

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik

Direktor: Prof. Dr. med. Jörg-Christian Tonn

in Zusammenarbeit mit

der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Biologische Evaluierung radioaktiv markierter Bindeproteine für die  
nuklearmedizinische Bildgebung der Glioblastom-Vaskulatur**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sarah Katharina Pfeiffer

aus Freiburg im Breisgau

2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. Rainer Glaß
Zweitgutachter:	Priv. Doz. Dr. rer. nat. Guido Böning
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	30.06.2017

## Zusammenfassung

Glioblastome sind die häufigsten und aggressivsten hirneigenen Tumore bei Erwachsenen und zeichnen sich durch eine starke Vaskularisierung aus. Selektive Marker der Glioblastom-assoziierten Neovaskulatur sind der Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3 und die Fibronektin-Spleißvariante ED-B. Beide sind im tumorfreien Gehirn nicht nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit wurden Bindeproteine mit Spezifität für VEGFR-3 oder ED-B auf ihre Eignung als Radiotracer für die nuklearmedizinische Bildgebung der Glioblastom-Vaskulatur untersucht.

Neben dem VEGFR-3-spezifischen Liganden VEGF-CC<sub>156S</sub> wurden hierfür Anticaline eingesetzt: künstliche Bindeproteine, die basierend auf dem Grundgerüst humaner Lipocaline durch kombinatorisches Proteindesign gewonnen werden. VEGF-CC<sub>156S</sub> und die Anticaline A5C3-QH (gegen VEGFR-3) und N7A (gegen ED-B) wurden nach der Iodogen-Methode mit <sup>123</sup>I markiert. Die *in-vitro*-Stabilität der [<sup>123</sup>I]iodierten Proteine wurde in Blutserum und Pufferlösungen und deren Bindungsaktivität auf Glioblastomzellen oder Glioblastomgewebeproben untersucht. Die *in-vivo*-Eigenschaften wurden mittels Szintigraphie und *ex-vivo*-Biodistributionsstudien an Mäusen mit subkutan inokulierten Glioblastomzellen charakterisiert. Mit N7E.107-PAS<sub>200</sub> stand im Verlauf der Arbeit eine optimierte ED-B-spezifische Anticalin-Variante zur Verfügung, die ortsspezifisch mit <sup>89</sup>Zr markiert und für bildgebende Untersuchungen mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) in einem orthotopen Glioblastom-Mausmodell angewendet wurde.

<sup>123</sup>I-VEGF-CC<sub>156S</sub>, <sup>123</sup>I-A5C3-QH und <sup>123</sup>I-N7A wurden mit Markierungsausbeuten von rund 80 % und radiochemischen Reinheiten von mehr als 95 % erhalten und waren stabil in Blutserum und Pufferlösungen. Nach Iodierung banden VEGF-CC<sub>156S</sub> und A5C3-QH *in vitro* spezifisch und mit guten Affinitäten ( $K_i = 44$  nM bzw.  $K_i = 46$  nM) auf VEGFR-3-positiven Glioblastomzellen. Auf Glioblastomgewebe zeigten die Anticaline <sup>123</sup>I-A5C3-QH und <sup>123</sup>I-N7A eine spezifische, heterogene und mehr als 3-fach erhöhte Anreicherung gegenüber tumorfreiem Gehirngewebe. *In vivo* ließen sich subkutane U87MG-Tumore mit <sup>123</sup>I-VEGF-CC<sub>156S</sub> (gegen VEGFR-3) und <sup>123</sup>I-N7A (gegen ED-B) trotz niedriger Anreicherungsgrade 24 h p.i. szintigraphisch abgrenzen (Tumor/Kontralateral = 1,8 bzw. 2,2). Demgegenüber reicherte <sup>123</sup>I-A5C3-QH (gegen VEGFR-3) nicht im Tumor an und wurde zügig renal ausgeschieden. Mit <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> (gegen ED-B) gelang die spezifische Darstellung orthotoper GL261-Tumore mittels PET mit ausgezeichnetem Bildkontrast (Tumor/Kontralateral = 8,2), der höher war als mit dem etablierten Gehirntumor-Tracer <sup>18</sup>F-FET.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sich mit den untersuchten [<sup>123</sup>I]iodierten Bindeproteinen *in vitro* sowohl VEGFR-3 als auch ED-B adressieren lassen. Während VEGFR-3-spezifische Anticaline für die *in-vivo*-Anwendung weiterer Optimierung bedürfen, steht mit <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> ein ED-B-spezifisches Anticalin für die präklinische, PET-gestützte Glioblastom-Bildgebung zur Verfügung.

## Abstract

Glioblastomas are the most common and most aggressive primary brain tumors in adults and they are characterized by a strong vascularization. The cell surface receptor VEGFR-3 and the fibronectin splice variant ED-B are selective markers of the glioblastoma-associated neovasculature. Both are not detectable in a tumor-free brain. Binding proteins directed against VEGFR-3 or ED-B were investigated in the present study for their suitability as radiotracers for nuclear medical imaging of the glioblastoma-associated vasculature.

Besides the VEGFR-3 specific ligand VEGF-C<sub>C156S</sub>, anticalins have been employed for this purpose: artificial binding proteins obtained via combinatorial protein design from the human lipocalin scaffold. VEGF-C<sub>C156S</sub> and the anticalins A5C3-QH (against VEGFR-3) and N7A (against ED-B) were labeled with <sup>123</sup>I using the iodogen method. The *in vitro* stability of the [<sup>123</sup>I]iodinated proteins was investigated in blood serum and buffer solutions and their binding activity was analyzed on glioblastoma cells or on glioblastoma tissue samples. *In vivo* properties were studied in mice with subcutaneously inoculated glioblastoma cells using scintigraphy and *ex vivo* biodistribution studies. In the form of N7E.107-PAS<sub>200</sub>, an optimized ED-B-specific anticalin variant had become available in the course of the research and was site-specifically labeled with <sup>89</sup>Zr and utilized for positron emission tomography (PET) studies in an orthotopic glioblastoma mouse model.

<sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub>, <sup>123</sup>I-A5C3-QH and <sup>123</sup>I-N7A were obtained in labeling yields of about 80 % and with radiochemical purities greater than 95 %. They were stable in blood serum and buffer solutions. Iodinated VEGF-C<sub>C156S</sub> and A5C3-QH bound specifically and with high affinities ( $K_i = 44$  nM and  $K_i = 46$  nM, respectively) on VEGFR-3 positive glioblastoma cells. The anticalins <sup>123</sup>I-A5C3-QH and <sup>123</sup>I-N7A displayed a specific and heterogenous accumulation in glioblastoma tissue sections that was increased more than 3-fold compared with tumor-free brain samples. Despite low tumor accumulation *in vivo*, subcutaneous U87MG tumors could be visualized by scintigraphy 24 h after injection of <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub> (against VEGFR-3) or <sup>123</sup>I-N7A (against ED-B) with tumor/contralateral ratios of 1.8 or 2.2, respectively. In contrast, <sup>123</sup>I-A5C3-QH (against VEGFR-3) underwent rapid renal clearance and did not accumulate in tumors. <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> (against ED-B) allowed specific PET imaging of orthotopic GL261-tumors with an excellent tumor/brain contrast, which at 8.2 was higher than if the established brain tumor tracer <sup>18</sup>F-FET had been used.

In conclusion, both VEGFR-3 and ED-B can be specifically targeted by the investigated [<sup>123</sup>I]iodinated binding proteins *in vitro*. While VEGFR-3 specific anticalins require further optimization for future *in vivo* applications, the ED-B specific Anticalin <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> is available as a PET-tracer for future preclinical glioblastoma imaging studies.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Glioblastom.....	1
1.2 Vaskularisierung des Glioblastoms.....	2
1.3 Bildgebung des Glioblastoms.....	3
1.4 Radiotracer für die nuklearmedizinische Bildgebung des Glioblastoms.....	4
1.4.1 2-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-desoxy-D-glucose ( <sup>18</sup> F-FDG).....	5
1.4.2 Aminosäuretracer.....	6
1.4.3 3'-[ <sup>18</sup> F]Fluor-3'-desoxythymidin ( <sup>18</sup> F-FLT).....	6
1.5 VEGFR-3 und ED-B als Zielstrukturen für die nuklearmedizinische Bildgebung des Glioblastoms.....	7
1.5.1 Der Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3.....	7
1.5.2 Die Fibronectin-Spleißvariante ED-B.....	8
1.6 Anticaline.....	9
1.7 In der vorliegenden Arbeit untersuchte Bindeproteine.....	11
1.8 Zielsetzung.....	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	14
2.1.2 Geräte.....	14
2.1.3 Software.....	15
2.1.4 Proteine.....	16
2.1.5 Radionuklide.....	16
2.1.6 Tumorzelllinien.....	17
2.1.7 Blutserum.....	17
2.1.8 Gewebeproben.....	18
2.1.9 Versuchstiere.....	18
2.2 Allgemeine chromatographische und spektroskopische Methoden.....	18
2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC) radioaktiv markierter Proteine.....	18
2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	18
2.2.3 UV-Spektroskopie zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	19
2.2.4 Massenspektrometrie (MS).....	19
2.2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	20
2.3 Allgemeine zellbiologische Methoden.....	20
2.3.1 Kultivierung humaner Tumorzelllinien und Kryokonservierung.....	20
2.3.2 Mykoplasmentestung.....	21
2.3.3 Vorbereitung der Zellen für Wettbewerbsassays oder die Injektion in Mäuse.....	21
2.4 Allgemeine tierexperimentelle Methoden.....	21
2.4.1 Haltung der Versuchstiere und Anästhesie.....	21

2.4.2	Erzeugung subkutaner Tumore.....	22
2.4.3	Erzeugung intrakranieller Tumore.....	22
2.5	Darstellung von Aminoxy-NOTA.....	22
2.6	Markierungsreaktionen.....	24
2.6.1	Markierung mit $^{123}\text{I}$ .....	24
2.6.2	Markierung mit $^{127}\text{I}$ .....	24
2.6.3	Markierung mit $^{68}\text{Ga}$ .....	25
2.6.4	Markierung mit $^{89}\text{Zr}$ .....	25
2.7	<i>in-vitro</i> -Testmethoden.....	26
2.7.1	Untersuchung der Stabilität.....	26
2.7.2	Kompetitionsassay auf Tumorzelllinien.....	26
2.7.3	<i>in-vitro</i> -Autoradiographie auf Gewebeschnitten.....	27
2.8	<i>in-vivo</i> -Testmethoden.....	28
2.8.1	Szintigraphie.....	28
2.8.2	Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	29
2.8.3	Biodistribution.....	30
2.8.4	<i>ex-vivo</i> -Autoradiographie und Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	$^{123}\text{I}$ Iodierung von VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ , A5C3-QH und N7A und biologische Evaluierung der Markierungsprodukte.....	32
3.1.1	VEGFR-3-spezifischer Ligand VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ .....	32
3.1.1.1	$^{123}\text{I}$ Iodierung und Untersuchung der Stabilität.....	32
3.1.1.2	Untersuchung der Bindungsaktivität <i>in vitro</i> .....	33
3.1.1.3	Untersuchungen im subkutanen Mausmodell.....	34
3.1.2	VEGFR-3-spezifisches Anticalin A5C3-QH.....	38
3.1.2.1	$^{123}\text{I}$ Iodierung und Untersuchung der Stabilität.....	38
3.1.2.2	Untersuchung der Bindungsaktivität <i>in vitro</i> .....	39
3.1.2.3	Untersuchungen im subkutanen Mausmodell.....	42
3.1.3	ED-B-spezifisches Anticalin N7A.....	44
3.1.3.1	$^{123}\text{I}$ Iodierung und Untersuchung der Stabilität.....	44
3.1.3.2	Untersuchung der Bindungsaktivität <i>in vitro</i> .....	45
3.1.3.3	Untersuchungen im subkutanen Mausmodell.....	47
3.2	Arbeiten zur ortsspezifischen Markierung ED-B-spezifischer Anticaline mit PET-Nukliden.....	49
3.2.1	Darstellung und $^{68}\text{Ga}$ -Markierung von Aminoxy-NOTA.....	49
3.2.2	Ortsspezifische Markierung von N7E.107-PAS <sub>200</sub> mit $^{89}\text{Zr}$ und PET-Bildgebung im orthotopen Glioblastom-Mausmodell.....	51
4	Diskussion.....	53
4.1	$^{123}\text{I}$ Iodierung von VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ , A5C3-QH und N7A.....	53
4.2	Evaluierung des VEGFR-3-spezifischen Liganden $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ .....	53
4.3	Evaluierung des VEGFR-3-spezifischen Anticalins $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH.....	55
4.4	Evaluierung des ED-B-spezifischen Anticalins $^{123}\text{I}$ -N7A.....	57

4.5 Möglichkeiten zur ortsspezifischen Markierung ED-B-spezifischer Anticaline mit PET-Nukliden .....	59
4.6 Aminoxy-NOTA für die ortsspezifische Verknüpfung mit ED-B-spezifischen Anticalinen und deren Markierung mit $^{68}\text{Ga}$ oder $^{64}\text{Cu}$ .....	61
4.7 Anwendung des ortsspezifisch mit $^{89}\text{Zr}$ markierten ED-B-spezifischen Anticalins N7E.107-PAS <sub>200</sub> für die PET-Bildgebung im orthotopen Glioblastom-Mausmodell .....	62
4.8 Schlussbetrachtung.....	63
Anhang.....	66
Literaturverzeichnis.....	70

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Klinisch relevante Radiotracer für die Gehirntumor-Bildgebung .....	5
Abbildung 2.	Molekülstruktur der auf dem Lipocalin-Grundgerüst basierenden Anticaline. ....	10
Abbildung 3.	Boc-Aminooxy-NOTA.....	22
Abbildung 4.	Aminooxy-NOTA.....	23
Abbildung 5.	Aufreinigung des Markierungsproduktes $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ . ....	32
Abbildung 6.	Stabilität von $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ in Pufferlösungen und Blutserum. ....	33
Abbildung 7.	Bindungsaktivität von iodiertem VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ auf Glioblastomzellen.....	34
Abbildung 8.	Biodistribution und Szintigraphie nach i.v.-Injektion von $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ .....	36
Abbildung 9.	Aufreinigung des Markierungsproduktes $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH.....	38
Abbildung 10.	Stabilität von $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH in Pufferlösungen und Blutserum.....	39
Abbildung 11.	Bindungsaktivität von iodiertem A5C3-QH auf Glioblastomzellen.....	40
Abbildung 12.	Bindungsaktivität von $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH auf Glioblastomgewebe.....	41
Abbildung 13.	Biodistribution und Szintigraphie nach i.v.-Injektion von $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH. ....	43
Abbildung 14.	Aufreinigung des Markierungsproduktes $^{123}\text{I}$ -N7A.....	44
Abbildung 15.	Stabilität von $^{123}\text{I}$ -N7A in Pufferlösungen und Blutserum. ....	45
Abbildung 16.	Bindungsaktivität von $^{123}\text{I}$ -N7A auf Glioblastomgewebe.....	46
Abbildung 17.	Szintigraphie und Biodistribution nach i.v.-Injektion von $^{123}\text{I}$ -N7A. ....	48
Abbildung 18.	Darstellung von Aminooxy-NOTA. ....	49
Abbildung 19.	$^{68}\text{Ga}$ -Markierung von Boc-aminooxy-NOTA.....	50
Abbildung 20.	Tumoranreicherung von $^{89}\text{Zr}$ -N7E.107-PAS <sub>200</sub> im orthotopen Glioblastom-Mausmodell. ....	52
Abbildung 21.	Histidin- und Tyrosinreste im Bereich der Bindungsregion des Anticalins A5C3-QH. ....	56
Abbildung 22.	Neue Varianten ED-B-spezifischer Anticaline für die bioorthogonale Verknüpfung mit bifunktionellen Radiometall-Chelatoren. ....	60

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	In der vorliegenden Arbeit untersuchte Bindeproteine.....	12
Tabelle 2.	Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine. ....	16
Tabelle 3.	Physikalische Eigenschaften und Anwendung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Radionuklide. ....	17
Tabelle 4.	Biodistribution nach i.v.-Injektion von $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ .....	66
Tabelle 5.	Biodistribution nach i.v.-Injektion von $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ und einem Überschuss VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ .....	67
Tabelle 6.	Biodistribution nach i.v.-Injektion von $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH.....	68
Tabelle 7.	Biodistribution nach i.v.-Injektion von $^{123}\text{I}$ -N7A oder $^{123}\text{I}$ -Lcn2.....	69



## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
<sup>11</sup> C-MET	[ <sup>11</sup> C]Methyl-L-Methionin
DC	Dünnschichtchromatographie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED-B	Extradomäne B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
<sup>18</sup> F-Dopa	3,4-Dihydroxy-6-[ <sup>18</sup> F]fluor-L-phenylalanin
<sup>18</sup> F-FDG	2-[ <sup>18</sup> F]Fluor-2-desoxy-D-glucose
<sup>18</sup> F-FET	<i>o</i> -(2-[ <sup>18</sup> F]Fluorethyl)-L-tyrosin
<sup>18</sup> F-FLT	3'-[ <sup>18</sup> F]Fluor-3'-desoxythymidin
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
FKS	Fetales Kälberserum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
ID	Injizierte Dosis
<sup>123</sup> I-IMT	3-[ <sup>123</sup> I]Iod- $\alpha$ -methyl-L-tyrosin
i.v.	Intravenös
K <sub>d</sub>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LAT	L-Typ Aminosäuretransporter
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure
PAS	Polypeptid aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzsösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

p.i.	Nach Injektion ( <i>post injectionem</i> )
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RCP	Radiochemische Reinheit ( <i>radiochemical purity</i> )
RCY	Radiochemische Ausbeute ( <i>radiochemical yield</i> )
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
SA	Spezifische Aktivität
SD	Standardabweichung
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie ( <i>single photon emission computed tomography</i> )
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
$\bar{x}$	Arithmetisches Mittel

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Glioblastom

Glioblastome sind die häufigsten und gleichzeitig die aggressivsten hirneigenen Tumore bei Erwachsenen. Nach der WHO-Klassifikation der ZNS-Tumore wird ihnen der höchste Malignitätsgrad zugeordnet (Grad IV; Louis, 2016). In Europa und den USA treten Glioblastome mit einer Inzidenz von rund 3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern im Jahr auf (Ostrom, 2014; Garcia-Figueiras, 2015). Männer sind etwa 1,6-mal häufiger von einem Glioblastom betroffen als Frauen (Ostrom, 2014). Primäre Glioblastome manifestieren sich ohne Beleg für eine vorangehende Läsion niedrigeren Grades, machen 80–95 % aller Glioblastome aus (Ohgaki 2007; Thakkar 2014) und treten durchschnittlich im Lebensalter von 64 Jahren auf (Ostrom, 2014). Seltener vorkommende sekundäre Glioblastome gehen aus niedrigergradigen Gliomen hervor und das durchschnittliche Lebensalter bei Diagnose beträgt 45 Jahre (Ohgaki, 2004; Thakkar, 2014).

Glioblastome zeigen ein schnelles Wachstum, breiten sich diffus infiltrierend in das umliegende Gewebe aus und sind meist von einem deutlichen Ödem umgeben. Histologisch sind sie gekennzeichnet durch hohe Proliferations- und Mitoseraten, ausgeprägte Zellpolymorphien, Nekrosen und Gefäßneubildungen (Reifenberger, 2004). Die klinische Symptomatik umfasst unspezifische, durch den intrakraniellen Druckanstieg verursachte Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, Krampfanfälle oder Bewusstseinstörung. In Abhängigkeit von der Lage des Tumors treten lokale Hirnfunktionsstörungen auf, die sich zum Beispiel in Sehstörungen, Sprachstörungen, Lähmungserscheinungen oder Wesensveränderungen äußern (DeAngelis, 2001; Stark, 2005; Stark, 2012).

Die Möglichkeiten zur Therapie eines Glioblastoms sind nach wie vor sehr begrenzt und eine Heilung kann nicht erreicht werden. Nach derzeitigem Therapiestandard wird zunächst eine weitestmögliche Resektion des Tumors vorgenommen, gefolgt von Strahlentherapie der erweiterten Tumorregion mit begleitender und anschließend erhaltender Chemotherapie mit Temozolomid (Stupp, 2005; Weller, 2014). Aufgrund des ausgeprägten invasiven Wachstums ist eine komplette Resektion des Tumors praktisch unmöglich. Nahezu unausweichlich treten Rezidive auf, für deren Behandlung keine klaren Therapiestandards definiert sind. Auf individueller Basis kann eine Reoperation, erneute Strahlentherapie oder Chemotherapie mit Temozolomid oder Nitrosoharnstoffen in Betracht gezogen werden. Allen therapeutischen Bemühungen zum Trotz beträgt die mittlere Überlebenszeit eines Glioblastom-Patienten nach der Diagnose durchschnittlich nur 14–15 Monate (Stupp, 2009; Johnson, 2012). Auch mit neueren, antiangiogenen Therapieansätzen mit dem anti-VEGF-A-Antikörper Bevacizumab oder dem Integrin-Inhibitor Cilengitid konnte das Gesamtüberleben von Patienten mit primären Glioblastomen nicht verlängert werden (Chinot, 2014; Gilbert, 2014; Nabors, 2015).

## 1.2 Vaskularisierung des Glioblastoms

Glioblastome sind durch ausgeprägte Gefäßneubildungen gekennzeichnet und gehören zu den am stärksten vaskularisierten soliden Tumoren (Brem, 1972). Verschiedene Mechanismen tragen zur Ausbildung der Glioblastom-Vaskulatur bei (Hardee, 2012; Das, 2013), darunter die Angiogenese, die als elementare Voraussetzung für die Entstehung und Metastasierung solider Tumore gilt (Hanahan, 2011). Angiogenese bezeichnet die Bildung neuer Blutgefäße durch die Proliferation von Endothelzellen der bereits bestehenden Vaskulatur (Potente, 2011), wobei beispielsweise die sprossende und die intussuszeptive Angiogenese unterschieden werden. Bei der sprossenden Angiogenese wandert eine spezialisierte Endothelzelle (*tip cell*) entlang eines Gradienten proangiogener Faktoren, zu denen etwa der Wachstumsfaktor VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) zählt. Benachbarte Endothelzellen (*stalk cells*) folgen, proliferieren und bilden ein neues Gefäßlumen aus (Ribatti, 2012). Bei der intussuszeptiven Angiogenese erfolgt eine Einstülpung gegenüberliegender Gefäßwände und dadurch die Längsteilung eines bestehenden Blutgefäßes (Burri, 2004; Mentzer, 2014).

Neben Endothelzellen der bestehenden Vaskulatur können auch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen zur Bildung neuer Blutgefäße beitragen. Endotheliale Vorläuferzellen werden aus dem Knochenmark rekrutiert und können zu reifen Endothelzellen differenzieren oder durch Freisetzung angiogener Faktoren parakrin angiogene Prozesse in ihrer Umgebung vorantreiben (Marcola, 2015). Diskutiert wird auch die Rolle von Glioblastomstammzellen bei der Vaskularisierung des Glioblastoms. Glioblastomstammzellen bilden eine Subpopulation der Glioblastomzellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung (Singh, 2004). In den vergangenen Jahren wurden vermehrt Hinweise darauf gefunden, dass sie durch Differenzierung zu Endothelzellen (Ricci-Vitiani, 2010; Wang, 2010; Soda, 2011) oder Perizyten (Cheng, 2013) an der Vaskularisierung des Glioblastoms beteiligt sein könnten.

Im Vergleich zu physiologischen Blutgefäßen ist die Vaskulatur des Glioblastoms und anderer solider Tumore strukturell und funktionell stark verändert. Tumorgefäße sind typischerweise stark verzweigt, dilatiert und bilden chaotische Netzwerke, denen die physiologische Hierarchie von Venolen, Arteriolen und Kapillaren fehlt. Die Permeabilität der Gefäße ist erhöht und der Blutfluss verläuft ungleichmäßig und ineffizient (Jain, 2007; Goel, 2011; Garcia-Figueiras, 2015).

Unter physiologischen Bedingungen reguliert und kontrolliert die Blut-Hirn-Schranke den Stoffaustausch zwischen peripherem Blutkreislauf und zentralem Nervensystem. Gebildet wird sie vom Gefäßendothel, den *Tight Junctions* in den Endothelzwischenräumen sowie dem Endothel aufliegenden Perizyten und Endausläufern der Astrozyten (Abbott, 2010). Im Glioblastom ist die Blut-Hirn-Schranke an vielen Stellen beeinträchtigt (Noell, 2011), weshalb vermehrt intravasale Flüssigkeit austreten kann und es in der Folge zur Ödem-Bildung kommt. Dies trägt maßgeblich

zur klinischen Symptomatik bei und korreliert negativ mit dem Überleben des Patienten (Pope, 2005; Schoenegger, 2009; Wu, 2015).

Auch auf molekularem Level unterscheidet sich die Vaskulatur des Glioblastoms von Blutgefäßen in gesundem Gewebe. Endothelzellen der Glioblastom-Vaskulatur exprimieren eine Vielzahl an Proteinen, die im tumorfreien Gehirngewebe nicht oder kaum nachweisbar sind. Hierzu zählen beispielsweise die Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*; Plate, 1994; Chan, 1998; Grau, 2007; Baumgarten, 2016), deren Liganden VEGF-C und VEGF-D (Grau, 2007), das Membranglykoprotein CD105 (Yao, 2005; Minhajat, 2006), das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Gladson, 1991; Schnell, 2008), das Prostata-spezifische Membranantigen (PSMA; Wernicke, 2011; Nomura, 2014) sowie Angiopoietin 2 (Stratmann, 1998; Scholz, 2015) und dessen Rezeptor Tie-2 (Stratmann, 1998). Auch Glykoproteine der Extrazellulärmatrix wie ED-B-positives Fibronectin (Castellani, 1994; Albrecht, 2016) und Tenascin C (Zagzag, 1995; Kim, 2000) werden selektiv im Bereich der Glioblastom-assoziierten Vaskulatur exprimiert.

### 1.3 Bildgebung des Glioblastoms

Bildgebende Untersuchungen sind für die Behandlung der Glioblastom-Patienten und die Evaluierung neuer Therapien unerlässlich. Von der initialen Diagnosestellung über die Therapieplanung und die Beurteilung des Therapieerfolges bis hin zur Verlaufskontrolle und Erkennung von Rezidiven dienen sie den behandelnden Ärzten als wichtige Entscheidungsgrundlage.

Bei der Diagnosestellung ist die kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT) das derzeit gängige Verfahren. Konventionelle MRT-Sequenzen (T1/T2-gewichtet, FLAIR = *fluid attenuated inversion recovery*) liefern hoch aufgelöste morphologische Informationen. Sie erlauben Rückschlüsse auf Größe und Lokalisation des Tumors sowie tumorassoziiertes Ödem und Nekrosen. Nach Kontrastmittelgabe werden Areale mit gestörter Blut-Hirn-Schranke sichtbar, was die Detektion und Abgrenzbarkeit des Tumors erleichtert, jedoch nur indirekt auf die Tumormasse schließen lässt (Essig, 2012; Leung, 2014).

An ihre Grenzen stößt die konventionelle MRT bei der Identifikation von Bereichen mit diffus infiltrierendem Tumorwachstum, in denen die Blut-Hirn-Schranke intakt ist und keine Kontrastmittelaufnahme stattfindet (Claes, 2007). Auch zur Beurteilung von Therapie-Effekten kann die konventionelle MRT nur eingeschränkt beitragen, da posttherapeutische Änderungen der Kontrastmittelaufnahme nicht zuverlässig das Ansprechen oder Versagen einer Therapie widerspiegeln (Hygino da Cruz, 2011). Beispielsweise ist unter antiangiogener Therapie häufig ein signifikanter Rückgang Kontrastmittel-anreichernder Areale zu beobachten, was sich jedoch nicht

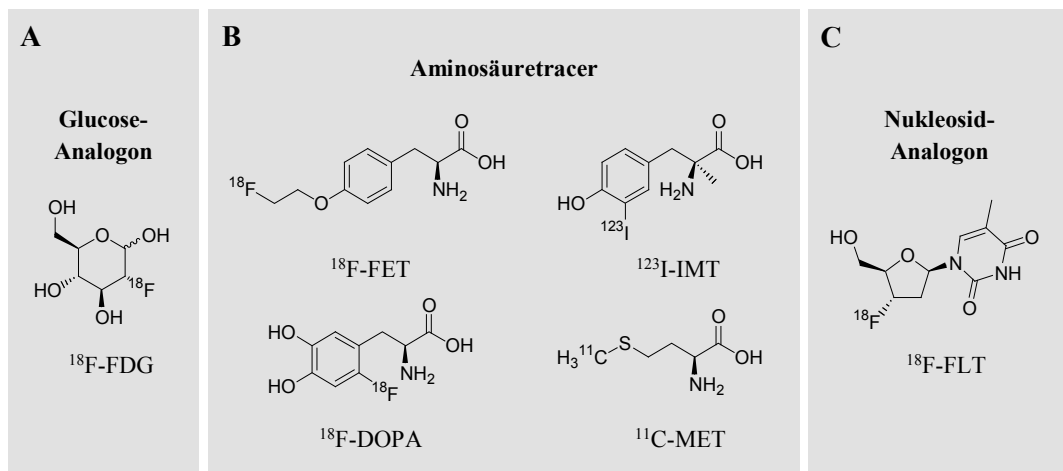
in einem verbesserten Gesamtüberleben der Patienten widerspiegelt (Chinot, 2014; Gilbert, 2014) und eher auf eine Normalisierung pathologisch permeabler Blutgefäße als auf einen antineoplastischen Effekt zurückzuführen ist (Fine, 2014).

Ergänzend zur MRT haben daher in den letzten Jahren nuklearmedizinische Methoden an Bedeutung gewonnen. Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) ermöglichen eine metabolische und molekulare Charakterisierung des Tumors und werden zunehmend in der Patientenversorgung und bei der Evaluierung neuer Glioblastom-Therapien eingesetzt (Alexiou, 2012; Suchorska, 2014).

Grundlage der nuklearmedizinischen Bildgebung sind Radiotracer, die nach intravenöser Applikation spezifisch im Tumor anreichern und deren Verteilung anhand der emittierten radioaktiven Strahlung mit hoher Sensitivität detektiert werden kann. Zu den ersten Radiotracern für die Gehirntumor-Bildgebung gehörten  $^{99m}\text{Tc}$ -Glucoheptonat,  $^{99m}\text{Tc}$ -Pertechnetat und  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA (Wolfstein, 1974; Leveille, 1977; Bjornsson, 1978; Castagnoli, 1982; Santra, 2015). Vergleichbar mit MRT-Kontrastmitteln beruht deren Anreicherung im Glioblastom vorrangig auf einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. Mittlerweile haben mit  $^{18}\text{F}$ -FDG,  $^{123}\text{I}$ -IMT,  $^{11}\text{C}$ -MET und  $^{18}\text{F}$ -FET modernere Radiotracer Einzug in die Klinik gehalten. Als Marker tumorspezifisch hochregulierter Stoffwechselprozesse ermöglichen sie unabhängig von einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke die direkte Visualisierung des Tumors und dessen metabolische Charakterisierung.

#### **1.4 Radiotracer für die nuklearmedizinische Bildgebung des Glioblastoms**

Radiotracer, die derzeit in der Patientenversorgung für die Gehirntumor-Bildgebung genutzt werden, sind Marker verschiedener tumorspezifisch hochregulierter Stoffwechsel- oder Transportprozesse (Abbildung 1). Sie liefern Informationen über die metabolische oder proliferative Aktivität des Tumors.



**Abbildung 1. Klinisch relevante Radiotracer für die Gehirntumor-Bildgebung.**

(A) Glucose-Analogon <sup>18</sup>F-FDG, dessen erhöhte Aufnahme in Tumorzellen auf einen gesteigerten Glucosestoffwechsel zurückzuführen ist. (B) Aminosäuretracer <sup>18</sup>F-FET, <sup>123</sup>I-IMT, <sup>18</sup>F-DOPA und <sup>11</sup>C-MET, deren erhöhte Aufnahme in Tumorzellen auf gesteigerte Transportraten der L-Typ-Aminosäuretransporter zurückgeführt wird. (C) Nukleosid-Analogon <sup>18</sup>F-FLT, dessen Anreicherung in Tumorzellen aufgrund gesteigerter DNA-Syntheseraten und gesteigerter Aktivität der Thymidinkinase 1 erhöht ist.

#### 1.4.1 2-[<sup>18</sup>F]Fluor-2-desoxy-D-glucose (<sup>18</sup>F-FDG)

Der für onkologische PET-Untersuchungen am weitesten verbreitete Radiotracer ist das Glucose-Analogon <sup>18</sup>F-FDG (Abbildung 1A; Delbeke, 2006; Boellaard, 2015). <sup>18</sup>F-FDG wird über transmembranäre Glucose-Transporter ins Zellinnere aufgenommen und reagiert dort im Rahmen der Glykolyse zu <sup>18</sup>F-FDG-6-Phosphat, das nicht weiter umgesetzt wird und sich in der Zelle anreichert (Leung, 2004). In Tumorzellen ist die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme aufgrund eines gesteigerten Glucosestoffwechsels erhöht (Jang, 2013). Es ist beschrieben, dass die Höhe der <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme positiv mit dem Malignitäts-Grad von Hirntumoren und negativ mit der Prognose des Patienten korreliert (Patronas, 1985; Holzer, 1993; Kaschten, 1998; De Witte, 2000; Padma, 2003). Limitiert wird der Einsatz von <sup>18</sup>F-FDG für die PET von Hirntumoren durch die Anreicherung des Tracers in entzündlichem Gewebe und in Makrophagen sowie durch ein starkes Hintergrund-Signal, das eine Folge des hohen physiologischen Glucosestoffwechsel verschiedener Gehirn-Regionen ist (Kubota, 1992; Waarde, 2004; la Fougere, 2011; Mergenthaler, 2013).

### 1.4.2 Aminosäuretracer

Untersuchungen mit Aminosäuretracern tragen in der Klinik in Ergänzung zur konventionellen MRT maßgeblich zu einer verbesserten Patientenversorgung bei (Herholz, 2012; Heiss, 2014; Galldiks, 2015a). Unter einer Vielzahl radioaktiv markierter Aminosäuren und Aminosäure-Analoga (McConathy, 2012) sind die wichtigsten Vertreter für die Gehirntumor-Bildgebung [<sup>11</sup>C]Methyl-L-Methionin (<sup>11</sup>C-MET), 3-[<sup>123</sup>I]Iod- $\alpha$ -methyl-L-tyrosin (<sup>123</sup>I-IMT), *o*-(2-[<sup>18</sup>F]Fluor-ethyl)-L-tyrosin (<sup>18</sup>F-FET) und 3,4-Dihydroxy-6-[<sup>18</sup>F]fluor-L-phenylalanin (<sup>18</sup>F-DOPA) (Abbildung 1B; Herholz, 2012; Galldiks, 2015a). Deren erhöhte Anreicherung in Tumorzellen wird auf gesteigerte Transportraten der L-Typ Aminosäuretransporter (LAT) (Huang, 2013) zurückgeführt, einem Transportsystem für große neutrale Aminosäuren (Verrey, 2003). Eine maßgebliche Rolle wird dabei dem Subtyp LAT1 zugeschrieben (Lahoutte, 2004; Okubo, 2010; Youland, 2013; Habermeier, 2015), über den eben diese Aminosäuren auch die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Boado, 1999; Verrey, 2003).

Aufgrund niedriger Hintergrundsignale können mit Aminosäuretracern deutlich bessere Tumor/Gehirn-Kontraste erreicht werden als mit <sup>18</sup>F-FDG. Sie erlauben eine präzisere Bestimmung der Tumorausdehnung als die konventionelle MRT, können auch infiltratives Tumorwachstum erfassen und ermöglichen dadurch eine verbesserte Planung der Tumorsektion und Bestrahlung (Pirotte, 2009; Götz, 2012). Eine veränderte Anreicherung von Aminosäuretracern kann als früher Hinweis auf ein Therapieansprechen oder -versagen gewertet werden (Galldiks, 2006; Galldiks, 2012; Schwarzenberg, 2014). Rezidive können mit der Aminosäure-Bildgebung mit hoher Spezifität erkannt werden (Kuwert, 1998; Ullrich, 2009; Karunanithi, 2013; Galldiks, 2015b). Darüber hinaus erleichtert die Auswertung der Anreicherungskinetik bei der <sup>18</sup>F-FET-PET eine nicht-invasive Differenzierung hoch- und niedriggradiger Tumore (Pöpperl, 2006; Pöpperl, 2007) und erlaubt eine Aussage zur Prognose neu diagnostizierter Glioblastome (Jansen, 2015).

### 1.4.3 3'-[<sup>18</sup>F]Fluor-3'-desoxythymidin (<sup>18</sup>F-FLT)

Das Nukleosid-Analogon <sup>18</sup>F-FLT (Abbildung 1C) wurde zur Untersuchung zellulärer Proliferationsraten entwickelt (Shields, 1998). Nach Aufnahme ins Zellinnere wird <sup>18</sup>F-FLT in der Synthesephase des Zellzyklus analog zu natürlich vorkommendem Desoxythymidin durch die cytosolische Thymidinkinase 1 phosphoryliert. Phosphoryliertes <sup>18</sup>F-FLT reichert sich in der Zelle an, dient jedoch im Gegensatz zu Desoxythymidintriphosphat nicht als Baustein für die DNA-Synthese (Rasey, 2002). Es ist eine positive Korrelation zwischen der <sup>18</sup>F-FLT-Aufnahme und der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 beschrieben (Yamamoto, 2012) und eine veränderte <sup>18</sup>F-FLT-Anreicherung unter antiangiogener Therapie des Glioblastoms wurde in verschiedenen



Studien als prädiktiver Wert für das Gesamtüberleben des Patienten identifiziert (Chen, 2007; Schwarzenberg, 2012). Mit  $^{18}\text{F}$ -FLT können bessere Tumor/Gehirn-Kontraste erreicht werden als mit  $^{18}\text{F}$ -FDG (Chen, 2005). Jedoch scheint die Anreicherung im Tumor von einer Schädigung der Blut-Hirnschranke abzuhängen (Nowosielski, 2014), was den klinischen Nutzen von  $^{18}\text{F}$ -FLT für die Gehirntumor-Bildgebung limitiert.

