

University of Groningen

Modular Approaches in PET-tracer Development

Böhmer, Verena

DOI:
[10.33612/diss.133809999](https://doi.org/10.33612/diss.133809999)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Böhmer, V. (2020). *Modular Approaches in PET-tracer Development: Radiotracer Design, Synthesis and Automation for Prostate Cancer and Heart Failure*. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.133809999>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Chapter 8

Summary

8.1 Summary

Positron emission tomography (PET) is a renowned non-invasive medical imaging technique that is instrumental in the diagnosis of diseases by visualizing specific biomarkers, such as receptors, transporters and physiological processes that are characterizing a specific disease-pattern by using radiopharmaceuticals. The most prominent and applied radiopharmaceutical is the radioactive variant of glucose, [^{18}F]fluoro-deoxy glucose, that is used for the detection of cancerous tissue. However, researchers are looking for other targets that are able to just as precisely detect other diseases. Nowadays, the daily clinical routine includes 52 radiopharmaceuticals that are approved by the Food-and-Drug Administration (FDA) (2020) and many more that fulfil the required performance and safety regulation, but are not yet FDA approved. In Europe, the European Medicines Agency (EMA) is responsible for the registration of clinical used radiopharmaceuticals, however it records less approvals. This fact is due to the registration procedure in which the approval of a radiopharmaceutical in one country can be used throughout Europe given its original reference is provided. In this thesis, we were focusing on the modularity of the development of radiotracer synthesis. Herein, we include the modular design, its synthesis and automation of molecular imaging agents for PET imaging purposes for prostate cancer and heart failure.

Radiopharmaceuticals need to accumulate and remain at the target site for sufficient amount of time to be able to provide diagnostically relevant images. Hence, their pharmacokinetics and pharmacodynamics need to be studied, as the radiopharmaceutical should show the specific target-interactions. The binding strength is usually measured in the binding affinity, which can be altered due to influences caused by biological factors and barriers after injection. One way to improve binding affinity is the nature-inspired concept of multivalency, which enables the tight binding of even weak ligands by having multiple copies of the ligand on the surface. This high ligand concentration provides the ability for a rebinding of the molecules after a first release. How such a multivalent molecular imaging agent can influence the binding affinity and improve the imaging characteristics is elaborated in **chapter 2** of this thesis. Herein, a step-wise synthesis approach for multivalent molecular imaging agents was introduced, which includes recent findings in the fields of drug delivery, medical imaging and biophysics to be able to synthesize a medical imaging agent with the desired properties. These properties include the factors influencing the pharmacodynamics of the imaging agent as well as its pharmacokinetics. This chapter describes the influence of homo- or heteroligand imaging systems, varying linker lengths as well as its composition that influences the metabolism, tissue accumulation and protein binding. As the development of such a multivalent probe requires the careful consideration of these factors, it can be counted as a modular approach, as only its optimal composition results in a diagnostically relevant image.

The focus of nuclear medicine in the last decade was pressed by targeting the prostate-specific membrane antigen (PSMA) for staging and monitoring prostate cancer and its recurrent disease and became one of the most studied targets in radiopharmaceutical sciences. The well-established binding-motif and the elaborated *in vitro* and *in vivo* protocols make PSMA-targeting radiotracers a very interesting showcase for several synthesis approaches. The same

binding motif was used in **chapter 3** to introduce a modular imaging agent that can couple different imaging tags on the binding motif utilizing the modular copper-catalyzed click reaction of azides with alkynes. Herein, we used an alkyne-functionalized PSMA-binding motif that was clicked to a radioactively labelled compound to produce [^{18}F]PSMA-MIC01. *In vitro* studies showed its specific binding towards PSMA-expressing cells and the corresponding *in vivo* evaluation including the comparison to the clinically used PSMA-targeting radiopharmaceutical [^{68}Ga]PSMA-HBED-CC revealed similar imaging properties of the two tracers. This showed that the modular PSMA-targeting moiety remained its binding affinity towards PSMA, while the radioactive label can be replaced with other imaging tags such as fluorescent dyes easily due to the clickable nature of the here presented radiotracer.

