

DISS. ETH No. 28341

# **Development of radiolabeled small molecules and peptides towards targeted radionuclide therapy**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by  
LUISA MARIA DEBERLE

MSc Chemistry, Heidelberg University  
born on December 17, 1993  
Heidelberg, Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roger Schibli, examiner  
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner  
PD Dr. Martin Lochner, co-examiner  
PD Dr. Cristina Müller, co-examiner

2022

## Summary

Nuclear medicine makes use of radiolabeled ligands that accumulate specifically in target-expressing cancer lesions. Among them is the folate receptor (FR), which is a target expressed on diverse tumors of epithelial origin. A few FR-targeting radiopharmaceuticals were clinically tested for tumor diagnosis, but none for therapeutic application. The prostate-specific membrane antigen (PSMA) is an established tumor target overexpressed in prostate cancer and the first therapeutic PSMA radioligand ( $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ ) achieved FDA approval in March 2022. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) may be used as an interesting new tumor target as it is involved in tumor invasion and metastasis and, hence, expressed in metastasizing cancer. So far, only one uPAR-targeting radiopeptide was clinically tested for diagnostic purposes which, however, suffered from low uptake in tumors.

Insufficient tumor uptake, high off-target accumulation, or both, are the main challenges that have to be faced by optimizing the radioligand design. The major aim of this thesis was the development of radioligands to enable their therapeutic application or improve it by optimization of their chemical structure and, consequently, their tissue distribution profile.

The preparation of new FR-targeting conjugates with modified chemical structure was so far limited by the difficult folate chemistry and time-consuming purification steps. **Chapter 2** describes the development of novel synthetic strategies for the efficient preparation of folate conjugates allowing for high flexibility in terms of modifying the incorporated structural units. Two synthetic approaches were developed using solid-phase synthesis techniques. They differed in the conjugation sequence of the targeting unit, the linker entity, the chelator, and the albumin binder as functional entity. Approach 1 enabled the synthesis of our lead compound OxFol-1 (yield = 8%, purity > 98%) containing folic acid as targeting unit in a short time, but it was not suitable for the preparation of folate conjugates containing the more sensitive 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) as alternative targeting entity. In Approach 2, the conjugation sequence of the single units was, therefore, changed. The folate entity was coupled in the latest possible step, which reduced the number of reaction steps involving sensitive 5-MTHF, avoiding degradation of the latter. This allowed the synthesis not only of OxFol-1 but also of the 5-MTHF-based analogs 6*R*-RedFol-1 and 6*S*-RedFol-1 with a yield of 2–8% and a purity of > 98%. As compared to liquid-phase chemistry methods which required six flash chromatography steps for the synthesis of OxFol-1, the number of purification steps was reduced in both approaches to only one final purification using HPLC. Approach 2 was also applied for the preparation of folate conjugates without albumin binder (OxFol-14, 6*R*-RedFol-14, and 6*S*-RedFol-14) which were obtained with a yield of 9–15% and a purity of > 95%. The preclinical evaluation revealed that the selection of each functional unit had a decisive impact on the folate radioconjugate's distribution pattern with the most favorable achieved with  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-6R-RedFol-1}$  which combined 6*R*-5-MTHF as a targeting agent and an albumin binder to enhance blood circulation.

As a next step, we investigated the impact of different protein-binding structures on the tissue distribution profile of PSMA radioligands. Previous studies with a PSMA radioligand containing a