## **1.5 VEGFR-3 und ED-B als Zielstrukturen für die nuklearmedizinische Bildgebung des Glioblastoms**

Ein weiterer attraktiver Ansatz für die Bildgebung des Glioblastoms ist die Verwendung von Radiotracer, die selektiv die aberrante Glioblastom-Vaskulatur adressieren. Zielstrukturen neuer Radiotracer, die sich in der präklinischen und frühen klinischen Erprobung befinden, sind beispielsweise Oberflächenproteine des Gefäßendothels. Darunter das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  (Schnell, 2009; Iagaru, 2015), VEGFR-2 (Wang, 2012; Kang, 2013) oder PSMA (Schwenck, 2015). Auch Glykoproteine der Extrazellulärmatrix, wie ED-B-positives Fibronectin (Santimaria, 2003; Poli, 2013) oder Tenascin C (Schold, 1993; Akabani, 2005) werden als Zielstrukturen evaluiert.

In der Zukunft könnten diese Radiotracer zur nicht-invasiven molekularen Charakterisierung des Glioblastoms und zur Auswahl und Überwachung insbesondere antiangiogener Therapien beitragen. Dies ist derzeit sowohl mit der kontrastmittelverstärkten MRT, als auch mit den in Kapitel 1.4 vorgestellten metabolischen Radiotracer nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich.

Zielstrukturen für die nuklearmedizinische Bildgebung der Glioblastom-Vaskulatur, die im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen, sind der Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3 und die Fibronectin-Spleißvariante ED-B.

### **1.5.1 Der Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3**

VEGFR-3 gehört neben VEGFR-1 und VEGFR-2 zu einer Familie von Rezeptor-Tyrosinkinasen, die gemeinsam mit ihren Liganden zentrale Regulatoren der Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen sind (Zhuang, 2015). Natürliche Liganden des VEGFR-3 sind die dimeren Glykoproteine VEGF-C und VEGF-D (Joukov, 1996a; Lee, 1996; Achen, 1998). Aufgebaut ist der VEGFR-3 aus sieben extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (D1–D7), einem transmembranären Bereich und einer intrazellulär liegenden Tyrosinkinase-Domäne. Die Liganden-Bindung wird durch die extrazellulären Domänen D1–D3 vermittelt (Leppänen, 2013).

Im frühen Embryonalstadium wird der VEGFR-3 im Endothel des gesamten Gefäßsystems exprimiert. Ein Knockout des VEGFR-3-Gens führt in Mäusen als Folge einer beeinträchtigten

Blutgefäß-Entwicklung zu Lethalität an Tag E9,5 (Dumont, 1998). Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung und im gesunden adulten Organismus beschränkt sich die Expression des VEGFR-3 vorrangig auf die lymphatische Vaskulatur (Kaipainen, 1995). Eine Ausnahme bilden fenestrierte Blutgefäße einiger Organe (Partanen, 2000). Darüber hinaus wird die Expression von VEGFR-3 im Endothel tumorassoziierter Blutgefäße reaktiviert, beispielsweise in zahlreichen vaskulären Tumoren (Partanen, 1999) und im Mammakarzinom (Valtola, 1999).

Vor einigen Jahren wurde VEGFR-3 als Endothelzellmarker der Glioblastom-assoziierten Neovaskulatur identifiziert, wohingegen VEGFR-3 im tumorfreien Gehirn nicht nachweisbar ist (Jenny, 2006; Grau, 2007; Grau, 2008). Vor diesem Hintergrund und wegen der leichten Zugänglichkeit des Gefäßendothels über das Blut, könnte mit einem VEGFR-3-spezifischen Radiotracer die Lokalisierung und Charakterisierung von Glioblastomen anhand ihrer stark ausgeprägten Vaskularisierung unabhängig von einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke gelingen. Ferner wurde die Expression von VEGFR-3 auch auf Glioblastomzelllinien und auf Tumorzellen in Glioblastomgewebeproben nachgewiesen (Gieser, 2014). Dies eröffnet die Möglichkeit, mit einem VEGFR-3-spezifischen Radiotracer die gesamte Tumormasse eines Glioblastoms zu erfassen. Bislang wurde VEGFR-3 als Zielstruktur für die nuklearmedizinische Bildgebung von Gehirntumoren nicht erprobt.

### **1.5.2 Die Fibronektin-Spleißvariante ED-B**

Fibronectin wird als Bestandteil der Extrazellulärmatrix von verschiedenen Zelltypen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und -migration. Über verschiedene Bindungsmotive interagiert Fibronectin mit Zelloberflächenrezeptoren der Integrin-Familie sowie mit Collagen, Fibrin und Heparin (Xu, 2011). Fibronectin ist ein heterodimeres Glykoprotein aus zwei rund 250 kDa großen Untereinheiten, die nahe ihrer C-Termini über Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind. Beide Untereinheiten sind aus etwa 30 homologen, perlschnurartig aufgereihten Domänen aufgebaut, die drei verschiedenen Strukturtypen angehören (Typ I–III) (Hohenester, 2002; Pankov, 2002). Obwohl Fibronectin von einem einzigen Gen codiert wird, können abhängig vom Gewebetyp durch alternatives Spleißen der prä-mRNA mehr als 20 Isoformen exprimiert werden. Diese Variabilität wird durch Insertion der Exons Extradomäne A (ED-A), Extradomäne B (ED-B) und des in seiner Größe variablen Segments IIICS bestimmt.

Die Expression der ED-B ist im Embryonalstadium typischerweise hoch, im adulten Organismus hingegen stark reguliert und eng mit angiogenen Prozessen verknüpft (Magnuson, 1991; Pagani, 1991; Peters, 1996). Bis auf wenige Ausnahmen (Wundheilungsprozesse, French-Constant, 1989; Endometrium und Ovarien, De Candia, 1999) ist ED-B-positives Fibronectin im gesunden

Erwachsenen nicht nachweisbar. Demgegenüber wird die Expression der ED-B im Rahmen pathologischer Gefäßneubildungen reaktiviert, wie sie beispielsweise im Zusammenhang mit Arteriosklerose oder Tumorerkrankungen auftreten (Matter, 2004; Dietrich, 2015). In einer Vielzahl solider Tumore wurde ED-B-positives Fibronectin im Bereich der Neovaskulatur nachgewiesen, darunter Kolorektalkarzinome (Pujuguet, 1996), Lungenkarzinome (Oyama, 1990), Leberkarzinome (Oyama, 1993) und metastasierende Melanome (Frey, 2011). Auch im Glioblastom wird ED-B-positives Fibronectin im Rahmen von Gefäßneubildungen exprimiert, wohingegen es in niedrigergradigen Gliomen oder tumorfreiem Gehirn nicht nachweisbar ist (Castellani, 1994; Castellani, 2002; Albrecht, 2016).

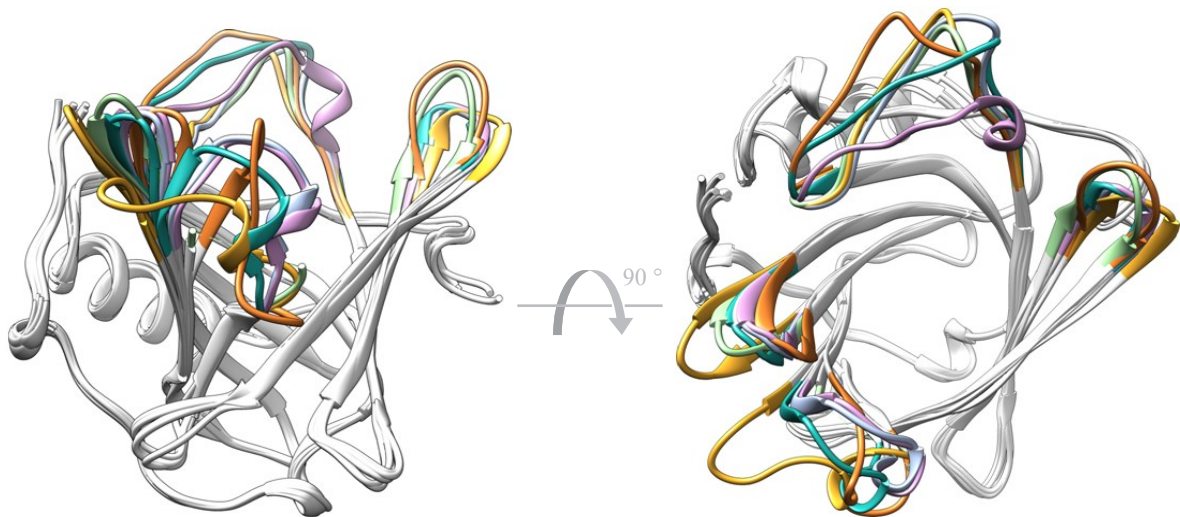
Die nahezu ausschließliche Beschränkung auf die pathologische Neovaskulatur macht ED-B-positives Fibronectin zu einer attraktiven Zielstruktur sowohl für *Drug Targeting*-Strategien als auch für die nuklearmedizinische Bildgebung (Kumra, 2016). Zwei Studien mit verschiedenen Formaten des ED-B-spezifischen Antikörpers L19 bestätigen die Eignung der ED-B als Zielstruktur für die Glioblastom-Bildgebung: Das *Small Immuno Protein*  $^{131}\text{I}$ -L19(SIP) reichert in der Ratte selektiv in orthotop implantierten C6-Tumoren an (Wyss, 2007) und mit dem dimeren Antikörper-Fragment  $^{125}\text{I}$ -L19(scFv)<sub>2</sub> gelang die szintigraphische Darstellung eines Glioblastoms im Patienten (Santimaria, 2003).

## 1.6 Anticaline

Anticaline sind eine Klasse künstlicher Bindeproteine, die auf dem Grundgerüst humaner Lipocaline basieren. Vertreter der Lipocaline kommen von Bakterien bis zum Menschen in vielen Organismen vor und sind in erster Linie dafür bekannt, als Transportproteine für eine Reihe hydrophober oder chemisch labiler Substanzen zu fungieren (Schiefer, 2015). Anticaline und die natürlich vorkommenden Lipocaline besitzen eine einfache Molekülstruktur aus einer einzelnen, relativ kurzen Polypeptidkette (160–180 Aminosäuren). Ihre Tertiärstruktur zeichnet sich durch ein hochkonserviertes Grundgerüst aus acht antiparallelen, kelchförmig angeordneten  $\beta$ -Faltblatt-Strängen aus. Am offenen Ende sind die  $\beta$ -Stränge paarweise durch hypervariable Schleifen verbunden, die die Liganden-Bindungsstelle ausbilden (Abbildung 2). Dieses Strukturprinzip besitzt eine grundsätzliche Ähnlichkeit zu den variablen, Antigen-bindenden Domänen der Immunglobuline (Richter, 2014a).

Die ersten generierten Anticaline basierten auf dem Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae* (Großer Kohlweißling) und waren gegen die relativ kleinen organischen Moleküle Fluorescein und Digoxigenin gerichtet (Beste, 1999; Schlehuber, 2000). In der weiteren Entwicklung der Anticalin-Technologie wurde auf Lipocaline humanen Ursprungs zurückgegriffen, um für die Anwendung im

Menschen die Gefahr einer Immunreaktion zu minimieren (Vogt, 2004; Kim, 2009). Inzwischen wurden Anticaline auch gegen Peptide und extrazelluläre oder membranständige Proteine selektiert, so dass eine Vielzahl medizinisch relevanter Zielstrukturen zugänglich ist. Zum Beispiel wurden Anticaline generiert mit Spezifität für VEGF-A, (Gille, 2008; Gille, 2016), Heparin (Hohlbaum, 2011), ED-B-positives Fibronectin (Gebauer, 2013),  $\beta$ -Amyloid (Rauth, 2016), PSMA (Barinka, 2016) oder VEGFR-3 (Richter, 2017). Die grundsätzliche Eignung der Anticaline für die Anwendung im Menschen wurde in einer klinischen Studie der Phase I demonstriert. Das gegen den VEGF-A gerichtete Anticalin PRS-050 bewies im Menschen eine gute Verträglichkeit bei gleichzeitiger biologischer Aktivität und fehlender Immunogenität (Mross, 2013).



**Abbildung 2. Molekülstruktur der auf dem Lipocalin-Grundgerüst basierenden Anticaline.**

Überlagerung der Kristallstrukturen des natürlich vorkommenden Lipocalins Lcn 2 und fünf davon abgeleiteter Anticaline. Grau: Konserviertes kelchförmiges Grundgerüst aus jeweils acht  $\beta$ -Faltblatt-Strängen. Farbige: Strukturell variable Schleifen verbinden paarweise die  $\beta$ -Stränge und bilden die jeweilige Liganden-Bindungsstelle.

Aufgrund ausgezeichneter Bindungsaffinitäten und -spezifitäten und der niedrigen Immunogenität besitzen Anticaline sehr gute Voraussetzungen für die Anwendung als Proteintracer in der nuklearmedizinischen Bildgebung. Mit einem Molekulargewicht von rund 20 kDa und einer kompakten Molekülstruktur stellen Anticaline kleine, robuste biomolekulare Grundbausteine dar, die je nach Anwendung mit Methoden des Proteinengineering modifiziert werden können. Beispielsweise ermöglicht die ortsspezifische Einführung proteinfremder funktioneller Gruppen, wie Ketone (Wang, 2003; Reichert, 2015) oder Aldehyde (Rabuka, 2012), die bioorthogonale Verknüpfung etwa mit bifunktionellen Chelatoren für die Markierung mit metallischen PET-Nukliden. Ferner lässt sich die Plasmahalbwertszeit der Anticaline durch gentechnische Fusion mit

strukturell ungeordneten, repetitiven Polypeptidsequenzen der Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin (PAS) steuern (Schlapschy, 2013). Die PAS-Anhängsel der erhaltenen Fusionsproteine liegen unter physiologischen Bedingungen hoch solvatisiert, in einer flexiblen *Random-Coil*-Konformation und mit einem großen hydrodynamischen Volumen vor. Da *in vivo* die renale Elimination im Plasma gelöster Moleküle in Abhängigkeit von deren Größe erfolgt und Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als 70 kDa von der glomerulären Basalmembran zurückgehalten werden, wird die Filtration PASylierter Anticaline in den Nieren verzögert, was in einer verlängerten Plasmahalbwertszeit resultiert.

Die grundsätzliche Verwendbarkeit der Anticaline als Radiotracer wurde in einer ersten präklinischen Studie gezeigt. Mit dem c-MET-Anticalin PRS-110, markiert mit  $^{89}\text{Zr}$  und gekoppelt mit zwei 20 kDa großen Polyethylenglykol-Resten, konnten subkutan in Mäuse xenotransplantierte Tumore spezifisch mit der PET dargestellt werden. Die Intensität der Tumoranreicherung korrelierte mit Expressionslevel des MET-Rezeptors im Tumorgewebe. In H441-Tumoren (Lungenkarzinom) mit starker MET-Expression wurden deutlich höhere Aktivitätskonzentrationen detektiert als in U87MG-Tumoren (Glioblastom) mit schwacher MET-Expression (Terwisscha van Scheltinga, 2014).

## 1.7 In der vorliegenden Arbeit untersuchte Bindeproteine

Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit sind die in Tabelle 1 aufgeführten Bindeproteine mit Spezifität für VEGFR-3 oder ED-B-positives Fibronectin.

VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$  ist eine rekombinant hergestellte Variante des natürlich vorkommenden VEGF-C und wurde durch Substitution des Cysteinrestes an Position 156 der Aminosäuresequenz mit Serin generiert (Joukov, 1998). Während VEGF-C ein natürlicher Ligand für VEGFR-2 und VEGFR-3 ist (Joukov, 1996b; Lee, 1996), ist VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$  ein selektiver Ligand für VEGFR-3 ohne Bindungsaktivität gegenüber VEGFR-2 (Joukov, 1998; Mäkinen, 2001).

Die Anticaline A5C3-QH (VEGFR-3-spezifisch; Richter, 2017), N7A (ED-B-spezifisch; Gebauer, 2013) und N7E.107-PAS<sub>200</sub> (ED-B-spezifisch; Richter, 2015) basieren auf dem Grundgerüst des humanen Lipocalins Lcn2. Sowohl A5C3-QH als auch N7A gehören zur ersten Generation von Anticalinen, die VEGFR-3 oder ED-B-positives Fibronectin mit hoher Spezifität und Affinität binden. Durch kombinatorisches Proteindesign werden die Anticaline der ersten Generation fortwährend weiterentwickelt. Mit N7E.107-PAS<sub>200</sub> stand im Verlauf der vorliegenden Arbeit ein ED-B-spezifisches Anticalin der zweiten Generation zur Verfügung, das durch Affinitätsmaturierung und genetische Fusion mit einer 200 Aminosäuren langen PAS-Polypeptidsequenz erhalten wurde. Es besitzt eine um mehr als den Faktor 200 gesteigerte Bindungsaffinität für ED-B-

positives Fibronectin. In der Größenausschlusschromatographie zeigt N7E.107-PAS<sub>200</sub> ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht von 260 kDa. Ein freier Cysteinrest, der C-terminal am PAS-Polypeptid positioniert ist, kann zur ortsspezifischen Verknüpfung mit Maleimid-funktionalisierten Molekülen genutzt werden.

**Tabelle 1. In der vorliegenden Arbeit untersuchte Bindeproteine.**

Bindeprotein	Art	Zielstruktur	K <sub>d</sub> [nM]	M [kDa]	Anwendung
VEGF-CC <sub>156s</sub> <sup>a</sup>	Cys156Ser-Variante von VEGF-C	VEGFR-3	2,8 <sup>b</sup>	15,4	Funktionelle Studien zur Untersuchung der Rolle von VEGFR-3 <sup>c</sup>
A5C3-QH <sup>d</sup>	Anticalin basierend auf humanem Lipocalin Lcn2	VEGFR-3	8,0 · 10 <sup>-2 d</sup>	21,7	Immunfluoreszenz (U251-Zellen) <sup>d</sup>
N7A <sup>e</sup>	Anticalin basierend auf humanem Lipocalin Lcn2	ED-B-positives Fibronectin	5,8 <sup>e</sup>	22,0	Immunfluoreszenz (Caco-Zellen) <sup>e</sup> ; Immunhistochemie (Gliom-Gewebe) <sup>f</sup>
N7E.107-PAS <sub>200</sub> <sup>g</sup>	Anticalin basierend auf humanem Lipocalin Lcn2	ED-B-positives Fibronectin	2,4 · 10 <sup>-2 g</sup>	38,5 (260) <sup>g</sup>	Markierung mit <sup>89</sup> Zr; PET-Bildgebung (subkutane FaDu-Tumore) <sup>g</sup>

K<sub>d</sub>: Durch Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie ermittelte Dissoziationsgleichgewichtskonstante.

M: Anhand der Aminosäuresequenz berechnetes Molekulargewicht; in Klammern angegeben ist das durch Größenausschlusschromatographie ermittelte apparente Molekulargewicht des PASylierten N7E.107.

<sup>a</sup> Joukov (1998); <sup>b</sup> Messung durchgeführt von A. Richter, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München; <sup>c</sup> Breslin (2007); Issaka (2009); Coso (2012); Planas-Paz (2012); <sup>d</sup> Richter (2017); <sup>e</sup> Gebauer (2013); <sup>f</sup> Albrecht (2016); <sup>g</sup> Richter (2015)

## 1.8 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des DFG-geförderten Sonderforschungsbereiches 824 zur *Selektion, Überwachung und Individualisierung der Krebstherapie* durchgeführt. Ziel der Arbeit war es, Bindeproteine mit Spezifität für den Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3 oder die Fibronectin-Spleißvariante ED-B auf ihre Eignung als Radiotracer für die nuklearmedizinische Bildgebung der Glioblastom-Vaskulatur zu untersuchen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass VEGFR-3 und ED-B selektiv im Bereich der Neovaskulatur des Glioblastoms, nicht aber im tumorfreien Gehirn nachweisbar sind. Die Adressierung der Glioblastom-Vaskulatur mit neuen VEGFR-3- oder ED-B-spezifischen Radiotracer soll zur nicht-invasiven Diagnostik und Charakterisierung des Glioblastoms beitragen.

Um dies zu erreichen, wurden der VEGFR-3-spezifische Ligand VEGF-CC<sub>156S</sub>, das VEGFR-3-spezifische Anticalin A5C3-QH und das ED-B-spezifische Anticalin N7A mit dem Gammastrahler <sup>123</sup>I markiert. Es wurden die Stabilität der [<sup>123</sup>I]iodierten Proteine in Blutserum und Pufferlösungen sowie deren Bindungsaktivität auf Glioblastomzellen oder Glioblastomgewebeprobe untersucht. Mittels Szintigraphie und *ex-vivo*-Biodistributionsstudien wurden die *in-vivo*-Eigenschaften der neuen Proteintracer charakterisiert. Da im Verlauf der Arbeit neue, optimierte Varianten ED-B-spezifischer Anticaline zur Verfügung standen, wurde zudem ein aminoxy-funktionalisierter Chelator für deren ortsspezifische Markierung mit PET-Nukliden synthetisiert und ein ortsspezifisch mit <sup>89</sup>Zr-markiertes Anticalin für die PET-Bildgebung in einem orthotopen Glioblastom-Mausmodell angewendet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel waren von handelsüblicher Qualität und wurden, falls nicht anders angegeben, von Carl Roth, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen. Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff für den Einmalgebrauch waren von Corning, Eppendorf, Greiner Bio-One oder TPP.

Boc-AoAc-NHS wurde von Iris Biotech und *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-NOTA von Macrocyclics bezogen. DMEM, L-Glutamin, MEM und Trypsin/EDTA waren von Thermo Fischer Scientific, FKS von Biochrom und PBS von Sigma-Aldrich. Das Venor GeM Mykoplasmen-Nachweiskit war von Minerva Biolabs. Bepanthen-Augensalbe wurde von Bayer Vital, Isofluran (Forene) von CP-Pharma, Natriumperchlorat (Irenat) von Alliance, Ketamin (Ketavet) von Pfizer und Xylazin (Rompun) von Bayer Vital bezogen. Kieselgel-imprägniertes Glas-Mikrofaser-Papier (Varian iTLC-SG) war von Agilent Technologies, Multiscreen Filterplatten und Stanzstempel von Merck Millipore, Phosphor-Bildplatten von Fuji, Säulen für die Größenausschlusschromatographie (illustra NAP5, illustra NAP25 und PD-10) und Ultrafiltrationseinheiten (Vivaspin) von GE Healthcare, Shandon Coverplates von Thermo Fisher Scientific, Spritzen und Kanülen von BD und Tissue-Tek O.C.T. von Sakura Finetek.

#### 2.1.2 Geräte

Aktivimeter	CRC-15R Isomed 2000 Veenstra	Capintec Nuklear-Medizintechnik Joure
Bildplatten-Scanner	Cr 35 Bio	Dürr Medical
Brutschrank	CB150	Binder
DC-Scanner	Bioscan Flow Count miniGITA	Bioscan Raytest Isotopenmessgeräte
Elektrophoresekammer	PerfectBlue Mini M	Peqlab
Elektrophoresenetzgerät	EV265 Consort	Hofer
Gamma-Counter	Cobra Quantum 5003	Canberra Packard
Gammakamera	e.cam	Siemens
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LDplus	Martin Christ
Geldokumentationssystem	GeneFlash	Syngene



HPLC-System	Serie 1200	Agilent Technologies
	Autosampler (G1329A)	Agilent Technologies
	Multiwellenlängendetektor (G1365B)	Agilent Technologies
	Quarternäre Pumpe (G1311A)	Agilent Technologies
	Radioaktivitätsdetektor (GABI Star)	Raytest Isotopenmessgeräte
	Vakuumentgaser (G1322A)	Agilent Technologies
Kleintier-PET-Scanner	Inveon P120	Siemens
Kryostat	CM1510 S	Leica
pH-Einstabmesskette	InLab Micro	Mettler Toledo
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo
Schüttler	Orbitalschüttler OS-10	Peqlab
	Thermomixer comfort	Eppendorf
	Wippschüttler, zweietagig	VWR
Sicherheits-Werkbank	Herasafe HSP12	Heraeus
Stanzvorrichtung	MultiScreen HTS	Merck Millipore
Stereotakt	Lab Standard	Stölting
Thermocycler	Primus 25 advanced	Peqlab
UV/Vis-Spektrophotometer	Ultrospec 1100 pro	Amersham Biosciences
Vakuum-Filtrationssystem	Multiscreen HTS	Merck Millipore
Vakuum-Pumpe	WP6122050	Merck Millipore
Waagen	Analysenwaage CP224s	Sartorius
	Mikrowaage CPA26P	Sartorius
	Präzisionswaage 1364 MP	Sartorius
Wärmeschrank	Typ 2716	Köttermann
Wasserbad	Typ 3042	Köttermann
Zell-Zähler	Scepter	Merck-Millipore
Zentrifugen	5810R	Eppendorf
	MiniSpin	Eppendorf

### 2.1.3 Software

AIDA	Raytest Isotopenmessgeräte
Amide	<a href="http://www.amide.sourceforge.net">www.amide.sourceforge.net</a> (Loening, 2003)

Bio-Chrom Lite	Biochrom
ChemStation for LC Systems	Agilent Technologies
GINA Star TLC	Raytest Isotopenmessgeräte
GraphPad Prism	GraphPad Software
Inveon Acquisition Workplace	Siemens Healthcare
Inveon Research Workplace	Siemens Healthcare
MestReNova	Mestrelab Research
ProtParam	www.expasy.org

### 2.1.4 Proteine

Rekombinant hergestelltes VEGF-C<sub>C156S</sub> wurde von R&D Systems bezogen. Die Anticaline A5C3-QH, N7A und N7E.107-PAS<sub>200</sub> wurden am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München entwickelt und produziert. Wildtyp Lipocalin Lcn2 wurde ebenfalls am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München produziert. Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten der Proteine (berechnet mit ProtParam) sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2. Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine.**

Protein	M [kDa]	$\epsilon_{280\text{nm}}$ [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	Literatur
VEGF-C <sub>C156S</sub>	15,4	11960	Joukov (1998)
A5C3-QH	21,6	36565	Richter (2017)
N7A	22,0	38055	Gebauer (2013)
N7E.107-PAS <sub>200</sub>	38,5	19035	Richter (2015)

M: Molekulargewicht.  $\epsilon_{280\text{nm}}$ : Extinktionskoeffizient bei 280 nm.

### 2.1.5 Radionuklide

Geträgertes <sup>123</sup>I wurde als [<sup>123</sup>I]NaI in 0,05 M NaOH mit einer spezifischen Aktivität von  $\geq 2 \cdot 10^{17}$  Bq/mol Iodid und einer Volumenaktivität von 14–20 GBq/ml von GE-Healthcare bezogen. <sup>68</sup>Ga wurde durch Zerfall von <sup>68</sup>Ge in einem <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga Generator (Nennaktivität 1,85 Mq; ITG Isotope Technologies Garching) mit einer Matrix aus Pyrogallol-derivatisiertem Siliziumdioxid gewonnen und durch fraktionierte Elution mit 0,05 M HCl als [<sup>68</sup>Ga]GaCl<sub>3</sub> erhalten. <sup>89</sup>Zr wurde als [<sup>89</sup>Zr]Zr-Oxalat mit einer Volumenaktivität von 1,4 GBq/ml in 1 M Oxalsäure von Perkin

Elmer bezogen. Die Physikalischen Eigenschaften der verwendeten Radionuklide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3. Physikalische Eigenschaften und Anwendung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Radionuklide.**

Radio-nuklid	Halbwert-zeit	Für die Bildgebung genutzte Strahlung			Anwendung
		Art	Energie [MeV]	Emissions-wahrscheinlichkeit [%]	
<sup>123</sup> I	13,3 h	$\gamma$	0,159	83,3	Szintigraphie, SPECT
<sup>68</sup> Ga	67,6 min	$\beta^+$	0,836 <sup>a</sup>	88,0	PET
<sup>89</sup> Zr	78,4 h	$\beta^+$	0,389 <sup>a</sup>	22,3	PET

<sup>a</sup> mittlere Energie

### 2.1.6 Tumorzelllinien

Die humane Glioblastomzelllinie U87MG wurde von der *American Type Culture Collection* (ATCC) und die murine Gliomzelllinie GL261 vom *National Cancer Institute* (NCI) bezogen. Die Zelllinie U251/VEGFR-3, die den VEGFR-3 überexprimiert, wurde in der Abteilung für Neurochirurgische Forschung der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik am Klinikum der Universität München durch Transfektion der humanen Glioblastomzelllinie U251 mit einem IRES-Expressionsvektor (EX-M0928-M61; GeneCopeia) erzeugt und charakterisiert (Gieser, 2014). Zur Selektion stabil transfizierter Zellklone enthielt der Expressionsvektor ein Geneticin-Resistenzgen.

### 2.1.7 Blutserum

Murines Blutserum von weiblichen SHO-Mäusen wurde von Charles River bezogen. Zur Gewinnung von humanem Blutserum wurde einer gesunden Probandin Blut in eine S-Monovette (Typ: Serum) entnommen, zur Gerinnung 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, zentrifugiert (300 g; 10 min) und anschließend das Serum abgenommen und zur Lagerung bei -20 °C aliquotiert.

### **2.1.8 Gewebeproben**

Glioblastomgewebe und tumorfreies Gehirngewebe wurden von der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, bereitgestellt und dort nach einer schriftlichen Einverständniserklärung der Patienten und mit Genehmigung der Ethik-Kommission gewonnen. Glioblastomgewebe stammten aus Tumor-Resektionen von Glioblastom-Patienten und tumorfreie Gehirngewebe aus Temporallappen-Resektionen von Epilepsie-Patienten. Die Gewebeproben wurden in Form tiefgefrorener (-80°C) Gewebelöcke oder 5 µm dicker Paraffinschnitte bereitgestellt.

### **2.1.9 Versuchstiere**

Weibliche SHO-Mäuse und weibliche C57BL/6-Mäuse wurden im Alter von 6–8 Wochen aus spezifisch pathogenfreier Zucht von Charles River bezogen.

## **2.2 Allgemeine chromatographische und spektroskopische Methoden**

### **2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC) radioaktiv markierter Proteine**

Die DC <sup>123</sup>I-markierter Proteine erfolgte auf Kieselgel-imprägnierten Glas-Mikrofaser-Papier-Streifen mit 85 % (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O als Fließmittel. Die Radioaktivitätsverteilung auf den getrockneten Teststreifen wurde mit dem DC-Scanner miniGITA ermittelt, die Daten mit dem Programm Gina Star TLC dargestellt und alle Peaks manuell integriert. Die DC <sup>89</sup>Zr-markierter Proteine erfolgte auf Kieselgel-imprägnierten Glas-Mikrofaser-Papier-Streifen mit 20 mM Na-Citrat (pH 5) + 10 % (v/v) MeCN als Fließmittel. Die Radioaktivitätsverteilung auf den getrockneten Teststreifen wurde mit dem DC-Scanner Bioscan Flow Count ermittelt, die Daten mit dem Programm Bio-Chrom Lite dargestellt und alle Peaks manuell integriert.

### **2.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Die Arbeiten wurden an einem Agilent-1200-System durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Multiwellenlängendetektor bei 214 nm und 254 nm und bei Bedarf zusätzlich mit einem Radioaktivitätsdetektor. Erhaltene Daten wurden mit dem Programm ChemStation dargestellt und alle Peaks manuell integriert. Folgende Methoden wurden angewendet:

**Boc-aminooxy-NOTA (Analytik)**

Säule: Chromolith Performance (RP-18e; 100-4,6 mm); Flussrate: 4 ml/min; Gradient: 0–100 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure in H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure in 5 min; t<sub>R</sub> = 2,5 min.

**Boc-aminooxy-NOTA (Aufreinigung)**

Säule: Chromolith SemiPrep (RP-18e; 100-10 mm); Flussrate: 8 ml/min; Gradient: 0–40 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure in H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure in 10 min, t<sub>R</sub> = 6,1 min.

**<sup>68</sup>Ga-Boc-aminooxy-NOTA (Analytik)**

Säule: Chromolith Performance (RP-18e; 100-4,6 mm); Flussrate: 4 ml/min; Gradient: 0–100 % Acetonitril + 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA in 5 min; t<sub>R</sub> = 1,7 min.

**Aminoxy-NOTA (Analytik)**

Säule: Chromolith Performance (RP-18e; 100-4,6 mm); Flussrate: 4 ml/min; Gradient: 0–100 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure in H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure in 5 min; t<sub>R</sub> = 1,6 min.

**Aminoxy-NOTA (Aufreinigung)**

Säule: Chromolith SemiPrep (RP-18e; 100-10 mm); Flussrate: 8 ml/min; Gradient: 0–30 % Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure in H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure in 6 min, t<sub>R</sub> = 2,6 min.

### 2.2.3 UV-Spektroskopie zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde durch Messen der Absorption bei 280 nm ( $A_{280\text{nm}}$ ) und Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $A_{280\text{nm}} = \epsilon_{280\text{nm}} \cdot c \cdot d$ ) ermittelt. Die Messungen erfolgten in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke  $d = 1$  cm in einem UV/VIS-Spektrophotometer. Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{280\text{nm}}$ ) des jeweiligen Proteins wurde auf Grundlage der Aminosäuresequenz mit dem Programm ProtParam berechnet. Die Eigenabsorption des verwendeten Puffers wurde bei jeder Messung abgezogen.

### 2.2.4 Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren wurden mit einem Finnigan LTQ FT Ultra (Thermo Fisher Scientific) nach Elektrospray-Ionisation (ESI) aufgenommen. Die Werte sind in atomaren Masseneinheiten pro Elementarladung ( $m/z$ ) angegeben. Durchgeführt wurden die Messungen durch Mitarbeiter des Departments Chemie, LMU München.

### **2.2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)**

NMR-Spektren wurden mit einem Eclipse 500 (JEOL) aufgenommen und mit dem Programm MestReNova ausgewertet. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  beziehen sich auf Tetramethylsilan ( $\delta = 0,00$  ppm) als internen Standard. Durchgeführt wurden die Messungen durch Mitarbeiter des Departments Pharmazie, LMU München.

## **2.3 Allgemeine zellbiologische Methoden**

### **2.3.1 Kultivierung humaner Tumorzelllinien und Kryokonservierung**

U87MG-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in MEM (10 % (v/v) FKS; 2 mM L-Glutamin) kultiviert, U251/VEGFR-3-Zellen bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> in DMEM (10 % (v/v) FKS; 2 mM L-Glutamin; 0,6 mg/ml Geneticin) und GL261-Zellen bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> in DMEM (10 % (v/v) FKS; 2 mM L-Glutamin; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin).

Wachstumsmedien und PBS wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Arbeiten an Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheits-Werkbank. Alle 2–3 Tage wurde das Wachstumsmedium einer Zellkultur erneuert. Erreichte der Zellrasen eine Konfluenz von 80 %, wurden die Zellen passagiert: Nach Entfernen des Mediums wurde der Zellrasen mit PBS gespült und die Zellen bei Raumtemperatur 2–5 min mit Trypsin/EDTA inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst, in Wachstumsmedium aufgenommen und vereinzelt. Ein Anteil (1/6 bis 1/20) der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche überführt.

Zur Bevorratung mit Zellen niedriger Passage wurden diese bei Erreichen von 80 % Konfluenz eingefroren. 24 h vor dem Einfrieren wurde das Wachstumsmedium erneuert. Zum Einfrieren wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst, vereinzelt und in Wachstumsmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation (200 g; 4 min) wurde das erhaltene Zellpellet in Wachstumsmedium + 10 % (v/v) DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen am nächsten Tag in die Gasphase eines Flüssigstickstoff-Lagerbehälters überführt.

### **2.3.2 Mykoplasmentestung**

Kultivierte Zelllinien wurden regelmäßig mit einem kommerziell erhältlichen, PCR-basierten Nachweissystem (Venor GeM Classic) auf Kontamination mit Mykoplasmen geprüft. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Zur Visualisierung der Testergebnisse wurde ein Agarosegel (1,5 %; 0,2 mg/ml Ethidiumbromid) mit jeweils 5 µl der Proben, die zuvor im Verhältnis 1:5 mit Probenpuffer versetzt wurden, und 5 µl eines DNA-Längenstandards beladen. Die horizontale Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 40 min. Die DNA-Fragmente wurden in einem Geldokumentationssystem durch Bestrahlen mit UV-Licht sichtbar gemacht.

### **2.3.3 Vorbereitung der Zellen für Wettbewerbsassays oder die Injektion in Mäuse**

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 %, und nach Erneuerung des Mediums am Vortag, wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in Wachstumsmedium aufgenommen und zweimal zentrifugiert (200 g; 4 min). Das Zellpellet wurde im für die nachfolgende Anwendung vorgesehenen Medium resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mit einem automatischen Zellzähler (Scepter) bestimmt und durch Verdünnung angepasst.

## **2.4 Allgemeine tierexperimentelle Methoden**

Tierexperimente wurden nach Genehmigung gemäß den Vorgaben der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

### **2.4.1 Haltung der Versuchstiere und Anästhesie**

Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen (24 °C Raumtemperatur; 45–65 % relative Luftfeuchtigkeit; 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus) in Gruppen von 4–6 Tieren in individuell ventilierten Käfigen (Grundfläche 1500 cm<sup>2</sup>) gehalten und konnten jederzeit frei über Futter und Leitungswasser verfügen. Das Einsetzen der Tiere erfolgte mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn.

