

Oligoprolin als molekulares Gerüst für multivalente, peptidische Tumor-Targeting Liganden

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Carsten Kroll

aus Frankfurt am Main (Deutschland)

Basel, 2013

Originaldokument gespeichert auf dem Dokumentenserver der Universität Basel
edoc.unibas.ch

Dieses Werk ist unter dem Vertrag „Creative Commons Namensnennung-Keine
kommerzielle Nutzung-Keine Bearbeitung 3.0 Schweiz“ (CC BY-NC-ND 3.0 CH) lizenziert.

Die vollständige Lizenz kann unter
creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/ch/
eingesehen werden.

**Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag von**

Prof. Dr. Helma Wennemers

Prof. Dr. Florian Seebeck

Basel, den 21. Februar 2012

Prof. Dr. Martin Spiess
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Helma Wennemers in der Zeit von Oktober 2007 bis Februar 2011 am Departement Chemie der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

C. Kroll, R. Mansi, F. Deininger, S. Dobitz, H. R. Maecke* and H. Wennemers*, "Hybride Bombesin Analogues: Combining an Agonist and an Antagonist in Defined Distances for Optimized Tumor Targeting" *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16793-16796.

Teile dieser Arbeit wurden an den folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

Poster: "Oligoprolines as Multivalent Scaffolds for Tumor Targeting Vectors"
45th Bürgenstock Conference (EUCHEM Conference on Stereochemistry), Brunnen, Mai 2010

Poster: "Oligoprolines as Multivalent Scaffolds for Tumor Targeting Vectors"
31st European Peptide Symposium, Kopenhagen (Dänemark), September 2010

Kurzvortrag: "Oligoprolines as Multivalent Scaffolds for Tumor Targeting Vectors"
5th Winter Conference of the European Society for Molecular Imaging – "Emerging Imaging Methods in Medicine", Les Houches (Frankreich), Januar 2011

Kurzvortrag: "Oligoprolines as Multivalent Scaffolds for Tumor Targeting Vectors"
10th German Peptide Symposium, Berlin, März 2011

Poster: "Oligoprolines as Multivalent Scaffolds for Tumor Targeting Vectors"
SCS Fall Meeting 2011, Lausanne, Sept. 2011

Kurzvortrag: „Oligoprolin-Scaffolds for the Combination of GRP-R Agonists and Antagonists“ 30th International Symposium „Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research“, Bad Hofgastein (Österreich), Januar 2012

Für meine Eltern

Kurzbeschreibung des Dissertationsprojekts

Peptidische, radiomarkierte Liganden für Rezeptoren die auf der Oberfläche von Tumorzellen überexprimiert sind, können für die Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen genutzt werden. Der Gastrin-Releasing Peptide-Rezeptor (GRP-R) ist insbesondere auf Brust- und Prostatakarzinomen überexprimiert und stellt daher ein interessantes Target dar. Der GRP-Rezeptor kann sowohl mit Agonisten wie auch mit Antagonisten gezielt zur Anreicherung von Radioaktivität im Tumor angesteuert werden. In dieser Arbeit stellen wir Hybridliganden vor, die die Vorteile von Agonisten (langsamere Auswaschung aus dem Tumor aufgrund von Internalisierung) mit den Vorteilen von Antagonisten (höhere Aufnahme in den Tumor, weil mehr Rezeptoren gebunden werden) in einem Moleküle kombinieren.

Dazu wurden Azidoprolin-haltige Oligoproline, die sich durch ihre Rigidität und leichte Funktionalisierbarkeit auszeichnen, als molekulare Gerüste genutzt. Es wurde eine modulare Synthesestrategie erarbeitet, die das Zusammensetzen verschiedener Peptidbausteine erlaubt. Die Bausteine wurden *via* "Click"-Reaktion aus einem funktionalisierten Prolintrimer und einem geschützten Agonisten oder Antagonisten für den GRP-Rezeptor zusammengesetzt. Über diese Strategie wurden zehn verschiedene mono-, bi- und heterobivalente Liganden zum gezielten Targeting von überexprimierten GRP-Rezeptoren auf Prostatakarzinomen untersucht.

Zellexperimente zeigten, dass die neuartigen Hybridpeptide deutlich besser internalisiert werden als zuvor bekannte Bombesinderivate. Zudem zeigten die Experimente, dass die Menge an internalisiertem Peptid von dem Abstand zwischen Agonist und Antagonist abhängt, und es einen optimalen Abstand von 20 Å zwischen den beiden Bindungselementen gibt. In Tierexperimenten mit tumortragenden Mäusen war die Aufnahme in den Tumor verglichen mit den Referenzen deutlich höher. Gleichzeitig gelang es durch das Hybridkonzept, die Auswaschung aus dem Tumor deutlich zu reduzieren. Für die hohe Aufnahme in die Tumorzelle wurde eine Hypothese entwickelt, die darauf beruht, dass die Distanz zwischen den beiden Bindungselementen dem Abstand der beiden möglichen Bindungsstellen des Rezeptors entspricht.

Abstract

Peptidic, radiolabelled ligands that bind to receptors overexpressed on tumor cells are attractive for molecular imaging and therapy. The gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) is overexpressed on prostate- and breast tumors and is therefore an interesting target. The GRP-R can be targeted both with agonist and antagonists to achieve an enrichment of radioligands in the tumor. Herein we present a novel approach towards multi- and heterovalent radiotracers for tumor targeting. We are especially interested in combining an agonist and an antagonist on a radiolabeled rigid scaffold in defined distances. Such hybrid ligands may combine the potency of antagonists (high uptake due to more binding sites) with the properties of agonists (slow washout due to internalization) and therefore lead to higher tumor uptake.

In our approach azido-functionalized oligoprolines are used as helical, conformationally well-defined scaffolds to display peptidic targeting vectors. As targeting vectors, bombesin agonists and antagonists with a high affinity towards gastrin releasing peptide receptors (GRP-R) are employed. Conjugation to the scaffold has been achieved via copper catalyzed "click chemistry". The modular synthesis of the molecules is performed on solid support. Additionally, a DOTA-chelator was introduced for labelling with different radiometals.

A series of molecules, differing in type and composition of the targeting vectors has been synthesized. *In vitro* studies with ^{177}Lu labelled ligands show excellent binding and high internalization of the novel hybride ligands. The experiments show, that the uptake depends on the distance between the two binding elements and that there is an optimal distance of 20 Å between the two recognition elements. PET images of mice with ^{68}Ga labelled ligands demonstrate the high and specific uptake in the tumor. Biodistribution experiments showed that tumor uptake of the best hybrid ligand is much higher compared to established monovalent controls, and washout is slower. A hypothesis is presented which might explain the high uptake of the best hybride ligand.

Danksagung

Mein erster und grösster Dank geht an Prof. Helma Wennemers für das spannende Thema und die engagierte Betreuung meiner Dissertation. Es hat viel Spass gemacht mit ihr zusammenzuarbeiten, ihre begeisternde Art und die wertvollen Ideen haben diese Arbeit um vieles bereichert und vorangebracht.

Prof. Helmut Mäcke gebührt ebenfalls großer Dank für seinen Beitrag zur Entwicklung des interessanten Themas. Ausserdem für die vielfältige Unterstützung meiner Arbeit mit seiner reichen Erfahrung.

Prof. Florian Seebeck möchte ich danken für die Übernahme des Korreferates.

Es war großartig, Teil des Arbeitskreises Wennemers gewesen zu sein! Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern möchte ich mich für die kollegiale und unterhaltsame Atmosphäre im Labor bedanken, es war eine tolle Zeit mit Euch, nicht nur während der Arbeit sondern auch darüber hinaus!

Dr. Rosalba Mansi führte mich in die Zelleexperimente ein, unterstützte mich bei der Auswertung der *in vitro* Ergebnisse und war immer eine grosse Hilfe. Dafür möchte ich mich bei ihr herzlich bedanken.

Yvonne Kiefer, Friederike Deininger, Eleni Gourni und Dr. Melpomeni Fani vom Universitätsklinikum Freiburg danke ich für die wertvolle Unterstützung bei den *in vivo* und *in vitro* Experimenten. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Wolfgang Weber bedanken, dass ich diese Evaluierungen im Institut für Nuklearmedizin (Freiburg i. Br.) durchführen konnte.

Stefanie Dobitz, Andreas Jodal und Martin Behe (ETH Zürich und PSI) danke ich ebenfalls ganz herzlich für ihren wichtigen Beitrag zu den Zelleexperimenten.

Das Team der Werkstatt am Departement Chemie hat sich mit ihrer freundlichen, unkomplizierten Art und stets kompetenten Hilfe ein großes Dankeschön verdient.

Danke auch an Brigitte Howald, sie war eine grosse Hilfe bei allen administrativen Dingen, die sie schnell und unkompliziert erledigte.

Bedanken möchte ich mich desweiteren bei der Universität Basel, dem Schweizerischen Nationalfond und der ETH Zürich für die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation.

Meiner Freundin Yvonne danke ich tausendfach, in erster Linie dafür, dass sie immer für mich da war und ist. Sie war eine große Hilfe bei der Durchsicht der vorliegenden Arbeit und hat auch sonst meine Arbeit kritisch-konstruktiv begleitet. Danke Dir!

Der letzte und wichtigste Dank geht an meine wunderbare Familie, die mich immer unterstützt hat und ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	4
1.1. Krebs	4
1.1.1. Krebs in der Bevölkerung – ein Blick in die Statistik	7
1.2. Peptid-Rezeptor Szintigraphie für spezifisches Tumor-Targeting	8
1.2.1. Radiotherapie	9
1.2.2. Diagnostik mit radiomarkierten Peptidhormonen	11
1.2.3. Aufbau peptidischer Radioliganden	12
1.3. Prostatakarzinome	13
1.3.1. Rezeptorexpression von Prostatakarzinomen	14
1.4. Der Gastrin-Releasing Peptide Rezeptor als molekulares Target	15
1.4.1. Radiomarkierte Liganden für das gezielte Targeting von GRP-R	17
1.5. G-Protein gekoppelte Rezeptoren und zwei Targeting Konzepte: Agonisten und Antagonisten	20
1.6. Multivalente Ligand - Rezeptor Interaktionen	22
1.6.1. Multivalente, peptidische Liganden für Tumor Targeting	24
1.7. Oligoprolin – eine funktionalisierbare Plattform in definierter Polyprolin-II Konformation	27
1.8. Die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition	30
2. Zielsetzung	31
3. Synthese der Liganden	33
3.1. Design der Bombesin-Oligoprolin Konjugate	33
3.2. Synthesestrategie	35
3.3. Ausgangsverbindungen für die Synthese der Oligoprolin- Bombesinkonjugate	36
3.3.1 Alkinylierte Bombesinderivate	36
3.3.2 Azidofunktionalisierte Oligoproline	37
3.3.3. Der Chelator für die Markierung mit einem Radionuklid	38

3.4. Synthese der alkinylierten, peptidischen Bindungselemente	39
3.4.1 Alkinylierte, geschützte Bombesinderivate	39
3.4.2 Synthesen weiterer alkinylierter Bombesinderivate	40
3.4.3 Synthese eines alkinylierten Octreotats	42
3.5 Synthese der trimeren Prolin Bausteine in Lösung	43
3.6 Kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloadditionen zum Aufbau der Oligoprolin-Bombesin Konjugate	45
3.6.1 Strategie A: "Click"-Reaktionen auf der festen Phase	45
3.6.2. Strategie B: "Click"-Reaktionen in Lösung	49
3.7. Verknüpfung der Bausteine auf der festen Phase	54
3.7.1. HPLC Aufreinigung und Charakterisierung der Liganden	57
3.8. Neue Syntheseroute für NODAGA(^tBu₃)	59
4. Biologische Evaluierung der Liganden	62
<hr/>	
4.1. Studien zur Internalisierung der Bombesin-Oligoprolinkonjugate	62
4.1.1. Internalisierungsexperimente mit agonistischen Liganden	64
4.1.2. Internalisierungsexperimente mit antagonistischen Liganden	65
4.1.3. Internalisierungsexperimente mit Hybridliganden	66
4.1.4. Hypothese zum Internalisierungsergebnis von Hybrid 2	69
4.2. Studien zur Externalisierung und Dissoziation	73
4.3. Bestimmung der Dissoziationskonstante und der Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen	73
4.4. Präklinische <i>in vivo</i> Experimente	78
4.4.1. PET/CT-Studien mit Hybridligand 2	80
4.4.2. Biodistributionsstudien mit Hybridligand 2	83
4.4.3. PET und Biodistribution von Hybrid 1	87
4.4.4. PET-Studien des divalenten Agonists 8	89
5. Zusammenfassung und Ausblick	90
<hr/>	

6. Experimenteller Teil	92
6.1. Geräte und Materialien	92
6.2. Synthese der geschützten Bombesin-Peptidsequenzen	93
6.2.1. Generelle Protokolle zur Festphasensynthese von geschützten, alkinylierten Bombesinderivaten	93
6.2.2. Synthese von alkinylierten Bombesinderivaten	97
6.3. Synthese geschützter Peptide auf Chlortritylchlorid-Harz	100
6.3.1. Generelle Protokolle zur Peptidsynthese auf 2-Chlortritylchlorid-Harz	100
6.4. Peptidsynthesen in Lösung	104
6.4.1. Synthese des Fmoc-Pro-(4 <i>S</i>)Azp-Pro-OH 13	104
6.4.2. Synthese des Fmoc-(Pro) ₃ -OH Bausteins 16	112
6.5. Kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloadditionen ("Click")	116
6.5.1. "Click"-Reaktionen in Lösung	116
6.5.2. "Click"-Reaktionen an der festen Phase	119
6.6. Festphasensynthese der Oligoprolin-Bombesinkonjugate 1-10	120
6.7. Synthese von TBTA	133
6.8. Synthese von NODAGA(^tBu₃)	135
6.9. <i>in vitro</i> Experimente mit kultivierten Tumorzellen	143
6.9.1. Internalisierungsexperiment	144
6.9.2. Sättigungsexperiment zur Bestimmung der Dissoziationskonstante	147
6.9.3. Externalisierung	148
6.10. <i>in vivo</i> Experimente mit Tumor-tragenden Mäusen	149
6.10.1. PET	150
6.10.2. Biodistribution	150
7. Anhang	151
7.1. Referenzen	151
7.2. Abkürzungen	161
7.3. CD-spektroskopische Analyse von Bombesin-konjugierten Oligoprolinen in Gegenwart von Phospholipid-Vesikeln	163
7.4. Detaillierte Biodistributionsdaten von Hybridligand 2	167

I. Einleitung

1.1. Krebs

Jede einzelne Zelle im menschlichen Körper ist Träger des kompletten Erbguts und besitzt damit viel mehr Information als sie jemals brauchen wird. Zellen haben damit die Fähigkeit, sich weiter zu entwickeln und sich an der Gewebeneubildung zu beteiligen, auch wenn der eigentliche Entwicklungsprozess des Organismus lange abgeschlossen ist. Diese Fähigkeit wird im fortschreitenden Leben nur noch für die Wundheilung und den Austausch alter Zellen benötigt. Die dafür notwendige Autonomie und Vielseitigkeit bietet aber auch Risiken, wenn eine Zelle Zugriff auf Erbinformationen bekommt, die normalerweise inaktiv sind, oder Erbgut durch Mutationen verändert wird. In der Folge können sich Eigenschaften wie abnormales Wachstum und Widerstandsfähigkeit entwickeln, die der Zelle erlauben aus ihrer eigentlich vorgesehenen Rolle auszubrechen, und sich nicht mehr an die Regeln zu halten. So wird aus einer gesunden, gutartigen Zelle eine bösartige Zelle, die der Ausgangspunkt für einen Tumor, also eine Krebserkrankung, sein kann. Der Überbegriff „Krebs“ umfasst mehr als einhundert bösartige Erkrankungen, die sich wiederum alle mit unterschiedlichen Tumoreigenschaften zeigen können.^[1]

Hält man normale, gesunde Zellen in Kultur, unterscheiden sie sich auf den ersten Blick nur geringfügig von einer Krebszelle. Die Wachstums- und Teilungsraten sind solange ähnlich, wie die Zellen Platz zum Wachsen haben und genügend Wachstumsfaktoren vorhanden sind. Erst wenn der Boden der Petrischale komplett mit Zellen bedeckt ist, zeigt sich der Unterschied signifikant: Normale Zellen stellen ihr Wachstum ein, Krebszellen dagegen wachsen unkontrolliert weiter, es bilden sich Zellhaufen. Welche Faktoren beeinflussen die Teilung und das Wachstum und sind verantwortlich für diesen fatalen Unterschied?^[2]

Nach mittlerweile einem Vierteljahrhundert hat die Krebsforschung grosse Fortschritte zu verzeichnen und dafür gesorgt, dass enormes Wissen über die Ursachen und die Behandlung der Krankheit vorhanden ist. In ihrem einschlägigem Aufsatz “The

Hallmarks of Cancer^[3] beschreiben Hanahan und Weinberg sechs zugrunde liegende Prinzipien die zur Tumorbildung führen. Die Autoren geben zu bedenken, dass sich eine kleine Zahl molekularer, biochemischer und zellulärer Merkmale herauskristallisiert hat, die bei den meisten oder sogar bei allen menschlichen Krebsarten vorliegen. Diese Vereinfachung erscheint plausibel, wenn man bedenkt, dass letztendlich alle Zellen die gleiche molekulare Maschinerie besitzen, die für Proliferation, Differenzierung und auch für den Zelltod verantwortlich sind. In einem zweiten, erst kürzlich erschienenen Review, definieren die Autoren ein siebtes und achttes Merkmal und erweitern das Konzept damit zusätzlich um zwei Charakteristika, die förderlich sind für die Tumorentstehung (Abb. 1).^[4]

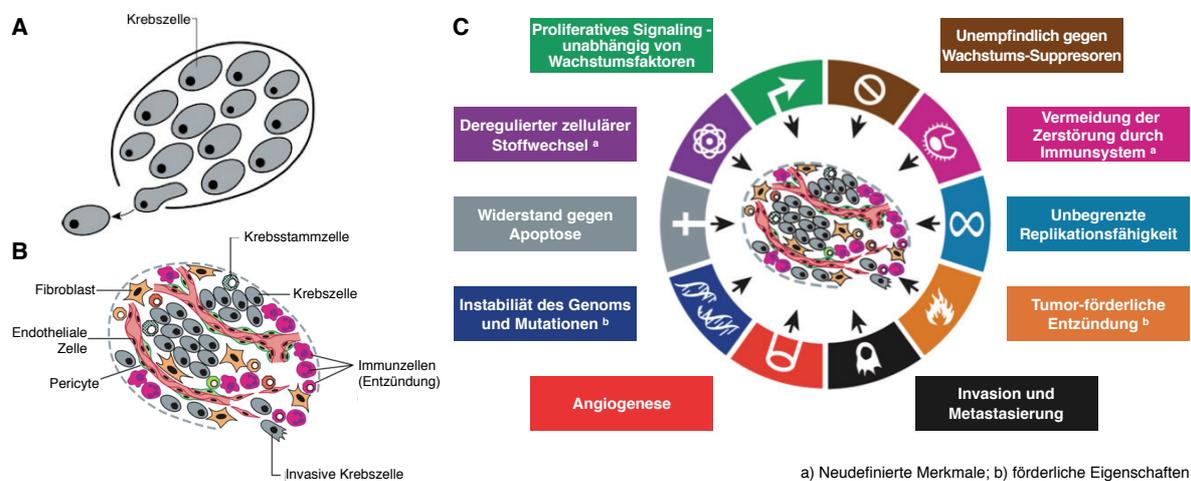


Abbildung 1. **A** Ein Tumor aus einer klassischen, reduktionistischen Sichtweise bestehend nur aus Krebszellen (überholt); **B** Ein Tumor als komplexes, heterogenes Gewebe mit einem Mikroumfeld aus kooperierenden gesunden Zellen; **C** Die notwendigen Merkmale und Charakteristika nach Hanahan und Weinberg, die ein Tumor entwickelt und benötigt. Alle drei Grafiken übernommen und angepasst aus ^{[3][4]}

Die einzelnen Krebstypen und Subtypen können auf verschiedene Art und Weise diese Merkmale entwickeln, das gilt für den Mechanismus, wie auch für die Reihenfolge, in der die Entartungen stattfinden. Zusätzlich können einzelne genetische Veränderungen auch zur Folge haben, dass zwei Voraussetzungen simultan eintreten. Dabei ist der Verlust des p53 Tumor Suppressor Proteins sicher das bekannteste Beispiel. Hierdurch wird die Zelle resistent gegenüber Apoptose und kann gleichzeitig die Möglichkeit erhalten, die Bildung neuer Blutgefäße anzuregen.^[5-8] Krebszellen haben verschiedenste Wege gefunden, um p53 zu inaktivieren, unter anderem Veränderungen im p53 codierenden Gen^[9]. Daneben kann es aber auch sein, dass mehrere genetische Modifikationen

benötigt werden, um eine der genannten Fähigkeiten zu entwickeln. Für all diese neuartigen Fähigkeiten, die dafür sorgen, dass eine Zelle bösartig wird, musste ein Schutzmechanismus überwunden werden, der die Zelle vor Krebs hätte bewahren sollen. Da ein Tumor erst wachsen kann, wenn alle genannten Veränderungen eingetreten sind, also vielfältige Schutzmechanismen versagt haben, ist das Auftreten von Krebs glücklicherweise während einer Lebenszeit doch recht selten. Diese Aussage wird eher verständlich, wenn man sich bewusst macht, dass Krebs einen monoklonalen Ursprung hat und im Gegensatz zu anderen Krankheiten bereits von einer einzigen, unkontrolliert wachsenden Zelle ausgehen kann (Abb. 2). Daher ist es doch irgendwie bemerkenswert, dass diese Krankheit nur etwa ein Drittel der Menschen trifft, da in unserem Körper, der aus immerhin drei Billionen Zellen besteht, von denen sich jeden Tag Milliarden teilen, nahezu jede dieser Zellen potentiell bösartig werden könnte.