strong albumin binder ( $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-ALB-56}$ ) showed 2-fold increased tumor uptake compared to  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ , but also high blood levels of activity (7-fold increased), potentially leading to red bone marrow toxicity in a clinical setting. **Chapter 3** describes the design of four PSMA ligands modified with ibuprofen as a weaker albumin binder which was connected to a PSMA-617-based backbone via variously charged linker entities. The ligands containing either no additional linker (Ibu-PSMA), a negatively charged aspartate (Ibu-D $\alpha$ -PSMA), a neutral asparagine (Ibu-N-PSMA), or a positively charged diaminobutanoate linker (Ibu-DAB-PSMA) were prepared according to an adapted solid-phase synthesis procedure within 15–17 steps with a yield of 3–15% and high purity (> 99%). The binding of the radiolabeled ligands to human (93–95%) and mouse plasma proteins (89–92%) was similar to that of  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-ALB-56}$  ( $95 \pm 1\%$  and  $89 \pm 2\%$ , respectively). An exception was  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-Ibu-DAB-PSMA}$  containing a positively charged linker, which showed lower binding to mouse and human plasma proteins ( $89 \pm 3\%$  and  $86 \pm 1\%$ , respectively). Other in vitro properties such as PSMA affinity and cell uptake and internalization did not differ between the ibuprofen-containing PSMA radioligands. Areas under the curve (AUCs) based on biodistribution studies with PSMA-positive PC-3 PIP tumor-bearing mice showed the most favorable tissue distribution for  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-Ibu-DAB-PSMA}$  with a higher tumor-to-blood AUC ratio (~40) than observed for  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-ALB-56}$  (~25) and the other ibuprofen-containing radioligands (21–39). Obviously, the charge of the linker entity in close proximity to the albumin binder strongly affected the biodistribution characteristics of the radioligands, with a positive charge slightly reducing the affinity towards albumin, thereby enhancing the radioligand's tumor-to-background ratios.

As a next step, we investigated whether only the charge of the linker adjacent to the albumin binder was responsible for these findings or whether also its length had an impact on the pharmacokinetic behavior of PSMA radioligands. For this reason, the lysine-based linker entity in Ibu-PSMA (herein referred to as Ibu-PSMA-01) was exchanged by a diaminobutanoate entity (Ibu-PSMA-02) with a two carbon atoms shorter alkyl chain as described in **Chapter 4**. While a shorter linker did not considerably change the in vitro properties of the radioligand, it did have a significant impact on the in vivo characteristics. Despite showing similar affinity towards mouse albumin as  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-Ibu-PSMA-01}$  (relative affinity set as 1.0),  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-Ibu-PSMA-02}$  (relative affinity: 1.1) showed much higher blood accumulation in biodistribution studies ( $29 \pm 4\%$  IA/g vs  $15 \pm 2\%$  IA/g at 1 h p.i.) and, as a consequence, also higher uptake in the tumor ( $63 \pm 8\%$  IA/g vs  $49 \pm 6\%$  IA/g at 1 h p.i.) and kidneys ( $115 \pm 15\%$  IA/g vs  $30 \pm 4\%$  IA/g at 1 h p.i.). Due to the excessive accumulation of  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-Ibu-PSMA-02}$  in the kidneys at early timepoints, we decided to continue our studies with  $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-Ibu-DAB-PSMA}$  as the most promising PSMA radioligand.

During the evaluation of the ibuprofen-containing PSMA radioligands, the question arose whether the stereochemistry of ibuprofen would affect the radioligands' affinity towards albumin and, therefore, their pharmacokinetics. In **Chapter 5**, we report on the synthesis of SibuDAB using (*S*)-ibuprofen and RibuDAB using (*R*)-ibuprofen as stereoisomerically pure analogs of Ibu-DAB-PSMA containing