Die Mäuse wurden durch Inhalationsnarkose mit Isofluran (2,5 % zur Einleitung und 1,5–2 % zur Erhaltung; Sauerstoff als Trägergas) oder durch intraperitoneale Injektion einer Ketamin/Xylazin-Lösung (7,5 mg/ml Ketamin; 0,5 mg/ml Xylazin; 0,15–0,2 ml pro 25 g Körpergewicht)

anästhesiert. Während der Narkose wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert und die Hornhaut wurde mit Bepanthen-Augensalbe bedeckt.

### 2.4.2 Erzeugung subkutaner Tumore

$5 \cdot 10^6$  U87MG- oder U251/VEGFR-3-Zellen wurden in 100  $\mu$ l Wachstumsmedium (ohne Zusätze) mit einer 26G-Kanüle subkutan in die rechte Flankenregion weiblicher SHO-Mäuse (7–9 Wochen alt) injiziert. Die Injektion erfolgte am wachen Tier und die Tumore wuchsen 4–5 Wochen.

### 2.4.3 Erzeugung intrakranieller Tumore

$5 \cdot 10^4$  GL261-eGFP-Zellen in 1  $\mu$ l Wachstumsmedium (ohne Zusätze) wurden weiblichen C57BL/6-Mäusen im Alter von 9 Wochen in die rechte Hemisphäre des Großhirns implantiert. Der Eingriff erfolgte unter Injektionsnarkose mit Ketamin und Xylazin und die Mäuse waren in einem Stereotakten mit horizontaler Ausrichtung der Schädeldecke fixiert. Nach einer Hautinzision erfolgte die Injektion der Zellen 1,2 mm rostral vom Bregma, 1,2 mm rechts von der Mittellinie und 3 mm unter der Knochenoberfläche mit einer Kanüle durch die zuvor durchbohrte Schädeldecke. Die Tumore wuchsen 4 Wochen. Durchgeführt wurde die Implantation der Tumorzellen durch Mitarbeiter der Abteilung für Neurochirurgische Forschung der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik am Klinikum der Universität München.

## 2.5 Darstellung von Aminoxy-NOTA

{2-[(*p*-{2-[*N*-*tert*-Butoxycarbonyl(aminoxy)]acetylamino}phenyl)methyl]-4,7-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl}essigsäure (Boc-Aminoxy-NOTA)

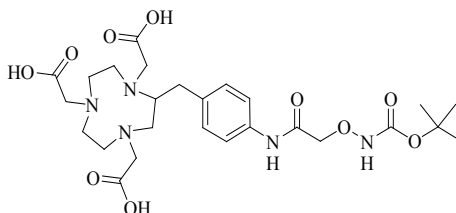


Abbildung 3. Boc-Aminoxy-NOTA

100 mg *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-NOTA (193  $\mu$ mol; 1 eq) wurden in 1,5 ml Acetonitril/Wasser (1:1) gelöst und im Eisbad gekühlt. Mit DIPEA wurde ein pH-Wert von 8–9 eingestellt. Tropfenweise wurde eine

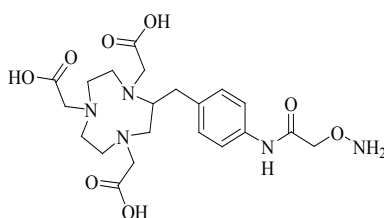


Lösung von 83,6 mg Boc-AoAc-NHS (290  $\mu\text{mol}$ ; 1,5 eq) in 150  $\mu\text{l}$  Acetonitril zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h auf dem Eisbad und weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei nach 1 h und nach 4 h jeweils noch einmal 27,9 mg Boc-AoAc-NHS (96,6  $\mu\text{mol}$ ; 0,5 eq) in 50  $\mu\text{l}$  Acetonitril zugetropft wurden. Der pH-Wert der Reaktionsmischung wurde wiederholt überprüft und bei Bedarf mit DIPEA auf 8–9 eingestellt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels analytischer HPLC kontrolliert. Nach einer Reaktionszeit von insgesamt 22 h wurde durch Zugabe von 1 M HCl ein pH-Wert von 5 eingestellt und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten (82,5 mg; 142  $\mu\text{mol}$ ; Ausbeute 74 %).

ESI-MS:  $m/z = 582,277$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (berechnet 582,277).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1,42$  (s, 9H); 2,37–3,67 (m, 19H); 4,34 (s, 2H); 7,21 (m, 2H); 7,57 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 10,08 (s, 1H); 10,55 (s, 1H).

#### **[2-(*p*-[2-(Aminooxy)acetyl-amino]phenyl)methyl)-4,7-bis(carboxymethyl)-1,4,7-triazonan-1-yl]essigsäure (Aminooxy-NOTA)**



**Abbildung 4. Aminooxy-NOTA**

16,6 mg (285  $\mu\text{mol}$ ) Boc-aminooxy-NOTA wurden in einer Mischung aus 1,2 ml TFA und 40  $\mu\text{l}$  TIS gelöst und 5 min reagieren gelassen. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen und mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Nach Lyophilisation wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten (74,9 mg; 129  $\mu\text{mol}$ ; Ausbeute 67 %).

ESI-MS:  $m/z = 482,224$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (berechnet 482,224).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 2,58$ –3,35 (m, 21H); 4,12 (s, 2H); 7,12–7,25 (m, 2H); 7,60 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H); 9,69 (s, 1H).

## 2.6 Markierungsreaktionen

### 2.6.1 Markierung mit $^{123}\text{I}$

Die Proteine VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ , A5C3-QH, N7A und Lcn2 wurden nach der Iodogen-Methode (Fraker, 1978) mit  $^{123}\text{I}$  markiert. Für *in-vitro*-Anwendungen wurden 10  $\mu\text{g}$  Protein (0,65 nmol VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  bzw. 0,46 nmol A5C3-QH, N7A oder Lcn2) und 111 MBq geträgertes [ $^{123}\text{I}$ ]NaI zur Reaktion gebracht. Für *in-vivo*-Anwendungen wurde das 2–4-fache beider Reaktionspartner eingesetzt. Die Markierungsreaktion erfolgte in PBS (pH 7,8) in einem konischen Glasvial, dessen Innenseite zuvor mit 200  $\mu\text{g}$  Iodogen beschichtet wurde. Das Reaktionsvolumen betrug 500  $\mu\text{l}$ . Die Reaktionsmischung inkubierte bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (160 rpm) für 5 min (VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  und A5C3-QH) oder 10 min (N7A und Lcn2). Nicht-Protein-gebundenes [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid wurde mit einer Größenausschluss-Säule (illustra NAP5) abgetrennt. Die Größenausschluss-Säule war mit Histidin-Puffer (50 mM Histidin, 2 % (m/v) Trehalose; 0,002 % (v/v) Tween20, 0,9 % (m/v) NaCl, pH 7,4) äquilibriert. Durch fraktionierte Elution mit 150  $\mu\text{l}$ , 650  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  Histidin-Puffer wurde in der zweiten Fraktion das aufgereinigte Markierungsprodukt erhalten. Rohprodukt und aufgereinigtes Markierungsprodukt wurden mittels DC analysiert, die Aktivität der Produktlösung im Aktivimeter gemessen und die Proteinkonzentration der Produktlösung UV-spektroskopisch bestimmt.

Die Markierungsausbeute wurde aus dem DC-Chromatogramm des Rohproduktes und die radiochemische Reinheit (RCP) aus dem DC-Chromatogramm des aufgereinigten Markierungsproduktes als prozentualer Anteil der Peakfläche des [ $^{123}\text{I}$ ]iodierten Proteins an der Summe aller Peakflächen berechnet. Die radiochemische Ausbeute (RCY) wurde als prozentualer Anteil der Aktivität der Produktlösung an der Aktivität des zur Markierung eingesetzten [ $^{123}\text{I}$ ]NaI berechnet. Die spezifische Aktivität (SA) wurde als Quotient aus der Aktivität der Produktlösung und der Stoffmenge des Proteins in der Produktlösung berechnet.

### 2.6.2 Markierung mit $^{127}\text{I}$

Die Markierung mit dem stabilen Iod-Isotop  $^{127}\text{I}$  wurde analog zu der im Abschnitt 2.6.1 beschriebenen Markierung mit  $^{123}\text{I}$  durchgeführt. [ $^{127}\text{I}$ ]NaI wurde als Lösung in 0,05 M NaOH mit einer Konzentration von 92,5  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

#### VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$

300  $\mu\text{g}$  (19,5 nmol) VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  wurden mit 16,3 nmol [ $^{127}\text{I}$ ]NaI in PBS (pH 7,8) in einem Iodogen-beschichteten (1 mg) Reaktionsvial in einem Gesamtvolumen von 2,0 ml zur Reaktion

gebracht. Nicht-Protein-gebundenes [ $^{127}\text{I}$ ]Iodid wurde mit einer Größenausschluss-Säule abgetrennt (illustra NAP25; äquilibriert mit Histidin-Puffer). Das aufgereinigte Markierungsprodukt wurde durch Elution mit 3,0 ml Histidin-Puffer erhalten und zur Aufkonzentrierung in Ultrafiltrationseinheiten (Vivaspin 500; 5 kDa) zentrifugiert (1500 g; 4 °C). Um die Ausbildung großer Konzentrationsunterschiede zu vermeiden, wurde die Zentrifugation alle 10 min unterbrochen und das Konzentrat mit einer Pipette durchmischt.

### **A5C3-QH**

84  $\mu\text{g}$  (3,9 nmol) A5C3-QH wurden mit 3,9 nmol [ $^{127}\text{I}$ ]NaI in PBS (pH 7,8) in einem Iodogen-beschichteten (0,4 mg) Reaktionsvial in einem Volumen von 0,7 ml zur Reaktion gebracht. Zur Abtrennung von nicht-Protein-gebundenem [ $^{127}\text{I}$ ]Iodid wurde der Reaktionsansatz aufgeteilt und jeweils das halbe Volumen (350  $\mu\text{l}$ ) der Reaktionsmischung auf eine Größenausschluss-Säule aufgetragen (illustra NAP5; äquilibriert mit Histidin-Puffer). 150  $\mu\text{l}$  Histidin-Puffer wurden aufgebracht und das Eluat verworfen, bevor durch fraktionierte Elution mit 150  $\mu\text{l}$ , 650  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  Histidin-Puffer in der zweiten Fraktion das aufgereinigte Markierungsprodukt erhalten und direkt in Konkurrenzexperimenten eingesetzt wurde.

### **2.6.3 Markierung mit $^{68}\text{Ga}$**

$^{68}\text{Ga}$  wurde durch fraktionierte Elution eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators mit 1,3 ml und 2,7 ml 0,05 M HCl gewonnen. 500  $\mu\text{l}$  der zweiten Fraktion wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 64  $\mu\text{l}$  1 M Na-Acetat versetzt, um pH 4,8 einzustellen. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 10 nmol des Markierungsvorläufers (gelöst in 0,025 M HEPES; pH 4) gestartet. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  2 M HEPES (pH 8) der pH-Wert der Reaktionslösung auf etwa 7 angehoben. Die Bestimmung der RCP erfolgte mittels HPLC. Die RCP wurde als prozentualer Anteil der Peakfläche des  $^{68}\text{Ga}$ -Markierungsproduktes an der Summe aller Peakflächen berechnet. Die Radioaktivität der Produktlösung wurde im Aktivimeter gemessen.

### **2.6.4 Markierung mit $^{89}\text{Zr}$**

130 MBq  $^{89}\text{Zr}$  in 100  $\mu\text{l}$  1 M Oxalsäure wurden mit 45  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt und 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Markierungsreaktion mit 400  $\mu\text{g}$  Desferoxamin-gekoppeltem N7E.107-PAS<sub>200</sub> in 0,5 M HEPES (pH 7,0) in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Nicht-Protein-gebundenes  $^{89}\text{Zr}$  wurde mit einer Größenausschluss-Säule abgetrennt (PD-10; äquilibriert mit 0,25 M Na-Acetat (pH 5,5) +

0,5 mg/ml Gentsinsäure) und das aufgereinigte Markierungsprodukt durch fraktionierte Elution (20 x 430 µl) in den Fraktionen 8–10 erhalten. Rohprodukt und aufgereinigtes Markierungsprodukt wurden mittels DC analysiert, die Aktivität der Produktlösung im Aktivimeter gemessen und die Proteinkonzentration der Produktlösung UV-spektroskopisch bestimmt.

Die RCP wurde aus dem DC-Chromatogramm des aufgereinigten Markierungsproduktes als prozentualer Anteil der Peakfläche des  $^{89}\text{Zr}$ -markierten N7E.107-PAS<sub>200</sub> an der Summe aller Peakflächen berechnet. Die RCY wurde als prozentualer Anteil der Aktivität der Produktlösung an der Aktivität des zur Markierung eingesetzten  $^{89}\text{Zr}$  berechnet. Die SA wurde als Quotient aus der Aktivität der Produktlösung und der Stoffmenge N7E.107-PAS<sub>200</sub> in der Produktlösung berechnet.

## 2.7 *in-vitro*-Testmethoden

### 2.7.1 Untersuchung der Stabilität

Die Stabilität  $^{123}\text{I}$ -markierter Proteine wurde in Pufferlösungen (Histidin-Puffer, PBS/BSA, MEM/BSA, DMEM/BSA und ImmunoBlock) sowie in murinem und humanem Blutserum untersucht. 20 MBq (VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ , A5C3-QH) oder 10 MBq (N7A) des Markierungsproduktes wurden in 500 µl (VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ , A5C3-QH) oder 250 µl (N7A) der Untersuchungslösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C (Histidin-Puffer), Raumtemperatur (PBS/BSA, MEM/BSA, DMEM/BSA, ImmunoBlock) oder 37 °C (Serum) auf dem Schüttler bei 300 rpm. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die RCP mittels DC bestimmt. Die Stabilität wurde aus der jeweils ermittelten RCP durch Normierung auf die RCP des Markierungsproduktes unmittelbar nach Beendigung der  $^{123}\text{I}$ -Markierung berechnet.

### 2.7.2 Kompetitionsassay auf Tumorzelllinien

#### Durchführung

Kompetitionsassays wurden als Vierfachbestimmung auf 96-Well-Filterplatten mit  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen pro Well durchgeführt. Experimente mit 5 nM  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  als Radioligand erfolgten mit U87MG-Zellen in MEM (2 mM Glutamin; 1 % (m/v) BSA) und mit VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  (0,26–2500 nM) oder  $^{127}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  (0,42–4000 nM) als Kompetitor. Experimente mit 5 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH als Radioligand erfolgten mit U251/VEGFR-3-Zellen in DMEM (2 mM Glutamin; 1 % (m/v) BSA) und mit A5C3-QH (0,052–500 nM) oder  $^{127}\text{I}$ -A5C3-QH (0,052–500 nM) als Kompetitor.

Die Vertiefungen einer Filterplatte wurden mit 200 µl PBS + 1 % (m/v) BSA versetzt und rund 3 h auf dem Schüttler inkubiert (200 rpm; RT). Eine Zellsuspension mit  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro ml wurde

hergestellt und bis zum Experiment für die Dauer von etwa 2 h auf dem Schüttler gelagert (200 rpm; RT). Eine 4-fach konzentrierte Verdünnungsreihe (Verdünnungsschritte 1:2,5) des Kompetitors wurde hergestellt. 120 µl der einzelnen Verdünnungen wurden mit 120 µl einer 20 nM Lösung des Radioliganden und 240 µl der vorbereiteten Zellsuspension versetzt. PBS + 1 % (m/v) BSA wurde mit einer Vakuum-Filtrationseinheit von der Filterplatte entfernt und anschließend die Ansätze aufgebracht (100 µl/Well). Nach 2 h auf dem Schüttler (200 rpm; RT) wurde der Inkubationspuffer mit Hilfe einer Vakuum-Filtrationseinheit von der Filterplatte abgesaugt und die Filterböden mitsamt der zurückgehaltenen Zellen fünfmal mit 300 µl PBS pro Well gewaschen. Die Filterböden der Wells wurden ausgestanzt und im Gamma-Counter vermessen. Für jede Probe wurde 1 min lang die Zählrate in einem Energiefenster von 100–300 keV gemessen.

### **Datenanalyse**

Die erhaltenen Datenpunkte wurden auf die Gesamtbindung (Bestimmung ohne Kompetitor) des jeweiligen Experimentes normiert und als arithmetisches Mittel aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Konzentration des Kompetitors aufgetragen. Mittels nichtlinearer Regression und unter Annahme einer reversiblen 1:1-Interaktion im Gleichgewicht, wurden mit GraphPad Prism sigmoidale Kompetitionskurven erhalten und die  $K_i$ -Werte der Testsubstanzen ermittelt.

## **2.7.3 *in-vitro*-Autoradiographie auf Gewebeschnitten**

### **Vorbereitung der Gewebeproben**

Bei -80 °C tiefgefrorene Gewebelöcke wurden am Tag vor der Durchführung des Experimentes in Tissue-Tek O.C.T. eingebettet. Mit einem Kryostaten (-20 °C) wurden 25 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf raumwarme Objektträger aufgezogen. Die Gefrierschnitte trockneten über Nacht bei Raumtemperatur, wurden 5 min bei -20 °C in 70 % (v/v) Aceton inkubiert, 5 min luftgetrocknet und im Anschluss direkt für *in-vitro*-Autoradiographie-Experimente verwendet.

Paraffinschnitte inkubierten zur Entfernung des Paraffins im Wärmeschrank bei 60 °C für 30 min in Isopropanol. Es folgte eine 10-minütige Inkubation in 70 % (v/v) Aceton bei -20 °C und eine 1-stündige Inkubation in PBS + 1 % (m/v) BSA bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (80 rpm). Anschließend wurden die Gewebeschnitte für *in-vitro*-Autoradiographie-Experimente verwendet.

### **Durchführung**

Experimente mit A5C3-QH erfolgten auf Gefrierschnitten und die Arbeitslösungen enthielten 2 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH  $\pm$  2 µM A5C3-QH in PBS + 1 % (m/v) BSA. Experimente mit N7A erfolgten auf Paraffinschnitten und die Arbeitslösungen enthielten 1 nM  $^{123}\text{I}$ -N7A  $\pm$  1 µM N7A in einer

Blockierungslösung auf Polymerbasis (ImmunoBlock). Alle Experimente wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Parallelschnitte wurden zur Darstellung der Gesamtbindung mit [ $^{123}\text{I}$ ]iodiertem Protein und zum Nachweis der Bindungsspezifität mit [ $^{123}\text{I}$ ]iodiertem Protein plus 1000-fachem Überschuss des nicht-markierten Proteins inkubiert. 80  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung wurden auf Shandon Coverplates verbracht und die Objektträger mit den Gewebeschnitten aufgesetzt. Die Reaktionskammer zwischen Objektträgeroberfläche und Coverplate wurde mit 120  $\mu\text{l}$  der Arbeitslösung beschickt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h mit A5C3-QH oder für 1 h mit N7A und wurde durch Aufbringen von 3 ml PBS gestoppt. Die Objektträger wurden in PBS-gefüllte Glas-Küvetten überführt und es folgten drei Waschschriffe auf dem Schüttler (60 rpm; 5 min; Raumtemperatur). Nach dem Lufttrocknen (30 min; Raumtemperatur) wurde in einer Expositionskassette eine Phosphor-Bildplatte (Multipurpose Standard) auf die Objektträger gelegt. Nach 16-stündiger Exposition wurde die Bildplatte mit einem Bildplatten-Scanner bei einer Auflösung von 25  $\mu\text{m}$  ausgelesen.

### **Datenanalyse**

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm AIDA dargestellt und ausgewertet. Es wurden Messbereiche über hochanreichernde Regionen der Glioblastom-Schnitte definiert, welche mit  $^{123}\text{I}$ -markiertem Protein inkubiert worden waren. Glioblastom-Schnitte nach Ko-Inkubation mit  $^{123}\text{I}$ -markiertem und nicht-markiertem Protein sowie Schnitte von tumorfreiem Gehirn wurden jeweils in ihrer Gesamtheit in einem Messbereich erfasst. Die mittleren Intensitäten pro Fläche der einzelnen Messbereiche wurden auf die mittlere Intensität pro Fläche von tumorfreiem Gehirn des jeweiligen Experimentes normiert und als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## **2.8 *in-vivo*-Testmethoden**

### **2.8.1 Szintigraphie**

#### **Durchführung**

Experimente mit  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$ ,  $^{123}\text{I}$ -N7A oder  $^{123}\text{I}$ -Lcn2 erfolgten an Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren und Experimente mit  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH an Mäusen mit subkutanen U251/VEGFR-3-Tumoren. Den Mäusen wurden 16–20 MBq einer Lösung [ $^{123}\text{I}$ ]iodierten Proteins in einem Volumen von 60–150  $\mu\text{l}$  mit einer 29G-Insulinspritze in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Die Injektion erfolgte am wachen Tier. 2 h und 24 h nach Injektion ( $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$ ,  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH) oder 1 h, 3 h und 24 h nach Injektion ( $^{123}\text{I}$ -N7A,  $^{123}\text{I}$ -Lcn2) wurden jeweils vier Tiere unter Isofluran-Narkose in Bauchlage auf einer Wärmematte auf dem Detektor einer

Gammakamera (e.cam, *Low Energy High Resolution*-Kollimator) platziert. Szintigramme wurden über einen Zeitraum von 30 min, mit einem Energiefenster von 147–170 keV und einer Bildmatrix von 512 x 512 aufgenommen. Um die Anreicherung von freiem Iodid in der Schilddrüse zu verhindern, wurde den Tieren 1 h vor Injektion und 1 h vor Aufnahme der 24 h-Szintigramme jeweils 1 Tropfen Irenat (etwa 20 mg Natriumperchlorat) peroral verabreicht.

### **Datenanalyse**

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm AMIDE dargestellt und ausgewertet. Messbereiche wurden über den Tumor und im Bereich der hinteren Extremität der gegenüberliegenden Körperseite (kontralateraler Hintergrund) definiert. Für jedes Tier wurde der Quotient aus der mittleren Intensität des Tumor-Bereiches und des kontralateralen Hintergrund-Bereiches (Tumor/Kontralateral-Verhältnis) gebildet und als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung der Tiere einer Gruppe dargestellt.

## **2.8.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**

### **Durchführung**

C57BL/6-Mäusen mit intrakraniell wachsenden GL261-Tumoren wurden 2,7 MBq  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  injiziert. Die Injektion erfolgte unter Isofluran-Narkose mit einem Katheter in eine der lateralen Schwanzvenen. Es wurde mit 100  $\mu\text{l}$  0,9 % (m/v) NaCl nachgespült. 3 h und 24 h nach Injektion wurden jeweils zwei Mäuse unter Isofluran-Narkose nebeneinander in Bauchlage auf einer Wärmematte auf der Liege eines Kleintier-PET-Scanners platziert. Die Köpfe der Mäuse lagen zentral im Gesichtsfeld des Scanners. Es erfolgten eine Emissionsmessung von 60 min Dauer und eine Transmissionsmessung von 15 min Dauer.

Zwei Tage vor der PET mit  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  wurden Aufnahmen mit  $^{18}\text{F-FET}$  durchgeführt. Den Mäusen wurden 18 MBq  $^{18}\text{F-FET}$  in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  über einen Katheter in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Die PET-Messung wurde zeitgleich mit der Injektion gestartet. Es erfolgten eine Emissionsmessung von 60 min Dauer und eine Transmissionsmessung von 7 Minuten Dauer. Die Lagerung der Tiere erfolgte wie zuvor beschrieben.

### **Rekonstruktion der Bilddaten**

Die Bilddaten wurden mit iterativen Algorithmen (OSEM3D (Hudson, 1994; Qi, 1998) und OP-MAP3D (Mumcuoglu, 1994; Qi, 2000)) mit dem Programm Inveon Acquisition Workplace rekonstruiert. Zusätzlich wurden die Bilder auf Schwächung, Streuung und Halbwertszeit korrigiert. Die resultierenden Bilder hatten eine Bildmatrix von 128x128x159 mit einer Voxelgröße von 0,78 x 0,78 x 0,80 mm<sup>3</sup>.

### Datenanalyse

Die rekonstruierten Bilddaten wurden mit dem Programm AMIDE ausgewertet. Für die Auswertung der  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$ -Daten wurde das Zeitfenster zwischen 0 min und 60 min, für die Auswertung der  $^{18}\text{F-FET}$ -Daten das Zeitfenster zwischen 40 min und 60 min verwendet. Messbereiche wurden über den Tumor und kontralateral im tumorfreien Gehirn definiert. Für jedes Tier wurde der Quotient aus der mittleren Aktivitätskonzentration des Tumor-Bereiches und des kontralateralen Hintergrund-Bereiches (Tumor/Kontralateral-Verhältnis) gebildet und als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung der Tiere einer Gruppe dargestellt.

### 2.8.3 Biodistribution

#### Durchführung

Die Biodistribution von  $^{123}\text{I-VEGF-C}_{156\text{S}}$  (2 MBq in 50  $\mu\text{l}$ ),  $^{123}\text{I-N7A}$  (16 MBq in 120  $\mu\text{l}$ ) und  $^{123}\text{I-Lcn2}$  (16 MBq in 60  $\mu\text{l}$ ) wurde an Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren untersucht. Die Biodistribution von  $^{123}\text{I-A5C3-QH}$  (2 MBq in 50  $\mu\text{l}$ ) wurde an Mäusen mit subkutanen U251/VEGFR-3-Tumoren untersucht. Den Mäusen wurde eine Lösung des [ $^{123}\text{I}$ ]iodierten Proteins mit einer 29G-Insulinspritze in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Die Injektion erfolgte am wachen Tier. 1 / 3 / 8 / 24 / 48 h nach Injektion ( $^{123}\text{I-VEGF-C}_{156\text{S}}$ ,  $^{123}\text{I-A5C3-QH}$ ) oder nach der Szintigraphie (24 h nach Injektion;  $^{123}\text{I-N7A}$ ,  $^{123}\text{I-Lcn2}$ ) wurden die Tiere unter tiefer Isofluran-Narkose durch Punktion des Herzens entblutet. Neben dem Blut wurden Tumor, Herz, Lunge, Leber, Milz, Magen, Nieren, Dünndarm, Dickdarm, Muskel, Schilddrüse und Gehirn entnommen. Der Inhalt von Magen und Blinddarm wurde durch Ausstreichen entfernt. Die Masse der entnommenen Organe wurde bestimmt und deren Radioaktivität im Gamma-Counter gemessen. Der Schwanz mit der Injektionsstelle, der Tupfer, der zur Stillung der Blutung nach der Injektion eingesetzt worden war, und eine Standardreihe der Injektionslösung wurden ebenfalls im Gamma-Counter vermessen. Für jede Probe wurde 1 min lang die Zählrate in einem Energiefenster von 100–300 keV gemessen.

#### Datenanalyse

Alle Messwerte wurden unter Berücksichtigung der physikalischen Halbwertszeit von  $^{123}\text{I}$  (13,2 h) auf eine Referenzzeit korrigiert. Für jedes Tier wurde über die Standardreihe der Injektionslösung und nach Abzug der Impulsraten in Schwanz und Tupfer die injizierte Dosis (ID) berechnet. Organspezifische Aufnahmewerte wurden als Prozent der injizierten Dosis (normiert auf die Masse des untersuchten Gewebes; % ID/g) berechnet und als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.



#### **2.8.4 *ex-vivo*-Autoradiographie und Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

C57BL/6-Mäuse mit intrakraniell wachsenden GL261-Tumoren wurden nach der PET mit  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  unter tiefer Isofluran-Narkose durch Punktion des Herzens entblutet. Das Gehirn wurde entnommen, in 0,9 % (m/v) NaCl gespült, mit Tissue-Tek O.C.T. umhüllt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Mit einem Kryostaten ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurden  $16\text{ }\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf raumwarme Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte trockneten 30 min bei Raumtemperatur.

In einer Expositionskassette wurde eine Phosphor-Bildplatte (Multipurpose Standard) auf die Objektträger gelegt. Nach 22-stündiger Exposition wurde die Bildplatte mit einem Bildplatten-Scanner bei einer Auflösung von  $25\text{ }\mu\text{m}$  ausgelesen. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm AIDA dargestellt.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden konsekutive Gewebeschnitte 30 s in 70 % (v/v) Ethanol und 5 min in Hämalaunlösung nach Mayer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und 30 s in 0,5 % (m/v) Eosin-G-Lösung (1 Tropfen Eisessig pro 100 ml) inkubiert. Es folgte die Inkubation in 70 % (v/v) Ethanol (2x 20 s), 96 % (v/v) Ethanol (1 min) und 100 % (v/v) Ethanol (1 min). Nach Inkubation in Xylol (2x 1 min) wurden die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckt. Angefertigt wurden die Färbungen durch Mitarbeiter der Abteilung für Neurochirurgische Forschung der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik am Klinikum der Universität München.

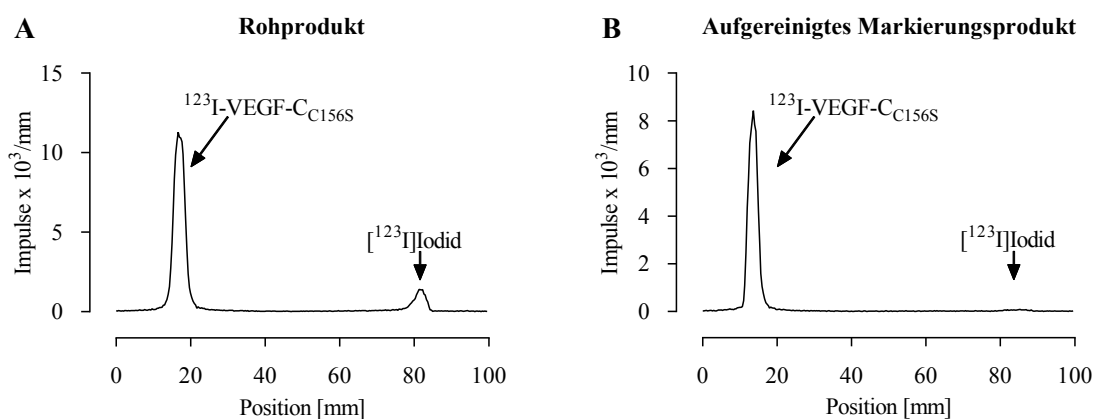
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung von VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ , A5C3-QH und N7A und biologische Evaluierung der Markierungsprodukte

##### 3.1.1 VEGFR-3-spezifischer Ligand VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$

##### 3.1.1.1 [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung und Untersuchung der Stabilität

VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  wurde nach der Iodogen-Methode (Fraker, 1978) mit  $^{123}\text{I}$  markiert. Die Aufreinigung des Rohproduktes mittels Größenausschlusschromatographie erlaubte eine effektive Abtrennung von nicht-Protein-gebundenem [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid (Abbildung 5). Die Markierungsausbeute betrug  $80,9 \pm 12,8 \%$  und die RCY war am Ende der Synthese und ohne Halbwertzeitkorrektur  $77,0 \pm 4,7 \%$ . Das aufgereinigte Markierungsprodukt hatte eine SA von  $170,6 \pm 22,0 \text{ MBq/nmol}$  und erfüllte mit einer RCP von  $97,8 \pm 1,1 \%$  die Anforderungen für die Verwendung in weiterführenden *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen (jeweils  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ;  $n = 6$ ).

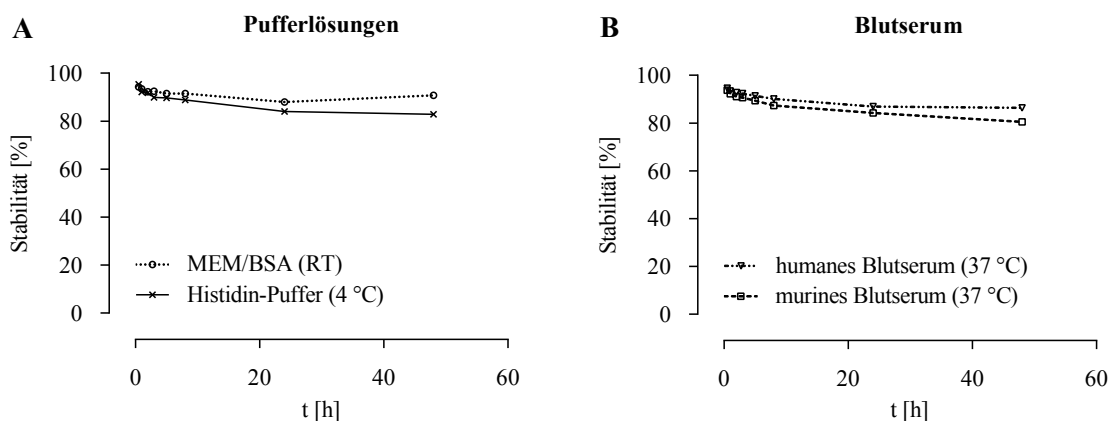


**Abbildung 5. Aufreinigung des Markierungsproduktes  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ .**

Repräsentative Dünnschichtchromatogramme (**A**) des Rohproduktes nach 5 min Reaktionszeit und (**B**) des aufgereinigten Markierungsproduktes nach Abtrennung von freiem [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid durch Größenausschlusschromatographie. Stationäre Phase: Mit Kieselgel imprägniertes Glas-Mikrofaser-Papier; mobile Phase: 85 % (v/v) Methanol in  $\text{H}_2\text{O}$ .  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  verblieb am Startpunkt und freies [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid wanderte mit der Fließmittelfront.

Die Stabilität des Markierungsproduktes  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  hinsichtlich Deiodierungsreaktionen wurde über einen Zeitraum von 48 h in Histidin-Puffer (Formulierungspuffer der Präparation und Applikationsmedium für Tierexperimente), in MEM/BSA (Inkubationspuffer für den *in-vitro*-Nachweis der Bindungsaktivität) sowie in murinem und humanem Blutserum untersucht (Abbildung 6).

In MEM/BSA betrug die Stabilität 93 % nach 3 h und 91 % nach 48 h. In Histidin-Puffer waren nach 3 h 90 % des Markierungsproduktes stabil erhalten und nach 48 h 83 % (Abbildung 6A). In Blutserum waren nach 3 h rund und 92 %  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  stabil erhalten und nach 48 h waren es zwischen 81 % und 86 % (Abbildung 6B).



**Abbildung 6. Stabilität von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  in Pufferlösungen und Blutserum.**

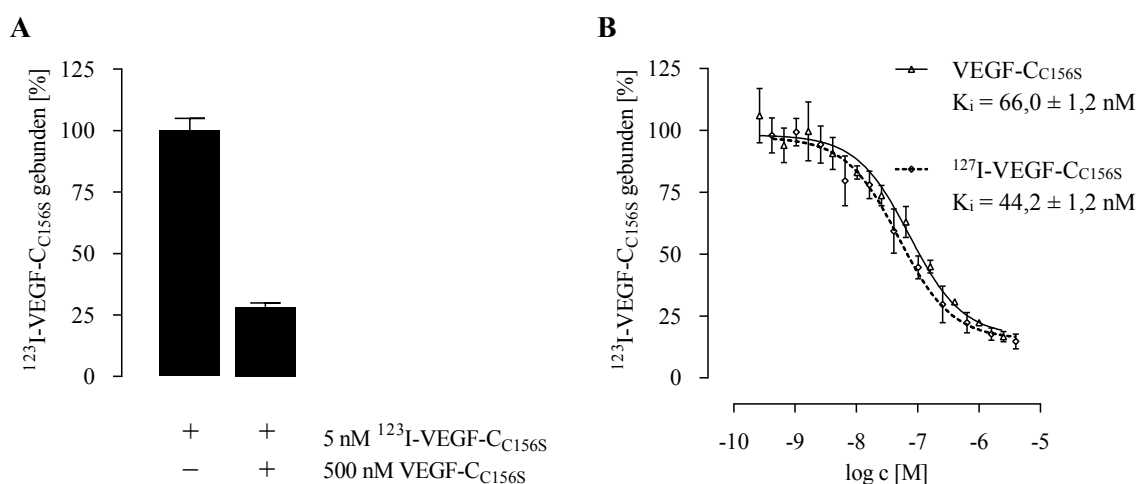
20 MBq  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  wurden in 500  $\mu\text{l}$  Untersuchungslösung bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Nach 0,5/1/2/3/5/8/24/48 h wurde die radiochemische Reinheit (RCP) mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt und durch Normierung auf die RCP des Markierungsproduktes die Stabilität berechnet. **(A)** Stabilität in Histidin-Puffer, in dem  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  nach der Markierung erhalten wurde, und in MEM/BSA, dem Inkubationspuffer für nachfolgende *in-vitro*-Experimente. **(B)** Stabilität in murinem und humanem Blutserum. RT: Raumtemperatur.

### 3.1.1.2 Untersuchung der Bindungsaktivität *in vitro*

Zum Nachweis der Bindungsaktivität von VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  nach  $^{123}\text{I}$ Iodierung wurde die Erkennung von zellulärem VEGFR-3 auf der Glioblastomzelllinie U87MG untersucht. Die Expression von VEGFR-3 auf der Oberfläche von U87MG-Zellen ist beschrieben in Gieser (2014).

Ein 100-facher Überschuss VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  kompetitierte die Bindung von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  auf U87MG-Zellen (Abbildung 7A). Dies beweist die spezifische Bindung von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  an dessen Zielstruktur und den Erhalt der Bindungsaktivität von VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  nach  $^{123}\text{I}$ Iodierung. Damit stand  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  als Radioligand für kompetitive Bindungsassays zur Verfügung.

Kompetitive Bindungsassays wurden zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten von nativem und iodiertem VEGF- $C_{156S}$  durchgeführt. U87MG-Zellen wurden mit  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  als Radioligand in Gegenwart steigender Konzentrationen der nicht-radioaktiven Kompetitoren VEGF- $C_{156S}$  oder  $^{127}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  inkubiert.  $^{127}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  wurde zuvor durch Markierung mit dem stabilen Iod-Isotop  $^{127}\text{I}$  erhalten. Der Zell-gebundene Anteil an  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  wurde durch Messen der Radioaktivität im Gamma-Counter detektiert. Mittels nichtlinearer Regressionsanalysen und unter der Annahme reversibler, im Gleichgewicht vorliegender 1:1-Interaktionen wurden für VEGF- $C_{156S}$  und  $^{127}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  sigmoidale Kompetitionskurven erhalten (Abbildung 7B). Die Gleichgewichtskonstanten ( $K_i$ ) betragen 66 nM für VEGF- $C_{156S}$  und 44 nM für  $^{127}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$ .