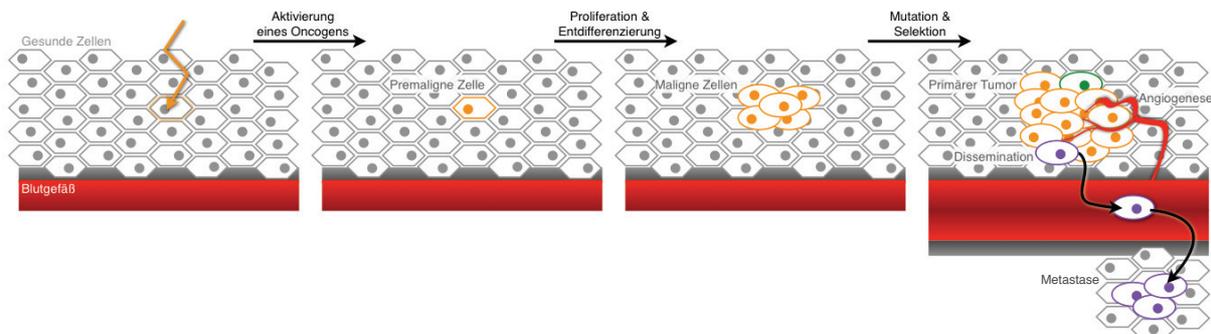


Abbildung 2. Entstehung eines Tumors und verschiedene Stadien der Krankheit (vereinfacht)

Die meisten Tumore sind *Karzinome* und haben ihren Ursprung in epitheliale Gewebe, sie zeichnen sich für 80 % der von Krebs verursachten Todesfälle verantwortlich. Epithelzellen haben im Organismus eine strukturgebende Funktion und weisen eine sehr hohe Teilungsrate auf. Viel epitheliales Gewebe beinhaltet Zellen, die verschiedene Substanzen in die Kanäle und Hohlräume absondern, die sie auskleiden. Tumore die diesen Zellen entspringen werden *Adenokarzinoma* genannt – das Prostatakarzinom ist ein Beispiel hierfür.

Andere Tumortypen sind *Sarkome*, die ihren Ursprung in mesenchyalem, also verbindendem Gewebe haben, hämatologische Zellen können zu Lymphomen mutieren und zu Leukämie führen. Aus neuroectodermalen Zellen können Gliome, Glioblastome und andere Tumore des Nervensystems entstehen. Sind die Zellen so entdifferenziert, dass die ursprüngliche Herkunft nicht bestimmt werden kann, spricht man von anaplastischen Tumoren.

1.1.1. Krebs in der Bevölkerung – ein Blick in die Statistik

Nach Herz- und Kreislauferkrankungen (ca. 41 %) sind Krebserkrankungen (25 %) die zweithäufigste Todesursache in westlichen Ländern wie Deutschland^[10] und der Schweiz.^[11] Die Ursachen, die zu den im vorherigen Kapitel beschriebenen bösartigen Veränderungen führen können, sind vielfältig, nennenswert ist insbesondere Tabakkonsum als Grund für vermutlich neun von zehn Lungenkrebskrankungen bei Männern (6/10 bei Frauen) und als entscheidender Risikofaktor weiterer Krebserkrankungen in Mund und Rachen, in der Speiseröhre und am Kehlkopf. Ungesunde Ernährung und mangelnde Bewegung kann statistisch das Risiko erhöhen an Darmkrebs zu erkranken, virale Infektionen sind der Hauptverursacher von Gebärmutterhalskrebs, Blasen- und Nierenkrebs kann häufig auf eine lange zurückliegende, berufliche Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen zurückgeführt werden. Zu viel Sonnenstrahlung kann ein malignes Melanom bewirken und ionisierende Strahlung vergrößert die Gefahr, an Leukämie und Schilddrüsenkrebs zu erkranken.

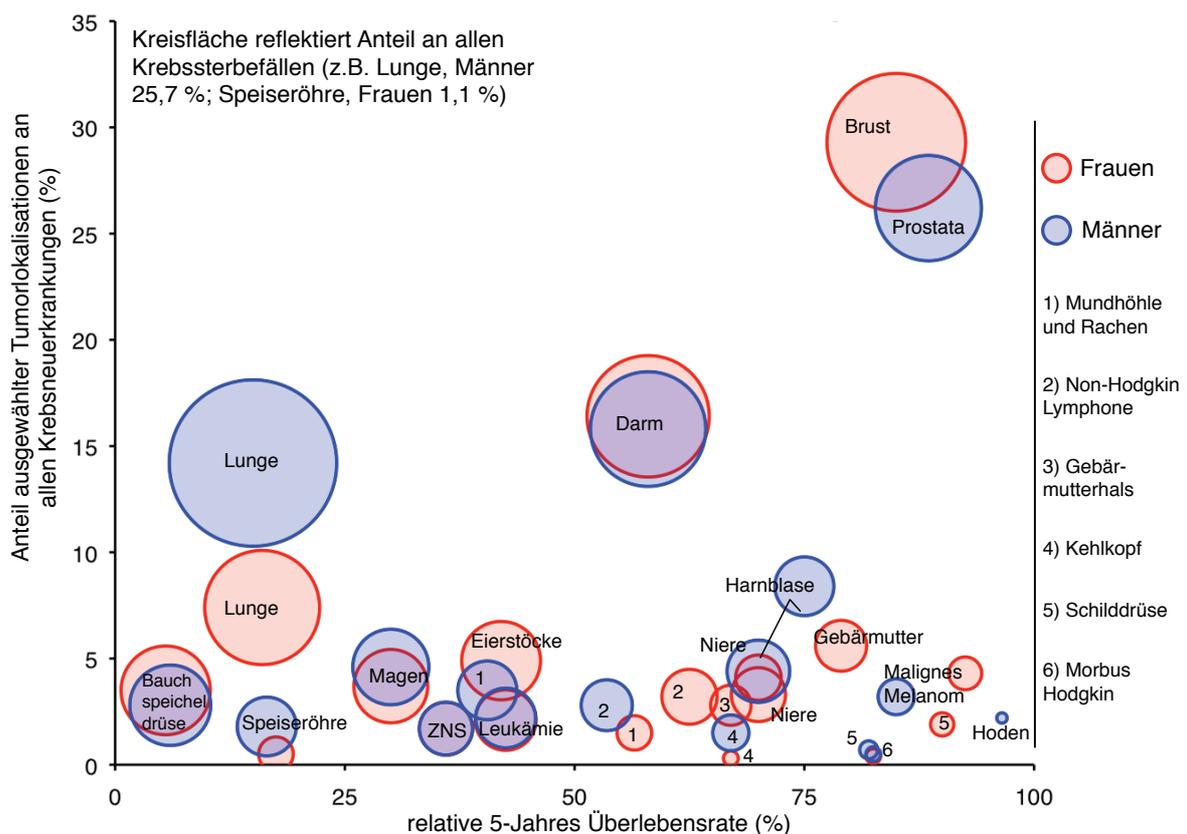


Abbildung 3. Tumorrhäufigkeit und Überlebensrate, Zahlen für Deutschland im Jahre 2006^[12]

Die zunehmend höhere Lebenserwartung trägt auch zu den hohen Neuerkrankungsraten bei, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren.

Genauso vielfältig sind die Folgen, die eine Krebserkrankung nach sich zieht. Früh erkannt bestehen sehr gute Heilungschancen, die sich in einer hohen 5-Jahres Überlebensrate widerspiegeln, wie zum Beispiel im Falle eines Prostatakarzinoms. Es gibt gesetzliche Früherkennungsprogramme für Prostatakrebs, die sich in der Statistik in Form von mehr Neuerkrankungen (Anstieg seit 1980 um 200%) niederschlagen. Die Zahl der Sterbefälle hat in Folge der demographischen Entwicklung, der Zunahme älterer Männer in der Bevölkerung, seit 1980 zwar um 30 % zugenommen, die alterstandardisierte Sterberate ist aber um 20 % gefallen. Wie entscheidend eine frühe Erkennung ist, zeigt sich im Falle des Bauchspeicheldrüsenkrebses. Obwohl er nur einen Anteil von etwa 3 Prozent an den jährlichen Neuerkrankungen hat, ist das Pankreaskarzinom die vierthäufigste Krebstodesursache (knapp 7 %) in Deutschland. Dies ist auf die schwierige Diagnostizierbarkeit zurückzuführen, die Frühsymptome sind selten und uncharakteristisch, das Karzinom wird typischerweise erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt, wenn keine Aussicht mehr auf Heilung besteht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist die niedrigste von allen, sie liegt bei 3-8 % (Abb. 3).^[12]

1.2. Peptid-Rezeptor Szintigraphie für spezifisches Tumor-Targeting

Zahlreiche Rezeptoren für regulatorische Peptide sind auf Tumorzellen überexprimiert. Dies ermöglicht die gezielte Anreicherung von radioaktiv-markierten Peptiden in Tumoren. Das Rezeptorexpressions-Profil ist für jede Tumorspezies unterschiedlich und nicht jeder Tumor überexprimiert Peptid-Rezeptoren.^[13] Ist jedoch eine deutliche Überexprimierung eines Rezeptors, verglichen zum gesunden Gewebe, vorhanden, können die entsprechenden Peptide als spezifische Transporter für diagnostische oder therapeutische Agenzien wie Chemotherapeutika^[14] und Nuklide^[15,16] genutzt werden. Die zu diesem Zweck am intensivsten studierten Rezeptoren sind die Somatostatin-Rezeptoren (5 Subtypen). Ihre Expressierung auf neuroendokrinen Tumoren wird therapeutisch und auch diagnostisch genutzt. Weitere Peptidhormone wie zum Beispiel Bombesin bzw. Gastrin-releasing Peptide (GRP), Neurotensin, Neuropeptid Y, Glucagon-like Peptid 1 (GLP), Substanz P, Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Cholecystokinin (CCK) binden an andere Rezeptoren, die auf der Oberfläche verschiedener Tumore übermäßig exprimiert sind und werden daher als potentielle Radiopharmazeutika untersucht.^[17] Ebenfalls zu nennen sind in diesem Zusammenhang

Peptide aus der Klasse der RGD's (Einbuchstabencode für das Tripeptid Arg-Gly-Asp) die an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine binden, die an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt sind und ebenfalls in Tumoren überexprimiert sind.^[18] Sie finden als Transporter von Nukliden zur Diagnostik Verwendung.^[19]

Die genannten Peptide binden mit Ausnahme der RGD's allesamt an membranständige G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Peptide, sofern sie Agonisten sind, aktivieren den Rezeptor durch ihre Bindung, werden gemeinsam mit diesem endocytotisch internalisiert und verbleiben in der Zelle. Zuletzt wurden jedoch auch Antagonisten untersucht und erfolgreich zur Rezeptor Szintigraphie eingesetzt. Antagonisten blockieren die Wirkung eines Agonisten am Rezeptor und werden nicht internalisiert.^[20] Es konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung keine notwendige Voraussetzung für ein effizientes Targeting ist. In den untersuchten Fällen fanden Antagonisten mehr Bindungsstellen im Vergleich zu Agonisten und daher konnte eine höhere Zahl an Liganden an die Zelloberfläche binden, und dort auch verbleiben.^[21-25]

1.2.1. Radiotherapie

Die Rezeptor Szintigraphie kann therapeutisch genutzt werden, wenn mit den peptidischen Liganden alpha- oder beta-Strahler an den Tumor befördert werden, die mit ihrer emittierten energiereichen Strahlung die Tumorzellen zerstören.^[26,27] Die Idee Krebs mit radioaktiven Strahlen heilen zu können ist nicht neu, bereits Marie Curie untersuchte, ob Radioaktivität Krebserkrankungen heilen könnte. Dafür wurden ihr im Jahre 1921 bei einem USA Besuch 1 Gramm Radium überreicht, um sie bei Ihren Anstrengungen Krebs zu heilen, zu unterstützen.^[28] Wie wir heute wissen, war sie von diesem Ziel noch weiter entfernt als wir es heute sind, auch weil sie damals das Nuklid in seiner Reinform ungezielt applizierte. Seit der Mitte des letzten Jahrhunderts ist Chemotherapie die vorherrschende Therapie für die Behandlung fortgeschrittener Krebserkrankungen, die damit verbundenen Nebenwirkungen sind dabei aber aufgrund der unspezifischen cytotoxischen Wirkungsweise häufig drastisch.^[29,30] Daher hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten ein Wandel vollzogen, hin zu spezifischen Therapeutika mit gesteigerter Wirksamkeit und geringeren Nebenwirkungen.^[31] Die Rezeptor Szintigraphie ist ein sehr erfolgversprechender Ansatz für die gezielte Zerstörung von Tumoren, wenn ein bestimmter Rezeptor überexprimiert ist und mit einem radioaktiv-

Jahre verlängern. Ernste Nebenwirkungen sind verglichen mit einer Chemotherapie selten, das am stärksten gefährdete Organ ist die Niere. [41-44]

Für Verbindungen wie DOTATOC, die sowohl als Therapeutikum wie auch als Diagnostikum eingesetzt werden können, hat sich der Begriff „Theranostics“ gebildet.[45] Die Entwicklung solcher kombinierten Ansätze passt in das Konzept der personalisierten Medizin.

1.2.2. Diagnostik mit radiomarkierten Peptidhormonen

Bildgebende, diagnostische Methoden werden in der Onkologie benötigt, um eine Krebserkrankung zu entdecken, das Stadium der Krankheit einzuordnen und das Ansprechen der Therapie zu überprüfen.[46] Grundsätzlich muss man zwei prinzipiell unterschiedliche Ansätze der Bildgebung unterscheiden: Verfahren zur Abbildung der Morphologie wie zum Beispiel Röntgen, Röntgen Computertomographie (CT), Kernspintomographie (MRI) und Ultraschall (US) sowie bildgebende Verfahren zur Abbildung der biochemischen Funktion und des Stoffwechsels wie die Positronen Emissions Tomographie (PET, Nuklide: ^{68}Ga , ^{64}Cu), die Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT, Nuklide: $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In) und teilweise auch MRI. Am stärksten sind die einzelnen Methoden, wenn sie kombiniert eingesetzt werden (PET/CT, SPECT/CT), so dass die funktionelle Bildgebung direkt in einen anatomischen Kontext gesetzt werden kann.[46-48] Der am häufigsten verwendete PET Ligand ist ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (FDG), mit dem ausgenutzt wird, dass der Glucose Transporter Glut1 auf vielen Tumorzellen aufgrund des erhöhten Stoffwechsels überexprimiert ist. [49,50] Peptidische Radioliganden sind insbesondere interessant für die Diagnostik von langsam wachsenden Tumoren wie NET oder Prostatakarzinomen, die keinen aussergewöhnlich hohen Stoffwechsel aufweisen, aber verschiedene Peptidhormon-Rezeptoren überexprimieren. Selbst kleinste Läsionen dieser Tumore, die in einer Computertomographie sich nicht vom umliegenden Gewebe abheben, können mit radiomarkierten Peptiden lokalisiert werden.[51]

Die mit einer PET oder SPECT Untersuchung verbundene Strahlungsdosis ist deutlich niedriger als bei der Peptidrezeptorradiotherapie. Daher sind die Anforderungen an die Bioverteilung, zum Beispiel hinsichtlich der Nierenaufnahme, weniger streng für diagnostisch eingesetzte Liganden. Eine Übersicht über Liganden, die in klinischen Studien an Patienten untersucht wurden, ist in Tabelle 2 gegeben. Ausser den intensiv genutzten Somatostatinderivaten stehen alle anderen radiomarkierten Peptide noch am

Beginn ihrer klinischen Untersuchung und wurden nur in einzelnen Studien an wenigen Patienten studiert.

Tabelle 2. Ausgewählte Patientenstudien mit verschiedenen radiomarkierten Peptiden für PET und SPECT^[52]. Für die Strukturen der untersuchten GRP-R Liganden siehe Abbildung 8. Soweit nicht anders vermerkt, sind die gelisteten Liganden Agonisten für den jeweiligen Rezeptor.

Target Rezeptor/Indikation	Radiopeptid	Status/Ergebnis
Somatostatin Rezeptor (SstR 2)		
Neuroendokrine Tumore	¹¹¹ In-DTPA-Octreotide	Zugelassen, klinischer Routineeinsatz
	⁶⁸ Ga-DOTATOC	Klinische Studien, > 10000 Pat./Jahr
	¹¹¹ In-DOTA-BASS (Antag.)	5 Pat., den Agonisten (s.o.) überlegen ^[53]
Gastrin-releasing Peptide Rezeptor (GRPR)		
Prostata/Brustkarzinom	^{99m} Tc-RP527	ca. 20 Pat., Aufnahme in 1/4 PC-Knochenmet., 12/15 Brustk.-Läsionen
Gastrointestinaler Stromatumor	⁶⁸ Ga-BZH3	17 Pat., Vergleich: 14/17 ¹⁸ F-FDG positiv nur 7/17 zeigen ⁶⁸ Ga-BZH3 Aufnahme
Prostatakarzinom	⁶⁴ Cu-CB-TE2A-AR06 (Antag.)	3/4 Pat. mit Aufnahme in den Tumor bessere Pharmakokinetik als Agonisten
	⁶⁸ Ga-AMBA	10 Pat. ^[54]
Glucagon-like Peptide-1 Rezeptor (GLP1R)		
Insulinomas	¹¹¹ In-[Lys ⁴⁰ (Ahx-DOTA)]-exendin-4	6 Pat., Sensitivität / Lokalisierbarkeit anderen Methoden überlegen ^[55]

1.2.3. Genereller Aufbau peptidischer Radioliganden

Abbildung 5 zeigt cartoonartig den Aufbau peptidischer Liganden zum spezifischen Transport eines Nuklids an eine Tumorzelle: Benötigt wird ein Peptid, dargestellt als Schlüssel, mit einer hohen Affinität gegenüber einem Rezeptor (Schloss), der auf Tumorzellen überexprimiert ist. Dieses Peptid, typischerweise ein Derivat von einem endogenen Peptidhormon, wird über einen Linker mit einem Chelator konjugiert. Der Linker dient einerseits als molekulare Verknüpfung und sollte eine hohe metabolische Stabilität aufweisen, andererseits beeinflusst er Eigenschaften wie Lipophilie und Ladung des gesamten Liganden. Desweiteren kann er als Spacer dienen, der eine gewissen Distanz zwischen dem pharmakophoren Peptid und dem Chelator schafft.

Der bifunktionelle Chelator dient zur Komplexbildung eines metallischen Nuklids, die meisten Chelatoren sind Polyaza-Makrozyklen mit Carbonsäuregruppen, die das Metallkation mehrzählig koordinieren. Eine hohe Komplexstabilität ist entscheidend,

um zu vermeiden, dass freies Radionuklid in den Organismus gelangt. Über eine funktionelle Gruppe wird der bifunktionelle Chelator mit dem Linker verbunden und damit mit dem Peptidvektor konjugiert. [56,57]

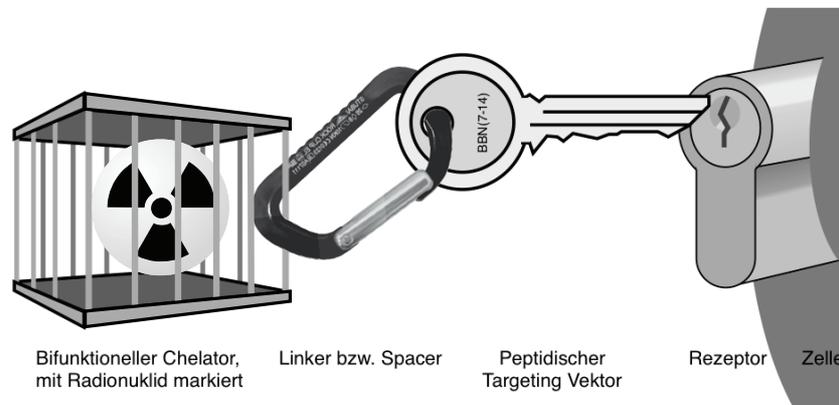


Abbildung 5: Genereller, schematischer Aufbau von Radiometall-konjugierten Peptiden zum Tumor Targeting

1.3. Prostatakarzinome

Mit einem Anteil von etwa 26% ist Prostatakrebs die häufigste Krebserkrankungen bei Männern, jedoch sind Prostatakarzinome nur für 10 % der Krebssterbefälle verantwortlich (Abb. 3). Die 5-Jahre Überlebensrate nähert sich immer mehr den 100 % und liegt derzeit bei 83-94 %. Die Überlebensrate ist hauptsächlich wegen der Vorverlagerung der Diagnose in den letzten Jahren immer größer geworden. Damit einher geht der Anstieg der diagnostizierten Neuerkrankungen um 200 % seit 1980 und das niedrigere, mittlere Erkrankungsalter von noch 69 Jahren (1980: 73 Jahre).^[12] Die flächendeckenden Prostatakrebs-Früherkennungsprogramme erlauben es zwar, durch frühzeitige Diagnosen rechtzeitig auf eine Erkrankung zu reagieren, doch werden auch sehr viele Überdiagnosen getroffen (30-50%), die dazu führen, dass Tumore behandelt werden, die klinisch nie relevant geworden wären.^[58] Autopsien haben gezeigt, dass zum Zeitpunkt des Todes 70% der Männer einen Tumor in der Prostata hatten, diese Läsionen meistens aber nur mikroskopisch und unbedeutend waren. Das liegt daran, dass die sehr häufig praktizierte Früherkennung durch Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Blut keine verlässliche Aussage über das Stadium der Erkrankung zulässt – Prostatakrebs entwickelt sich über einen Zeitraum von 20-30 Jahren.^[58] Die aufgrund eines "auffälligen" PSA-Werts durchgeführte Prostata Biopsie ist

ein unangenehmer Eingriff, dessen Aussagekraft erneut gering ist, da nur ein kleiner Teil des Prostatagewebes erfasst wird und das Stadium der Erkrankung unter Umständen immer noch nicht offenkundig wird. Daher ist es nach wie vor eine Herausforderung, die Patienten zu identifizieren, die tatsächlich eine Therapie brauchen, und unnötige Therapien durch Überdiagnosen zu vermeiden.