racemic ibuprofen. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB showed an 11-fold stronger binding to mouse plasma proteins in ultrafiltration assays than [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB, whereas its binding to human plasma proteins was 2-fold increased. The blood activity levels of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB determined in biodistribution studies in mice were twice as high as those of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB at all investigated timepoints. In contrast, [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB consistently showed 2-fold lower kidney uptake than [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB and, consequently, significantly increased tumor-to-kidney ratios. Investigation of blood and urine samples of mice injected with either radioligand showed that no metabolic inversion of one stereoisomer into the other occurred *in vivo*. While only a low amount of radiometabolites was formed within 4 h after injection of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB (5–10%), the fraction was much larger (9–33%) after injection of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB. The different characteristics of the two stereoisomers highlight the importance of small structural details such as the stereochemistry of radiopharmaceuticals on their pharmacokinetics. In a continuous effort to reach an optimum compromise between plasma protein-binding properties to achieve high tumor uptake, but efficient clearance from the blood pool, we developed a new class of PSMA radioligands described in **Chapter 6**. These new PSMA ligands were modified with entities that were reported to bind to transthyretin instead or additionally to their binding to serum albumin. Three PSMA ligands were synthesized containing either the dimethylpyrazole-based TTR-01 (PSMA-TTR-01), diflunisal (PSMA-TTR-02) or mefenamic acid (PSMA-TTR-03), respectively. During the synthesis, precipitation of TTR-01 and diflunisal occurred during activation of the carboxyl group using standard conditions, which disturbed their coupling to the resin-immobilized PSMA precursor. PSMA-TTR-01 and PSMA-TTR-02 were, therefore, only obtained in low yields (2% and 3%, respectively) compared to PSMA-TTR-03 (16%). The coupling was investigated under various conditions which revealed EDC as a suitable alternative coupling reagent. Ultrafiltration studies performed with the novel radioligands showed virtually no binding of [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-02 and [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-03 to transthyretin (<5%) but strong binding to serum albumin (>91%) which was in the same range as for radioligands containing designated albumin binders. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-02 and [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-03 should, therefore, not be referred to as transthyretin-binding PSMA radioligands. Considerable binding to transthyretin was, however, observed for [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-01 ( $46 \pm 3\%$ ), indicating that TTR-01 was, indeed, a designated transthyretin binder. This feature renders [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-01 an interesting radioligand for further *in vitro* and, finally, *in vivo* investigations.

As a final step, we aimed to investigate whether uPAR-targeting radiopeptides could also profit from an enhanced blood circulation time as achieved with albumin-binding folate radioconjugates and PSMA radioligands. For this reason, a DOTA-containing cyclic uPAR ligand equipped with a 4-(*p*-iodophenyl)butanoate unit (cyclo-uPAR-ALB-07) and its analog without albumin binder (cyclo-uPAR-06) were synthesized as described in **Chapter 7**. The synthetic conditions were optimized in order to suppress racemization and the formation of byproducts of the growing peptide chain while coupling the single amino acids, which improved the crude product yield by 70%. Optimal cyclization conditions were found for each peptide using either DMSO as a mild oxidation agent or a thiol-disulfide interchange

reaction. Our studies revealed that a successful cyclization was dependent on the peptide structure and cyclization conditions had to be chosen accordingly. Cell uptake and internalization studies in uPAR-transfected HEK cells revealed 3–6-fold increased values for [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-cyclo-uPAR-ALB-07 ( $8.2 \pm 1.1\%$  and  $6.1 \pm 1.6\%$ , respectively) containing a 4-(*p*-iodophenyl)butanoate unit as compared to [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-cyclo-uPAR-06 ( $3.1 \pm 1.2\%$  and  $1.1 \pm 0.4\%$ , respectively) without the albumin binder. Both cyclic radiopeptides showed, however, lower cell uptake and internalization than the linear reference radiopeptide [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTA-AE105 ( $43 \pm 4\%$  and  $19 \pm 3\%$ , respectively). Further in vitro investigations will be necessary to understand the observed behavior and enable subsequent design optimization in order to obtain a cyclic uPAR radiopeptide suitable for uPAR-targeted radioligand therapy.

In conclusion, the results of this thesis represent a major step forward in the synthetic efficiency for the preparation of radiopharmaceuticals which can be directly translated to the development of ligands targeting the investigated targets and other relevant tumor-associated receptors. Our biological investigations demonstrated the uniqueness of each targeting system which requires the definition of the ideal composition for each individual type of targeting agent. In this thesis, the chemical units that favorably affect the biodistribution profile of the different radioligands were identified. This will elucidate their optimum structural composition for high accumulation of activity in the tumor with fast clearance from background tissue and organs.