**Abbildung 7. Bindungsaktivität von iodiertem VEGF- $C_{156S}$  auf Glioblastomzellen.**

(A) U87MG-Zellen wurden bei Raumtemperatur 2 h mit 5 nM  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  mit oder ohne 500 nM VEGF- $C_{156S}$  inkubiert. Dargestellt ist der Anteil an gebundenem  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$ , normiert auf die Gesamtbindung (Bestimmung ohne VEGF- $C_{156S}$ ). (B) Kompetitionskurven zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte von VEGF- $C_{156S}$  und  $^{127}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$ . U87MG-Zellen wurden bei Raumtemperatur 2 h mit 5 nM  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  als Radioligand und steigenden Konzentrationen VEGF- $C_{156S}$  (0,26–2500 nM; durchgezogene Linie) oder  $^{127}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$  (0,42–4000 nM; gestrichelte Linie) als Kompetitor inkubiert. Dargestellt ist der Anteil an gebundenem  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{156S}$ , normiert auf die Gesamtbindung (Bestimmung ohne Kompetitor).  $K_i$ -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression ermittelt.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, jeweils durchgeführt als Vierfachbestimmung.

### 3.1.1.3 Untersuchungen im subkutanen Mausmodell

Die Untersuchungen erfolgten an weiblichen SHO-Mäusen mit subkutan in der rechten Flankenregion wachsenden U87MG-Tumoren.

### **Biodistribution**

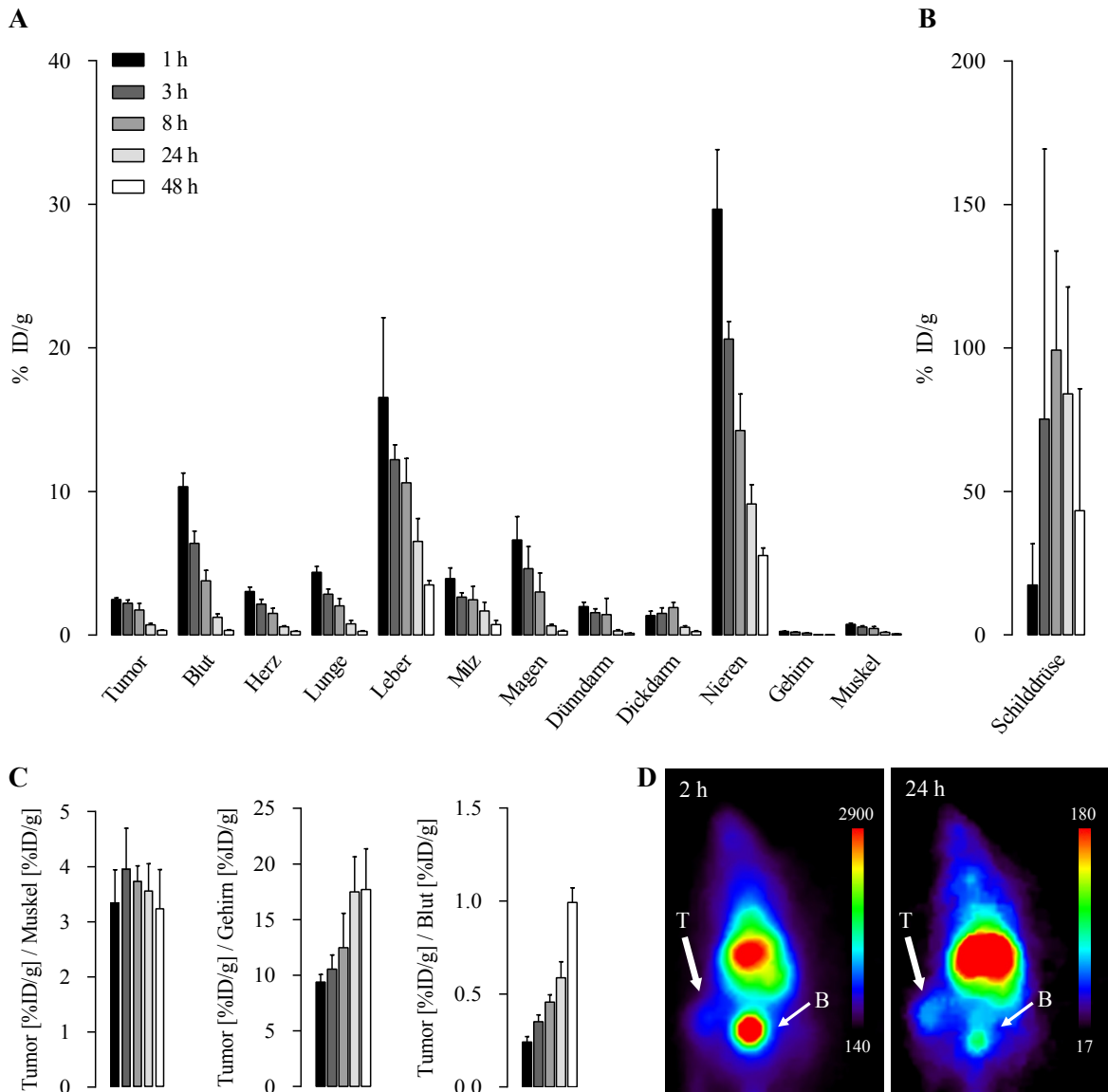
1 h, 3 h, 8 h, 24 h und 48 h nach i.v.-Injektion von 2 MBq  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$  wurden jeweils 5 Tiere getötet, ausgewählte Organe entnommen und organspezifische Aktivitätskonzentrationen (% ID/g) bestimmt (Abbildung 8A). In allen Organen mit Ausnahme des Dickdarms und der Schilddrüse waren die Aktivitätskonzentrationen 1 h p.i. am höchsten und fielen im weiteren Zeitverlauf ab. Im Tumor waren es 1 h p.i. 2,5 % ID/g. Dieser Wert fiel bis 3 h p.i. nur wenig ab (2,2 % ID/g) und 8 h p.i. wurden 1,8 % ID/g im Tumor detektiert. Im Vergleich dazu nahm die Aktivität im Blut und in gut durchbluteten Organen (wie Herz, Lunge, Leber oder Nieren) im frühen Zeitverlauf bis 8 h deutlich schneller ab. Dies kann als Hinweis auf eine spezifische Retention von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$  im Tumor, die über einen reinen Perfusionseffekt hinausging, bewertet werden.

Die höchsten Aktivitätskonzentrationen wurden neben der Schilddrüse (Abbildung 8B) in den Nieren (30 % ID/g), in der Leber (17 % ID/g) und im Blut (10 % ID/g) gefunden (Abbildung 8A). Die hohen Aktivitätskonzentrationen in der Schilddrüse (Höchstwert 99 % ID/g nach 8 h, Abbildung 8B) und die Aktivität im Magen (Höchstwert 7 % ID/g nach 1 h; Abbildung 8A) sind auf die Akkumulation von  $^{123}\text{I}$ Iodid zurückzuführen, das durch die enzymatische Dehalogenierung  $^{123}\text{I}$ iodierter Protein-Tracer freigesetzt wird. Im Gehirn und im Muskelgewebe waren die Aktivitätskonzentrationen im gesamten Zeitverlauf niedriger als im Tumor (Abbildung 8A), was sich in Tumor/Muskel-Verhältnissen größer als 3 und einem ansteigenden Tumor/Gehirn-Verhältnis zwischen 9 und 18 widerspiegelte (Abbildung 8C links und Mitte). Das Tumor/Blut-Verhältnis stieg zwischen 1 h p.i. und 48 h p.i. von 0,2 auf 1,0 an (Abbildung 8C rechts).

### **Szintigraphie**

Tumortragende Mäuse erhielten 20 MBq  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$  i.v. appliziert. 2 h und 24 h nach Applikation wurden Szintigramme aufgenommen (Abbildung 8D). Den Tieren wurde peroral Irenat verabreicht, um die Anreicherung von  $^{123}\text{I}$ Iodid in der Schilddrüse zu unterbinden.

In Übereinstimmung mit den Biodistributions-Daten, waren 2 h nach Injektion von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{\text{C156S}}$  hohe Aktivitäten in den Organen des Brust- und oberen Bauchraumes zu verzeichnen (Abbildung 8D links). Deutlich erkennbar war die Harnblase. Der Tumor war 2 h p.i. nicht abgrenzbar und das Tumor/Kontralateral-Verhältnis betrug  $1,5 \pm 0,03$  ( $n = 4$ ). 24 h nach Injektion war eine Abgrenzung des Tumors szintigraphisch möglich (Abbildung 8D rechts) und das Verhältnis Tumor/Kontralateral war auf  $1,8 \pm 0,1$  ( $n = 4$ ) angestiegen. Hohe Aktivitäten reicherten sich 24 h p.i. in den Nieren und der Leber an.



**Abbildung 8. Biodistribution und Szintigraphie nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{s}}$ .**

Untersuchungen an SHO-Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren. (A, B) Organspezifische Aufnahmewerte (% ID/g) und (C) Tumor/Organ-Verhältnisse im Zeitverlauf nach i.v.-Injektion von 2 MBq  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{s}}$ .  $\bar{x} \pm \text{SD}$  (n = 5). Den Diagrammen zugrunde liegende Zahlenwerte sind im Anhang in Tabelle 4 aufgeführt. (D) Szintigramme einer Maus in der Ansicht von unten: 2 h und 24 h nach i.v. Injektion von  $19,9 \pm 0,9$  MBq (n = 4)  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{s}}$ . Pfeile markieren den Tumor (T) und die Blase (B).

### **Biodistribution in Gegenwart eines Überschusses VEGF-C<sub>C156S</sub> zur Überprüfung der Spezifität *in vivo***

Um zu überprüfen, ob die im Tumor detektierte Radioaktivität auf eine spezifische Wechselwirkung des Bindeproteins <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub> mit dessen Zielstruktur zurückzuführen ist, wurde ein Blockade-Experiment durchgeführt. Tumortragenden Mäusen (n = 6) wurden 2 MBq <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub> (0,011 nmol in 50 µl) i.v. injiziert. Jeweils 3 Mäuse hatten 1 min vorher einen Überschuss VEGF-C<sub>C156S</sub> (13 nmol in 150 µl) oder 150 µl PBS (als Kontrolle) i.v. erhalten. 3 h nach Injektion wurden die Tiere getötet, ausgewählte Organe entnommen und organspezifische Aktivitätskonzentrationen bestimmt.

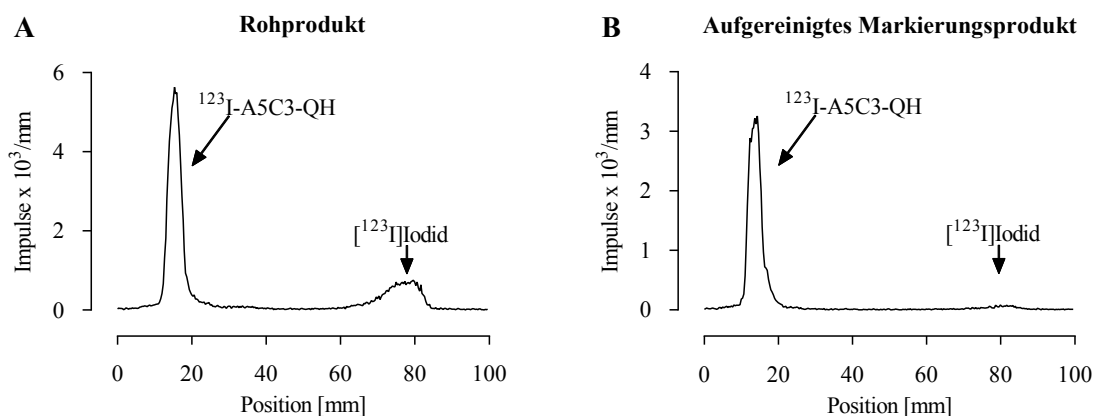
In beiden Gruppen des Blockade-Experimentes waren die Aktivitätskonzentrationen im Tumor gleich hoch und betragen 3 h p.i. 1,4 % ID/g (Tabelle 5 im Anhang). Eine Kompetition der <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub>-Retention im Tumor durch einen Überschuss an VEGF-C<sub>C156S</sub> konnte nicht nachgewiesen werden. Im Blut wurden 3 h p.i. 1,3 % ID/g (Tabelle 5 im Anhang) detektiert.

Die Aktivitätskonzentrationen waren sowohl im Tumor als auch im Blut deutlich niedriger als die Werte des in Abbildung 8A beschriebenen Biodistributionsexperimentes (Tumor 2,2 % ID/g; Blut 6,4 % ID/g). Dies spiegelte sich auch in niedrigeren Aufnahmewerten gut durchbluteter Organe, wie Herz, Lunge, Leber oder Nieren, wider (Tabelle 5 im Anhang).

### 3.1.2 VEGFR-3-spezifisches Anticalin A5C3-QH

#### 3.1.2.1 [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung und Untersuchung der Stabilität

Für die [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung wurde das VEGFR-3-spezifische Anticalin A5C3-QH bei Raumtemperatur mit [ $^{123}\text{I}$ ]NaI umgesetzt. Mittels Größenausschlusschromatographie wurde nicht-Protein-gebundenes [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid aus der Rohproduktlösung abgetrennt (Abbildung 9). Das aufgereinigte Markierungsprodukt wurde mit einer RCP von  $96,0\% \pm 1,0\%$  und einer SA von  $226,2 \pm 39,9$  MBq/nmol erhalten. Die Markierungsausbeute betrug  $79,6\% \pm 10,1\%$  und die RCY nach der Synthese und ohne Halbwertzeitkorrektur  $64,8\% \pm 8,3\%$  (jeweils  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ;  $n = 14$ ).



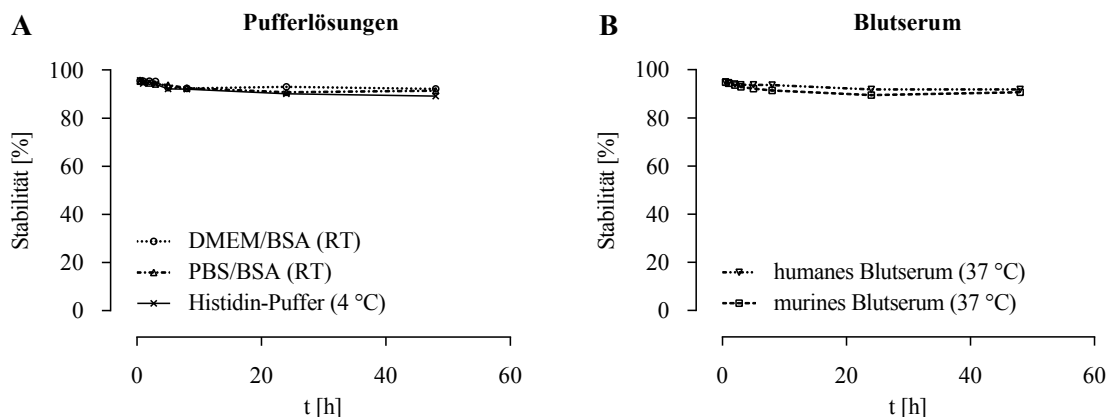
**Abbildung 9. Aufreinigung des Markierungsproduktes  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH.**

Repräsentative Dünnschichtchromatogramme (A) des Rohproduktes nach 5 min Reaktionszeit und (B) des aufgereinigten Markierungsproduktes nach Abtrennung von freiem [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid durch Größenausschlusschromatographie. Stationäre Phase: Mit Kieselgel imprägniertes Glas-Mikrofaser-Papier; mobile Phase: 85 % (v/v) Methanol in  $\text{H}_2\text{O}$ .  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH verblieb am Startpunkt und freies [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid wanderte mit der Fließmittelfront.

Die Stabilität des Markierungsproduktes  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH hinsichtlich Deiodierungsreaktionen wurde über einen Zeitraum von 48 h in Histidin-Puffer (Formulierungspuffer der Präparation und Applikationsmedium für Tierexperimente), in DMEM/BSA und PBS/BSA (jeweils Inkubationspuffer für den *in-vitro*-Nachweis der Bindungsaktivität) sowie in murinem und humanem Blutserum untersucht.

In den untersuchten Pufferlösungen (Abbildung 10A) sowie in humanem und murinem Blutserum (Abbildung 10B) war die Stabilität von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH etwa gleich hoch. Nach 3 h waren zwischen 93 % und 95 % des Markierungsproduktes stabil erhalten. Nach 24 h und 48 h waren es zwischen 90 % und 92 %.





**Abbildung 10. Stabilität von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH in Pufferlösungen und Blutserum.**

20 MBq  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH wurden in 500  $\mu\text{l}$  Untersuchungslösung bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Nach 0,5/1/2/3/5/8/24/48 h wurde die radiochemische Reinheit (RCP) mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt und durch Normierung auf die RCP des Markierungsproduktes die Stabilität berechnet. **(A)** Stabilität in Histidin-Puffer, in dem  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH nach der Markierung erhalten wurde, sowie in PBS/BSA und DMEM/BSA, den Inkubationspuffern für nachfolgende *in-vitro*-Experimente. **(B)** Stabilität in murinem und in humanem Blutserum. RT: Raumtemperatur.

### 3.1.2.2 Untersuchung der Bindungsaktivität *in vitro*

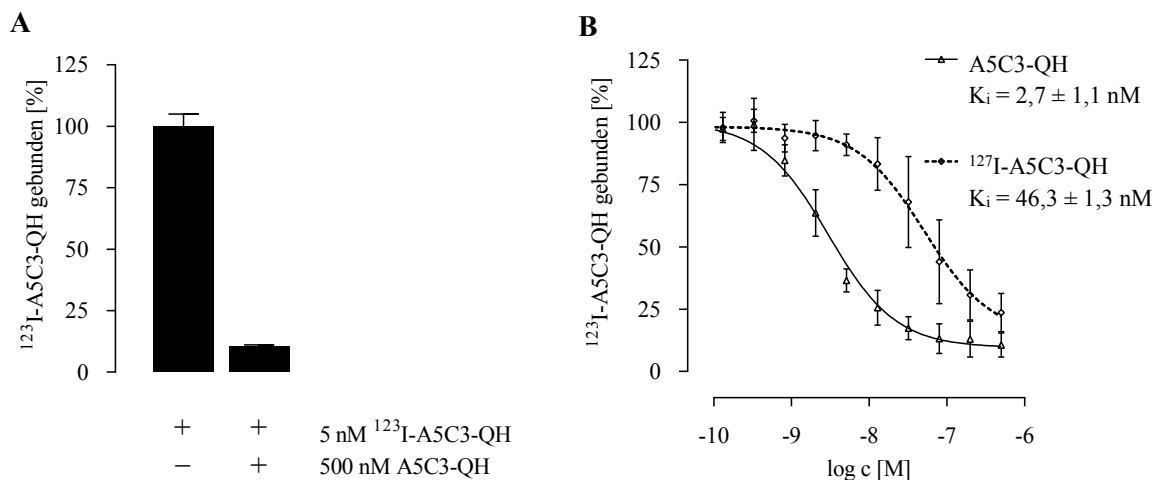
Um die Bindungsaktivität des Anticalins A5C3-QH nach [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung zu belegen, wurde die Erkennung von zellulärem VEGFR-3 auf einer humanen Glioblastomzelllinie sowie auf humanen Glioblastomgewebeschnitten untersucht.

#### Bindungsaktivität auf Glioblastomzellen

Die Bindung von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH an VEGFR-3-überexprimierende U251/VEGFR-3-Zellen wurde durch einen 100-fachen Überschuss an nicht-markiertem A5C3-QH kompetitiert (Abbildung 11A). Dies belegt die spezifische Bindung von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH an dessen Zielstruktur, was Voraussetzung für die Verwendung von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH als Radioligand in kompetitiven Bindungsassays war.

Mit kompetitiven Bindungsassays wurden die Bindungsaffinitäten von nativem und iodiertem A5C3-QH ermittelt. U251/VEGFR-3-Zellen wurden mit  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH als Radioligand und einer Konzentrationsreihe der nicht-radioaktiven Kompetitoren A5C3-QH oder  $^{127}\text{I}$ -A5C3-QH (markiert mit dem stabilen Iod-Isotop  $^{127}\text{I}$ ) inkubiert. Der zellgebundene Anteil an  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH wurde quantifiziert. Unter der Annahme reversibler, im Gleichgewicht vorliegender 1:1-Interaktionen wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalysen sigmoidale Kompetitionskurven erhalten

(Abbildung 11B). Die Gleichgewichtskonstante ( $K_i$ ) von  $^{127}\text{I}$ -A5C3-QH betrug 46,3 nM und war 17-mal höher als die von A5C3-QH (2,7 nM).

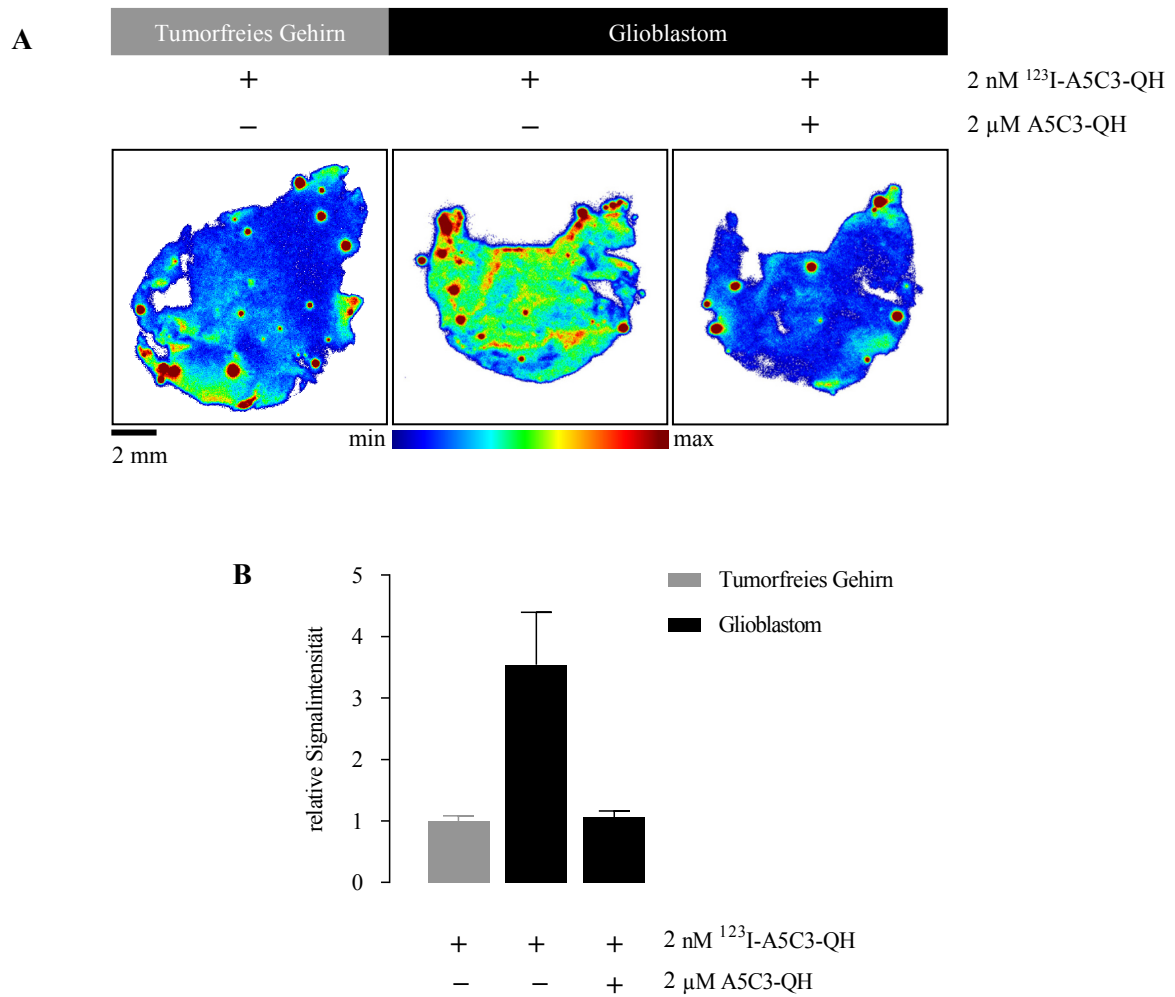


**Abbildung 11. Bindungsaktivität von iodiertem A5C3-QH auf Glioblastomzellen.**

(A) U251/VEGFR-3-Zellen wurden bei Raumtemperatur 2 h mit 5 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH mit oder ohne 500 nM A5C3-QH inkubiert. Dargestellt ist der Anteil an gebundenem  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH, normiert auf die Gesamtbindung (Bestimmung ohne A5C3-QH). (B) Kompetitionskurven zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte von A5C3-QH und  $^{127}\text{I}$ -A5C3-QH. U251/VEGFR-3-Zellen wurden bei Raumtemperatur 2 h mit 5 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH als Radioligand und steigenden Konzentrationen A5C3-QH (durchgezogene Linie) oder  $^{127}\text{I}$ -A5C3-QH (gestrichelte Linie; jeweils 0,052–500 nM) als Kompetitor inkubiert. Dargestellt ist der Anteil an gebundenem  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH, normiert auf die Gesamtbindung (Bestimmung ohne Kompetitor).  $K_i$ -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression ermittelt.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus mindestens  $n = 3$  unabhängigen Experimenten, jeweils durchgeführt als Vierfachbestimmung.

### Bindungsaktivität auf Glioblastomgewebe

Glioblastomgewebe, für das die Expression von VEGFR-3 dokumentiert ist, und tumorfreies Gehirngewebe, in dem VEGFR-3 nicht nachweisbar ist, (Grau, 2007) wurden mit 2 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH inkubiert. Mittels *in-vitro*-Autoradiographie wurde eine deutlich höhere Anreicherung des Tracers in Glioblastomgewebe (Abbildung 12A mittleres Kästchen) als in tumorfreiem Gehirn-Gewebe detektiert (Abbildung 12A linkes Kästchen). Auf konsekutiven Glioblastom-Schnitten kompetitierte ein 1000-facher Überschuss an nicht-markiertem A5C3-QH die Bindung von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH (Abbildung 12A rechtes Kästchen). Die semiquantitative Auswertung der Autoradiogramme ergab ein 3,5-fach höheres Signal in hoch-anreichernden Glioblastom-Regionen gegenüber tumorfreiem Gehirn, was durch einen Überschuss an unmarkiertem A5C3-QH vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 12B). Diese Ergebnisse belegen die Spezifität der Bindung von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH in VEGFR-3-positivem Glioblastomgewebe.



**Abbildung 12. Bindungsaktivität von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH auf Glioblastomgewebe.**

Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur 2 h mit 2 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH mit oder ohne 2  $\mu\text{M}$  A5C3-QH inkubiert und gebundenes  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH mittels Autoradiographie detektiert. **(A)** Repräsentative Autoradiogramme von tumorfreiem Gehirngewebe nach Inkubation mit 2 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH (Negativkontrolle; links) und von konsekutiven Glioblastom-Schnitten nach Inkubation mit 2 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH (Mitte) oder nach Inkubation mit 2 nM  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH + 2  $\mu\text{M}$  A5C3-QH (rechts). **(B)** Semiquantitative Auswertung der Autoradiogramme. Dargestellt sind mittlere Signalintensitäten normiert auf tumorfreies Gehirn.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten, jeweils durchgeführt als Doppelbestimmung.

### 3.1.2.3 Untersuchungen im subkutanen Mausmodell

Experimente zur *in-vivo*-Charakterisierung von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH wurden an weiblichen SHO-Mäusen mit subkutan in der rechten Flankenregion wachsenden U251/VEGFR-3-Tumoren durchgeführt.

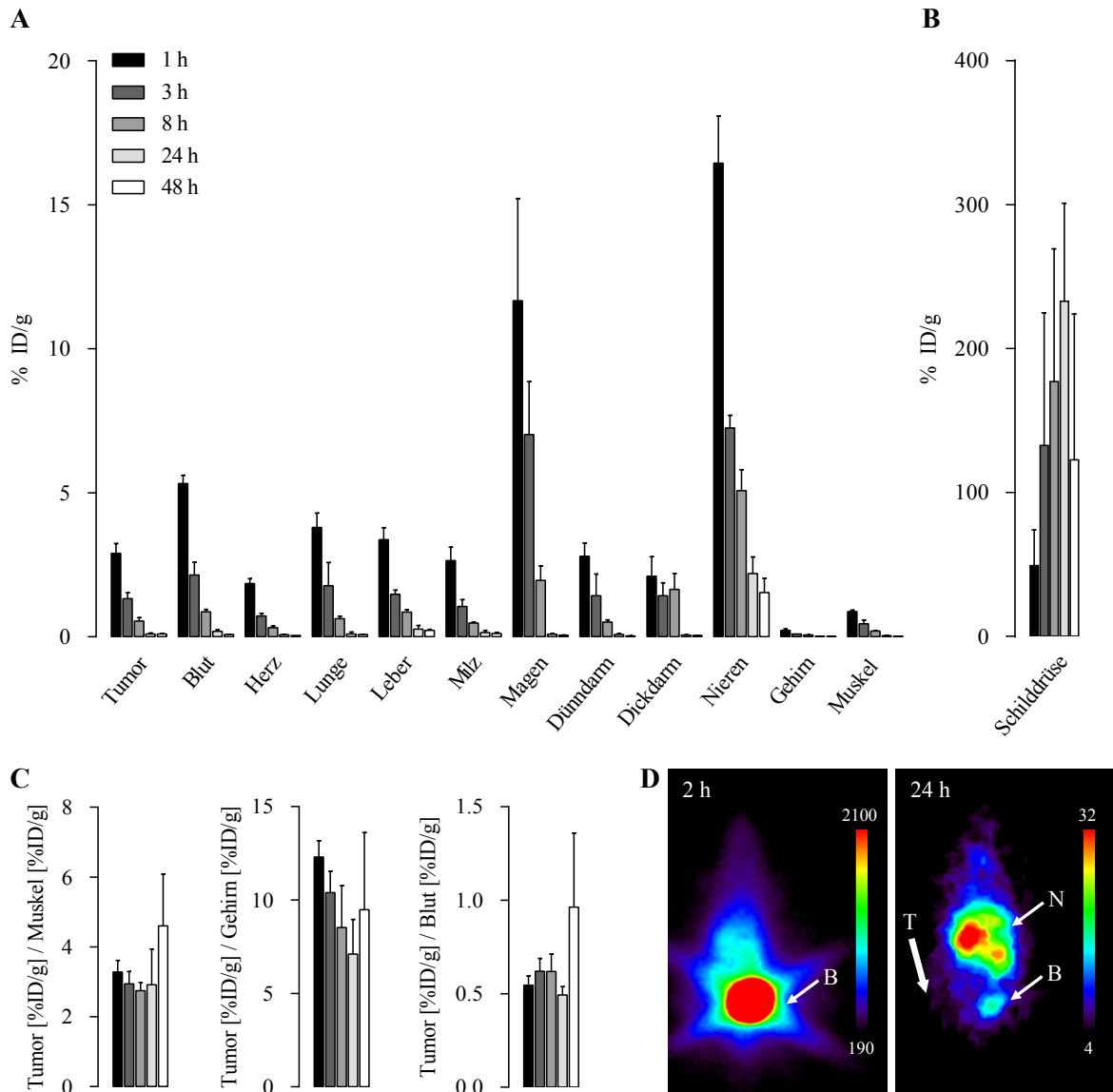
#### Biodistribution

Zur Bestimmung organspezifischer Aktivitätskonzentrationen wurden tumortragende Mäuse 1 h, 3 h, 8 h, 24 h und 48 h nach i.v.-Applikation von 2 MBq  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH getötet und ausgewählte Organe entnommen. Mit Ausnahme des Dickdarms und der Schilddrüse fielen die Aktivitätskonzentrationen in den untersuchten Organen bereits im frühen Zeitverlauf rasch ab. Im Tumor sank die detektierte Aktivität von 2,9 % ID/g (1 h p.i.) über 1,3 % ID/g (3 h p.i.) und 0,5 % ID/g (8 h p.i.) auf 0,1 % ID/g (24 h p.i.). Die höchsten Aktivitätskonzentrationen wurden neben der Schilddrüse in den Nieren (16,4 % ID/g 1 h p.i.) und im Magen (11,7 % ID/g 1 h p.i.) detektiert. In den Nieren wurden auch 24 h und 48 h p.i. noch rund 2 % ID/g gefunden (Abbildung 13A). Die hohen Aktivitätskonzentrationen in der Schilddrüse (bis 233 % ID/g 24 h p.i., Abbildung 13B) und die Aktivität im Magen sind auf die Akkumulation von [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid zurückzuführen, das durch die enzymatische Dehalogenierung [ $^{123}\text{I}$ ]iodierter Protein-Tracer freigesetzt wird. Das Verhältnis Tumor/Muskel betrug zwischen 1 h p.i. und 24 h p.i. etwa 3 und 48 h p.i. 4,6 (Abbildung 13C links), wohingegen das Verhältnis Tumor/Gehirn zwischen 1 h und 24 h p.i. von 12,3 auf 7,1 absank und 48 h p.i. 9,5 betrug (Abbildung 13C Mitte). Der Tumor/Blut-Verhältnis lag zwischen 1 h und 24 h p.i. bei etwa 0,5 und 48 h p.i. bei 1,0 (Abbildung 13C rechts).

#### Szintigraphie

2 h und 24 h nach i.v.-Injektion von 17 MBq  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH wurden Szintigramme tumortragender Mäuse aufgenommen (Abbildung 13D). Um die Anreicherung von [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid in der Schilddrüse zu unterbinden, wurde den Tieren im Vorfeld peroral Irenat verabreicht.

2 h p.i. sammelte sich die meiste Aktivität in der Blase und die Nieren ließen sich deutlich darstellen, was auf eine schnelle renale Elimination von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH und freiem [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid hindeutet. Die sternförmigen Artefakte um die Blase sind auf das Durchdringen der Bleisepten des Kollimators durch hochenergetische Gammaphotonen zurückzuführen (Septenpenetration; Dobbeleir, 1999; Abbildung 13D links). In Übereinstimmung mit den Biodistributions-Daten war 24 h p.i. der Großteil der Aktivität ausgeschieden. Eine szintigraphische Darstellung des Tumors nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH war nicht möglich und das Tumor/Kontralateral-Verhältnis betrug 24 h p.i.  $1,3 \pm 0,3$  (Abbildung 13D rechts).



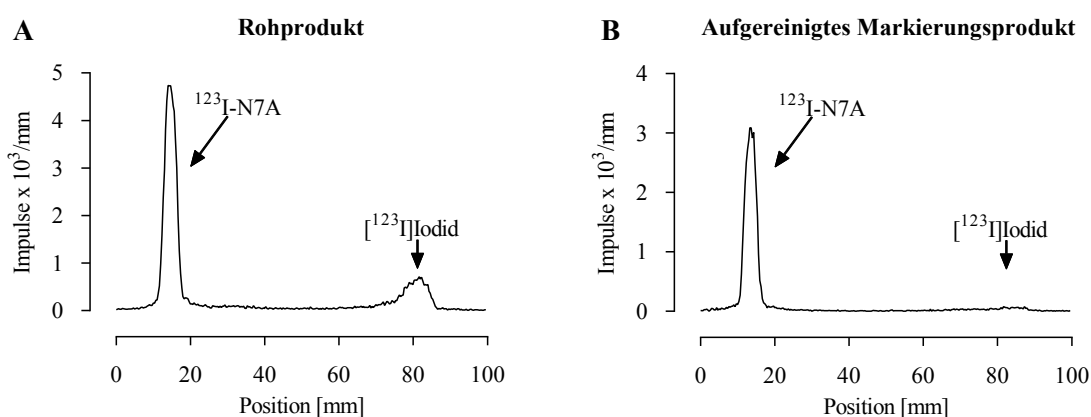
**Abbildung 13. Biodistribution und Szintigraphie nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I-A5C3-QH}$ .**

Untersuchungen an SHO-Mäusen mit subkutanen U251/VEGFR-3-Tumoren. (A, B) Organspezifische Aufnahmewerte (% ID/g) und (C) Tumor/Organ-Verhältnisse im Zeitverlauf nach i.v.-Injektion von 2 MBq  $^{123}\text{I-A5C3-QH}$ .  $\bar{x} \pm \text{SD}$  (n = 5). Den Diagrammen zugrunde liegende Zahlenwerte sind im Anhang in Tabelle 6 aufgeführt. (D) Szintigramme einer Maus in der Ansicht von unten: 2 h und 24 h nach i.v. Injektion von  $17,4 \pm 0,4$  MBq (n = 4)  $^{123}\text{I-A5C3-QH}$ . Pfeile markieren den Tumor (T), die Nieren (N) und die Blase (B).

### 3.1.3 ED-B-spezifisches Anticalin N7A

#### 3.1.3.1 [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung und Untersuchung der Stabilität

Das ED-B-spezifische Anticalin N7A wurde mit [ $^{123}\text{I}$ ]NaI zur Reaktion gebracht und anschließend nicht-Protein-gebundenes [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid mittels Größenausschlusschromatographie wirksam abgetrennt (Abbildung 14). Das aufgereinigte Markierungsprodukt wurde mit einer RCP von  $95,4 \pm 0,9\%$  erhalten. Die Markierungsausbeute betrug  $79,6 \pm 6,5\%$ , die RCY  $65,4 \pm 4,1\%$  und das Markierungsprodukt hatte eine SA von  $207,7 \pm 29,7$  MBq/nmol (jeweils  $\bar{x} \pm \text{SD}$ ;  $n = 10$ ).