Noch in der Prostata lokalisierte, wenig entdifferenzierte Tumore sind die am häufigsten diagnostizierten – bereits entdifferenzierte und metastasierende Tumore sind eher selten zum Zeitpunkt der ersten Diagnose.^[58] Abhängig davon, ergeben sich verschiedene Therapiemöglichkeiten. Zunächst bietet es sich an, den Tumor einfach weiter zu beobachten (“active monitoring“). Dann kann der Tumor durch Bestrahlung zurückgedrängt werden oder die Prostata wird operativ ganz oder teilweise entfernt (“Prostatektomie“), was zu erheblichen Nebenwirkungen und Einschränkungen führen kann.^[59] Entscheidend für die Auswahl der Therapie ist das aus der Diagnose abgeleitete Krankheitsstadium und die damit verbundene Prognose. Für diese Planung der Behandlung werden belastbare Bildgebungsverfahren benötigt.^[60] Dabei hat sich der geläufigste PET-Tracer FDG in vielen Fällen als nicht sensitiv genug erwiesen, da Prostatakarzinome sehr langsam wachsen und keinen sonderlich erhöhten Stoffwechsel aufweisen.^[61] Eine weniger gebräuchliche, aber erfolgreichere Methode ist die PET Abbildung des erhöhten Fettsäurestoffwechsels in Prostatakarzinomen mittels ¹¹C-Acetat und ¹¹C-Choline.^[62]

Metastasen von weit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen bilden sich bevorzugt in Knochen,^[63] metastasierender Prostatakrebs stellt nach wie vor eine unheilbare Krankheit dar. ^{99m}Tc-markiertes Methylendiphosphonat ist das gebräuchlichste Diagnostikum für Knochenmetastasen, für PET kann zum Beispiel ¹⁸F-Fluorid verwendet werden.^[61]

Neben dem erhöhten Stoffwechsel kann auch die veränderte Rezeptorexpression von Prostatakarzinomen zur Diagnostik ausgenutzt werden.

1.3.1. Rezeptorexpression von Prostatakarzinomen

Das Gastrin-releasing Peptid (GRP) stimuliert das Wachstum von Androgen-unabhängigen Prostatakarzinom Zelllinien. Die Wirkung des GRP beruht dabei auf dem GRP-Rezeptor (GRP-R), der auf Prostatakarzinomen überexprimiert ist und daher zur Diagnose und potentiell auch für die gezielte Therapie von Prostatakarzinomen genutzt werden kann.

Die GRP-R Expression von gesundem und neoplastischen Prostatagewebe und von Prostatakarzinomen wurde von Reubi et al. untersucht.^[64] Dabei zeigte sich, dass normales Prostatagewebe keine GRP-R exprimieren. In hyperplastischen und neoplastischem Gewebe wurden teilweise erhöhte Rezeptordichten nachgewiesen. Die höchste Rezeptordichte wurde in präkanzeröser PIN (Prostatische intraepitheliale Neoplasie) und in invasiven Karzinomen gefunden, und zwar in allen Proben. Gerade die Überexprimierung von GRP-R in PIN, einem Vorläufer des eigentlichen Karzinoms, ist bemerkenswert, da es eine Diagnose bereits zu einem sehr frühen Stadium der Krankheit ermöglicht. Mit zunehmendem Fortschritt der Erkrankung und der damit verbundenen Dedifferenzierung der Tumorzellen, nimmt die Rezeptordichte wieder ab.

In den Tumoren mit der höchsten WHO-Einordnung (Grade 3) wurde im Rahmen der Studie die geringste Rezeptordichte gefunden. Diese Patienten wiesen auch keine erhöhten PSA-Level mehr auf, die bösartigen Wucherungen hatten ihre Prostata-spezifischen Eigenschaften im Verlauf der Tumorgenese verloren. Auch in Knochenmetastasen konnten GRP-R nachgewiesen werden, jedoch nur in 4 von 7 Patienten, in etwas geringerer durchschnittlicher Dichte als in den Karzinomen.

Als *in vitro* Modell für Prostatakarzinome dienen humane Adenokarzinom Zellen (PC-3), die stabil den GRP-R überexprimieren und *in vitro* in Kultur gehalten werden und für Zellexperimente verwendet werden können. In Nacktmäuse transplantiert, wachsen PC-3 Zellen zu Tumoren heran und können als Tiermodell von Prostatakarzinomen verwendet werden.

1.4. Der Gastrin-Releasing Peptide Rezeptor als molekulares Target

Der Gastrin-Releasing Peptide-Rezeptor gehört zur Bombesin-Rezeptor Familie, zu der ausserdem noch der Neuromedin B Rezeptor (NMBR) und der Bombesin Rezeptor Subtyp 3 (BRS3) gehören. Alle drei sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Der Name „Bombesin“ kommt von der Rotbauchunke (lat. *Bombina bombina*) aus deren Haut 1971 ein Tetradecapeptid isoliert wurde, das Bombesin (BBN) genannt wurde (Abb. 6 A).^[65] Erst danach wurden in Säugetieren die zwei verwandten Peptide Gastrin-releasing Peptide (Abb. 6 B) und Neuromedin B (NMB) entdeckt. GRP besteht aus 27 Aminosäuren und hat C-terminal die sieben

gleichen Aminosäuren wie Bombesin. Der Ligand für BRS3 ist unbekannt, der Rezeptor wurde aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der Familie zugeordnet.

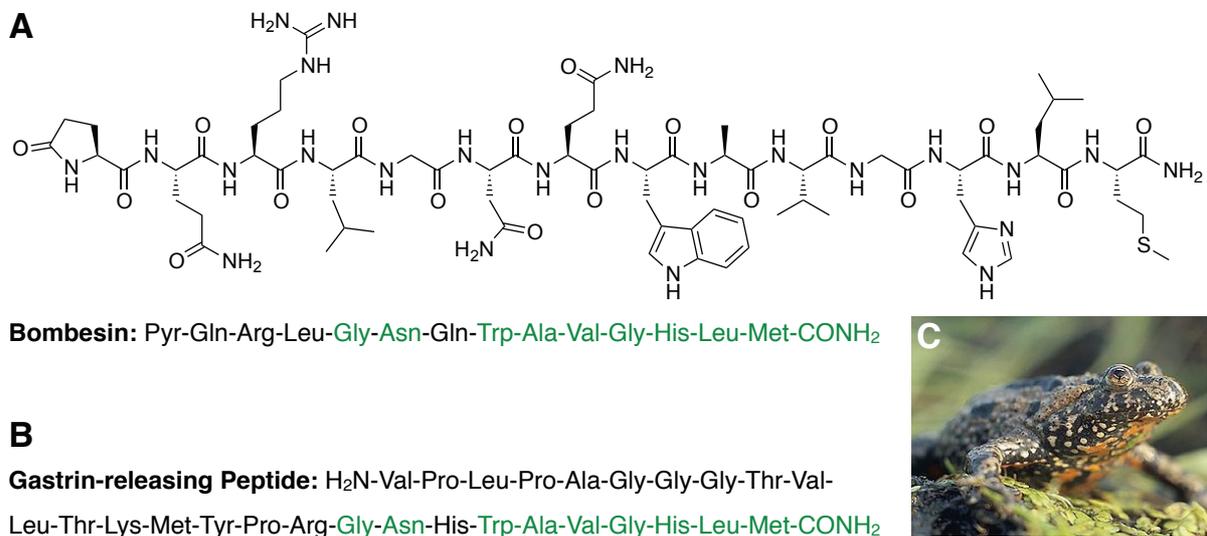


Abbildung 6. **A** Bombesin; **B** GRP, identische Aminosäuren von Bombesin und GRP sind in grün hervorgehoben; **C** Rotbauchunke *Bombina bombina*

Alle Bombesin Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPC-R). GRP findet sich hauptsächlich im zentralen Nervensystem (ZNS) und im Verdauungstrakt (Gastrointestinal, GI) und ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel an dem zirkadianem Rhythmus, dem Sättigungsgefühl, der Freisetzung verschiedener Hormone und der Sekretion von Verdauungssäften. Das Interesse an der Bombesin Rezeptor Familie ist gestiegen, seit man erkannt hat, dass die Rezeptoren auf verschiedenen Tumoren überexprimiert sind, und daher zur Lokalisation und für gezielte cytotoxische Angriffe auf den Tumor genutzt werden können.^[64] GRP hat einen pathophysiologischen Effekt auf die Differenzierung und das Wachstum verschiedenster Tumore und wirkt in manchen Fällen als autokriner Wachstumsfaktor.^[66] Damit verbunden ist die ausgeprägte Überexprimierung auf vielen Tumoren (Tabelle 3).^[67]

Tabelle 3. Übersicht über die GRP-R und NMB-R Überexprimierung auf verschiedenen Tumoren^{[67][68]}

Tumor	Überexprimierung	
	GRP-R	NMB-R
Kleinzelliger Lungenkrebs (SCLC)	85 – 100 %	55 %
Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC)	74 – 78 %	67 %
Bauchspeicheldrüsenkrebs	75 %	100 %
Prostatakarzinom	60 – 100 %	0 %
Gastrointestinaler Stromatumor (Sarkom)	84 %	5 %
Kopf-Hals Karzinom	100 %	
Glioblastom	85 %	
Neuroblastom	72 %	46 %
Brustkrebs	40 – 70 %	0 %

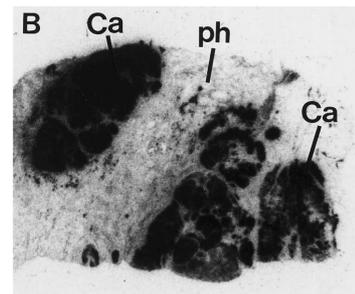


Abbildung 7. Autoradiogram eines Prostata - Gewebeschnitts mit ¹²⁵I-Tyr⁴-Bombesin. Das invasive Karzinom zeigt eine hohe GRP-R Dichte (Ca, schwarz), das umliegende hyperplastische Prostatagewebe (ph, übermäßige Zellbildung) weist keine GRP-R auf.^[64]

Die überexprimierten Rezeptoren in verschiedensten Tumoren sind aufgrund endogener Rezeptoren im Gastrointestinal-Trakt nicht in allen Fällen als effektives Target für die Peptidrezeptorzintigraphie nutzbar.^[69] Ausserdem sind die GRP-Rezeptoren nicht in jedem Tumor gleichermassen homogen verteilt, beispielsweise ist die Rezeptorendichte in Brusttumoren und Gastrointestinalen Stromatumoren teilweise sehr heterogen.^{[70][68]}

Prostatakarzinome, und ihre Vorläufer, neoplastische Transformationen, weisen eine sehr hohe, homogene Rezeptorendichte auf (Abb. 7). Die Knochenmetastasen fortgeschrittener Prostatakarzinome haben auch in etwa 60 % der Fällen eine hohe Rezeptorendichte, wogegen die Rezeptorendichte in normalem und hyperplastischem Prostatagewebe sehr niedrig bzw. auf einem nicht meßbaren Level ist.^[64] Aus diesem Grund stellt die GRP-R Überexprimierung in Prostatakarzinomen ein potentielles Target für die Peptidrezeptorzintigraphie mit radiomarkierten Bombesinderivaten dar – auch wegen der Distanz der Prostata zu rezeptorpositiven Organen wie zum Beispiel der Bauchspeicheldrüse.^[69]

1.4.1. Radiomarkierte Liganden für das gezielte Targeting von GRP-R

Die derzeit verfügbaren Daten über die Verwendung von Bombesinanaloga (Abb. 8) zur gezielten Diagnostik und Therapie von Prostatakarzinomen sind in erster Linie präklinisch, nur wenige Patientenstudien sind bisher realisiert und publiziert. Eine Auswahl der bekannten Studien zur diagnostischen Anwendung ist in Tabelle 2 aufgeführt.

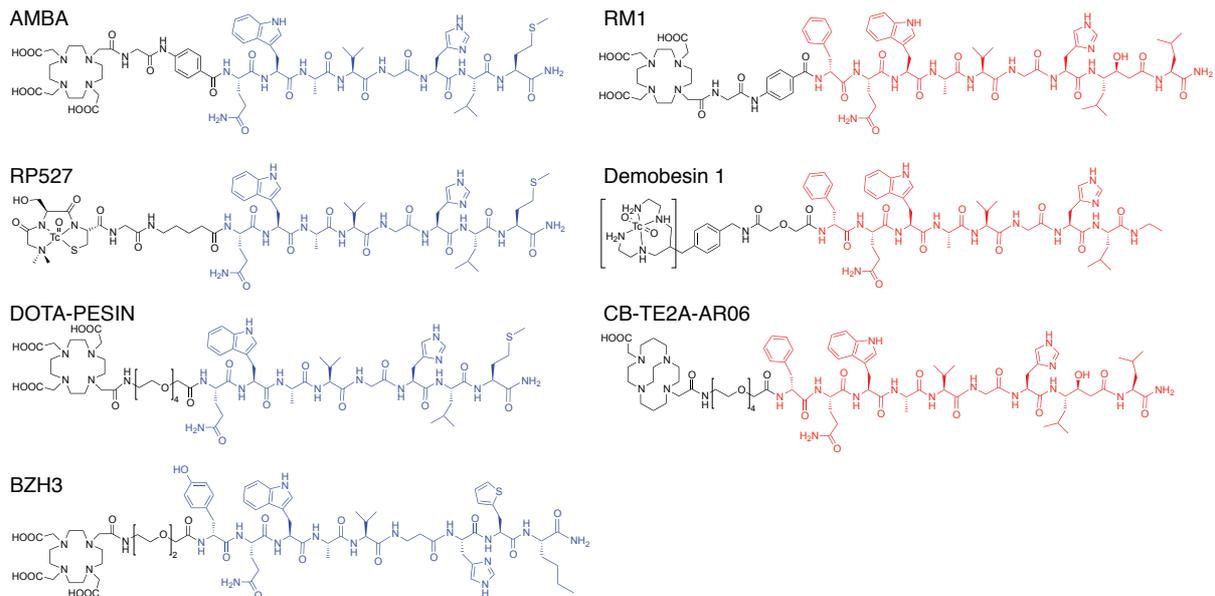


Abbildung 8. Ausgewählte Liganden für den GRP-R. AMBA, RP527 und DOTA-Pesin sind Agonisten, BZH3 hat Affinität zu allen drei Bombesin-Rezeptor-Subtypen ("Pan-Bombesin" Ligand). RM1, Demobesin 1 und AR06 sind Antagonisten. RP527 und Demobesin 1^[23] sind als Tc-Komplex gezeigt, die DOTA Chelatoren von AMBA, DOTA-Pesin, RM1 und BZH3 als Markierungsvorläufer ohne Metall. CB-TE2A ist ein spezieller Chelator für die Cu-Markierung.

¹⁷⁷Lu-AMBA, entwickelt von dem italienischen Pharmaunternehmen Bracco, ist das einzige radiomarkierte Bombesin-Derivat, dessen therapeutische Anwendung in Humanstudien bisher erforscht wurde. Sieben Patienten mit metastatischem Prostatakrebs wurden im Rahmen einer Phase I Studie mit ¹⁷⁷Lu-AMBA behandelt, bei fünf der sieben Patienten konnte Aktivitätsaufnahme in den Tumor gefunden werden. Die Nebenwirkungen (Krämpfe, Übelkeit, Diarrhoe) konzentrierten sich auf den Magen-Darm Trakt. Die Bauchspeicheldrüse, die hohe Aufnahme zeigte, war das Dosis-limitierende Organ. Der Fund deckt sich mit der Bioverteilung aus dem Tierexperiment (Tabelle 4). Drei Monate nach Ende der Behandlung zeigten alle Patienten Progression der Krankheit.^[71]

Tabelle 4. Biodistributionen der verschiedenen GRP-R Liganden im Tierexperiment. Die Strukturen sind in Abbildung 8 gezeigt. Demob. = Demobesin 1; AR06 = CB-TE2A-AR06

		Agonisten				Antagonisten		
		AMBA	AMBA	PESIN	BZH3	RM1	Demob.	AR06
Tumor	4h	1.9	3.7	8.8	5.3	13.5	2.2	24.0
% IA/g	24h	1.6	3.0	6.8	2.1	6.6	0.4	6.1
Nieren	4h	3.4	2.3	3.4	4.1	1.9	1.1	6.5
% IA/g	24h	1.3	1.3	2.8	1.8	1.0	0.1	1.9
Pankreas	4h	40.5	49.4	43.8	36.5	1.3	4.1	6.0
% IA/g	24h	32.9	47.1	37.5	20.8	0.15	0.1	0.1
Darm	4h	5.6	2.7	3.7	6.6	0.2	1.2	1.8
% IA/g	24h	3.2	1.8	-	2.6	0.04	0.1	0.14
Verhältnisse:								
Tumor zu...								
Nieren	4h	0.6	1.6	2.6	1.3	7.0	2.0	13.0
	24h	1.2	2.3	2.4	1.2	6.5	4.0	15.0
Pankreas	4h	0.05	0.07	0.2	0.14	10.4	0.5	4.0
	24h	0.05	0.06	0.2	0.10	44	4.0	61
Darm	4h	0.3	1.4	2.4	0.8	67.3	1.8	13.6
	24h	0.5	1.6	-	0.8	165	4.0	43.8
Blut	4h	-	74	81	43.8	336	-	133
	24h	-	147	211	140	658	-	205
Nuklid		¹¹¹ In	¹¹¹ In	⁶⁷ Ga	⁶⁷ Ga	¹¹¹ In	^{99m} Tc	⁶⁴ Cu
n _{Ligand} (pmol)		10 pmol	10 pmol	10 pmol	15 pmol	10 pmol	10 pmol	10 pmol
Xenograft		PC-3	PC-3	PC-3	AR42J	PC-3	PC-3	PC-3
Ref.		[72]	[22]	[73]	[74]	[22]	[72]	[75]

Der Vergleich der vier Agonisten mit den drei Antagonisten zeigt mehrere grundsätzliche Unterschiede in der Bioverteilung (Tab. 4). Die beiden auf der JMV594-Sequenz^[76] basierenden Antagonisten RM1 und AR06 zeigen die höchste Tumoraufnahme im Vergleich der sieben GRP-R. Der strukturell unterschiedliche Antagonist Demobesin 1 weist auch eine bessere Bioverteilung auf als die Agonisten, ist aber im Vergleich zu RM1 und AR06 unterlegen. Die Tumor : Organ-Verhältnisse der JMV594-Antagonisten sind überragend. Auffällig an den Agonisten ist insbesondere die exorbitant hohe Aufnahme in die Bauchspeicheldrüse, bei gleichzeitig niedriger Aufnahme in die Tumore. Einziger Vorteil der Agonisten ist die relativ gesehen geringere Auswaschung aus dem Tumor. Nach 24 h sind bei den Antagonisten RM1 und AR06 bereits 51 bzw. 75 % der bei 4h vorhandenen Aktivität ausgewaschen. Die Agonisten mit der Bombesin(7-14) Sequenz werden innerhalb der 24 h nur zu ca. 20 % ausgewaschen.