In **chapter 4** we introduced the prototype of the radiosynthesis module FlowSafe, which was used to automatize the synthesis of [^{18}F]PSMA-MIC01. This module combines in-batch reactions with microfluidics, this enables the synthesis-specific rearrangement of the FlowSafe radiosynthesis module to obtain the optimal synthesis yield. The optimization of the FlowSafe setup was conducted during the implementation of [^{18}F]PSMA-MIC01 and further expanded for the synthesis of the second generation [^{18}F]PSMA-MIC02 radiotracer as well as [^{18}F]fluoropyridine, *N*-succinimidyl-4-[^{18}F]fluorobenzoate ([^{18}F]SFB) and [^{18}F]PSMA-1007. While we could successfully synthesize [^{18}F]fluoropyridine, [^{18}F]PSMA-1007 and [^{18}F]PSMA-MIC02, we could not yet successfully produce [^{18}F]SFB. While the fluorination step to obtain ethyl-[^{18}F]fluorobenzoate was successful, the third synthesis step resulted in a leakage at the FlowSafe module, which requires a change of the setup or different synthesis method. However, we could show that different radiotracers with different leaving groups and reaction mechanisms can successfully be synthesized with this new radiosynthesis module by rearranging the batch reactor, microreactor and tubes.

After the stepwise synthesis approach for multivalent imaging agents, the introduction of [^{18}F]PSMA-MIC01 and the radiosynthesis module FlowSafe, we tried to improve binding affinities of radiotracers. For achieving this, we first introduced the second generation of [^{18}F]PSMA-MIC in **chapter 5** consisting of three new PSMA-targeting tracers that are supposed to determine the best linker composition by performing a click reaction not only on an alkyne-functionalized PSMA-binding motif but also on an azide-functionalized motif. This gave a rigid triazole-benzene linker and a more flexible triazole-methyl-benzene-linker and we included two radiotracers that are targeting the arene-binding site of PSMA. However, the introduced electron-rich aromatic was discovered to have the sub-optimal face-to-edge orientation based on molecular docking studies, which showed in the case of [^{18}F]PSMA-MIC02 indeed an improved binding affinity, however, the difference was not as much as expected, concluding that an electron-deficient aromatic should be used for targeting the arene-binding site. The same study also showed that the more rigid triazole-benzene linker had a higher binding affinity than the more flexible triazole-methyl-benzene-linker. The best binder [^{18}F]PSMA-MIC02 was successfully radiolabeled and automatized using the FlowSafe radiosynthesis module.

After improving the binding affinity by analyzing the pharmacophore, we used in **chapter 6** the concept of multivalency to improve binding affinity. Herein, we aimed to target the β -

adrenergic receptors, which are the most prominent adrenergic receptors on the cardiac muscle as this target is not as flexible as PSMA which simplifies a proof-of-concept study in this early phase. Therefore, we synthesized a propranolol-derivative which was coupled to a tri-ethylene glycol linker that was functionalized with an azide-moiety that can undergo the copper-catalyzed click reaction to form a trimeric ligand. The successfully synthesized monomer and the trimer were tested *in vitro*, in which the trimer showed a 3-fold increase in binding affinity, proofing that multivalency indeed improved the binding affinity. However, the synthesized monomer was not enantiomerically pure but a racemate, while it is known that the (*S*)-enantiomer of the binding motif is the active form. Consequently, the trimer was obtained in a statistic mixture of active- and non-active binding motives. For future studies this need to be improved which is expected to bring an even larger increase as a consequence of multimerization.

All in all, this thesis provides an overview about different forms of modularity in the development of different radiotracers for prostate cancer and heart failure using the modular click reaction. Automation with a customized radiosynthesis module that can easily be rearranged for optimal an optimal synthesis set-up was shown, which enabled the synthesis of clinically used radiotracer and radioactively labelled prosthetic groups for further radiopharmaceutical productions.

8.2 Samenvatting

Positron emissie tomografie (PET) is een gerenommeerde niet-invasieve medische beeldvormingstechniek die behulpzaam is bij de diagnose van ziektes. Hierbij worden specifieke biologische indicatoren, zoals receptoren, transporters en andere fysiologische processen die karakteristiek zijn voor een specifiek ziektebeeld in beeld gebracht door gebruik te maken van radioactieve geneesmiddelen (radiotracer). De meest toegepaste radiotracer is de radioactieve vorm van glucose, [^{18}F]fluorodeoxyglucose, die gebruikt wordt voor de detectie van kanker. Maar onderzoekers zijn nog steeds bezig om andere biomoleculen (targets) te vinden, die net zo goed en precies andere ziektes kunnen detecteren. In dit proefschrift zijn we gefocust op de modulariteit van de ontwikkeling van de radiotracer synthese. Hierbij hebben we een modulair design, synthese en automatisering beschreven van moleculaire beeldvormende middelen met het doel om prostaatkanker en hartfalen door middel van de PET beeldvorming af te beelden.