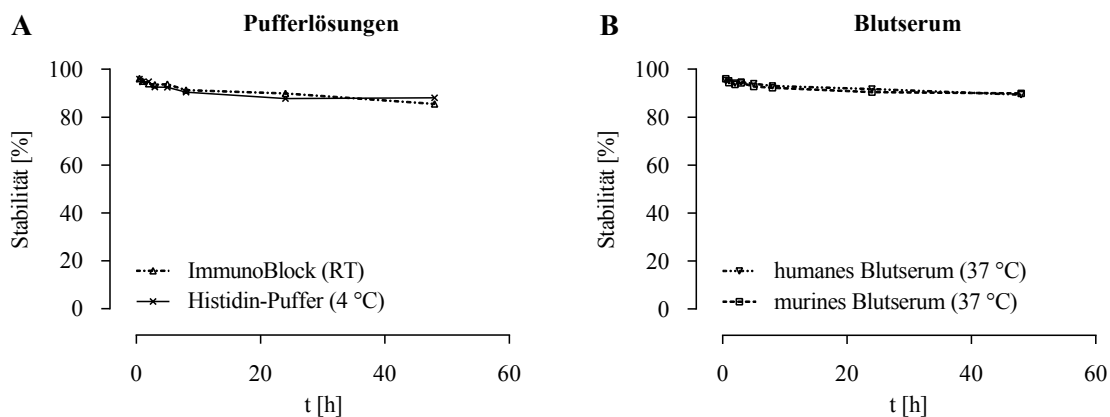


**Abbildung 14. Aufreinigung des Markierungsproduktes  $^{123}\text{I}$ -N7A.**

Repräsentative Dünnschichtchromatogramme (A) des Rohproduktes nach 10 min Reaktionszeit und (B) des aufgereinigten Markierungsproduktes nach Abtrennung von freiem [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid durch Größenausschlusschromatographie. Stationäre Phase: Mit Kieselgel imprägniertes Glas-Mikrofaser-Papier; mobile Phase: 85 % (v/v) Methanol in  $\text{H}_2\text{O}$ .  $^{123}\text{I}$ -N7A verblieb am Startpunkt und freies [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid wanderte mit der Fließmittelfront.

Die Stabilität des Markierungsproduktes  $^{123}\text{I}$ -N7A hinsichtlich Deiodierungsreaktionen wurde über einen Zeitraum von 48 h in Histidin-Puffer (Formulierungspuffer der Präparation und Applikationsmedium für Tierexperimente), in ImmunoBlock (Inkubationspuffer für den *in-vitro*-Nachweis der Bindungsaktivität) sowie in murinem und humanem Blutserum untersucht (Abbildung 15).

In den untersuchten Pufferlösungen betrug die Stabilität nach 3 h etwa 94 % und nach 48 h zwischen 86 und 88 % (Abbildung 15A). In den untersuchten Blutseren waren nach 3 h ebenfalls rund 94 %  $^{123}\text{I}$ -N7A stabil erhalten und nach 48 h waren es 90 % (Abbildung 15B).



**Abbildung 15. Stabilität von  $^{123}\text{I-N7A}$  in Pufferlösungen und Blutserum.**

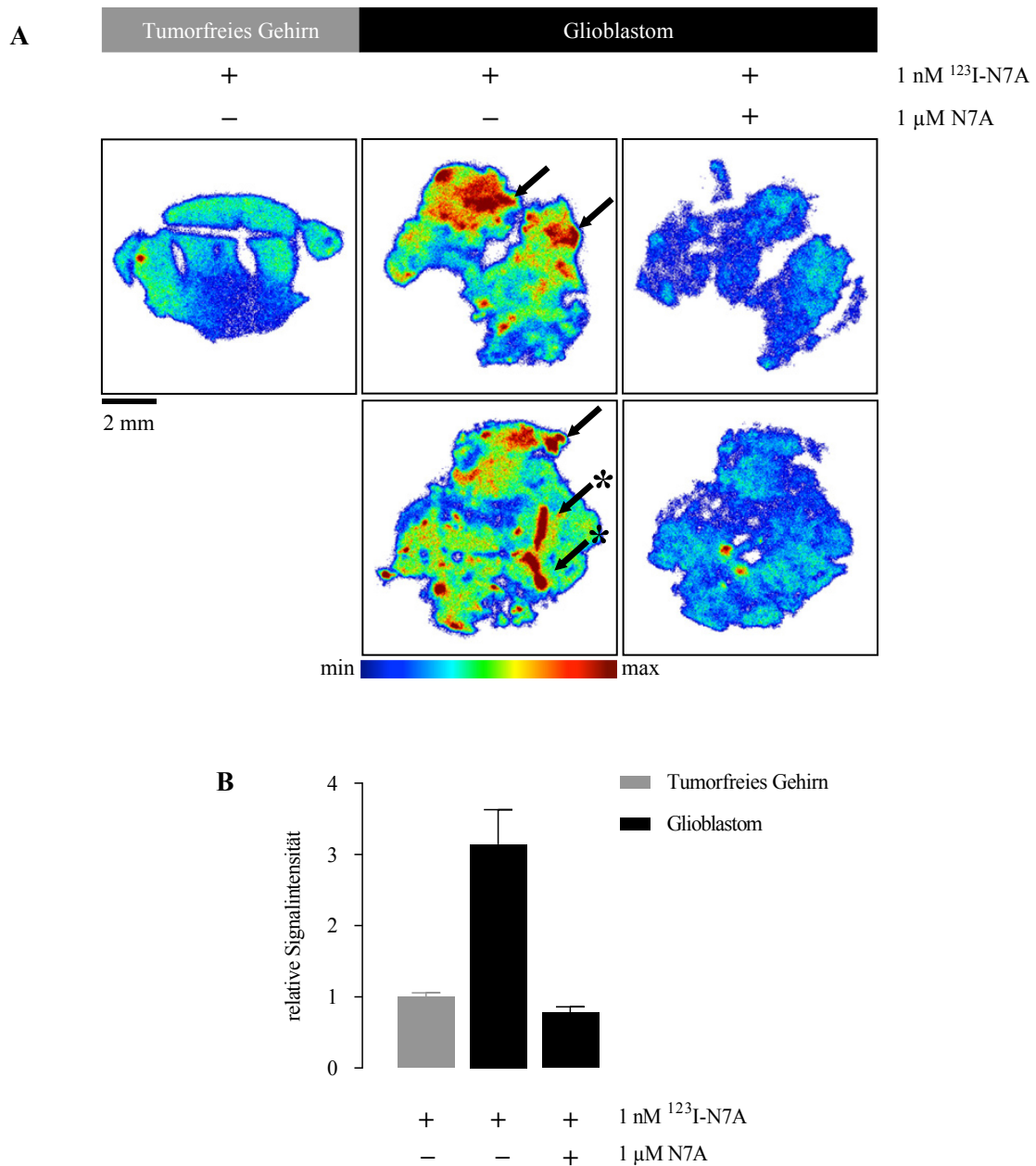
10 MBq  $^{123}\text{I-N7A}$  wurden in 250  $\mu\text{l}$  Untersuchungslösung bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Nach 0,5/1/2/3/5/8/24/48 h wurde die radiochemische Reinheit (RCP) mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt und durch Normierung auf die RCP des Markierungsproduktes die Stabilität berechnet. (A) Stabilität in Histidin-Puffer, in dem  $^{123}\text{I-N7A}$  nach der Markierung erhalten wurde, und in ImmunoBlock, dem Inkubationspuffer für nachfolgende *in-vitro*-Experimente. (B) Stabilität in murinem und in humanem Blutserum. RT: Raumtemperatur.

### 3.1.3.2 Untersuchung der Bindungsaktivität *in vitro*

Zum Nachweis der funktionellen Aktivität des Anticalins N7A nach [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung wurde die Erkennung von ED-B-positivem Fibronectin in humanem Glioblastomgewebe untersucht. Gewebeschnitte wurden mit  $^{123}\text{I-N7A}$  inkubiert und gebundenes  $^{123}\text{I-N7A}$  mittels *in-vitro*-Autoradiographie detektiert. Als Negativkontrolle dienten Gewebeschnitte von tumorfreiem Gehirn, in dem ED-B nicht nachweisbar ist (Castellani, 2002; Albrecht, 2016).

Autoradiogramme von Glioblastomgewebe (Abbildung 16A mittleres Kästchen) dokumentieren im Gegensatz zu Autoradiogrammen von tumorfreiem Gehirngewebe (Abbildung 16A linkes Kästchen) eine starke Anreicherung von  $^{123}\text{I-N7A}$ . Im Glioblastomgewebe waren fokale Mehranreicherungen erkennbar (Abbildung 16A mittleres Kästchen, Pfeile), die zum Teil die Form großer, längs angeschnittener Blutgefäße hatten (Abbildung 16A mittleres Kästchen, Pfeile mit Stern). Auf konsekutiven Glioblastom-Schnitten wurde die Anreicherung von  $^{123}\text{I-N7A}$  durch einen 1000-fachen Überschuss an nicht-markiertem N7A kompetitiert (Abbildung 16A rechtes Kästchen).

Die semiquantitative Auswertung der Autoradiogramme ergab ein 3,1-fach höheres Signal in hochanreichernden Glioblastom-Regionen gegenüber tumorfreiem Gehirn, was durch einen Überschuss an nicht-markiertem N7A vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 16B). Diese Ergebnisse belegen, dass  $^{123}\text{I-N7A}$  mit hoher Spezifität seine Zielstruktur in ED-B-positivem Glioblastomgewebe erkennt.



**Abbildung 16. Bindungsaktivität von  $^{123}\text{I-N7A}$  auf Glioblastomgewebe.**

Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur 1 h mit 1 nM  $^{123}\text{I-N7A}$  mit oder ohne 1  $\mu\text{M N7A}$  inkubiert und gebundenes  $^{123}\text{I-N7A}$  mittels *in-vitro*-Autoradiographie detektiert. **(A)** Repräsentative Autoradiogramme von tumorfreiem Gehirngewebe nach Inkubation mit 1 nM  $^{123}\text{I-N7A}$  (Negativkontrolle; links) und von konsekutiven Glioblastom-Schnitten nach Inkubation mit 1 nM  $^{123}\text{I-N7A}$  (Mitte) oder nach Inkubation mit 1 nM  $^{123}\text{I-N7A}$  + 1  $\mu\text{M N7A}$  (rechts). Fokale Mehranreicherung von  $^{123}\text{I-N7A}$  im Glioblastomgewebe (Pfeile), zum Teil in der Form großer, längs angeschnittener Blutgefäße (Pfeile mit Stern). **(B)** Semiquantitative Auswertung der Autoradiogramme. Dargestellt sind mittlere Signalintensitäten normiert auf tumorfreies Gehirn.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  von jeweils  $n=3$  Schnitten aus zwei unabhängigen Experimenten.



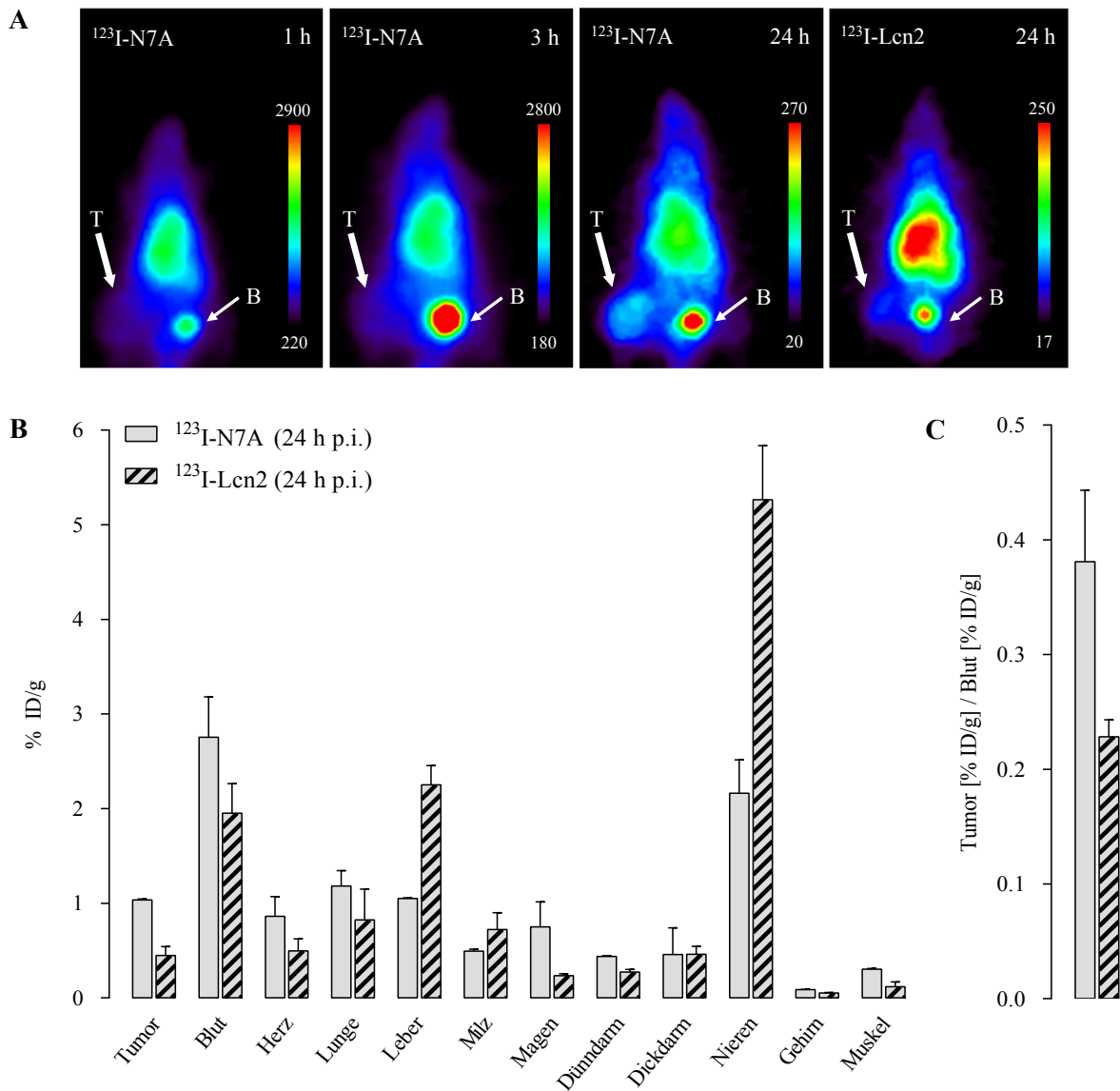
### 3.1.3.3 Untersuchungen im subkutanen Mausmodell

#### Szintigraphie

Weiblichen SHO-Mäusen mit subkutan in der rechten Flankenregion wachsenden U87MG-Tumoren wurden 16–17 MBq  $^{123}\text{I-N7A}$  oder  $^{123}\text{I-Lcn2}$  (Wildtyp-Lipocalin, Negativkontrolle) i.v. injiziert. Die Anreicherung von freiem [ $^{123}\text{I}$ ]Iodid in Schilddrüse und Magen wurde durch die perorale Gabe von Irenat unterbunden. 1 h, 3 h und 24 h nach der Injektion wurden Szintigramme aufgenommen (Abbildung 17A). Im gesamten Zeitverlauf nach Injektion von  $^{123}\text{I-N7A}$  wurde die meiste Aktivität in den blutreichen Organen des Thorax, in den Organen des oberen Bauchraumes und in der Blase detektiert. Der Tumor ließ sich 24 h nach Injektion von  $^{123}\text{I-N7A}$  szintigraphisch deutlich abgrenzen und das Verhältnis Tumor/Kontralateral stieg von  $1,3 \pm 0,1$  (1 h p.i.;  $n = 4$ ) über  $1,6 \pm 0,2$  (3 h p.i.  $n = 4$ ) auf  $2,2 \pm 0,3$  (24 h p.i.;  $n = 3$ ) an. Nach Injektion des Wildtyp-Lipocalins  $^{123}\text{I-Lcn2}$  wurde über den gesamten Zeitverlauf die meiste Aktivität in den Nieren und in der Blase detektiert. Der Tumor ließ sich nach 1 h und 3 h nicht und nach 24 h nur sehr schwach abgrenzen (Abbildung 17A rechts: 24 h p.i.; nicht abgebildet: 1 h p.i. und 3 h p.i.). Das Verhältnis Tumor/Kontralateral betrug 24 h p.i.  $1,7 \pm 0,2$  ( $n = 4$ ).

#### Biodistribution

Nach Aufnahme der 24 h-Szintigramme wurden die Mäuse getötet, einzelne Organe entnommen und organspezifische Aktivitätskonzentrationen für  $^{123}\text{I-N7A}$  und das Wildtyp-Lipocalin  $^{123}\text{I-Lcn2}$  bestimmt (Abbildung 17B). Im Tumor war die Aktivitätskonzentration von  $^{123}\text{I-N7A}$  (1,0 % ID/g) doppelt so hoch wie die von  $^{123}\text{I-Lcn2}$  (0,5 % ID/g). Auch im Blut und in den gut durchbluteten Organen Herz, Lunge, Gehirn und Muskel wurden höhere Aktivitäten für  $^{123}\text{I-N7A}$  als für  $^{123}\text{I-Lcn2}$  gefunden. Die Ausscheidungsorgane Nieren und Leber wiesen höhere Aktivitätskonzentrationen für  $^{123}\text{I-Lcn2}$  (Leber: 2,3 % ID/g, Nieren: 5,3 % ID/g) als für  $^{123}\text{I-N7A}$  auf (Leber: 1,1 % ID/g, Nieren: 2,2 % ID/g). Das Verhältnis Tumor/Blut war nach Injektion von  $^{123}\text{I-N7A}$  doppelt so hoch wie nach Injektion des Wildtyp-Lipocalins  $^{123}\text{I-Lcn2}$  und betrug 0,4 für  $^{123}\text{I-N7A}$  und 0,2 für  $^{123}\text{I-Lcn2}$  (Abbildung 17C).



**Abbildung 17. Szintigraphie und Biodistribution nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I-N7A}$ .**

(A) Szintigraphien an SHO-Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren nach i.v.-Injektion von  $16,7 \pm 0,5$  MBq ( $n = 4$ )  $^{123}\text{I-N7A}$  oder  $16,0 \pm 0,3$  MBq ( $n = 4$ )  $^{123}\text{I-Lcn2}$  (Wildtyp Lipocalin) in der Ansicht von unten.  $^{123}\text{I-N7A}$ : Szintigramme einer Maus im Zeitverlauf 1 h, 3 h und 24 h p.i.;  $^{123}\text{I-Lcn2}$ : Szintigramm 24 h p.i. Pfeile markieren den Tumor (T) und die Blase (B). (B) Biodistribution zur Bestimmung organspezifischer Aufnahmewerte (% ID/g) und (C) Tumor/Blut-Verhältnis. Durchgeführt nach Aufnahme der 24 h-Szintigramme für  $^{123}\text{I-N7A}$  ( $n = 2$ ) und  $^{123}\text{I-Lcn2}$  ( $n = 3$ ). Den Diagrammen zugrunde liegende Zahlenwerte sind im Anhang in Tabelle 7 aufgeführt.

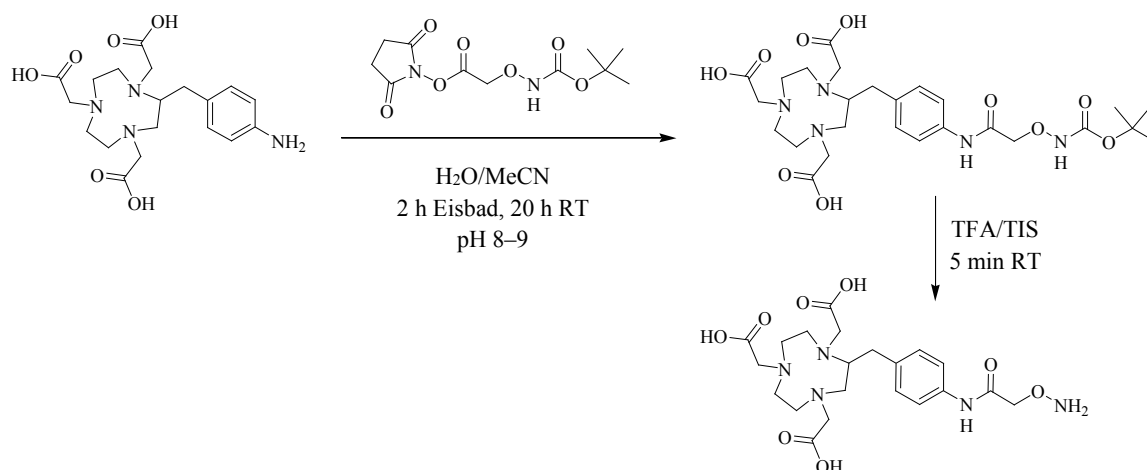
## 3.2 Arbeiten zur ortsspezifischen Markierung ED-B-spezifischer Anticaline mit PET-Nukliden

### 3.2.1 Darstellung und $^{68}\text{Ga}$ -Markierung von Aminoxy-NOTA

Für die ortsspezifische Verknüpfung mit Aldehyd- oder Keton-funktionalisierten Anticalinen wurde die Darstellung eines aminoxy-funktionalisierten Chelators und dessen Markierung mit  $^{68}\text{Ga}$  etabliert.

Die Darstellung von Aminoxy-NOTA erfolgte in einer zweistufigen Synthese (Abbildung 18). Im ersten Schritt wurde *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-NOTA mit dem NHS-Ester der Boc-geschützten Aminoxyessigsäure im leicht basischen Milieu zum entsprechenden Carbonsäureamid umgesetzt. Bei der Reaktion entstanden kaum Nebenprodukte und das Zwischenprodukt Boc-aminoxy-NOTA wurde nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC mit hoher Reinheit und in einer Ausbeute von 74 % erhalten. Die Identität des Produktes wurde mittels ESI-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie bestätigt.

Im zweiten Schritt wurde Boc-aminoxy-NOTA zum Entfernen der Boc-Schutzgruppe in TFA unter Zusatz von 0,33 % TIS umgesetzt. Nach 5 min war die Reaktion quantitativ abgelaufen und es wurden nahezu keine Nebenprodukte detektiert. Nach der Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC wurde Aminoxy-NOTA mit hoher Reinheit und in einer Ausbeute von 67 % erhalten. Die Identität des Produktes wurde mittels ESI-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie bestätigt.

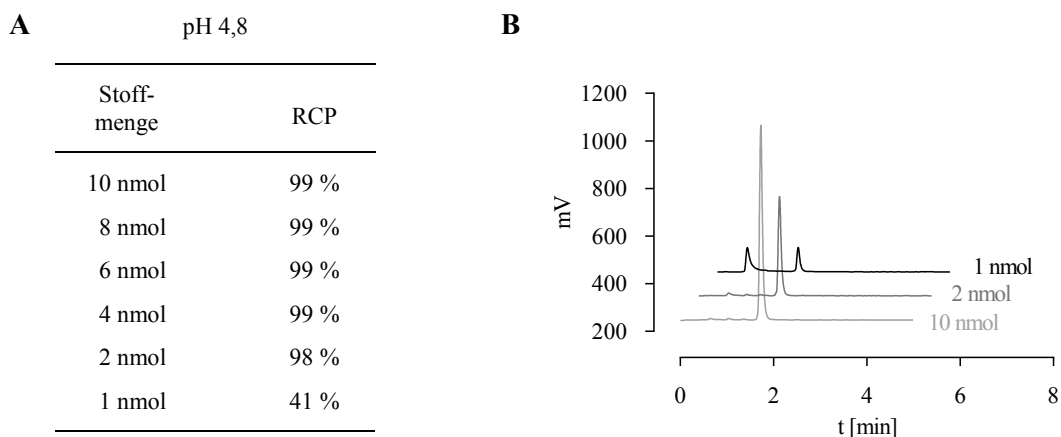


**Abbildung 18. Darstellung von Aminoxy-NOTA.**

Durch Umsetzen von *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-NOTA mit dem Boc-geschützten NHS-Ester der Aminoxyessigsäure und Entschützen des Zwischenproduktes Boc-aminoxy-NOTA wurde Aminoxy-NOTA erhalten. RT: Raumtemperatur.

Für die Etablierung der  $^{68}\text{Ga}$ -Markierung des Boc-geschützten Aminoxy-NOTA wurde  $^{68}\text{Ga}$  als  $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$  in 2,7 ml 0,05 M HCl durch fraktionierte Elution eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators erhalten. Die Aktivität der verwendeten Generator-Eluate betrug 570–980 MBq und für die Markierungsreaktionen wurden jeweils 500  $\mu\text{l}$ -Aliquots davon eingesetzt. Optimiert wurde die Markierungsreaktion hinsichtlich des pH-Wertes der Markierungslösung und der eingesetzten Stoffmenge an Boc-Aminoxy-NOTA.

Für die Ermittlung des optimalen pH-Wertes wurden 10 nmol Boc-aminoxy-NOTA eingesetzt und ein pH-Bereich zwischen 3,5 und 5,5 untersucht. Für pH-Werte zwischen 4,4 und 5,2 lag die RCP über 95 % und die höchste RCP wurde mit 99 % bei pH 4,8 erzielt. Um die geringstmögliche Stoffmenge an Boc-aminoxy-NOTA für die Markierung mit  $^{68}\text{Ga}$  zu bestimmen, wurde die eingesetzte Menge an Boc-aminoxy-NOTA sukzessive auf 1 nmol reduziert. Der pH-Wert der Markierungsansätze wurde auf den zuvor ermittelten optimalen Wert von 4,8 festgelegt. Die Stoffmenge an Boc-aminoxy-NOTA konnte auf 2 nmol verringert werden (RCP 98 %). Demgegenüber lieferte 1 nmol Boc-aminoxy-NOTA unter den untersuchten Bedingungen lediglich eine RCP von 41 % (Abbildung 19A). Abbildung 19B zeigt beispielhaft die Radioaktivitätsspuren der HPLC-Analytik für die Markierungsansätze mit 10 nmol, 2 nmol oder 1 nmol Boc-Aminoxy-NOTA.



**Abbildung 19.**  $^{68}\text{Ga}$ -Markierung von Boc-aminoxy-NOTA.

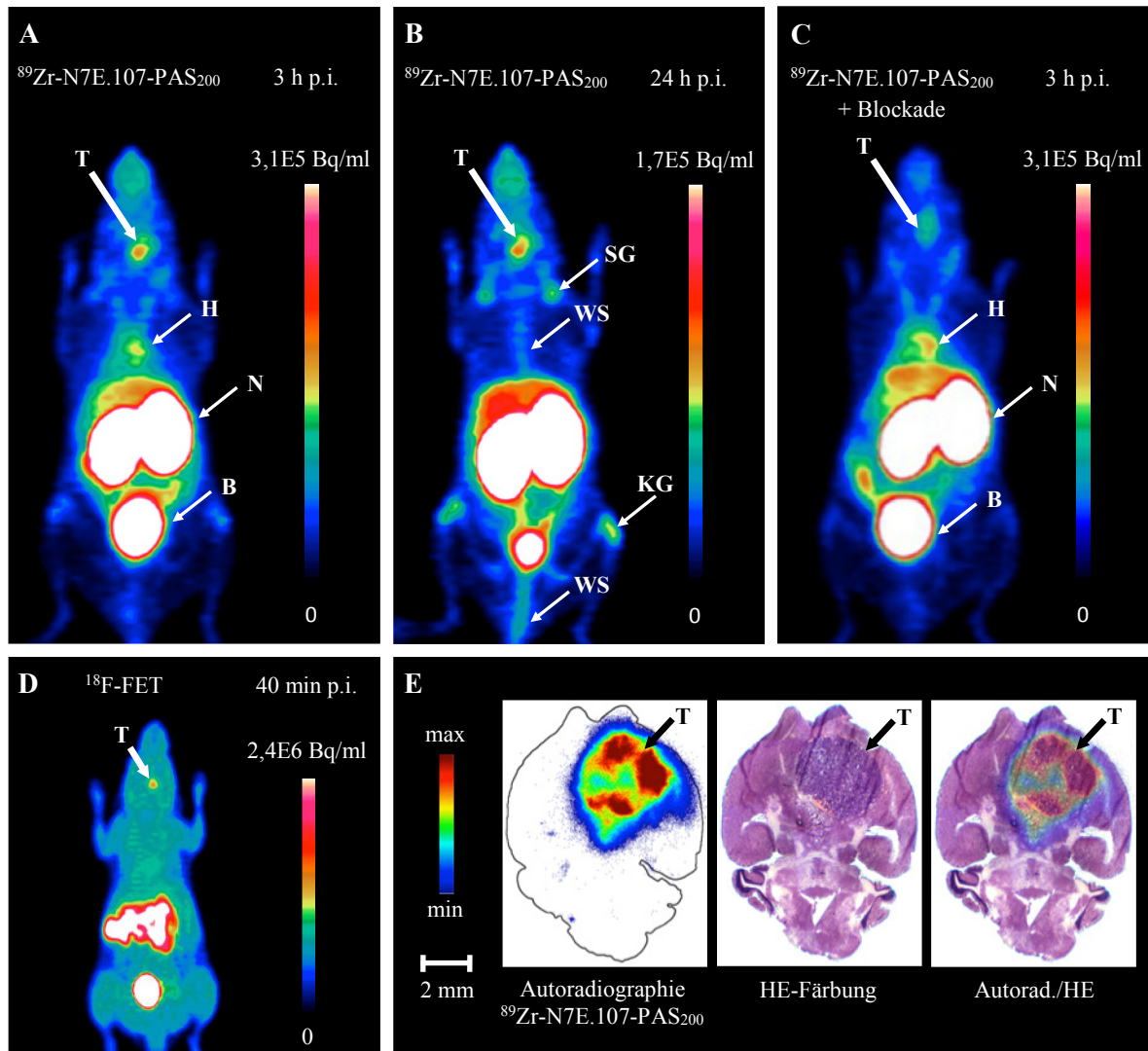
(A) 500  $\mu\text{l}$   $^{68}\text{Ga}$ -Eluat wurden mit Boc-aminoxy-NOTA (1–10 nmol) und 64  $\mu\text{l}$  1 M Na-Acetat zur Einstellung von pH 4,8 versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die radiochemische Reinheit (RCP) mittels HPLC bestimmt. (B) Radioaktivitäts-Spuren der HPLC-Analytik für die Markierungsansätze mit 10 / 2 / 1 nmol Boc-aminoxy-NOTA. Säule: Chromolith Performance (RP-18e, 100-4,6 mm), Gradient: 0–100 % Acetonitril + 0,1 % TFA in 5 min, Flussrate: 4 ml/min. Retentionszeiten:  $t_{\text{R}}(^{68}\text{Ga}) = 0,6$  min,  $t_{\text{R}}(^{68}\text{Ga}\text{-Boc-aminoxy-NOTA}) = 1,7$  min.

### 3.2.2 Ortsspezifische Markierung von N7E.107-PAS<sub>200</sub> mit <sup>89</sup>Zr und PET-Bildgebung im orthotopen Glioblastom-Mausmodell

Das ED-B-spezifische Anticalin N7E.107-PAS<sub>200</sub> trägt einen einzelnen Cysteinrest mit einer freien Thiolgruppe, an die regioselektiv Maleimid-funktionalisiertes Desferoxamin gebunden werden kann. Für die Markierung wurde Desferoxamin-gekoppeltes N7E.107-PAS<sub>200</sub> mit [<sup>89</sup>Zr]Zr-Oxalat umgesetzt. Nach Abtrennung von freiem <sup>89</sup>Zr mittels Größenausschlusschromatographie wurde <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> mit einer RCP von 99,7 % erhalten. Die SA betrug 5,8 MBq/nmol und die RCY 40,8 %.

Weiblichen C57BL/6-Mäusen mit intrakraniell wachsenden GL261-Tumoren wurden 2,7 MBq (0,47 nmol) <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> i.v. injiziert und nach 3 h und 24 h statische PET-Bilder aufgenommen. Der Tumor ließ sich 3 h und 24 h p.i. sehr gut abgrenzen (Abbildung 20A und B). Das Verhältnis Tumor/Kontralateral betrug 3 h p.i.  $8,2 \pm 1,2$  (n = 5) und 24 h p.i.  $5,8 \pm 0,5$  (n = 2). 3 h nach Injektion von <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> zeichnete sich das Herz ab, was auf die noch andauernde Zirkulation von <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> im Blutkreislauf schließen lässt (Abbildung 20A). Die höchsten Aktivitätskonzentrationen wurden 3 h und 24 h nach Injektion von <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> in den Nieren und in der Blase detektiert, während niedrigere Aktivitätskonzentrationen in der Leber gefunden wurden (Abbildung 20A und B). Eine Anreicherung von freiem <sup>89</sup>Zr in Gelenken und Knochen zeichnete sich 3 h p.i. ab (Abbildung 20A) und war 24 h p.i. besonders deutlich im Bereich der Kniegelenke und der Wirbelsäule erkennbar (Abbildung 20B). Zur Überprüfung der Spezifität der Tumoranreicherung erhielten vier Mäuse 2,7 MBq <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> zusammen mit 1 mg (26 nmol) nicht-markiertem N7E.107-PAS<sub>200</sub> i.v. injiziert. Der Überschuss an nicht-markiertem N7E.107-PAS<sub>200</sub> kompetitierte die Anreicherung von <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> im Tumor und das Verhältnis Tumor/Kontralateral betrug  $3,0 \pm 2,5$  (3 h p.i.; n = 4; Abbildung 20C). Zusätzlich zur <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub>-PET wurde an zwei Mäusen eine PET-Messung mit dem klinisch relevanten Aminosäuretracer <sup>18</sup>F-FET durchgeführt. Aufgrund eines höheren Hintergrundsignals im tumorfreien Gehirn war das Tumor/Kontralateral-Verhältnis für <sup>18</sup>F-FET mit  $2,7 \pm 0,8$  (40 min p.i.; n = 2; Abbildung 20D) deutlich niedriger als für <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub>.

Nach Durchführung der <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub>-PET (24 h p.i.) wurden die Tiere getötet und ihre Gehirne zur Anfertigung von Gefrierschnitten für die *ex-vivo*-Autoradiographie und Histologie entnommen. Autoradiogramme und der Abgleich mit HE-Färbungen konsekutiver Gewebeschnitte belegen eine starke und selektive Anreicherung von <sup>89</sup>Zr-N7E.107-PAS<sub>200</sub> im Tumor (Abbildung 20E; T). Die Verteilung der Aktivität im Tumor war heterogen und fokale Mehranreicherungen waren verstärkt in Randbereichen des Tumors zu finden. In tumorfreien Gehirnregionen wurde nahezu keine Radioaktivität detektiert.



**Abbildung 20. Tumoranreicherung von  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  im orthotopen Glioblastom-Mausmodell.**

PET-Aufnahmen (dargestellt als Maximum-Intensitäts-Projektionen) von C57BL/6-Mäusen mit intrakraniell wachsenden GL261-Tumoren: **(A)** 3 h und **(B)** 24 h nach i.v.-Injektion von  $2,7 \text{ MBq } ^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$ , **(C)** 3 h nach Ko-Injektion von  $2,7 \text{ MBq } ^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  und  $1 \text{ mg N7E.107-PAS}_{200}$  sowie **(D)** 40 min nach i.v.-Injektion von  $18 \text{ MBq } ^{18}\text{F-FET}$ . **(E)** *Ex-vivo*-Autoradiographie (links), Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Mitte) und deren Überlagerung (rechts) angefertigt an konsekutiven Gefrierschnitten des tumortragenden Gehirns nach der  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$ -PET (24 h p.i.). **(A)**, **(B)**, **(D)** und **(E)** zeigen Aufnahmen und Gewebeschnitte derselben Maus. Pfeile markieren den Tumor (T) sowie Herz (H), Nieren (N), Blase (B), Wirbelsäule (WS), Schultergelenk (SG) und Kniegelenk (KG). HE: Hämatoxylin-Eosin.

## 4 Diskussion

### 4.1 [<sup>123</sup>I]Iodierung von VEGF-C<sub>C156S</sub>, A5C3-QH und N7A

Aufgrund seiner attraktiven physikalischen Eigenschaften ( $E_{\gamma} = 159 \text{ keV}$  (83 %); Halbwertszeit 13,3 h) und der einfachen Markierungschemie wurde <sup>123</sup>I für die initiale Markierung und Evaluierung der VEGFR-3- oder ED-B-spezifischen Bindeproteine gewählt. Die [<sup>123</sup>I]Iodierung von VEGF-C<sub>C156S</sub>, A5C3-QH oder N7A erfolgte nach der Iodogen-Methode (Fraker, 1978), bei der die Gefahr markierungsbedingter Proteinschädigungen gering ist (Salacinski, 1981). Mit Hilfe des milden Oxidationsmittels Iodogen wird Iodid *in situ* zu positiv geladenen Iodspezies oxidiert, die als Elektrophile mit Phenol-Ringen proteineigener Tyrosinreste oder Imidazol-Ringen von Histidinresten reagieren (Dewanjee, 1992). Diese direkte Markierungsstrategie erlaubt es, in einem Reaktionsschritt bei Raumtemperatur innerhalb von 5–20 min auch geringe Proteinmengen mit hohen Ausbeuten von 60–90 % zu markieren (Behr, 2002). Pro Markierungsansatz wurden in der vorliegenden Arbeit 10–40 µg VEGF-C<sub>C156S</sub>, A5C3-QH oder N7A eingesetzt. Mit allen untersuchten Proteinen wurden Markierungsausbeuten von rund 80 % und hohe spezifische Aktivitäten von mehr als 170 MBq/nmol erzielt.

Da *in vitro* Deiodierungsreaktionen auftreten können (Huang, 2000), wurde die Stabilität der Markierungsprodukte <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub>, <sup>123</sup>I-A5C3-QH und <sup>123</sup>I-N7A in verschiedenen relevanten Pufferlösungen sowie in Blutserum untersucht. Bei der Vorbereitung und Durchführung der hier beschriebenen Experimente lagen die [<sup>123</sup>I]iodierten Proteine maximal 3 h in den untersuchten Lösungen vor. Die Stabilität war über diesen Zeitraum mit 90–95 % hinreichend groß.