1.5. G-Protein gekoppelte Rezeptoren und zwei Targeting Konzepte: Agonisten und Antagonisten

Um 1900 wurde die Bedeutung von Kontrollmechanismen von Zellen und biologischen Prozessen erkannt. Emil Fischer benutzte als Erster die Schlüssel-Schloss Analogie für die Selektivität von biologischen Auswahlprozessen und schuf damit im Jahr 1894 ein Bild, das heute noch verwendet wird, um die Wechselwirkung zwischen einem Liganden und einem Rezeptor zu beschreiben.^[77] Paul Ehrlich, Entdecker des ersten chemisch-synthetischen Arzneimittels (Salvarsan) erkannte, dass „Chemorezeptoren“ therapeutisch genutzt werden können.^[78] Genau studiert und beschrieben wurden Rezeptoren dann von Alfred J. Clark, er formulierte die „Occupancy Theory“ und führte mathematische Modelle für Rezeptor Wechselwirkungen ein. Schon in den siebziger und achtziger Jahren gab es die ersten Hinweise, dass Rhodopsin (GPCR) aus einem Bündel von sieben transmembran-Domänen besteht, gewonnen aus CD und Sequenzierungsstudien.^[79,80] Erst in 2000 gelang der entscheidende Durchbruch, die erste dreidimensionale Röntgenkristall-Struktur von Rhodopsin wurde publiziert.^[81] Heutzutage wirken 30 % der zugelassenen Medikamente an GPC-R's, sie sind damit die wichtigste Targetklasse überhaupt.^[82]

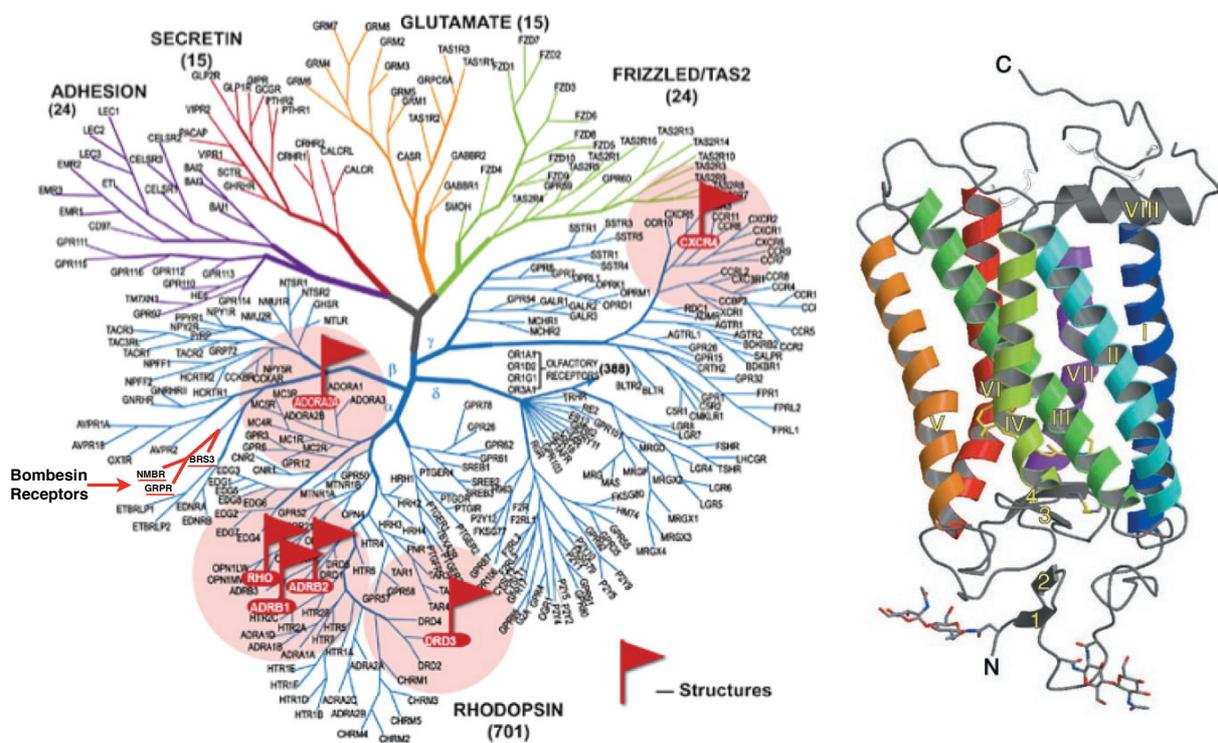


Abbildung 9. Stammbaum der GPCR – Grafik von <http://gpcr.scripps.edu/> (Dez. 2011, noch nicht alle aufgeklärten Strukturen markiert) und die erste Rhodopsin Struktur (Palczweski et al. Science 2000)

Es zeigte sich, dass die ersten Beschreibungen der GPC-R Struktur korrekt waren, und dass die Rhodopsin Struktur mit der anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verwandt ist. Nach und nach wurde ein Stammbaum anhand genetischer Merkmale der Rezeptoren erstellt und alle GPCR's in verschiedene Familien unterteilt (Abb. 9)^[83]. Mittlerweile (Februar 2012) sind die Strukturen von acht Rezeptoren röntgenkristallographisch gelöst,^[84,85] allesamt aus der Rhodopsin Familie. Computer Rechnungen erlauben die mehr oder weniger genaue Vorhersage der anderen Rezeptorstrukturen, deren Sequenzen bekannt sind, so auch die Struktur des Gastrin-Releasing Peptide Receptors (GRP-R).

GPC-R reagieren auf die Bindung eines Effektors (Agonist), indem sie eine Signalkaskade in Gang setzen, vermittelt durch cytosolisch gebundene, GTP-bindende Proteine (G-Proteine). Im Zuge dieses Prozesses wird der gesamte Rezeptor endocytotisch eingekapselt und mitsamt des Liganden in die Zelle internalisiert. Agonisten binden an die orthosterische Bindungsstelle des Rezeptors. Liganden, die den Rezeptor inhibieren (Antagonisten) konkurrieren entweder mit dem Agonisten um die orthosterische Bindungsstelle oder binden an eine andere Region des Rezeptors, was als allosterische Bindung bezeichnet wird. Allosterische Inhibitoren können im Gegensatz zu orthosterischen Inhibitoren nicht mit einem Überschuss an Agonist verdrängt werden.^[20] Agonisten binden nur an den Rezeptor in seiner aktiven Konformation, dafür muss in der cytosolischen Region des transmembranständigen Rezeptors das G-Protein an den Rezeptor gebunden sein. Zudem kann der Rezeptor in Konformationen vorliegen, die eine Bindung des Agonisten nicht zulassen. Die allosterische Bindungsstelle für Antagonisten ist demgegenüber unabhängig von der Konformation des Rezeptors. Dadurch ist die Population an Rezeptoren, die als potentielle Bindungspartner in Frage kommen, für Antagonisten grösser als für Agonisten.^[86]

Dementsprechend "sehen" agonistische Radioliganden unter Umständen nur einen Teil der Rezeptoren, nämlich den, der in einer aktiven Konformation vorliegt. Allosterische Antagonisten dagegen binden an mehr Rezeptoren. Experimentell werden auch entsprechend mehr potentielle Bindungsstellen für Antagonisten gefunden als für Agonisten (Abb. 10).^[25]

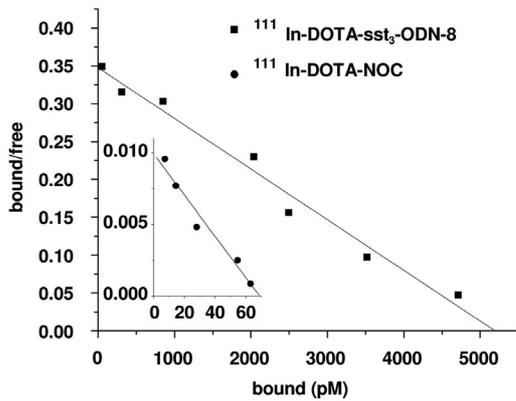


Abbildung 10. Der Scatchard Plot eines Bindungssättigungsexperiments mit Somatostatin - Rezeptor 3 exprimierenden HEK-Zellen zeigt eine deutlich höhere Nummer an Bindungsstellen (B_{max}) für den Antagonisten $^{111}\text{In-DOTA-sst}_3\text{-ODN-8}$ ($B_{\text{max}} = 354 \pm 14 \text{ pM}$) als für den Agonisten $^{111}\text{In-DOTA-NOC}$ ($B_{\text{max}} = 23 \pm 1.0 \text{ pM}$). Diagramm übernommen aus ^[21]

Die Kombination agonistischer und antagonistischer Bindungselemente, die damit gleichzeitig die orthosterische und die allosterische Bindungsstelle des Rezeptors binden können, werden Hybridliganden oder bitopische Liganden genannt. Die bekannten Beispiele zielen darauf, durch eine gleichzeitige Bindung der beiden Bindungsstellen eine höhere Affinität und Rezeptorsubtyp-Spezifität zu erreichen.^[87,88] Der Begriff Hybrid findet auch Verwendung für gezielte Chemotherapeutika, die ein cytotoxisches Agens mit einem Peptidhormon kombinieren (z.B. Octreotat, GRP), um das Chemotherapeutikum gezielt in Tumore zu transportieren.^[89]

1.6. Multivalente Ligand - Rezeptor Interaktionen

Ein wichtiges Beispiel für eine multivalente Interaktion ist die Bindung eines Antikörpers an Antigene. Antikörper sind Glykoproteine und setzen sich symmetrisch aus zwei gleichen Fragmenten zusammen. Antikörper bilden Oligomere aus bis zu fünf Untereinheiten und haben je nach Isotyp 2 bis 10 Bindungsstellen.^[20,90] Die hohe Affinität der Antikörper gegenüber dem entsprechenden Antigen beruht auf einer multivalenten Bindung. Die Bindungsstärke wird durch die Avidität reflektiert, die um Größenordnungen höher ist als die reine Summe der einzelnen Bindungen.^[90] Genau wie beim Chelat-Effekt beruht die gewonnene Bindungsenergie darauf, dass für die Bindung des ersten Liganden an den Antikörper der gleiche Entropieverlust zu zahlen ist wie bei einer monovalenten Interaktion – jede weitere Bindung eines Liganden verursacht in der Folge jedoch deutlich weniger Entropieverlust, was sich in der hohen Bindungsstärke niederschlägt.^[91] Besonders wenn die Liganden durch einen rigiden Linker verbunden sind, der die einzelnen Bindungselemente passend zu den

Bindungsstellen präsentiert, ist die Bindung entropisch verstärkt. Der Entropieaufwand entspricht dann dem Entropieaufwand einer monovalenten Wechselwirkung.^[91]

Ein klassisches, eindruckliches Beispiel für die multivalente Bindung eines synthetischen Liganden an einen synthetischen Rezeptor stammt von Whitesides.^[92] Drei an einen dendrimeren, aromatischen Kern gebundene Vancomycin, binden ein trimeres D-Alanin-D-Alanin Motiv mit einer Bindungskonstante (K_d) von $4 \cdot 10^{-17}$ M, also sub-femtomolar. Das Antibiotikum Vancomycin hemmt die bakterielle Zellwandsynthese durch eine nicht-kovalente Bindung an ein D-Ala-D-Ala-Motiv des Zellwandbestandteils Murein. Die monovalente Interaktion hat eine Bindungskonstante von etwa $1 \mu\text{M}$.^[93] Die Bindungsstärke des trivalenten Systems ist damit um 10 Größenordnungen höher als die monovalente Bindung und 25 mal höher als die Bindung zwischen Biotin und Avidin, welches eines der am stärksten gebundenen biologischen Paare ist.

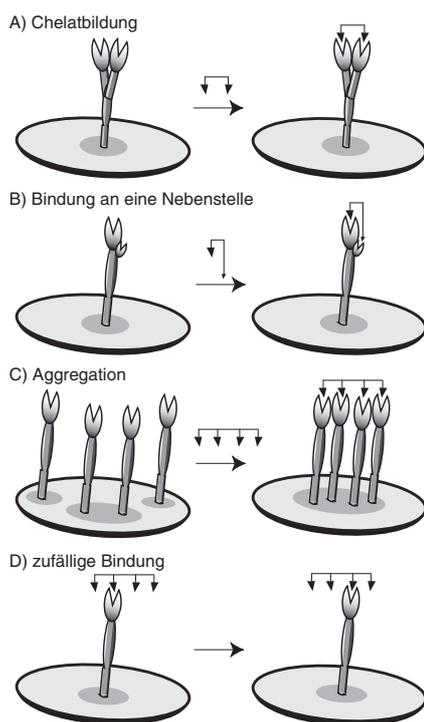


Abbildung 11. Mögliche Interaktionen zwischen Rezeptoren und multivalenten Liganden. Grafik aus ^[94]. Die Chelatbildung A ist das klassische Beispiel für eine multivalente Interaktion. Die Bindung an eine Nebenstelle ist ein Spezialfall, für Rezeptoren die eine zweite, allosterische Bindungsstelle haben. Die „zufällige Bindung“, in der englischen Originalpublikation als „Rebinding“ bezeichnet, beschreibt den Effekt, dass im Moment des Wegdissoziierens eines multivalenten Liganden der Rezeptor eine erhöhte lokale Konzentration an potentiellen Bindungspartnern sieht – „Rebinding“ ist wahrscheinlicher als für monovalente Liganden in der gleichen Situation.

Ausführliche Studien über multivalente Interaktionen und Faktoren, die diese beeinflussen wurden von Kiessling durchgeführt (Abb. 11). Ihre Studien zeigen, dass verschiedene Arten von Interaktionen je nach System und Architektur der Liganden möglich sind.^[94,95]

Dimerisierte, divalente Peptide als Liganden für den Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRP-R) und den α -Melanocyte-Stimulating Hormone Receptor (α -MSH) wurden auf

ihre Aktivität und Affinität hin untersucht und mit den monomeren Fragmenten verglichen.^[96] Dabei zeigte sich, dass die dimeren Peptide fünf bis sieben-mal tieferen EC₅₀ haben als die jeweiligen Monomere (Bombesin: 23.4 ± 5.6 nM vs. 110 ± 9 nM; α-MSH / α-MSH-R 51.8 ± 5.4 vs. 372 ± 18). Da die Dimere die doppelte Anzahl an potentiellen Liganden enthalten, war der multivalente Effekt (Avidität) in etwa zweifach. Die Autoren gehen davon aus, dass der geringe Effekt auf die niedrige Rezeptordichte zurückzuführen ist. Die Interpretation geht davon aus, dass das Design der Liganden es generell erlauben würde, zwei Rezeptoren gleichzeitig zu binden.

1.6.1. Multivalente, peptidische Liganden für Tumor Targeting

Zahlreiche multivalente Liganden wurden auch für die gezielte Ansteuerung von Tumoren ("Tumor targeting") hergestellt. Dazu gehören multivalente RGD Peptide (Kap. 1.6.1.1.), multivalente Somatostatin Liganden (Kap. 1.6.1.2.) und dimerisierte Bombesine (Kap. 1.6.1.3.). Zudem wurden auch einige heterovalente Liganden hergestellt aus zwei Bindungselementen für unterschiedliche Rezeptoren (Kap. 1.6.1.3.).

1.6.1.1. Multimerisierte cyclo-RGD für Integrin Targeting

Multimerisierte cyclische RGD's sind die am intensivsten untersuchten multivalenten Liganden im Feld der peptidischen Radiopharmazeutika.^[19,97] Neben aus Lysin oder Glutamat aufgebauten dendrimeren Strukturen, findet sich auch ein Beispiel, in dem ein Chelator als Gerüst verwendet wurde (Tabelle 5, A+B).^[98] Für multivalente RGD-Liganden nimmt die Affinität typischerweise in der Reihenfolge Monomer (IC₅₀ = 20nmol) – Dimer – Tetramer (IC₅₀ = 0.41 nmol) zu und auch die Aufnahme in den Tumor kann durch Multimerisierung deutlich erhöht werden.^[99,97] Jedoch zeigt sich auch, dass die unerwünschte Aufnahme des multivalenten Liganden in Organe ebenso ansteigt und sich daher die Tumor : Organ Verhältnisse in Tierexperimenten nicht verbesserten.
[100,101]

1.6.1.2. Multivalente Somatostatin Liganden

Ein tetramerisiertes Octreotat wurde ebenfalls zum Tumor Targeting eingesetzt (Tabelle 5, F), jedoch konnte hierfür keine Verbesserung der Affinität gegenüber der monomeren und dimeren Verbindung gezeigt werden.^[102] Die Aufnahme in den Tumor war niedriger für das Dimer als für das Monomer, auch wenn das Dimer langsamer

ausgewaschen wurde. Die Tumor : Organ Verhältnisse waren zu jedem Zeitpunkt besser für das Monomer.^[103]

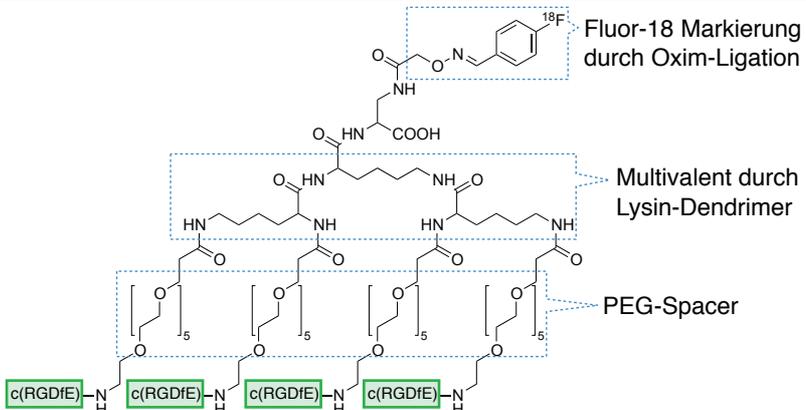
1.6.1.3. Bombesin

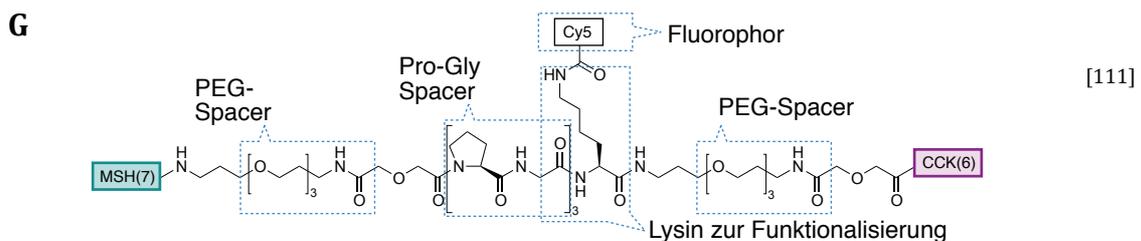
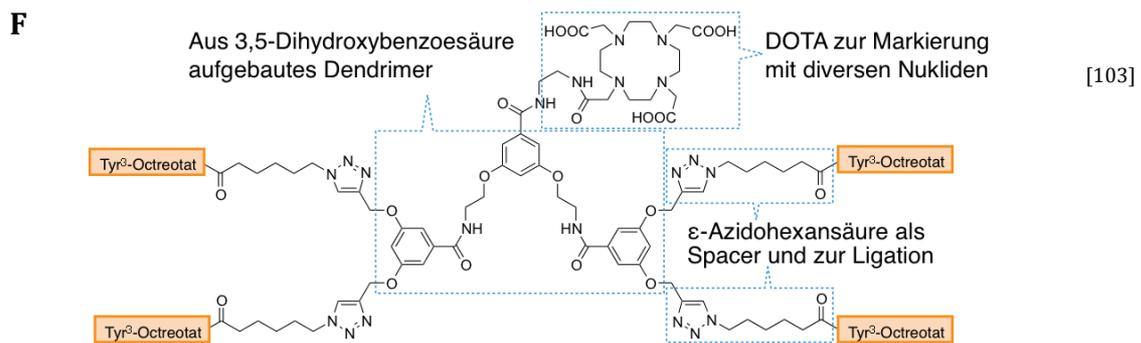
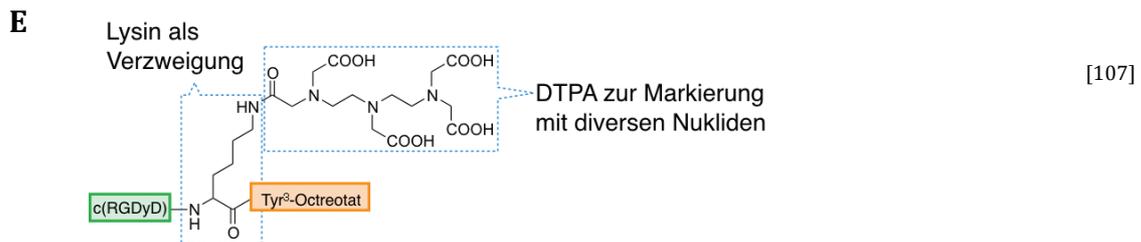
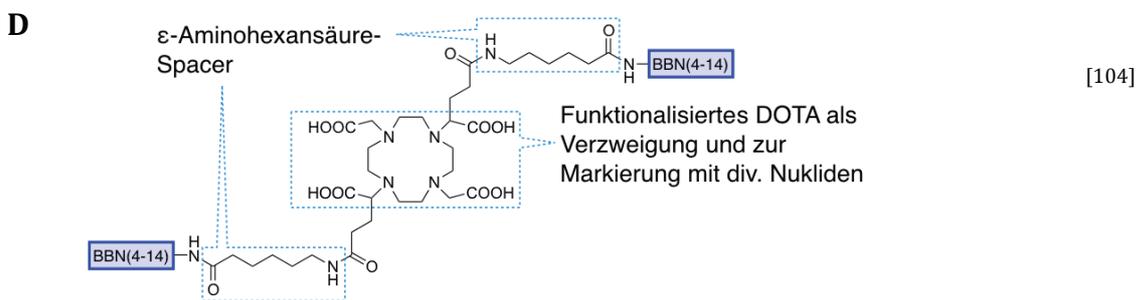
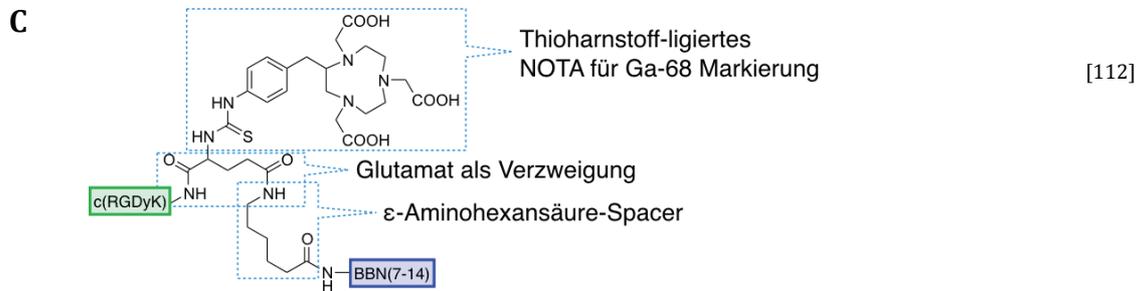
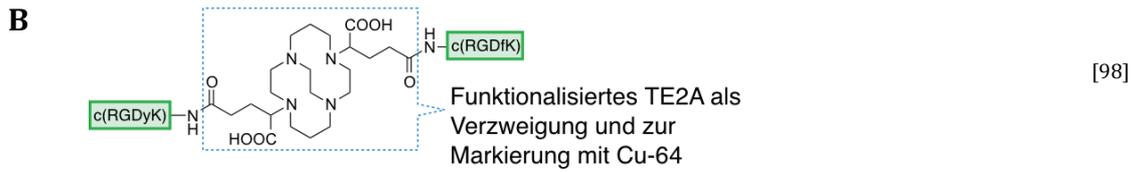
Für ein dimerisiertes Bombesin zum Tumor Targeting gibt es bisher nur ein publiziertes Beispiel, ein DOTA Chelator wurde entsprechend modifiziert als Gerüst für den divalenten Liganden verwendet (Tabelle 5, D).^[104] In den durchgeführten *in vitro* Experimenten mit PC-3 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorinternalisierung für das dimerisierte Bombesin in etwa doppelt so hoch ist wie für die monomere Verbindung.

