wird danach für 15 min bei 95 °C inkubiert, anschließend ein Aliquot entnommen und per Radio-HPLC analysiert.

## 5.6.2 Radiomarkierungen Modelkonstrukt 16

### 5.6.2.1 <sup>64</sup>Cu- <sup>177</sup>Lu- <sup>225</sup>Ac-Markierung des Modellkonstrukts 16

Zunächst wurde die Stammlösung des Modellkonstruktes **16** angesetzt:

#### Ansatz Modellkonstrukt-Stammlösung für die Radiomarkierung

Konzentration der Stammlösung  $c = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$

Dazu wurde **16** (16.0 mg, 13.1  $\mu\text{mol}$ ) gelöst in 13.1 mL H<sub>2</sub>O

Die Radiometall-Lösungen lagen in folgender Volumenaktivität in 0.04 M HCl vor:

[<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in 0.04 M HCl ca. 3 MBq/ $\mu\text{L}$

[<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl ca. 10 MBq/ $\mu\text{L}$

[<sup>225</sup>Ac]AcCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl ca. 0.25 MBq/10  $\mu\text{L}$

#### Ansätze und Durchführung der Radiomarkierung

##### Ansatz Synthese [<sup>64</sup>Cu]Cu**16**

- 1  $\mu\text{L}$  **16** (1 nmol)
- 31  $\mu\text{L}$  [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (78 MBq) in 0.04 M HCl
- 108  $\mu\text{L}$  Ammoniumacetatpuffer pH 5.4

Ligand **16** (1 nmol) wird in Ammoniumacetatpuffer vorgelegt und danach ein Aliquot [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in 0.04 M HCl zugegeben. Die Markierungslösung wird für 15 min bei 95 °C inkubiert, anschließend ein Aliquot (10  $\mu\text{L}$ ) mit einer 5 M DTPA-Lösung (10  $\mu\text{L}$ ) verdünnt und per Radio-HPLC überprüft. Nach erfolgter Inkubation wurde die Probe abgekühlt und die radiochemische Reinheit per Radio-HPLC sowie ITLC ermittelt.

### Ansatz Synthese [<sup>177</sup>Lu]Lu**16**

- 1 µL **16** (1 nmol)
- 16 µL [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> (127 MBq) in 0.04 M HCl
- 108 µL Ammoniumacetatpuffer pH 5.4

Ligand **16** (1 nmol) wird in Ammoniumacetatpuffer vorgelegt und danach ein Aliquot [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl zugegeben. Die Markierungslösung wird für 15 min bei 95 °C inkubiert, anschließend ein Aliquot (10 µL) mit einer 5 M DTPA-Lösung (10 µL) verdünnt und per Radio-HPLC überprüft. Nach erfolgter Inkubation wurde die Probe abgekühlt und die radiochemische Reinheit per Radio-HPLC sowie ITLC ermittelt.

### Ansatz Synthese [<sup>64</sup>Cu]Cu[<sup>177</sup>Lu]Lu**16** – Gemischte Komplexierung

- 1 µL **16** (1 nmol)
- 31 µL [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (78 MBq) in 0.04 M HCl
- 16 µL [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> (127 MBq) in 0.04 M HCl
- 108 µL Ammoniumacetatpuffer pH 5.4

Ligand **16** (1 nmol) wird in Ammoniumacetatpuffer bei pH 5.4 vorgelegt und danach ein Aliquot [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in 0.04 M HCl zugegeben. Die Markierungslösung wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend ein Aliquot (10 µL) mit einer 5 M DTPA-Lösung (10 µL) verdünnt und per Radio-HPLC überprüft. Nach erfolgter Überprüfung der Radiomarkierung wurde eine Aliquot an [<sup>177</sup>Lu]LuCl<sub>3</sub> bzw. [<sup>225</sup>Ac]AcCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl zugegeben und die Lösung für 15 min bei 95 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird die Probe abgekühlt und die radiochemische Reinheit per Radio-HPLC sowie ITLC ermittelt.

### Ansatz Synthese [<sup>225</sup>Ac]Ac**16**

- 1 µL **16** (1 nmol)
- 12 µL [<sup>225</sup>Ac]AcCl<sub>3</sub> (300 Bq) in 0.04 M HCl
- 112 µL Ammoniumacetatpuffer pH 5.4

Ligand **16** (1 nmol) wird in Ammoniumacetatpuffer bei pH 5.4 vorgelegt und danach ein Aliquot [<sup>225</sup>Ac]AcCl<sub>3</sub> in 0.04 M HCl zugegeben. Die Markierungslösung wird für 15 min bei 95 °C inkubiert, anschließend ein Aliquot (10 µL) mit einer 5 M DTPA-Lösung (10 µL) verdünnt und per ITLC ermittelt.

### 5.6.2.2 Synthese der dualmarkierten Komplexe mittels Absättigung durch die entsprechenden nichtradioaktiven Metallsalze

Für die Radiomarkierung wurde eine Modellkonstrukt-Stammlösungen in einer Konzentration von  $c = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$  angesetzt.

#### Ansatz Modellkonstrukt-Stammlösung für die Radiomarkierung

Konzentration der Stammlösung  $c = 1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$

Dazu wurde **16** (16.0 mg, 13.1 µmol) gelöst in 13.1 mL H<sub>2</sub>O

Die Radiometall-Lösungen lagen in folgender Volumen-Aktivität in 0.04 M HCl vor:

|   |                    |
|---|--------------------|
| [ <sup>64</sup> Cu]CuCl <sub>2</sub> in 0.04 M HCl  | ca. 3 MBq/µL       |
| [ <sup>177</sup> Lu]LuCl <sub>3</sub> in 0.04 M HCl | ca. 10 MBq/µL      |
| [ <sup>225</sup> Ac]AcCl <sub>3</sub> in 0.04 M HCl | ca. 0.25 MBq/10 µL |

Die Lösungen der Metallsalze zur Absättigung der Probe wurden wie folgt angesetzt:

|  |   |
|--|---|
| CuCl <sub>2</sub>                      | 13.5 mg (1 mmol) in 1 mL Wasser, davon eine 1:1000-Verdünnung, $c = 0.1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$ |
| LuCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O | 38.9 mg (1 mmol) in 1 mL Wasser, davon eine 1:1000-Verdünnung, $c = 0.1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$ |
| LaCl <sub>3</sub> * 7 H <sub>2</sub> O | 37.1 mg (1 mmol) in 1 mL Wasser, davon eine 1:1000-Verdünnung, $c = 0.1 \text{ nmol}/\mu\text{L}$ |

### Ansatz Synthese $^{64}/^{nat}\text{Cu}[\text{Cu}]^{177}/^{nat}\text{Lu}[\text{Lu}]\mathbf{16}$

- 1  $\mu\text{L}$  **16** (1 nmol)
- 16  $\mu\text{L}$   $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}]\text{Cl}_3$  (127 MBq) in 0.04 M HCl
- 10  $\mu\text{L}$   $\text{LuCl}_3$  (1.0 Äq., 0.1 M) in Wasser
- 31  $\mu\text{L}$   $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}]\text{Cl}_2$  (78 MBq) in 0.04 M HCl
- 10  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2$  (1.0 Äq., 0.1 M) in Wasser
- 108  $\mu\text{L}$  Ammoniumacetatpuffer pH 5.4

### Ansatz Synthese $^{64}/^{nat}\text{Cu}[\text{Cu}]^{225}\text{Ac}[\text{Ac}^{nat}\text{La}]\mathbf{16}$

- 1  $\mu\text{L}$  **16** (1 nmol)
- 16  $\mu\text{L}$   $^{225}\text{Ac}[\text{Ac}]\text{Cl}_3$  (500 Bq) in 0.04 M HCl
- 10  $\mu\text{L}$   $\text{LaCl}_3$  (1.0 Äq., 0.1 M) in Wasser
- 31  $\mu\text{L}$   $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}]\text{Cl}_2$  (78 MBq) in 0.04 M HCl
- 10  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2$  (1.0 Äq., 0.1 M) in Wasser
- 108  $\mu\text{L}$  Ammoniumacetatpuffer pH 5.4

### Durchführung der Radiomarkierung und Absättigung der dualmarkierten Komplexe

Ligand **16** (1 nmol) wird in Ammoniumacetatpuffer bei pH 5.4 vorgelegt, danach ein Aliquot  $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}]\text{Cl}_3$  bzw.  $^{225}\text{Ac}[\text{Ac}]\text{Cl}_3$  in 0.05 M HCl zugegeben und die Lösung für 15 min bei 95 °C inkubiert. Die Probe wird auf RT abgekühlt, danach  $\text{LuCl}_3$  (1.0 Äq., 0.1 M) bzw.  $\text{LaCl}_3$  (1.0 Äq., 0.1 M) zugegeben und erneut für 15 min bei 95 °C inkubiert. Der Markierungsansatz wird erneut auf RT gebracht und danach eine Aliquot an  $^{64}\text{Cu}[\text{Cu}]\text{Cl}_2$  in 0.04 M HCl zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Zuletzt erfolgt die Zugabe von  $\text{CuCl}_2$  (1.0 Äq., 0.1 M, 10  $\mu\text{L}$ ) sowie die anschließende Aufreinigung des Liganden mittels  $\text{C}_{18}$ -Sep Pak-Kartusche (AV 5). Im Anschluss an die Aufreinigung wird ein Aliquot (10  $\mu\text{L}$ ) mit einer 5 M DTPA-Lösung (10  $\mu\text{L}$ ) verdünnt und per Radio-HPLC sowie ITLC überprüft.

### 5.6.3 Verwendete Stammlösungen für *in vitro* Evaluation der BODIPY-PSMA-Liganden

#### 5.6.3.1 Stammlösungen der BODIPY-PSMA-Liganden für das kompetitive Bindungsassay

Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß AV 8.

##### Ansatz der Liganden für die verwendeten Stammlösungen

|           |  |
|-----------|--|
| <b>5</b>  | 1.27 mg (2 $\mu$ mol) in 2000 $\mu$ L DMSO |
| <b>6</b>  | 1.50 mg (2 $\mu$ mol) in 2000 $\mu$ L DMSO |
| <b>7</b>  | 1.72 mg (2 $\mu$ mol) in 2000 $\mu$ L DMSO |
| <b>8</b>  | 1.95 mg (2 $\mu$ mol) in 2000 $\mu$ L DMSO |
| <b>12</b> | 2.98 mg (2 $\mu$ mol) in 2000 $\mu$ L DMSO |
| <b>13</b> | 1.40 mg (2 $\mu$ mol) in 2000 $\mu$ L DMSO |

#### 5.6.3.2 Stammlösung und Durchführung der Zellinternalisierung von Ligand 6

Die Radiomarkierung des für die Zellinternalisierung verwendeten BODIPY-PSMA-Liganden **6** erfolgt gemäß Kapitel 5.6.1.2. Vorbereitungen der Zellen, das Ansetzen der benötigten Lösungen sowie die Durchführung des Assays erfolgen gemäß AV 9.

##### Ansatz der verwendeten Stammlösung für die Zellinternalisierung

Konzentration der Stammlösung  $c = 0.0037$  M

Dazu wurde **6** (1 mg, 1.33  $\mu$ mol) in 360  $\mu$ L Acetonitril gelöst.

##### Pipettierschema für die Radiomarkierung

|  |                              |
|--|------------------------------|
| Stammlösung Ligand                               | 100 $\mu$ L (0.37 $\mu$ mol) |
| SnCl <sub>4</sub> Stammlösung                    | 37 $\mu$ L (37 $\mu$ mol)    |
| [ <sup>18</sup> F]F-TEA in trockenem Acetonitril | 100 $\mu$ L                  |

Ansatz Verdünnungsreihen für Internalisierung

3 µL (1 µmol) [<sup>18</sup>F]F6 werden mit 2000 µL PBS verdünnt (c = 1 nM).

1 mL dieser Lösung entspricht somit einer Konzentration von c = 0.5 nM

**Tabelle 20** Verdünnungsreihe radiomarkierten PSMA-Liganden [<sup>18</sup>F]F6 für die Zellinternalisierung.

| <b>Lösung</b> | <b>Volumen<br/>[<sup>18</sup>F]F6</b> | <b>Volumen<br/>PBS<br/>für<br/>Verdünnung</b> | <b>Konzentration</b> | <b>Finales<br/>Volumen<br/>für<br/>Inkubation</b> | <b>Endkonzentration</b> |
|---------------|---------------------------------------|---|----------------------|---|-------------------------|
| <b>L1</b>     | 200 µL                                | 800 µL  | 0.1 nM               | 100 µL  | 10 pM                   |
| <b>L2</b>     | 100 µL                                | 900 µL  | 0.05 nM              | 100 µL  | 5 pM                    |
| <b>L3</b>     | 50 µL                                 | 950 µL  | 0.025 nM             | 100 µL  | 2.5 pM                  |
| <b>L4</b>     | 20 µL                                 | 980 µL  | 0.01 nM              | 100 µL  | 1 pM                    |

**Tabelle 21** Pipettierschema der Zellinternalisierung von [<sup>18</sup>F]F6 in LNCaP-Zellen.

| <b>Well</b> | <b>Vorgelegtes<br/>Volumen PBS</b> | <b>Volumen<br/>[<sup>18</sup>F]F6</b> | <b>Volumen 2-<br/>PMPA-<br/>Stammlösung<br/>für Blocking</b> | <b>Volumen 2-<br/>PBS<br/>benötigtes<br/>Endvolumen</b> | <b>Endvolumen<br/>Well</b> |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------------|--|---|----------------------------|
| <b>1</b>    | 1200 µL                            | 100 µL                                | -  | 200 µL  | 1500 µL                    |
| <b>2</b>    | 1200 µL                            | 100 µL                                | 200 µL   | -   | 1500 µL                    |

### **5.6.3.3 Stammlösungen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der BODIPY PSMA Liganden**

Vorbereitungen der Zellen, die Präparation der Objektträger, das Ansetzen der benötigten Lösungen sowie die Durchführung des Assays erfolgte gemäß AV 10.

#### Ansatz der verwendeten Stammlösung

**6** 1.4 mg (1.87  $\mu\text{mol}$ ) in 19  $\mu\text{L}$  DMSO

#### Ansatz Verdünnungsreihen für Internalisierungsexperimente Ligand 6

1  $\mu\text{L}$  der Stammlösung von **6** wird mit 999  $\mu\text{L}$  DMSO verdünnt (1:1000 Verdünnung) = Stammlösung 2.

0.4  $\mu\text{L}$  der Stammlösung 2 pro Well für eine finale Konzentration von 20 nM

2  $\mu\text{L}$  der Stammlösung 2 pro Well für eine finale Konzentration von 100 nM

### **5.6.3.4 Stammlösungen - *In vitro* Evaluation Dichelator PSMA-Liganden**

Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß AV 8.

#### Ansatz der verwendeten Stammlösungen

**18** 3.46 mg (2.26  $\mu\text{mol}$ ) in 2260  $\mu\text{L}$  DMSO

**19** 2.82 mg (1.73  $\mu\text{mol}$ ) in 1730  $\mu\text{L}$  Wasser

## 6 Literaturverzeichnis

1. Spohn, F. *et al.* Aktueller Stand der PSMA-PET-Diagnostik beim Prostatakarzinom Current status of PSMA-PET diagnostics in prostate cancer. *Der Nuklearmediziner* **41**, 232-246 (2018).
2. Gasch, C. *et al.* Stellenwert der PSMA-Liganden-Bildgebung beim Prostatakarzinom. *Urologe* **56**, 3–12 (2017).
3. Maresca, K. P. *et al.* A Series of Halogenated Heterodimeric Inhibitors of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) as Radiolabeled Probes for Targeting Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **52**, 347–357 (2009).
4. Esserman, L. J. *et al.* Addressing overdiagnosis and overtreatment in cancer: a prescription for change. *The Lancet Oncology* **15**, 234–242 (2014).
5. Pashayan, N. *et al.* Stage Shift in Psa-detected Prostate Cancers – Effect Modification by Gleason Score. *J. Med. Screen.* **16**, 98–101 (2009).
6. Benešová, M. *et al.* Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **56**, 914–920 (2015).
7. Ahmadzadehfar, H. *et al.* Early side effects and first results of radioligand therapy with <sup>177</sup>Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. *EJNMMI Res* **5**, 1-8 (2015).
8. Kratochwil, C. *et al.* [<sup>177</sup>Lu]Lutetium-labelled PSMA ligand-induced remission in a patient with metastatic prostate cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **42**, 987–988 (2015).
9. Liu, H. *et al.* Constitutive and Antibody-induced Internalization of Prostate-specific Membrane Antigen1. *Cancer Res.* **58**, 4055–4060 (1998).
10. Davis, M. I., Bennett, M. J., Thomas, L. M. & Bjorkman, P. J. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5981-5986 (2005).

11. Barinka, C., Rojas, C., Slusher, B. & Pomper, M. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *CMC* **19**, 856–870 (2012).
12. Mesters, J. R. *et al.* Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *EMBO J* **25**, 1375–1384 (2006).
13. Klusák, V. *et al.* Reaction Mechanism of Glutamate Carboxypeptidase II Revealed by Mutagenesis, X-ray Crystallography, and Computational Methods. *Biochemistry* **48**, 4126–4138 (2009).
14. Evans, J. C., Malhotra, M., Cryan, J. F. & O’Driscoll, C. M. The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. *Br. J. Pharmacol* **173**, 3041–3079 (2016).
15. Speno, H. S. *et al.* Site-directed mutagenesis of predicted active site residues in glutamate carboxypeptidase II. *Mol. Pharmacol.* **55**, 179–185 (1999).
16. Bařinka, C. *et al.* Structural Insight into the Pharmacophore Pocket of Human Glutamate Carboxypeptidase II. *J. Med. Chem.* **50**, 3267–3273 (2007).
17. Wang, H. *et al.* Bioisosterism of urea-based GCPII inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 392–397 (2010).
18. Mesters, J. R., Henning, K. & Hilgenfeld, R. Human glutamate carboxypeptidase II inhibition: structures of GCPII in complex with two potent inhibitors, quisqualate and 2-PMPA. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **63**, 508–513 (2007).
19. Hloučová, K. *et al.* Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III. *J Neurochem.* **101**, 682–696 (2007).
20. Barinka, C. *et al.* Structural Basis of Interactions between Human Glutamate Carboxypeptidase II and Its Substrate Analogs. *J. Mol. Biol.* **376**, 1438–1450 (2008).
21. Kopka, K., Beneřová, M., Bařinka, C., Haberkorn, U. & Babich, J. Glu-Ureido–Based Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Lessons Learned During the Development of a Novel Class of Low-Molecular-Weight Theranostic Radiotracers. *J. Nucl. Med.* **58**, 17S–26S (2017).
22. Håkansson, K. & Miller, C. G. Structure of peptidase T from *Salmonella typhimurium*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 443–450 (2002).

23. Jozic, D. *et al.* Crystal structure of the dinuclear zinc aminopeptidase PepV from *Lactobacillus delbrueckii* unravels its preference for dipeptides. *Structure* **10**, 1097–1106 (2002).
24. Navrátil, M. *et al.* Structural and biochemical characterization of the folyl-poly- $\gamma$ -L-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *FEBS J.* **281**, 3228–3242 (2014).
25. Mhaweche-Fauceglia, P. *et al.* Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumour tissue microarray technique. *Histopathology* **50**, 472–483 (2007).
26. Sokoloff, R. L., Norton, K. C., Gasior, C. L., Marker, K. M. & Grauer, L. S. A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine. *Prostate* **43**, 150–157 (2000).
27. Bostwick, D. G., Pacelli, A., Blute, M., Roche, P. & Murphy, G. P. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer* **82**, 2256–2261 (1998).
28. Heynickx, N., Herrmann, K., Vermeulen, K., Baatout, S. & Aerts, A. The salivary glands as a dose limiting organ of PSMA-targeted radionuclide therapy: A review of the lessons learnt so far. *Nucl. Med. Biol.* **98–99**, 30–39 (2021).
29. Silver, D. A., Pellicer, I., Fair, W. R., Heston, W. D. & Cordon-Cardo, C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin. Cancer Res.* **3**, 81–85 (1997).
30. Kinoshita, Y. *et al.* Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Normal and Malignant Human Tissues. *World J. Surg.* **30**, 628–636 (2006).
31. Eder, M. *et al.* <sup>68</sup>Ga-Complex Lipophilicity and the Targeting Property of a Urea-Based PSMA Inhibitor for PET Imaging. *Bioconjug. Chem.* **23**, 688–697 (2012).
32. Ghosh, A. & Heston, W. D. W. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J. Cell Biochem.* **91**, 528–539 (2004).
33. Rosar, F. *et al.* New insights in the paradigm of upregulation of tumoral PSMA expression by androgen receptor blockade: Enzalutamide induces PSMA upregulation in castration-resistant

- prostate cancer even in patients having previously progressed on enzalutamide. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **47**, 687–694 (2020).
34. Lenzo, N. P., Meyrick, D. & Turner, J. H. Review of Gallium-68 PSMA PET/CT Imaging in the Management of Prostate Cancer. *Diagnostics (Basel)* **8**, 1-17 (2018).
  35. Rahbar, K. *et al.* German Multicenter Study Investigating <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J. Nucl. Med.* **58**, 85–90 (2017).
  36. Khreish, F. *et al.* <sup>177</sup>Lu-PSMA-617 radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: Initial 254-patient results from a prospective registry (REALITY Study). *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **49**, 1075–1085 (2022).
  37. Emmett, L. *et al.* Lutetium <sup>177</sup> PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy. *J. Med. Radiat. Sci.* **64**, 52–60 (2017).
  38. Kratochwil, C. *et al.* PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with <sup>177</sup>Lu-Labeled PSMA-617. *J. Nucl. Med.* **57**, 1170–1176 (2016).
  39. Boros, E. & Packard, A. B. Radioactive Transition Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **119**, 870–901 (2019).
  40. Schlegel, W., Karger, C.P. & Jäkel, O. *Medizinische Physik* 1. Auflage. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54801-1> (2018).
  41. Keith, S. *et al.* Toxicological Profile for Uranium. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US) (2013.)
  42. Scott, B. R. & Guilmette, R. A. Radiation Toxicology, Ionizing and Nonionizing. *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)* (ed. Wexler, P.) 601–615. doi:10.1016/B0-12-369400-0/00828-0 (2005).
  43. Dollé, F. Carbon-11 and fluorine-18 chemistry devoted to molecular probes for imaging the brain with positron emission tomography. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **56**, 65–67 (2013).
  44. Bhattacharyya, S. & Dixit, M. Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Dalton Trans.* **40**, 6112–6128 (2011).

45. Lindegren, S., Albertsson, P., Bäck, T., Jensen, H., Palm, S. & Aneheim, E. Realizing Clinical Trials with Astatine-211: The Chemistry Infrastructure. *Cancer Biother. Radiopharm.* **35**, 425-436 (2020)
46. Ramdhani, D., Widyasari, E. M., Sriyani, M. E., Arnanda, Q. P. & Watabe, H. Iodine-131 labeled genistein as a potential radiotracer for breast cancer. *Heliyon* **6**, e04780 (2020).
47. Mou, L. *et al.* <sup>67</sup>Cu Production Capabilities: A Mini Review. *Molecules* **27**, 1-18 (2022).
48. Mitchell, N., Pérez-Sánchez, D. & Thorne, M. C. A review of the behaviour of U-238 series radionuclides in soils and plants. *J. Radiol. Prot.* **33**, R17 (2013).
49. Radioaktive Zerfallsreihen. <https://www.spektrum.de/lexikon/physik/radioaktive-zerfallsreihen/11995>.
50. Morgenstern, A. *et al.* An Overview of Targeted Alpha Therapy with <sup>225</sup>Actinium and <sup>213</sup>Bismuth. *Curr. Radiopharm.* **11**, 200–208 (2018).
51. Hutton, B. F. The origins of SPECT and SPECT/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **41**, 3–16 (2014).
52. Mariani, G. *et al.* A review on the clinical uses of SPECT/CT. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **37**, 1959–1985 (2010).
53. Hennrich, U. & Benešová, M. [<sup>68</sup>Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved <sup>68</sup>Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals* **13**, 38 (2020).
54. Riklund, K. A. PET/CT: nuclear medicine imaging in the future. *Radiat. Prot. Dosim.* **139**, 8–11 (2010).
55. Shukla, A. K. & Kumar, U. Positron emission tomography: An overview. *J. Med. Phys.* **31**, 13–21 (2006).
56. van der Veldt, A. A. M., Smit, E. F. & Lammertsma, A. A. Positron Emission Tomography as a Method for Measuring Drug Delivery to Tumors in vivo: The Example of [<sup>11</sup>C]docetaxel. *Front. Oncol.* **3**, 1-7 (2013).
57. Vaquero, J. J. & Kinahan, P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu Rev Biomed Eng.* **17**, 385–414 (2015).

58. Benešová, M. *et al.* Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. *J. Med. Chem.* **59**, 1761–1775 (2016).
59. Wadsak, W. & Mitterhauser, M. Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. *Eur. J. Radiol.* **73**, 461–469 (2010).
60. Benešová, M. *et al.* Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. *J. Med. Chem.* **59**, 1761–1775 (2016).
61. Coenen, H. H. *et al.* Consensus nomenclature rules for radiopharmaceutical chemistry - Setting the record straight. *Nucl. Med. Biol.* **55**, v–xi (2017).
62. Cai, L., Lu, S. & Pike, V. W. Chemistry with [18F]Fluoride Ion. *Eur. J. Org. Chem.* **17**, 2853–2873 (2008).
63. Gillings, N. Radiotracers for positron emission tomography imaging. *Magn. Reson. Mater. Phy.* **26**, 149–158 (2013).
64. Khreish, F. *et al.* <sup>225</sup>Ac-PSMA-617/<sup>177</sup>Lu-PSMA-617 tandem therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: pilot experience. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **47**, 721–728 (2020).
65. Anderson, C. J. & Ferdani, R. Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Cancer: Advances in Preclinical and Clinical Research. *Cancer Biother. Radiopharm.* **24**, 379–393 (2009).
66. Vāvere, A. L. & Scott, P. J. H. Clinical Applications of Small-molecule PET Radiotracers: Current Progress and Future Outlook. *Semin. Nucl. Med.* **47**, 429–453 (2017).
67. Bartholomä, M. D. Recent developments in the design of bifunctional chelators for metal-based radiopharmaceuticals used in Positron Emission Tomography. *Inorg. Chim.* **389**, 36–51 (2012).
68. Van de Bittner, G. C., Ricq, E. L. & Hooker, J. M. A philosophy for CNS radiotracer design. *Acc. Chem. Res.* **47**, 3127–3134 (2014).
69. Price, E. W. & Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 260–290 (2014).

70. Chakraborty, S. *et al.* Prospects of medium specific activity  $^{177}\text{Lu}$  in targeted therapy of prostate cancer using  $^{177}\text{Lu}$ -labeled PSMA inhibitor. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **59**, 364–371 (2016).
71. Deng, X. *et al.* Chemie der Positronenemissionstomographie: Aktuelle Fortschritte bei  $^{11}\text{C}$ -,  $^{18}\text{F}$ -,  $^{13}\text{N}$ - und  $^{15}\text{O}$ -Markierungsreaktionen. *Angew. Chem.* **131**, 2604–2631 (2019).
72. Hamacher, K., Coenen, H. H. & Stöcklin, G. Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[ $^{18}\text{F}$ ]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.* **27**, 235–238 (1986).
73. Wester, H. J. *et al.* Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethyl)-L-tyrosine for tumor imaging. *J. Nucl. Med.* **40**, 205–212 (1999).
74. Schirrmacher, R. *et al.* Small Prosthetic Groups in  $^{18}\text{F}$ -Radiochemistry: Useful Auxiliaries for the Design of  $^{18}\text{F}$ -PET Tracers. *Semin. Nucl. Med.* **47**, 474–492 (2017).
75. Nymann Petersen, I., Madsen, J., Bernard Matthijs Poulie, C., Kjær, A. & Manfred Herth, M. One-Step Synthesis of N-Succinimidyl-4-[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorobenzoate ([ $^{18}\text{F}$ ]SFB). *Molecules* **24**, (2019).
76. Wester, H. J., Hamacher, K. & Stöcklin, G. A comparative study of N.C.A. fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. *Nucl. Med. Biol.* **23**, 365–372 (1996).
77. Liu, S. *et al.* Lewis acid-assisted isotopic  $^{18}\text{F}$ - $^{19}\text{F}$  exchange in BODIPY dyes: facile generation of positron emission tomography/fluorescence dual modality agents for tumor imaging. *Theranostics* **3**, 181–189 (2013).
78. Bernard-Gauthier, V. *et al.*  $^{18}\text{F}$ -Labeled Silicon-Based Fluoride Acceptors: Potential Opportunities for Novel Positron Emitting Radiopharmaceuticals. *Biomed. Res. Int.* **2014**, 1-20 (2014).
79. de Goeij, J. J. M. & Bonardi, M. L. How do we define the concepts specific activity, radioactive concentration, carrier, carrier-free and no-carrier-added? *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **263**, 13–18 (2005).
80. Subasinghe, N. *et al.* Synthesis of acyclic and dehydroaspartic acid analogues of Ac-Asp-Glu-OH and their inhibition of rat brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALA dipeptidase). *J. Med. Chem.* **33**, 2734–2744 (1990).

81. Tsukamoto, T., Wozniak, K. M. & Slusher, B. S. Progress in the discovery and development of glutamate carboxypeptidase II inhibitors. *Drug Discov. Today* **12**, 767–776 (2007).
82. Gourni, E. & Henriksen, G. Metal-Based PSMA Radioligands. *Molecules* **22**, 523 (2017).
83. Jackson, P. F. *et al.* Design, Synthesis, and Biological Activity of a Potent Inhibitor of the Neuropeptidase N-Acetylated  $\alpha$ -Linked Acidic Dipeptidase. *J. Med. Chem.* **39**, 619–622 (1996).
84. Kozikowski, A. P. *et al.* Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents. *J. Med. Chem.* **47**, 1729–1738 (2004).
85. Kwon, H. *et al.* Structure-activity relationship studies of prostate-specific membrane antigen (PSMA) inhibitors derived from  $\alpha$ -amino acid with (S)- or (R)-configuration at P1' region. *Bioorg. Chem.* **104**, 104304 (2020).
86. Wüstemann, T. *et al.* Design of Internalizing PSMA-specific Glu-ureido-based Radiotherapeutics. *Theranostics* **6**, 1085–1095 (2016).
87. Kozikowski, A. P. *et al.* Design of Remarkably Simple, Yet Potent Urea-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II (NAALADase). *J. Med. Chem.* **44**, 298–301 (2001).
88. Barinka, C. *et al.* Interactions between Human Glutamate Carboxypeptidase II and Urea-Based Inhibitors: Structural Characterization. *J. Med. Chem.* **51**, 7737–7743 (2008).
89. Mlcochová, P. *et al.* Mapping of the active site of glutamate carboxypeptidase II by site-directed mutagenesis. *FEBS J* **274**, 4731–4741 (2007).
90. Lütje, S. *et al.* PSMA Ligands for Radionuclide Imaging and Therapy of Prostate Cancer: Clinical Status. *Theranostics* **5**, 1388–1401 (2015).
91. Murphy, G. P. *et al.* Comparison of serum PSMA, PSA levels with results of Cytogen-356 ProstaScint scanning in prostatic cancer patients. *Prostate* **33**, 281–285 (1997).
92. Tagawa, S. T. *et al.* Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5182–5191 (2013).
93. Barrett, J. A. *et al.* First-in-man evaluation of 2 high-affinity PSMA-avid small molecules for imaging prostate cancer. *J. Nucl. Med.* **54**, 380–387 (2013).