### 4.2 Evaluierung des VEGFR-3-spezifischen Liganden <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub>

VEGFR-3 wurde vor einigen Jahren als luminaler und spezifischer Marker der Glioblastom-assoziierten Neovaskulatur identifiziert (Jenny, 2006; Grau, 2007; Grau, 2008). Mit VEGFR-3-spezifischen Radiotracern könnte die Lokalisierung und Charakterisierung von Glioblastomen anhand ihrer stark ausgeprägten Vaskularisierung unabhängig von einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke gelingen. Darüber hinaus wird VEGFR-3 im Glioblastom von Tumorzellen abseits der Vaskulatur exprimiert (Gieser, 2014), was zur direkten Visualisierung der gesamten Tumormasse genutzt werden könnte.

Bislang wurde VEGFR-3 als Zielstruktur für die nuklearmedizinische Bildgebung in zwei präklinischen Studien untersucht: Mit <sup>111</sup>In-mF4-31C1, einem monoklonalen Antikörper mit Spezifität für den murinen VEGFR-3 an orthotopen SKOV-3-Ovarialkarzinomen (Huhtala, 2010) und mit <sup>131</sup>I-AFC5, einem scFv-Fragment mit Spezifität für den humanen VEGFR-3 an subkutanen

F9/VEGFR-3-Teratokarzinomen (Zehnder-Fjällman, 2007). Für die Bildgebung des Glioblastoms wurde VEGFR-3 als Zielstruktur bislang nicht erprobt.

VEGF- $C_{C156S}$  ist ein 15,4 kDa großer, selektiver Ligand des VEGFR-3 ohne Spezifität für den verwandten VEGFR-2. Bindungsaktivität wurde sowohl für den humanen, als auch für den murinen VEGFR-3 gezeigt (Joukov, 1998; Veikkola, 2001). In der vorliegenden Arbeit bewies iodiertes VEGF- $C_{C156S}$  *in vitro* eine spezifische Bindung mit guter Affinität ( $K_i = 44$  nM) an VEGFR-3-positive U87MG-Glioblastomzellen. Die *in-vivo*-Evaluierung von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{C156S}$  erfolgte an Mäusen mit subkutan wachsenden U87MG-Tumoren, einem einfachen Glioblastom-Modell, das in zahlreichen präklinischen Studien zur nuklearmedizinischen Bildgebung mit Angiogenese-Tracern beschrieben ist (Mariani, 1997; Blom, 2011; Oxboel, 2014).

Nach intravenöser Applikation von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{C156S}$  betrug die maximale Aktivitätskonzentration im Tumor 2,5 % ID/g (1 h p.i.). Im Vergleich dazu war mit dem Vollantikörper  $^{111}\text{In}$ -mF4-31C1 die Anreicherung in SKOV-3-Tumoren mehr als doppelt so hoch (5,8 % ID/g). Aufgrund der für Antikörper typischen langen Zirkulationsdauer und langsamen Pharmakokinetik wurde dieser Wert erst 48 h nach Applikation des Tracers erreicht (Huhtala, 2010). Mit dem rund 25 kDa großen scFv-Fragment  $^{131}\text{I}$ -AFC5 wurden in subkutanen F9/VEGFR-3-Tumoren bis zu 2,8 % ID detektiert (4 h p.i.; Zehnder-Fjällman, 2007).

Im frühen Zeitverlauf zwischen 1 h und 8 h nach intravenöser Applikation von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{C156S}$  nahm die Aktivitätskonzentration im Tumor nur wenig, im Blut hingegen deutlich stärker ab. Im Einklang damit stieg das Tumor/Blut-Verhältnis im Zeitverlauf an und es gelang die szintigraphische Darstellung des Tumors 24 h p.i., wohingegen 2 h p.i. keine Abgrenzung möglich war. Im Vergleich dazu ließen sich F9/VEGFR-3-Tumore bereits 2 h nach Applikation von  $^{131}\text{I}$ -AFC5 visualisieren (Zehnder-Fjällman, 2007).

Der im frühen Zeitverlauf langsame Rückgang der Aktivitätskonzentrationen im Tumor im Vergleich zum Blut und das damit einhergehend ansteigende Tumor/Blut-Verhältnis weisen auf eine spezifische, über einen reinen Perfusionseffekt hinausgehende Tumor-Retention von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{C156S}$  hin. Ein abschließender Nachweis der *in-vivo*-Spezifität konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden, da in einem Blockade-Experiment mit einem gut 1100-fachen Überschuss an nicht-markiertem VEGF- $C_{C156S}$  keine Konkurrenz von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{C156S}$  im Tumor nachgewiesen werden konnte. Ursächlich könnte das Zusammenspiel der niedrigen Anreicherungsgrade von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $C_{C156S}$  im Tumor und die im Blockade-Experiment applizierte große Flüssigkeitsmenge sein. Letztere bewirkte möglicherweise eine beschleunigte renale Ausscheidung des Radiotracers, was sich in verringerten Aktivitätskonzentrationen in den Tumoren (und auch allen übrigen Organen) sowohl der Blockade- als auch der Kontroll-Gruppe niederschlug und letztlich das Herausarbeiten eines Konkurrenz-Effektes verhinderte.



Die hohen und im Zeitverlauf ansteigenden Aktivitätskonzentrationen in der Schilddrüse (99 % ID/g; 24 h p.i.) können auf *in-vivo*-Deiodierungsreaktionen zurückgeführt werden und sind ein vielfach beschriebenes Phänomen iodierter Proteintracer (Britton, 1988; Berndorff, 2005; Mendler, 2015b). Freies Iodid wird aus der Blutbahn über den Natrium-Iodid-Symporter aktiv vor allem in Follikelzellen der Schilddrüse, aber auch in Zellen der Magenschleimhaut aufgenommen (Shen, 2001; Dohan, 2003). Die hohen Aktivitätskonzentrationen in den Nieren (30 % ID/g), stehen im Einklang mit der geringen Molekülgröße von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  (15,4 kDa). Proteintracer mit einem Molekulargewicht von weniger als 70 kDa werden effektiv in den Nierenglomeruli filtriert und größtenteils in den proximalen Tubuli endozytotisch reabsorbiert (Vegt, 2010). Darüber hinaus lassen hohe Aktivitätskonzentrationen in der Leber (17 % ID/g) auf hepatobiliäre Metabolisierungs- und Exkretionsmechanismen schließen (Hosseinimehr, 2012).

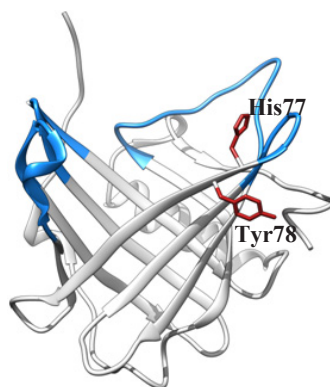
### 4.3 Evaluierung des VEGFR-3-spezifischen Anticalins $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH

Anticaline sind künstliche Bindeproteine, deren definierte Bindungseigenschaften mit Methoden des kombinatorischen Proteindesigns generiert und optimiert werden können. Das Anticalin A5C3-QH gehört zu einer ersten Generation von Anticalinen, die den Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3 mit hoher Affinität und Spezifität binden (Richter, 2017).

Nach Markierung mit  $^{123}\text{I}$  reicherte A5C3-QH selektiv auf Glioblastomgewebe-Schnitten an. Mittels *in-vitro*-Autoradiographie gelang mit  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH als Radiotracer die Unterscheidung zwischen Patientenproben von Glioblastomgewebe und tumorfreiem Gehirngewebe, was das Potential des VEGFR-3-spezifischen Anticalins für die nuklearmedizinische Glioblastom-Bildgebung verdeutlicht. Die Anreicherung im Glioblastomgewebe war stark heterogen ausgeprägt und kann auf die Bindung von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH an VEGFR-3 im Endothel tumorassoziierter Blutgefäße und auf der Oberfläche einzelner Zellen des Tumorparenchyms zurückgeführt werden (Jenny, 2006; Grau, 2007; Gieser, 2014). Die Spezifität der Bindung wurde durch die vollständige Konkurrenz mit einem Überschuss an nicht-markiertem A5C3-QH belegt.

Auch auf kultivierten Glioblastomzellen (U251/VEGFR-3) zeigte  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH *in vitro* eine spezifische Bindung. Die Bindungsaffinität des iodierten Anticalins war hoch ( $K_i = 46,3 \text{ nM}$ ), wengleich im Vergleich zu der des nativen A5C3-QH ( $K_i = 2,7 \text{ nM}$ ) um den Faktor 17 herabgesetzt. Der Verlust an Bindungsaffinität ist möglicherweise auf die kovalente Bindung von [ $^{123}\text{I}$ ]Iod an den Phenol-Ring des Tyrosinrestes an Position 78 oder den Imidazol-Ring des Histidinrestes in Position 77 der Aminosäuresequenz zurückzuführen, die beide im Bereich der Bindungsregion von A5C3-QH lokalisiert sind (Abbildung 21). Die Gefahr des markierungsbedingten Affinitätsverlustes könnte durch ortsspezifische Markierungsstrategien (Adumeau,

2016a; b) abgewendet werden, wie sie in Kapitel 4.5 für ED-B-spezifische Anticaline besprochen werden. Voraussetzung hierfür ist die Generierung einer zweiten A5C3-QH-Generation, beispielsweise durch Einführen proteinfremder Aldehyd- oder Keton-Funktionen, für die bioorthogonale Verknüpfung mit bifunktionellen Radiometall-Chelatoren. Zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Untersuchungen standen entsprechende A5C3-QH-Varianten nicht zur Verfügung.



**Abbildung 21. Histidin- und Tyrosinreste im Bereich der Bindungsregion des Anticalins A5C3-QH.**

Bei der [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung erfolgt die kovalente Bindung von [ $^{123}\text{I}$ ]Iod an Phenol-Ringe von Tyrosinresten oder an Imidazol-Ringe von Histidinresten. Jeweils einer von insgesamt sechs Tyrosinresten (Tyr78) und einer von insgesamt drei Histidinresten (His77) des Anticalins A5C3-QH ist im Bereich der Bindungsregion lokalisiert. Blau: Bindungsregion.

Trotz der spezifischen Bindung mit nanomolarer Affinität an U251/VEGFR-3-Zellen *in vitro*, reicherte  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH *in vivo* nicht in subkutanen U251/VEGFR-3-Tumoren an. Die Aktivitätskonzentration nahm im Tumor, ebenso wie im Blut und gut durchbluteten Organen im Zeitverlauf rasch ab. Möglicherweise trug die auffallend zügige renale Elimination des Radiotracers und die dadurch bedingt kurze Zirkulationsdauer im Blut zum Fehlen der Tumoranreicherung bei (Wittrup, 2012). Verbesserte *in-vivo*-Eigenschaften könnten womöglich mit einer PASylierten A5C3-QH-Variante erreicht werden. Die PASylierung bewirkt eine Vergrößerung des hydrodynamischen Proteinvolumens, wodurch eine Verringerung der Nierenfiltration und eine Verlängerung der Plasmahalbwertszeit erreicht werden kann (Morath, 2015). Insbesondere für kleine Proteine, wie die Anticaline mit einem Molekulargewicht von rund 20 kDa, verspricht dies mit einer erhöhten Tumoranreicherung einherzugehen (Wittrup, 2012).

Die hohen Aktivitätskonzentrationen im Magen und in der Schilddrüse, die auf eine Natrium-Iodid-Symporter-vermittelte Akkumulation von freiem Iodid zurückzuführen sind (Shen, 2001; Dohan, 2003), lassen außerdem auf *in-vivo*-Deiodierungsreaktionen schließen, wodurch die Verfügbarkeit von intaktem  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH womöglich weiter verringert wurde.

Weiterhin könnte auch die Selektivität des Anticalins A5C3-QH für den humanen VEGFR-3 zu den niedrigen Anreicherungswerten beigetragen haben. Es ist anzunehmen, dass die Vaskulatur der U251/VEGFR-3-Tumore murinen Ursprungs ist, wie es beispielsweise für subkutane U87MG-Tumore gezeigt wurde (Ricci-Vitiani, 2010). Eine nennenswerte Bindung des vom Gefäßendothel exprimierten murinen VEGFR-3 durch A5C3-QH ist nicht zu erwarten. Durch Affinitätsmaturierung des Anticalins A5C3-QH könnten hochaffine Binder des murinen VEGFR-3 generiert werden. Ein Anticalin mit Spezifität für den murinen VEGFR-3 wäre ausgezeichnet für eine Evaluierung in syn- oder transgenen Mausmodellen des Glioblastoms geeignet.

#### 4.4 Evaluierung des ED-B-spezifischen Anticalins <sup>123</sup>I-N7A

Im Gegensatz zu VEGFR-3 ist die Aminosäuresequenz der ED-B spezieübergreifend in Mensch, Maus und Ratte vollständig konserviert. Dies ist eine ideale Voraussetzung für die Evaluierung und Anwendung eines ED-B-spezifischen Bindeproteins im Tierversuch, auf Patientenmaterial und in der Klinik.

ED-B-positives Fibronectin wird im Verlauf der Angiogenese in einer Vielzahl solider Tumore im Bereich der Neovaskulatur exprimiert (Oyama, 1990; Oyama, 1993; Pujuguet, 1996; Frey, 2011), während im gesunden adulten Organismus ED-B nur in weiblichen Reproduktionsorganen oder während Wundheilungsprozessen nachweisbar ist (Ffrench-Constant, 1989; De Candia, 1999). Als Zielstruktur für die nuklearmedizinische Bildgebung der Tumor-Angiogenese wurde ED-B in zahlreichen präklinischen (Borsi, 2002; Berndorff, 2006; Rossin, 2007; Wyss, 2007; Tijink, 2009) und ersten klinischen Studien (Santimaria, 2003; Birchler, 2007; Poli, 2013) mit verschiedenen Formaten des ED-B-spezifischen Antikörpers L19 (Pini, 1998) validiert. Insbesondere die Darstellung von Gehirntumoren gelang mit sehr gutem Bildkontrast (Santimaria, 2003; Poli, 2013). Als Alternative zu rekombinant hergestellten L19-Antikörper-Fragmenten wurde mit dem Anticalin N7A ein neuartiges Proteinreagenz entwickelt, das ED-B-positives Fibronectin mit etwa 20-mal höherer Affinität bindet (Gebauer, 2013) und im Gegensatz zu vielen scFv-Fragmenten eine streng monomere Struktur besitzt (Arndt, 1998). Letzteres ist in Hinblick auf eine mögliche Anwendung im Menschen von großer Bedeutung, da es die Bereitstellung definierter pharmazeutischer Produkte ermöglicht.

In immunhistochemischen Untersuchungen bewies N7A großes Potential für eine zukünftige Anwendung in der Glioblastom-Diagnostik (Albrecht, 2016) und wurde in der vorliegenden Arbeit auf seine Eignung für die nuklearmedizinische Bildgebung der Glioblastom-Vaskulatur untersucht. Nach Markierung mit <sup>123</sup>I wurde N7A als Radiotracer in *in-vitro*-Autoradiographie-Experimenten zur Erkennung von ED-B-positivem Fibronectin in Gewebeproben eingesetzt. In Übereinstimmung

mit den Ergebnissen immunhistochemischer Untersuchungen (Albrecht, 2016) gelang mit  $^{123}\text{I}$ -N7A die Unterscheidung zwischen Patientenproben von Glioblastomgewebe und tumorfreiem Gehirngewebe. Die starke und heterogene Anreicherung von  $^{123}\text{I}$ -N7A in Glioblastomgewebe steht im Einklang mit der für das Glioblastom charakteristischen hohen Gefäßdichte (Brem, 1972; Reifenberger, 2004) und der erhöhten Expression von ED-B-positivem Fibronectin im Bereich der Glioblastom-assoziierten Neovaskulatur (Castellani, 1994; Albrecht, 2016). Die selektive Anreicherung von  $^{123}\text{I}$ -N7A in Glioblastomgewebe (im Gegensatz zu tumorfreiem Gehirngewebe) und deren vollständige Kompetition durch einen Überschuss an unmarkiertem N7A belegen die Spezifität der Bindung des [ $^{123}\text{I}$ ]iodierten Anticalins.

Die *in-vivo*-Evaluierung erfolgte an Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren. Das Wildtyp-Lipocalin  $^{123}\text{I}$ -Lcn2 diente als Negativkontrolle, da sich N7A und Lcn2 bei gleicher Molekülstruktur und -größe in nur 20 Positionen ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden und Lcn2 keine Affinität für ED-B zeigt.

Mit  $^{123}\text{I}$ -N7A war 24 h p.i. im Gegensatz zu  $^{123}\text{I}$ -Lcn2 eine deutliche Abgrenzung der U87MG-Tumore mittels Szintigraphie möglich. Die Aktivitätskonzentration im Tumor war 24 h p.i. für  $^{123}\text{I}$ -N7A zweimal größer als für  $^{123}\text{I}$ -Lcn2 und auch das Verhältnis Tumor/Blut war beinahe doppelt so hoch wie für  $^{123}\text{I}$ -Lcn2. Unter der Annahme, dass sich  $^{123}\text{I}$ -N7A und  $^{123}\text{I}$ -Lcn2 in der Maus mit Ausnahme der ED-B-Bindungsaktivität identisch verhalten, können diese Befunde als Hinweis auf eine spezifische Retention von  $^{123}\text{I}$ -N7A im Tumor gewertet werden. Allerdings kontrastieren die mehr als zweimal höheren Aktivitätskonzentrationen des unspezifischen  $^{123}\text{I}$ -Lcn2 in der Leber und den Nieren sowie dessen niedrigere Aktivitätskonzentration im Blut mit dieser Annahme. Ein sicherer Nachweis der *in-vivo*-Spezifität von  $^{123}\text{I}$ -N7A kann durch Blockade mit einem Überschuss an unmarkiertem N7A erbracht werden. Zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Untersuchungen standen die dafür notwendigen Mengen an N7A nicht zur Verfügung.

Insgesamt war die Tumoranreicherung von  $^{123}\text{I}$ -N7A mit 1,0 % ID/g (24 h p.i.) niedrig im Vergleich zur Anreicherung verschiedener [ $^{125}\text{I}$ ]iodierter Formate des ED-B-spezifischen Antikörper-Fragments L19 in subkutanen F9- oder SKMEL-Tumoren (1,6–15,3 % ID/g; Tarli, 1999; Borsi, 2002). Ursächlich könnte eine markierungsbedingte Beeinträchtigung der Bindungsaffinität von N7A sein, beispielsweise durch die [ $^{123}\text{I}$ ]iodierung von Tyrosin- oder Histidinresten im Bereich der Bindungsregion. Viti (1999) berichtet, dass eine niedrige Bindungsaffinität ED-B-spezifischer Proteintracer mit einer ebenfalls niedrigen Tumoranreicherung einhergehen kann. Eine vielversprechende Alternative können daher ortsspezifische Markierungsstrategien sein, mit denen gezielt eine Modifizierung bindungsrelevanter Anticalin-Regionen umgangen wird und die die hohe Bindungsaffinität erhalten. Arbeiten zur ortsspezifischen Markierung ED-B-spezifischer Anticaline werden in den folgenden Kapiteln besprochen.

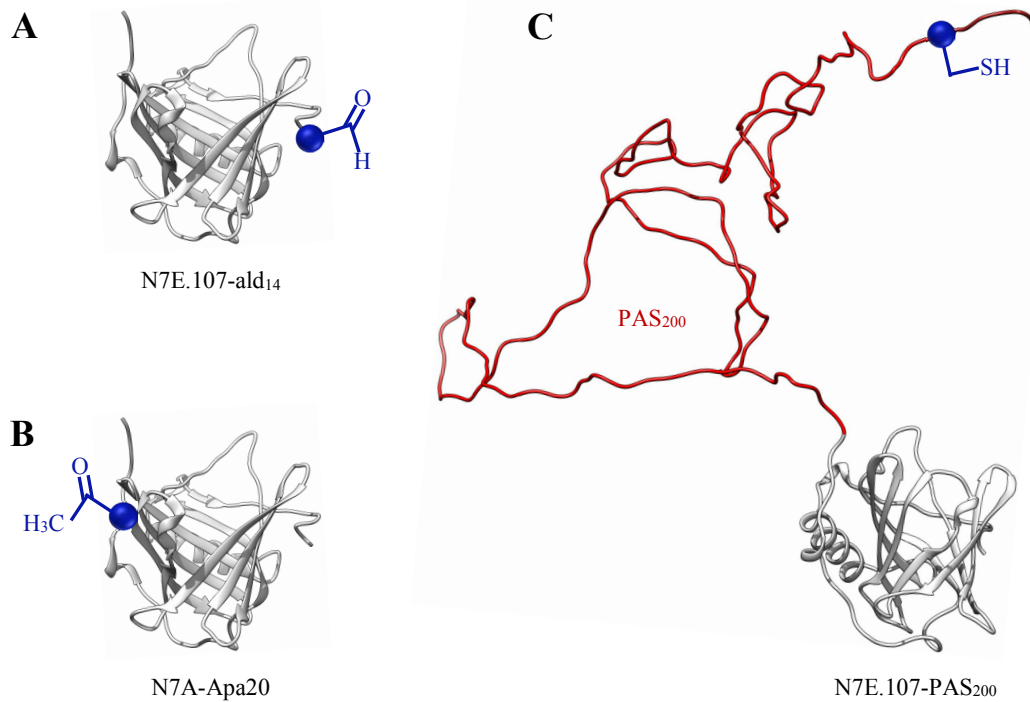
#### 4.5 Möglichkeiten zur ortsspezifischen Markierung ED-B-spezifischer Anticaline mit PET-Nukliden

Um ED-B-spezifische Anticaline für die im Vergleich zur Szintigraphie oder SPECT höher auflösende PET nutzbar zu machen, ist eine Markierung mit Positronen emittierenden Radionukliden erforderlich. Hierfür eignen sich metallische PET-Nuklide wie  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  oder  $^{89}\text{Zr}$ , mit denen unter milden Reaktionsbedingungen effiziente Markierungen möglich sind.

Proteine werden für die radioaktive Markierung mit metallischen PET-Nukliden mit bifunktionalen Chelatoren verknüpft (Liu, 2008). Bifunktionelle Chelatoren enthalten eine das Radiometall komplexierende Einheit und eine funktionelle Gruppe, die die kovalente Bindung an das Protein ermöglicht. Häufig eingesetzte Funktionalitäten sind N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Ester oder Isothiocyanate, die mit primären Aminen der Lysin-Seitenketten eines Proteins unter Ausbildung von Amidbindungen reagieren. Da ein Protein in der Regel zahlreiche Lysinreste besitzt, entstehen heterogene Produktgemische aus Proteinkonjugaten (Wang, 2005), die unterschiedlich viele Chelatoren tragen. Werden Lysinreste in bindungsrelevanten Bereichen eines Proteins modifiziert, kann ein Verlust der Bindungsaktivität die Folge sein. Zahlreiche Antikörper konnten auf diese Weise ohne schwerwiegende Beeinträchtigung der Bindungsaktivität für die PET-Bildgebung markiert werden (Perk, 2005; Huhtala, 2010; Engle, 2012; Vera, 2012). Jedoch bedingt die geringe Molekülgröße der Anticaline (20 kDa), und der im Vergleich zu Antikörpern hohe Anteil bindungsrelevanter Regionen, eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Modifizierung von Lysinresten im Bereich der Bindungsregion. Beispielsweise war in Vorversuchen mit den ED-B-spezifischen Anticalinen N7A und N7E nach Verknüpfung mit dem NHS-aktivierten Chelator NODA-GA-NHS eine massive Beeinträchtigung der Bindungsaktivitäten zu beobachten, weshalb diese Markierungsstrategie nicht weiter verfolgt wurde.

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Konzepte entwickelt, Bindeproteine regionsspezifisch mit bifunktionalen Chelatoren oder anderen Molekülen zu verknüpfen, um unter Bewahrung der Bindungsaktivität homogene und definierte Produkte zu erhalten (Adumeau, 2016a; b). Grundvoraussetzung hierfür sind Proteine mit einer in ausreichender Entfernung zur Bindungsregion vorkommenden Funktionalität, die unter milden Reaktionsbedingungen chemoselektiv mit einem bifunktionalen Chelator adressierbar ist.

Bislang wurden drei neuartige Varianten ED-B-spezifischer Anticaline mit jeweils einem selektiven Angriffspunkt entwickelt (Abbildung 22).



**Abbildung 22. Neue Varianten ED-B-spezifischer Anticaline für die bioorthogonale Verknüpfung mit bifunktionalen Radiometall-Chelatoren.**

Blau dargestellt sind jeweils die mit Methoden des Protein Engineering regioselektiv eingeführten funktionellen Gruppen, die sich selektiv mit geeigneten bifunktionalen Chelatoren adressieren lassen. **(A)** N7E.107-ald<sub>14</sub> mit einer am C-Terminus des Proteins positionierten Aldehyd-Funktion und **(B)** N7A-Apa<sub>20</sub> mit einer Keton-Funktion für die bioorthogonale Verknüpfung mit aminoxy-funktionalisierten Chelatoren. **(C)** N7E.107-PAS<sub>200</sub>, fusioniert mit einem strukturell ungeordneten Polypeptid aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin (PAS<sub>200</sub>; rot) und einem freien Cysteinrest am N-Terminus für die bioorthogonale Verknüpfung mit Maleimid-funktionalisierten Chelatoren.

Für eine Aldehyd-funktionalisierte Variante wurde das Anticalin N7E.107 genetisch mit einer kurzen Erkennungssequenz für das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) fusioniert. Durch Koexpression von N7E.107 und FGE und die enzymkatalysierte Oxidation eines Cysteinrestes innerhalb der Erkennungssequenz wurde N7E.107-ald<sub>14</sub> erhalten (Abbildung 22A; Rabuka, 2012; Kotter, 2016). Eine Keton-funktionalisierte N7A-Variante (N7A-Apa<sub>20</sub>; Abbildung 22B) wurde durch den ortsspezifischen Einbau der nicht-natürlichen Aminosäure *p*-Acetyl-L-Phenylalanin mit Hilfe gentechnisch veränderter Komponenten der Translationsmaschinerie generiert (Reichert, 2015). Eine Anticalin-Variante mit einem einzelnen Cysteinrest (N7E.107-PAS<sub>200</sub>; Abbildung 22C) wurde durch gentechnische Fusion mit einem strukturell ungeordneten Polypeptid der Aminosäuren Prolin, Alanin, Serin (PAS) und endständigem Cystein erhalten (Richter, 2015).

Sowohl Keton- und Aldehyd-Gruppe als auch ein einzelner Cysteinrest eines Proteins eignen sich für die ortsspezifische Verknüpfung mit bifunktionellen Chelatoren und die anschließende Markierung mit metallischen PET-Nukliden. Keton- oder Aldehyd-Funktion lassen sich selektiv mit einer Aminoxy-Funktion (Axup, 2012; Rabuka, 2012) und die Thiolgruppe eines einzelnen Cysteinrestes mit einer Maleimid-Funktion adressieren (Adumeau, 2016a).

#### **4.6 Aminoxy-NOTA für die ortsspezifische Verknüpfung mit ED-B-spezifischen Anticalinen und deren Markierung mit $^{68}\text{Ga}$ oder $^{64}\text{Cu}$**

Eine in ein Protein eingefügte Aldehyd- oder Keton-Gruppe lässt sich chemoselektiv mit Aminoxy-Funktionen zu stabilen Oximen umsetzen. Die Reaktion läuft unter milden Bedingungen ab und wird zur Erzeugung von Proteinkonjugaten genutzt. Beispielsweise wurden Antikörper mit zytotoxisch wirkenden Molekülen (Axup, 2012; Zhou, 2014) und ED-B-spezifisches Anticalin N7A mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 488 verknüpft (Reichert, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese eines Aminoxy-funktionalisierten Chelators etabliert, um die Oximbildung erstmals für die ortsspezifische radioaktive Markierung der neuen Aldehyd- oder Keton-funktionalisierten Varianten ED-B-spezifischer Anticaline nutzbar zu machen. Als Chelatbildner wurde NOTA (1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure) gewählt, das stabile Komplexe mit zwei- und dreiwertigen Metallionen bildet (Wieghardt, 1982) und sich ausgezeichnet für die radioaktive Markierung temperaturempfindlicher Proteine eignet. NOTA lässt sich bei Raumtemperatur sowohl mit kurzlebigen  $^{68}\text{Ga}$  (physikalische Halbwertszeit 68 min) als auch mit langlebigerem  $^{64}\text{Cu}$  (physikalische Halbwertszeit 12,7 h) markieren (Velikyan, 2008; Cooper, 2012), weshalb ein breites Zeitfenster für PET-Untersuchungen abgedeckt werden kann. Die Verteilung  $^{68}\text{Ga}$ -markierter Radiotracer kann in der Maus bis zu 4 h Stunden nach intravenöser Applikation mittels PET untersucht werden. Für spätere Beobachtungszeitpunkte, beispielsweise zur Untersuchung PASylierter Anticaline mit verlängerter Plasmahalbwertszeit (Schlapschy, 2013), kann auf  $^{64}\text{Cu}$  zurückgegriffen werden.  $^{64}\text{Cu}$  zerfällt mit einer physikalischen Halbwertszeit von 12,7 h und erlaubt PET-Aufnahmen bis zu 24 h oder sogar 48 h nach Applikation des  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Radiotracer.  $^{68}\text{Ga}$  bietet den Vorteil, dass es direkt vor Ort in radiochemischen Laboratorien in  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren erzeugt werden kann.

Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Edukt *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-NOTA wurde eine unkomplizierte Syntheseroute etabliert, die in nur zwei Schritten das Produkt Aminoxy-NOTA mit einer guten Gesamtausbeute von 50 % lieferte. Der neue bifunktionelle Chelator ließ sich bei Raumtemperatur und pH 4,8 innerhalb von 10 min mit radiochemischen Ausbeuten von bis zu 99 % mit  $^{68}\text{Ga}$

markieren. Vergleichbare Werte sind für die  $^{68}\text{Ga}$ -Markierung anderer NOTA-Derivate beschrieben (Ferreira, 2010; Chakravarty, 2013).

In ersten Versuchen zur Anwendung des neuen NOTA-Derivates und in Fortführung der hier vorgestellten Arbeiten wurde Aldehyd-funktionalisiertes N7E.107-ald<sub>14</sub> erfolgreich mit Aminoxy-NOTA verknüpft. Das Kopplungsprodukt wies ein Protein : Chelator-Verhältnis von 1 : 1 auf und ließ sich bei Raumtemperatur mit  $^{68}\text{Ga}$  markieren. Bei Inkubation in humanem Blutserum wurde ein Abgang der Chelatorgruppe beobachtet, so dass die RCP nach 1,5-stündiger Inkubation von 99 % auf 81 % gesunken war und nach 3 h 63 % betrug. Dennoch ließen sich in einem initialen Tierversuch subkutane FaDu-Tumore (Plattenepithelkarzinom) nach intravenöser Applikation von N7E.107-ald<sub>14</sub>-NOTA- $^{68}\text{Ga}$  sehr gut mittels PET abgrenzen (Kotter, 2016).

#### **4.7 Anwendung des ortsspezifisch mit $^{89}\text{Zr}$ markierten ED-B-spezifischen Anticalins N7E.107-PAS<sub>200</sub> für die PET-Bildgebung im orthotopen Glioblastom-Mausmodell**

Durch Affinitätsmaturierung und genetische Fusion mit einem 200 Aminosäuren langen PAS-Polypeptid (PAS<sub>200</sub>) wurde N7E.107-PAS<sub>200</sub> als ein ED-B-spezifisches Anticalin der zweiten Generation generiert. Es besitzt neben einer um mehr als den Faktor 200 gesteigerten Bindungsaffinität für ED-B-positives Fibronectin ( $K_D = 24 \text{ pM}$ ) ein erhöhtes hydrodynamisches Proteinvolumen. Ein freier Cysteinrest, der in räumlicher Entfernung zur Bindungstasche am Ende des PAS-Polypeptids positioniert ist, kann zur ortsspezifischen Verknüpfung mit einem Maleimid-funktionalisierten Chelator genutzt werden (Richter, 2015; Adumeau, 2016a).

Die PASylierung zur Erhöhung des hydrodynamischen Volumens erfolgte vor dem Hintergrund einer Studie mit  $^{125}\text{I}$ -markierten Fab-Fragmenten: Durch Fusion mit PAS<sub>200</sub> wurden die Aktivitätskonzentrationen in subkutanen Tumor von 0,8 auf 2,2 % ID/g für ein gegen HER2 gerichtetes und von 0,2 auf 2,4 % ID/g für ein gegen CD20 gerichtetes Fab-Fragment gesteigert (jeweils 24 h p.i.; Mendler, 2015a).

In der vorliegenden Arbeit wurde N7E.107-PAS<sub>200</sub> als PET-Tracer im orthotopen GL261 Glioblastom-Mausmodell untersucht, das charakteristische Merkmale humaner Glioblastome, wie Gefäßproliferation und ein diffus infiltrierendes Tumorstadium widerspiegelt (Newcomb, 2009; Doblas, 2010). Hierfür wurde N7E.107-PAS<sub>200</sub> nach ortsspezifischer Verknüpfung mit Maleimid-Desferoxamin mit  $^{89}\text{Zr}$  markiert, das aufgrund seiner langen physikalischen Halbwertszeit (78,4 h) vielfach für die Markierung langsam akkumulierender Proteintracers genutzt wird (Watering, 2014; Mendler, 2015b).  $^{89}\text{Zr}$ -N7E.107-PAS<sub>200</sub> wurde mit einer spezifischen Aktivität von rund 6 MBq/nmol erhalten, die vergleichbar ist mit der spezifischen Aktivität des gegen HER2 gerichteten  $^{89}\text{Zr}$ -Fab-PAS<sub>200</sub> (11 MBq/nmol; Mendler, 2015b).



ED-B spezifisches  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  zeigte eine starke Anreicherung in orthotopen GL261-Tumoren, die sich bereits 3 h p.i. mittels PET ausgezeichnet vom tumorfreien Gehirn abgrenzen ließen. Hinsichtlich des Tumor/Kontralateral-Verhältnisses war  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  dem etablierten Aminosäuretracer  $^{18}\text{F-FET}$  überlegen, was das Potential des ED-B-spezifischen Anticalins für die klinische Anwendung in der Glioblastom-Bildgebung verdeutlicht, beispielsweise zur Beurteilung antiangiogener Therapien. Die Spezifität der Anreicherung wurde durch Konkurrenz mit einem Überschuss an nicht-markiertem N7E.107-PAS<sub>200</sub> belegt. *Ex-vivo*-Autoradiographie und die HE-Färbung konsekutiver Gewebeschnitte des tumortragenden Gehirns bestätigen die hohe Selektivität der Anreicherung im Tumor gegenüber tumorfreiem Gehirn.

24 h nach Injektion von  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  war eine deutliche Aktivitäts-Anreicherung in Knochen und Gelenken erkennbar. Dieses Phänomen ist in einer Vielzahl präklinischer Studien mit verschiedenen  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Proteintracern beschrieben (Holland, 2010; Tinianow, 2010; Chang, 2012; Azad, 2016) und wird auf die Instabilität des  $^{89}\text{Zr}$ -Desferoxamin-Komplexes (Fischer, 2013; Deri, 2015) und die Akkumulation des aus dem Komplex freigesetzten  $^{89}\text{Zr}$  im Knochen zurückgeführt (Abou, 2011).

Da die Darstellung des Tumors bereits 3 h nach intravenöser Applikation von  $^{89}\text{Zr-N7E.107-PAS}_{200}$  gelang und zudem ein höherer Tumor/Gehirn-Kontrast erreicht wurde als 24 h p.i., ist für weiterführende Experimente die Markierung mit dem kurzlebigen  $^{68}\text{Ga}$  geplant. Für die stabile Komplexbildung von  $^{68}\text{Ga}$  sind mit Maleimid-NOTA und Maleimid-NODA-GA zwei bifunktionelle Chelatoren kommerziell verfügbar, die analog zu Maleimid-Desferoxamin ortsspezifisch mit N7E.107-PAS<sub>200</sub> verknüpft werden können. Ferner bietet  $^{68}\text{Ga}$  als Generator-Nuklid den Vorteil, direkt vor Ort in radiochemischen Laboratorien erzeugt werden zu können.

## 4.8 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurden Bindeproteine mit Spezifität für den Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3 oder die Fibronectin-Spleißvariante ED-B auf ihre Eignung als Radiotracer für die Bildgebung der Glioblastom-assoziierten Neovaskulatur untersucht. Hierfür wurden der VEGFR-3-spezifische Ligand VEGF-C<sub>C156S</sub>, das VEGFR-3-spezifische Anticalin A5C3-QH und das ED-B-spezifische Anticalin N7A mit dem Gammastrahler  $^{123}\text{I}$  markiert.

Da die direkte [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung nach der Iodogen-Methode keine vorherige Derivatisierung des Proteins erfordert, eignet sie sich insbesondere für die Markierung in der Entwicklung befindlicher und im kleinen Labormaßstab hergestellter Proteine, wie der Anticaline. In der vorliegenden Arbeit wurden geringe Proteinmengen von weniger als 40 µg pro Markierungsansatz eingesetzt und die [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung der untersuchten Proteine erfolgte mit hohen Ausbeuten. Die erhaltenen

Markierungsprodukte wiesen hohe spezifische Aktivitäten auf und waren *in vitro* stabil in Pufferlösungen und Blutserum.