1.6.1.4. Heterovalente Liganden

Als heterovalente Liganden bezeichnet man die Kombination verschiedener Peptidsequenzen in einem Molekül, die zwei unterschiedliche Rezeptoren als Target haben.^[105] Beispiele hierfür sind Verbindungen mit einem RGD und einem Octreotat,^[106,107] einem RGD und einem Bombesin^[108] und einer α -MSH-Rezeptor spezifischen Sequenz mit einem Liganden für den CCK-Rezeptor (Tabelle 5, C, E & G).^[109-111] Die Verbindungen wurden bisher nur präklinisch untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass die Liganden eine hohe Affinität gegenüber den beiden jeweiligen Rezeptoren haben. Eindeutige Belege für die gleichzeitige Bindung verschiedener Rezeptoren gibt es bisher nicht.

Tabelle 5. Übersicht über peptidische multi- und heterovalente Liganden für Tumor Targeting

Molekulare Struktur und verwendete Bindungselemente	Referenz
<p>A</p>  <p>Fluor-18 Markierung durch Oxim-Ligation</p> <p>Multivalent durch Lysin-Dendrimer</p> <p>PEG-Spacer</p> <p>α(RGDfE)-NH₂</p>	<p>[99]</p>



Die Beispiele in Tabelle 5 zeigen, dass es eine Vielzahl an möglichen Architekturen für das Design multivalenter Verbindungen gibt. Die meisten Ansätze nutzen dendrimere Strukturen. Für die Verzweigung werden Aminosäuren aber auch andere Bausteine verwandt und auch Chelatoren wurden als Kern des Dendrimers zweimal genutzt.^[98,104] Gemein haben alle Ansätze, dass das molekulare Gerüst konformationell sehr flexibel ist und daher keine definierte Struktur vorgibt.

1.7. Oligoprolin – eine funktionalisierbare Plattform in definierter Polyprolin-II Konformation

Prolin nimmt unter den proteinogenen Aminosäuren eine Sonderrolle ein, da es als einzige ein sekundäres Amin aufweist. Es hat in Proteinen einen wichtigen Einfluss auf die Sekundärstruktur. Dies liegt zum einen an der zyklischen Gestalt von Prolin, wodurch die möglichen Diederwinkel der vorangehenden Amidbindung eingeschränkt werden. Desweiteren ist die Energiebarriere zwischen der *cis* und *trans* Konformation für tertiäre Amide deutlich niedriger als für sekundäre Amide. Deshalb ist die Xaa-Pro Amidbindung in *cis* Konformation zu einem signifikanten Anteil populiert. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften ist Prolin in der Lage, in Peptiden einen β -Turn zu induzieren. Einen vergleichbaren Einfluss auf Struktur und Konformation haben N-methylierte Aminosäuren.^[113]

Peptidsequenzen mit vielen Prolinen nehmen in wässriger Umgebung bevorzugt die helikale sogenannte Polyprolin-II (PPII) Struktur mit einer hohen konformationellen Stabilität ein (Abb. 12). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist Kollagen, ein Strukturprotein, das hauptsächlich aus sich wiederholenden Prolin-Hydroxyprolin-Glycin Einheiten besteht.^[114,115] Prolin-haltige Motive spielen ebenfalls bei der Faltung von Proteinen und auch bei Protein-Protein Wechselwirkungen in Zellen eine wichtige Rolle und tragen unter anderem zur Signalübertragung bei.^[116-119]

In der PPII Struktur liegen alle Amidbindungen in der *trans* Konformation vor. Die linksgängige Helix wird bereits von kurzen Oligoprolinen ($n \geq 6$) bevorzugt eingenommen. Die helikale Struktur ist sehr regelmäßig, wobei jeweils genau drei Prolin Einheiten eine Drehung ausmachen. Dabei beträgt die Distanz zwischen den sich wiederholenden Positionen innerhalb der Helix circa 9.5 Å.^[116]

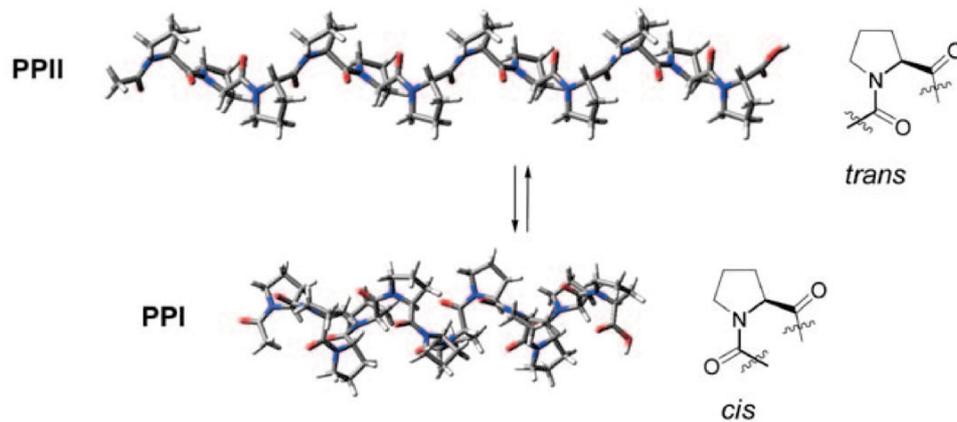


Abbildung 12. Model der PPII Helix mit allen Amidbindungen in *trans* Konformation (oben) und der kompakteren PPI Helix mit all-*cis* Amidbindungen (unten)

In unpolareneren Lösungsmitteln wie z.B. n-Propanol, liegen Oligoproline bevorzugt als kompaktere Polyprolin-I (PPI) Helix vor, bei der alle Amidbindungen in *cis* Konformation angeordnet sind (Abb. 12).^[120] Beide Strukturen zeichnen sich, wie andere Sekundärstrukturen in Peptiden und Proteinen, durch ein charakteristisches CD-Spektrum aus und können so identifiziert werden. Weitere Möglichkeiten zur strukturellen Charakterisierung dieser Peptide bieten z.B. auch NMR Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse.

Aufgrund der definierten Struktur kann man Oligoproline als Foldamer^[121] bezeichnen, die durch Substituenten am C-4 (C γ) des Pyrrolidin-Rings funktionalisiert werden können. Vielfältig nutzbar sind in diesem Zusammenhang Azide (Abb 13, 14).

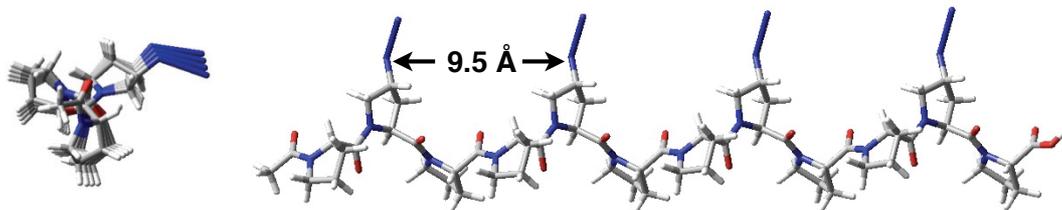


Abbildung 13. Model eines Oligoprolin-12mers in PPII Struktur mit Aziden an jedem dritten Prolin. Ansicht entlang der helikalen Achse (links) und seitlich (rechts).

In der Vergangenheit wurde im Arbeitskreis Wennemers gezeigt, wie sich Oligoproline elegant funktionalisieren lassen, indem man in den gewünschten Positionen Azidoproline einbaut und diese kupferkatalysiert mit terminalen Alkinen in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition ("Click-Reaktion") zu 1,4-substituierten Triazolen umsetzen kann. Ebenso können Azide über Reduktion zu Aminen gefolgt von Acylierung zur

Funktionalisierung mit gewünschten Gruppen genutzt werden. Unter Anpassung der Reaktionsbedingungen sind beide Reaktionen sowohl in Lösung, als auch direkt an der Festphase möglich (Abb. 14).^[120,122–124]

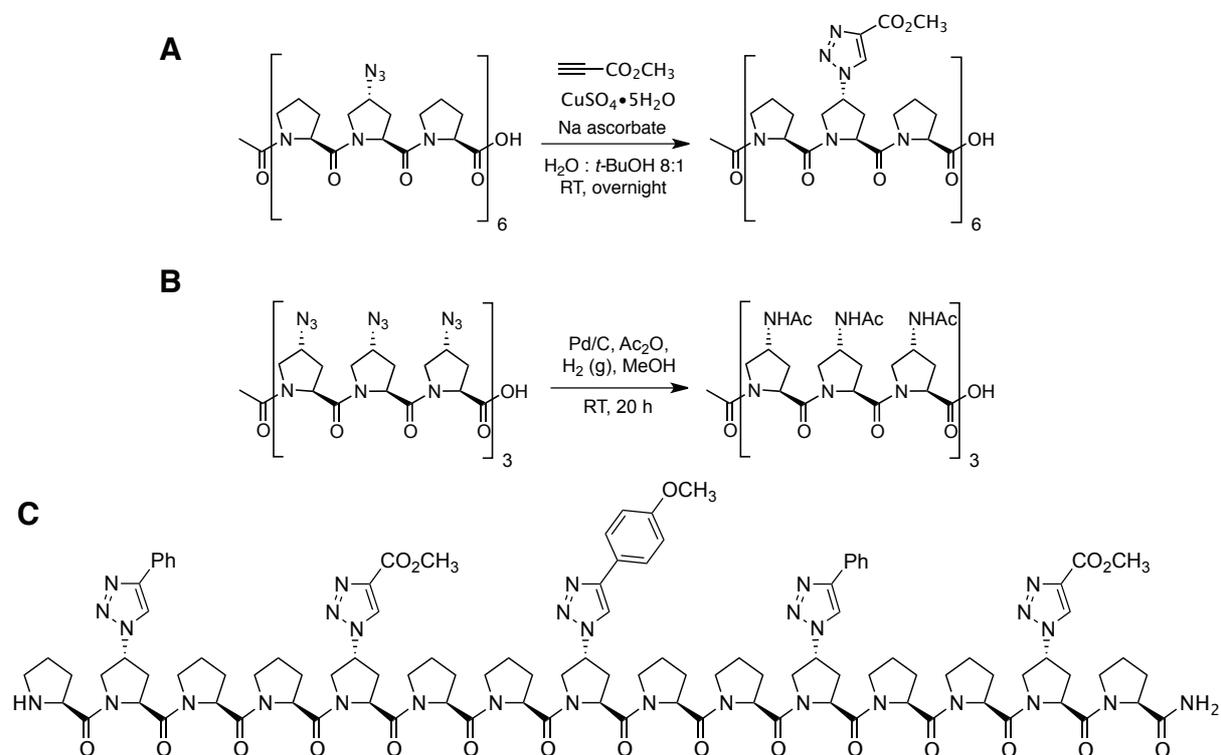


Abbildung 14. **A** Funktionalisierung eines Azidoprolin-haltigen Peptids zum entsprechenden Triazol-haltigen Peptid via “Click” Reaktion (**B**) in situ Reduktion der Azidogruppen mit anschließender Acylierung (unten) in Lösung.^[123] **C** Abwechselnde “Click“-Reaktionen und Peptidsynthese an der festen Phase führen zu vielfältig dekorierten Oligoprolinen^[120]

Die definierten konformationellen Eigenschaften von Azidoprolin-haltigen Oligoprolinen gepaart mit ihrer einfachen Funktionalisierbarkeit eignen sich für zahlreiche Anwendungen. So wurden sie bereits im Bereich der zellgängigen Peptide als strukturgebendes Element eingesetzt und zu diesem Zweck mit kationischen Einheiten funktionalisiert.^[125–128] Desweiteren wurde die präzise Anpassung der Länge des Scaffolds genutzt, um die Grösse von Silbernanopartikeln zu kontrollieren^[129] und Oligoprolin wurden als Gerüst homobivalenter Liganden für Glycoprotein-Hormon Rezeptoren eingesetzt.^[130] Azidoprolin wurden auch als funktionalisierbare Gruppe in Kollagen-Modellpeptiden untersucht.^[131]

1.8. Die Kupfer(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition

Die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Alkin und einem Azid ist seit Jahrzehnten bekannt, gelang aber nur unter vergleichsweise harschen Bedingungen, zum Beispiel in siedendem Toluol, und lieferte unselektiv die beiden möglichen Triazolstrukturisomere.^[132,133] Die Verwendung von Kupfer(I) als Katalysator für die dipolare Cycloaddition eröffnet neue Möglichkeiten. Da sich unter milden Bedingungen ein organisches Azid mit einem terminalen Alkin konjugieren lässt, hat sich die Reaktion als sehr wertvoll erwiesen.^[134,135] Die Reaktion ist orthogonal zu den meisten funktionellen Gruppen und ist auch in wässrigem Medium durchführbar. Mit den Eigenschaften ist sie prädestiniert für die Verknüpfung und Modifikation von Biomolekülen. Wegen der Einfachheit und der Effizienz die diese Reaktion in vielen Fällen auszeichnet, wurde der Begriff "Click-Reaktion" von Sharpless geprägt und soll der Einfachheit halber auch in dieser Arbeit verwendet werden.^[136] Kupferkatalysiert liefert die Reaktion selektiv das 1,4-substituierte 1,2,3-Triazol. 1,4-substituierte Triazole sind metabolisch stabile Isostere der *trans*-Amid Bindung und daher interessant für die Inkorporation in biologisch aktive Moleküle.^[137] Über die Ruthenium-katalysierte Reaktion sind 1,5-substituierte 1,2,3-Triazole zugänglich, die als Isostere von *cis*-Amiden verwendet werden können.^[138]

In der Literatur finden sich verschiedene Beispiele für "Click"-Reaktionen auf der festen Phase, sie unterscheiden sich ziemlich in den verwendeten Konditionen und Kupferquellen.^[137] Die Vielzahl an Protokollen ist darauf zurückzuführen, dass die an sich robuste und einfache Reaktion doch von Fall zu Fall optimiert werden muss.

2. Zielsetzung

Die Entwicklung neuartiger radiomarkierter Liganden zum zielgerichteten Ansteuern ("Targeting") von Tumoren ist sowohl für die Diagnostik als auch für die Behandlung von Krebserkrankungen von grosser Bedeutung. Dafür wird ausgenutzt, dass bestimmte Peptide selektiv an Rezeptoren binden, die von Tumorzellen überexprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob die Kombination von Agonisten und Antagonisten in einem Molekül die Vorteile der beiden Konzepte kombiniert: In bisherigen Studien wurde beobachtet, dass Antagonisten eine höhere Aufnahme in den Tumor zeigen als Agonisten, da sie mehr Bindungsstellen finden. Agonisten dagegen werden langsamer aus dem Tumor ausgewaschen als Antagonisten, da sie in die Zellen internalisiert werden. Ziel der vorliegenden Dissertation war daher die Untersuchung, ob mit heterobivalenten Liganden ("Hybridliganden") die Tumoraufnahme und Retention der radiomarkierten Liganden verbessert wird. (Abb. 15).

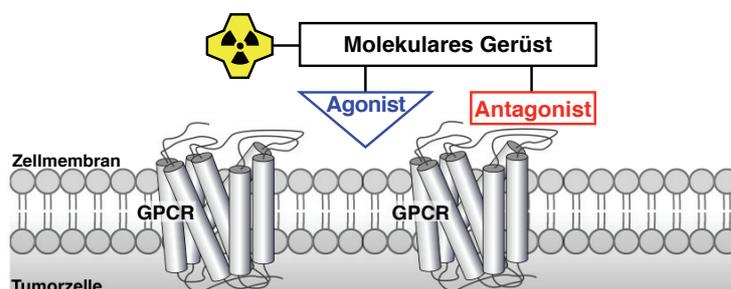


Abbildung 15.

Konzept zum Targeting von GPCR mit Hybridliganden

Dieses Konzept wird am Beispiel von Agonisten und Antagonisten für den Gastrin-releasing Peptide Rezeptor (GRPR) untersucht, der insbesondere auf Prostatakarzinomen überexprimiert ist und daher ein interessantes Target darstellt. Als rigides molekulares Gerüst, das die Einstellung definierter Abstände zwischen den beiden Bindungselementen erlaubt, werden Oligoproline verwendet (Abb. 16). Durch Variation des rigiden Oligoprolin-Gerüsts soll untersucht werden, ob es einen optimalen Abstand zwischen den beiden Bindungselementen gibt, der für eine optimierte Aufnahme der Liganden notwendig ist.

Neben den heterobivalenten Liganden sollten auch monovalente und homobivalente Liganden, die nur agonistische oder antagonistische Bindungselemente enthalten, nach dem gleichen Konzept synthetisiert und untersucht werden. Die neuartigen Liganden

sollten mit dem bekannten Agonisten AMBA und dem Antagonisten RM1 in Zell- und Tierexperimenten verglichen werden.^[22]

Der Gastrin-Releasing Peptide Rezeptor dient nur als erstes exemplarisches Target, das eine hohe Relevanz hat aber auch den Nutzen des Konzepts generell beweisen soll. So ist es auch das Ziel, den Ansatz universell zu gestalten, damit Liganden für andere Rezeptoren ebenfalls zugänglich sind, ohne dass eine grundsätzlich neue Synthesestrategie notwendig wird.

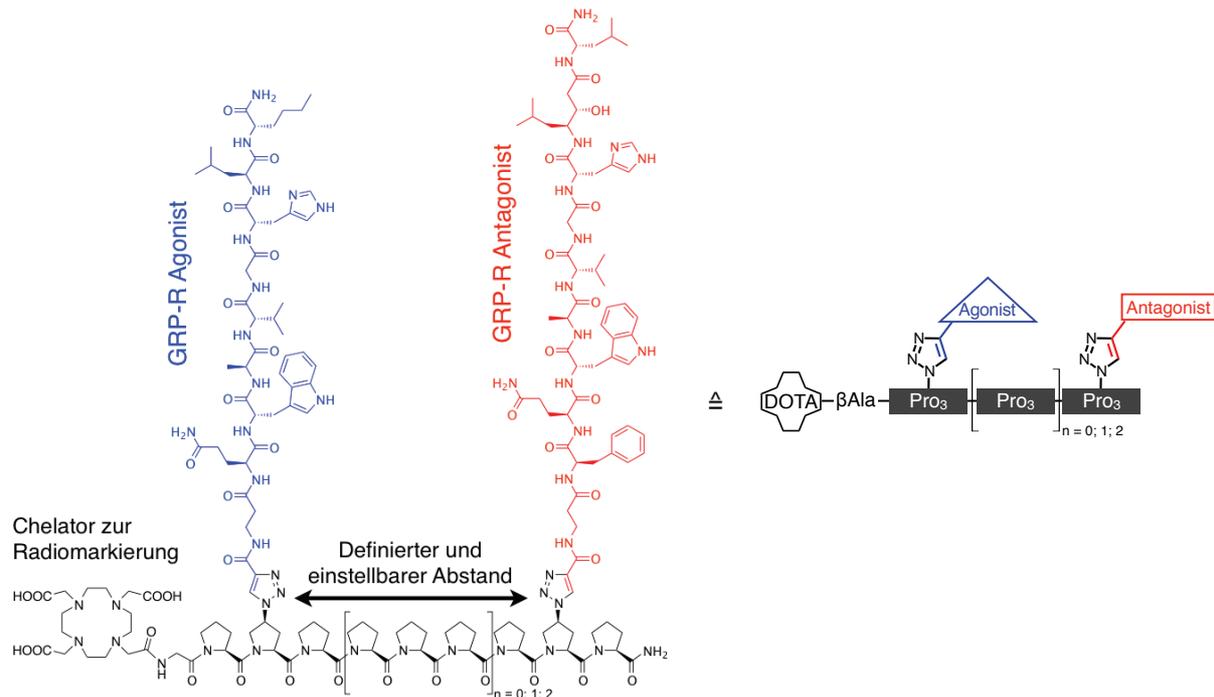


Abbildung 16. Hybridligand für den Gastrin-releasing Peptide Rezeptor, der aus einem Agonisten und einem Antagonisten aufgebaut ist. Die Peptide sind jeweils abgeleitet von der Bombesinsequenz und verknüpft mit einem Azidoprolin-haltigen Oligoprolin als rigides Gerüst. Der DOTA-Chelator erlaubt die Komplexierung verschiedener Nuklide. Rechts die vereinfachte Cartoondarstellung.

3. Synthese der Liganden

3.1. Design der Bombesin-Oligoprolin Konjugate

Es wurden drei heterobivalente Oligoprolin-Bombesin Konjugate entworfen, die sich im Abstand zwischen den Bindungselementen unterscheiden (Abb. 17). Mit diesen drei Hybridliganden soll die Frage beantwortet werden, ob eine Optimierung der Aufnahme in den Tumor mit der gewählten Strategie möglich ist und wenn ja, ob es einen optimalen Abstand zwischen den beiden Bindungselementen gibt.