94. Banerjee, S. R. *et al.* Effect of Chelators on the Pharmacokinetics of <sup>99m</sup>Tc-Labeled Imaging Agents for the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *J. Med. Chem.* **56**, 6108–6121 (2013).
95. Vallabhajosula, S. *et al.* <sup>99m</sup>Tc-Labeled Small-Molecule Inhibitors of Prostate-Specific Membrane Antigen: Pharmacokinetics and Biodistribution Studies in Healthy Subjects and Patients with Metastatic Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **55**, 1791–1798 (2014).
96. Vassaux, G. & Groot-Wassink, T. In Vivo Noninvasive Imaging for Gene Therapy. *J. biotechnol. biomed.* **2003**, 92–101 (2003).
97. Makarem, A., Konrad, M., Liolios, C. & Kopka, K. A Convenient Synthesis for HBED-CC-tris(tert-butyl ester). *Synlett* **29**, 1239–1243 (2018).
98. Afshar-Oromieh, A. *et al.* PET imaging with a [<sup>68</sup>Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **40**, 486–495 (2013).
99. Fendler, W. P., Bluemel, C., Czernin, J. & Herrmann, K. PET imaging in prostate cancer, future trends: PSMA ligands. *Clin. Transl. Imaging* **4**, 467–472 (2016).
100. Koerber, S. A. *et al.* <sup>68</sup>Ga-PSMA-11 PET/CT in Primary and Recurrent Prostate Carcinoma: Implications for Radiotherapeutic Management in 121 Patients. *J. Nucl. Med.* **60**, 234–240 (2019).
101. Wurzer, A. *et al.* Preclinical comparison of four [<sup>18</sup>F, natGa]rhPSMA-7 isomers: influence of the stereoconfiguration on pharmacokinetics. *EJNMMI Res* **10**, 149 (2020).
102. Wurzer, A. *et al.* Radiohybrid Ligands: A Novel Tracer Concept Exemplified by <sup>18</sup>F- or <sup>68</sup>Ga-Labeled rhPSMA Inhibitors. *J. Nucl. Med.* **61**, 735–742 (2020).
103. Sanchez-Crespo, A. Comparison of Gallium-68 and Fluorine-18 imaging characteristics in positron emission tomography. *Applied Radiation and Isotopes* **76**, 55–62 (2013).
104. Cardinale, J. *et al.* Preclinical Evaluation of <sup>18</sup>F-PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging. *J. Nucl. Med.* **58**, 425–431 (2017).
105. Robu, S. *et al.* Synthesis and preclinical evaluation of novel <sup>18</sup>F-labeled Glu-urea-Glu-based PSMA inhibitors for prostate cancer imaging: a comparison with <sup>18</sup>F-DCFPyl and <sup>18</sup>F-PSMA-1007. *EJNMMI Res.* **8**, 30 (2018).

106. Kratochwil, C. *et al.* 225Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted  $\alpha$ -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **57**, 1941–1944 (2016).
107. Delker, A. *et al.* Dosimetry for (177)Lu-DKFZ-PSMA-617: a new radiopharmaceutical for the treatment of metastatic prostate cancer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **43**, 42–51 (2016).
108. Baranski, A.-C. *et al.* PSMA-11-Derived Dual-Labeled PSMA Inhibitors for Preoperative PET Imaging and Precise Fluorescence-Guided Surgery of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **59**, 639–645 (2018).
109. Matthias, J. *et al.* Cytoplasmic Localization of Prostate-Specific Membrane Antigen Inhibitors May Confer Advantages for Targeted Cancer Therapies. *Cancer Res.* **81**, 2234–2245 (2021).
110. Eder, A.-C. *et al.* A New Class of PSMA-617-Based Hybrid Molecules for Preoperative Imaging and Intraoperative Fluorescence Navigation of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)* **15**, 267 (2022).
111. Eder, A.-C. *et al.* The PSMA-11-derived hybrid molecule PSMA-914 specifically identifies prostate cancer by preoperative PET/CT and intraoperative fluorescence imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **48**, 2057–2058 (2021).
112. Bu, L., Shen, B. & Cheng, Z. Fluorescent imaging of cancerous tissues for targeted surgery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **76**, 21–38 (2014).
113. Hussain, T. & Nguyen, Q. T. Molecular imaging for cancer diagnosis and surgery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**, 90–100 (2014).
114. Eiber, M. *et al.*  $^{18}$ F-rhPSMA-7 PET for the Detection of Biochemical Recurrence of Prostate Cancer After Radical Prostatectomy. *J. Nucl. Med.* **61**, 696–701 (2020).
115. Wienhoff, B. E. *et al.* Synthesis and Selective Radiolabeling Strategies for Production of [90Y-DOTA- $\beta$ ala-K-64Cu-NOTA-BBN(7–14) NH<sub>2</sub>] Conjugate; A Dual Negatron/Positron Emitting Radioligand. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* **43**, 178–184 (2013).
116. Wurzer, A. *et al.* Dual-Nuclide Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography Based Dosimetry in Radiotherapy. *Chem. Eur. J.* **24**, 547–550 (2018).

117. Notni, J., Hermann, P., Dregely, I. & Wester, H.-J. Convenient Synthesis of <sup>68</sup>Ga-Labeled Gadolinium(III) Complexes: Towards Bimodal Responsive Probes for Functional Imaging with PET/MRI. *Chem. Eur. J.* **19**, 12602–12606 (2013).
118. Kumar, A. *et al.* Molecular Platform for Design and Synthesis of Targeted Dual-Modality Imaging Probes. *Bioconjug. Chem.* **26**, 549–558 (2015).
119. Kowada, T., Maeda, H. & Kikuchi, K. BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4953–4972 (2015).
120. Franke, J. M. *et al.* BODIPY Fluorophores for Membrane Potential Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 12824–12831 (2019).
121. Boens, N., Leen, V. & Dehaen, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1130–1172 (2012).
122. Treibs, A. & Kreuzer, F.-H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **718**, 208–223 (1968).
123. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **107**, 4891–4932 (2007).
124. Bittel, A. M. *et al.* Varied Length Stokes Shift BODIPY-Based Fluorophores for Multicolor Microscopy. *Sci. Rep.* **8**, 4590 (2018).
125. Jeon, S. *et al.* Amine-Reactive Activated Esters of meso-CarboxyBODIPY: Fluorogenic Assays and Labeling of Amines, Amino Acids, and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 9231–9239 (2020).
126. Schüller, A., Goh, G. B., Kim, H., Lee, J.-S. & Chang, Y.-T. Quantitative Structure-Fluorescence Property Relationship Analysis of a Large BODIPY Library. *Mol. Inform.* **29**, 717–729 (2010).
127. Hinkeldey, B., Schmitt, A. & Jung, G. Comparative photostability studies of BODIPY and fluorescein dyes by using fluorescence correlation spectroscopy. *Chemphyschem* **9**, 2019–2027 (2008).
128. Vernekar, S. K. V. *et al.* Toward Biophysical Probes for the 5-HT<sub>3</sub> Receptor: Structure–Activity Relationship Study of Granisetron Derivatives. *J. Med. Chem.* **53**, 2324–2328 (2010).

129. Waghorn, P. A. *et al.* Targeting Carbonic Anhydrases with Fluorescent BODIPY-Labelled Sulfonamides. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2898–2907 (2012).
130. Lee, J.-S. *et al.* Synthesis of a BODIPY Library and Its Application to the Development of Live Cell Glucagon Imaging Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10077–10082 (2009).
131. Nørager, N. G. *et al.* Development of Potent Fluorescent Polyamine Toxins and Application in Labeling of Ionotropic Glutamate Receptors in Hippocampal Neurons. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2033–2041 (2013).
132. Liu, S. *et al.* Efficient synthesis of fluorescent-PET probes based on [18F]BODIPY dye. *Chem. Commun.* **50**, 7371 (2014).
133. Alquicer, G. *et al.* Development of a High-Throughput Fluorescence Polarization Assay to Identify Novel Ligands of Glutamate Carboxypeptidase II. *J. Biomol. Screen* **17**, 1030–1040 (2012).
134. Son, S. H. *et al.* Design and synthesis of a novel BODIPY-labeled PSMA inhibitor. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **30**, 126894 (2020).
135. Hartwig, S., Schwarz, J. & Hecht, S. From Peptides to Their Alternating Ester-Urea Analogues: Synthesis and Influence of Hydrogen Bonding Motif and Stereochemistry on Aggregation. *J. Org. Chem.* **75**, 772–782 (2010).
136. Rumyantsev, E. V., Alyoshin, S. N. & Marfin, Y. S. Kinetic study of Bodipy resistance to acids and alkalis: Stability ranges in aqueous and non-aqueous solutions. *Inorganica Chim. Acta* **408**, 181–185 (2013).
137. Martin, S. *et al.* Identification, Characterization, and Suppression of Side Products Formed during the Synthesis of [177Lu]Lu-PSMA-617. *J. Med. Chem.* **64**, 4960–4971 (2021).
138. Vrettos, E. I. *et al.* Unveiling and tackling guanidinium peptide coupling reagent side reactions towards the development of peptide-drug conjugates. *RSC Adv.* **7**, 50519–50526 (2017).
139. Inkster, J. a. H. *et al.* A non-anhydrous, minimally basic protocol for the simplification of nucleophilic 18F-fluorination chemistry. *Sci. Rep.* **10**, 6818 (2020).
140. Mier, W. *et al.* Conjugation of DOTA Using Isolated Phenolic Active Esters: The Labeling and Biodistribution of Albumin as Blood Pool Marker. *Bioconjug. Chem.* **16**, 237–240 (2005).

141. S. Marfin, Y., D. Usoltsev, S. & V. Rumyantsev, E. Decomposition Mechanisms of BODIPY Dyes. in *BODIPY Dyes - A Privilege Molecular Scaffold with Tunable Properties* (eds. Bañuelos-Prieto, J. & Sola Llano, R.). doi:10.5772/intechopen.80498 (2019).
142. Hoffmann, C. Auf dem Weg zu multifunktionalen Bodipy-Farbstoffen. Dissertation, Universität des Saarlandes, doi:10.22028/D291-35498 (2021).
143. Liu, S., Li, Z. & Conti, P. An efficient method for NIR fluorescent/PET probe synthesis based on 18F-bodipy dye. *J. Nucl. Med.* **54**, 1041–1041 (2013).
144. Lämpchen, T., Holland, J. P., Kiefer, Y. & Bartholomä, M. D. Preparation and preclinical evaluation of a <sup>68</sup>Ga-labelled c(RGDfK) conjugate comprising the bifunctional chelator NODIA-Me. *EJNMMI radiopharm. chem.* **3**, 6 (2018).
145. Cheng, Y. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
146. Stemler, T. *et al.* A Structure-Activity Relationship Study of Bimodal BODIPY-Labeled PSMA-Targeting Bioconjugates. *ChemMedChem* **16**, 2535–2545 (2021).
147. Meershoek, P. *et al.* Multi-wavelength fluorescence imaging with a da Vinci Firefly—a technical look behind the scenes. *J. Robotic Surg.* **15**, 751–760 (2021).
148. Eder, A.-C. *et al.* The PSMA-11-derived hybrid molecule PSMA-914 specifically identifies prostate cancer by preoperative PET/CT and intraoperative fluorescence imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **48**, 2057–2058 (2021).
149. Weinmann, C. *et al.* Optimized synthesis and indium complex formation with the bifunctional chelator NODIA-Me. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 7503–7512 (2018).
150. Schmidtke, A. *et al.* Gallium Complexation, Stability, and Bioconjugation of 1,4,7-Triazacyclononane Derived Chelators with Azaheterocyclic Arms. *Inorg. Chem.* **56**, 9097–9110 (2017).
151. Lippard, S. J. Eight-Coordination Chemistry. *Prog. Inorg. Chem.* **35**, 109-184 (1967).

152. Gotzmann, C., Braun, F. & Bartholomä, M. D. Synthesis, <sup>64</sup>Cu-labeling and PET imaging of 1,4,7-triazacyclononane derived chelators with pendant azaheterocyclic arms. *RSC Adv.* **6**, 119–131 (2015).
153. Martin, S. *et al.* Proof-of-Concept Study of the NOTI Chelating Platform: Preclinical Evaluation of <sup>64</sup>Cu-Labeled Mono- and Trimeric c(RGDfK) Conjugates. *Mol. Imaging Biol.* **23**, 95–108 (2021).
154. Läppchen, T., Kiefer, Y., Holland, J. P. & Bartholomä, M. D. In vitro and in vivo evaluation of the bifunctional chelator NODIA-Me in combination with a prostate-specific membrane antigen targeting vector. *Nuclear Medicine and Biology* **60**, 45–54 (2018).
155. Müller, C. *et al.* Terbium-161 for PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. *Eur J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **46**, 1919–1930 (2019).
156. O'Donoghue, J. A., Bardiès, M. & Wheldon, T. E. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J. Nucl. Med.* **36**, 1902–1909 (1995).
157. Geraldes, C. F. G. C., Marques, M. P. M., Castro, B. de & Pereira, E. Study of Copper(II) Polyazamacrocyclic Complexes by Electronic Absorption Spectrophotometry and EPR Spectroscopy. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 559–565 (2000).
158. Garribba, E. & Micera, G. The Determination of the Geometry of Cu(II) Complexes: An EPR Spectroscopy Experiment. *J. Chem. Educ.* **83**, 1229 (2006).
159. Comba, P., Hambley, T. W., Hitchman, M. A. & Stratemeier, H. Interpretation of Electronic and EPR Spectra of Copper(II) Amine Complexes: A Test of the MM-AOM Method. *Inorg. Chem.* **34**, 3903–3911 (1995).
160. Hötzer, B., Ivanov, R., Altmeier, S., Kappl, R. & Jung, G. Determination of copper(II) ion concentration by lifetime measurements of green fluorescent protein. *J. Fluoresc.* **21**, 2143–2153 (2011).
161. Osl, T., Kapp, T., Schottelius, M., Kessler, H. & Wester, H. J. CXCR4-targeted diagnostic and therapeutic with reduced species selectivity. Patent WO2020053256A1 (2019).

162. Grüter, A., Hoffmann, M., Müller, R., Wohland, T. & Jung, G. A high-affinity fluorescence probe for copper(II) ions and its application in fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 3229–3240 (2019).
163. Zanzonico, P. Routine Quality Control of Clinical Nuclear Medicine Instrumentation: A Brief Review. *J. Nucl. Med.* **49**, 1114–1131 (2008).
164. Gstraunthaler, G. & Lindl, T. Zell- und Gewebekultur 7. Auflage. Springer, doi:10.1007/978-3-642-35997-2 (2013).

## 7 Anhang

### 7.1 Spektroskopische Charakterisierung der multifunktionellen PSMA-Liganden

#### 7.1.1 Spektroskopische Charakterisierung der PSMA-Bindemotiv und BODIPY PSMA-Liganden

Die  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  sowie  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren der BODIPY-PSMA-Liganden **5**, **6**, **7** und **8** wurden in Kooperation mit Frau Dr. C. Hoffmann (AK Prof. Dr. G. Jung, Biophysikalische Chemie, UdS) ausgewertet.

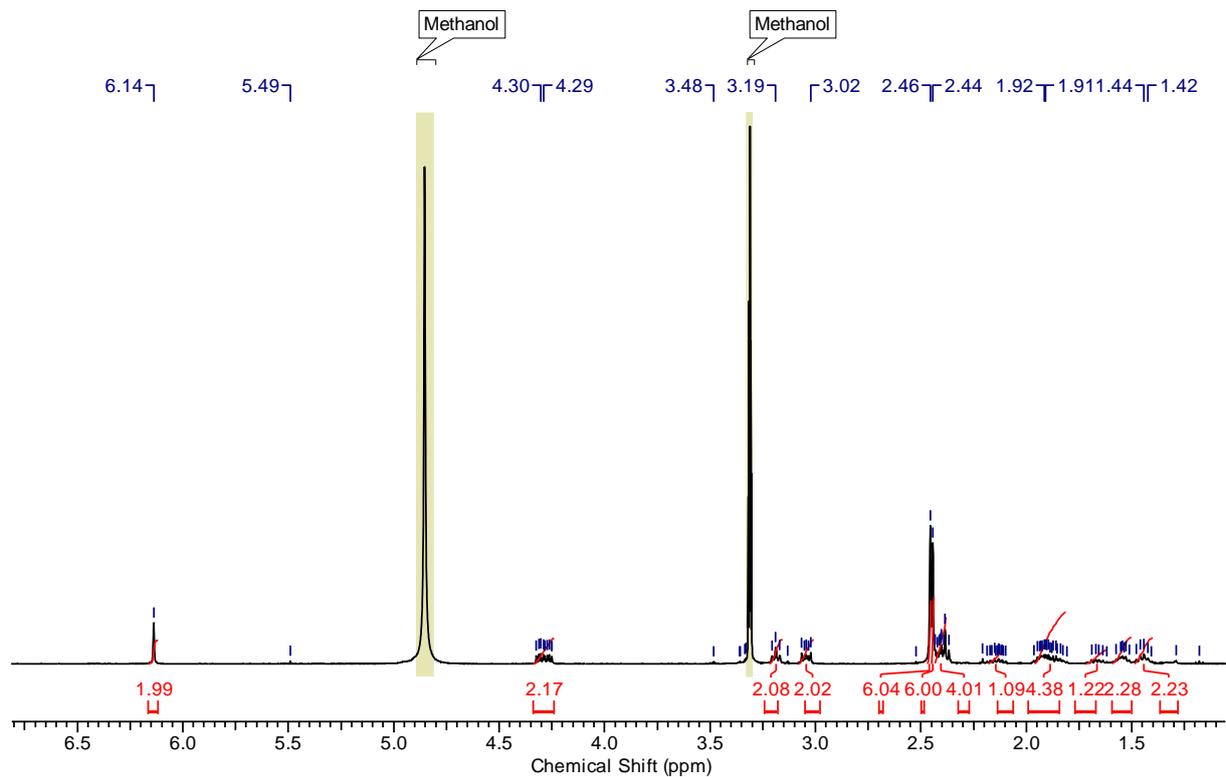


Abbildung 70  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum **5**.

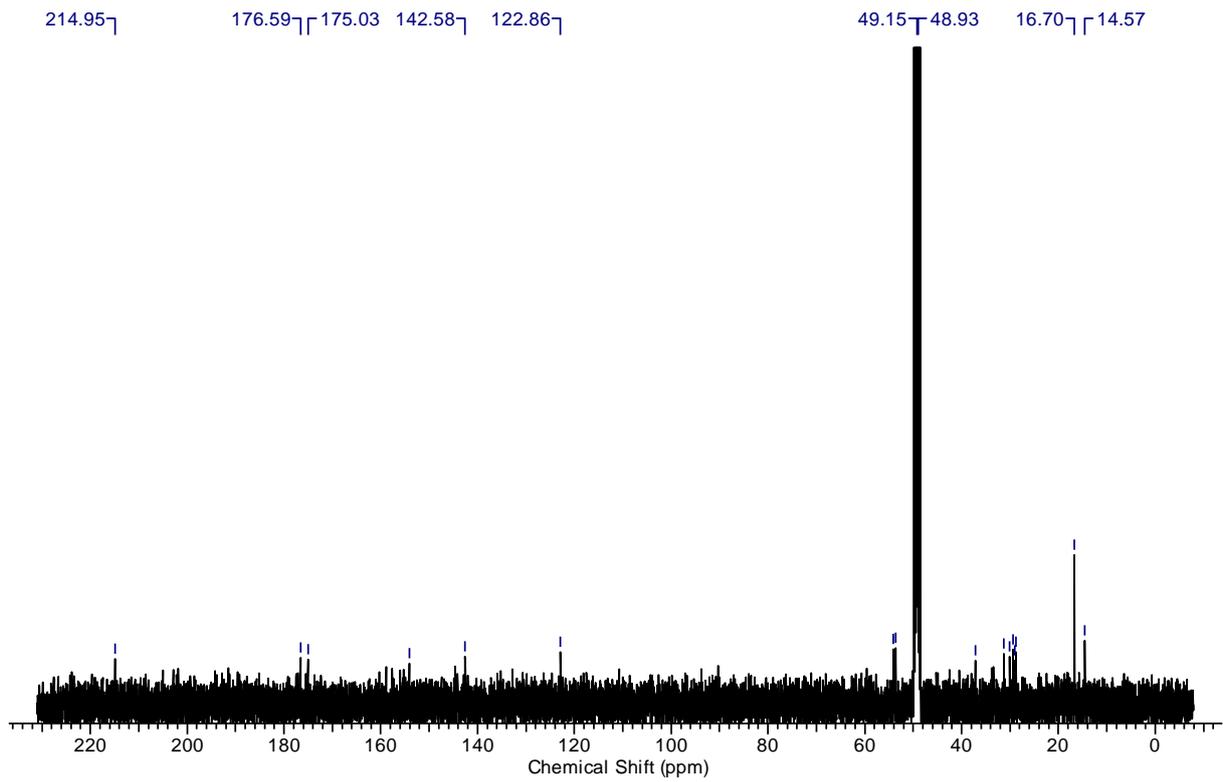


Abbildung 71  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum 5.

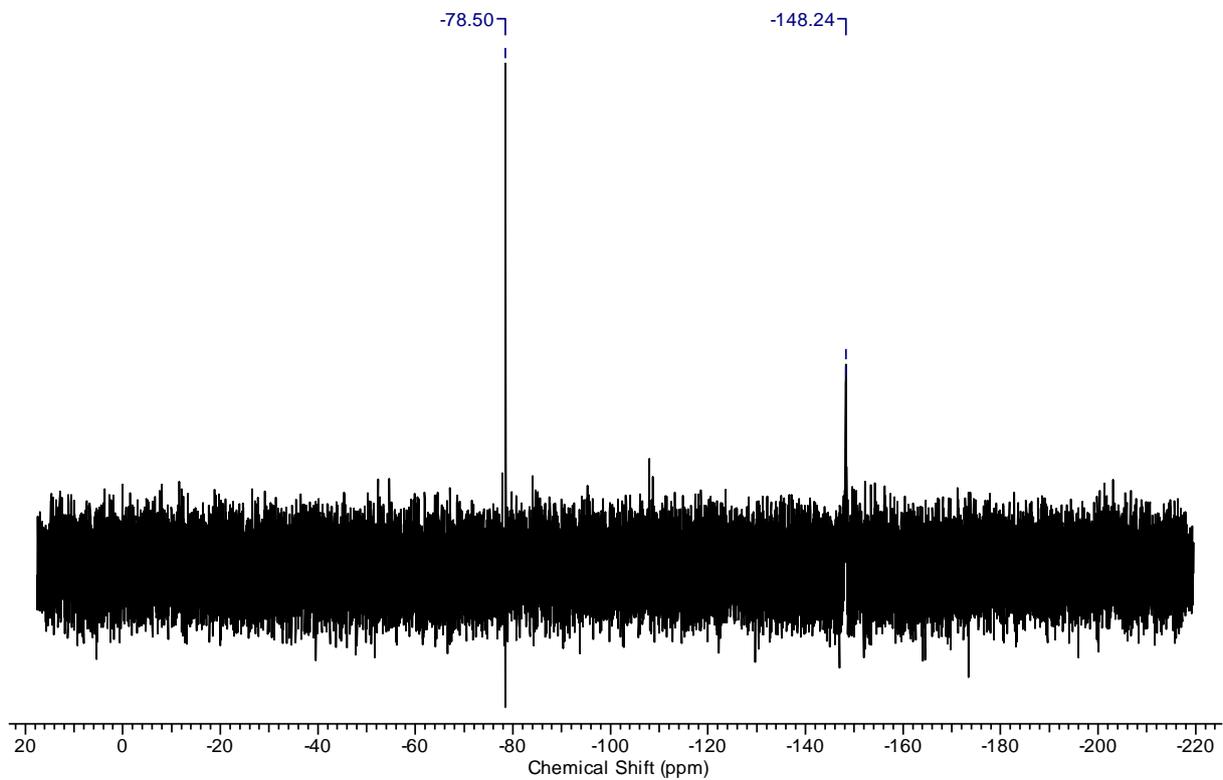
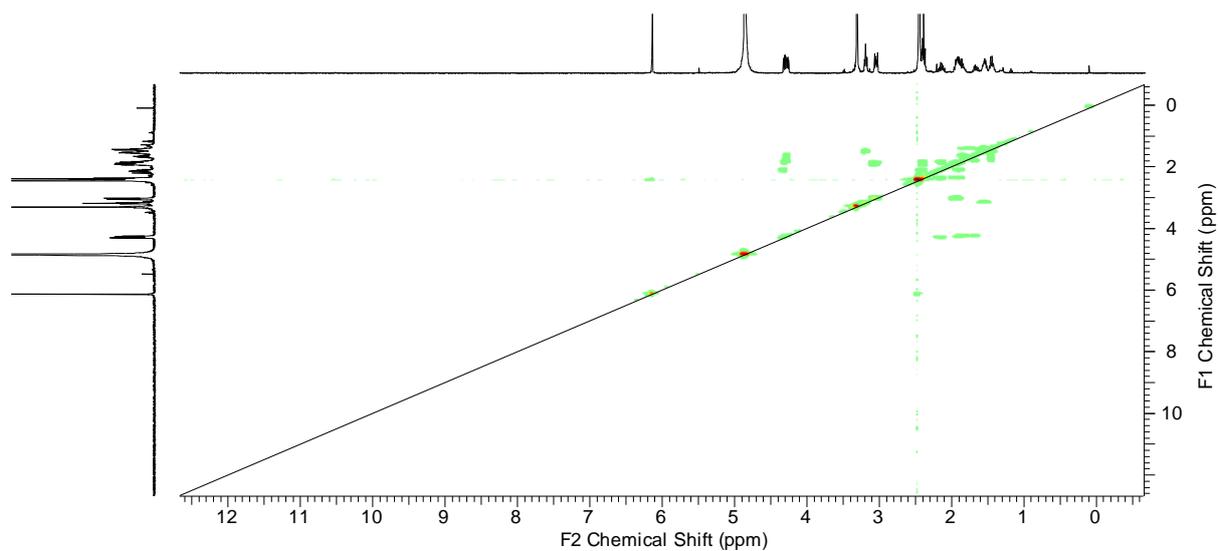
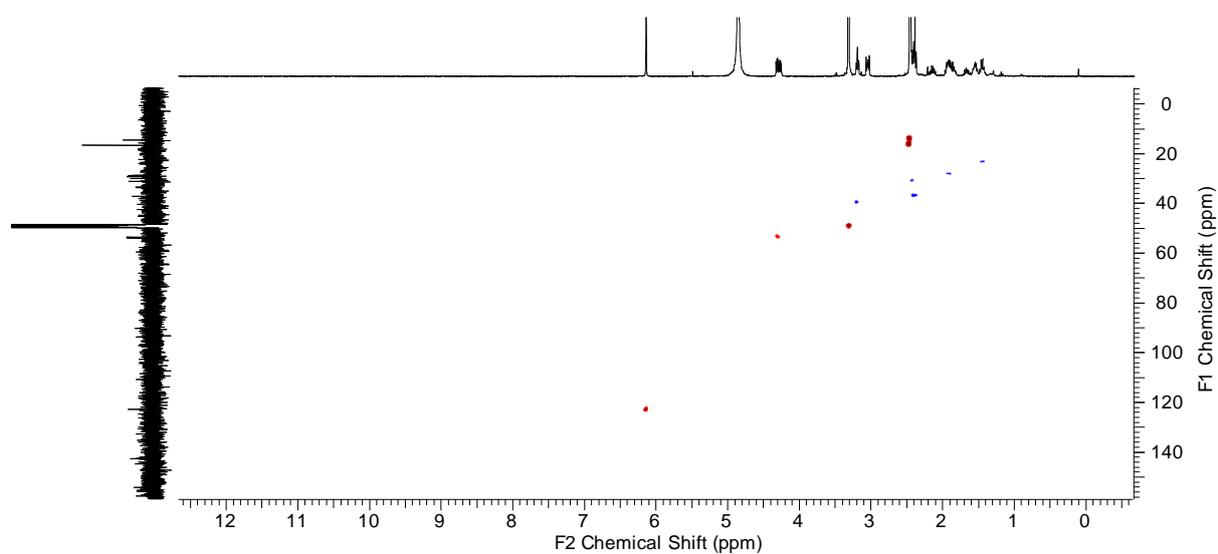


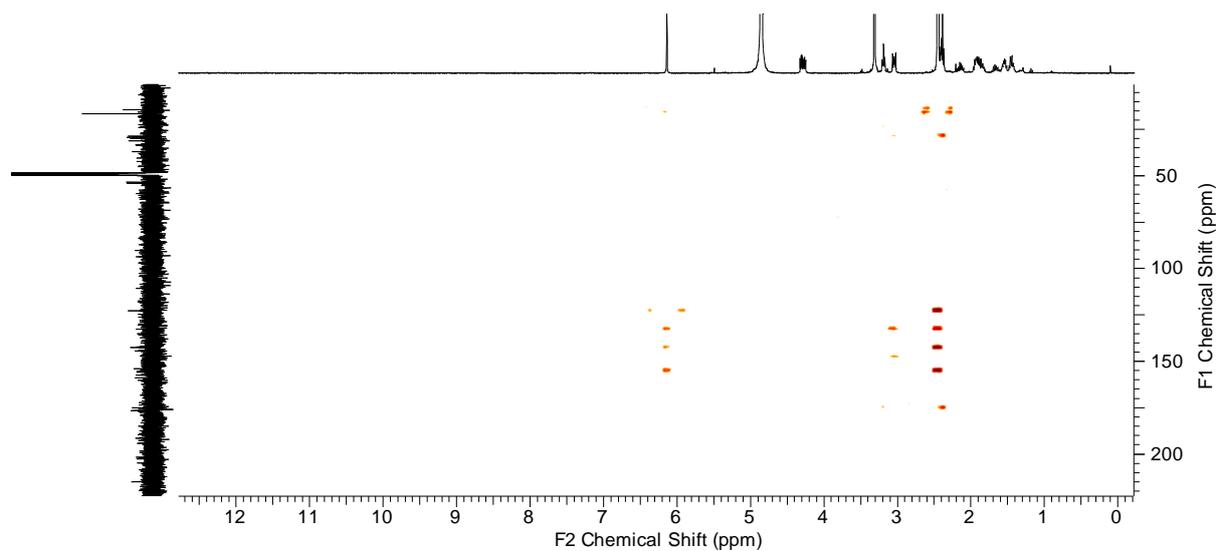
Abbildung 72  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum 5.



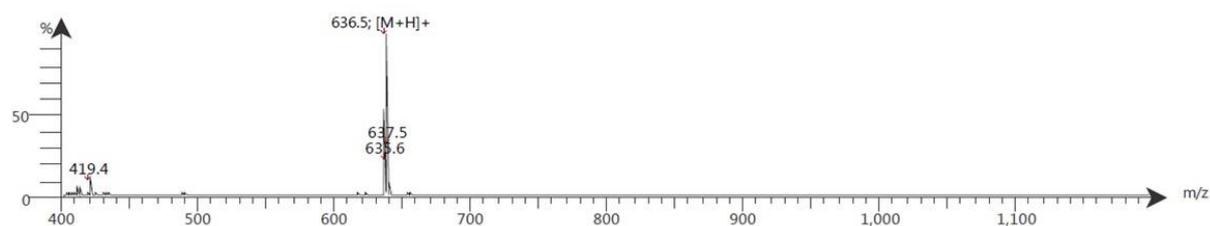
**Abbildung 73** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum 5.