Radiotracers moeten zich stapelen in weefsel, en voor een voldoende tijd in het target blijven, om een diagnostisch relevant beeld te verkrijgen. Daarom moeten hun farmacodynamiek en farmacokinetiek worden bestudeerd, omdat de radiotracer een specifieke target - interactie, oftewel binding, zou moeten tonen. Deze bindingskracht wordt gemeten als bindingsaffiniteit en kan na injectie vanwege de invloed van biologische factoren en barrières, de *in vivo* eigenschappen en bindingskracht veranderen. Een manier om de bindingsaffiniteit te verhogen is de toepassing van het natuur-geïnspireerde concept van multivalentie. Hierbij kan een sterke binding van, op zichzelf zwakke, liganden bereikt worden door de aanwezigheid van meerdere liganden op het oppervlak van het beeldvormende molecuul. Deze hoge ligandenconcentratie biedt de mogelijkheid voor herbinden van de liganden nadat de voorgaande target-ligand binding is afgebroken. Hoe op deze manier een multivalent moleculair beeldvormend middel de bindingsaffiniteit met het target kan beïnvloeden en de beeldvormende kenmerken kan verbeteren is uitgewerkt in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift. We hebben een stapsgewijze synthese aanpak voor multivalente moleculaire beeldvormende middelen geïntroduceerd, die de recente inzichten in de gebieden van medicijnafgifte, medische beeldvorming en biofysica omvatten, om in staat te zijn een multivalent beeldvormend middel met de gewenste eigenschappen te synthetiseren. Deze eigenschappen bevatten de factoren die de farmacodynamiek van het beeldvormend middel beïnvloeden, als ook de farmacokinetiek. Dit hoofdstuk beschrijft de invloed van homo- en heteroligandsystemen, verbindingen (linker) met verschillende lengtes als ook de chemische samenstelling die invloed heeft op het metabolisme, accumulatie in het weefsel en eiwitbinding. Omdat de ontwikkeling van een dergelijk multivalent middel zorgvuldige overwegingen van deze factoren nodig heeft, kan het meegeteld worden als een modulaire aanpak, omdat alleen de optimale samenstelling leidt tot een diagnostisch relevant beeld.

In de nucleaire geneeskunde van het laatste decennium is veel focus geweest op het prostaatspecifieke membraan antigeen (PSMA), voor de observatie en stadiumindeling van prostaatkanker. Hiermee werd het tevens een van de meest bestudeerde targets in de radiofarmaceutische wetenschappen. Dit goed bestudeerde bindingsmotief en de bekende *in vitro* en

in vivo eigenschappen maken van PSMA-bindende radiotracers een erg interessante showcase voor verschillende synthese benaderingen. Hetzelfde bindingsmotief is gebruikt in **hoofdstuk 3** om een modulair beeldvormende middel te introduceren dat gekoppeld kan worden aan verschillende beeldtags waarbij gebruik gemaakt wordt van de modulaire koper-gekatalyseerde klik reactie van aziden met alkynen. Hierbij hebben we een alkyn-gefunctionaliseerd PSMA-bindingsmotief gebruikt dat gekoppeld werd aan een radioactief gemaakte linker om de nieuwe radiotracer [^{18}F]PSMA-MIC01 te produceren. *In vitro* studies hebben de specifieke binding aan PSMA-expresserende cellen aangetoond. De corresponderende *in vivo* evaluatie, die ook een vergelijking met het klinisch gebruikte PSMA-bindend radiotracer [^{68}Ga]PSMA-HBED-CC bevat, heeft dezelfde beeldvormende eigenschappen van de twee radiotracers vergeleken. Dit heeft aangetoond dat het modulaire PSMA-bindend motief zijn bindingsaffiniteit voor PSMA heeft behouden, terwijl de radioactieve marker met andere beeldvormende modaliteiten zoals fluorescente kleurstoffen gemakkelijk gewisseld kunnen worden door de klik eigenschappen van de hier gepresenteerde radiotracer.