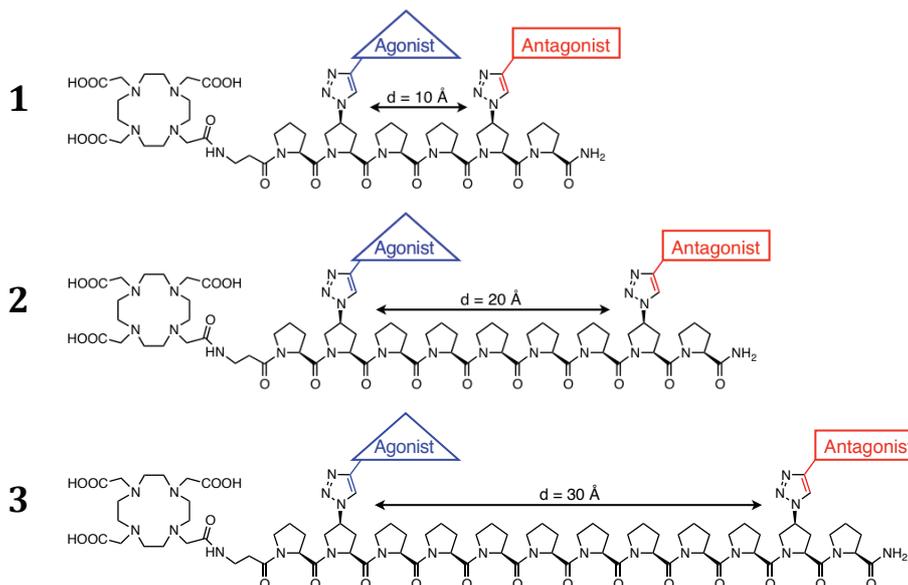


Abbildung 17. Heterobivalente Oligoprolin-Bombesin Konjugate **1-3** mit variiertem Abstand (d) zwischen den beiden Bindungselementen

Um das neuartige Hybridkonzept mit monovalenten Liganden vergleichen zu können, die auf dem gleichen Oligoprolin-Gerüst basieren, wurden die drei monovalenten Liganden **4-6** synthetisiert (Abb.18). Desweiteren sollte beantwortet werden, wie die Ligation mit dem Oligoprolin die Bindung der Bombesinderivate an den GRP-Rezeptor beeinflusst. Die beiden Liganden **4** und **6** nutzen die gleichen agonistischen Erkennungsmerkmale wie die Hybridliganden **1-3**, Ligand **5** nutzt das gleiche antagonistische Erkennungsmerkmal wie **1-3**.

3.2. Synthesestrategie

Für die Synthese der Oligoprolin-Bombesin Konjugate kamen zwei grundsätzliche Strategien in Frage. Die erste Strategie (A) knüpft an die Resultate von Michael Kümin^[120] an und sieht vor, die Cycloaddition zwischen den alkylierten Bombesinderivaten **11** und **12** und dem in ein Oligoprolin eingebauten Azidoprolin an der festen Phase durchzuführen (Abb. 20). So kann der angestrebte Ligand Schritt für Schritt an der festen Phase durch abwechselnde Peptidkupplungen und "Click"-Reaktionen aufgebaut werden.

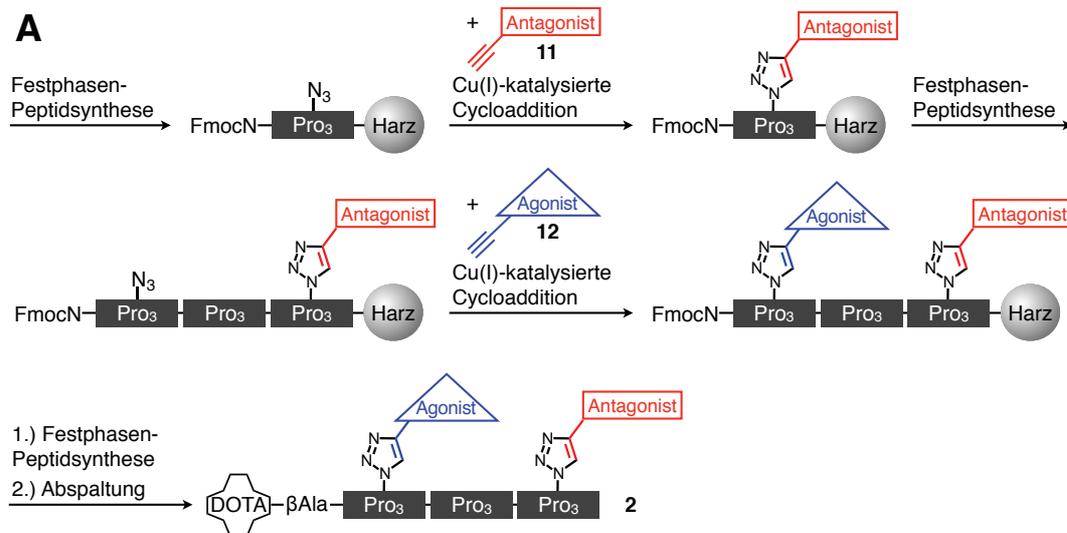


Abbildung 20. Synthesestrategie A mit "Click"-Reaktionen an der festen Phase am Beispiel des Hybridliganden **2**

Als Alternative bietet sich an, trimere Prolinbausteine in Lösung zu synthetisieren und diese ebenfalls in Lösung mit einem alkylierten Bombesinderivat *via* "Click"-Reaktion zu ligieren. So kann ein Satz an Bausteinen, bestehend aus Prolin-Trimeren die mit einem Erkennungsmerkmal ausgestattet sind (**14** und **15**) und aus unfunktionalisierten Spacern **16**, erstellt werden. Die Bausteine werden dann an der festen Phase zu den Zielverbindungen zusammengesetzt (Abb. 21).

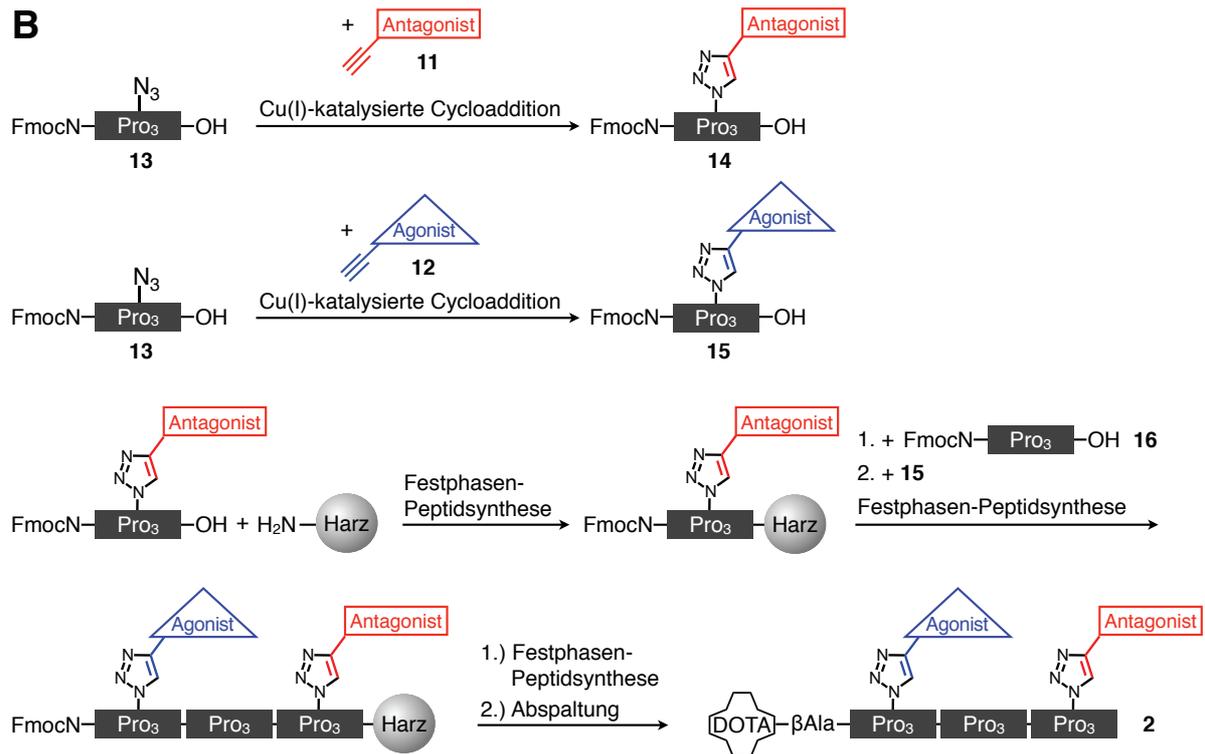


Abbildung 21. Synthesestrategie B mit “Click“-Reaktionen in Lösung und Verknüpfung der Bausteine auf der festen Phase am Beispiel des Hybridliganden 2.

3.3. Ausgangsverbindungen für die Synthese der Oligoprolin-Bombesin Konjugate

3.3.1 Alkinylierte Bombesinderivate

Da RM1 und AMBA zwei etablierte und im Detail studierte antagonistische bzw. agonistische Liganden für den GRP-R sind, wurden deren Erkennungssequenzen Bombesin(7-14) und JMV594 für die hier durchgeführten Studien verwendet (Abb. 22).^[22] Die Aminosäuren 7-14 des Bombesins genügen für eine hohe agonistische Affinität gegenüber dem GRP-R. Auch der Antagonist JMV594 ist vom Bombesin abgeleitet und bindet mit hoher Affinität an den GRP-R. Um die beiden Erkennungsmerkmale mit dem Azidoprolin-haltigen Oligoprolin ligieren zu können, wurden sie mit Alkinen funktionalisiert. Die Funktionalisierung erfolgte am N-Terminus, da Studien mit anderen Bombesinderivaten zeigten, dass Modifikationen am N-Terminus die agonistischen und antagonistischen Eigenschaften nur unwesentlich beeinflussen.^[67]

Für die Alkinylierung wurde Propinsäure (Prs) verwendet, da sie eine reaktive, elektronenarme Dreifachbindung enthält.^[137] Als kurzer Abstandshalter wurde ein β -

Alanin zwischen die Propinsäure und die Erkennungssequenz gesetzt. Die gesamte Sequenz wurde nach dem Fmoc/Boc-Protokoll auf säurelabilem Sieber-Amid Harz synthetisiert, um sie mitsamt der Schutzgruppen nach Kupplung der Propinsäure von der festen Phase mit 1% TFA abspalten zu können. Die milden Bedingungen bei der Abspaltung schützen einerseits das Alkin, andererseits ist die geschützte Peptidsequenz von Vorteil für anschließende Peptidkupplungen, wie sie bei den beiden Strategien in Gegenwart der Bombesinderivate durchgeführt werden. Das Methionin der Bombesinsequenz, wie es auch in AMBA verwendet wird, wurde durch ein isosteres Norleucin ersetzt. Das Methionin wird leicht zum Sulfoxid oxidiert, was mit einem Verlust der Affinität des Bombesins einhergeht. [139,140]

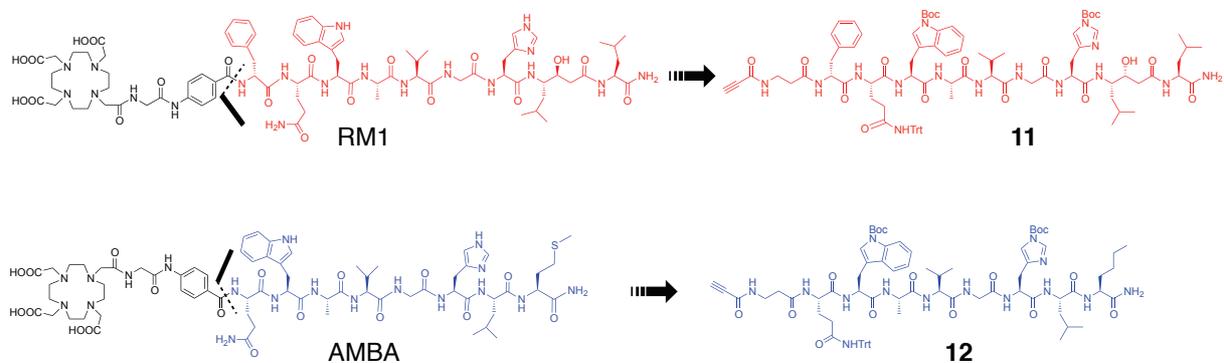


Abbildung 22. Die alkylierten Bombesinderivate **11** und **12** mit Schutzgruppen (rechts) und die beiden Referenzverbindungen RM1 und AMBA mit den gleichen Erkennungssequenzen

3.3.2 Azidofunktionalisierte Oligoproline

Als Monomere für die Synthese des molekularen Gerüsts wurde Fmoc-geschütztes Prolin und (4S)Azidoprolin verwendet. Die Ausgangsverbindungen **17** (für homobivalente Liganden) und **18** für Strategie A wurden nach dem Fmoc/*t*Bu -Protokoll mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS) synthetisiert. Da sich alle angestrebten Liganden aus trimeren Prolin-Bausteinen zusammensetzen lassen, wurden die beiden Tripeptide Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH **13** (funktionalisierbar) und Fmoc-Pro₃-OH **16** in Lösung synthetisiert, um die eigentlichen Liganden mit weniger Kupplungsschritten aus vorgefertigten Elementen zusammensetzen zu können (Abb. 23).

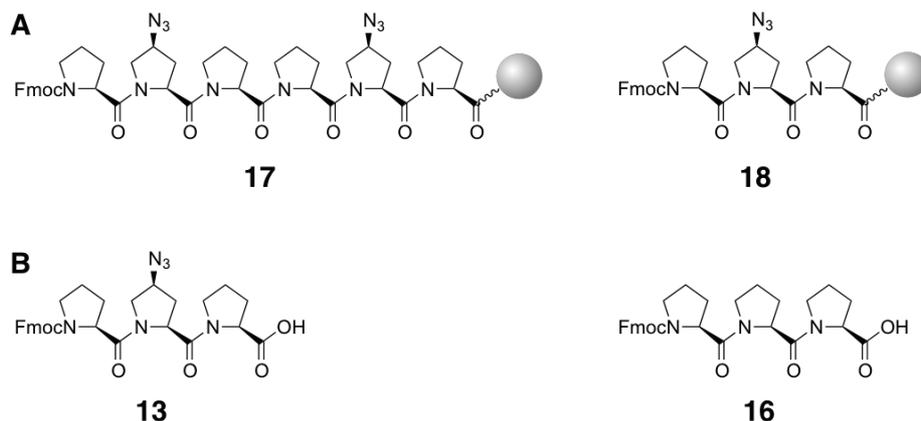


Abbildung 23. Die Oligoproline wie sie für die beiden Strategien benötigt werden – gebunden an die feste Phase (**A**, **17** und **18**) und als trimere Fmoc-geschützte Bausteine (**B**, **13** und **16**)

3.3.3. Der Chelator für die Markierung mit einem Radionuklid

DOTA ist ein Chelator, der mit den meisten dreiwertigen Metallkationen sehr stabile Komplexe bildet. Daher kann er sehr gut für die Radiomarkierung mit $^{177}\text{Lu}^{3+}$ und $^{68}\text{Ga}^{3+}$ genutzt werden. Das DOTA Derivat mit drei *tert*-Butyl geschützten Carbonsäuregruppen und einer freien Carbonsäure eignet sich sehr gut zur Kupplung an Amine und ist kommerziell erhältlich (Abb. 24). Bei der Abspaltung von der festen Phase mit konzentrierter TFA werden auch die drei Carbonsäuregruppen entschützt, der Chelator kann erst dann stabile Komplexe bilden.

NODAGA ist ein Chelator speziell für dreiwertige Metallkationen mit kleinerem Ionenradius und bildet daher noch stabilere Komplexe mit $^{68}\text{Ga}^{3+}$ (Abb. 24). Es kann auch für die Markierung mit zweiwertigem $^{64}\text{Cu}^{2+}$ verwendet werden. Der Nachteil ist der hohe Preis und aufgrund der kleineren Ringgröße und der kleineren Koordinationszahl die geringere Komplexstabilität mit Lanthanidkationen, verglichen mit DOTA.^[141]

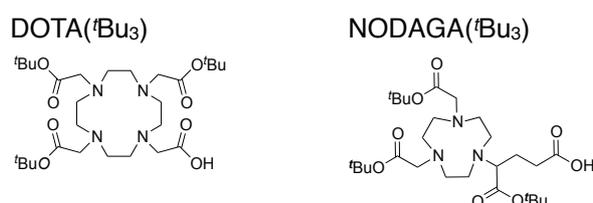


Abbildung 24. Die beiden Chelatoren DOTA($t\text{Bu}_3$) und NODAGA($t\text{Bu}_3$)

DOTA($t\text{Bu}_3$) wurde aufgrund seiner Universalität für die Synthese aller Liganden genutzt und über ein β -Alanin mit dem Oligoprolin-Gerüst verknüpft. Das β -Alanin dient dabei

als kurzer Spacer und stellt mit seinem primären Amin ein besseres Nukleophil für die Kupplung des Chelators zur Verfügung.

Eine optimierte Synthese von NODAGA war Teil eines Nebenprojekts (siehe Kap. 3.8), der Chelator wurde jedoch nicht für die Liganden verwendet.

3.4. Synthese der alkylierten, peptidischen Bindungselemente

3.4.1 Alkylierte, geschützte Bombesinderivate

Die Synthese des Bombesinagonisten **12** Prs- β -Ala-[Nle¹⁴]-Bombesin(7-14) gelang nach dem etabliertem Fmoc/^tBu-Protokoll mit HCTU als Kupplungsreagenz (Abb. 25). Nur die Kupplung des Alkins in Form von Propinsäure musste optimiert werden, da anfängliche Versuche mit HCTU oder DIC/HOBt als Kupplungsreagenzien fehlschlagen. Unter den basischen Bedingungen der Kupplung mit HCTU und ⁱPr₂NEt, in Kombination mit der Aktivierung von Propinsäure durch HCTU zu einem Acylierungsreagenz, kam es zu einer Nebenreaktion. Vermutet wird eine Polymerisation der Propinsäure. Versuche zeigten, dass sich eine Propinsäure-Lösung unter Zugabe von HCTU und ⁱPr₂NEt sofort erwärmt und dunkelbraun verfärbt. Die Beobachtungen waren die gleichen mit DIC/HOBt, auch wenn die beschriebene Reaktion langsamer ablief.

Als alternatives Kupplungsreagenz wurde daher N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ) verwendet. EEDQ bildet mit Carbonsäuren ein gemischtes Anhydrid,^[142] und aktiviert so den Carbonylkohlenstoff für den nukleophilen Angriff desamins. Es ist kein Zusatz von Base notwendig. Die Reaktion lief sauber und quantitativ innerhalb von 2-3h ab (Literatur 16 h).^[135]

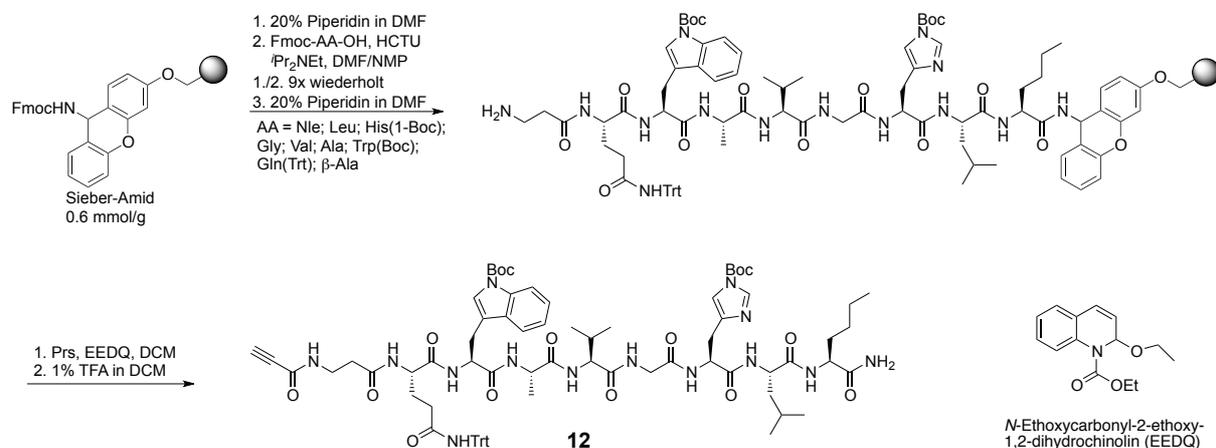


Abbildung 25. Festphasenpeptidsynthese des alkylierten agonistischen Bombesinderivats **12**

Die Abspaltung von säurelabilen Sieber-Amid Harz gelang mit 1 %iger TFA in CH₂Cl₂. Um die Schutzgruppen dabei zu erhalten, wurde das Harz wiederholt (10x) für jeweils 2 Minuten mit der sauren Abspatlösung behandelt, die jeweils sofort in 10% Pyridin/Methanol neutralisiert wurde.

Anschließendes Ausfällen in Wasser lieferte das geschützte Peptid in einer Rohausbeute von 80-90 %. LC-MS Analysen zeigten eine Reinheit von 70-80 %. Die Synthese des alkylierten Agonisten **12** gelang im Gramm-Maßstab, die Synthese auf 1,5 g Sieber-Amid Harz führte zu 1,4 g Produkt.