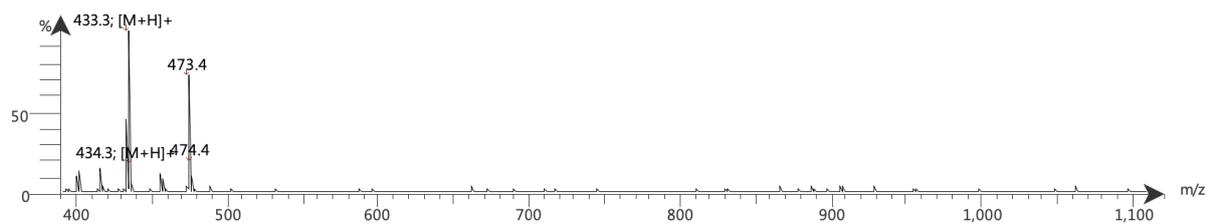
**Abbildung 74** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum 5.



**Abbildung 75** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum **5**.



**Abbildung 76** LR-ESI (+) – Spektrum **5**.



**Abbildung 77** LR-ESI (+) – Spektrum Glu-CO-Lys-Ahx **2**.

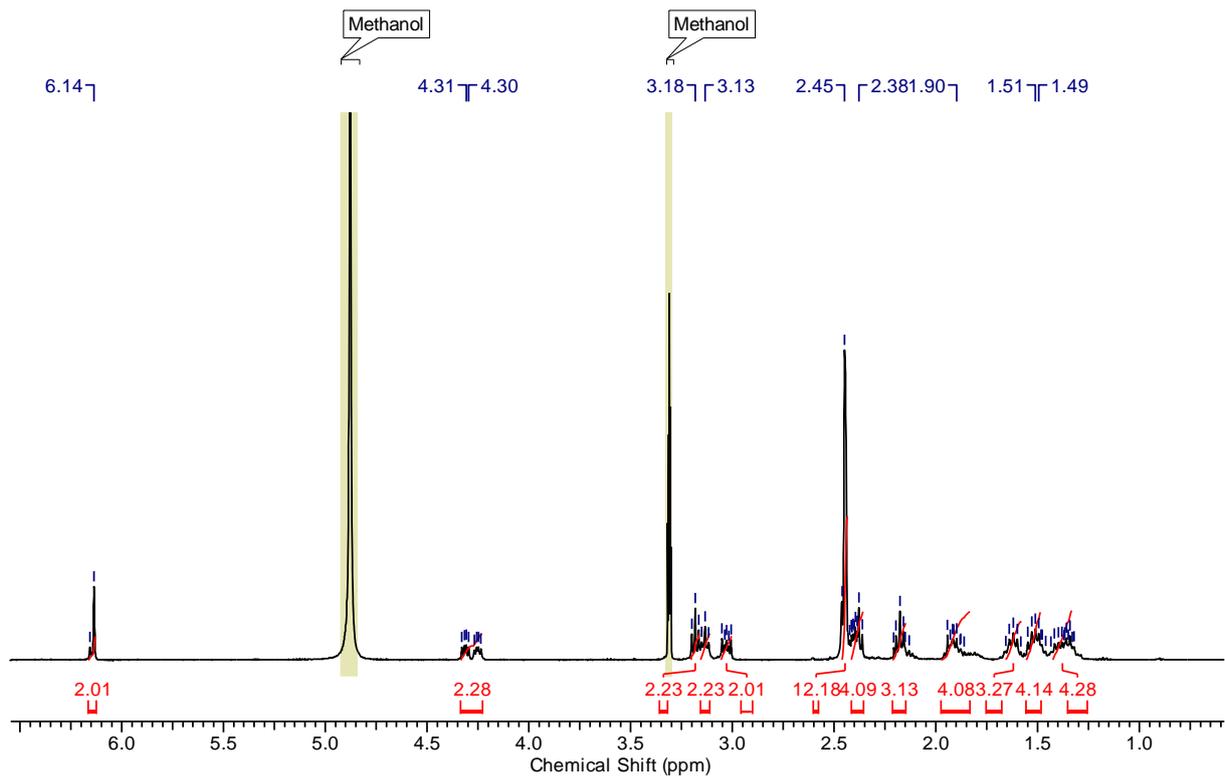


Abbildung 78  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum 6.

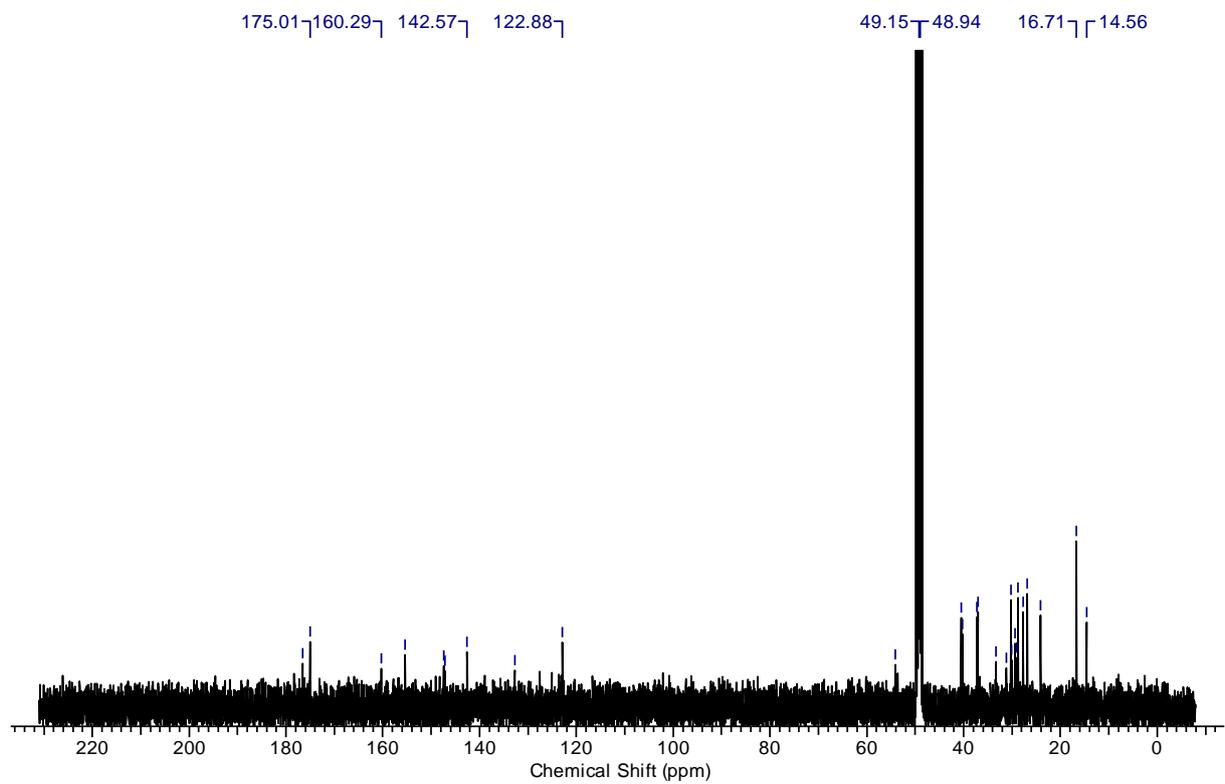


Abbildung 79  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum 6.

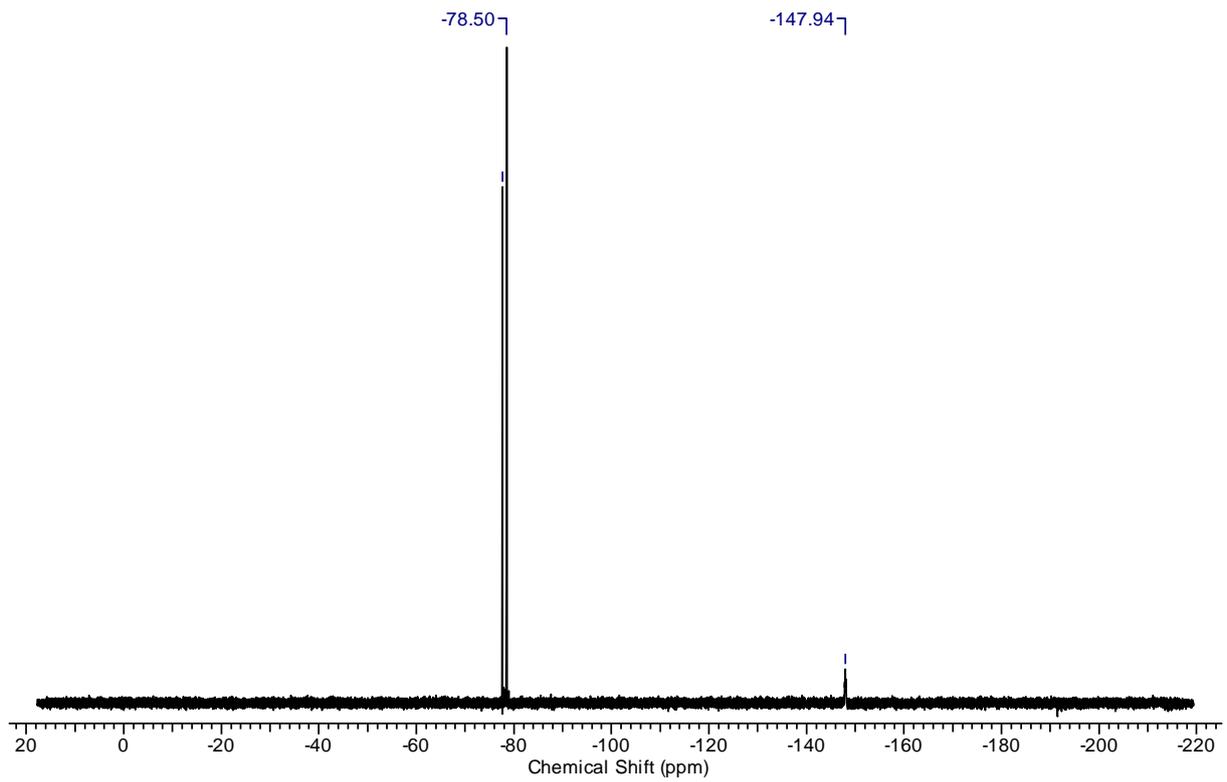


Abbildung 80  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum 6.

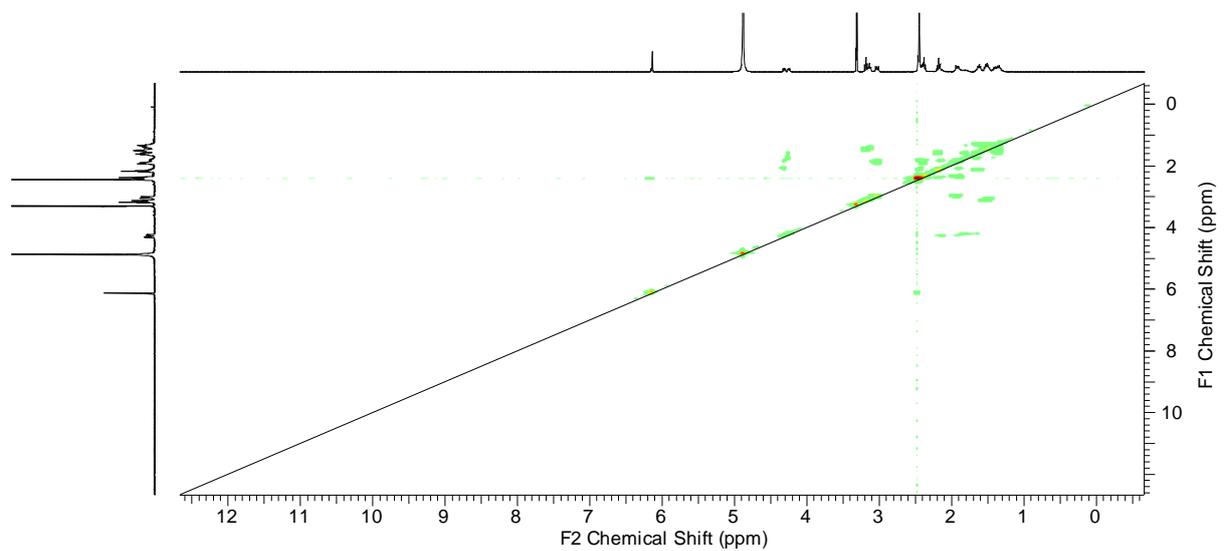
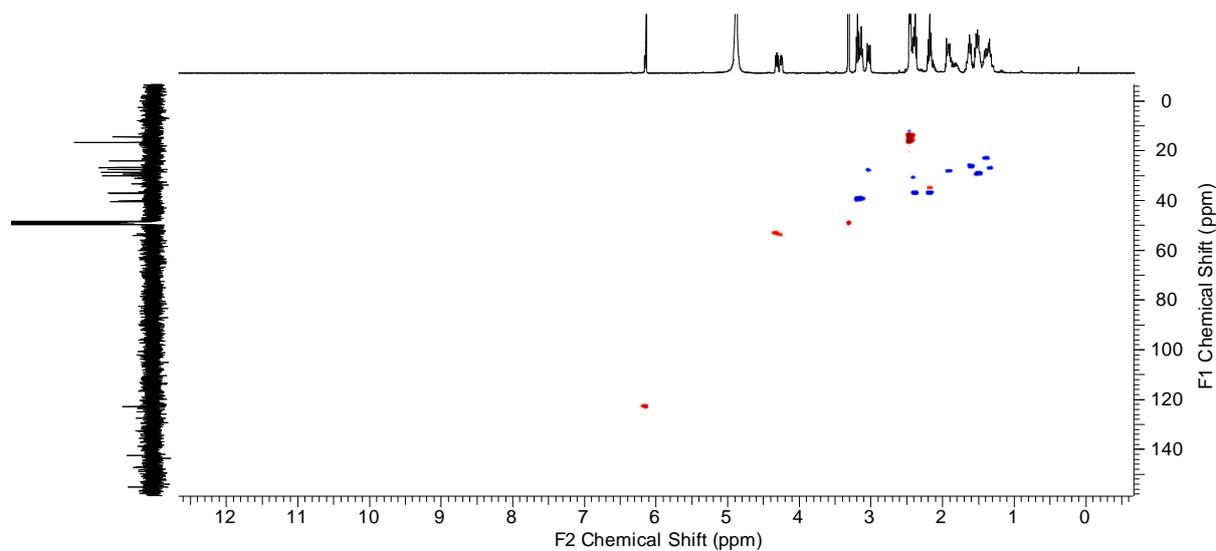
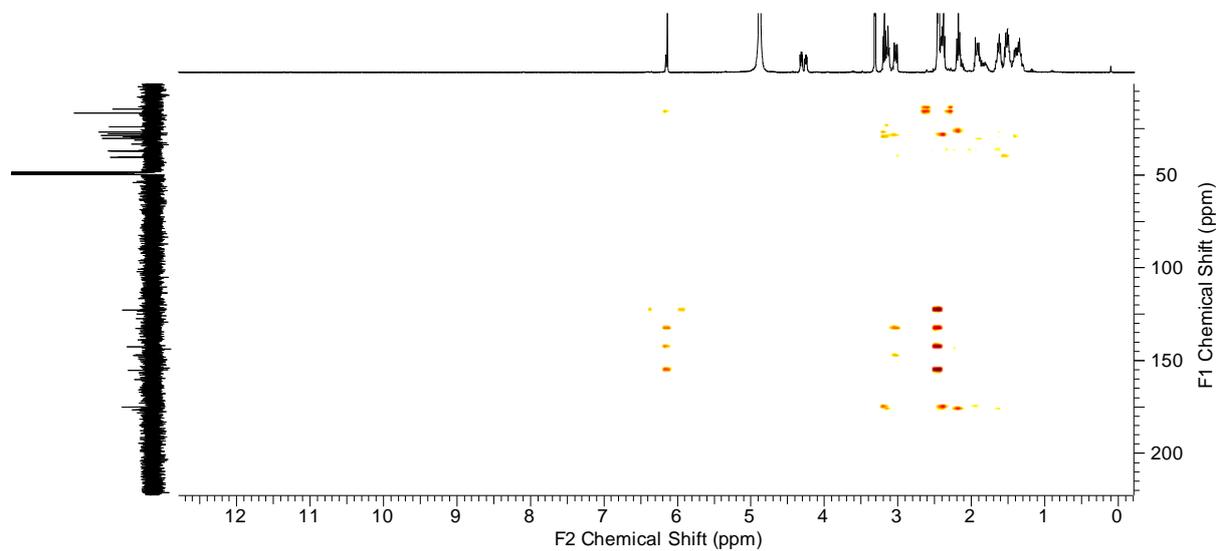


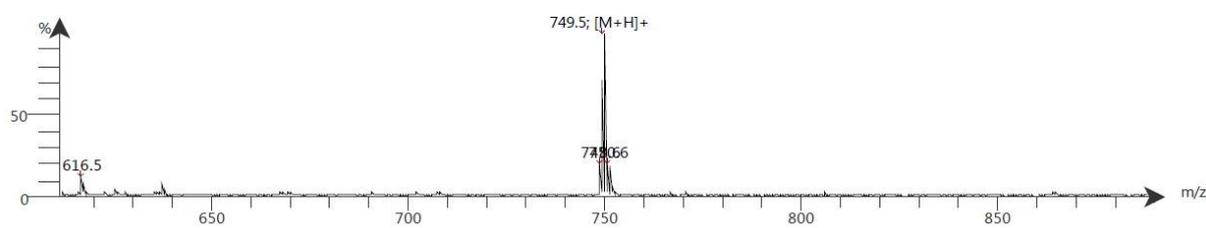
Abbildung 81 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum 6.



**Abbildung 82** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum **6**.



**Abbildung 83** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum **6**.



**Abbildung 84** LR-ESI (+) – Spektrum **6**.

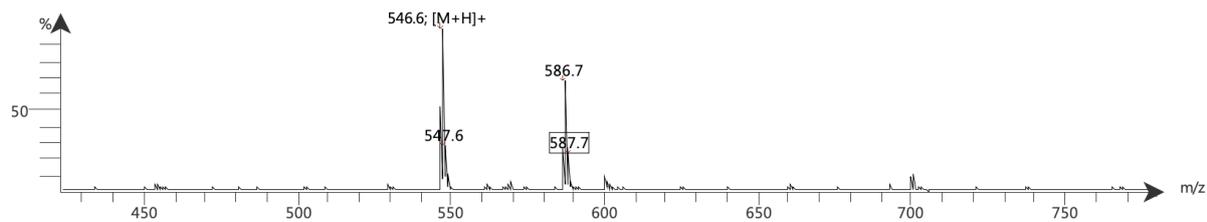


Abbildung 85 LR-ESI (+) – Spektrum Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx 3.

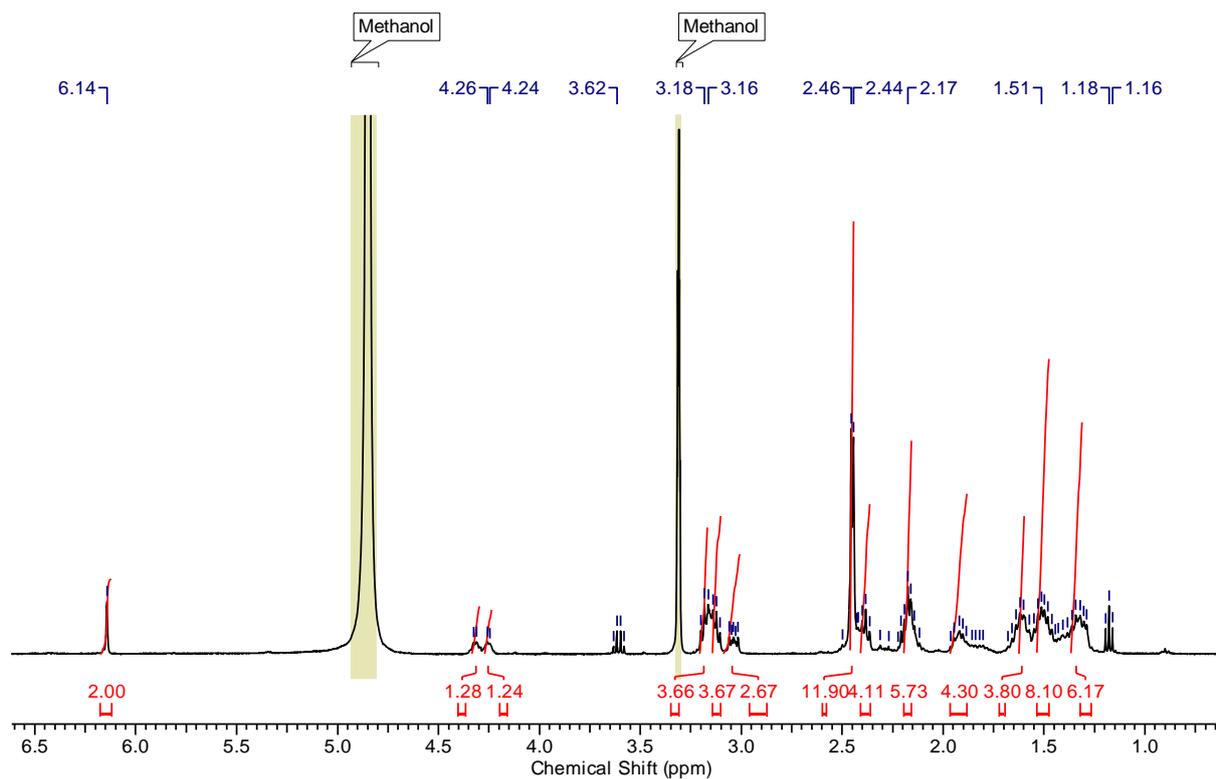


Abbildung 86 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum 7.

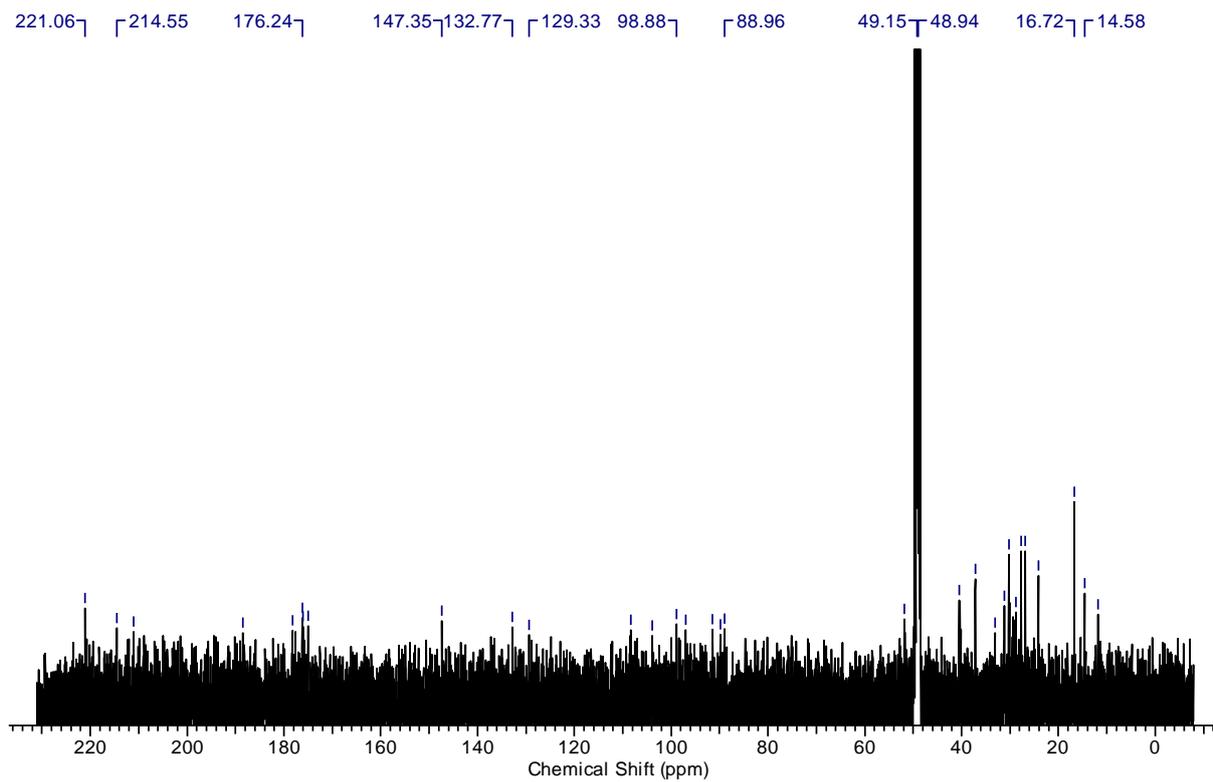


Abbildung 87  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum 7.

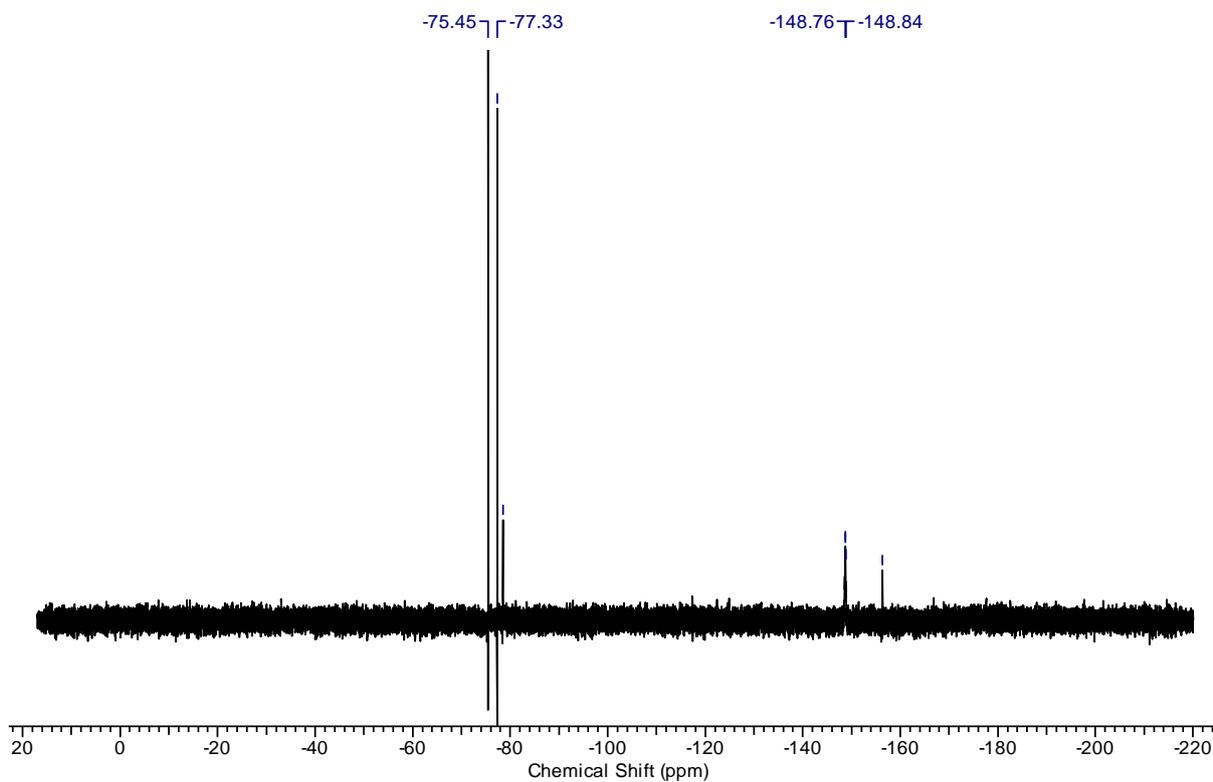
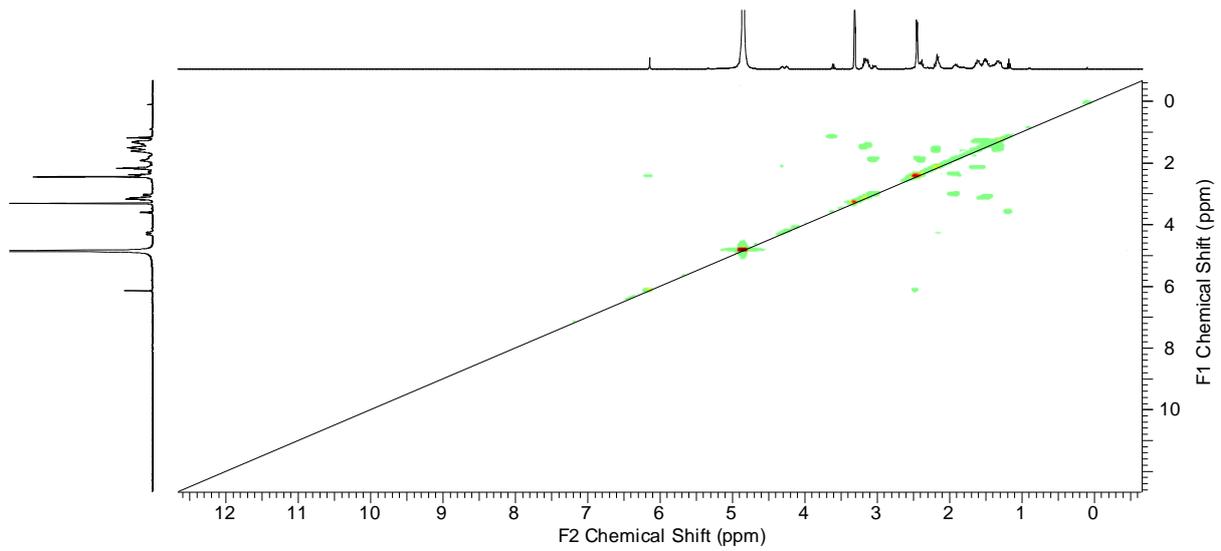
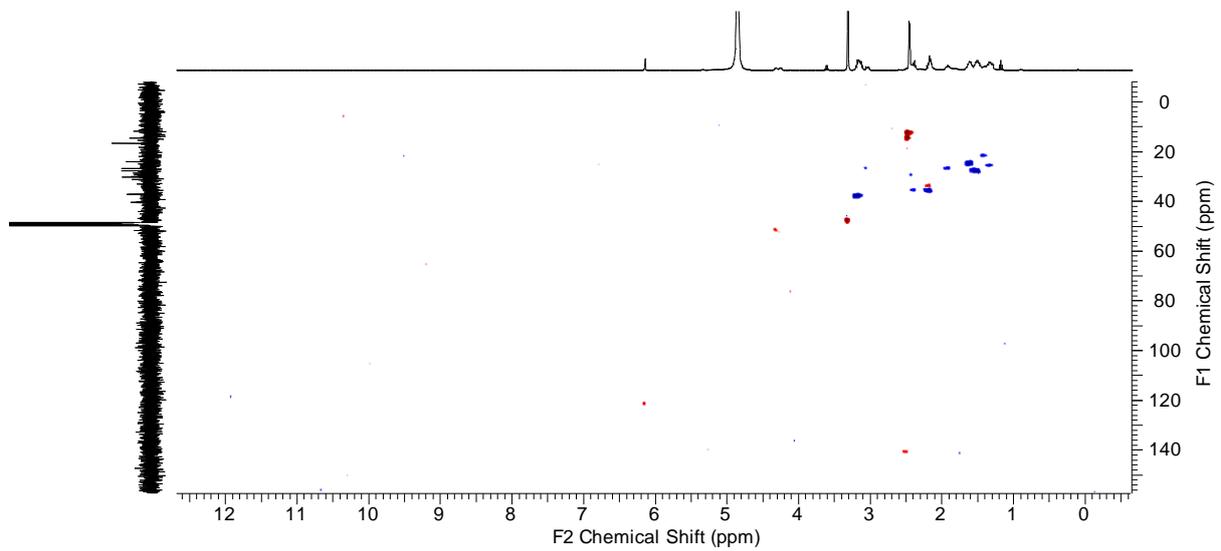


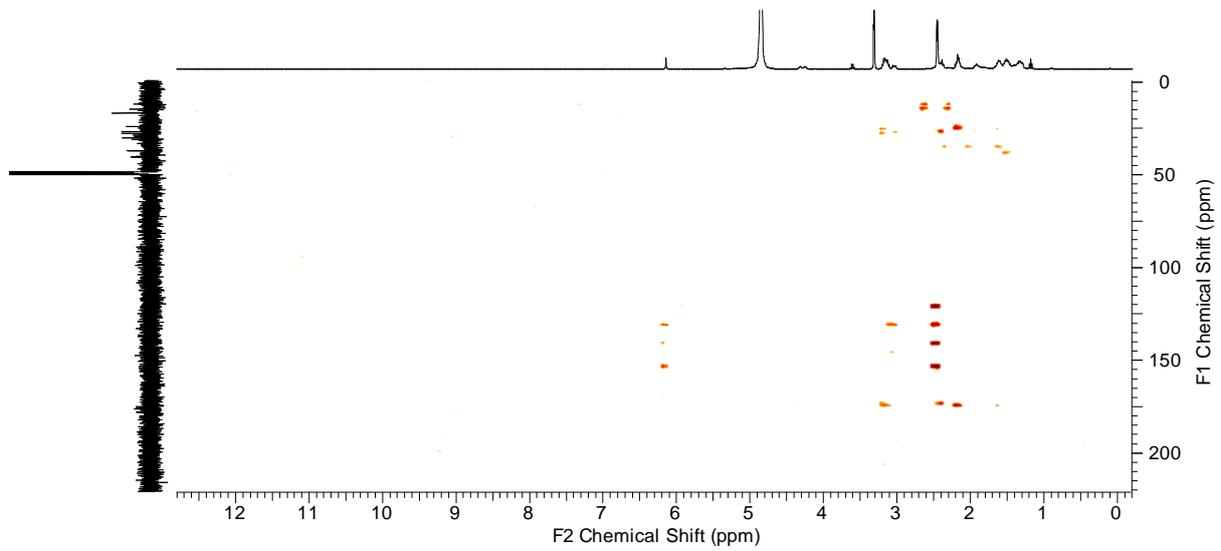
Abbildung 88  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum 7.