In **hoofdstuk 4** introduceren we een prototype van het bereidingsapparaat FlowSafe voor radiosyntheses, welke gebruikt werd om de synthese van [^{18}F]PSMA-MIC01 te automatiseren. Deze module combineert in-batch reacties met microfluidica en maakt de synthese-specifieke samenstelling van de FlowSafe mogelijk om een optimale synthese opbrengst te verkrijgen. De optimalisering van de FlowSafe set-up was uitgevoerd tijdens de implementatie van [^{18}F]PSMA-MIC01 en verder uitgebreid voor de synthese van een tweede generatie radiotracer, [^{18}F]PSMA-MIC02, evenals [^{18}F]fluorpyridine, *N*-succinimidyl-4-[^{18}F]fluorbenzoaat ([^{18}F]SFB) en [^{18}F]PSMA-1007. Terwijl de radiotracers [^{18}F]fluorpyridine, [^{18}F]PSMA-1007 en [^{18}F]PSMA-MIC02 met succes gesynthetiseerd konden worden, is het tot nu toe nog niet gelukt om [^{18}F]SFB te produceren. De fluoridering, nodig om ethyl-[^{18}F]fluorbenzoate te synthetiseren was gelukt, maar de derde synthese stap veroorzaakte een lekkage in de FlowSafe. Vandaar moet de set-up of de synthese methode veranderd worden. Wel kon er aangetoond worden dat er verschillende radiotracers met verschillende vertrekkende groepen en reactiemechanismen op de FlowSafe gesynthetiseerd kunnen worden, waarbij de volgorde van batchreactoren, microreactor en de slangen naar wens veranderd kan worden.

Na de stapsgewijze synthese aanpak voor multivalente beeldvormende middelen, de introductie van [^{18}F]PSMA-MIC01 en het bereidingsapparaat FlowSafe, hebben we geprobeerd om de bindingsaffiniteit van tracers te verbeteren. Om dit te bereiken hebben we een tweede generatie van [^{18}F]PSMA-MIC ontwikkeld in **hoofdstuk 5**. Deze bestaat uit drie nieuwe PSMA-bindende tracers waarbij verwacht wordt de beste linker samenstelling te kunnen bepalen, door wederom gebruik te maken van klik reacties. In dit geval niet alleen van het alkyn-gefunctionaliseerde PSMA-bindingsmotief, maar ook op een azide-gefunctionaliseerd motief. Deze leveren, respectievelijk, een stijve triazool-benzeen linker en een iets flexibeler triazool-methylbenzeen-linker op. Tevens hebben we twee radiotracers geïncludeerd die ook gericht zijn op de arene-bindingsplaats van PSMA. De ingevoegde elektronenrijke aromatische ring heeft echter aangetoond een niet-optimale face-to-edge oriëntatie te hebben tijdens de binding aan PSMA. Dit werd gevonden met behulp van moleculaire docking studies, die in het geval voor [^{18}F]PSMA-MIC02 inderdaad een verbeterde bindingsaffiniteit opleverde. Dit verschil was niet

zo groot als verwacht, waardoor we concluderen dat een electronenarme aromatische ring gebruikt moet worden om een sterke interactie met de arene-bindingsplaats van PSMA te vormen. Dezelfde studie heeft aangetoond dat de stijvere triazool-benzeen-linker een hogere bindingsaffiniteit heeft dan de flexibelere triazool-methyl-benzeen linker. De beste binder [¹⁸F]PSMA-MIC02 werd met succes radioactief gemaakt en geautomatiseerd geproduceerd met behulp van de FlowSafe radiosynthese module.

Na het verbeteren van de bindingsaffiniteit door de analyse van de farmacofoor hebben we in **hoofdstuk 6** het concept van multivalentie gebruikt om de bindingsaffiniteit te verbeteren. We hebben gekozen om ons te richten op de β -adrenerge receptoren, de meest aanwezige adrenerge receptor op de hartspier, omdat dit target niet zo flexibel is als PSMA en daardoor een proof-of-concept studie vereenvoudigt. Hiervoor hebben we een propranolol-derivaat gesynthetiseerd die gekoppeld werd aan een azide-gefunctionaliseerde triethylene glycol linker die de kopergekatalyseerde klik reactie kan ondergaan om een trimeer-ligand te vormen. Het succesvol gesynthetiseerde monomeer en trimeer werden getest op hun *in vitro* eigenschappen, waar het trimeer een 3-voudig verhoogde bindingsaffiniteit heeft aangetoond en bevestigde dat multivalentie inderdaad de bindingsaffiniteit kan verbeteren. De synthese van de monomeer leverde niet een enantiomeer zuivere verbinding op maar een racemaat, hoewel al bekend is dat het (*S*)-enantiomeer van het bindingsmotief de actievere vorm is. Bijgevolg was het trimeer ook gesynthetiseerd als een statistisch mengsel van de actieve en niet-actieve bindingsmotieven. Vervolgstudies kunnen dit verbeteren en het is de verwachting dat dit door multimerisatie een zelfs een hogere bindingsaffiniteit kan opleveren.