Nach dem gleichen Schema wurde der Antagonist **11** Prs-β-Ala-JMV594 synthetisiert (Abb. 26). Bei den durchgeführten Synthesen wurden Rohausbeuten von 80-90 % erzielt, LC-MS Analysen zeigten eine Reinheit der Peptide von 70-80 %.

Die beiden alkylierten Bombesinderivate wurden ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt, unter anderem da deren schlechte Löslichkeit (nur in DMF löslich) die Möglichkeiten zur Aufreinigung stark einschränkte.

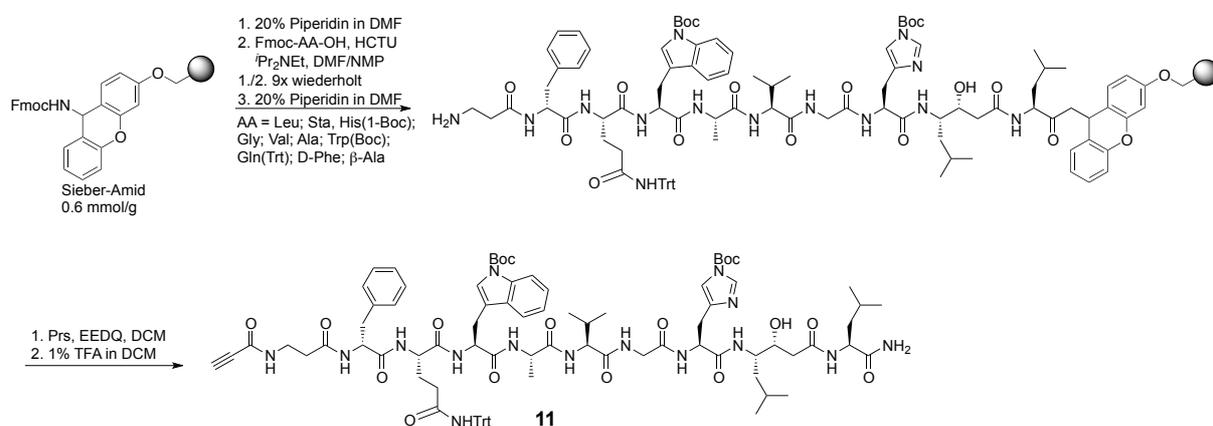


Abbildung 26. Festphasensynthese des alkylierten antagonistischen Bombesinderivats **11**

3.4.2 Synthesen weiterer alkylierter Bombesinderivate

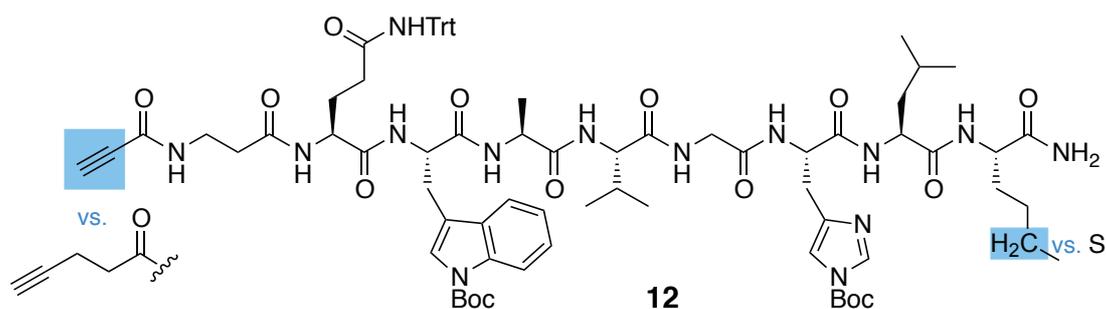
Prs-βAla-BBN(7-14) Wie beschrieben, wurde das Methionin der natürlichen Bombesinsequenz durch ein isosteres Norleucin ersetzt. Es wurde auch das Methionin-haltige Analogon Prs-βAla-BBN(7-14) **19** in ausreichender Reinheit (68 %) synthetisiert. Bei der "Click"-Ligation mit Azidoprolinen an der festen Phase (Strategie A), bildete sich jedoch das unerwünschte Methionin-Sulfoxid in nennenswerter Menge.

Bei der anschliessenden Abspaltung mit konzentrierter TFA vom Rink-Amid Linker konnte zwar durch den Zusatz des Reduktionsmittels Ammoniumiodid die Oxidation zurückgedrängt werden, doch spätestens nach der präparativen Aufreinigung der Peptide mittels HPLC wurde wieder oxidiertes Methionin nachgewiesen. Daher wurde entschieden, Prs- β Ala-[Nle¹⁴]BBN(7-14) **12** als Bombesin-Agonisten zu verwenden.

Pentinsäure- β Ala-BBN(7-14) Die in den alkinylierten Bombesinderivaten verwendete Propinsäure enthaltene Dreifachbindung ist aufgrund des Elektronenmangels als reaktiv bekannt.^[137] Zum Vergleich wurde das Pentinsäurehaltige Bombesinpeptid **20** ebenfalls synthetisiert (Reinheit 91 %). **20** konnte in höherer Reinheit synthetisiert werden als die entsprechende Verbindung mit Propinsäure **19**, was sich vermutlich auf weniger Nebenprodukte durch die unreaktivere Dreifachbindung zurückführen lässt.

Der Vergleich in einer "Click"-Reaktion an der festen Phase zwischen den beiden verschiedenen Alkinen **19** und **29** zeigte wie erwartet höhere Ausbeuten für **20** (siehe Kapitel 3.6.1.).

Demobesin Ethylamid-Antagonist Neben dem letztendlich verwendeten JMV594 als Antagonist für den GRP-R, wurde auch die Synthese anderer Antagonisten untersucht, insbesondere der Peptidsequenz wie sie in Demobesin-1 (Abb. 8) auftritt. Der Antagonist unterscheidet sich durch ein C-terminales Ethylamid von den anderen Sequenzen.^[23] Die Synthese wurde zunächst mit verschiedenen Linkern getestet, die sich durch Ethylamin ammonolytisch spalten lassen. Mit den verwendeten Linkern (Wang, Hydrazinobenzoyl, und 4-Hydroxymethylbenzoesäure (HMBA)^[143-145]) gelang die Synthese des alkinylierten Peptids mit C-terminalem Ethyl- oder Propylamid nicht. Es entstanden nicht identifizierbare Produktgemische. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Dreifachbindung der N-terminalen Alkinamide unter den basischen Bedingungen der Abspaltungen deprotoniert wurde, was zu Nebenreaktionen führte. Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten und der Tatsache, dass in der Gruppe von Prof. Mäcke ausschliesslich der Antagonist JMV594 verwendet wird, wurde die Arbeit an anderen Antagonisten eingestellt.



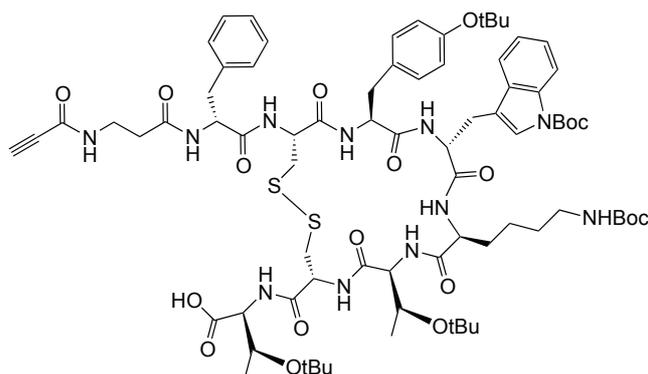
Verbindung	Sequenz
Bombesin:	Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂
Agonist (geschützt):	12 Prs-βAla-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Ala-Val-Gly-His(1-Boc)-Leu-Nle-NH ₂
	19 Prs-βAla-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Ala-Val-Gly-His(1-Boc)-Leu-Met-NH ₂
	20 Pes-βAla-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Ala-Val-Gly-His(1-Boc)-Leu-Met-NH ₂
Antagonist (geschützt):	11 Prs-βAla-D-Phe-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Ala-Val-Gly-His(1-Boc)-Sta-Leu-NH ₂
“Demobesin“	- Prs-βAla-D-Phe-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Ala-Val-Gly-His(1-Boc)-Leu-NHEt

Abbildung 27. Übersicht über die synthetisierten alkylierten Bombesinderivate. **11** und **12** wurden für die Synthese der finalen Oligoprolin-Bombesin Konjugate verwendet

3.4.3. Synthese eines alkylierten Octreotats

Zur Vorbereitung einer Masterarbeit^[146] und um ein Bindungselement für potentielle heterobivalente Liganden für das simultane Targeting des GRP- und des Somatostatin-Rezeptors zu erhalten, wurde die Synthese von alkylierten [Tyr³]-Octreotat ausgearbeitet (**21**, Abbildung 28).

Abbildung 28. Prs-βAla-[Tyr³]-Octreotat **21**, mit Schutzgruppen vom Harz abgespalten



Im Zusammenhang der Synthese von Prs-βAla-[Tyr³]-Octreotat auf 2-Chlorotrytylchlorid-Harz wurde die Verwendung des Kupplungsreagenzes COMU in Verbindung mit Erhitzen in der Mikrowelle untersucht. Die Kupplungen wurden bei 80°C für 10 Minuten durchgeführt. Kaiser-Tests waren jeweils negativ, was auf eine quantitative Reaktion schließen lässt. Die Abspaltung mit Essigsäure, Trifluorethanol

und CH_2Cl_2 und die anschliessende Zyklisierung mit Iod lieferten **21** in 33 % Ausbeute und hoher Reinheit (84 %).

Die anschliessende "Click"-Reaktion mit dem azidofunktionalisierten Prolin-trimer **13** verlief quantitativ ($[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, DMF/NMP 2:1, MW 70°C , 2h).

Damit wurde gezeigt, dass die notwendigen Ausgangsverbindungen zugänglich sind, die Synthese der finalen Liganden erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Patrick Wilhelm.^[146]

Die Zeitersparnis durch die Kupplungen in der Mikrowelle war beachtlich (10 min vs. 60 min bei RT), es ist jedoch zu bemerken, dass mit der Mikrowelle, die zum damaligen Zeitpunkt zur Verfügung stand (Biotage Initiator), die Mikrowellen-unterstützte Synthese kompliziert in der Handhabung war. Das Protokoll wurde daher nicht weiter verfolgt.

3.5 Synthese der trimeren Prolin Bausteine in Lösung

Die Synthese von Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH **13** und Fmoc-(Pro)₃-OH **16** ist bereits in verschiedenen Dissertationen und Masterarbeiten beschrieben, und wurde in leicht modifizierter Form verwendet (Abb. 29).^[120,120,146]

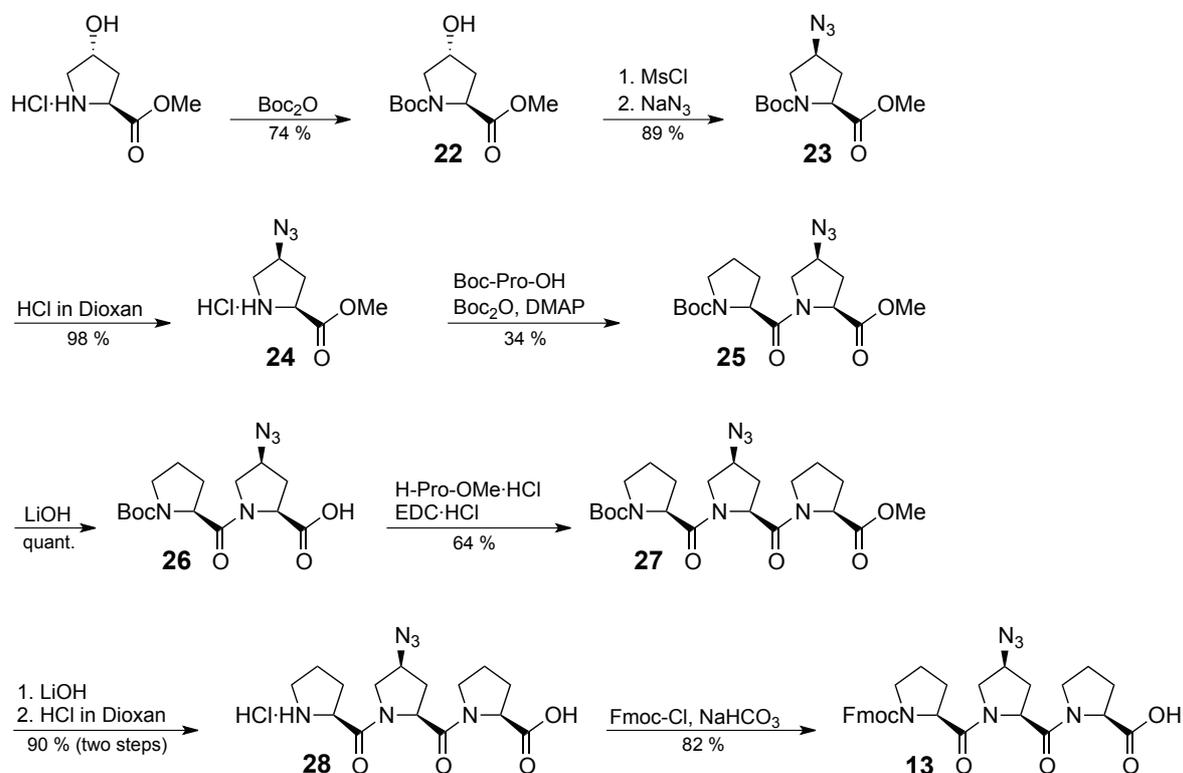


Abbildung 29. Syntheschema zur Darstellung des funktionalisierbaren Prolin Bausteins **13**

Für die Synthese des Azidofunktionalisierten-Prolintrimers **13** wurde zunächst Hydroxyprolinmethylester mit der Boc-Schutzgruppe geschützt (**22**). Nach Aktivierung der Hydroxyfunktion durch Mesylchlorid wurde das resultierende Mesylat durch Natriumazid unter Inversion des Stereozentrums substituiert (**23**). Nach der Boc-Entschützung wurde abweichend von den beschriebenen Synthesen untersucht, ob für die Peptidkupplung von Boc-Prolin und Azidoprolinmethylester **24** anstelle von EDC*HCl das günstigere Boc₂O als Kupplungsreagenz verwendet werden kann. Die Ausbeute von 34 % für das Dipeptid **25** war niedriger als mit EDC*HCl zu erwarten gewesen wäre und ist daher für diese Reaktion nicht zu empfehlen.^[147] Die Verseifung mit Lithiumhydroxid lieferte die Carbonsäure **26** in quantitativer Ausbeute, das nächste Prolin wurde mit EDC*HCl gekuppelt und Tripeptid **27** in 64 % Ausbeute erhalten. Nach der Verseifung des Methylesters und der Abspaltung der Boc-Gruppe mit HCl in Dioxan wurde Tripeptid **28** als Salz isoliert und mit Fmoc-Chlorid zum fertigen Baustein **13** umgesetzt. Die Ausbeuten aller Schritte, ausser der Kupplung mit Boc₂O, waren moderat bis sehr gut (64 – 100 %, Abb. 29) und im Rahmen der Erwartung. Über alle zehn Schritte gerechnet liegt die Ausbeute bei 10 %.

Der trimere Prolinbaustein **16** wurde analog zu **13** synthetisiert (Abb. 30). Das Dipeptid **29** wurde aus Boc-geschütztem Prolin und Prolinmethylester hergestellt, die anschliessende Verseifung lieferte die Carbonsäure **30** in quantitativer Ausbeute. Die Kupplungsausbeute der Reaktion dieses Dipeptids mit H-Pro-O^tBu (als freie Base) war mit 35% sehr gering, was vermutlich auf die schlechte Qualität des alten, oxidationsempfindlichen Reagenzes zurückzuführen war, sie wurde nicht weiter optimiert. Entschützung des N-terminalen Amins und der C-terminalen Carbonsäure lieferte **32** als TFA-Salz. Die anschliessende Reaktion mit Fmoc-Chlorid führte zum fertigen Baustein **16**. Die Ausbeuten, ausser der für **31**, waren mit 63 – 100 % wiederum moderat bis sehr gut (Abb. 30), die Ausbeute über alle 5 Schritte lag bei 9 %.

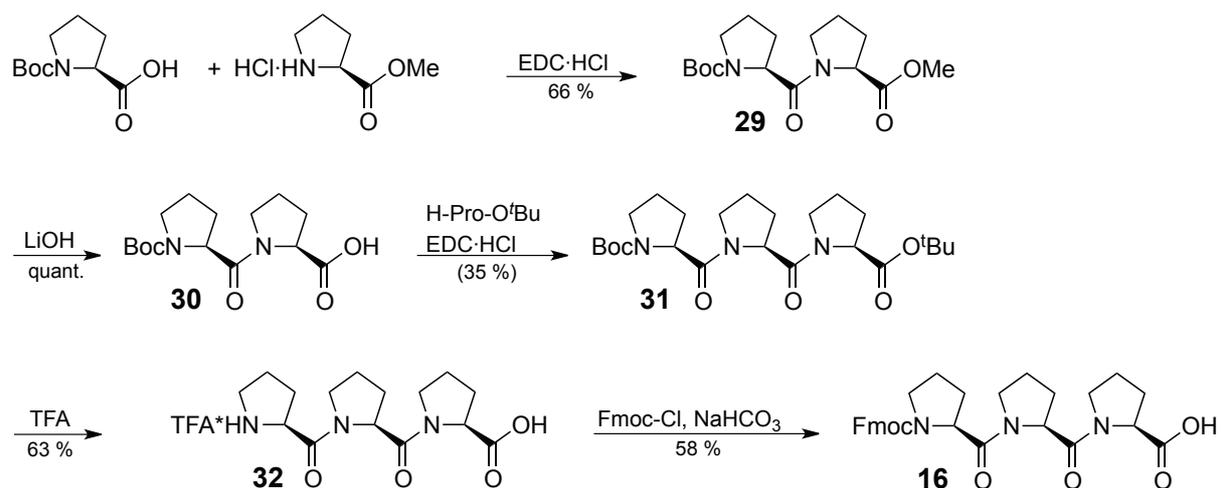


Abbildung 30. Syntheschema zur Herstellung des trimeren Prolin Bausteins 16

Bei den Kupplungen mit EDC·HCl war bei der LC-MS Analyse der Reaktionslösung neben dem EDC-Aktivester der Carbonsäure eine Verbindung mit der gleichen Masse zu erkennen. Dabei dürfte es sich um den inaktiven N-Acylharnstoff aus EDC und der Carbonsäure gehandelt haben (Wanderung des Acylrests vom Sauerstoff zum Stickstoff des Carbodiimids). Der Zusatz von HOBT beziehungsweise eine Variation der Reaktionsbedingungen (Überschuss an Amin) könnte sich positiv auf die Ausbeuten auswirken.

3.6 Kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloadditionen zum Aufbau der Oligoprolin-Bombesin Konjugate

Für die Verknüpfung der alkinylierten Bombesinderivate **11** und **12** mit den Aziden **13**, **17** und **18** wurden, sowohl an der festen Phase (Strategie A, Abb. 20) wie auch in Lösung (Strategie B, Abb. 21), verschiedene Bedingungen untersucht. Dabei wurden der Kupferkatalysator, das Lösungsmittel und die Temperatur variiert.

3.6.1 Strategie A: “Click“-Reaktionen auf der festen Phase

Zunächst wurden verschiedene Cu(I) und Cu(II)-Salze als Katalysatoren getestet. Dazu wurde die Ligation des kurzen Modellpeptids Prs-Trp(Boc)-D-Phe-NH₂ **33** mit dem Festphasen-gebundenen Peptid **17** als Testreaktion genutzt (Abbildung 31). [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ in CH₂Cl₂ hatte sich bereits zuvor für Reaktionen von Azidoprolin-haltigen Oligoprolinen mit Alkinen bewährt. Die Verwendung von CuI und *i*Pr₂NEt in THF wurde in der ersten Publikation zu Azid-Alkin Cycloadditionen von Meldal

beschrieben,^[135] Sharpless dagegen verwendete Cu(II)SO₄ und Natriumascorbat als Reduktionsmittel, das in einer minimalen Menge Wasser gelöst wurde und zur Reaktionslösung in DMF gegeben wurde.^[134] Die Konditionen wurden mit ein und zwei Äquivalenten Alkin **33** getestet. Die Experimente zeigten, dass der Einsatz von Cu(I) als Katalysator ([Cu(CH₃CN)₄]PF₆, CuI) zu höheren Ausbeuten führte. Ebenso zeigt sich, dass für eine hohe Produktausbeute mehr als ein Äquivalent des Alkins notwendig ist.