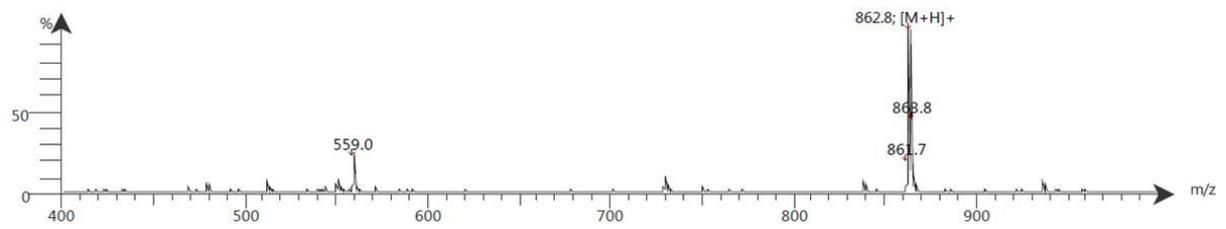
**Abbildung 89** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum **7**.



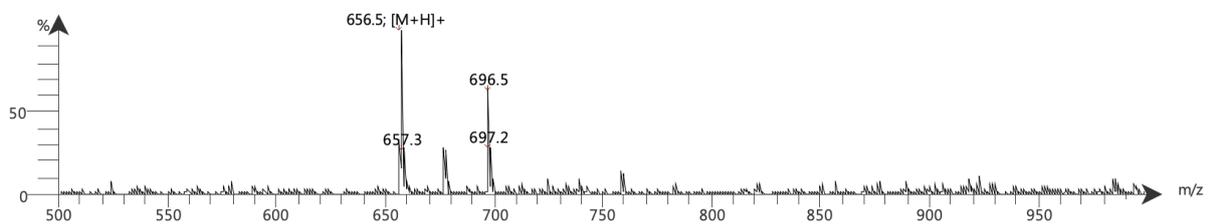
**Abbildung 90** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum **7**.



**Abbildung 91** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum **7**.



**Abbildung 92** LR-ESI (+) – Spektrum **7**.



**Abbildung 93** LR-ESI (+) – Spektrum Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc **4**.

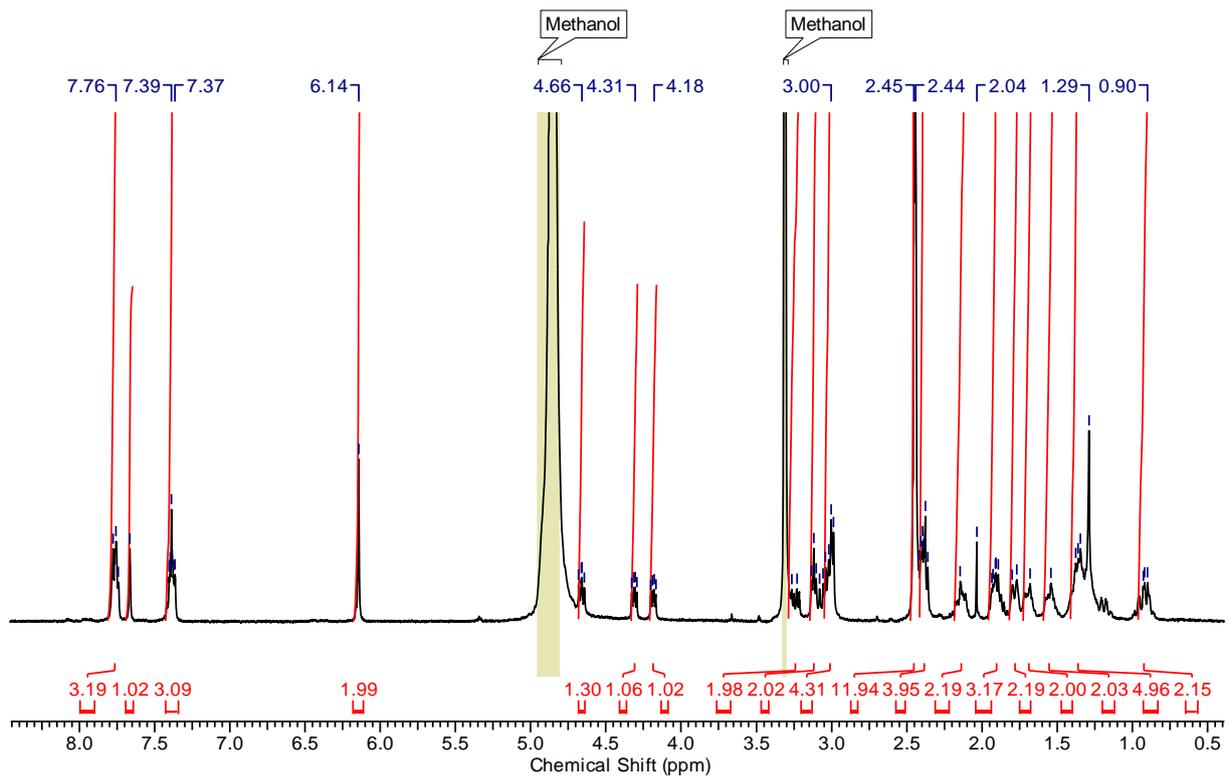


Abbildung 94  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum 8.

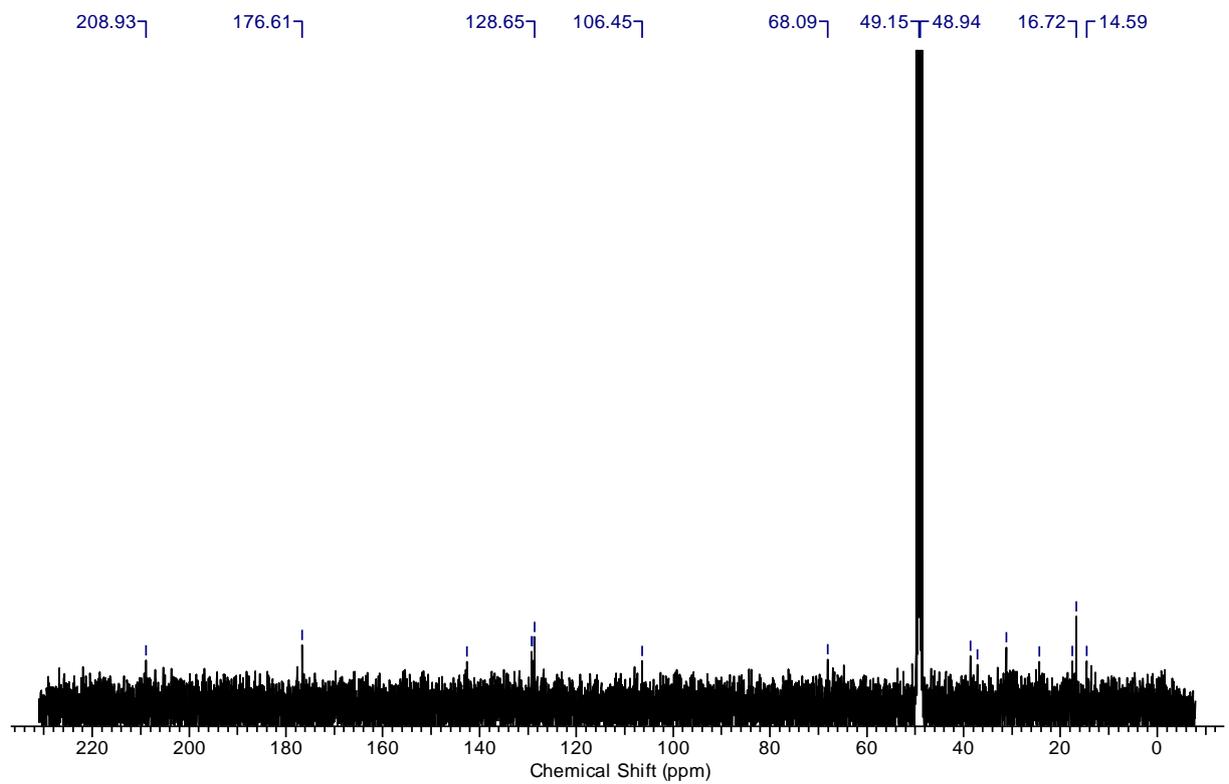


Abbildung 95  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum 8.

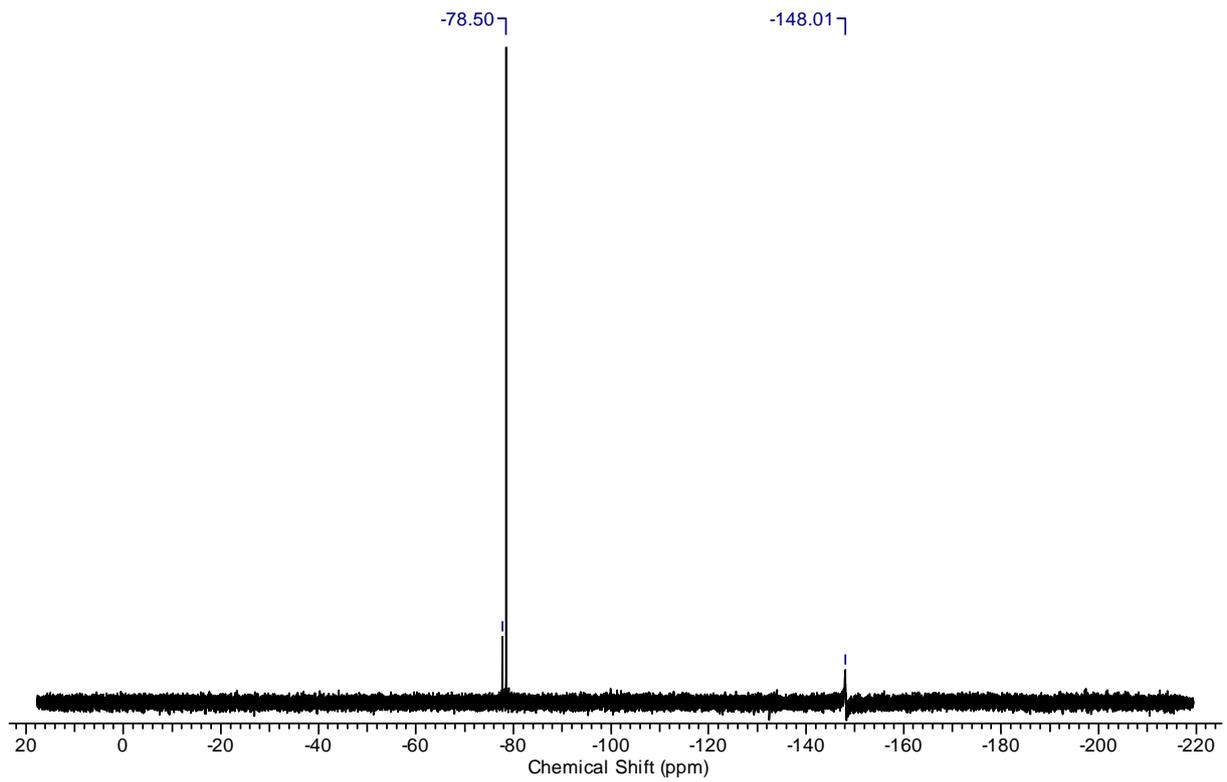


Abbildung 96  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum 8.

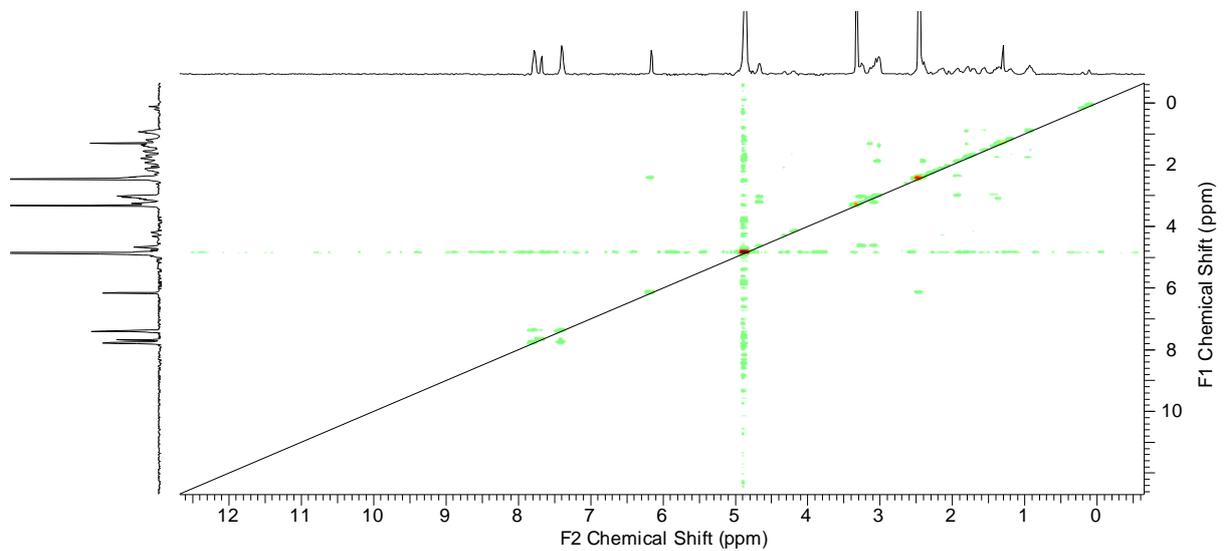
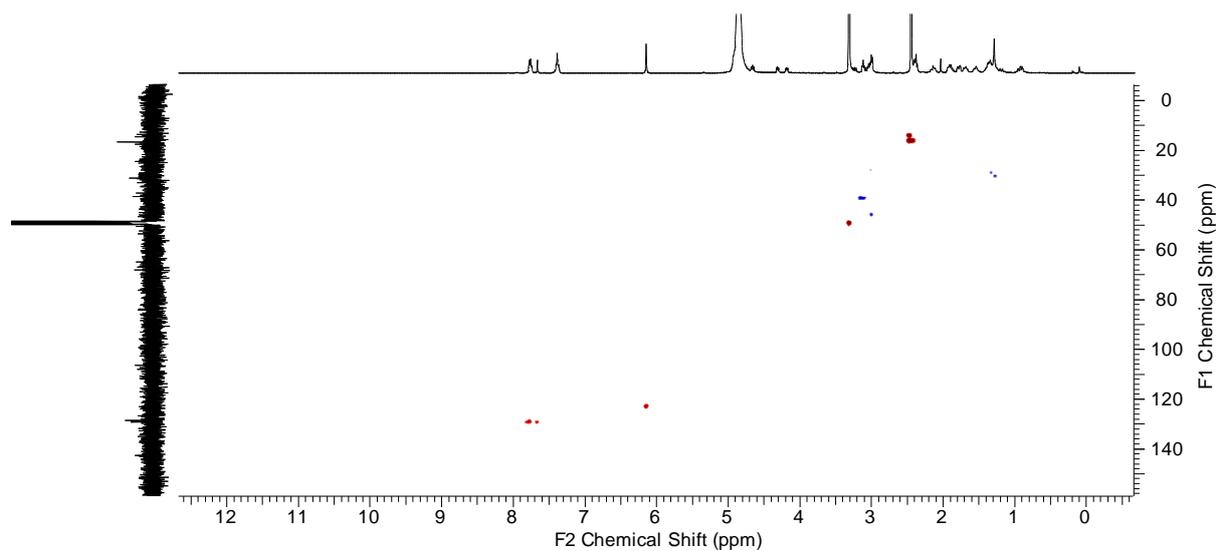
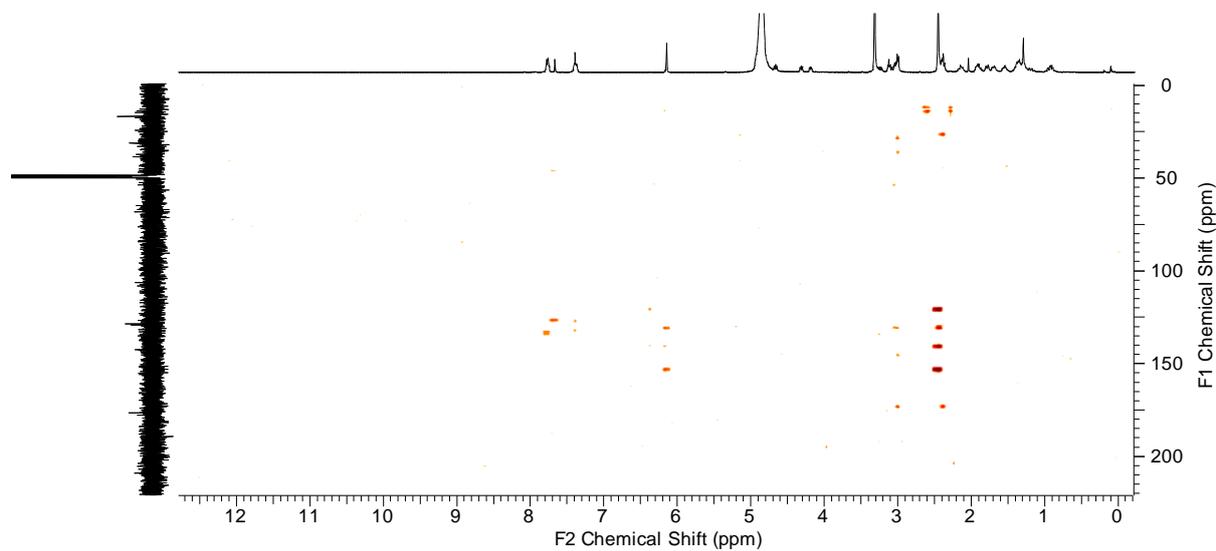


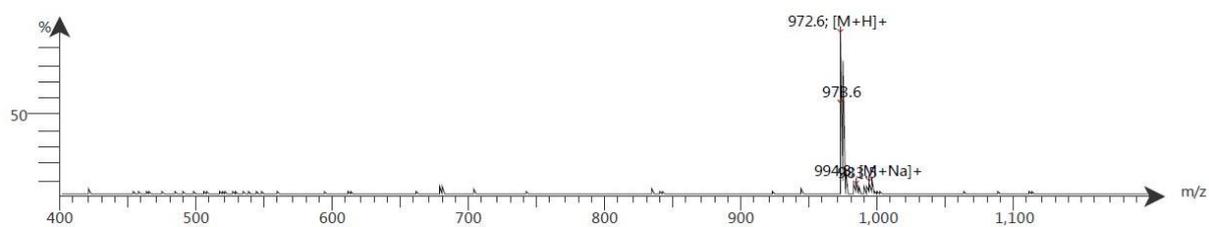
Abbildung 97 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum 8.



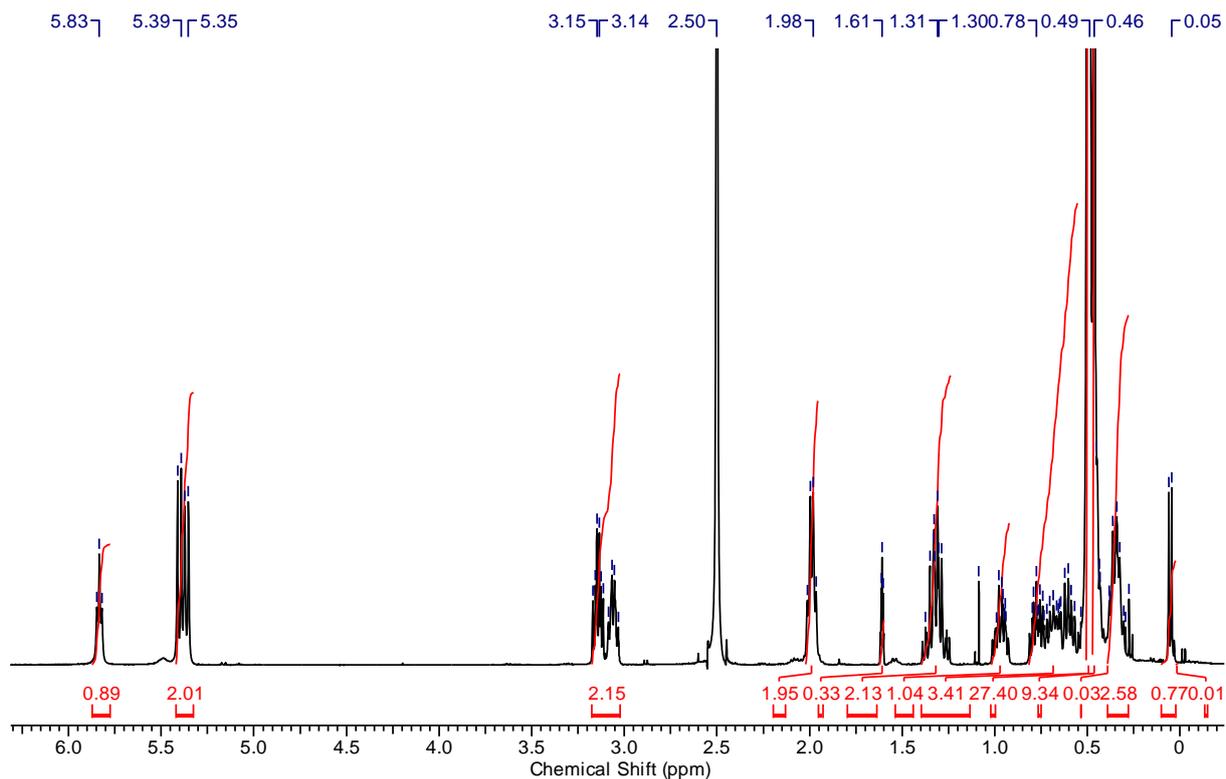
**Abbildung 98** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum **8**.



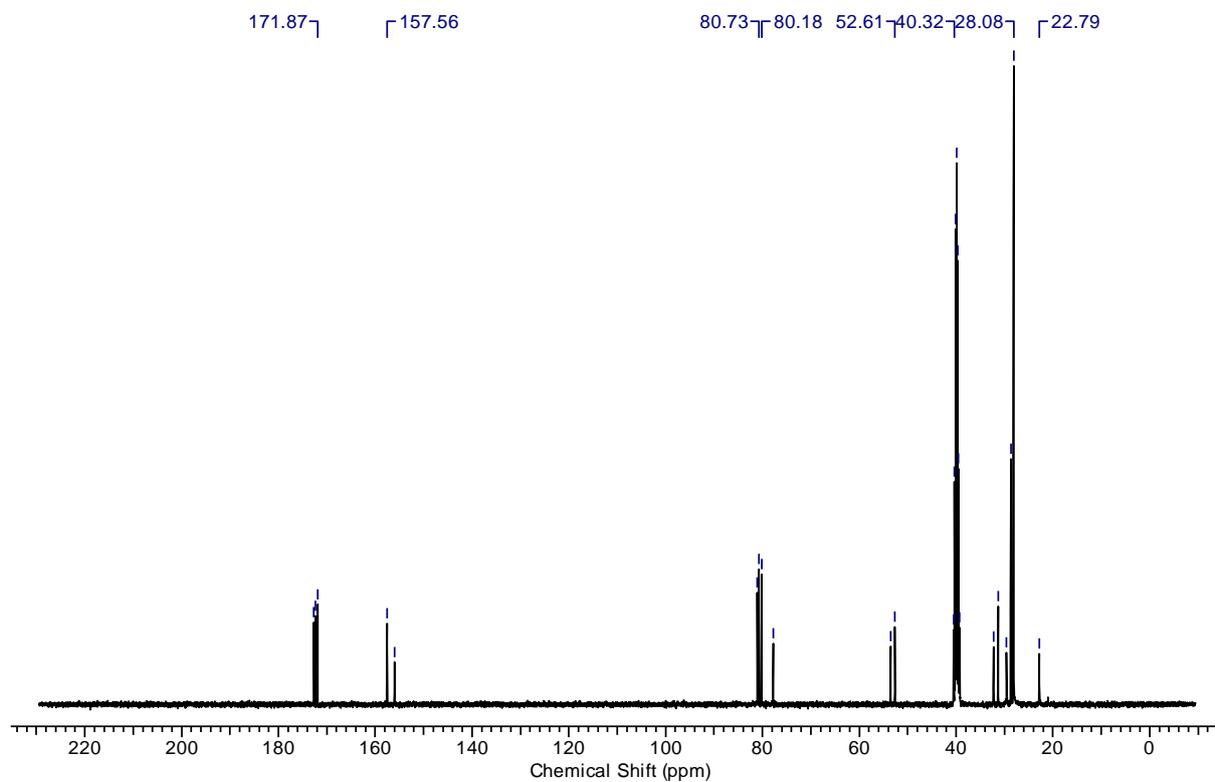
**Abbildung 99** 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum **8**.



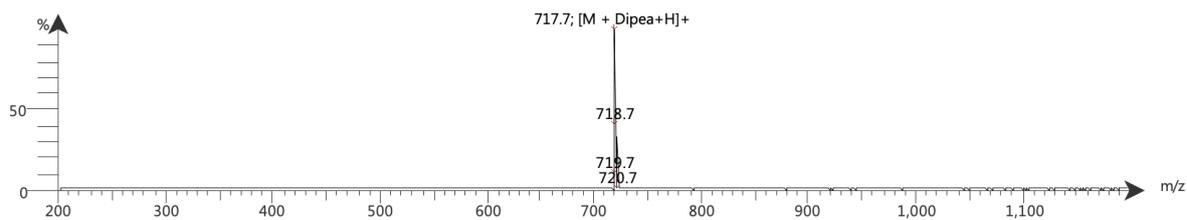
**Abbildung 100** LR-ESI (+) – Spektrum **8**.



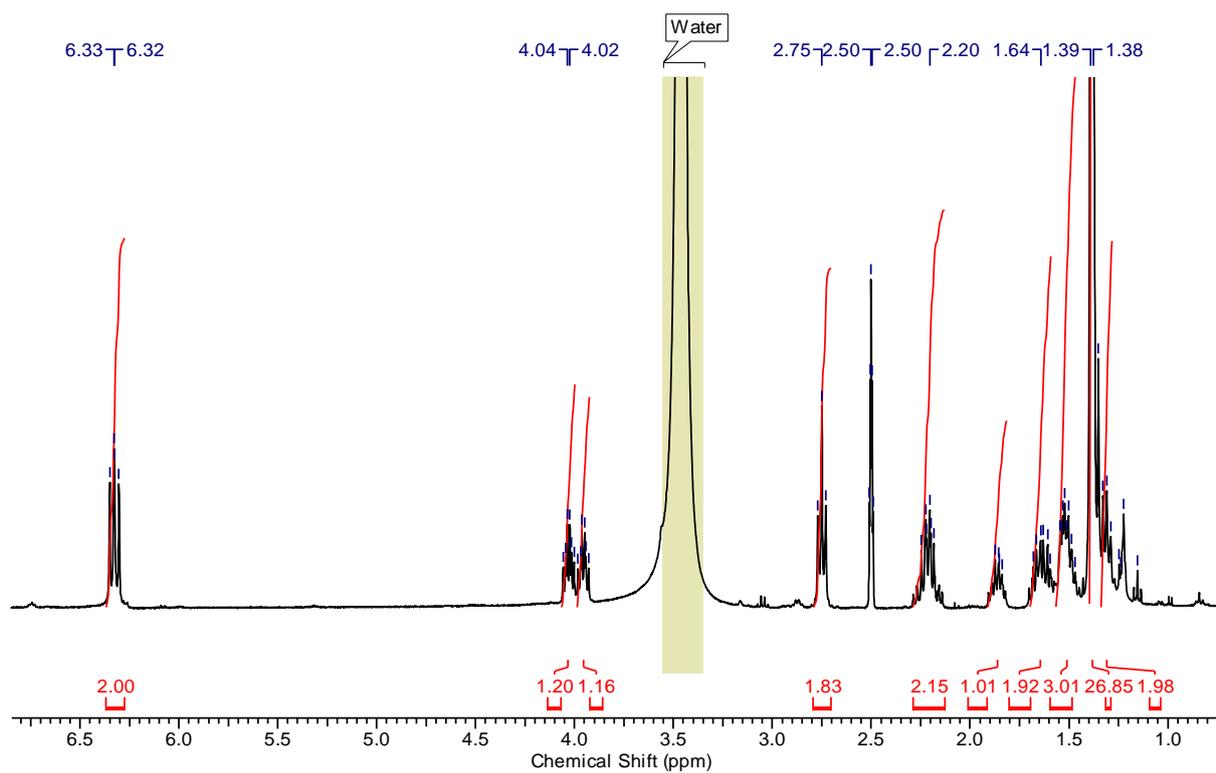
**Abbildung 101** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys(O<sup>t</sup>Bu)-ε-NHBOC 9.