Dit proefschrift geeft een overzicht van de verschillende vormen van modulariteit in de ontwikkeling van radiotracers voor prostaatkanker en hartfalen, gebruikmakend van klik reacties. Automatisering met een aangepast bereidingsmodule, die gemakkelijk veranderd kan worden voor een optimale synthese set-up, werd aangetoond. Dit maakt het mogelijk om ook radiotracers die al in de kliniek worden gebruikt en radioactief gemaakte prothetische groepen voor toekomstige radiotracerproductie te synthetiseren.

8.3 Zusammenfassung

Positronenemissionstomographie (PET) ist eine renommierte nicht-invasive Bildgebungstechnik, die mithilfe von radioaktiv-markierten Pharmaka (Radiopharmaka) spezifische biologische Indikatoren, wie zum Beispiel Rezeptoren, Transporter und physiologische Prozessen, die charakterisierend sind für ein spezifisches Krankheitsbild, optisch darstellen. Das am häufigsten verwendete und bekannteste Radiopharmakon ist die radioaktive Form von Glukose, das sogenannte [^{18}F]Fluorodeoxyglucose, welches für die Lokalisierung von unter anderem krebsartigem Gewebe benutzt wird. Forscher suchen jedoch nach weiteren Biomolekülen (Targets) die genau so präzise andere Krankheiten erkennen können. In dieser Doktorarbeit haben wir uns auf die Modularität während der Entwicklung von neuen Radiopharmaka fokussiert. Dazu gehört die Modularität in Design, Synthese und Automatisierung von molekularen Bildgebungsmitteln zum Zwecke der PET-Bildgebung für Prostatakrebs und Herzinsuffizienz.

Radiopharmaka müssen sich im Target ansammeln und dort für eine ausreichende Zeitspanne verbleiben, um in der Lage zu sein ein diagnostisch wertvolles Bild zu bekommen. Daher müssen sowohl die Pharmakodynamik als auch die Pharmakokinetik studiert werden, da Radiopharmaka eine hohe Bindungsstärke aufweisen müssen. Diese Bindungsstärke wird im Allgemeinen gemessen anhand der Bindungsaffinität, die infolge der äußeren Einflüsse von biologischen Faktoren und Barrieren nach der Injektion verändert werden können. Eine Möglichkeit um die Bindungsaffinität zu erhöhen, ist die Anwendung des von der Natur inspirierten Konzeptes der Multivalenz. Dieses Konzept ermöglicht selbst bei Liganden mit schwacher Affinität nur durch die Präsenz von mehreren Liganden an der Oberfläche des Pharmakons eine starke Bindung zu erzeugen. Diese hohe Ligandenkonzentration gibt die Möglichkeit zum erneuten binden, nachdem die vorhergehende Bindung gelöst wurde. Wie so ein multivalentes molekulares Bildgebungsmittel die Bindungsaffinität beeinflussen und die Bildgebungseigenschaften verbessern kann, wurde in **Kapitel 2** dieser Doktorarbeit ausgearbeitet. Hierfür wurde ein schrittweiser Syntheseansatz für multivalente molekulare Bildgebungsmittel vorgestellt, welcher jüngste Erkenntnisse in den Bereichen der Arzneimittalabgabe, Medizinische Bildgebung und Biophysik beinhaltet, um in der Lage zu sein ein multivalentes Bildgebungsmittel zu synthetisieren, welches die gewünschten Eigenschaften ausweist. Diese Eigenschaften beinhalten Faktoren, die die Pharmakodynamik des Bildgebungsmittels beeinflussen als auch seine pharmakokinetischen Eigenschaften. Dieses Kapitel umfasst die theoretischen Einwirkungen von homo- und heteroligand Bildgebungssystemen, verschieden lange Linkern, sowie ihre Komposition, die sich auf den Metabolismus, die Gewebeansammlung und Proteinbindung auswirken. Da die Entwicklung solch eines multivalenten Bildgebungsmittel die sorgfältige Betrachtung dieser Faktoren erfordert, kann auch dies zu den modularen Ansätzen gezählt werden, da nur ihre optimale Zusammensetzung ein diagnostisch relevantes Bild geben wird.