Da die kovalente Bindung von [<sup>123</sup>I]Iod statistisch an jeden lösungsmittelzugänglichen Tyrosin- oder Histidinrest des Proteins erfolgen kann, birgt die direkte [<sup>123</sup>I]Iodierung die Gefahr eines markierungsbedingten Affinitätsverlustes. Der genaue Ort der Modifikation kann nicht gesteuert werden und die Modifikation eines Aminosäurerestes im Bereich der Bindungsregion kann die Bindungsaktivität bedeutend beeinträchtigen. Während die Bindungsaffinität von VEGF-C<sub>C156S</sub> auch nach der Iodierung vollständig erhalten war, wurde für das Anticalin A5C3-QH ein deutlicher Affinitätsverlust verzeichnet. Dennoch wiesen sowohl <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub> als auch <sup>123</sup>I-A5C3-QH auf Glioblastomzelllinien hohe Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich auf und <sup>123</sup>I-A5C3-QH erkannte seine Zielstruktur in Glioblastomgewebeproben mit hoher Spezifität.

*In vivo* ließen sich subkutane U87MG-Tumore mit <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub> szintigraphisch abgrenzen, wengleich die Tumoranreicherung niedrig war und hohe Aktivitätskonzentrationen in den Nieren und der Leber detektiert wurden. Demgegenüber reicherte <sup>123</sup>I-A5C3-QH nicht im Tumor an. Neben der zügigen Elimination aus dem Blutstrom war hierfür möglicherweise die Selektivität von A5C3-QH für den humanen VEGFR-3 ursächlich. Es kann angenommen werden, dass durch <sup>123</sup>I-A5C3-QH keine Bindung des murinen VEGFR-3 auf den, den Tumor versorgenden Blutgefäßen, erfolgte. Im Gegensatz dazu bindet VEGF-C<sub>C156S</sub> sowohl den humanen als auch den murinen VEGFR-3. Obwohl beide [<sup>123</sup>I]iodierten Proteine in Blutserum *in vitro* stabil waren, unterlag <sup>123</sup>I-A5C3-QH *in vivo* in höherem Ausmaß Deiodierungsreaktionen. Dies spiegelte sich in deutlich höheren Aktivitätskonzentrationen in der Schilddrüse und im Magen nach Applikation von <sup>123</sup>I-A5C3-QH im Vergleich zu <sup>123</sup>I-VEGF-C<sub>C156S</sub> wider und verringerte zusätzlich die Verfügbarkeit von intaktem <sup>123</sup>I-A5C3-QH.

Vor dem Hintergrund der spezifischen Bindung von <sup>123</sup>I-A5C3-QH an dessen Zielstruktur auf Glioblastomzelllinien und Glioblastomgewebe *in vitro* und den vielseitigen Möglichkeiten der Anticalin-Technologie, könnte mit optimierten A5C3-QH-Varianten eine Verbesserung der *in-vivo*-Eigenschaften erreicht werden. Erfolgsversprechend erscheint zum einen die Etablierung von Bindern des murinen VEGFR-3. Außerdem könnten unter Erhalt der Bindungsaktivität ortsspezifisch markierbare Varianten, sowie PASylierte Vertreter mit vergrößertem hydrodynamischem Volumen und dadurch verlängerter Zirkulationsdauer, zu verbesserten *in-vivo*-Eigenschaften beitragen.

Mit dem ED-B-spezifischen Anticalin <sup>123</sup>I-N7A gelang, wie mit dem VEGFR-3-spezifischen <sup>123</sup>I-A5C3-QH, mittels *in-vitro*-Autoradiographie die Unterscheidung zwischen Patientenproben von Glioblastom-Gewebe und tumorfreiem Gehirngewebe. Da im Gegensatz zur VEGFR-3 die Aminosäuresequenz der ED-B in Mensch und Maus konserviert ist, ist eine ideale Voraussetzung für die Anwendung ED-B-spezifischer Anticaline sowohl auf Patientenmaterial als auch im

Mausmodell gegeben. Mit  $^{123}\text{I}$ -N7A gelang, im Gegensatz zu  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH, die Darstellung subkutaner U87MG-Tumore mittels Szintigraphie.

Im Verlauf dieser Arbeit stand mit N7E.107-PAS<sub>200</sub> eine neue, optimierte ED-B-spezifische Anticalin-Variante zur Verfügung. N7E.107-PAS<sub>200</sub> zeichnet sich durch eine um mehr als den Faktor 200 gesteigerte Bindungsaffinität für ED-B-positives Fibronectin, ein durch PASylierung erhöhtes hydrodynamisches Proteinvolumen und einen freien Cysteinrest als Angriffspunkt für die ortsspezifische Markierung mit PET-Nukliden aus. Der Cysteinrest ist am freien Ende des PAS-Polypeptides in räumlicher Distanz zur Bindungsregion positioniert, weshalb er sich ohne Beeinträchtigung der Bindungsaktivität modifizieren lässt.

Im Gegensatz zur direkten [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung erfordert die ortsspezifische Markierung mit PET-Nukliden eine vorherige Derivatisierung des Anticalins mit einem bifunktionellen Chelator. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die ortsspezifische Verknüpfung von N7E.107-PAS<sub>200</sub> mit Maleimid-Desferoxamin und anschließend die Markierung mit  $^{89}\text{Zr}$ . Im Vergleich zu den [ $^{123}\text{I}$ ]iodierten Bindeproteinen wurde  $^{89}\text{Zr}$ -N7E.107-PAS<sub>200</sub> mit einer um mehr als den Faktor 28 niedrigeren spezifischen Aktivität erhalten. Für einen Markierungsansatz inklusive der Derivatisierung mit Maleimid-Desferoxamin wurden rund 500  $\mu\text{g}$  N7E.107-PAS<sub>200</sub> benötigt, mehr als 10-mal so viel im Vergleich zur [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung. Jedoch bietet die ortsspezifische Markierung mit  $^{89}\text{Zr}$  im Gegensatz zur direkten [ $^{123}\text{I}$ ]Iodierung den Vorteil, dass unter Erhalt der Bindungsaktivität definierte und homogene Produkte erhalten werden. Außerdem ist  $^{89}\text{Zr}$ -N7E.107-PAS<sub>200</sub> im Gegensatz zu [ $^{123}\text{I}$ ]iodierten Radiotracer für die im Vergleich zur Szintigraphie höher auflösende PET nutzbar. So gelang mit  $^{89}\text{Zr}$ -N7E.107-PAS<sub>200</sub> die spezifische Darstellung orthotop implantierter GL261-Tumore mittels PET mit einem ausgezeichneten Tumor/Gehirnkontrast, der höher war als mit dem etablierten Gehirntumor-Tracer  $^{18}\text{F}$ -FET.

## Anhang

**Tabelle 4. Biodistribution nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$ .**

SHO-Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren wurden 2 MBq  $^{123}\text{I}$ -VEGF- $\text{C}_{156\text{S}}$  i.v. injiziert. Aufgeführt sind im Zeitverlauf organspezifische Aufnahmewerte als Prozent der injizierten Dosis pro Masse des untersuchten Gewebes (% ID/g) und Tumor/Organ-Verhältnisse, berechnet als Quotient der % ID/g-Werte.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  (n = 5).

Gewebe	1 h	3 h	8 h	24 h	48 h
Tumor	2,48 ± 0,12	2,23 ± 0,22	1,75 ± 0,47	0,72 ± 0,10	0,33 ± 0,03
Blut	10,34 ± 0,96	6,39 ± 0,85	3,79 ± 0,72	1,24 ± 0,23	0,33 ± 0,05
Herz	3,03 ± 0,31	2,17 ± 0,33	1,52 ± 0,36	0,58 ± 0,06	0,26 ± 0,02
Lunge	4,38 ± 0,40	2,86 ± 0,34	2,04 ± 0,51	0,79 ± 0,24	0,26 ± 0,06
Leber	16,55 ± 5,55	12,22 ± 1,03	10,60 ± 1,70	6,52 ± 1,59	3,50 ± 0,30
Milz	3,93 ± 0,76	2,65 ± 0,30	2,47 ± 0,92	1,68 ± 0,62	0,74 ± 0,28
Magen	6,63 ± 1,62	4,63 ± 1,55	3,00 ± 1,33	0,65 ± 0,10	0,27 ± 0,06
Dünndarm	2,00 ± 0,30	1,57 ± 0,26	1,43 ± 1,13	0,30 ± 0,08	0,13 ± 0,02
Dickdarm	1,36 ± 0,31	1,52 ± 0,38	1,92 ± 0,37	0,55 ± 0,11	0,25 ± 0,07
Nieren	29,66 ± 4,15	20,62 ± 1,22	14,25 ± 2,55	9,14 ± 1,33	5,55 ± 0,52
Gehirn	0,26 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Muskel	0,75 ± 0,09	0,57 ± 0,08	0,47 ± 0,13	0,20 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Schilddrüse	21,74 ± 12,32	75,23 ± 94,14	99,30 ± 34,55	84,08 ± 37,19	43,32 ± 42,52
<b>Ratio</b>					
Tumor/Muskel	3,35 ± 0,59	3,97 ± 0,73	3,74 ± 0,27	3,57 ± 0,48	3,25 ± 0,70
Tumor/Gehirn	9,40 ± 0,67	10,55 ± 1,26	12,48 ± 3,09	17,50 ± 3,15	17,71 ± 3,67
Tumor/Blut	0,24 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,59 ± 0,09	0,99 ± 0,08

**Tabelle 5. Biodistribution nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I}$ -VEGF-CC<sub>156S</sub> und einem Überschuss VEGF-CC<sub>156S</sub>.**

SHO-Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren wurden 3 h vor Organ-Entnahme 2 MBq  $^{123}\text{I}$ -VEGF-CC<sub>156S</sub> (0,11 nmol) i.v. injiziert. 1 min vorher hatten die Tiere einen Überschuss VEGF-CC<sub>156S</sub> (13 nmol; mittlere Spalte) oder PBS als Kontrolle (rechte Spalte) i.v. erhalten. Dargestellt sind organspezifische Aufnahmewerte 3 h nach Injektion als Prozent der injizierten Dosis pro Masse des untersuchten Gewebes (% ID/g) sowie Tumor/Organ-Verhältnisse berechnet als Quotient der % ID/g-Werte.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  (n = 3).

Gewebe	3 h	3 h + Block
Tumor	1,44 ± 0,51	1,44 ± 0,22
Blut	1,29 ± 0,52	1,27 ± 0,13
Herz	0,77 ± 0,29	0,71 ± 0,07
Lunge	1,28 ± 0,47	1,80 ± 0,14
Leber	4,25 ± 0,65	3,74 ± 0,43
Milz	1,43 ± 0,73	2,00 ± 0,28
Magen	5,42 ± 3,57	4,76 ± 1,11
Dünndarm	1,54 ± 0,47	2,12 ± 0,85
Dickdarm	1,86 ± 1,00	2,48 ± 1,04
Nieren	9,58 ± 1,05	13,14 ± 1,30
Gehirn	0,26 ± 0,13	0,22 ± 0,02
Muskel	0,68 ± 0,21	0,67 ± 0,10
Schilddrüse	95,12 ± 18,99	121,67 ± 18,32
Tumor/Muskel	2,13 ± 0,36	2,18 ± 0,42
Tumor/Gehirn	5,73 ± 1,05	6,52 ± 0,52
Tumor/Blut	1,13 ± 0,06	1,13 ± 0,05

**Tabelle 6. Biodistribution nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH.**

SHO-Mäusen mit subkutanen U251/VEGFR-3-Tumoren wurden 2 MBq  $^{123}\text{I}$ -A5C3-QH i.v. injiziert. Aufgeführt sind im Zeitverlauf organspezifische Aufnahmewerte als Prozent der injizierten Dosis pro Masse des untersuchten Gewebes (% ID/g) sowie Tumor/Organ-Verhältnisse, berechnet als Quotient der % ID/g-Werte.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  (n = 4).

Gewebe	1 h	3 h	8 h	24 h	48 h
Tumor	2,91 ± 0,33	1,31 ± 0,23	0,54 ± 0,12	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,03
Blut	5,32 ± 0,27	2,13 ± 0,46	0,87 ± 0,08	0,19 ± 0,06	0,08 ± 0,02
Herz	1,85 ± 0,16	0,72 ± 0,10	0,32 ± 0,06	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,00
Lunge	3,81 ± 0,52	1,77 ± 0,80	0,63 ± 0,09	0,10 ± 0,07	0,08 ± 0,01
Leber	3,36 ± 0,44	1,48 ± 0,13	0,85 ± 0,08	0,27 ± 0,12	0,22 ± 0,04
Milz	2,66 ± 0,43	1,05 ± 0,24	0,48 ± 0,04	0,15 ± 0,07	0,11 ± 0,04
Magen	11,66 ± 3,54	7,02 ± 1,83	1,96 ± 0,50	0,09 ± 0,03	0,05 ± 0,01
Dünndarm	2,80 ± 0,43	1,43 ± 0,74	0,51 ± 0,08	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,00
Dickdarm	2,09 ± 0,65	1,43 ± 0,45	1,64 ± 0,55	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Nieren	16,44 ± 1,63	7,23 ± 0,45	5,08 ± 0,72	2,20 ± 0,58	1,54 ± 0,49
Gehirn	0,24 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Muskel	0,88 ± 0,03	0,45 ± 0,13	0,20 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,00
Schilddrüse	49,13 ± 24,79	132,62 ± 92,13	176,98 ± 92,35	233,02 ± 67,97	122,65 ± 101,35
Tumor/Muskel	3,29 ± 0,33	2,95 ± 0,35	2,75 ± 0,24	2,92 ± 1,02	3,52 ± 2,47
Tumor/Gehirn	12,32 ± 0,89	10,39 ± 1,13	8,52 ± 2,22	7,10 ± 1,86	9,48 ± 3,67
Tumor/Blut	0,55 ± 0,05	0,62 ± 0,07	0,62 ± 0,09	0,49 ± 0,04	0,96 ± 0,47

**Tabelle 7. Biodistribution nach i.v.-Injektion von  $^{123}\text{I-N7A}$  oder  $^{123}\text{I-Lcn2}$ .**

Die Durchführung erfolgte nach Aufnahme der 24 h-Szintigramme an SHO-Mäusen mit subkutanen U87MG-Tumoren. Aufgeführt sind die organspezifische Anreicherung als Prozent der injizierten Dosis pro Masse des untersuchten Gewebes (% ID/g) und das Tumor/Blut-Verhältnis berechnet als Quotient der % ID/g-Werte.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  (n = 2 für  $^{123}\text{I-N7A}$  und n = 4 für  $^{123}\text{I-Lcn2}$ ).

Gewebe	$^{123}\text{I-N7A}$	$^{123}\text{I-Lcn2}$
Tumor	1,04 ± 0,01	0,45 ± 0,09
Blut	2,75 ± 0,43	1,95 ± 0,31
Herz	0,86 ± 0,21	0,50 ± 0,13
Lunge	1,18 ± 0,16	0,82 ± 0,33
Leber	1,05 ± 0,01	2,25 ± 0,20
Milz	0,49 ± 0,02	0,72 ± 0,18
Magen	0,75 ± 0,27	0,23 ± 0,02
Dünndarm	0,44 ± 0,01	0,27 ± 0,03
Dickdarm	0,46 ± 0,28	0,46 ± 0,08
Nieren	2,16 ± 0,35	5,26 ± 0,57
Gehirn	0,09 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Muskel	0,30 ± 0,01	0,12 ± 0,05
Schilddrüse	3,70 ± 3,19	3,71 ± 3,50
Tumor/Blut	0,38 ± 0,1	0,23 ± 0,01

## Literaturverzeichnis

Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R. und Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37(1): 13-25.

Abou, D.S., Ku, T. und Smith-Jones, P.M. (2011). *In vivo* biodistribution and accumulation of <sup>89</sup>Zr in mice. *Nucl Med Biol.* 38(5): 675-681.

Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Mäkinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K. und Stacker, S.A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(2): 548-553.

Adumeau, P., Sharma, S.K., Brent, C. und Zeglis, B.M. (2016a). Site-specifically labeled immunoconjugates for molecular imaging - Part 1: Cysteine residues and glycans. *Mol Imaging Biol.* 18(1): 1-17.

Adumeau, P., Sharma, S.K., Brent, C. und Zeglis, B.M. (2016b). Site-specifically labeled immunoconjugates for molecular imaging - Part 2: Peptide tags and unnatural amino acids. *Mol Imaging Biol.* 18(2): 153-165.

Akabani, G., Reardon, D.A., Coleman, R.E., Wong, T.Z., Metzler, S.D., Bowsher, J.E., Barboriak, D.P., Provenzale, J.M., Greer, K.L., DeLong, D., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Zhao, X.G., Pegram, C.N., McLendon, R.E., Bigner, D.D. und Zalutsky, M.R. (2005). Dosimetry and radiographic analysis of <sup>131</sup>I-labeled anti-tenascin 81C6 murine monoclonal antibody in newly diagnosed patients with malignant gliomas: a phase II study. *J Nucl Med.* 46(6): 1042-1051.

Albrecht, V., Richter, A., Pfeiffer, S., Gebauer, M., Lindner, S., Gieser, E., Schuller, U., Schichor, C., Gildehaus, F.J., Bartenstein, P., Tonn, J.C., Skerra, A. und Glass, R. (2016). Anticalins directed against the fibronectin extra domain B as diagnostic tracers for glioblastomas. *Int J Cancer.* 138(5): 1269-1280.

Alexiou, G.A., Tsiouris, S., Voulgaris, S., Kyritsis, A.P. und Fotopoulos, A.D. (2012). Glioblastoma multiforme imaging: the role of nuclear medicine. *Curr Radiopharm.* 5(4): 308-313.

Arndt, K.M., Muller, K.M. und Pluckthun, A. (1998). Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry (Mosc).* 37(37): 12918-12926.

Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., Lu, Y., Tran, H., Seller, A.J., Biroc, S.L., Szydlak, A., Pinkstaff, J.K., Tian, F., Sinha, S.C., Felding-Habermann, B., Smider, V.V. und Schultz, P.G. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(40): 16101-16106.

Azad, B.B., Lisok, A., Chatterjee, S., Poirier, J.T., Pullambhatla, M., Luker, G.D., Pomper, M.G. und Nimmagadda, S. (2016). Targeted Imaging of the Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3/CXCR7) in Human Cancer Xenografts. *J Nucl Med.*

Barinka, C., Ptacek, J., Richter, A., Novakova, Z., Morath, V. und Skerra, A. (2016). Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Protein Eng Des Sel.* 29(3): 105-115.



Baumgarten, P., Blank, A.E., Franz, K., Hattingen, E., Dunst, M., Zeiner, P., Hoffmann, K., Bähr, O., Mäder, L., Goepfert, B., Machein, M., Seifert, V., Steinbach, J.P., Plate, K.H., Harter, P.N. und Mittelbronn, M. (2016). Differential expression of vascular endothelial growth factor A, its receptors VEGFR-1, -2, and -3 and co-receptors neuropilin-1 and -2 does not predict bevacizumab response in human astrocytomas. *Neuro Oncol.* 18(2): 173-183.

Behr, T.M., Gotthardt, M., Becker, W. und Behe, M. (2002). Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. A review of standardized, reliable and safe procedures for clinical grade levels kBq to GBq in the Göttingen/Marburg experience. *Nuklearmedizin.* 41(2): 71-79.

Berndorff, D., Borkowski, S., Sieger, S., Rother, A., Friebe, M., Viti, F., Hilger, C.S., Cyr, J.E. und Dinkelborg, L.M. (2005). Radioimmunotherapy of solid tumors by targeting extra domain B fibronectin: identification of the best-suited radioimmunoconjugate. *Clin Cancer Res.* 11(19): 7053s-7063s.

Berndorff, D., Borkowski, S., Moosmayer, D., Viti, F., Müller-Tiemann, B., Sieger, S., Friebe, M., Hilger, C.S., Zardi, L., Neri, D. und Dinkelborg, L.M. (2006). Imaging of tumor angiogenesis using <sup>99m</sup>Tc-labeled human recombinant anti-ED-B fibronectin antibody fragments. *J Nucl Med.* 47(10): 1707-1716.

Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T. und Skerra, A. (1999). Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5): 1898-1903.

Birchler, M.T., Thuerl, C., Schmid, D., Neri, D., Waibel, R., Schubiger, A., Stoeckli, S.J., Schmid, S. und Goerres, G.W. (2007). Immunoscintigraphy of patients with head and neck carcinomas, with an anti-angiogenic antibody fragment. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 136(4): 543-548.

Bjornsson, O.G., Petursson, E., Sigurbjörnsson, B. und Davidsson, D. (1978). Over-all accuracy of <sup>99m</sup>Tc-pertechnetate brain scanning for brain tumours - study of 471 patients. *Nuklearmedizin.* 17(6): 249-253.

Blom, E., Velikyan, I., Monazzam, A., Razifar, P., Nair, M., Razifar, P., Vanderheyden, J.-L., Krivoshein, A.V., Backer, M., Backer, J. und B., L. (2011). Synthesis and characterization of scVEGF-PEG-[<sup>68</sup>Ga]NOTA and scVEGF-PEG-[<sup>68</sup>Ga]DOTA PET tracers. *J Labelled Compd Radiopharmaceut.* 54(11): 685-693.

Boado, R.J., Li, J.Y., Nagaya, M., Zhang, C. und Pardridge, W.M. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(21): 12079-12084.

Boellaard, R., Delgado-Bolton, R., Oyen, W.J., Giammarile, F., Tatsch, K., Eschner, W., Verzijlbergen, F.J., Barrington, S.F., Pike, L.C., Weber, W.A., Stroobants, S., Delbeke, D., Donohoe, K.J., Holbrook, S., Graham, M.M., Testanera, G., Hoekstra, O.S., Zijlstra, J., Visser, E., Hoekstra, C.J., Pruim, J., Willemsen, A., Arends, B., Kotzerke, J., Bockisch, A., Beyer, T., Chiti, A. und Krause, B.J. (2015). FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 42(2): 328-354.

Borsi, L., Balza, E., Bestagno, M., Castellani, P., Carnemolla, B., Biro, A., Leprini, A., Sepulveda, J., Burrone, O., Neri, D. und Zardi, L. (2002). Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int J Cancer.* 102(1): 75-85.

- Brem, S., Cotran, R. und Folkman, J. (1972). Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst.* 48(2): 347-356.
- Breslin, J.W., Yuan, S.Y. und Wu, M.H. (2007). VEGF-C alters barrier function of cultured lymphatic endothelial cells through a VEGFR-3-dependent mechanism. *Lymphat Res Biol.* 5(2): 105-113.
- Britton, K. und Granowska, M. (1988). Experience with iodine-123 labeled antibodies. In: Srivastava S.C. (Hrsg). *Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy.* Boston, MA: Springer US. 177-191.
- Burri, P.H., Hlushchuk, R. und Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 231(3): 474-488.
- Castagnoli, A., Pupi, A., Guizzardi, G., Ferri, P., Taverni, N., Meldolesi, U. und Formiconi, A. (1982). Brain scintigraphy with  $^{99m}\text{Tc}$ -citrate and  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA: a clinical comparison of the results. *Eur J Nucl Med.* 7(4): 184-186.
- Castellani, P., Viale, G., Dorcaratto, A., Nicolo, G., Kaczmarek, J., Querze, G. und Zardi, L. (1994). The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer.* 59(5): 612-618.
- Castellani, P., Borsi, L., Carnemolla, B., Biro, A., Dorcaratto, A., Viale, G.L., Neri, D. und Zardi, L. (2002). Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. *Am J Pathol.* 161(5): 1695-1700.
- Chakravarty, R., Chakraborty, S., Dash, A. und Pillai, M.R. (2013). Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted  $^{68}\text{Ga}$  with different bifunctional chelators. *Nucl Med Biol.* 40(2): 197-205.
- Chan, A.S., Leung, S.Y., Wong, M.P., Yuen, S.T., Cheung, N., Fan, Y.W. und Chung, L.P. (1998). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma. *Am J Surg Pathol.* 22(7): 816-826.
- Chang, A.J., Desilva, R., Jain, S., Lears, K., Rogers, B. und Lapi, S. (2012).  $^{89}\text{Zr}$ -Radiolabeled trastuzumab imaging in orthotopic and metastatic breast tumors. *Pharmaceuticals (Basel).* 5(1): 79-93.
- Chen, W., Cloughesy, T., Kamdar, N., Satyamurthy, N., Bergsneider, M., Liau, L., Mischel, P., Czernin, J., Phelps, M.E. und Silverman, D.H. (2005). Imaging proliferation in brain tumors with  $^{18}\text{F}$ -FLT PET: comparison with  $^{18}\text{F}$ -FDG. *J Nucl Med.* 46(6): 945-952.
- Chen, W., Delaloye, S., Silverman, D.H., Geist, C., Czernin, J., Sayre, J., Satyamurthy, N., Pope, W., Lai, A., Phelps, M.E. und Cloughesy, T. (2007). Predicting treatment response of malignant gliomas to bevacizumab and irinotecan by imaging proliferation with [ $^{18}\text{F}$ ]fluorothymidine positron emission tomography: a pilot study. *J Clin Oncol.* 25(30): 4714-4721.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., Min, W., McLendon, R.E., Rich, J.N. und Bao, S. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell.* 153(1): 139-152.

Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M., Abrey, L. und Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 370(8): 709-722.

Claes, A., Idema, A.J. und Wesseling, P. (2007). Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol.* 114(5): 443-458.

Cooper, M.S., Ma, M.T., Sunassee, K., Shaw, K.P., Williams, J.D., Paul, R.L., Donnelly, P.S. und Blower, P.J. (2012). Comparison of <sup>64</sup>Cu-complexing bifunctional chelators for radioimmunoconjugation: labeling efficiency, specific activity, and *in vitro/in vivo* stability. *Bioconjug Chem.* 23(5): 1029-1039.

Coso, S., Zeng, Y., Opeskin, K. und Williams, E.D. (2012). Vascular endothelial growth factor receptor-3 directly interacts with phosphatidylinositol 3-kinase to regulate lymphangiogenesis. *PLoS One.* 7(6): e39558.

Das, S. und Marsden, P.A. (2013). Angiogenesis in glioblastoma. *N Engl J Med.* 369(16): 1561-1563.

De Candia, L.M. und Rodgers, R.J. (1999). Characterization of the expression of the alternative splicing of the ED-A, ED-B and V regions of fibronectin mRNA in bovine ovarian follicles and corpora lutea. *Reprod Fertil Dev.* 11(6): 367-377.

De Witte, O., Lefranc, F., Levivier, M., Salmon, I., Brotchi, J. und Goldman, S. (2000). FDG-PET as a prognostic factor in high-grade astrocytoma. *J Neurooncol.* 49(2): 157-163.

DeAngelis, L.M. (2001). Brain tumors. *N Engl J Med.* 344(2): 114-123.

Delbeke, D., Coleman, R.E., Guiberteau, M.J., Brown, M.L., Royal, H.D., Siegel, B.A., Townsend, D.W., Berland, L.L., Parker, J.A., Hubner, K., Stabin, M.G., Zubal, G., Kachelriess, M., Cronin, V. und Holbrook, S. (2006). Procedure guideline for tumor imaging with <sup>18</sup>F-FDG PET/CT 1.0. *J Nucl Med.* 47(5): 885-895.

Deri, M.A., Ponnala, S., Kozlowski, P., Burton-Pye, B.P., Cicek, H.T., Hu, C., Lewis, J.S. und Francesconi, L.C. (2015). p-SCN-Bn-HOPO: A Superior Bifunctional Chelator for <sup>89</sup>Zr ImmunoPET. *Bioconjug Chem.* 26(12): 2579-2591.

Dewanjee, M.K. (1992). Chemistry of radioiodination reactions. In: *Radioiodination: theory, practice, and biomedical applications.* Boston, MA: Springer US. 69-125.

Dietrich, T., Berndorff, D., Heinrich, T., Hucko, T., Stepina, E., Hauff, P., Dinkelborg, L.M., Atrott, K., Giovannoni, L., Neri, D., Fleck, E., Graf, K. und Menssen, H.D. (2015). Targeted ED-B fibronectin SPECT *in vivo* imaging in experimental atherosclerosis. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 59(2): 228-237.

Dobbeleir, A.A., Hambye, A.S. und Franken, P.R. (1999). Influence of high-energy photons on the spectrum of iodine-123 with low- and medium-energy collimators: consequences for imaging with <sup>123</sup>I-labelled compounds in clinical practice. *Eur J Nucl Med.* 26(6): 655-658.

Doblas, S., He, T., Saunders, D., Pearson, J., Hoyle, J., Smith, N., Lerner, M. und Towner, R.A. (2010). Glioma morphology and tumor-induced vascular alterations revealed in seven rodent glioma models by *in vivo* magnetic resonance imaging and angiography. *J Magn Reson Imaging.* 32(2): 267-275.

Dohan, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C.S. und Carrasco, N. (2003). The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev.* 24(1): 48-77.

Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M. und Alitalo, K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science.* 282(5390): 946-949.

Engle, J.W., Hong, H., Zhang, Y., Valdovinos, H.F., Myklejord, D.V., Barnhart, T.E., Theuer, C.P., Nickles, R.J. und Cai, W. (2012). Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis with a <sup>66</sup>Ga-labeled monoclonal antibody. *Mol Pharm.* 9(5): 1441-1448.

Essig, M., Anzalone, N., Combs, S.E., Dorfler, A., Lee, S.K., Picozzi, P., Rovira, A., Weller, M. und Law, M. (2012). MR imaging of neoplastic central nervous system lesions: review and recommendations for current practice. *AJNR Am J Neuroradiol.* 33(5): 803-817.

Ferreira, C.L., Lamsa, E., Woods, M., Duan, Y., Fernando, P., Bensimon, C., Kordos, M., Guenther, K., Jurek, P. und Kiefer, G.E. (2010). Evaluation of bifunctional chelates for the development of gallium-based radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem.* 21(3): 531-536.

Ffrench-Constant, C., Water, L. van de, Dvorak, H.F. und Hynes, R.O. (1989). Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol.* 109(2): 903-914.

Fine, H.A. (2014). Bevacizumab in glioblastoma - still much to learn. *N Engl J Med.* 370(8): 764-765.

Fischer, G., Seibold, U., Schirrmacher, R., Wängler, B. und Wängler, C. (2013). <sup>89</sup>Zr, a radiometal nuclide with high potential for molecular imaging with PET: chemistry, applications and remaining challenges. *Molecules.* 18(6): 6469-6490.

Fougere, C. la, Suchorska, B., Bartenstein, P., Kreth, F.W. und Tonn, J.C. (2011). Molecular imaging of gliomas with PET: opportunities and limitations. *Neuro Oncol.* 13(8): 806-819.

Fraker, P.J. und Speck, J.C., Jr. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun.* 80(4): 849-857.

Frey, K., Fiechter, M., Schwager, K., Belloni, B., Barysch, M.J., Neri, D. und Dummer, R. (2011). Different patterns of fibronectin and tenascin-C splice variants expression in primary and metastatic melanoma lesions. *Exp Dermatol.* 20(8): 685-688.

Galldiks, N., Kracht, L.W., Burghaus, L., Thomas, A., Jacobs, A.H., Heiss, W.D. und Herholz, K. (2006). Use of <sup>11</sup>C-methionine PET to monitor the effects of temozolomide chemotherapy in malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 33(5): 516-524.

Galldiks, N., Langen, K.J., Holy, R., Pinkawa, M., Stoffels, G., Nolte, K.W., Kaiser, H.J., Filss, C.P., Fink, G.R., Coenen, H.H., Eble, M.J. und Piroth, M.D. (2012). Assessment of treatment response in patients with glioblastoma using O-(2-<sup>18</sup>F-fluoroethyl)-L-tyrosine PET in comparison to MRI. *J Nucl Med.* 53(7): 1048-1057.

Galldiks, N. und Langen, K.J. (2015a). Applications of PET imaging of neurological tumors with radiolabeled amino acids. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 59(1): 70-82.

Galldiks, N., Stoffels, G., Filss, C., Rapp, M., Blau, T., Tscherpel, C., Ceccon, G., Dunkl, V., Weinzierl, M., Stoffel, M., Sabel, M., Fink, G.R., Shah, N.J. und Langen, K.J. (2015b). The use of dynamic O-(2-<sup>18</sup>F-fluoroethyl)-L-tyrosine PET in the diagnosis of patients with progressive and recurrent glioma. *Neuro Oncol.* 17(9): 1293-1300.

Garcia-Figueiras, R., Padhani, A.R., Beer, A.J., Baleato-Gonzalez, S., Vilanova, J.C., Luna, A., Oleaga, L., Gomez-Caamano, A. und Koh, D.M. (2015). Imaging of tumor angiogenesis for radiologists - Part 1: Biological and technical basis. *Curr Probl Diagn Radiol.* 44(5): 407-424.

Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G. und Skerra, A. (2013). Combinatorial design of an Anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *Journal of molecular biology.* 425(4): 780-802.

Gieser, E. (2014). VEGF-Rezeptor 3 als vielversprechendes Target im malignen Gliom. Dissertation. Neurochirurgische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P.D., Jaeckle, K.A., Schiff, D., Stieber, V.W., Brachman, D.G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I.W., Sulman, E.P., Aldape, K.D., Curran, W.J. Jr. und Mehta, M.P. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med.* 370(8): 699-708.

Gille, H., Huelsmeyer, M., Christian, H.-J., Matschiner, G., Trentmann, S., Skerra, A. und Hohlbaum, A. (2008). Discovery and characterization of a novel Anticalin with potent *in vivo* antagonistic activity towards VEGF-A. *Cancer Res.* 68(9): Supplement 4077.

Gille, H., Hulsmeier, M., Trentmann, S., Matschiner, G., Christian, H.J., Meyer, T., Amirkhosravi, A., Audoly, L.P., Hohlbaum, A.M. und Skerra, A. (2016). Functional characterization of a VEGF-A-targeting Anticalin, prototype of a novel therapeutic human protein class. *Angiogenesis.* 19(1): 79-94.

Gladson, C.L. und Cheresch, D.A. (1991). Glioblastoma expression of vitronectin and the  $\alpha_v\beta_3$  integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest.* 88(6): 1924-1932.

Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D. und Jain, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 91(3): 1071-1121.

Götz, L., Spehl, T.S., Weber, W.A. und Grosu, A.L. (2012). PET and SPECT for radiation treatment planning. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 56(2): 163-172.

Grau, S.J., Trillsch, F., Herms, J., Thon, N., Nelson, P.J., Tonn, J.C. und Goldbrunner, R. (2007). Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *J Neurooncol.* 82(2): 141-150.

Grau, S.J., Trillsch, F., von Lutichau, I., Nelson, P.J., Herms, J., Tonn, J.C. und Goldbrunner, R.H. (2008). Lymphatic phenotype of tumour vessels in malignant gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34(6): 675-679.

Habermeier, A., Graf, J., Sandhofer, B.F., Boissel, J.P., Roesch, F. und Closs, E.I. (2015). System L amino acid transporter LAT1 accumulates o-(2-fluoroethyl)-L-tyrosine (FET). *Amino Acids.* 47(2): 335-344.

- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646-674.
- Hardee, M.E. und Zagzag, D. (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol*. 181(4): 1126-1141.
- Heiss, W.D. (2014). Clinical impact of amino acid PET in gliomas. *J Nucl Med*. 55(8): 1219-1220.
- Herholz, K., Langen, K.J., Schiepers, C. und Mountz, J.M. (2012). Brain tumors. *Semin Nucl Med*. 42(6): 356-370.
- Hohenester, E. und Engel, J. (2002). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol*. 21(2): 115-128.
- Hohlbaum, A.M., Trentmann, S., Gille, H., Allersdorfer, A., Belaiba, R.S., Huelsmeyer, M., Christian, J., Sandal, T., Matschiner, G., Jensen, K., Skerra, A. und Audoly, L.P. (2011). Discovery and preclinical characterization of a novel hepcidin antagonist with tunable PK/PD properties for the treatment of anemia in different patient populations. 53. ASH Annual Meeting and Exposition. San Diego.
- Holland, J.P., Divilov, V., Bander, N.H., Smith-Jones, P.M., Larson, S.M. und Lewis, J.S. (2010). <sup>89</sup>Zr-DFO-J591 for immunoPET of prostate-specific membrane antigen expression *in vivo*. *J Nucl Med*. 51(8): 1293-1300.
- Holzer, T., Herholz, K., Jeske, J. und Heiss, W.D. (1993). FDG-PET as a prognostic indicator in radiochemotherapy of glioblastoma. *J Comput Assist Tomogr*. 17(5): 681-687.
- Hosseinimehr, S.J., Tolmachev, V. und Orlova, A. (2012). Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting peptide conjugate design. *Drug Discov Today*. 17(21-22): 1224-1232.
- Huang, C. und McConathy, J. (2013). Radiolabeled amino acids for oncologic imaging. *J Nucl Med*. 54(7): 1007-1010.
- Huang, W.S., Cherng, S.C., Jen, T.K., Yu, M.H. und Yeh, M.Y. (2000). Effects of temperature on radiochemical purity and immunoreactivity of radiolabeled monoclonal antibody 1H10. *J Nucl Med Technol*. 28(3): 182-185.
- Hudson, H.M. und Larkin, R.S. (1994). Accelerated image reconstruction using ordered subsets of projection data. *IEEE Trans Med Imaging*. 13(4): 601-609.
- Huhtala, T., Laakkonen, P., Sallinen, H., Yla-Herttuala, S. und Narvanen, A. (2010). *In vivo* SPECT/CT imaging of human orthotopic ovarian carcinoma xenografts with <sup>111</sup>In-labeled monoclonal antibodies. *Nucl Med Biol*. 37(8): 957-964.
- Hygino da Cruz, L.C., Jr., Rodriguez, I., Domingues, R.C., Gasparetto, E.L. und Sorensen, A.G. (2011). Pseudoprogression and pseudoresponse: imaging challenges in the assessment of posttreatment glioma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 32(11): 1978-1985.
- Iagaru, A., Mosci, C., Mitra, E., Zaharchuk, G., Fischbein, N., Harsh, G., Li, G., Nagpal, S., Recht, L. und Gambhir, S.S. (2015). Glioblastoma Multiforme Recurrence: An Exploratory Study of <sup>18</sup>F-FPPRGD<sub>2</sub> PET/CT. *Radiology*. 277(2): 497-506.