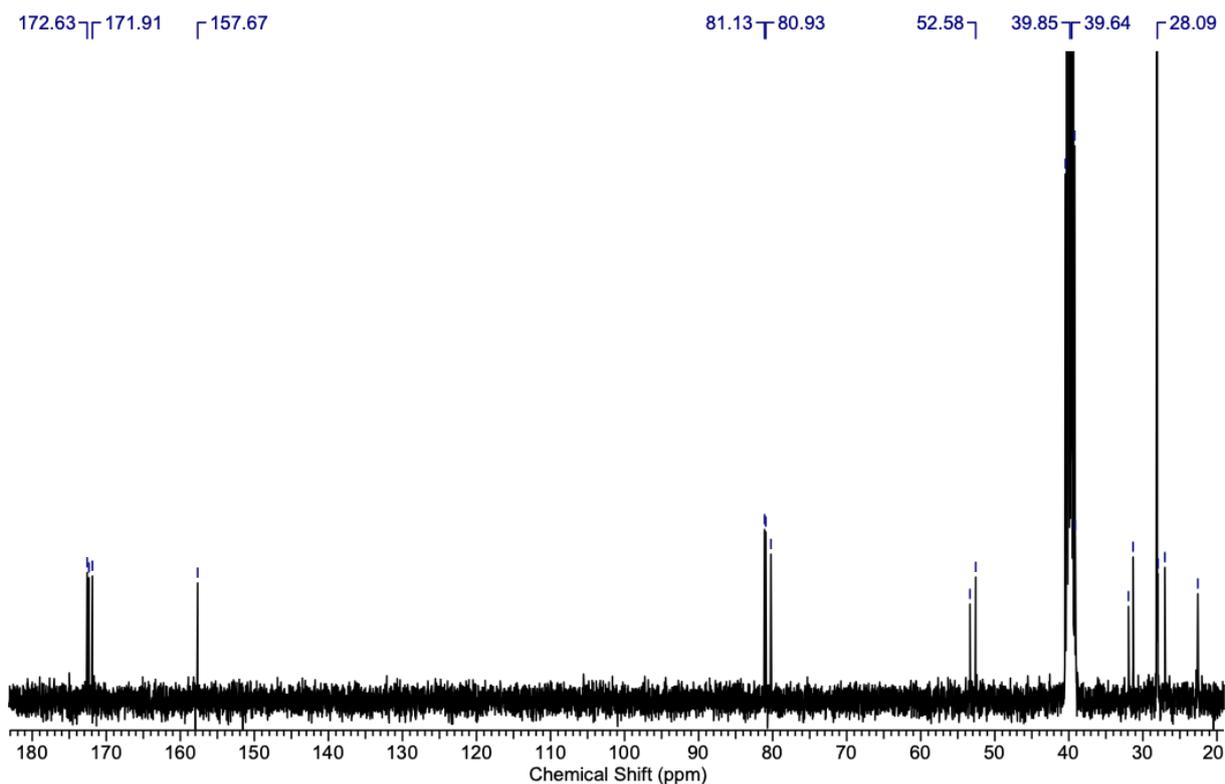
**Abbildung 102** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum Glu(O<sup>t</sup>Bu)<sub>2</sub>-CO-Lys(O<sup>t</sup>Bu)-ε-NHBOC 9.



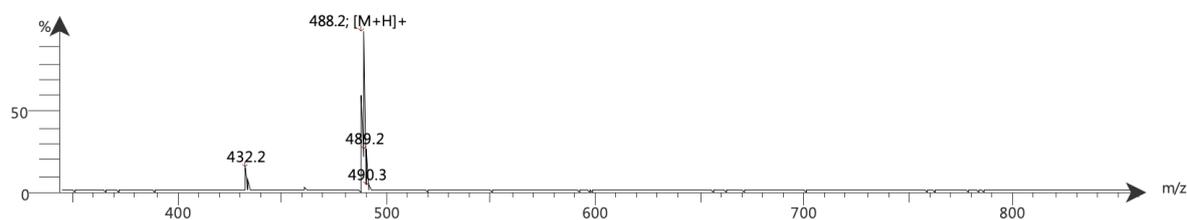
**Abbildung 103** LR-ESI (+) – Spektrum  $\text{Glu}(\text{O}^t\text{Bu})_2\text{-CO-Lys}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-}\epsilon\text{-NHBOC-DIPEA-Addukt 9}^*$  DIPEA.



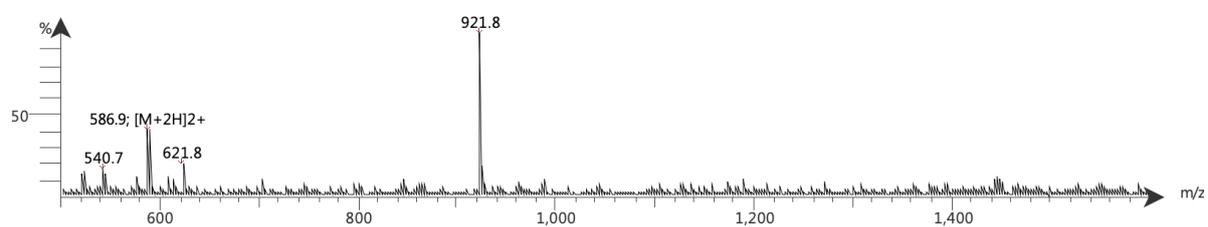
**Abbildung 104**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum  $\text{Glu}(\text{O}^t\text{Bu})_2\text{-CO-Lys}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-}\epsilon\text{-NH}_2$  **10**.



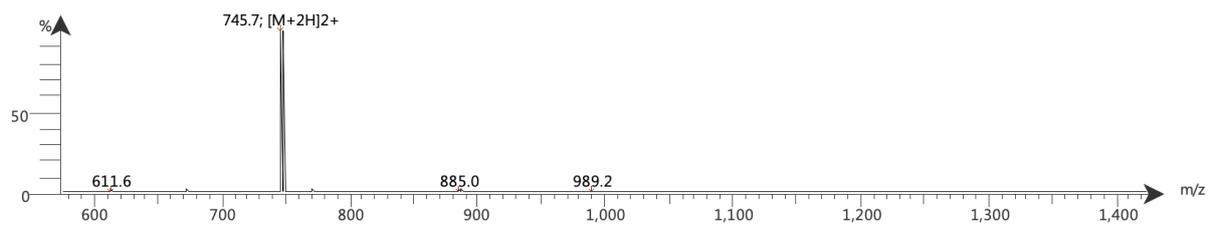
**Abbildung 105**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum  $\text{Glu}(\text{O}^t\text{Bu})_2\text{-CO-Lys}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-}\epsilon\text{-NH}_2$  **10**.



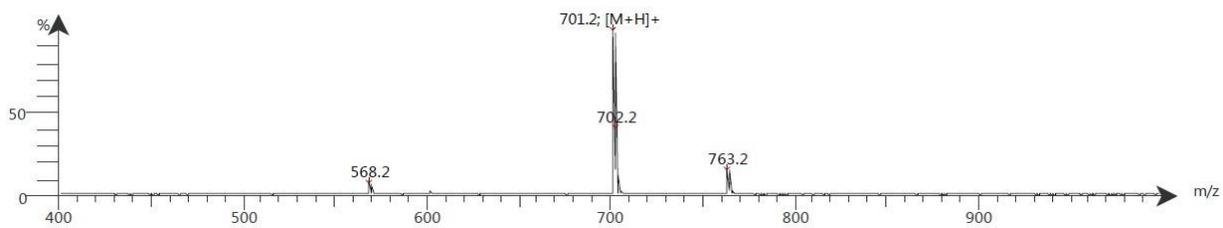
**Abbildung 106** LR-ESI (+) – Spektrum  $\text{Glu}(\text{O}^t\text{Bu})_2\text{-CO-Lys}(\text{O}^t\text{Bu})\text{-}\epsilon\text{-NH}_2$  **10**.



**Abbildung 107** LR-ESI (+) – Spektrum  $\text{Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA}$  **11**.



**Abbildung 108** LR-ESI (+) – Spektrum **12**.



**Abbildung 109** LR-ESI (+) – Spektrum **13**.

## 7.1.2 Spektroskopische Charakterisierung Bischelator PSMA-Liganden und der (heterodinuklearen) Metallkomplexe

### 7.1.2.1 Spektroskopische Charakterisierung 16

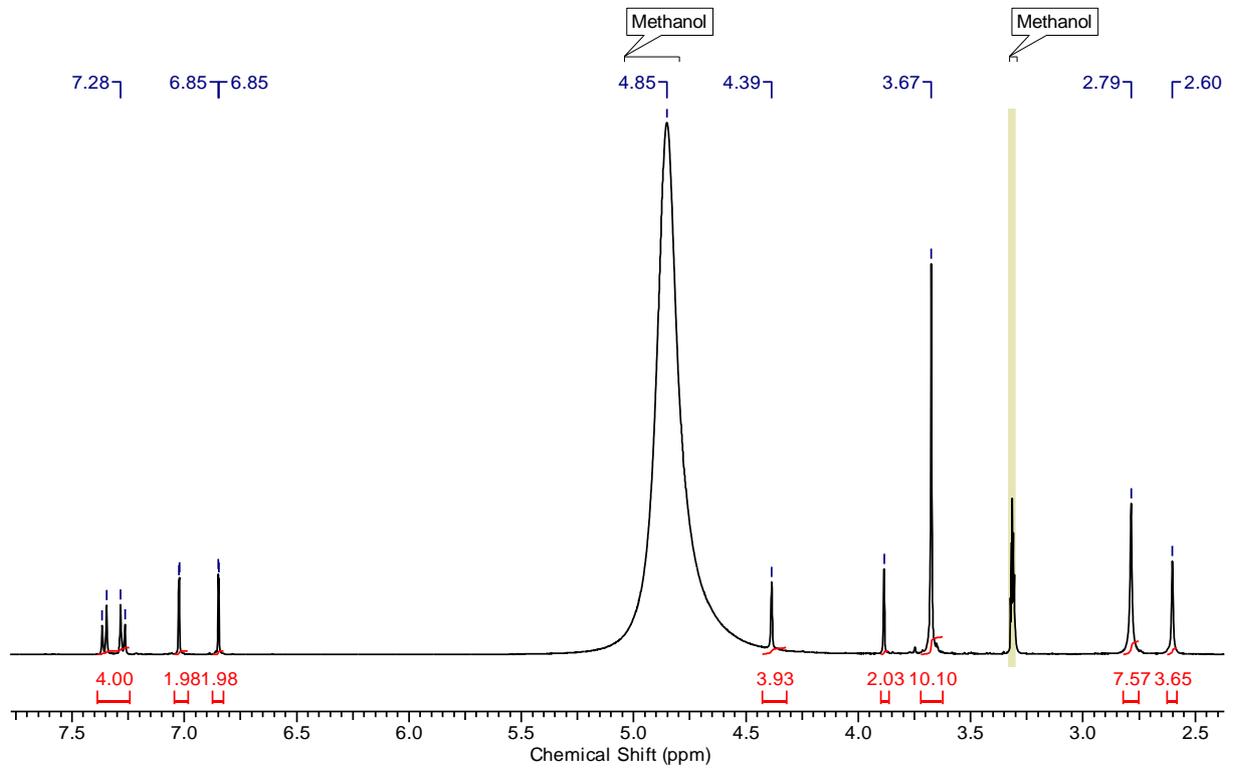
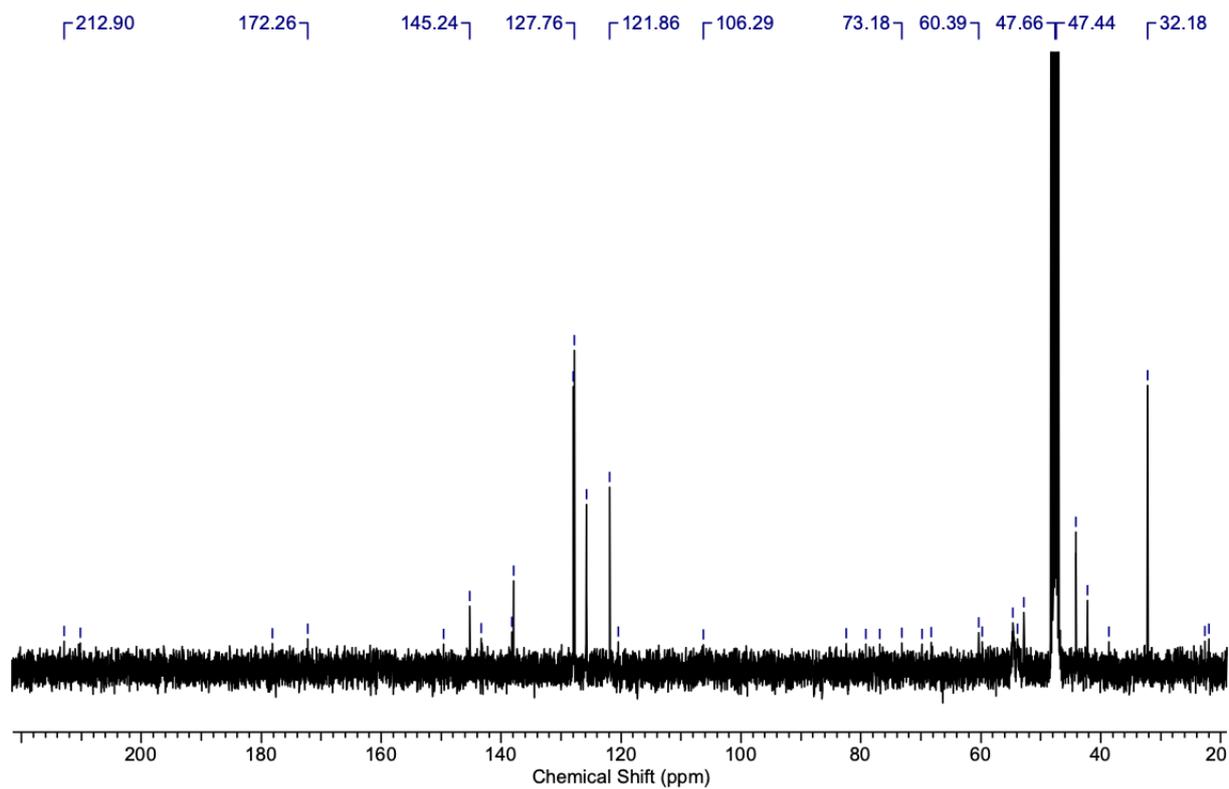
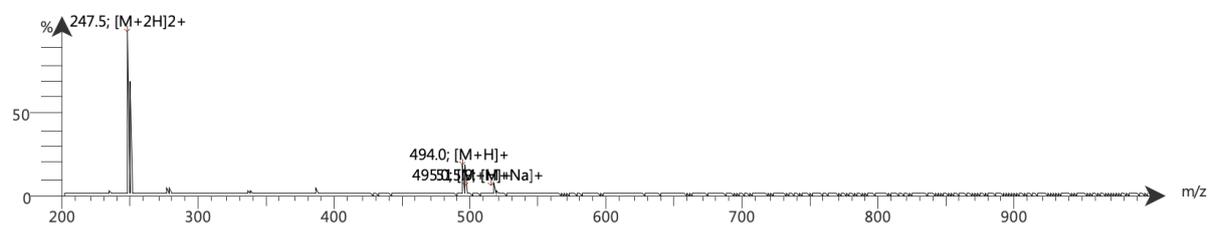


Abbildung 110  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum 15.



**Abbildung 111**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum **15**.



**Abbildung 112** LR-ESI (+) – Spektrum **15**.

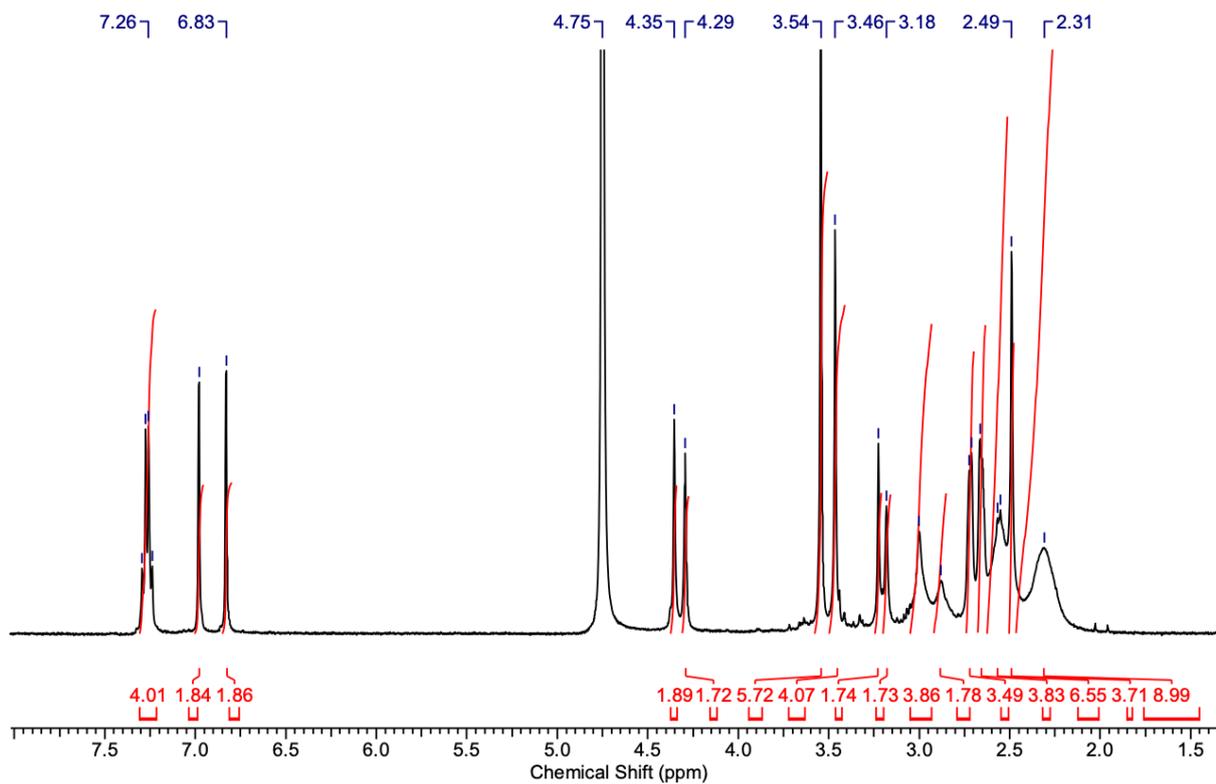


Abbildung 113  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum 16.

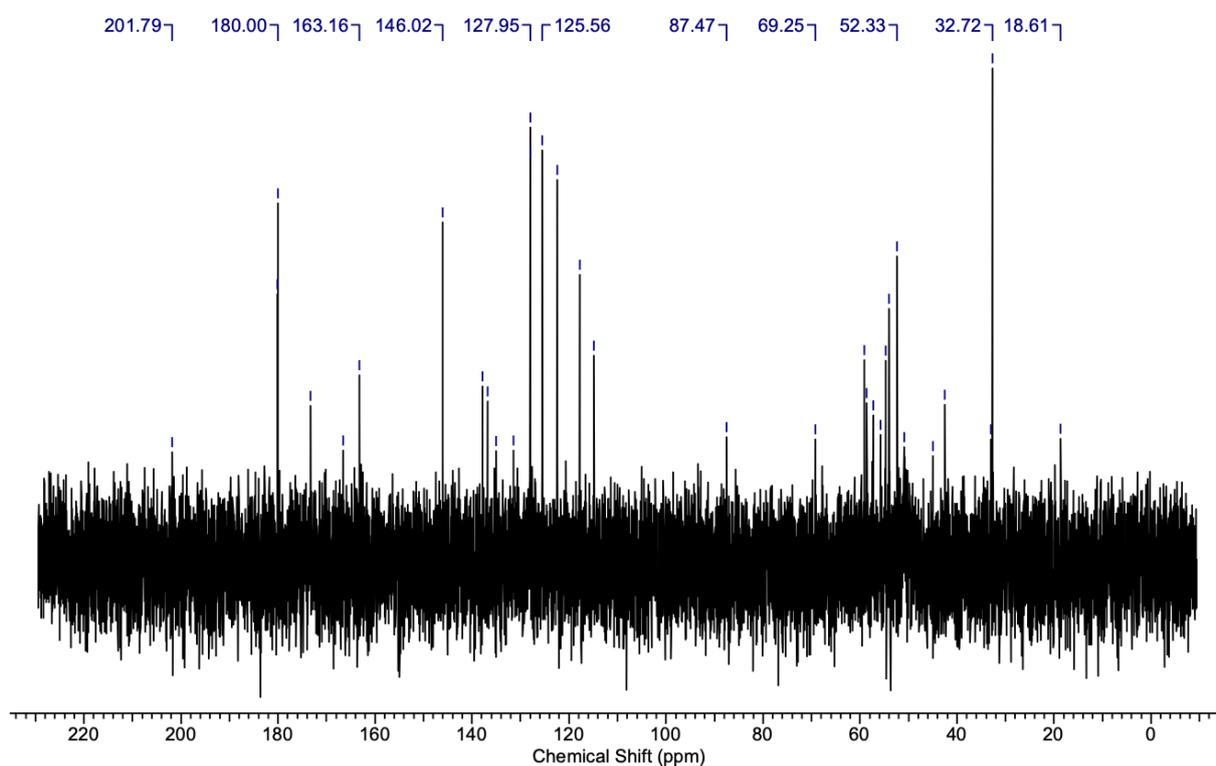
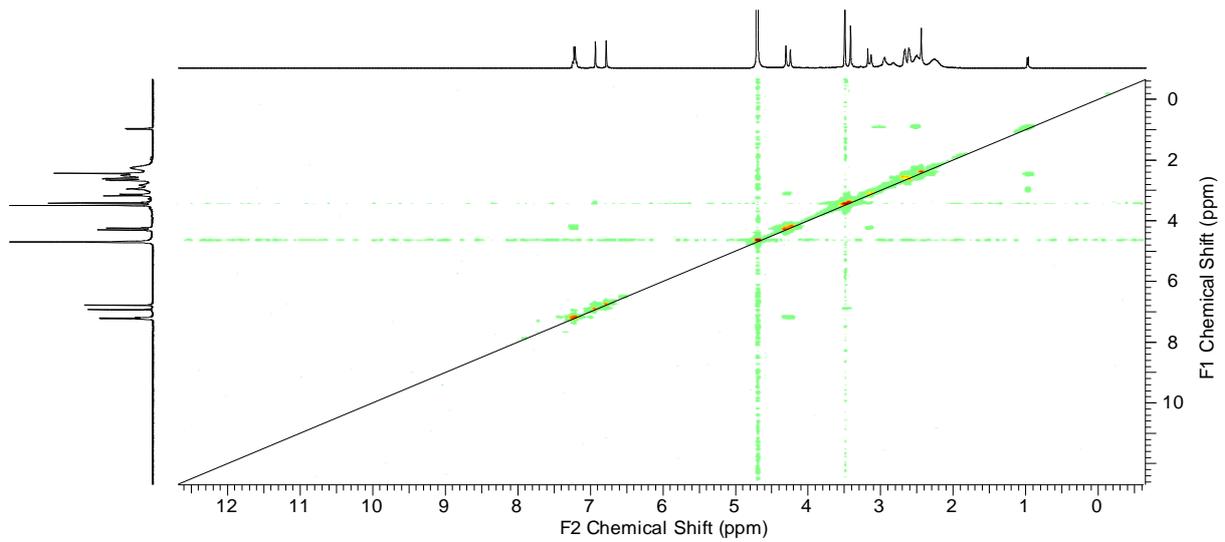
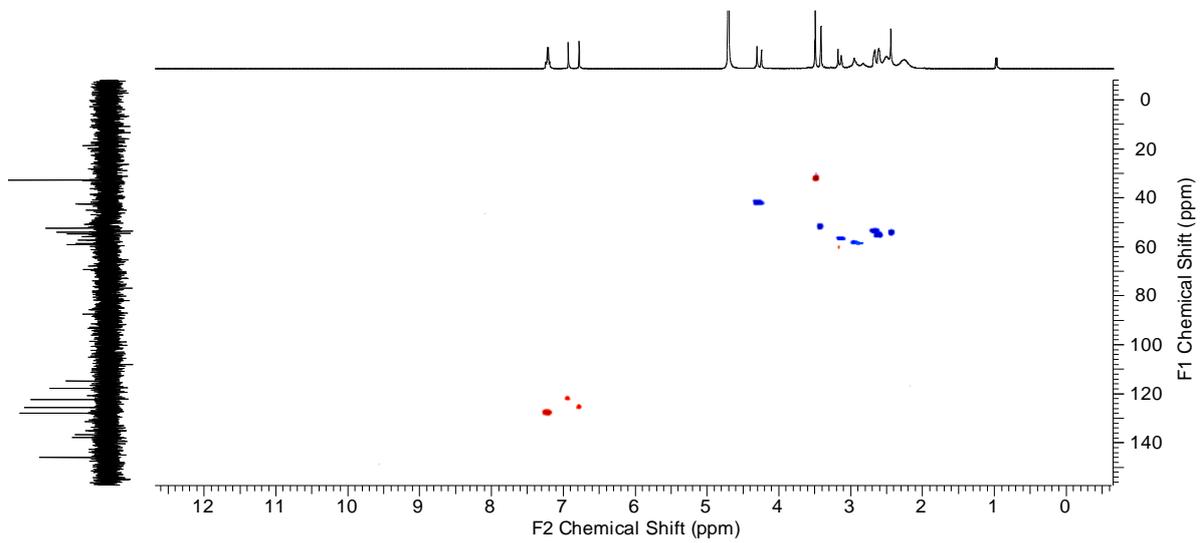


Abbildung 114  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum 16.



**Abbildung 115** 2D NMR Spektren NODIA-Me-Bz-DOTA. HH-COSY Spektrum **16**.



**Abbildung 116** 2D NMR Spektren NODIA-Me-Bz-DOTA. CH-COSY Spektrum **16**.

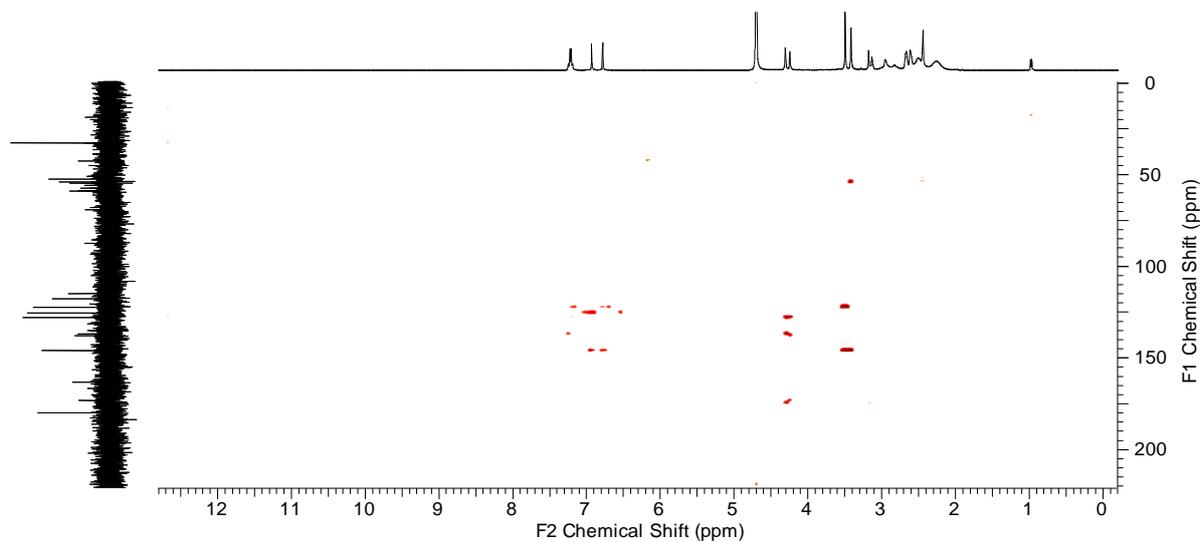


Abbildung 117 2D NMR Spektren NODIA-Me-Bz-DOTA. HMBC Spektrum **16**.

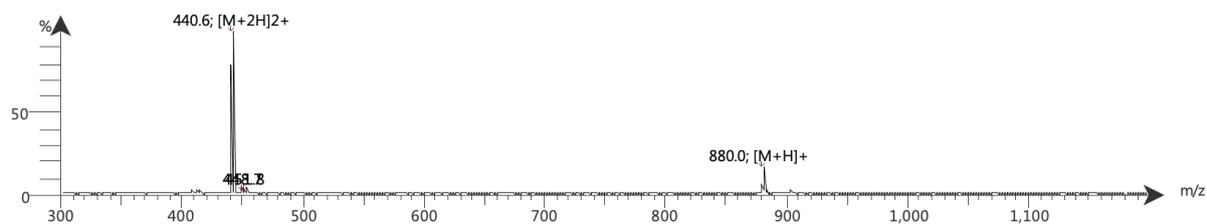


Abbildung 118 LR-ESI (+) – Spektrum **16**.

### 7.1.2.2 Spektroskopische Charakterisierung der Metallkomplexe vom Typ $[\text{Ln}(\text{NODIA-Me-Bz-DOTA})]$ und der heterodiknuklearen Metallkomplexe vom Typ $[\text{MLn}(\text{NODIA-Me-Bz-DOTA})]$

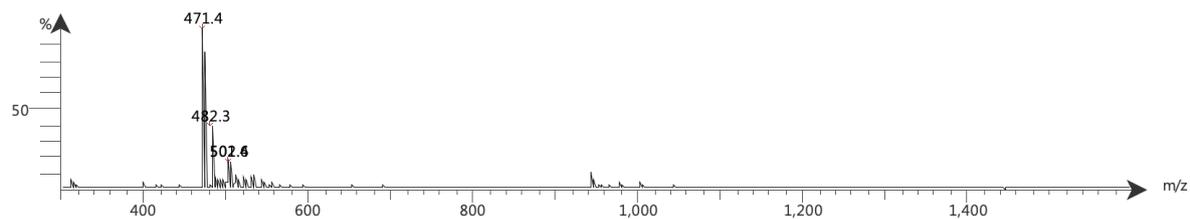


Abbildung 119 LR-ESI (+) – Spektrum **Cu16**.