Im Laufe des letzten Jahrzehntes hat sich die Nukleare Medizin zunehmend auf die Bildgebung des Prostata-spezifische Membran Antigens (PSMA) fokussiert, welches ein sehr gutes Target für die Einstufung und Überwachung von Prostata Krebs und seinem Rezidiv darstellt. Dadurch

wurde es zu einem der beststudiertesten Targets in den Radiopharmazeutischen Wissenschaften. Das etablierte Bindungsmotif und die sehr gut ausgearbeiteten *in vitro* und *in vivo* Protokolle machen PSMA-bindende Radiotracer zu einem sehr interessanten Vorführmodell für verschiedene Syntheseansätze. Dasselbe Bindungsmotif wurde auch in **Kapitel 3** genutzt, in dem ein neues, modulares Bildgebungsmittel vorgestellt wird, das sowohl radioaktiv markiert, als auch an andere Bildgebungsgruppen gekoppelt werden kann. Dies wird erreicht durch die Anwendung der modularen Kupfer-katalysierten Klick-Reaktion von Aziden mit Alkinen. Hierfür benutzen wir ein Alkin-funktionalisiertes PSMA-Bindungsmotif, das an einen radioaktiv-markierten Linker gekoppelt wird, um [^{18}F]PSMA-MIC01 zu synthetisieren. *In vitro* Studien haben bewiesen, dass dieser Radiotracer spezifisch an PSMA-exprimierende Zellen bindet. Die *in vivo* Evaluierung von [^{18}F]PSMA-MIC01 zieht gleichzeitig auch einen Vergleich mit dem in der Klinik genutzten PSMA-bindendem Radiopharmakon [^{68}Ga]PSMA-HBED-CC. Dies offenbart, dass beide Radiopharmaka ähnliche Bildgebungseigenschaften aufweisen. Dies beweist, dass das modulare PSMA-Bindungsmotif seine Bindungsaffinität zu PSMA nicht verliert und daher der radioaktive Linker einfach mit jeglicher anderen Bildgebungsgruppe, wie zum Beispiel fluoreszierende Farbstoffen, ersetzt werden kann.

In **Kapitel 4** stellen wir einen Prototypen des Radiosynthesemodules FlowSafe vor, welcher benutzt wurde um [^{18}F]PSMA-MIC01 zu automatisieren. Dieses Modul kombiniert in-Batch Synthesen mit Mikrofluidik und ermöglicht eine Neuordnung der Komponenten des FlowSafes vor zu nehmen, um eine bestmögliche Syntheseausbeute zu bekommen. Die Optimierung der FlowSafe Konfiguration wurde während der Implementierung von [^{18}F]PSMA-MIC01 durchgeführt und für die Synthese der zweiten Generation [^{18}F]PSMA-MIC02 sowie [^{18}F]Fluoro-Pyridine, *N*-Succinimidyl-4- ^{18}F Fluorobenzoate ([^{18}F]SFB) und [^{18}F]PSMA-1007 erweitert. Während wir erfolgreich [^{18}F]Fluoro-Pyridine, [^{18}F]PSMA-1007 und [^{18}F]PSMA-MIC02 synthetisiert haben, konnten wir bisher noch keine erfolgreiche Produktion von [^{18}F]SFB aufzeichnen. Der erste Reaktionsschritt, die Fluorinierung, die das Zwischenprodukt [^{18}F]Fluorobenzoat bildet, war erfolgreich, jedoch entsteht bei der Ester Aktivierung mit einer Kupplungsreagenz ein Leck innerhalb der FlowSafe Komponenten, wodurch diese Synthese entweder eine Veränderung des Aufbaus oder der Synthesemethode benötigt. Jedoch konnten wir zeigen, dass verschiedene Radiopharmaka mit verschiedenen Austrittsgruppen und Reaktionsmechanismen erfolgreich mit diesem neuen Radiosynthesemodul synthetisiert werden können durch eine einfache Neuordnung von Batch-Reaktoren, Mikroreaktoren und Schläuchen.