## Zusammenfassung

In der Nuklearmedizin werden radioaktiv markierte Liganden verwendet, die sich spezifisch in Target-exprimierenden Krebsläsionen anreichern. Zu diesen Targets gehört auch der Folatezeptor (FR), der in verschiedenen Tumoren epithelialen Ursprungs vorkommt. Einige wenige Radiopharmazeutika, die auf den FR abzielen, wurden klinisch für die Tumordiagnose getestet, keines jedoch für die therapeutische Anwendung. Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) ist ein etabliertes Tumortarget, das bei Prostatakrebs überexprimiert wird, und der erste therapeutische PSMA Radioligand ( $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-PSMA-617}$ ) hat im März 2022 die FDA-Zulassung erhalten. Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator Rezeptor (uPAR) könnte ein interessantes neues Tumortarget sein, da er an der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt ist und daher bei metastasierendem Krebs exprimiert wird. Bisher wurde nur ein auf uPAR abzielendes Radiopeptid zu diagnostischen Zwecken klinisch getestet, das jedoch nur eine geringe Aufnahme in Tumoren aufgewiesen hat.

Unzureichende Tumoraufnahme, hohe Anreicherung in gesundem Gewebe oder beides sind die größten Herausforderungen, die durch Optimierung des Radioligandendesigns adressiert werden müssen. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Radioliganden, um ihre therapeutische Anwendung zu ermöglichen oder durch Optimierung ihrer chemischen Struktur und folglich ihres Gewebeverteilungsprofils zu verbessern.

Die Herstellung neuer auf den FR abzielender Konjugate mit modifizierter chemischer Struktur wurde bisher durch die schwierige Folatchemie und zeitaufwändige Reinigungsschritte eingeschränkt. In **Kapitel 2** wird die Entwicklung neuartiger Synthesestrategien für die effiziente Herstellung von Folatkonjugaten beschrieben, die eine hohe Flexibilität in Bezug auf die Modifizierung der eingebauten Struktureinheiten ermöglichen. Es wurden zwei synthetische Ansätze unter Verwendung der Festphasensynthese entwickelt. Sie unterschieden sich in der Konjugationssequenz der Targeting-Einheit, des Linkers, des Chelators und der albuminbindenden funktionellen Einheit. Ansatz 1 ermöglichte die Synthese unserer Leitverbindung OxFol-1 (Ausbeute = 8%, Reinheit > 98%) mit Folsäure als Targeting-Einheit in kurzer Zeit, war jedoch nicht für die Herstellung von Folatkonjugaten geeignet, die das empfindlichere 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) als alternative Targeting-Einheit enthielten. In Ansatz 2 wurde daher die Konjugationssequenz der einzelnen Einheiten geändert. Das Folat wurde im letztmöglichen Schritt gekoppelt, wodurch die Zahl der Reaktionsschritte mit dem empfindlichen 5-MTHF reduziert und dessen Zersetzung vermieden wurde. Dies ermöglichte die Synthese nicht nur von OxFol-1, sondern auch der 5-MTHF-basierten Analoga 6R-RedFol-1 und 6S-RedFol-1 mit einer Ausbeute von 2 bis 8% und einer Reinheit von > 98%. Im Vergleich zur Flüssigphasensynthese, die zur Herstellung von OxFol-1 sechs Säulenchromatographieschritte erforderte, wurde die Anzahl der Reinigungsschritte in beiden Ansätzen auf nur eine finale HPLC Aufreinigung reduziert. Ansatz 2 wurde auch für die Synthese von Folatkonjugaten ohne Albuminbinder (OxFol-14, 6R-RedFol-14 und 6S-RedFol-14) angewendet, die mit einer Ausbeute von 9 bis 15% und einer Reinheit von > 95% gewonnen wurden. Die präklinische Evaluation ergab, dass die Auswahl der

einzelnen funktionellen Einheiten einen entscheidenden Einfluss auf das Verteilungsmuster des Folat-Radiokonjugats hatte, wobei das beste Ergebnis mit [<sup>177</sup>Lu]Lu-6R-RedFol-1 erzielt wurde, in dem 6R-5-MTHF als Targeting-Einheit und ein Albuminbinder zur Verbesserung der Blutzirkulation kombiniert wurden.

