

Site-specific labeling of nanobody-based radioimmunotracers on the road to pancreatic beta cell targeting

Radioimmunotracers are a promising class of companion diagnostics for precision medicine. They are composed of an antibody-based vehicle for specific targeting of a molecular marker of disease. This targeting agent is conjugated to a radiolabeled imaging probe that allows *in vivo* identification and visualization of the disease.

Beta cells are the insulin-producing cells in the pancreas that are responsible for maintenance of blood sugar levels. The loss of functional beta cells is a key hallmark of diabetes. However, the changes in beta cell mass during the onset and course of diabetes are not completely understood. The generation of proficient targeting agents can help in unraveling the disease and the development of new diagnostic and therapeutic strategies. Camelid single-domain antibody-fragments, also called nanobodies, have shown previously in other disease models to be a valuable option. Therefore nanobodies were raised against a novel beta cell biomarker and characterized *in vitro* and *in vivo* towards the selection of a lead compound.

In a parallel track the nanobody-based radioimmunotracer construct was optimized by the implementation of site-specific labeling technologies. These aim to functionalize the targeting agent with the imaging probe at a defined location to preserve the targeting capacity and facilitate the characterization and manufacturing of the final tracer product. We explored two conjugation strategies: (1) via the installation of an unpaired cysteine-tag, and (2) with a Sortase A-mediated chemoenzymatic approach. Both strategies resulted in single-conjugated tracers that were validated *in vitro* and *in vivo*.

Site-specifieke merking van nanobody-afgeleide radioimmunoprobeg gericht naar pancreas beta cellen

Radioimmunoprobeg behoren tot een veelbelovende klasse van diagnostica voor het gebruik in gepersonaliseerde geneeskunde. Ze bestaan uit een antilichaam-afgeleid vehikel dat gericht is naar een specifieke ziektemerker. Dit vehikel is gekoppeld aan een radioactieve contrastvloeistof die *in vivo* identificatie en visualisatie van de pathologie toelaat.

Beta cellen zijn de insuline-producerende cellen van de pancreas die verantwoordelijk zijn voor de controle van de bloedsuikerspiegel. Het verlies van functionele beta cellen is een hoofdkenmerk van suikerziekte. De veranderingen in het aantal beta cellen gedurende de initiatie en het verloop van diabetes zijn echter weinig doorgrond. De generatie van geschikte beta cel-gerichte probeg kan helpen om het ziekteproces beter te begrijpen en om nieuwe diagnostische en therapeutische strategieën te ontwikkelen. Kameel-afgeleide antilichaamfragmenten, ook nanobodies genoemd, hebben in andere ziektemodellen eerder reeds aangetoond om hiervoor geschikt te zijn. In deze studie werden nanobodies opgewekt tegen een nieuwe beta cel biomerker, biochemisch gekarakteriseerd en een geschikte kandidaat voorgedragen.

Gelijktijdig werd de merking van de nanobody-afgeleide radioimmunoprobe geoptimaliseerd door de implementatie van site-specifieke methodes. Deze hebben tot doel het vehikel op een gekozen locatie te koppelen ten einde de functionaliteit te behouden en de karakterisatie en vervaardiging van het finale product te vergemakkelijken. Twee conjugatiestrategieën werden uitgeprobeerd: (1) via de invoeging van een ongepaarde cysteine-tag, en (2) met een Sortase A-gemedieerde chemo-enzymatische methodologie. Beide strategieën resulteerden in homogene probeg die zowel *in vitro* als *in vivo* gevalideerd werden.