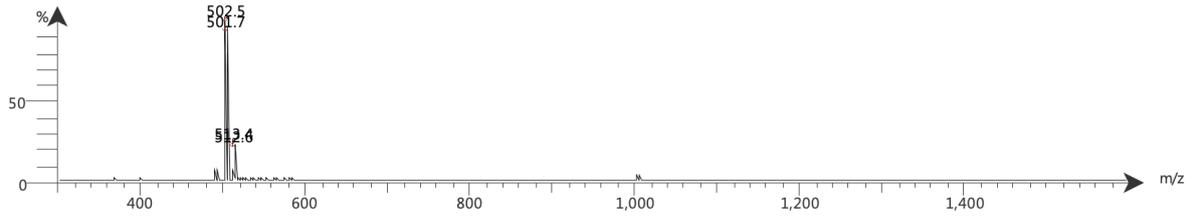


Abbildung 120 LR-ESI (+) – Spektrum Cu<sub>2</sub>16.

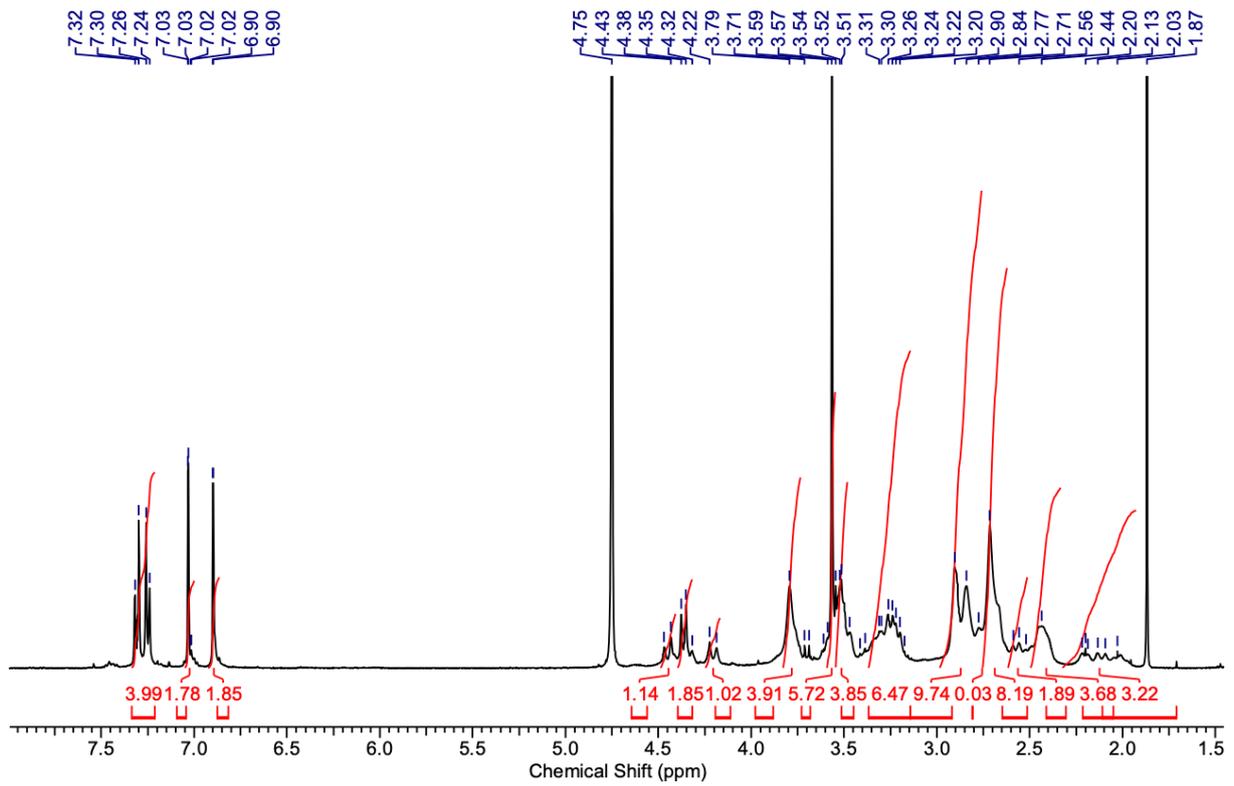


Abbildung 121 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum Lu16.

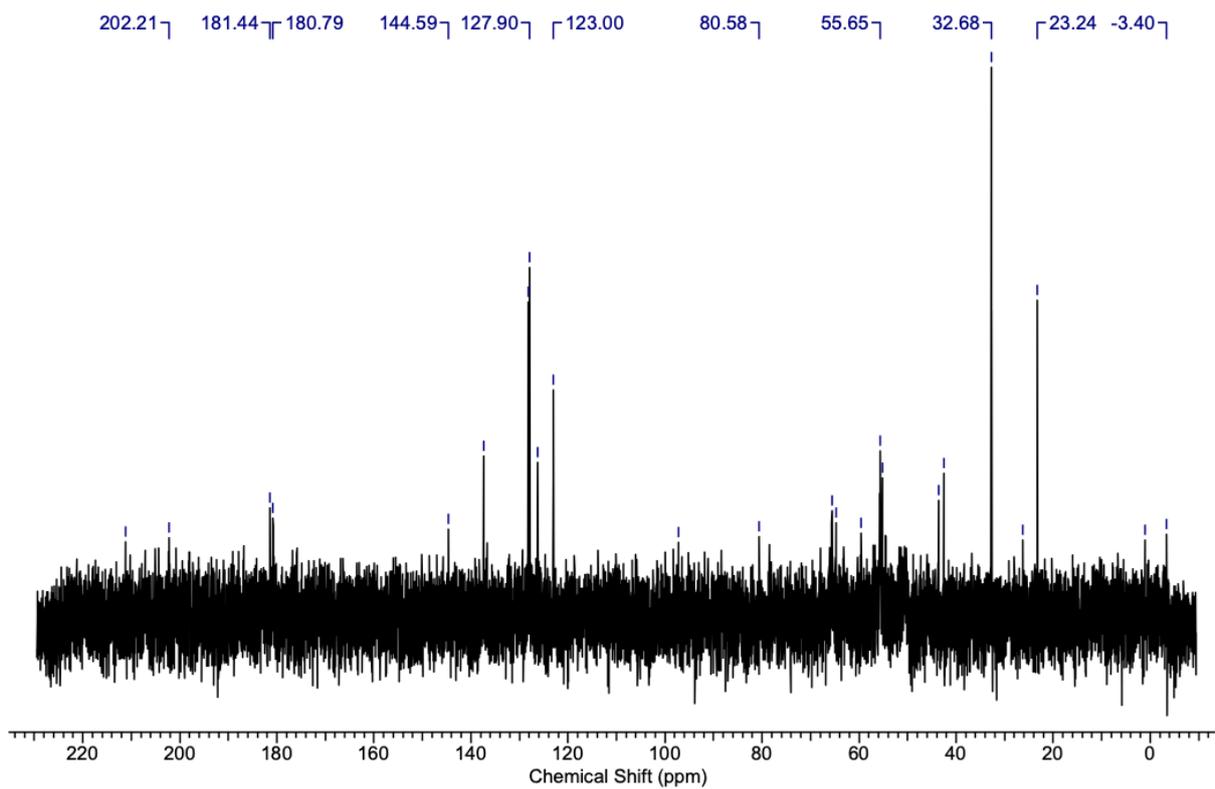


Abbildung 122  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum Lu16.

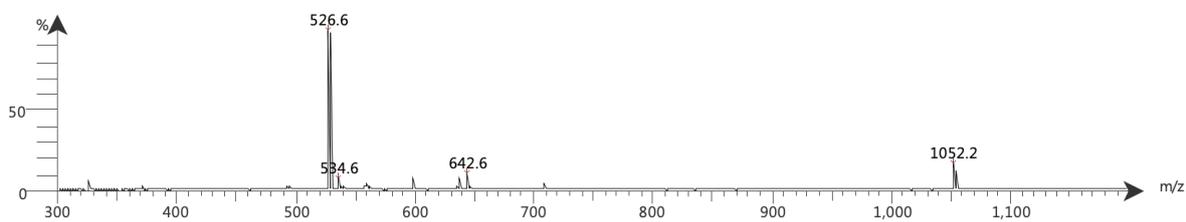


Abbildung 123 LR-ESI (+) – Spektrum Lu16.

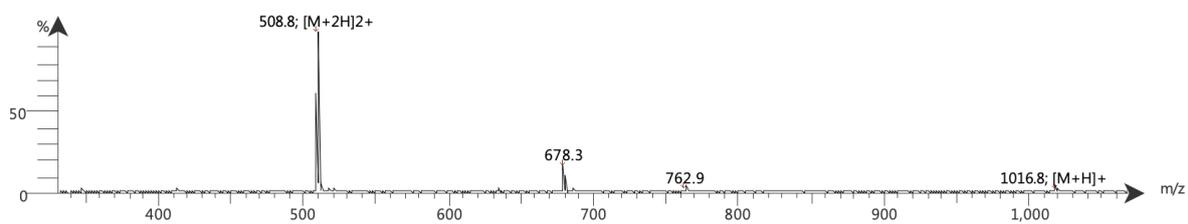


Abbildung 124 LR-ESI (+) – Spektrum La16.

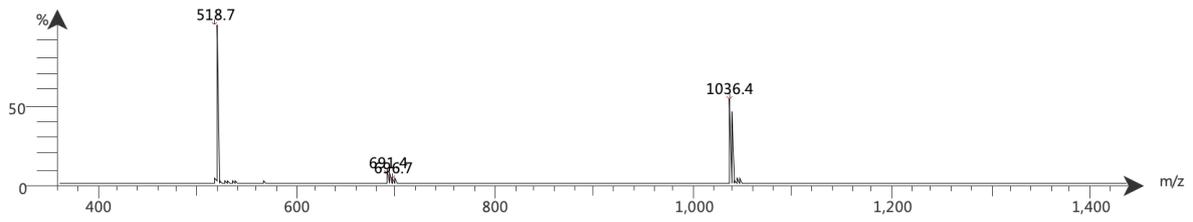


Abbildung 125 LR-ESI (+) – Spektrum Tb16.

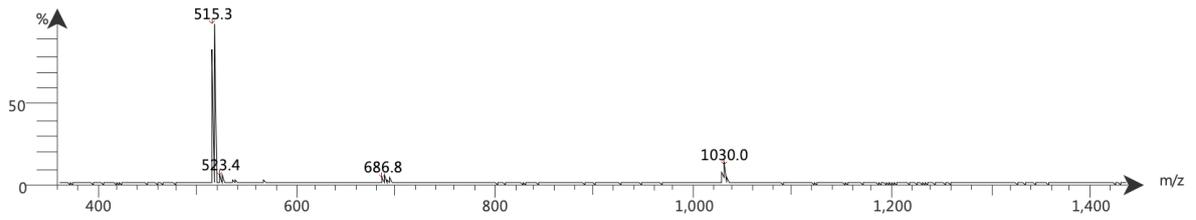


Abbildung 126 LR-ESI (+) – Spektrum Eu16.

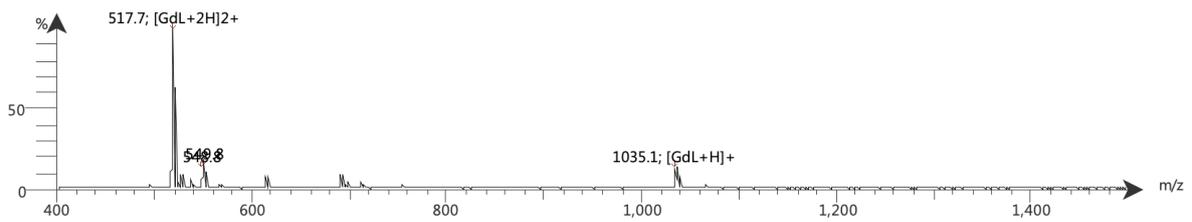


Abbildung 127 LR-ESI (+) – Spektrum Gd16.

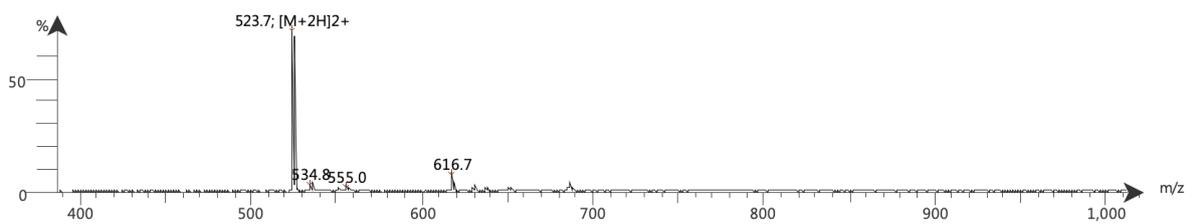


Abbildung 128 LR-ESI (+) – Spektrum Tm16.

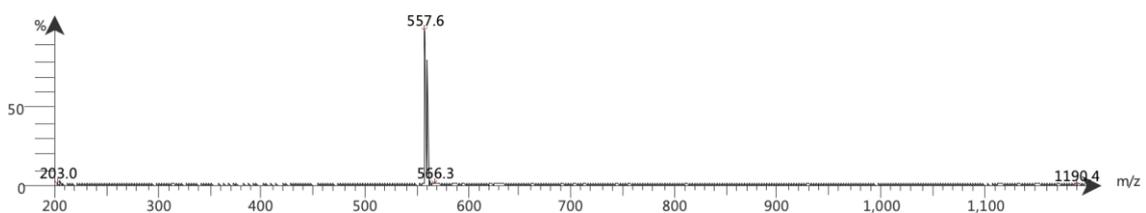
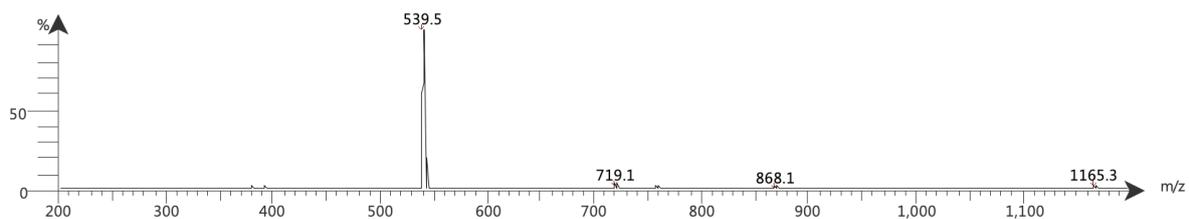
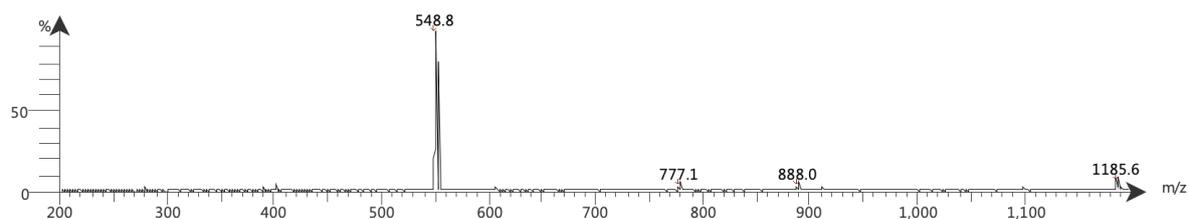


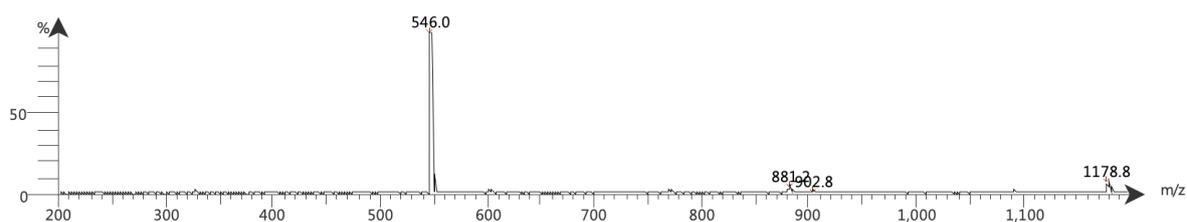
Abbildung 129 LR-ESI (+) – Spektrum CuLu16.



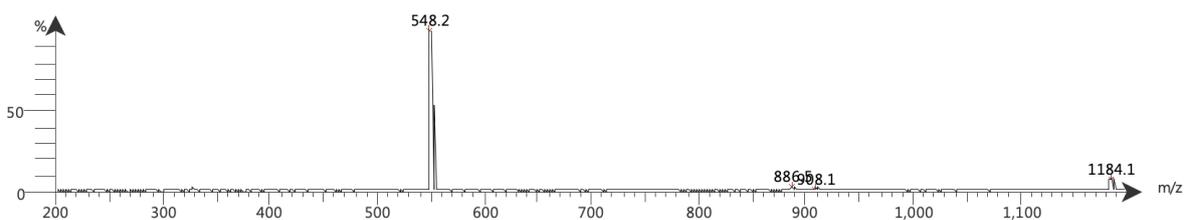
**Abbildung 130** LR-ESI (+) – Spektrum CuLa16.



**Abbildung 131** LR-ESI (+) – Spektrum CuTb16.



**Abbildung 132** LR-ESI (+) – Spektrum CuEu16.



**Abbildung 133** LR-ESI (+) – Spektrum CuGd16.

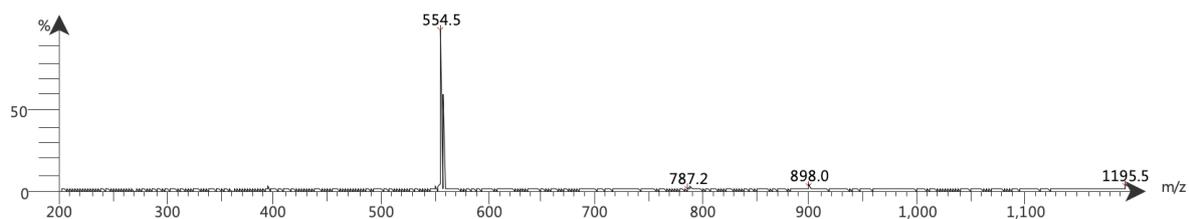


Abbildung 134 LR-ESI (+) – Spektrum CuTm16.

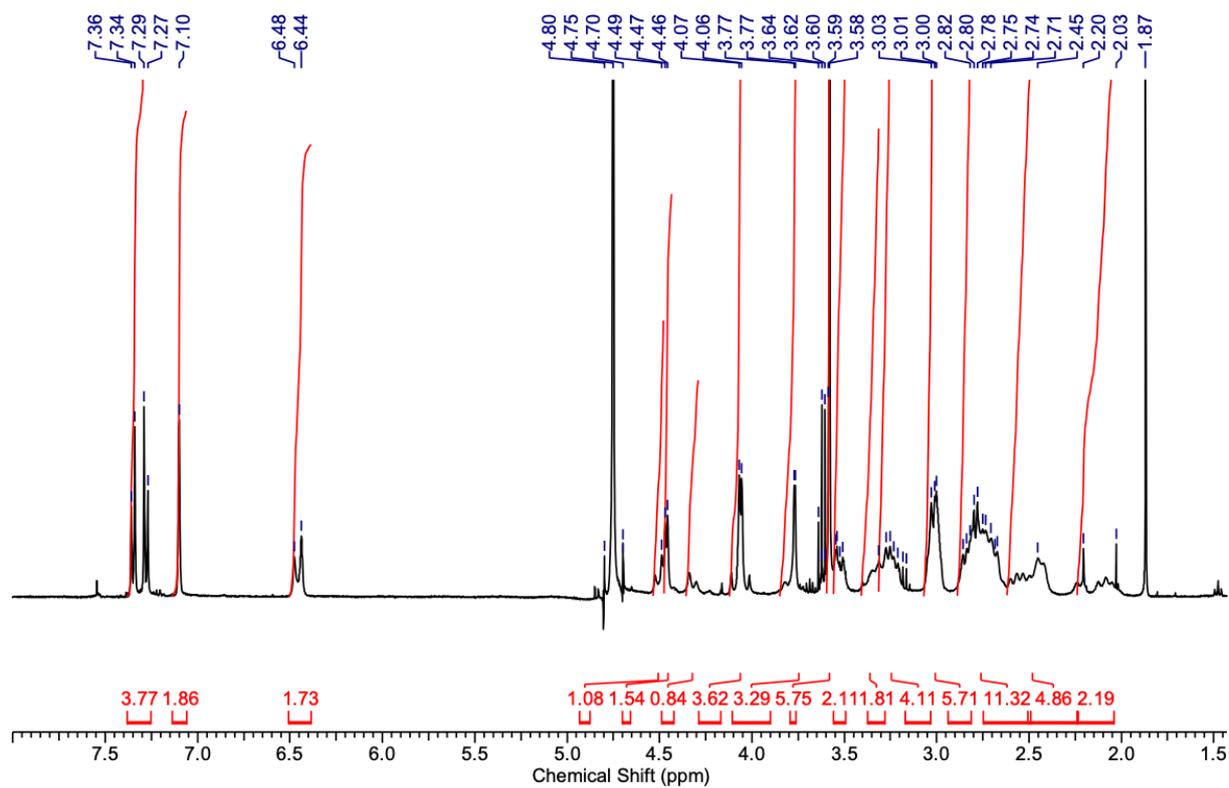
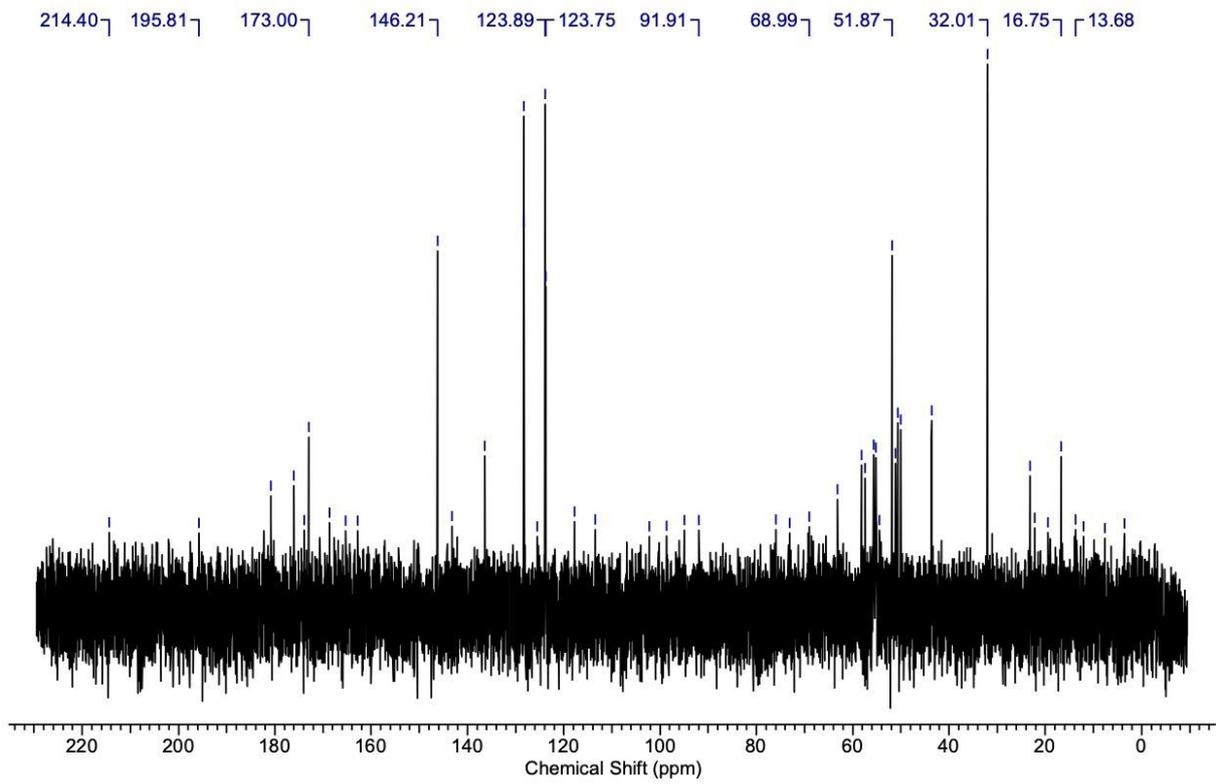
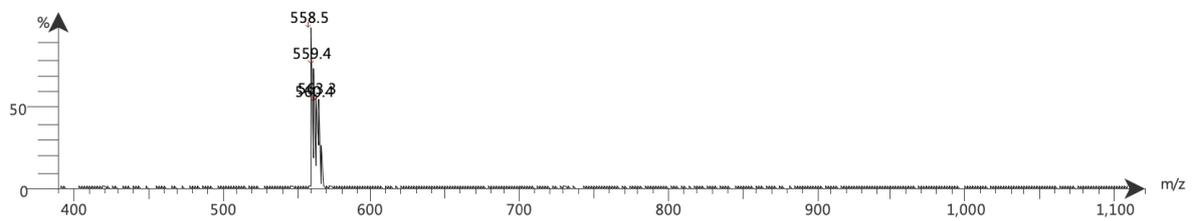


Abbildung 135 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ZnLu16.



**Abbildung 136**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum ZnLu16.



**Abbildung 137** LR-ESI (+) – Spektrum ZnLu16.

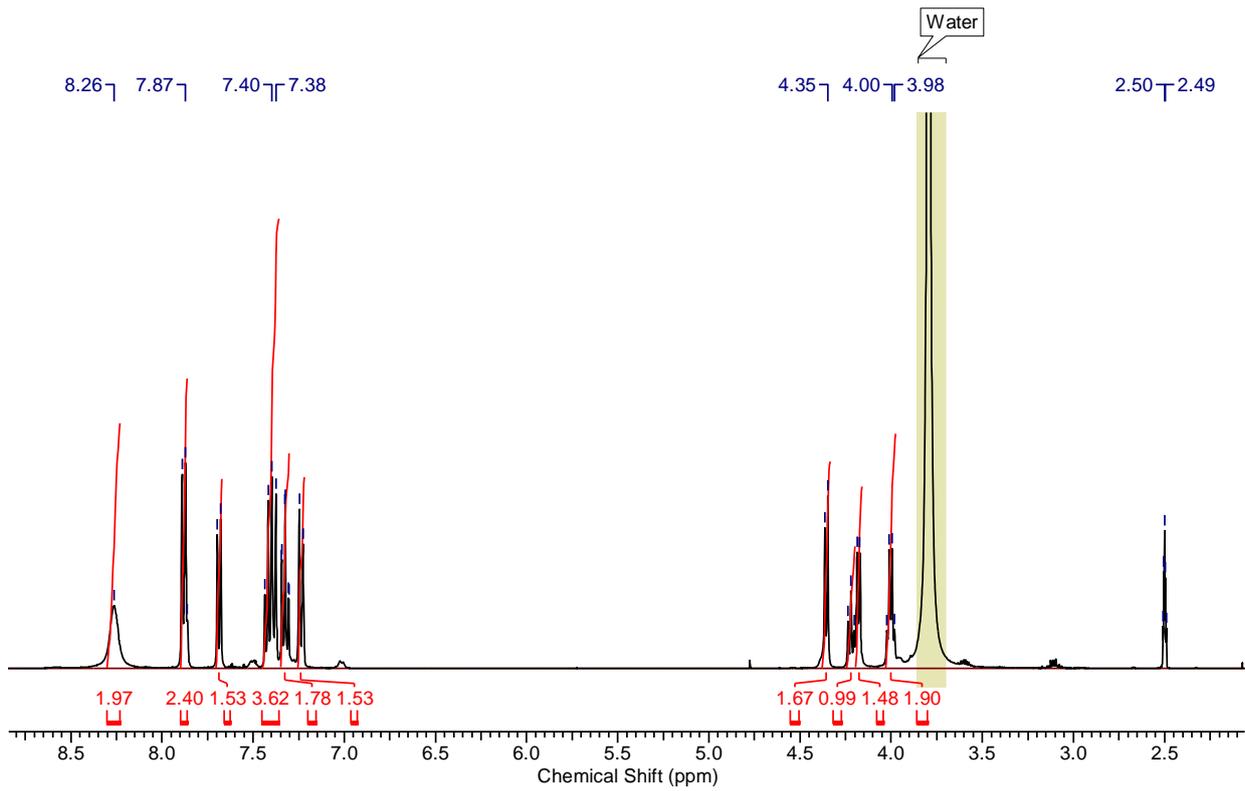


Abbildung 138  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum 17.