Im nächsten Schritt haben wir die Auswirkungen unterschiedlicher proteinbindender Strukturen auf das Gewebeverteilungsprofil von PSMA-Radioliganden untersucht. Frühere Studien mit einem PSMA-Radioliganden, der einen starken Albuminbinder enthielt ([<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-ALB-56), zeigten eine mehr als zweifach erhöhte Tumoraufnahme im Vergleich zu [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-617, aber auch hohe Aktivitätswerte im Blut (7-fach erhöht), was in einer klinischen Anwendung möglicherweise zu Toxizität im roten Knochenmark führen könnte. In **Kapitel 3** wird die Entwicklung von vier PSMA-Liganden beschrieben, die Ibuprofen als schwächeren Albuminbinder enthielten und über unterschiedlich geladene Linker mit einem PSMA-617-basierten Grundgerüst verbunden wurden. Die Liganden, die entweder keinen zusätzlichen Linker (Ibu-PSMA), ein negativ geladenes Aspartat (Ibu-D $\alpha$ -PSMA), ein neutrales Asparagin (Ibu-N-PSMA) oder einen positiv geladenen Diaminobutanoat-Linker (Ibu-DAB-PSMA) enthielten, wurden nach einem adaptierten Festphasensyntheseverfahren in 15 bis 17 Schritten mit einer Ausbeute von 3 bis 15% und hoher Reinheit (> 99%) hergestellt. Die Bindung der radioaktiv markierten Liganden an Human- (93–95%) und Mausplasmaproteine (89–92%) war ähnlich wie die von [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-ALB-56 ( $95 \pm 1\%$  bzw.  $89 \pm 2\%$ ). Eine Ausnahme bildete [<sup>177</sup>Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA mit positiv geladenem Linker, das eine geringere Bindung an Human- und Mausplasmaproteine gezeigt hat ( $89 \pm 3\%$  bzw.  $86 \pm 1\%$ ). Andere in-vitro-Eigenschaften wie PSMA-Affinität, Zellaufnahme und Internalisierung unterschieden sich nicht zwischen den einzelnen mit Ibuprofen modifizierten PSMA Radioliganden. Die Flächen unter der Kurve (AUCs), die auf der Grundlage von Biodistributionsstudien mit PSMA-positiven PC-3 PIP-Tumormäusen berechnet wurden, zeigten die günstigste Gewebeverteilung für [<sup>177</sup>Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA. Dieser Radioligand wies ein höheres Tumor-zu-Blut-AUC-Verhältnis (~40) auf als [<sup>177</sup>Lu]Lu-PSMA-ALB-56 (~25) und die anderen mit Ibuprofen modifizierten Radioliganden (21–39). Offensichtlich hat die Ladung der Linker-Einheit in unmittelbarer Nähe des Albuminbinders einen starken Einfluss auf die Biodistribution der Radioliganden, wobei eine positive Ladung die Affinität zu Albumin leicht verringert und dadurch die Tumor-zu-Organ-Verhältnisse des Radioliganden erhöht hat.

Danach wurde untersucht, ob nur die Ladung des an den Albuminbinder angrenzenden Linkers für diese Befunde verantwortlich war oder ob auch dessen Länge das pharmakokinetische Verhalten der PSMA-Radioliganden beeinflussen würde. Aus diesem Grund wurde wie in **Kapitel 4** beschrieben die Lysin-basierte Linker-Einheit in Ibu-PSMA (hier als Ibu-PSMA-01 bezeichnet) durch eine Diaminobutanoat-Einheit (Ibu-PSMA-02) mit einer um zwei Kohlenstoffatome gekürzten Alkylkette ersetzt. Während ein kürzerer Linker die in-vitro-Eigenschaften des Radioliganden nicht wesentlich veränderte, hatte er doch einen erheblichen Einfluss auf die in-vivo-Eigenschaften. Trotz ähnlicher Affinität zu Mausalbumin wie [<sup>177</sup>Lu]Lu-Ibu-PSMA-01 (relative Affinität normalisiert auf 1.0), zeigte [<sup>177</sup>Lu]Lu-Ibu-PSMA-02