Nach dem Syntheseansatz für multivalente Bildgebungsmittel, der Einführung von [^{18}F]PSMA-MIC01 und das Radiosynthesemodul FlowSafe, fokussierten wir uns auf die Verbesserung der Bindungsaffinität von Liganden. Um dies zu erreichen, entwickelten wir in **Kapitel 5** eine zweite Generation von [^{18}F]PSMA-MIC, die drei neue PSMA-bindende Tracer umfasst, mit denen der beste Linker und dessen Komposition bestimmt werden kann, die mithilfe von Klick Chemie nicht nur an das Alkin-funktionalisierte PSMA-Bindungsmotive, sondern auch an ein Azide-funktionalisiertem Motif gekoppelt werden. Dieses Experiment ergab zwei verschiedene Linker-Kompositionen, einen starren Triazol-Benzen-Linker und einen flexibleren Triazol-

Methyl-Benzen-Linker. Darüber hinaus haben wir zwei Radiotracer hinzugefügt die an die Arene-Bindungsseite von PSMA binden. Jedoch zeigte eine Molekulare Bindungsstudie, dass der eingefügte elektronenreiche aromatische Ring eine suboptimale face-to-edge Orientierung formt, wobei im Fall von [¹⁸F]PSMA-MIC02 diese jedoch tatsächlich eine verbesserte Bindungsaffinität aufweisen konnte. Leider war der Unterschied nicht so ausgeprägt wie erhofft., was darauf schließen lässt, dass ein elektronenarmer aromatischer Ring besser geeignet ist um eine Interaktion mit der Aren-Bingunsseite einzugehen. Die gleiche Studie zeigte außerdem, dass der festere Triazol-Benzen-Linker eine höhere Bindungsaffinität hatte als der flexiblere Triazol-Methyl-Benzen-Linker. Das Radiopharmakon mit der höchsten Bindungsaffinität [¹⁸F]PSMA-MIC02 wurde erfolgreich radioaktiv markiert und mit dem FlowSafe automatisiert.

Nach Verbesserung der Bindungsaffinität durch die genaue Analyse des Pharmakophores, verwendeten wir in **Kapitel 6** das Konzept der Multivalenz, um die Bindungsaffinität zu verbessern. Im Gegensatz zu den vorherigen Kapiteln haben wir uns in diesem Kapitel entschieden die β -Adrenozeptoren als Target zu nutzen, welche auf dem Herzmuskel die bekanntesten Adrenorezeptoren sind, da dieses Target eine geringere Flexibilität aufweist als PSMA und für den konzeptionellen Beweis vereinfacht. Daher haben wir ein Propranolol-Derivat synthetisiert, welche an einen Azide-funktionalisierten Triethylenglycol Linker gekoppelt wurde. Mithilfe der Klick Reaktion wurde ein Trimer geformt. Die erfolgreich synthetisierten Mono- und Trimere wurden auf ihre *in vitro* Bindungsaffinität getestet, wobei der Trimer eine dreifach erhöhte Bindungsaffinität aufweisen konnte. Allerdings war das synthetisierte Monomer nicht enantiomerenrein sondern ein Racemate, wohingegen bekannt ist, dass das (S)-enantiomer des benutzten Bindungsmotives die aktive Form ist. Daher wurde der Trimer als statistische Mischung aus aktiven und nicht-aktiven Bindungsmotiven benutzt. Für zukünftige Studien muss dies verbessert werden wobei davon auszugehen ist, dass Multimerisation eine noch höhere Verbesserung erreichen kann als bisher hier gezeigt.

Alles in allem gibt diese Doktorarbeit eine Übersicht der verschiedenen Formen von Modularität innerhalb der Entwicklung von verschiedenen Radiotracern für Prostatakrebs und Herzinsuffizienz unter Verwendung der modularen Klick Reaktion. Es wurde gezeigt, dass die Automatisierung mit einem angepassten Radiosynthesemodul, dass durch eine einfache Neuordnung eine gute Konfiguration für verschiedene Radiopharmaka erreicht werden kann, die die Synthese von klinisch genutzten Radiotracern und radioaktiv markierten prosthetischen Gruppe für weitere Radiopharmazeutische Produktion ermöglicht.