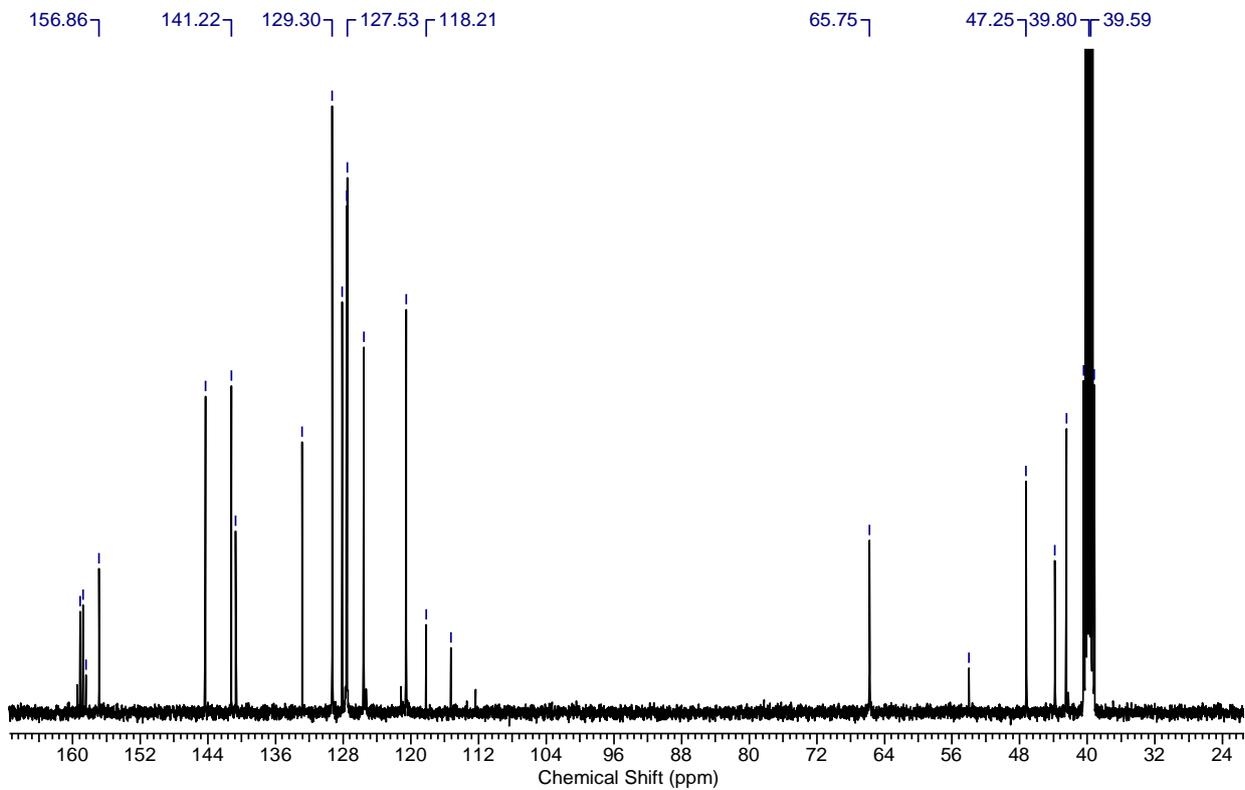
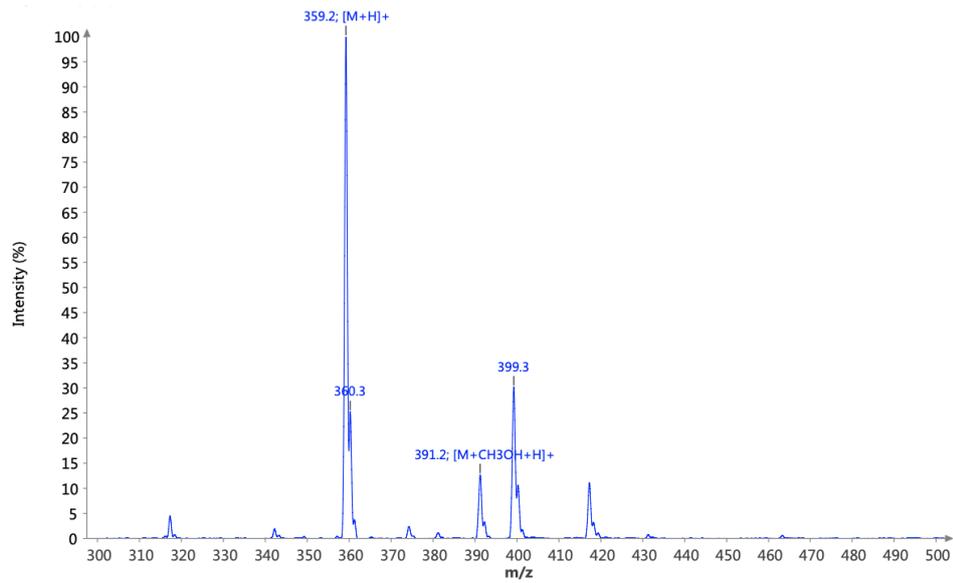
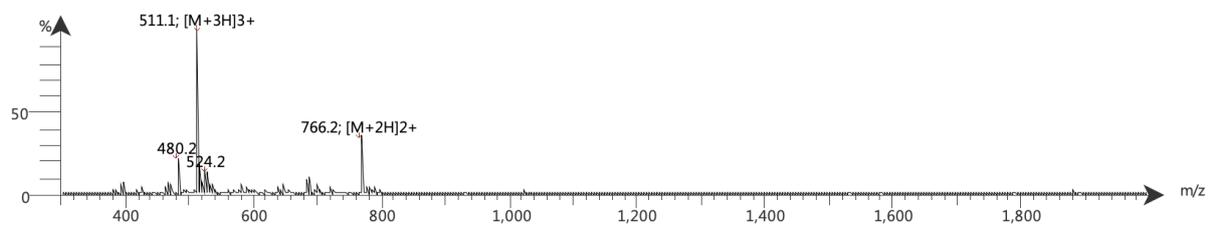


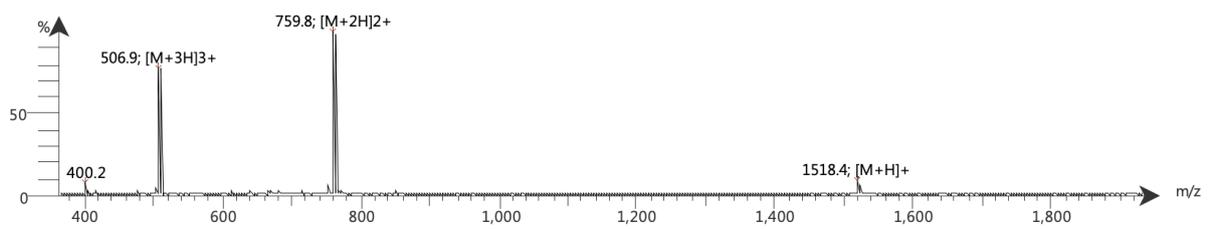
Abbildung 139  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum 17.



**Abbildung 140** LR-ESI (+) – Spektrum 17.

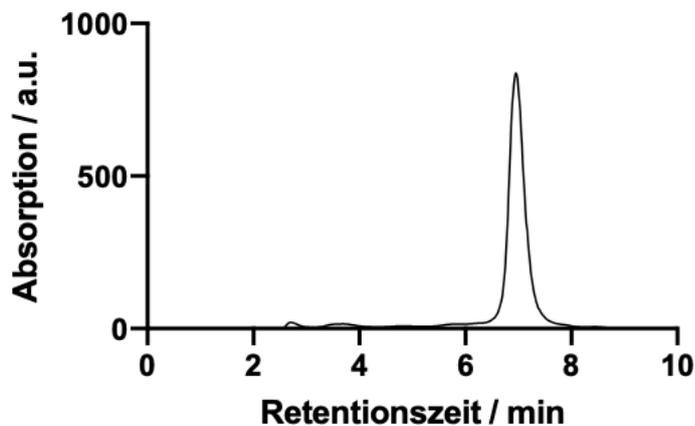


**Abbildung 141** LR-ESI (+) – Spektrum 18.

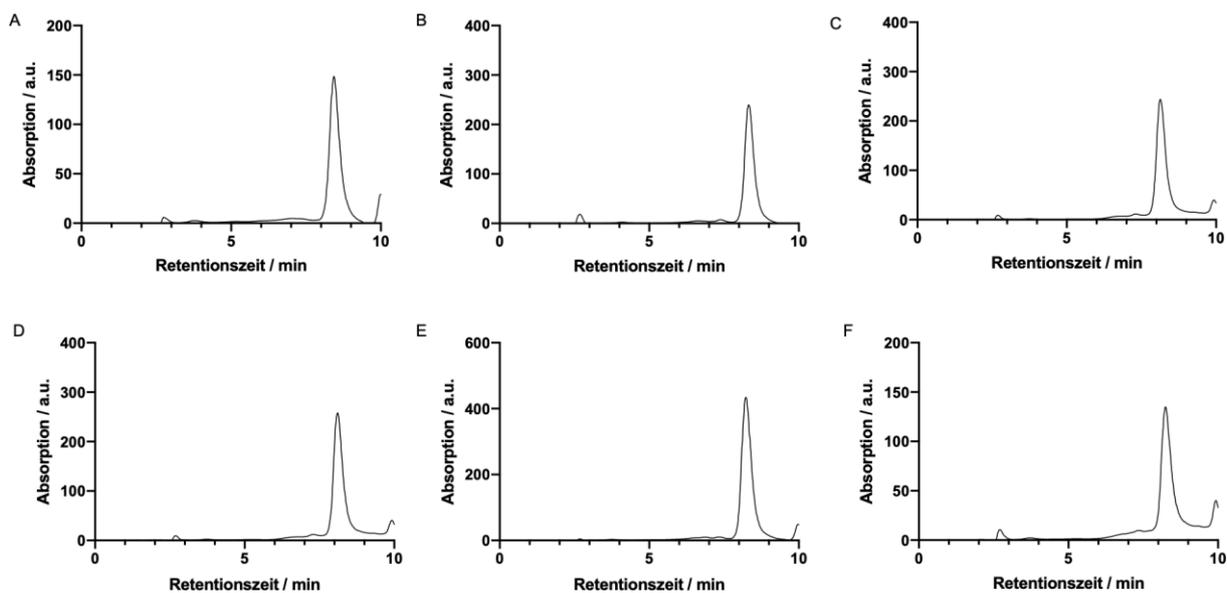


**Abbildung 142** LR-ESI (+) – Spektrum 19.

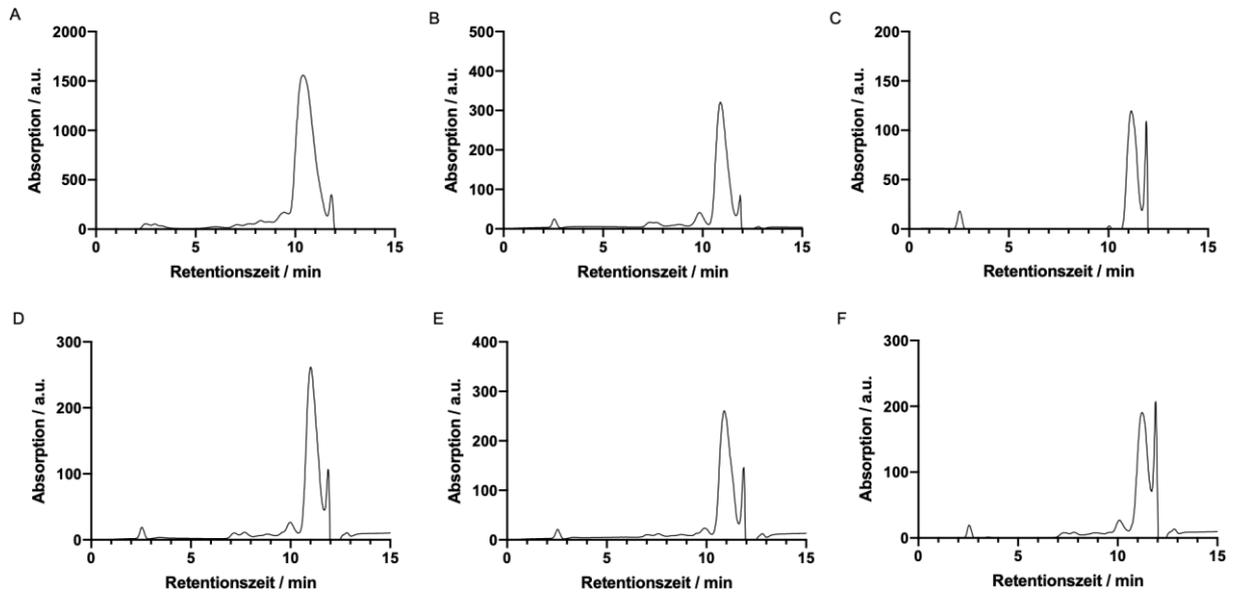
### 7.1.2.3 Analytische HPLC heterodinukleare Metallkomplexe



**Abbildung 143** UV Chromatogramm - Analytische HPLC **16**. Laufmittelgradient: Gradient: 5 % auf 95 % B in 15 min mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>.

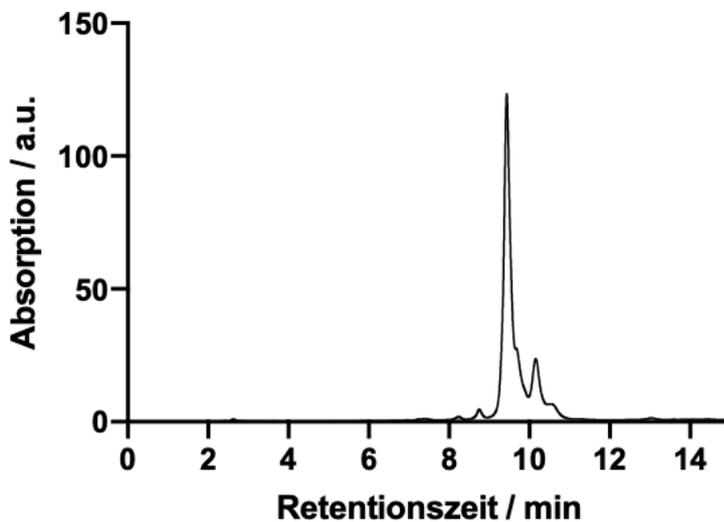


**Abbildung 144** UV Chromatogramm - Analytische HPLC der Komplexe A) Lu**16**, B) La**16**, C) Tb**16**, D) Eu**16**, E) Gd**16**, F) Tm**16**. Laufmittelgradient: Gradient (Analytische HPLC): 5 % auf 95 % B in 15 min mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>.

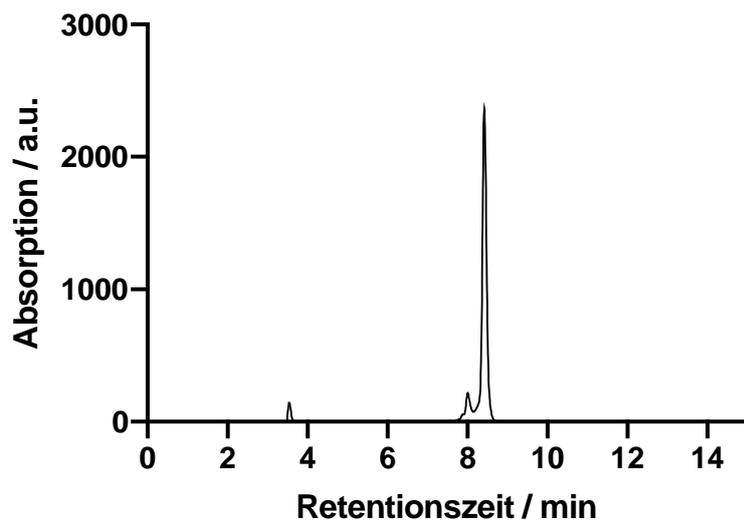


**Abbildung 145** UV-Chromatogramm - Analytische HPLC der Komplexe A) CuLu**16**, B) CuLa**16**, C) CuTb**16**, D) CuEu**16**, E) CuGd**16**, F) CuTm**16**. Laufmittelgradient: Gradient (Analytische HPLC): 5 % auf 95 % B in 15 min mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>.

(Verunreinigungen sind auf Blank der Säule zurückzuführen)



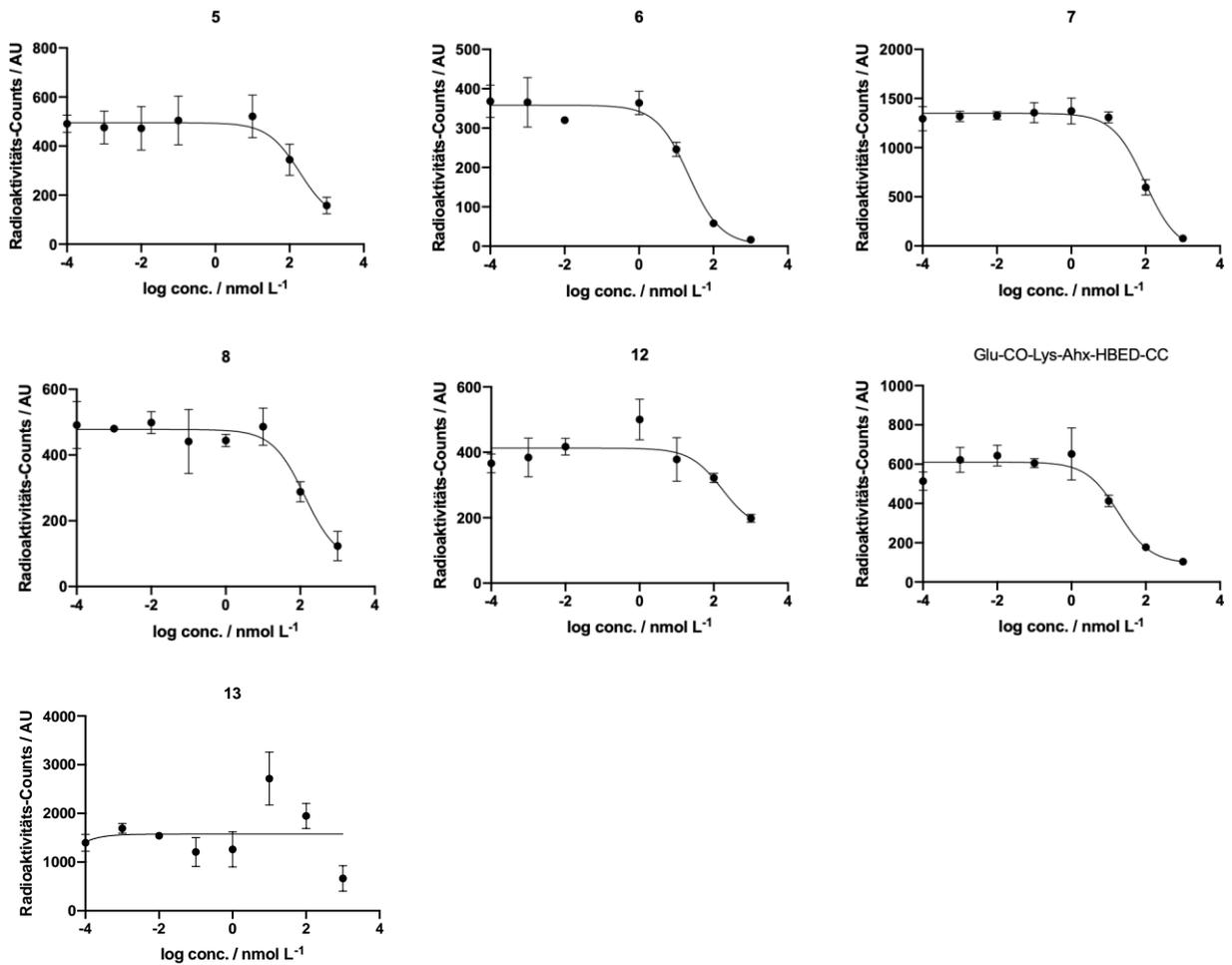
**Abbildung 146** UV-Chromatogramm - Analytische HPLC **18**. Laufmittelgradient: Gradient (Analytische HPLC): 5 % auf 95 % B in 15 min mit einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup>.



**Abbildung 147** UV-Chromatogramm - Analytische HPLC 19. Laufmittelgradient: 5 % B auf 95 % B in 19 min mit einer Flussrate von  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

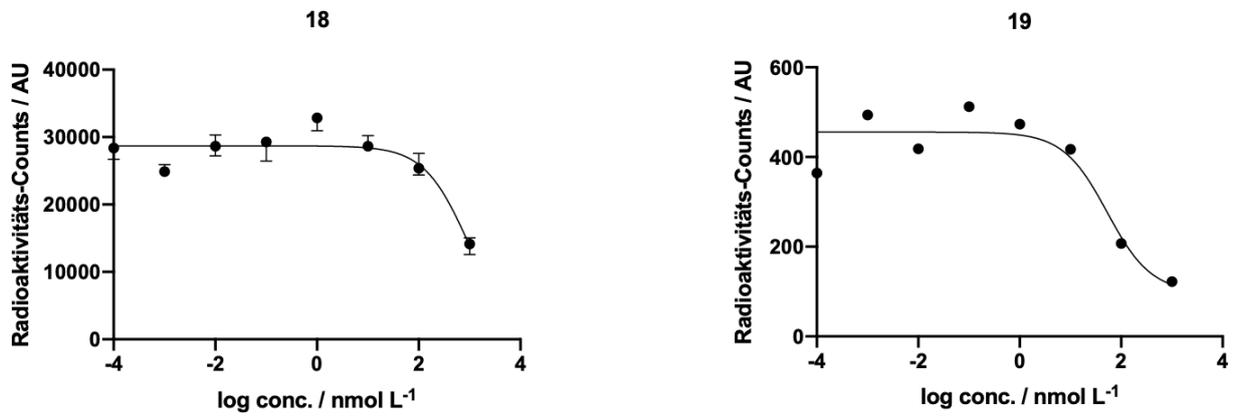
## 7.2 *In vitro* Evaluation der multifunktionellen PSMA-Liganden

### 7.2.1 Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays der BODIPY-PSMA-Liganden



**Abbildung 148** Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays - Ermittelte IC<sub>50</sub>-Kurven der Liganden **5**, **6**, **7**, **8**, **12** und **13** sowie der verwendeten Kontrolle PSMA-11.

## 7.2.2 Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays der Bischelator PSMA-Liganden



**Abbildung 149** Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays - Ermittelte IC<sub>50</sub>-Kurven der Liganden **18** und **19**.

## 7.3 Publikationen und Konferenzbeiträge

### Dissertationsspezifische Publikationen

**Stemler T**, Hoffmann C, Hierlmeier IM, Maus S, Krause E, Ezziddin S, Jung G, Bartholomä MD. A Structure-Activity Relationship Study of Bimodal BODIPY-Labeled PSMA-Targeting Bioconjugates. ChemMedChem. (2021), Ahead of Print.

Weinmann C, Holland JP, Läppchen T, Scherer H, Maus S, **Stemler T**, Bohnenberger H, Ezziddin S, Kurz P, Bartholomä MD. Optimized synthesis and indium complex formation with the bifunctional chelator NODIA-Me. Organic & Biomolecular Chemistry (2018), 16(40), 7503-7512.

### Sonstige Publikationen

Martin S, Maus S, **Stemler T**, Rosar F, Khreish F, Holland JP, Ezziddin S, Bartholomä MD. Proof-of-Concept Study of the NOTI Chelating Platform: Preclinical Evaluation of <sup>64</sup>Cu-Labeled Mono- and Trimeric c(RGDfK) Conjugates. Molecular Imaging and Biology (2021), 23(1), 95-108.

Rosar F, Schön N, Bohnenberger H, Bartholomä M, **Stemler T**, Maus S, Khreish F, Ezziddin S, Schaefer-Schuler A. Comparison of different methods for post-therapeutic dosimetry in [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 radioligand therapy. EJNMMI physics (2021), 8(1), 40.

Rosar F, Krause J, Bartholomä M, Maus S, **Stemler T**, Hierlmeier I, Linxweiler J, Ezziddin S, Khreish F. Efficacy and Safety of [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617 Augmented [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Patients with Highly Advanced mCRPC with Poor Prognosis. Pharmaceuticals (2021), 13(5), 722.

Rosar F, Kochems N, Bartholomä M, Maus S, **Stemler T**, Linxweiler J, Khreish F, Ezziddin S. Renal Safety of [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Patients with Compromised Baseline Kidney Function. Cancers (2021), 13(12), 3095.

Rosar F, Hau F, Bartholomä M, Maus S, **Stemler T**, Linxweiler J, Ezziddin S, Khreish F. Molecular imaging and biochemical response assessment after a single cycle of [<sup>225</sup>Ac]Ac-PSMA-617/[<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 tandem therapy in mCRPC patients who have progressed on [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617 monotherapy. Theranostics (2021), 11(9), 4050-4060.

Khreish F, Ebert N, Ries M, Maus S, Rosar F, Bohnenberger H, **Stemler T**, Saar M, Bartholomä M, Ezziddin S. <sup>225</sup>Ac-PSMA-617/<sup>177</sup>Lu-PSMA-617 tandem therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: pilot experience. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (2020), 47(3), 721-728.

## **Konferenzbeiträge**

### Society of Radiopharmaceutical Science Meeting (iSRS 2021)

A structure-activity relationship study of bimodal BODIPY-labeled PSMA-targeting bioconjugates, Selected Short Presentation

### European Society of Molecular Imaging Meeting (EMIM 2021, Göttingen)

Synthesis, radiolabeling and in vitro characterization of a bimodal BODIPY-labeled PSMA-targeting peptidomimetic for dual imaging of prostate cancer, Poster Presentation

### Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM 2021)

Synthesis, radiolabelling and in vitro characterisation of a bimodal BODIPY-labelled PSMA-targeting bioconjugate for dual imaging of prostate cancer, Top Rated Oral Presentation