(relative Affinität: 1.1) in den Biodistributionsstudien eine wesentlich höhere Blutakkumulation ( $29 \pm 4\%$  IA/g vs.  $15 \pm 2\%$  IA/g 1 h nach Injektion) und infolgedessen auch eine höhere Aufnahme im Tumor ( $63 \pm 8\%$  IA/g vs.  $49 \pm 6\%$  IA/g 1 h nach Injektion) und in den Nieren ( $115 \pm 15\%$  IA/g vs.  $30 \pm 4\%$  IA/g 1 h nach Injektion). Aufgrund der übermäßigen Anreicherung von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-Ibu-PSMA-02 in den Nieren zu frühen Zeitpunkten haben wir beschlossen, unsere Studien mit [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-Ibu-DAB-PSMA als vielversprechendstem PSMA-Radioliganden fortzusetzen.

Bei der Evaluierung der Ibuprofen-enthaltenden PSMA-Radioliganden stellte sich die Frage, ob die Stereochemie des Ibuprofens die Affinität der Radioliganden zu Albumin und damit ihre Pharmakokinetik beeinflussen würde. In **Kapitel 5** berichten wir über die Synthese von SibuDAB unter Verwendung von (*S*)-Ibuprofen und RibuDAB unter Verwendung von (*R*)-Ibuprofen als stereoisomerenreine Analoga von Ibu-DAB-PSMA mit racemischem Ibuprofen. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB zeigte in Ultrafiltrationsstudien eine 11-fach stärkere Bindung an Mausplasmaproteine als [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB, während seine Bindung an menschliche Plasmaproteine um das Zweifache erhöht war. Die in Biodistributionsstudien an Mäusen ermittelten Blutaktivitätswerte von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB waren zu allen untersuchten Zeitpunkten doppelt so hoch wie die von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB. Im Gegensatz dazu zeigte [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB durchweg eine halb so hohe Nierenaufnahme wie [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB und folglich ein signifikant erhöhtes Tumor-zu-Nieren-Verhältnis.

Die Untersuchung von Blut- und Urinproben von Mäusen, denen einer der beiden Radioliganden injiziert wurde, zeigte, dass in vivo keine metabolische Inversion des einen Stereoisomers in das andere stattgefunden hat. Während innerhalb von vier Stunden nach der Injektion von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-SibuDAB nur eine geringe Menge an Radiometaboliten gebildet wurde (5–10%), war der Anteil nach der Injektion von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-RibuDAB wesentlich größer (9–33%). Die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Stereoisomere zeigen, wie wichtig strukturelle Details wie die Stereochemie von Radiopharmazeutika für deren Pharmakokinetik sind.

Auf der Suche nach einem optimalen Kompromiss zwischen Plasmaproteinbindung für eine hohe Tumoraufnahme und gleichzeitig effizienter Ausscheidung aus dem Blut haben wir eine neue Klasse von PSMA-Radioliganden entwickelt, die in **Kapitel 6** beschrieben wird. Diese neuen PSMA-Liganden wurden mit Einheiten modifiziert, die bekanntermaßen anstelle von oder zusätzlich zu ihrer Bindung an Serumalbumin an Transthyretin binden. Es wurden drei PSMA-Liganden synthetisiert, die entweder das auf Dimethylpyrazol basierende TTR-01 (PSMA-TTR-01), Diflunisal (PSMA-TTR-02) oder Mefenaminsäure (PSMA-TTR-03) enthalten. Während der Synthese kam es bei der Aktivierung der Carboxylgruppe unter Standardbedingungen zu einer Ausfällung von TTR-01 und Diflunisal, wodurch ihre Kopplung an den immobilisierten PSMA-Precursor gestört wurde. PSMA-TTR-01 und PSMA-TTR-02 wurden daher nur in geringen Ausbeuten (2% bzw. 3%) im Vergleich zu PSMA-TTR-03 (16%) erhalten. Die Kopplung wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht, wobei sich EDC als geeignetes alternatives Kopplungsreagenz erwies. Ultrafiltrationsstudien, die mit den neuen Radioliganden durchgeführt wurden, zeigten praktisch keine Bindung von [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-02