- Issaka, R.B., Oommen, S., Gupta, S.K., Liu, G., Myers, J.L., Ryu, J.H. und Vlahakis, N.E. (2009). Vascular endothelial growth factors C and D induces proliferation of lymphangioliomyomatosis cells through autocrine crosstalk with endothelium. *Am J Pathol.* 175(4): 1410-1420.
- Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G. und Batchelor, T.T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci.* 8(8): 610-622.
- Jang, M., Kim, S.S. und Lee, J. (2013). Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med.* 45: e45.
- Jansen, N.L., Suchorska, B., Wenter, V., Schmid-Tannwald, C., Todica, A., Eigenbrod, S., Niyazi, M., Tonn, J.C., Bartenstein, P., Kreth, F.W. und Fougere, C. la (2015). Prognostic significance of dynamic <sup>18</sup>F-FET PET in newly diagnosed astrocytic high-grade glioma. *J Nucl Med.* 56(1): 9-15.
- Jenny, B., Harrison, J.A., Baetens, D., Tille, J.C., Burkhardt, K., Mottaz, H., Kiss, J.Z., Dietrich, P.Y., De Tribolet, N., Pizzolato, G.P. und Pepper, M.S. (2006). Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas. *J Pathol.* 209(1): 34-43.
- Johnson, D.R. und O'Neill, B.P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *J Neurooncol.* 107(2): 359-364.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K. (1996a). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 15(7): 1751.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K. (1996b). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal.* 15(2): 290-298.
- Joukov, V., Kumar, V., Sorsa, T., Arighi, E., Weich, H., Saksela, O. und Alitalo, K. (1998). A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem.* 273(12): 6599-6602.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., Hinsbergh, V.W. van, Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M. und Alitalo, K. (1995). Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(8): 3566-3570.
- Kang, C.M., Kim, S.M., Koo, H.J., Yim, M.S., Lee, K.H., Ryu, E.K. und Choe, Y.S. (2013). *In vivo* characterization of <sup>68</sup>Ga-NOTA-VEGF<sub>121</sub> for the imaging of VEGF receptor expression in U87MG tumor xenograft models. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 40(2): 198-206.
- Karunanithi, S., Sharma, P., Kumar, A., Khangembam, B.C., Bandopadhyaya, G.P., Kumar, R., Gupta, D.K., Malhotra, A. und Bal, C. (2013). <sup>18</sup>F-FDOPA PET/CT for detection of recurrence in patients with glioma: prospective comparison with <sup>18</sup>F-FDG PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 40(7): 1025-1035.
- Kaschten, B., Stevenaert, A., Sadzot, B., Deprez, M., Degueldre, C., Del Fiore, G., Luxen, A. und Reznik, M. (1998). Preoperative evaluation of 54 gliomas by PET with Fluorine-18-fluorodeoxyglucose and/or Carbon-11-methionine. *J Nucl Med.* 39(5): 778-785.

- Kim, C.H., Bak, K.H., Kim, Y.S., Kim, J.M., Ko, Y., Oh, S.J., Kim, K.M. und Hong, E.K. (2000). Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg Neurol.* 54(3): 235-240.
- Kim, H.J., Eichinger, A. und Skerra, A. (2009). High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc.* 131(10): 3565-3576.
- Kotter, B. (2016). Evaluierung verschiedener Formate eines Anticalins mit Spezifität für das onkofetale Fibronectin hinsichtlich der Radiomarkierung mit <sup>68</sup>Gallium. Masterarbeit im Studiengang Molekulare Biotechnologie. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Kubota, R., Yamada, S., Kubota, K., Ishiwata, K., Tamahashi, N. und Ido, T. (1992). Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose *in vivo*: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J Nucl Med.* 33(11): 1972-1980.
- Kumra, H. und Reinhardt, D.P. (2016). Fibronectin-targeted drug delivery in cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 97: 101-110.
- Kuwert, T., Woesler, B., Morgenroth, C., Lerch, H., Schafers, M., Palkovic, S., Matheja, P., Brandau, W., Wassmann, H. und Schober, O. (1998). Diagnosis of recurrent glioma with SPECT and iodine-123- $\alpha$ -methyl tyrosine. *J Nucl Med.* 39(1): 23-27.
- Lahoutte, T., Caveliers, V., Camargo, S.M., Franca, R., Ramadan, T., Veljkovic, E., Mertens, J., Bossuyt, A. und Verrey, F. (2004). SPECT and PET amino acid tracer influx via system L (*h4F2hc-hLAT1*) and its transstimulation. *J Nucl Med.* 45(9): 1591-1596.
- Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Luoh, S.M., Avraham, H. und Wood, W.I. (1996). Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(5): 1988-1992.
- Leppänen, V.M., Tvorogov, D., Kisko, K., Prota, A.E., Jeltsch, M., Anisimov, A., Markovic-Mueller, S., Stutfeld, E., Goldie, K.N., Ballmer-Hofer, K. und Alitalo, K. (2013). Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(32): 12960-12965.
- Leung, D., Han, X., Mikkelsen, T. und Nabors, L.B. (2014). Role of MRI in primary brain tumor evaluation. *J Natl Compr Canc Netw.* 12(11): 1561-1568.
- Leung, K. (2004). [<sup>18</sup>F]Fluoro-2-deoxy-2-D-glucose. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD).
- Leveille, J., Pison, C., Karakand, Y., Lemieux, R. und Vallieres, B.J. (1977). Technetium-99m glucoheptonate in brain-tumor detection: an important advance in radiotracer techniques. *J Nucl Med.* 18(10): 957-961.
- Liu, S. (2008). Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(12): 1347-1370.
- Loening, A.M. und Gambhir, S.S. (2003). AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging.* 2(3): 131-137.



Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P. und Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 131(6): 803-820.

Magnuson, V.L., Young, M., Schattenberg, D.G., Mancini, M.A., Chen, D.L., Steffensen, B. und Klebe, R.J. (1991). The alternative splicing of fibronectin pre-mRNA is altered during aging and in response to growth factors. *J Biol Chem.* 266(22): 14654-14662.

Mäkinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E.C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaschki, D., Stacker, S.A., Achen, M.G. und Alitalo, K. (2001). Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 20(17): 4762-4773.

Marcola, M. und Rodrigues, C.E. (2015). Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. *Stem Cells Int.* 2015: 832649.

Mariani, G., Lasku, A., Balza, E., Gaggero, B., Motta, C., Di Luca, L., Dorcaratto, A., Viale, G.A., Neri, D. und Zardi, L. (1997). Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants. *Cancer.* 80(12 Suppl): 2378-2384.

Matter, C.M., Schuler, P.K., Alessi, P., Meier, P., Ricci, R., Zhang, D., Halin, C., Castellani, P., Zardi, L., Hofer, C.K., Montani, M., Neri, D. und Luscher, T.F. (2004). Molecular imaging of atherosclerotic plaques using a human antibody against the extra-domain B of fibronectin. *Circ Res.* 95(12): 1225-1233.

McConathy, J., Yu, W., Jarkas, N., Seo, W., Schuster, D.M. und Goodman, M.M. (2012). Radiohalogenated nonnatural amino acids as PET and SPECT tumor imaging agents. *Med Res Rev.* 32(4): 868-905.

Mendler, C.T., Friedrich, L., Laitinen, I., Schlapschy, M., Schwaiger, M., Wester, H.J. und Skerra, A. (2015a). High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *MAbs.* 7(1): 96-109.

Mendler, C.T., Gehring, T., Wester, H.J., Schwaiger, M. und Skerra, A. (2015b). <sup>89</sup>Zr- versus <sup>124</sup>I-labeled  $\alpha$ HER2 Fab with optimized plasma half-life for high contrast tumor imaging *in vivo*. *J Nucl Med.* 56(7): 1112-1118.

Mentzer, S.J. und Konerding, M.A. (2014). Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis.* 17(3): 499-509.

Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A. und Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36(10): 587-597.

Minhajati, R., Mori, D., Yamasaki, F., Sugita, Y., Satoh, T. und Tokunaga, O. (2006). Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int.* 56(12): 717-723.

Morath, V., Bolze, F., Schlapschy, M., Schneider, S., Sedlmayer, F., Seyfarth, K., Klingenspor, M. und Skerra, A. (2015). PASylation of murine leptin leads to extended plasma half-life and enhanced *in vivo* efficacy. *Mol Pharm.* 12(5): 1431-1442.

Mross, K., Richly, H., Fischer, R., Scharr, D., Buchert, M., Stern, A., Gille, H., Audoly, L.P. und Scheulen, M.E. (2013). First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an Anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors. *PLoS One*. 8(12): e83232.

Mumcuoglu, E.U., Leahy, R., Cherry, S.R. und Zhou, Z. (1994). Fast gradient-based methods for Bayesian reconstruction of transmission and emission PET images. *IEEE Trans Med Imaging*. 13(4): 687-701.

Nabors, L.B., Fink, K.L., Mikkelsen, T., Grujicic, D., Tarnawski, R., Nam do, H., Mazurkiewicz, M., Salacz, M., Ashby, L., Zagonel, V., Depenni, R., Perry, J.R., Hicking, C., Picard, M., Hegi, M.E., Lhermitte, B. und Reardon, D.A. (2015). Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated MGMT gene promoter: results of the open-label, controlled, randomized phase II CORE study. *Neuro Oncol*. 17(5): 708-717.

Newcomb, E.W. und Zagzag, D. (2009). The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. In: Meir G.E. (Hrsg). *CNS cancer: models, markers, prognostic factors, targets, and therapeutic approaches*. Totowa, NJ: Humana Press. 227-241.

Noell, S., Wolburg-Buchholz, K., Mack, A.F., Wolburg, H. und Fallier-Becker, P. (2011). The blood-brain barrier in brain tumours. In: Garami M. (Hrsg). *Management of CNS tumors*. InTech. DOI: 10.5772/21465.

Nomura, N., Pastorino, S., Jiang, P., Lambert, G., Crawford, J.R., Gymnopoulos, M., Piccioni, D., Juarez, T., Pingle, S.C., Makale, M. und Kesari, S. (2014). Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in primary gliomas and breast cancer brain metastases. *Cancer Cell Int*. 14(1): 26.

Nowosielski, M., DiFranco, M.D., Putzer, D., Seiz, M., Recheis, W., Jacobs, A.H., Stockhammer, G. und Hutterer, M. (2014). An intra-individual comparison of MRI, <sup>18</sup>F-FET and <sup>18</sup>F-FLT PET in patients with high-grade gliomas. *PLoS One*. 9(4): e95830.

Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M.G., Lutolf, U.M. und Kleihues, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 64(19): 6892-6899.

Okubo, S., Zhen, H.N., Kawai, N., Nishiyama, Y., Haba, R. und Tamiya, T. (2010). Correlation of L-methyl-<sup>11</sup>C-methionine (MET) uptake with L-type amino acid transporter 1 in human gliomas. *J Neurooncol*. 99(2): 217-225.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Liao, P., Rouse, C., Chen, Y., Dowling, J., Wolinsky, Y., Kruchko, C. und Barnholtz-Sloan, J. (2014). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol*. 16: iv1-iv63.

Oxboel, J., Brandt-Larsen, M., Schjoeth-Eskesen, C., Myschetzky, R., El-Ali, H.H., Madsen, J. und Kjaer, A. (2014). Comparison of two new angiogenesis PET tracers <sup>68</sup>Ga-NODAGA-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub> and <sup>64</sup>Cu-NODAGA-E[c(RGDyK)]<sub>2</sub>; *in vivo* imaging studies in human xenograft tumors. *Nucl Med Biol*. 41(3): 259-267.

Oyama, F., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Titani, K. und Sekiguchi, K. (1990). Oncodevelopmental regulation of the alternative splicing of fibronectin pre-messenger RNA in human lung tissues. *Cancer Res*. 50(4): 1075-1078.

- Oyama, F., Hirohashi, S., Sakamoto, M., Titani, K. und Sekiguchi, K. (1993). Coordinate oncodevelopmental modulation of alternative splicing of fibronectin pre-messenger RNA at ED-A, ED-B, and CS1 regions in human liver tumors. *Cancer Res.* 53(9): 2005-2011.
- Padma, M.V., Said, S., Jacobs, M., Hwang, D.R., Dunigan, K., Satter, M., Christian, B., Ruppert, J., Bernstein, T., Kraus, G. und Mantil, J.C. (2003). Prediction of pathology and survival by FDG PET in gliomas. *J Neurooncol.* 64(3): 227-237.
- Pagani, F., Zagato, L., Vergani, C., Casari, G., Sidoli, A. und Baralle, F.E. (1991). Tissue-specific splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor during development and aging in rat. *J Cell Biol.* 113(5): 1223-1229.
- Pankov, R. und Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115(Pt 20): 3861-3863.
- Partanen, T.A., Alitalo, K. und Miettinen, M. (1999). Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer.* 86(11): 2406-2412.
- Partanen, T.A., Arola, J., Saaristo, A., Jussila, L., Ora, A., Miettinen, M., Stacker, S.A., Achen, M.G. und Alitalo, K. (2000). VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J.* 14(13): 2087-2096.
- Patronas, N.J., Di Chiro, G., Kufta, C., Bairamian, D., Kornblith, P.L., Simon, R. und Larson, S.M. (1985). Prediction of survival in glioma patients by means of positron emission tomography. *J Neurosurg.* 62(6): 816-822.
- Perk, L.R., Visser, G.W., Vosjan, M.J., Stigter-van Walsum, M., Tjink, B.M., Leemans, C.R. und Dongen, G.A.v. (2005). <sup>89</sup>Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals <sup>90</sup>Y and <sup>177</sup>Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med.* 46(11): 1898-1906.
- Peters, J.H. und Hynes, R.O. (1996). Fibronectin isoform distribution in the mouse I. The alternatively spliced EIIIB, EIIIA, and V segments show widespread codistribution in the developing mouse embryo. *Cell Adhes Commun.* 4(2): 103-125.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P. und Neri, D. (1998). Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem.* 273(34): 21769-21776.
- Pirotte, B.J., Levivier, M., Goldman, S., Massager, N., Wikler, D., Dewitte, O., Bruneau, M., Rorive, S., David, P. und Brotchi, J. (2009). Positron emission tomography-guided volumetric resection of supratentorial high-grade gliomas: a survival analysis in 66 consecutive patients. *Neurosurgery.* 64(3): 471-481.
- Planas-Paz, L., Strlic, B., Goedecke, A., Breier, G., Fassler, R. und Lammert, E. (2012). Mechanoinduction of lymph vessel expansion. *EMBO J.* 31(4): 788-804.
- Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A., Mennel, H.D. und Risau, W. (1994). Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms. *Int J Cancer.* 59(4): 520-529.
- Poli, G.L., Bianchi, C., Virota, G., Bettini, A., Moretti, R., Trachsel, E., Elia, G., Giovannoni, L., Neri, D. und Bruno, A. (2013). Radretumab radioimmunotherapy in patients with brain metastasis: a <sup>124</sup>I-L19SIP dosimetric PET study. *Cancer immunology research.* 1(2): 134-143.

- Pope, W.B., Sayre, J., Perlina, A., Villablanca, J.P., Mischel, P.S. und Cloughesy, T.F. (2005). MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol.* 26(10): 2466-2474.
- Pöpperl, G., Kreth, F.W., Herms, J., Koch, W., Mehrkens, J.H., Gildehaus, F.J., Kretzschmar, H.A., Tonn, J.C. und Tatsch, K. (2006). Analysis of <sup>18</sup>F-FET PET for grading of recurrent gliomas: is evaluation of uptake kinetics superior to standard methods? *J Nucl Med.* 47(3): 393-403.
- Pöpperl, G., Kreth, F.W., Mehrkens, J.H., Herms, J., Seelos, K., Koch, W., Gildehaus, F.J., Kretzschmar, H.A., Tonn, J.C. und Tatsch, K. (2007). FET PET for the evaluation of untreated gliomas: correlation of FET uptake and uptake kinetics with tumour grading. *Eur J Nucl Med.* 34(12): 1933-1942.
- Potente, M., Gerhardt, H. und Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 146(6): 873-887.
- Pujuguet, P., Hammann, A., Moutet, M., Samuel, J.L., Martin, F. und Martin, M. (1996). Expression of fibronectin ED-A<sup>+</sup> and ED-B<sup>+</sup> isoforms by human and experimental colorectal cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts. *Am J Pathol.* 148(2): 579-592.
- Qi, J., Leahy, R.M., Cherry, S.R., Chatziioannou, A. und Farquhar, T.H. (1998). High-resolution 3D Bayesian image reconstruction using the microPET small-animal scanner. *Phys Med Biol.* 43(4): 1001-1013.
- Qi, J. und Leahy, R.M. (2000). Resolution and noise properties of MAP reconstruction for fully 3D PET. *IEEE Trans Med Imaging.* 19(5): 493-506.
- Rabuka, D., Rush, J.S., deHart, G.W., Wu, P. und Bertozzi, C.R. (2012). Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags. *Nat Protoc.* 7(6): 1052-1067.
- Rasey, J.S., Grierson, J.R., Wiens, L.W., Kolb, P.D. und Schwartz, J.L. (2002). Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med.* 43(9): 1210-1217.
- Rauth, S., Hinz, D., Borger, M., Uhrig, M., Mayhaus, M., Riemenschneider, M. und Skerra, A. (2016). High-affinity Anticalins with aggregation-blocking activity directed against the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Biochem J.* 473(11): 1563-1578.
- Reichert, A.J., Poxleitner, G., Dauner, M. und Skerra, A. (2015). Optimisation of a system for the co-translational incorporation of a keto amino acid and its application to a tumour-specific Anticalin. *Protein Eng Des Sel.* 28(12): 553-565.
- Reifenberger, G. und Collins, V.P. (2004). Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl).* 82(10): 656-670.
- Ribatti, D. und Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Dev Biol.* 372(2): 157-165.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M. und De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 468(7325): 824-828.

Richter, A., Eggenstein, E. und Skerra, A. (2014a). Anticalins: exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett.* 588(2): 213-218.

Richter, A. und Skerra, A. (2014b). Neuartige biopharmazeutische Wirkstoffe auf der Grundlage von Lipocalinen. *BIOspektrum.* 20(5): 503-505.

Richter, A., Mendler, C.T., D'Allessandria, C., Blechert, B., Gebauer, M., Skerra, A. und Schwaiger, M. (2015). Evaluierung PASylierter Anticaline zur molekularen Bildgebung der Tumervaskulatur. 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin. Hannover.

Richter, A. und Skerra, A. (2017). Anticalins directed against vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) with picomolar affinities show potential for medical therapy and *in vivo* imaging. *Biol Chem.* 396(1): 39-55.

Rossin, R., Berndorff, D., Friebe, M., Dinkelborg, L.M. und Welch, M.J. (2007). Small-animal PET of tumor angiogenesis using a <sup>76</sup>Br-labeled human recombinant antibody fragment to the ED-B domain of fibronectin. *J Nucl Med.* 48(7): 1172-1179.

Salacinski, P.R., McLean, C., Sykes, J.E., Clement-Jones, V.V. und Lowry, P.J. (1981). Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycoluril (Iodogen). *Anal Biochem.* 117(1): 136-146.

Santimaria, M., Moscatelli, G., Viale, G.L., Giovannoni, L., Neri, G., Viti, F., Leprini, A., Borsi, L., Castellani, P., Zardi, L., Neri, D. und Riva, P. (2003). Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res.* 9(2): 571-579.

Santra, A., Kumar, R. und Sharma, P. (2015). Use of 99m-technetium-glucoheptonate as a tracer for brain tumor imaging: An overview of its strengths and pitfalls. *Indian J Nucl Med.* 30(1): 1-8.

Schiefner, A. und Skerra, A. (2015). The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Acc Chem Res.* 48(4): 976-985.

Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. und Skerra, A. (2013). PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel.* 26(8): 489-501.

Schlehuber, S., Beste, G. und Skerra, A. (2000). A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J Mol Biol.* 297(5): 1105-1120.

Schnell, O., Krebs, B., Wagner, E., Romagna, A., Beer, A.J., Grau, S.J., Thon, N., Goetz, C., Kretschmar, H.A., Tonn, J.C. und Goldbrunner, R.H. (2008). Expression of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. *Brain Pathol.* 18(3): 378-386.

Schnell, O., Krebs, B., Carlsen, J., Miederer, I., Goetz, C., Goldbrunner, R.H., Wester, H.J., Haubner, R., Pöpperl, G., Holtmannspotter, M., Kretschmar, H.A., Kessler, H., Tonn, J.C., Schwaiger, M. und Beer, A.J. (2009). Imaging of integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression in patients with malignant glioma by [<sup>18</sup>F]Galacto-RGD positron emission tomography. *Neuro Oncol.* 11(6): 861-870.

Schoenegger, K., Oberndorfer, S., Wuschitz, B., Struhal, W., Hainfellner, J., Prayer, D., Heinzl, H., Lahrman, H., Marosi, C. und Grisold, W. (2009). Peritumoral edema on MRI at initial diagnosis: an independent prognostic factor for glioblastoma? *Eur J Neurol.* 16(7): 874-878.

- Schold, S.C., Jr., Zalutsky, M.R., Coleman, R.E., Glantz, M.J., Friedman, A.H., Jaszczak, R.J., Bigner, S.H. und Bigner, D.D. (1993). Distribution and dosimetry of I-123-labeled monoclonal antibody 81C6 in patients with anaplastic glioma. *Invest Radiol.* 28(6): 488-496.
- Scholz, A., Harter, P.N., Cremer, S., Yalcin, B.H., Gurnik, S., Yamaji, M., Di Tacchio, M., Sommer, K., Baumgarten, P., Bähr, O., Steinbach, J.P., Trojan, J., Glas, M., Herrlinger, U., Krex, D., Meinhardt, M., Weyerbrock, A., Timmer, M., Goldbrunner, R., Deckert, M., Braun, C., Schittenhelm, J., Frueh, J.T., Ullrich, E., Mittelbronn, M., Plate, K.H. und Reiss, Y. (2015). Endothelial cell-derived angiopoietin-2 is a therapeutic target in treatment-naive and bevacizumab-resistant glioblastoma. *EMBO Mol Med.* 8(1): 39-57.
- Schwarzenberg, J., Czernin, J., Cloughesy, T.F., Ellingson, B.M., Pope, W.B., Geist, C., Dahlbom, M., Silverman, D.H., Satyamurthy, N., Phelps, M.E. und Chen, W. (2012). 3'-deoxy-3'-<sup>18</sup>F-fluorothymidine PET and MRI for early survival predictions in patients with recurrent malignant glioma treated with bevacizumab. *J Nucl Med.* 53(1): 29-36.
- Schwarzenberg, J., Czernin, J., Cloughesy, T.F., Ellingson, B.M., Pope, W.B., Grogan, T., Elashoff, D., Geist, C., Silverman, D.H., Phelps, M.E. und Chen, W. (2014). Treatment response evaluation using <sup>18</sup>F-FDOPA PET in patients with recurrent malignant glioma on bevacizumab therapy. *Clin Cancer Res.* 20(13): 3550-3559.
- Schwenck, J., Tabatabai, G., Skardelly, M., Reischl, G., Beschoner, R., Pichler, B. und Fougere, C. la (2015). *In vivo* visualization of prostate-specific membrane antigen in glioblastoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 42(1): 170-171.
- Shen, D.H., Kloos, R.T., Mazzaferri, E.L. und Jhian, S.M. (2001). Sodium iodide symporter in health and disease. *Thyroid.* 11(5): 415-425.
- Shields, A.F., Grierson, J.R., Dohmen, B.M., Machulla, H.J., Stayanoff, J.C., Lawhorn-Crews, J.M., Obradovich, J.E., Muzik, O. und Mangner, T.J. (1998). Imaging proliferation *in vivo* with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nat Med.* 4(11): 1334-1336.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. und Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 432(7015): 396-401.
- Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., Pastorino, S., Yang, M., Hoffman, R.M., Kesari, S. und Verma, I.M. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(11): 4274-4280.
- Stark, A.M., Nabavi, A., Mehdorn, H.M. und Blomer, U. (2005). Glioblastoma multiforme - Report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol.* 63(2): 162-169.
- Stark, A.M., Bergh, J. van de, Hedderich, J., Mehdorn, H.M. und Nabavi, A. (2012). Glioblastoma: clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 114(7): 840-845.
- Stratmann, A., Risau, W. und Plate, K.H. (1998). Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol.* 153(5): 1459-1466.
- Stupp, R., Mason, W.P., Bent, M.J. van den, Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E. und Mirimanoff, R.O. (2005).

Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352(10): 987-996.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., Bent, M.J. van den, Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G. und Mirimanoff, R.O. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10(5): 459-466.

Suchorska, B., Tonn, J.C. und Jansen, N.L. (2014). PET imaging for brain tumor diagnostics. *Curr Opin Neurol.* 27(6): 683-688.

Tarli, L., Balza, E., Viti, F., Borsi, L., Castellani, P., Berndorff, D., Dinkelborg, L., Neri, D. und Zardi, L. (1999). A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood.* 94(1): 192-198.

Terwisscha van Scheltinga, A.G., Lub-de Hooge, M.N., Hinner, M.J., Verheijen, R.B., Allersdorfer, A., Hulsmeyer, M., Nagengast, W.B., Schroder, C.P., Kosterink, J.G., de Vries, E.G., Audoly, L. und Olwill, S.A. (2014). *In vivo* visualization of MET tumor expression and anticalin biodistribution with the MET-specific anticalin <sup>89</sup>Zr-PRS-110 PET tracer. *J Nucl Med.* 55(4): 665-671.

Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Barnholtz-Sloan, J.S. und Villano, J.L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 23(10): 1985-1996.

Tijink, B.M., Perk, L.R., Budde, M., Stigter-van Walsum, M., Visser, G.W., Kloet, R.W., Dinkelborg, L.M., Leemans, C.R., Neri, D. und Dongen, G.A. van. (2009). <sup>124</sup>I-L19-SIP for immuno-PET imaging of tumour vasculature and guidance of <sup>131</sup>I-L19-SIP radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 36(8): 1235-1244.

Tinianow, J.N., Gill, H.S., Ogasawara, A., Flores, J.E., Vanderbilt, A.N., Luis, E., Vandlen, R., Darwish, M., Junutula, J.R., Williams, S.P. und Marik, J. (2010). Site-specifically <sup>89</sup>Zr-labeled monoclonal antibodies for ImmunoPET. *Nucl Med Biol.* 37(3): 289-297.

Ullrich, R.T., Kracht, L., Brunn, A., Herholz, K., Frommolt, P., Miletic, H., Deckert, M., Heiss, W.D. und Jacobs, A.H. (2009). Methyl-L-<sup>11</sup>C-methionine PET as a diagnostic marker for malignant progression in patients with glioma. *J Nucl Med.* 50(12): 1962-1968.

Valtola, R., Salven, P., Heikkila, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., deWaal, R. und Alitalo, K. (1999). VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol.* 154(5): 1381-1390.

Vegt, E., de Jong, M., Wetzels, J.F., Masereeuw, R., Melis, M., Oyen, W.J., Gotthardt, M. und Boerman, O.C. (2010). Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J Nucl Med.* 51(7): 1049-1058.

Veikkola, T., Jussila, L., Makinen, T., Karpanen, T., Jeltsch, M., Petrova, T.V., Kubo, H., Thurston, G., McDonald, D.M., Achen, M.G., Stacker, S.A. und Alitalo, K. (2001). Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 20(6): 1223-1231.

- Velikyan, I., Maecke, H. und Langstrom, B. (2008). Convenient preparation of  $^{68}\text{Ga}$ -based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. *Bioconjug Chem.* 19(2): 569-573.
- Vera, D.R., Eigner, S., Henke, K.E., Lebeda, O., Melichar, F. und Beran, M. (2012). Preparation and preclinical evaluation of  $^{177}\text{Lu}$ -nimotuzumab targeting epidermal growth factor receptor overexpressing tumors. *Nucl Med Biol.* 39(1): 3-13.
- Verrey, F. (2003). System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch.* 445(5): 529-533.
- Viti, F., Tarli, L., Giovannoni, L., Zardi, L. und Neri, D. (1999). Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res.* 59(2): 347-352.
- Vogt, M. und Skerra, A. (2004). Construction of an artificial receptor protein ("Anticalin") based on the human apolipoprotein D. *ChemBioChem.* 5(2): 191-199.
- Waarde, A. van, Cobben, D.C., Suurmeijer, A.J., Maas, B., Vaalburg, W., Vries, E.F.d., Jager, P.L., Hoekstra, H.J. und Elsinga, P.H. (2004). Selectivity of  $^{18}\text{F}$ -FLT and  $^{18}\text{F}$ -FDG for differentiating tumor from inflammation in a rodent model. *J Nucl Med.* 45(4): 695-700.
- Wang, H., Gao, H., Guo, N., Niu, G., Ma, Y., Kiesewetter, D.O. und Chen, X. (2012). Site-Specific Labeling of scVEGF with Fluorine-18 for Positron Emission Tomography Imaging. *Theranostics.* 2(6): 607-617.
- Wang, L., Zhang, Z., Brock, A. und Schultz, P.G. (2003). Addition of the keto functional group to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(1): 56-61.
- Wang, L., Amphlett, G., Blattler, W.A., Lambert, J.M. und Zhang, W. (2005). Structural characterization of the maytansinoid-monoclonal antibody immunoconjugate, huN901-DM1, by mass spectrometry. *Protein Sci.* 14(9): 2436-2446.
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C. und Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature.* 468(7325): 829-833.
- Watering, F.C. van de, Rijpkema, M., Perk, L., Brinkmann, U., Oyen, W.J. und Boerman, O.C. (2014). Zirconium-89 labeled antibodies: a new tool for molecular imaging in cancer patients. *Biomed Res Int.* 2014: 203601.
- Weller, M., Bent, M. van den, Hopkins, K., Tonn, J.C., Stupp, R., Falini, A., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Frappaz, D., Henriksson, R., Balana, C., Chinot, O., Ram, Z., Reifenberger, G., Soffietti, R. und Wick, W. (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 15(9): e395-403.
- Wernicke, A.G., Edgar, M.A., Lavi, E., Liu, H., Salerno, P., Bander, N.H. und Gutin, P.H. (2011). Prostate-specific membrane antigen as a potential novel vascular target for treatment of glioblastoma multiforme. *Arch Pathol Lab Med.* 135(11): 1486-1489.
- Wiegardt, K., Bossek, U., Chaudhuri, P., Herrmann, W., Menke, B.C. und Weiss, J. (1982). 1,4,7-Triazacyclononane-*N,N,N'*-triacetate (TCTA), a new hexadentate ligand for divalent and trivalent metal ions. Crystal structures of  $[\text{Cr}^{\text{III}}(\text{TCTA})]$ ,  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TCTA})]$ , and  $\text{Na}[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{TCTA})] \cdot 2\text{NaBr} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . *Inorg Chem.* 21(12): 4308-4314.



- Wittrup, K.D., Thurber, G.M., Schmidt, M.M. und Rhoden, J.J. (2012). Practical theoretic guidance for the design of tumor-targeting agents. *Methods Enzymol.* 503: 255-268.
- Wolfstein, R.S., Tanasescu, D., Sakimura, I.T., Waxman, A.D. und Siemsen, J.K. (1974). Brain imaging with  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA: a clinical comparison of early and delayed studies. *J Nucl Med.* 15(12): 1135-1137.
- Wu, C.X., Lin, G.S., Lin, Z.X., Zhang, J.D., Chen, L., Liu, S.Y., Tang, W.L., Qiu, X.X. und Zhou, C.F. (2015). Peritumoral edema on magnetic resonance imaging predicts a poor clinical outcome in malignant glioma. *Oncol Lett.* 10(5): 2769-2776.
- Wyss, M.T., Spaeth, N., Biollaz, G., Pahnke, J., Alessi, P., Trachsel, E., Treyer, V., Weber, B., Neri, D. und Buck, A. (2007). Uptake of  $^{18}\text{F}$ -Fluorocholine,  $^{18}\text{F}$ -FET, and  $^{18}\text{F}$ -FDG in C6 gliomas and correlation with  $^{131}\text{I}$ -SIP(L19), a marker of angiogenesis. *J Nucl Med.* 48(4): 608-614.
- Xu, J. und Mosher, D. (2011). Fibronectin and other adhesive glycoproteins. In: Mecham P.R. (Hrsg). *The Extracellular Matrix: an Overview.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 41-75.
- Yamamoto, Y., Ono, Y., Aga, F., Kawai, N., Kudomi, N. und Nishiyama, Y. (2012). Correlation of  $^{18}\text{F}$ -FLT uptake with tumor grade and Ki-67 immunohistochemistry in patients with newly diagnosed and recurrent gliomas. *J Nucl Med.* 53(12): 1911-1915.
- Yao, Y., Kubota, T., Takeuchi, H. und Sato, K. (2005). Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology.* 25(3): 201-206.
- Youland, R.S., Kitange, G.J., Peterson, T.E., Pafundi, D.H., Ramiscal, J.A., Pokorny, J.L., Giannini, C., Laack, N.N., Parney, I.F., Lowe, V.J., Brinkmann, D.H. und Sarkaria, J.N. (2013). The role of LAT1 in  $^{18}\text{F}$ -DOPA uptake in malignant gliomas. *J Neurooncol.* 111(1): 11-18.
- Zagzag, D., Friedlander, D.R., Miller, D.C., Dosik, J., Cangiarella, J., Kostianovsky, M., Cohen, H., Grumet, M. und Greco, M.A. (1995). Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. *Cancer Res.* 55(4): 907-914.
- Zehnder-Fjällman, A.H., Marty, C., Halin, C., Hohn, A., Schibli, R., Ballmer-Hofer, K. und Schwendener, R.A. (2007). Evaluation of anti-VEGFR-3 specific scFv antibodies as potential therapeutic and diagnostic tools for tumor lymph-angiogenesis. *Oncol Rep.* 18(4): 933-941.
- Zhou, Q., Stefano, J.E., Manning, C., Kyazike, J., Chen, B., Gianolio, D.A., Park, A., Busch, M., Bird, J., Zheng, X., Simonds-Mannes, H., Kim, J., Gregory, R.C., Miller, R.J., Brondyk, W.H., Dhal, P.K. und Pan, C.Q. (2014). Site-specific antibody-drug conjugation through glycoengineering. *Bioconj Chem.* 25(3): 510-520.
- Zhuang, G. und Ferrara, N. (2015). The VEGF receptor family. In: Wheeler L.D. und Yarden Y. (Hrsg). *Receptor tyrosine kinases: family and subfamilies.* Cham: Springer International Publishing. 821-841.

## Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. R. Glaß ebenso wie Herrn Prof. P. Bartenstein danke ich für die interessante Themenstellung, die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und viele hilfreiche Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. F. J. Gildehaus danke ich für die Schaffung eines kollegialen und konstruktiven Arbeitsklimas, die Einführung in radiochemische Arbeiten und den Freiraum zur Umsetzung eigener Ideen.

Herrn Dr. S. Lindner danke ich für zahlreiche konstruktive und richtungsweisende Diskussionen und Anregungen und für die gemeinsam mit Frau S. Neubaur gewährte Unterstützung bei chemischen Fragestellungen.

Herrn Prof. A. Skerra und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München danke ich für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Anticaline. Ein besonderer Dank gilt Frau A. Richter für die äußerst produktive und kollegiale Zusammenarbeit, einen fruchtbaren fachlichen Austausch und die Bereitstellung der Anticalin-Abbildungen für die vorliegende Arbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Radiopharmazie der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre. Hier geht ein besonderer Dank an Frau M. Pape, Herr M. Coporda und Frau Dr. S. Niedermoser für die Unterstützung während meiner Einarbeitungszeit und an Frau S. Haller und Frau L. Fiedler für die angenehme Bürogemeinschaft.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der präklinischen Forschung an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin danke ich für die Unterstützung bei tierexperimentellen Arbeiten und die Pflege der Versuchstiere. Besonders danke ich Frau Dr. J. Carlsen für die kompetente und richtungsweisende Einführung in die Arbeit mit Versuchstieren und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Frau R. Oos und Frau K. Borman-Giglmeier danke ich für die exzellente technische Assistenz bei der Vorbereitung und Durchführung der Tierexperimente. Frau Dr. R. Beck danke ich für die kritische Diskussion der erhaltenen Ergebnisse. Ein großes Dankeschön geht außerdem an Frau Dr. L. Günther für ihre Unterstützung und ihr jederzeit aufmunterndes Wesen.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Neurochirurgische Forschung der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik danke ich für die angenehme Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Frau Dr. V. Albrecht und Frau Dr. E. Gieser für die Unterstützung während der Anfangsphase und Herrn Dr. R. Kälin für die konstruktive Zusammenarbeit während der Endphase dieser Arbeit. Herrn Dr. R. Kälin danke ich besonders für die gemeinsam mit Herrn S. Gu

durchgeführten orthotopen Implantationen und die gemeinsam mit Frau S. Lange durchgeführten HE-Färbungen.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Physik der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, insbesondere Herrn Dr. G. Böning, Herrn Dr. A. Delker und Herrn Dr. C. Zach, danke ich für die Hilfestellung bei physikalischen Fragestellungen und ganz besonders für die Unterstützung bei der Vorbereitung der  $^{89}\text{Zr}$ -Messungen.

Frau A. Brunegraf und Frau U. Weckopp danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme der Szintigramme.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Birgit und Peter, Martin und Susanne und meinen Geschwistern Mirjam, Anne und Maximilian für ihren stetigen Zuspruch und den für mich immer spürbaren Rückhalt.

Von ganzem Herzen danke ich Patrick für die mir bedingungslos gewährte Unterstützung, den immerwährenden Rückhalt und ganz besonders für seinen grenzenlosen Optimismus.

## **Lebenslauf**





## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema "Biologische Evaluierung radioaktiv markierter Bindeproteine für die nuklearmedizinische Bildgebung der Glioblastom-Vaskulatur" selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

*München, 26.09.2017*

*Sarah Pfeiffer*

---

Ort, Datum

---

Unterschrift