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1</b> Schematische Struktur des Prostataspezifischen Membranantigens (PSMA). Die große extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 44-750) des symmetrischen Dimers besteht aus der Proteasedomäne (orange, Aminosäuren 57-116; Aminosäuren 352-590), der apikalen Domäne (lila, Aminosäuren 117-351), der C-terminalen Domäne (gelb, Aminosäuren 591-750) sowie dem binuklearen aktiven Zentrum (rot). Die transmembranäre Region des Proteins ist in grün, die cytoplasmatische Domäne in rosa dargestellt <sup>11,14</sup> .....  | 2  |
| <b>Abbildung 2</b> Wechselwirkung der S1 bzw. S1'-Pocket des katalytisch aktiven PSMA-Zentrums mit seinem natürlichen Substrat NAAG unter Beteiligung des binuklearen Zink-Zentrums sowie der verschiedenen Aminosäure-Seitenketten <sup>12</sup> .....  | 4  |
| <b>Abbildung 3</b> Einblick ins aktive Zentrum der GCP II im Rahmen der Substratspaltung. Spaltung des Substrats <i>N</i> -Acetylaspartylglutaminsäure (NAAG) zu <i>N</i> -Acetylaspartat (NAA) und L-Glutaminsäure (L-Glu) sowie hydrolytische Abspaltung von Glutaminsäure Poly- $\gamma$ -glutamathaltiger Folate (FolGlu(n) zu FolGlu(n-1) und L-Glu) <sup>24</sup> . ....   | 5  |
| <b>Abbildung 4</b> Zerfallsreihe des Alphaemitters Actinium-225 unter Angabe der jeweiligen Tochternuklide inklusive Halbwertszeit und Energie der emittierten Teilchen <sup>50</sup> .....  | 9  |
| <b>Abbildung 5</b> Schematisches Funktionsprinzip einer SPECT-Untersuchung <sup>40</sup> .....   | 10 |
| <b>Abbildung 6</b> Physikalisches Prinzip der Positronen-Emissions-Tomographie <sup>56</sup> .....   | 11 |
| <b>Abbildung 7</b> Schematische Darstellung eines zielspezifischen Radiotracers in Wechselwirkung mit seiner biologischen Zielstruktur <sup>59</sup> .....   | 12 |
| <b>Abbildung 8</b> Beispiele für verschiedener bifunktionelle Chelatoren (BFC) im Bereich der radiopharmazeutischen Chemie <sup>31,67,68</sup> .....   | 14 |
| <b>Abbildung 9</b> Schematische Darstellung der Metallkomplexierung eines DOTA-konjugierten Biomoleküls unter Angabe der notwendigen Markierungsbedingungen. Als Metallkation bzw. Radionuklid wurde als Beispiel [ <sup>177</sup> Lu]Lu <sup>3+</sup> verwendet <sup>6,69</sup> .....   | 15 |
| <b>Abbildung 10</b> Unterschiedliche Radiofluorierungsreaktionen. A) Radiosynthese von [ <sup>18</sup> F]-Deoxyglucose ([ <sup>18</sup> F]FDG). Nukleophile Substitution einer Triflatgruppe (OTf) des Acetatgeschützten FDG-Vorläufers durch ein <sup>18</sup> F-Anion und anschließender Hydrolyse <sup>62,72</sup> . B) Radiosynthese von [ <sup>18</sup> F]-Fluorethyltyrosin ([ <sup>18</sup> F]FET) über eine <sup>18</sup> F-Fluorethylierung. Radiomarkierung mit Fluor-18 erfolgt in zwei Schritten über <sup>18</sup> F-Fluoroethyltosylat (prosthtische Gruppe), ausgehend von Ethylenglycol-1,2-ditosylat <sup>73</sup> . C) Radiomarkierung der SiFA-Gruppe über einen <sup>18</sup> F/ <sup>19</sup> F-Isotopenaustausch. .... | 17 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 11</b> A) Strukturformeln der PSMA-Inhibitoren NAAG, 2-PMPA und harnstoffbasierter Liganden <sup>3,82-85</sup> . B) Schematische Darstellung der Wechselwirkung eines harnstoffbasierten PSMA-Liganden mit dem aktiven Zentrum des PSMA <sup>86</sup> .....   | 20 |
| <b>Abbildung 12</b> Strukturformel von PSMA-11 und schematische Darstellung des Radiokomplexes [ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA-11 für die PET/CT <sup>31,97</sup> .....   | 23 |
| <b>Abbildung 13</b> Strukturformel der Fluor-18-markierten PSMA-Liganden [ <sup>18</sup> F]F-DCFPyL und [ <sup>18</sup> F]F-PSMA-1007 <sup>104,105</sup> .....   | 24 |
| <b>Abbildung 14</b> Strukturformel von PSMA-617. ....  | 25 |
| <b>Abbildung 15</b> Fallbeispiel eines 61-jährigen Patienten mit diffuser PCa-geschuldeter Knochenmetastasierung (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes). PET-Bildgebung mit [ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA-11 vor und nach drei Zyklen PRLT mit [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617. Die PET-Bildgebung nach RLT zeigt eine minimale Resterkrankung unter drastischer Reduktion des PSA-Wertes.....  | 26 |
| <b>Abbildung 16</b> PET-Bildgebung eines Patienten mit mCRPC nach [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617/[ <sup>225</sup> Ac]Ac-PSMA-617-Tandemtherapie (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum des Saarlandes). A) Tumorausbreitung vor [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617 Monotherapie. B) Progression der Erkrankung nach 3 Zyklen [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617 Monotherapie. C) Partielle Remission der Erkrankung nach [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617/[ <sup>225</sup> Ac]Ac-PSMA-617 Tandemtherapie <sup>64</sup> .....   | 28 |
| <b>Abbildung 17</b> Strukturformeln der hybriden PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-HBED-CC-PEG <sub>2</sub> -STAR-RED <sup>109</sup> , Glu-CO-Lys-HBED-CC-IRDye800CW <sup>108</sup> und Glu-CO-Lys-2-Nal-Chx-Lys-IRDye800CW-DOTA <sup>110</sup> .....   | 30 |
| <b>Abbildung 18</b> Fallbeispiel für PET/CT-Fluoreszenz-Hybrid-Bildgebung eines Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom. A) Präoperative PET/CT Bildgebung mit [ <sup>68</sup> Ga]Ga-Glu-CO-Lys-(HE) <sub>3</sub> -HBED-CC-IRDye800CW ([ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA-914) 1 h nach Injektion mit starker Anreicherung im Tumor (Pfeil). B) Visualisierung Primärtumor nach Anreicherung von PSMA-914 im Rahmen der DaVinci-assistierten Fluoreszenz gesteuerten chirurgischen Resektion (Gabe von nicht radioaktivem Ga-PSMA-917 am Folgetag). C) <i>Ex situ</i> Fluoreszenzdetektion nach Tumorresektion. D) + E) Kontrast zwischen bösartigem (grün fluoreszierend) und gutartigem Gewebe (kein optisches Signal) <sup>111</sup> . .... | 31 |
| <b>Abbildung 19</b> Strukturformel des radiohybriden PSMA-Liganden rhPSMA-7.3 <sup>101</sup> . In Blau: SiFA-Gruppe zur Markierung mit Fluor-18 für die PET/CT-Bildgebung. In Grün: DOTAGA-Chelator zur Komplexbildung von Radiometallen für die Endoradiotherapie.....  | 33 |
| <b>Abbildung 20</b> A) Strukturformel und IUPAC-Nomenklatur des BODIPY-Grundgerüsts <sup>121</sup> . B) Strukturformel der BODIPY-Carbonsäure <b>1</b> .....   | 37 |
| <b>Abbildung 21</b> Festphasensynthese des geschützten PSMA-Bindemotivs. ....  | 40 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 22</b> Allgemeine Syntheseroute der in dieser Arbeit entwickelten BODIPY-PSMA-Liganden <b>5</b> , <b>6</b> , <b>7</b> und <b>8</b> .....   | 41 |
| <b>Abbildung 23</b> Analytische HPLC-Chromatogramme der BODIPY-PSMA-Liganden bei einer Wellenlänge von 490 nm, Eingesetzt: LR-ESI-(+)-Spektren der jeweiligen Liganden. A) <b>5</b> , B) <b>6</b> , C) <b>7</b> , D) <b>8</b> .....   | 44 |
| <b>Abbildung 24</b> Thermisch induzierte Bildung von Zyklisierungsprodukten des PSMA-Bindemotivs durch eine intramolekulare Kondensationsreaktion. Ausgehend von Glu-CO-Lys werden zyklisierte Produkte aufgebaut aus Hydantion A, Hydantion B und Pyroglutaminsäure gebildet.....  | 45 |
| <b>Abbildung 25</b> Versuche zur Darstellung des BODIPY-PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-BODIPY <b>5</b> mittels Festphasensynthese.....  | 46 |
| <b>Abbildung 26</b> A). Analytisches HPLC-Chromatogramm bei $\lambda = 490$ nm von <b>1</b> in EtOH, eingesetzt: LR-ESI-(-)-Spektrum von <b>1</b> . B). Analytisches HPLC-Chromatogramm von <b>1</b> nach Inkubation in TFA für 2 h, eingesetzt: LR-ESI-(+)-Spektrum von <b>1</b> .....   | 47 |
| <b>Abbildung 27</b> Synthese des geschützten PSMA-Bindemotivs <b>9</b> und der dazugehörigen BOC-entschützten Zwischenstufe <b>10</b> in Lösung.....  | 48 |
| <b>Abbildung 28</b> Radiomarkierung der BODIPY-PSMA-Liganden via $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch.....  | 49 |
| <b>Abbildung 29</b> Radio-HPLC Chromatogramme der radiomarkierten PSMA-Liganden nach erfolgter $\text{C}_{18}$ -Aufreinigung A). $[^{18}\text{F}]\text{F5}$ , B) $[^{18}\text{F}]\text{F6}$ , C) $[^{18}\text{F}]\text{F7}$ , D) $[^{18}\text{F}]\text{F8}$ .....   | 52 |
| <b>Abbildung 30</b> Syntheseroute des BODIPY-PSMA-Liganden <b>12</b> basierend auf PSMA-617.....  | 54 |
| <b>Abbildung 31</b> HPLC-Chromatogramm des BODIPY-PSMA-Liganden <b>12</b> , Eingesetzt: LR-ESI-(+)-Spektrum des Peaks bei einer Retentionszeit von $t_R = 11.58$ min, der <b>12</b> entspricht.....   | 56 |
| <b>Abbildung 32</b> Radiomarkierung des PSMA-Liganden <b>12</b> mit $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ in Natriumacetatpuffer (pH 4.5) bei 95 °C und einer Inkubationszeit von 15 min.....  | 57 |
| <b>Abbildung 33</b> Radio-HPLC des radiohybriden Liganden <b>12</b> A) nach der $^{18}\text{F}$ -Markierung ( $\text{C}_{18}$ -Aufreinigung und B) nach Inkubation mit $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ in Natriumacetatpuffer für 15 min bei 95 °C.....  | 58 |
| <b>Abbildung 34</b> A) Zeitlicher Verlauf der Absorptionsspektren von <b>1</b> während Inkubation in 100% TFA. B) Zeitlicher Verlauf der Emissionsspektren von <b>1</b> während Inkubation in TFA.....  | 59 |
| <b>Abbildung 35</b> A) Synthese des $\text{BF}_2$ -freien BODIPY-PSMA-Liganden <b>13</b> , B) UV/Vis-Chromatogramm von $[^{18}\text{F}]\text{F6}$ nach der Radiomarkierung mittels $^{19}\text{F}/^{18}\text{F}$ -Isotopenaustausch bei einer Wellenlänge von 490 nm . UV/Vis-Chromatogramm des analytischen HPLC-Laufs von <b>13</b> bei einer Wellenlänge von 490 nm, eingesetzt: LR-ESI-(+)-Spektrum von <b>13</b> .....   | 61 |
| <b>Abbildung 36</b> Stabilitätsuntersuchungen BODIPY <b>1</b> in Gegenwart von $\text{SnCl}_4$ A). Zeitlicher Verlauf Absorptionsspektren von <b>1</b> . B) Verlauf der Emissionsspektren von <b>1</b> . C) Analytischer HPLC-Lauf von <b>1</b> nach Inkubation mit $\text{SnCl}_4$ für 15 min, eingesetzt: LR-ESI-(-)-Spektrum von <b>1</b> nach Inkubation mit $\text{SnCl}_4$ ; berechnetes m/z für $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{BF}_2$ : 333.17, gefunden: 333.2..... | 63 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 37</b> HPLC-Chromatogramme der Stabilitätsuntersuchung von [ <sup>18</sup> F]F6 in PBS bei Raumtemperatur direkt nach der Radiomarkierung, 1 h und 2 h. ....   | 65 |
| <b>Abbildung 38</b> PSMA-vermittelte Internalisierung und PSMA- Zelloberflächenbindung von [ <sup>18</sup> F]F6 bei Raumtemperatur nach 15, 30, 60 und 120 min. Die PSMA-vermittelte Internalisierung wurde mittels Blockingstudien mit 2-PMPA sichergestellt. ....   | 70 |
| <b>Abbildung 39</b> Normierte Absorptions- und Emissionsspektren von <b>1</b> , <b>5</b> , <b>6</b> , <b>7</b> , <b>8</b> und <b>12</b> . ....  | 71 |
| <b>Abbildung 40</b> Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des BODIPY-PSMA-Liganden <b>6</b> . SIM-Aufnahmen des zeitlichen Verlaufs der Internalisierung von <b>6</b> (c = 20 nM) in PSMA-positiven LNCaP-Zellen nach einer Inkubationszeit von 15 (A), 30 (B) min, 1 h (C) und 1 h bei 4 °C (D) <sup>146</sup> . ....   | 74 |
| <b>Abbildung 41</b> Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Ligand <b>6</b> in LNCaP Zellen in Gegenwart des Inhibitors 2-PMPA. ....   | 75 |
| <b>Abbildung 42</b> Echtzeitaufnahmen verschiedener Konzentrationen der BODIPY-Carbonsäure <b>1</b> in EtOH am DaVinci-Roboter mit einem FireFly Laparoskop. Konzentrationen von links nach rechts: 14, 1.4, 0.14, 0.014 und 0.0014 µmol/mL. ....   | 76 |
| <b>Abbildung 43</b> Schematischer Aufbau eines multifunktionellen heterodinuklearen Radiohybridliganden. Orange: Biovektor zur spezifischen Bindung an Tumorzellen. Gelb: Spacer. Hellblau: Universeller Chelator für die Komplexierung verschiedener (Radio)metalle, z.B. Alpha- und Betaemitter zur Therapie, lumineszierende Metallkationen für Fluoreszenzbildgebung (engl.: fluorescence imaging = FI) oder MR-aktive Metallkationen (engl.: magnetic resonance imaging = MRI). Dunkelblau: Maßgeschneiderter Chelator für Cu <sup>2+</sup> entweder für die PET-Diagnostik mit <sup>64</sup> Cu oder Therapie mit <sup>67</sup> Cu. Verschiedene (Radio)metallkombinationen erlauben potentiell zahlreiche medizinische Anwendungen. .... | 79 |
| <b>Abbildung 44</b> Strukturformeln von A) DOTA, B) der TACN-basierten Cu-spezifischen Chelatoren NOTI, NOTI-Me sowie NOTThia und C) des TACN-basierten Cu-spezifischen BFCs NODIA-Me <b>14</b> . ....  | 80 |
| <b>Abbildung 45</b> Synthese des Dichelator Modellliganden <b>16</b> ausgehend von NODIA-Me <b>14</b> . ....  | 84 |
| <b>Abbildung 46</b> LR-ESI-(+)-Spektrum des Modellliganden <b>16</b> . ....   | 85 |
| <b>Abbildung 47</b> Schematische Darstellung der zwei potentiell gebildeten Cu <sup>2+</sup> -Komplexe des Modellkonstruktes Cu <b>16</b> und Cu <sub>2</sub> <b>16</b> unter Angabe der Summenformel und der exakten Masse. Die Ladungen der Komplexe sind aus Gründen der Einfachheit nicht angegeben. ....   | 88 |
| <b>Abbildung 48</b> A) LR-ESI-(+)-Spektrum von <b>16</b> bei pH 1 nach der Zugabe von 1.0 Äq. CuCl <sub>2</sub> . Beobachtet wurde die Bildung des Komplexes Cu <b>16</b> mit [M+2H] <sup>2+</sup> = 471.4 und [M+2Na] <sup>2+</sup> = 482.3 sowie des Komplexes Cu <sub>2</sub> <b>16</b> mit [2M+H] <sup>2+</sup> = 502.6. B) LR-ESI-(+)-Spektrum von <b>16</b> nach Zugabe von 0.6 Äq. CuCl <sub>2</sub> . C) LR-ESI-(+)-Spektrum von <b>16</b> nach Zugabe von 1.0 Äq. CuCl <sub>2</sub> bei pH 5.4. D) C) LR-ESI-(+)-Spektrum von <b>16</b> nach Zugabe von 2.0 Äq. CuCl <sub>2</sub> bei pH 5.4. ....   | 89 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abbildung 49</b> Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung der selektiven Metallkomplexierung zwischen den Chelatoren DOTA und NODIA-Me <b>14</b> mit den Metallsalzen CuCl <sub>2</sub> bzw. LuCl <sub>3</sub> bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. A) LR-ESI(+)-Spektrum der beiden freien Liganden vor Inkubation mit Metallsalzen. B) LR-ESI(+)-Spektrum nach Zugabe von 1 Äq. Cu <sup>2+</sup> . C) LR-ESI(+)-Spektrum der beiden Chelatoren nach Zugabe von 1 Äq. Cu <sup>2+</sup> und 1 Äq. Lu <sup>3+</sup> bei Raumtemperatur. D). LR-ESI(+)-Spektrum der beiden Chelatoren nach (gleichzeitiger) Zugabe von 1 Äq. Cu <sup>2+</sup> und 1 Äq. Lu <sup>3+</sup> nach Inkubation bei 95 °C..... | 91  |
| <b>Abbildung 50</b> Synthese der Lanthanoidkomplexe vom Typ [Ln(NODIA-Me-Bz-DOTA)]/ Ln <b>16</b> . ....  | 94  |
| <b>Abbildung 51</b> Synthese der heterodinuklearen Metallkomplexe vom Typ [CuLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)] / CuLn <b>16</b> ausgehend von Ln <b>16</b> .....   | 95  |
| <b>Abbildung 52</b> Schematische Darstellung der Kupferkomplexe [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> und [Cu(NODIA-Me-NHEt)], die als Referenz der UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen verwendet wurden. ....  | 99  |
| <b>Abbildung 53</b> Vergleich der UV/Vis-Spektren der Komplexe [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> (rot), [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (grün) und Cu <b>16</b> (blau) in wässriger Lösung (c = 5 mM).....  | 99  |
| <b>Abbildung 54</b> Vergleich der UV/Vis-Spektren der Komplexe [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (blau), CuLu <b>16</b> (grün) und Cu <b>16</b> (rot) in wässriger Lösung (c = 5 mM). ....   | 101 |
| <b>Abbildung 55</b> UV/Vis-Spektren von Cu <b>16</b> vor (rot) und nach (blau) Inkubation bei 95 °C. ....  | 102 |
| <b>Abbildung 56</b> Synthese der Metallkomplexe Lu <b>16</b> und ZnLu <b>16</b> für die NMR-Spektroskopie.....   | 105 |
| <b>Abbildung 57</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von <b>16</b> in D <sub>2</sub> O (pH > 12) unter Zuordnung der entsprechenden Signale. ....   | 106 |
| <b>Abbildung 58</b> Vergleich der <sup>1</sup> H-NMR-Spektren des Modellkonstruktes <b>16</b> (schwarz) mit denen der Metallkomplexe Lu <b>16</b> (blau) und ZnLu <b>16</b> (rot) in D <sub>2</sub> O (pH >12).....  | 107 |
| <b>Abbildung 59</b> Ausschnitt aus dem aromatischen Bereich der <sup>1</sup> H-NMR Spektren von <b>16</b> , Lu <b>16</b> und ZnLu <b>16</b> . ....   | 108 |
| <b>Abbildung 60</b> Vergleich der EPR-Spektren der Cu-Komplexe Cu <b>16</b> , Cu <sub>2</sub> <b>16</b> , [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> , [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (Cu-NODIA 0.8 eq), CuLu <b>16</b> und CuCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O. Blau: EPR-Spektrum von Cu <b>16</b> (monoCu modelconstruct). Orange: EPR-Spektrum von Cu <sub>2</sub> <b>16</b> (bisCu modelconstruct). Grün: EPR-Spektrum von [Cu(NODIA-Me-NHEt)] (Cu-NODIA 0.8 eq), Rot: EPR-Spektrum von [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> (Cu-DOTA frac. 2). Lila: EPR-Spektrum von CuLu <b>16</b> (LuCu modelconstruct). Braun: EPR-Spektrum von CuCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O.....  | 111 |
| <b>Abbildung 61</b> Radio-HPLC der Markierung von Ligand <b>16</b> mit (A) [ <sup>177</sup> Lu]LuCl <sub>3</sub> und (B) entsprechendem Gammaskopogramm der Fraktion bei t <sub>R</sub> = 7.9 min. (C) Markierung mit [ <sup>64</sup> Cu]CuCl <sub>2</sub> und (D) entsprechendem Gammaskopogramm bei t <sub>R</sub> = 9.0 min. (E) Dualmarkierung von <b>16</b> mit beiden Radionukliden wurde in den drei Energiekanälen die Bildung von mindestens drei   |     |

|  |     |
|--|-----|
| radioaktivmarkierten Hauptprodukten beobachtet. Die Retentionszeiten der Hauptfraktionen lagen bei $t_R = 7.9$ min, 9.0 min und 10.2 min.....  | 115 |
| <b>Abbildung 62</b> Ergebnis der Radiomarkierung von Ligand <b>16</b> mit mit $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ und $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ . Schematische Darstellung der Radiokomplexe nach Inkubation mit den jeweiligen Radiometall. ....   | 117 |
| <b>Abbildung 63</b> Syntheseroute der selektiv dualmarkierten Radiokomplexe. ....  | 118 |
| <b>Abbildung 64</b> Ergebnis der Radiomarkierung von <b>16</b> mit $^{177}\text{Lu}$ und $^{64}\text{Cu}$ nach erfolgter Absättigung der beiden Chelatereinheiten mit nichtradioaktivem $\text{Lu}^{3+}$ und $\text{Cu}^{2+}$ . A). Radiochromatogramm von $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$ mit $t_R = 10.2$ min. B) Gammaspektrum von $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{177/\text{nat}}\text{Lu}]\text{Lu16}$ mit den charakteristischen Energien von Cu-64 (511 keV) und Lu-177 (113 und 209 keV). ....   | 119 |
| <b>Abbildung 65</b> Ergebnis der Radiomarkierung von <b>16</b> mit $^{225}\text{Ac}$ und $^{64}\text{Cu}$ nach erfolgter Absättigung der beiden Chelatereinheiten mit nichtradioaktivem $\text{La}^{3+}$ und $\text{Cu}^{2+}$ . A). Radiochromatogramm von $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac16}$ mit $t_R = 8.0$ min. B) Gammaspektrum von $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac16}$ mit den charakteristischen Energien der aus dem Zerfall von Ac-225 entstehenden Tochternuklide Fr-221 (219 keV) und Bi-213 (440 keV) C) Radiochromatogramm von $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu16}$ mit Produktes $t_R = 9.0$ min. D) Gammaspektrum von $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu16}$ mit der charakteristischen Energien von 511 keV. E) Radiochromatogramm von $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{\text{nat}}\text{La16}$ mit $t_R = 10.2$ min. F) Gammaspektrum von $[^{64/\text{nat}}\text{Cu}]\text{Cu}[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{\text{nat}}\text{La16}$ mit den charakteristischen Energien von Fr-221 (219 keV), Bi-213 (440 keV) und Cu-64 (511 keV). .... | 121 |
| <b>Abbildung 66</b> Synthese radiohybrider PSMA-spezifischer Tracer für die Bildgebung $^{225}\text{Ac}$ -markierten Radiotracers mittels PET. Herstellung eines Gemisches bestehend aus dem $^{64}\text{Cu}$ -markierten und dem $^{225}\text{Ac}$ -markierten Ligand mit einer definierten Aktivität. Aufgrund der identischen Summenformel (durch Absättigung mit nichtradioaktiven Metallen) haben beide Radiotracer die gleiche Bioverteilung, wodurch die PET-Bildgebung von Actinium-225 ermöglicht werden kann. ....   | 124 |
| <b>Abbildung 67</b> Synthese der Dichelator PSMA-Liganden Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-PEG-NODIA-Me <b>18</b> und Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-XDA-NODIA-Me <b>19</b> ausgehend von DOTA-di- <i>tert</i> .butylester. ....   | 126 |
| <b>Abbildung 68</b> Synthese des Fmoc-geschützten Linkers Fmoc-Xylylendiamin <b>17</b> ausgehend von 1-( <i>N</i> -BOC-aminomethyl)-4-(aminomethyl)benzol. ....  | 127 |
| <b>Abbildung 69</b> Radiomarkierung des radiohybriden PSMA-Ligand <b>19</b> mit Ac-225 und Cu-64. Herstellung eines Gemisches bestehend aus dem $^{64}\text{Cu}$ -markierten und dem $^{225}\text{Ac}$ -markiertem Ligand mit einer definierten Aktivität für die Ermittlung der Bioverteilung des $^{225}\text{Ac}$ -markiertem Liganden $^{\text{nat}}\text{Cu}[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{\text{nat}}\text{La19}$ . ....  | 129 |
| <b>Abbildung 70</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum <b>5</b> . ....   | 199 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Abbildung 71</b> $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum <b>5</b> .....  | 200 |
| <b>Abbildung 72</b> $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum <b>5</b> .....  | 200 |
| <b>Abbildung 73</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum <b>5</b> .....   | 201 |
| <b>Abbildung 74</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum <b>5</b> .....   | 201 |
| <b>Abbildung 75</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum <b>5</b> .....  | 202 |
| <b>Abbildung 76</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>5</b> .....  | 202 |
| <b>Abbildung 77</b> LR-ESI (+) – Spektrum Glu-CO-Lys-Ahx <b>2</b> .....   | 202 |
| <b>Abbildung 78</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum <b>6</b> .....   | 203 |
| <b>Abbildung 79</b> $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum <b>6</b> .....  | 203 |
| <b>Abbildung 80</b> $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum <b>6</b> .....  | 204 |
| <b>Abbildung 81</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum <b>6</b> .....   | 204 |
| <b>Abbildung 82</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum <b>6</b> .....   | 205 |
| <b>Abbildung 83</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum <b>6</b> .....  | 205 |
| <b>Abbildung 84</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>6</b> .....  | 205 |
| <b>Abbildung 85</b> LR-ESI (+) – Spektrum Glu-CO-Lys-Ahx-Ahx <b>3</b> .....   | 206 |
| <b>Abbildung 86</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum <b>7</b> .....   | 206 |
| <b>Abbildung 87</b> $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum <b>7</b> .....  | 207 |
| <b>Abbildung 88</b> $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum <b>7</b> .....  | 207 |
| <b>Abbildung 89</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum <b>7</b> .....   | 208 |
| <b>Abbildung 90</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum <b>7</b> .....   | 208 |
| <b>Abbildung 91</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum <b>7</b> .....  | 209 |
| <b>Abbildung 92</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>7</b> .....  | 209 |
| <b>Abbildung 93</b> LR-ESI (+) – Spektrum Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc <b>4</b> .....   | 209 |
| <b>Abbildung 94</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum <b>8</b> .....   | 210 |
| <b>Abbildung 95</b> $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum <b>8</b> .....  | 210 |
| <b>Abbildung 96</b> $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum <b>8</b> .....  | 211 |
| <b>Abbildung 97</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HH-COSY Spektrum <b>8</b> .....   | 211 |
| <b>Abbildung 98</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. CH-COSY Spektrum <b>8</b> .....   | 212 |
| <b>Abbildung 99</b> 2D NMR Spektren BODIPY-PSMA-Liganden. HMBC Spektrum <b>8</b> .....  | 212 |
| <b>Abbildung 100</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>8</b> .....   | 212 |
| <b>Abbildung 101</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)- $\epsilon$ -NHBOC <b>9</b> .....                | 213 |
| <b>Abbildung 102</b> $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)- $\epsilon$ -NHBOC <b>9</b> .....             | 213 |
| <b>Abbildung 103</b> LR-ESI (+) – Spektrum Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)- $\epsilon$ -NHBOC-DIPEA-Addukt <b>9</b> * DIPEA..... | 214 |
| <b>Abbildung 104</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)- $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> <b>10</b> .....     | 214 |
| <b>Abbildung 105</b> $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)- $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> <b>10</b> .....  | 215 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Abbildung 106</b> LR-ESI (+) – Spektrum Glu(O <sup>t</sup> Bu) <sub>2</sub> -CO-Lys(O <sup>t</sup> Bu)-ε-NH <sub>2</sub> <b>10</b> ..... | 215 |
| <b>Abbildung 107</b> LR-ESI (+) – Spektrum Glu-CO-Lys-2-Nal-Amc-DOTA-DOOA <b>11</b> .....   | 215 |
| <b>Abbildung 108</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>12</b> .....  | 216 |
| <b>Abbildung 109</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>13</b> .....  | 216 |
| <b>Abbildung 110</b> <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum <b>15</b> .....  | 217 |
| <b>Abbildung 111</b> <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum <b>15</b> .....   | 218 |
| <b>Abbildung 112</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>15</b> .....  | 218 |
| <b>Abbildung 113</b> <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum <b>16</b> .....  | 219 |
| <b>Abbildung 114</b> <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum <b>16</b> .....   | 219 |
| <b>Abbildung 115</b> 2D NMR Spektren NODIA-Me-Bz-DOTA. HH-COSY Spektrum <b>16</b> .....   | 220 |
| <b>Abbildung 116</b> 2D NMR Spektren NODIA-Me-Bz-DOTA. CH-COSY Spektrum <b>16</b> .....   | 220 |
| <b>Abbildung 117</b> 2D NMR Spektren NODIA-Me-Bz-DOTA. HMBC Spektrum <b>16</b> .....  | 221 |
| <b>Abbildung 118</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>16</b> .....  | 221 |
| <b>Abbildung 119</b> LR-ESI (+) – Spektrum Cu <b>16</b> .....   | 221 |
| <b>Abbildung 120</b> LR-ESI (+) – Spektrum Cu <sub>2</sub> <b>16</b> .....  | 222 |
| <b>Abbildung 121</b> <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum Lu <b>16</b> .....   | 222 |
| <b>Abbildung 122</b> <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum Lu <b>16</b> .....  | 223 |
| <b>Abbildung 123</b> LR-ESI (+) – Spektrum Lu <b>16</b> .....   | 223 |
| <b>Abbildung 124</b> LR-ESI (+) – Spektrum La <b>16</b> .....   | 223 |
| <b>Abbildung 125</b> LR-ESI (+) – Spektrum Tb <b>16</b> .....   | 224 |
| <b>Abbildung 126</b> LR-ESI (+) – Spektrum Eu <b>16</b> .....   | 224 |
| <b>Abbildung 127</b> LR-ESI (+) – Spektrum Gd <b>16</b> .....   | 224 |
| <b>Abbildung 128</b> LR-ESI (+) – Spektrum Tm <b>16</b> .....   | 224 |
| <b>Abbildung 129</b> LR-ESI (+) – Spektrum CuLu <b>16</b> .....   | 224 |
| <b>Abbildung 130</b> LR-ESI (+) – Spektrum CuLa <b>16</b> .....   | 225 |
| <b>Abbildung 131</b> LR-ESI (+) – Spektrum CuTb <b>16</b> .....   | 225 |
| <b>Abbildung 132</b> LR-ESI (+) – Spektrum CuEu <b>16</b> .....   | 225 |
| <b>Abbildung 133</b> LR-ESI (+) – Spektrum CuGd <b>16</b> .....   | 225 |
| <b>Abbildung 134</b> LR-ESI (+) – Spektrum CuTm <b>16</b> .....   | 226 |
| <b>Abbildung 135</b> <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum ZnLu <b>16</b> .....   | 226 |
| <b>Abbildung 136</b> <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum ZnLu <b>16</b> .....  | 227 |
| <b>Abbildung 137</b> LR-ESI (+) – Spektrum ZnLu <b>16</b> .....   | 227 |
| <b>Abbildung 138</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum <b>17</b> .....  | 228 |
| <b>Abbildung 139</b> <sup>13</sup> C-NMR Spektrum <b>17</b> .....   | 228 |
| <b>Abbildung 140</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>17</b> .....  | 229 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abbildung 141</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>18</b> .....   | 229 |
| <b>Abbildung 142</b> LR-ESI (+) – Spektrum <b>19</b> .....   | 229 |
| <b>Abbildung 143</b> UV Chromatogramm - Analytische HPLC <b>16</b> . Laufmittelgradient: Gradient: 5 % auf 95 %<br>B in 15 min mit einer Flussrate von 1 mL·min <sup>-1</sup> .....  | 230 |
| <b>Abbildung 144</b> UV Chromatogramm - Analytische HPLC der Komplexe A) Lu <b>16</b> , B) La <b>16</b> , C) Tb <b>16</b> , D)<br>Eu <b>16</b> , E) Gd <b>16</b> , F) Tm <b>16</b> . Laufmittelgradient: Gradient (Analytische HPLC): 5 % auf 95 % B in 15 min<br>mit einer Flussrate von 1 mL·min <sup>-1</sup> .....             | 230 |
| <b>Abbildung 145</b> UV-Chromatogramm - Analytische HPLC der Komplexe A) CuLu <b>16</b> , B) CuLa <b>16</b> , C)<br>CuTb <b>16</b> , D) CuEu <b>16</b> , E) CuGd <b>16</b> , F) CuTm <b>16</b> . Laufmittelgradient: Gradient (Analytische HPLC): 5 %<br>auf 95 % B in 15 min mit einer Flussrate von 1 mL·min <sup>-1</sup> ..... | 231 |
| <b>Abbildung 146</b> UV-Chromatogramm - Analytische HPLC <b>18</b> . Laufmittelgradient: Gradient (Analytische<br>HPLC): 5 % auf 95 % B in 15 min mit einer Flussrate von 1 mL·min <sup>-1</sup> .....   | 231 |
| <b>Abbildung 147</b> UV-Chromatogramm - Analytische HPLC <b>19</b> . Laufmittelgradient: 5 % B auf 95 % B in 19<br>min mit einer Flussrate von 1 mL·min <sup>-1</sup> .....  | 232 |
| <b>Abbildung 148</b> Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays - Ermittelte IC <sub>50</sub> -Kurven der Liganden <b>5</b> , <b>6</b> ,<br><b>7</b> , <b>8</b> , <b>12</b> und <b>13</b> sowie der verwendeten Kontrolle PSMA-11. ....  | 233 |
| <b>Abbildung 149</b> Ergebnis des kompetitiven Bindungsassays - Ermittelte IC <sub>50</sub> -Kurven der Liganden <b>18</b> und<br><b>19</b> .....  | 234 |

## 7.5 Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabelle 1</b> Physikalische Grundlagen unterschiedlicher radioaktiver Zerfallsarten <sup>40,41</sup> .....   | 7   |
| <b>Tabelle 2</b> Beispiele klinisch eingesetzter Radionuklide, inklusive Halbwertszeit und Zerfallsart <sup>43-47</sup> .....   | 9   |
| <b>Tabelle 3</b> Massenspektrometrische Überprüfung der peptidomimetischen BODIPY-PSMA-Vorstufen mit unterschiedlichen Spacern. ....  | 42  |
| <b>Tabelle 4</b> MS-Charakterisierung, HPLC-Retentionszeiten und Ausbeuten der BODIPY-PSMA-Liganden <b>5, 6, 7</b> und <b>8</b> . ....  | 44  |
| <b>Tabelle 5</b> Ausbeuten von [ <sup>18</sup> F]F-TEA nach Aufreinigung der eingesetzten QMA-adsorbierten Startaktivität an F-18. ....   | 50  |
| <b>Tabelle 6</b> Massenspektrometrische Charakterisierung und die HPLC-Retentionszeit des potentiellen radiohybriden PSMA-Ligand <b>12</b> . ....   | 56  |
| <b>Tabelle 7</b> HPLC Retentionszeiten und log $D_{oct/PBS}$ Werte der Biokonjugate [ <sup>18</sup> F]F <b>5</b> , [ <sup>18</sup> F]F <b>6</b> , [ <sup>18</sup> F]F <b>7</b> , [ <sup>18</sup> F]F <b>8</b> und [ <sup>18</sup> F]F <b>12</b> zusammen mit der Referenzverbindung [ <sup>68</sup> Ga]Ga-PSMA-11. ....   | 66  |
| <b>Tabelle 8</b> IC <sub>50</sub> -Werte [nM] der Liganden <b>5, 6, 7, 8, 12, 13</b> und der Kontrolle PSMA-11 in LNCaP Zellen unter Verwendung von [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617 als Radioligand. ....   | 67  |
| <b>Tabelle 9</b> Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der BODIPY-PSMA-Liganden <b>5, 6, 7, 8</b> und <b>12</b> im Vergleich mit der Carbonsäure <b>1</b> . ....  | 72  |
| <b>Tabelle 10</b> Anwendungsmöglichkeiten von Radiohybridliganden auf Basis von zwei (unterschiedlichen) Chelatoren durch verschiedene Metallkombinationen. ....  | 81  |
| <b>Tabelle 11</b> Auflistung der theoretischen und gemessenen Massen, der HPLC-Retentionszeiten der [Ln(NODIA-Me-Bz-DOTA)]/ Ln <b>16</b> Komplexe nach erfolgter C <sub>18</sub> -Sep Pak Aufreinigung. ....  | 94  |
| <b>Tabelle 12</b> Auflistung der theoretischen und gemessenen Massen, der HPLC-Retentionszeiten der [CuLn(NODIA-Me-Bz-DOTA)] / CuLn <b>16</b> Komplexe nach erfolgter C <sub>18</sub> -Sep Pak Aufreinigung. ....   | 96  |
| <b>Tabelle 13</b> Absorptionsmaxima der d-d Übergänge der untersuchten Kupferkomplexe [Cu(DOTA)] <sup>2-</sup> , [Cu(NODIA-Me-NHET)] und Cu <b>16</b> in verschiedenen Lösungsmitteln. ....   | 101 |
| <b>Tabelle 14</b> Zusammenfassung der massenspektrometrischen Charakterisierung der <i>in vitro</i> Evaluation der PSMA-Liganden <b>18</b> und <b>19</b> . Die IC <sub>50</sub> -Werte [nM] der Liganden <b>18</b> und <b>19</b> wurden in einem kompetitiven Bindungsassay unter Verwendung von [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617 als Radioligand bestimmt. .... | 128 |
| <b>Tabelle 15</b> Pipettierschema für die Synthese von [ <sup>177</sup> Lu]Lu-PSMA-617. ....  | 138 |
| <b>Tabelle 16</b> Allgemeines Ansatz- und Pipettierschema der Konzentrationsreihe der zu testenden Liganden im kompetitiven Bindungsassay. ....   | 139 |
| <b>Tabelle 17</b> Pipettierschema der Wellplatten für das Bindungsassay. Die Durchführung erfolgte in dreifacher Ausführung. ....   | 140 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabelle 18</b> Pipettierschema für massenspektrometrische Untersuchung der Bildung der Cu-Komplexe des Modellliganden ..... | 170 |
| <b>Tabelle 19</b> Pipettierschema UV/Vis-spektroskopische Untersuchung Ligand <b>16</b> . .....                                | 172 |
| <b>Tabelle 20</b> Verdünnungsreihe radiomarkierten PSMA-Liganden [ <sup>18</sup> F]F6 für die Zellinternalisierung. 182        |     |
| <b>Tabelle 21</b> Pipettierschema der Zellinternalisierung von [ <sup>18</sup> F]F6 in LNCaP-Zellen.....                       | 182 |