und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-03 an Transthyretin ( $< 5\%$ ), aber eine starke Bindung an Serumalbumin ( $> 91\%$ ), die im selben Bereich lag wie bei Radioliganden mit designierten Albuminbindern. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-02 und [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-03 sollten daher nicht als transthyretinbindende PSMA Radioliganden bezeichnet werden. Für [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-01 wurde jedoch eine beträchtliche Bindung an Transthyretin festgestellt ( $46 \pm 3\%$ ), was darauf hindeutet, dass TTR-01 tatsächlich einen Transthyretin-Binder darstellt. [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-PSMA-TTR-01 zeichnet sich durch diese Eigenschaft als interessanter Radioligand für weitere in-vitro- und schließlich in-vivo-Untersuchungen aus.

In einem letzten Schritt wollten wir untersuchen, ob uPAR-bindende Radiopeptide ebenfalls von einer verlängerten Zirkulationszeit im Blut profitieren könnten, wie mit albuminbindenden Folat-Radiokonjugaten und PSMA-Radioliganden erreicht. Aus diesem Grund wurden ein DOTA-enthaltender zyklischer uPAR-Ligand mit einer 4-(*p*-Iodophenyl)butanoat-Einheit (cyclo-uPAR-ALB-07) und sein Analogon ohne Albuminbinder (cyclo-uPAR-06) wie in **Kapitel 7** beschrieben synthetisiert. Die Synthesbedingungen wurden optimiert, um Racemisierungen und die Bildung von Nebenprodukten der wachsenden Peptidkette bei der Kopplung der einzelnen Aminosäuren zu unterdrücken, was die Ausbeute des Rohprodukts um 70% erhöhte. Für jedes Peptid wurden optimale Zyklisierungsbedingungen gefunden, wobei entweder DMSO als mildes Oxidationsmittel oder eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion verwendet wurde. Unsere Studien zeigten, dass eine erfolgreiche Zyklisierung von der Peptidstruktur abhängt und die Zyklisierungsbedingungen entsprechend gewählt werden müssen. Zellaufnahme- und Internalisierungsstudien in uPAR-transfizierten HEK-Zellen ergaben 3- bis 6-fach erhöhte Werte für [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-cyclo-uPAR-ALB-07 ( $8,2 \pm 1,1\%$  bzw.  $6,1 \pm 1,6\%$ ), das eine 4-(*p*-Iodophenyl)butanoat-Einheit enthält, im Vergleich zu [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-cyclo-uPAR-06 ( $3,1 \pm 1,2\%$  bzw.  $1,1 \pm 0,4\%$ ) ohne Albuminbinder. Beide zyklischen Radiopeptide haben jedoch eine geringere Zellaufnahme und Internalisierung als das lineare Referenz-Radiopeptid [ $^{177}\text{Lu}$ ]Lu-DOTA-AE105 ( $43 \pm 4\%$  bzw.  $19 \pm 3\%$ ) gezeigt. Weitere in-vitro-Untersuchungen sind zum Verständnis des beobachteten Verhaltens und anschließender Designoptimierung notwendig, um ein zyklisches uPAR-Radiopeptid zu erhalten, das für eine uPAR-Radioligandentherapie geeignet ist.

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse dieser Arbeit einen großen Fortschritt in der synthetischen Effizienz bei der Herstellung von Radiopharmazeutika dar, der sich direkt auf die Entwicklung von Liganden für die untersuchten Targets und andere relevante tumorassoziierte Rezeptoren übertragen lässt. Unsere biologischen Untersuchungen haben gezeigt, dass jedes Targeting-System einzigartig ist, was die Definition einer idealen Zusammensetzung für jede einzelne Art von Targeting-Einheit erfordert. In dieser Arbeit wurden die chemischen Einheiten identifiziert, die das Biodistributionsprofil der verschiedenen Radioliganden günstig beeinflussen. Dies wird ihre optimale strukturelle Zusammensetzung für eine hohe Akkumulation im Tumor bei schneller Ausscheidung aus gesundem Gewebe und Organen aufklären.