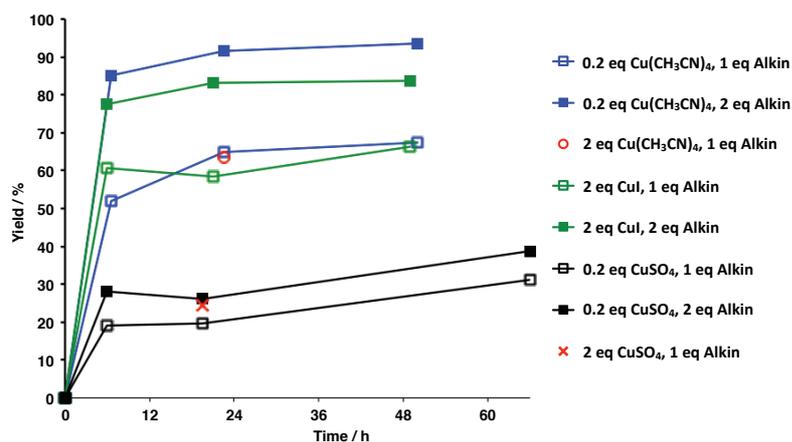
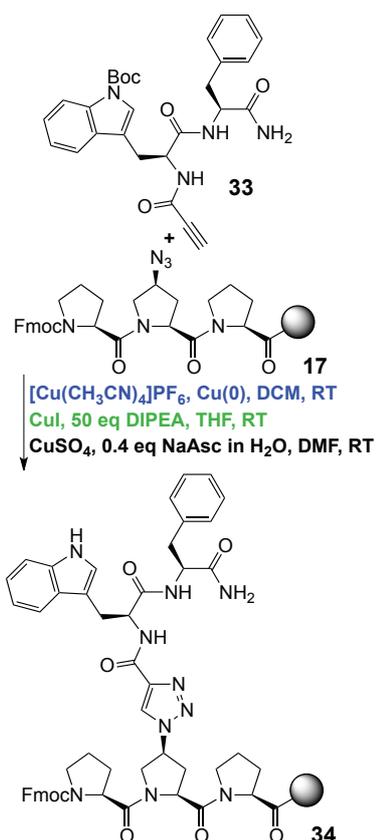


Abbildung 31. Vergleich der drei verschiedenen Kupferverbindungen in einer Modellreaktion (rechts). Die Reaktionen wurden per HPLC-Analyse von Testabspaltungen nach der spezifizierten Zeit verfolgt (oben).



Meldal beschreibt wegen der kleinen Ansatzgrösse die Verwendung einer sehr grossen Menge Katalysator (2 eq).^[135] Die Vorschrift wurde übernommen. Für CuSO₄ und [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ wurden 0.2 eq verwendet, die verglichen mit 2 eq Cu(I) keinen Nachteil hatten (rote Datenpunkte in Abb. 31). Die im Meldal-Protokoll beschriebene grosse Menge ⁱPr₂NEt ist notwendig, um die CuI-Cluster aufzubrechen, die sich in organischen Lösungsmitteln bilden.^[137] Das ist mit [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ nicht notwendig. [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ in DMF war hinsichtlich Ausbeuten und Einfachheit den beiden anderen Protokollen überlegen und wurde daher standardmässig verwendet. Aufgrund der besseren Löslichkeit der alkylierten Bombesinderivate wurde DMF statt DCM als Lösungsmittel für die "Click"-Reaktion verwendet.

Die optimierten Bedingungen ($[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$, $\text{Cu}(0)$) wurden dann für die Synthese des Hybridligands **1** auf der festen Phase erprobt. Dazu wurden die beiden alkylierten Bombesinderivate **19** (Agonist, Reaktion A) und **11** (Antagonist, Reaktion B) mit dem ans Harz gebundenen Trimer **17** via "Click"-Reaktion ligiert. Der Unterschied in der Reaktivität der beiden Bombesinderivate war deutlich. Die Reaktion A mit **19** war quantitativ, Reaktion B mit **11** unvollständig (<50%). Im nächsten Schritt wurden die beiden Oligoprolinsequenzen um ein weiteres Trimer Pro-Azp-Pro ergänzt. Das freie Azidoprolin wurde dann mit dem jeweils anderen Bombesinderivat zur Reaktion gebracht um den heterobivalenten Liganden herzustellen: Zu Reaktion A wurde Antagonist **11** gegeben, zu Reaktion B Agonist **19** (Abb. 32)

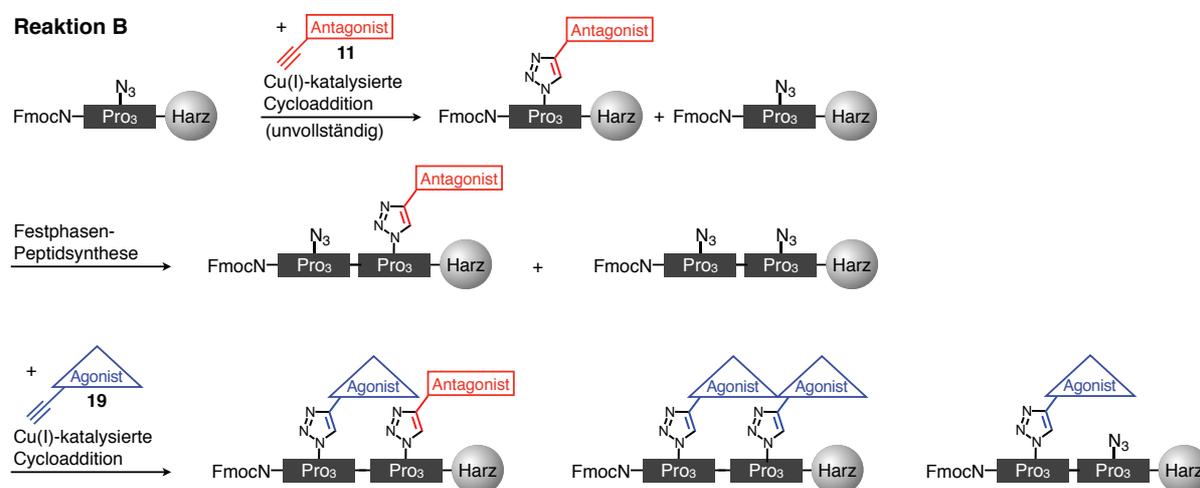


Abbildung 32. Schema der Reaktion B, die das Peakmuster der LC-MS Analyse (Abb. 33, rechts) erklärt. Bei Reaktion A wurden die beiden Alkine **11** und **19** in umgekehrter Reihenfolge ligiert.

Wie aus den LC-MS Analysen hervorgeht (Abb. 33), waren beide Reaktionen mit dem Antagonisten **11** unvollständig, anders können Peak 1 im Fall der Reaktion A, und Peak 1, 2 und 4 bei Reaktion **B** nicht erklärt werden. Dass Prs- β Ala-Bombesin(7-14) **19** reaktiver ist, zeigte sich auch daran, dass bei Reaktion B das Produkt der "Click"-Reaktion mit zwei Agonisten **19** zu erkennen ist (Peak 4).

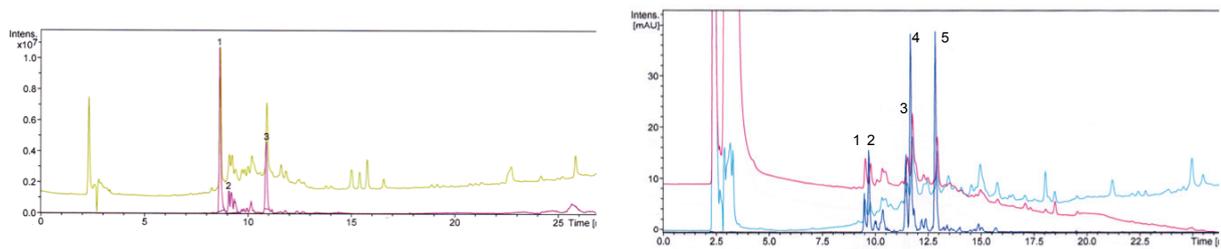


Abbildung 33. LC-MS der beschriebenen Reaktionen **A** (links) und **B** (rechts)

Peak # 1: Nur ein BBN(7-14) ligiert
Peak # 3: Produkt, BBN(7-14) und JMV594

Peak # 1: Nur ein BBN(7-14) ligiert
Peak # 2: Nur ein BBN(7-14) ligiert
Peak # 3: Nur ein JMV594 ligiert
Peak # 4: Zwei BBN(7-14) ligiert
Peak # 5: Produkt, BBN(7-14) und JMV594

Es wurde dann untersucht, ob die Reaktivität des Kupferkatalysators durch den Zusatz des Polytriazols TBTA **36** als Kupfer(I)liganden gesteigert werden kann. TBTA formt oxidationsunempfindliche Cu(I)-Komplexe und erhöht die katalytische Aktivität von Cu(I).^[148] Die Synthese von TBTA gelang in drei Schritten (Abb. 34) in einer Gesamtausbeute von 29 %.^[148]

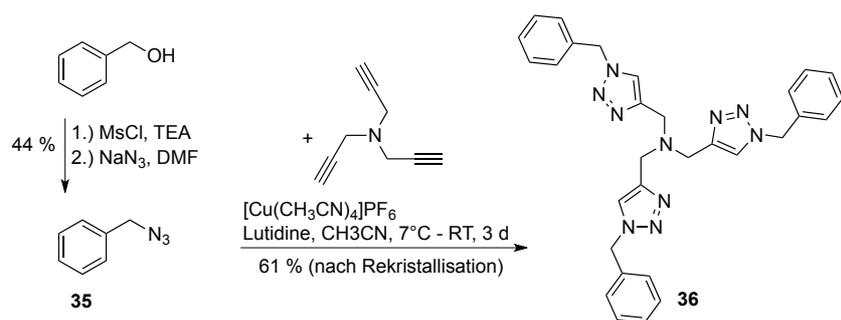


Abbildung 34. Synthese von TBTA

TBTA wurde dann sowohl bei "Click"-Reaktionen mit dem Modellpeptid **33** wie auch bei den "Click"-Reaktionen mit den alkylierten Bombesinderivaten eingesetzt. Unmittelbar wurde beobachtet, dass sich die Reaktionslösungen mit TBTA an der Luft nicht grün verfärbten, was zeigt dass die Oxidation zu Cu(II) unterdrückt wird. In einem direkten Vergleich zweier Reaktionen mit $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ als Katalysator in Kombination mit und ohne TBTA, wurde bei der Reaktion ohne TBTA mehr Produkt beobachtet. Diese Beobachtung war unabhängig vom Lösungsmittel (DCM/TFE, NMP, DMF). TBTA wurde nicht weiterverwendet, jedoch wurde um die Oxidation von Cu(I) zu reduzieren, die Lösungsmittel für die "Click"-Reaktionen entgast. Nach der Erfahrung mit den ersten Experimenten wurde auch auf den Zusatz von Cu(0), in Form von Kupferpulver, als Reduktionsmittel verzichtet.

Die beiden mit den unterschiedlichen Alkinen ausgestatteten Bombesinderivate **12** (mit Propinsäure) und **20** (mit Pesinsäure) wurden hinsichtlich ihrer Eignung für "Click"-Reaktionen untersucht. Dafür wurden sie mit Boc-Prolin-(4*S*)-Azidoprolinmethylester **25** in Lösung, und mit Fmoc-(Pro-(4*S*)Azp-Pro)₂ **18**, an der festen Phase gebunden, umgesetzt. Dabei reagierte das mit Propinsäure derivatisierte Bombesin quantitativ mit dem Dipeptid **25** in Lösung. Das immobilisierte Hexapeptid **18** mit zwei Azidoprolinen reagierte zu einem Drittel zur monovalenten Verbindung, zu einem Drittel zur divalenten Verbindung und blieb zu einem Drittel unverändert. Dagegen liess sich unter den selben Bedingungen ([Cu(CH₃CN)₄PF₆, DMF, Cu(0), 72h, RT) mit dem Pentinsäure-Bombesinderivat kein vollständiger Umsatz im Falle der Reaktion in Lösung erzielen und auf der festen Phase wurde keinerlei Produkt gebildet. Die elektronenarme Dreifachbindung des Propinamids **12** erwies sich daher wie erwartet als reaktiver im Vergleich zum Pentinamid und wurde für alle weiteren Studien verwendet.

Die Reaktionszeiten von mehreren Tagen bei Raumtemperatur liessen sich durch den Einsatz der Mikrowelle (60 – 80°C) auf wenige Stunden (2 – 4h) reduzieren. Die Effizienz der Ligation der alkinylierten Bombesinderivate, insbesondere des Antagonisten **11**, mit den Festphasen-gebundenen Oligoprolinen konnte damit jedoch nicht gesteigert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die angestrebten Oligoprolin-Bombesinkonjugate durch "Click"-Reaktion mit keiner der untersuchten Bedingungen an der festen Phase zuverlässig und effizient realisierbar waren. Limitierend war die aus unbekanntem Gründen eingeschränkte Reaktivität des alkinylierten Antagonisten **11**. Daher wurde Strategie **B** untersucht.

3.6.2. Strategie B: "Click"-Reaktionen in Lösung

Die Alternative zur Ligation der Oligoprolin-Bombesinkonjugate durch eine "Click"-Reaktion an der festen Phase ist die vorherige Synthese der Bombesin-konjugierten Oligoprolin in Lösung, die dann an der festen Phase aneinander gereiht werden (Abb. 21). Dazu wurde untersucht, unter welchen Bedingungen das alkinylierte Bombesin **12** und das azidofunktionalisierte Prolintrimer **13** am besten miteinander reagieren (Abb. 35)

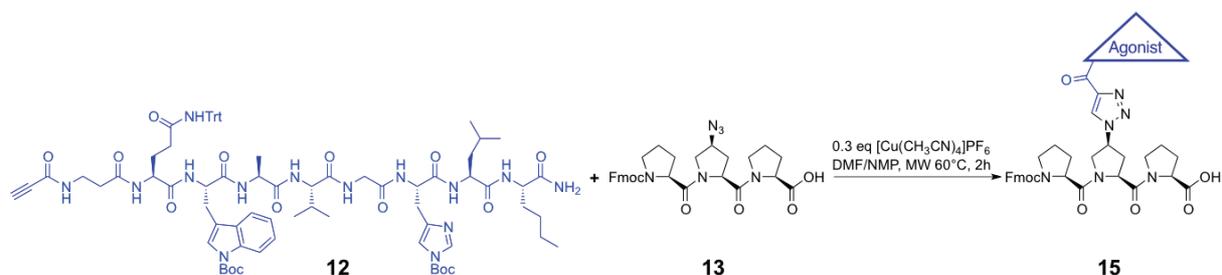


Abbildung 35. "Click"-Reaktion zur Ligation des Bombesinderivats **12** mit dem Fmoc-geschützten trimeren Baustein Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH **13**

Der Einfluss des Lösungsmittel, der Temperatur und unterschiedlicher Mengen Kupfer(I) wurde untersucht. Aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit des geschützten Bombesinderivats **12** konnten keine wasserhaltigen Lösungsmittelgemische verwendet werden, wie in dem Kupfer(II)sulfat/Natriumascorbat Protokoll von Sharpless.^[134] Verwendet wurde daher erneut DMF als Lösungsmittel in Kombination mit $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ als Kupfer(I)-Salz, dessen Menge variiert wurde. Vergleichend wurde die Reaktion in dem ebenfalls polaren, aprotischen Lösungsmittel NMP, durchgeführt. Es wurde kein $\text{Cu}(\text{O})$ oder andere Reduktionsmittel hinzugegeben. Zu definierten Zeitpunkten wurde ein Aliquot der homogenen Reaktionsgemische A-F mittels HPLC analysiert (Abb. 36).

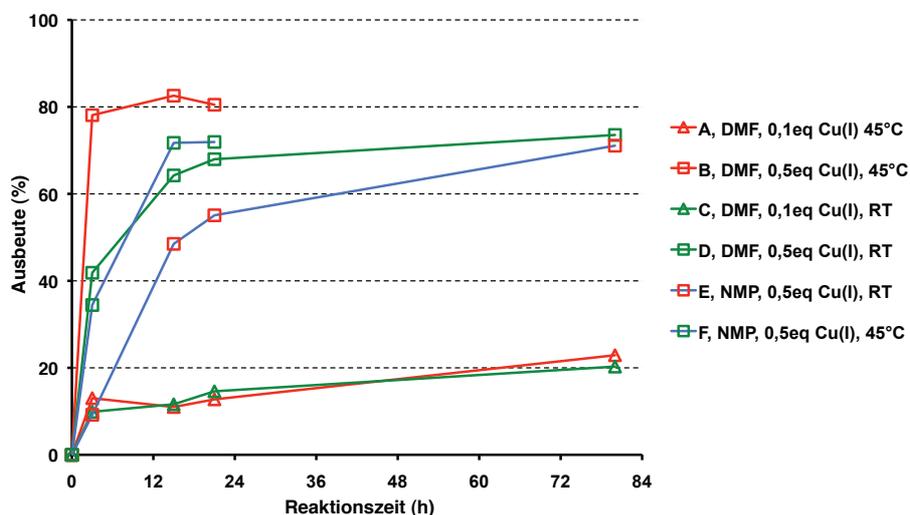


Abbildung 36. Konditionen für die "Click"-Reaktion in Lösung und die daraus resultierende zeitabhängige Ausbeute anhand der Reaktion von **12** mit **13**

Die Reaktion zwischen **12** und **13** lief am schnellsten unter den Bedingungen von Reaktion B. Bei 45°C in DMF mit 0.5 eq $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ waren bereits nach drei Stunden fast 80 % der Edukte umgesetzt wonach der Umsatz, vermutlich wegen der

Oxidation des Cu(I) zu Cu(II) stagnierte. Aus dem gleichen Grund lieferten die Ansätze mit nur 0.1 eq $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ nur Ausbeuten von ca. 20 % (A & C). Als Konsequenz wurden die folgenden Reaktionen mit 0.3 eq in entgastem Lösungsmittel unter Argonatmosphäre durchgeführt, um weiter auf Zusätze wie TBTA oder Cu(0) verzichten zu können. Die Reaktion B und D in DMF erwiesen sich als schneller als die Reaktionen E und F in NMP, bei den ansonsten gleichen Bedingungen. Ein deutlicher Temperatureinfluss auf die Reaktionsrate war ebenfalls zu beobachten.

Mit den optimierten Bedingungen wurde untersucht, ob es wie bei der "Click"-Reaktion auf der festen Phase, ebenfalls einen Unterschied in der Reaktivität des alkylierten Agonisten **12** und des Antagonisten **11** gibt (Abb. 37).

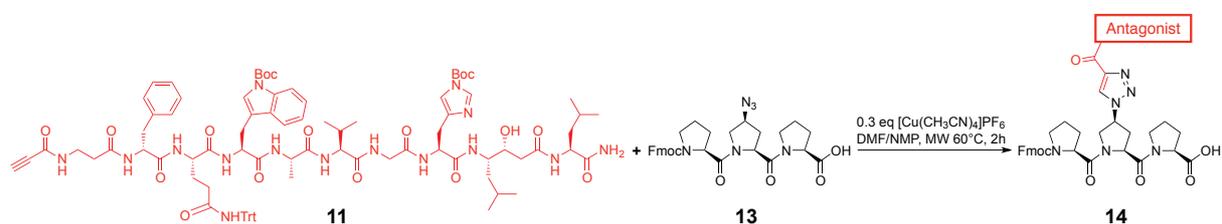


Abbildung 37. "Click"-Reaktion zur Ligation des Bombesinderivats **11** mit einem Fragment des Oligoprolin-Gerüsts in Lösung

Um die Oxidation und damit Deaktivierung des Cu(I)-Katalysators zu vermeiden, wurde das Lösungsmittel entgast. Als Lösungsmittel wurde ein Gemisch aus DMF und NMP (2:1) verwendet, um die Reaktionsmischung mit dem Produkt direkt zur Peptidsynthese auf der festen Phase verwenden zu können. Das Alkin **11** wurde in einem minimalen Überschuss (1.1 eq) eingesetzt. Damit wurde sichergestellt, dass das Azid **13** quantitativ verbraucht wird, da nicht-umgesetzter Prolinbaustein **13** in einer anschließenden Peptidkopplung ebenfalls reagieren könnte. Die Temperatur wurde auf 60°C gesteigert, als Heizquelle diente eine Mikrowelle, in der die Reaktion in einem verschlossenen, gasdichten Glasgefäß durchgeführt wurde. So wurde auch der Antagonist **11** quantitativ mit dem trimeren Peptid **13** ligiert. Die beiden Bombesinderivate **11** und **12** wiesen beide die gleiche Reaktivität auf (Abb. 38). Die Produkte **14** und **15** wurden direkt zur Peptidsynthese auf der festen Phase genutzt.

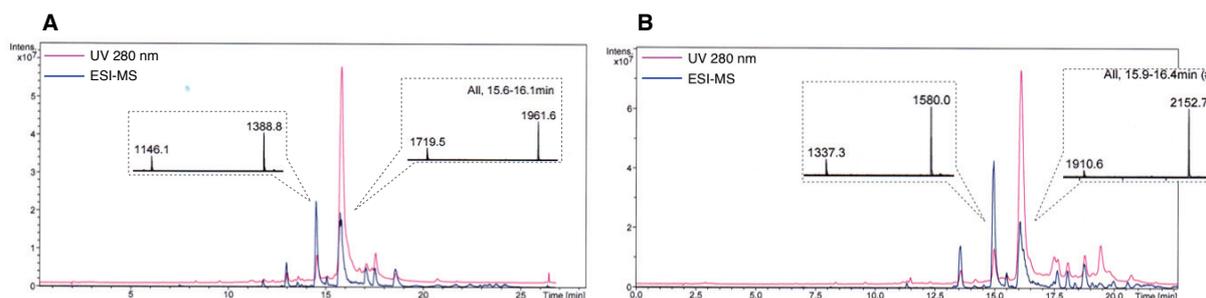


Abbildung 38. LC-MS der Reaktionslösungen. **A** Produkt **15** ($M = 2060.35$ g/mol, MS zeigt Verlust einer Boc-Gruppe) und überschüssiges Edukt **12** ($M = 1487.74$ g/mol, ebenfalls ohne eine Boc-Gruppe) **B** Produkt **14** ($M = 2251.58$ g/mol, MS zeigt Verlust einer Boc-Gruppe) und Edukt **11** ($M = 1678.97$ g/mol, ebenfalls ohne eine Boc-Gruppe)

Zusammengefasst ergaben die Untersuchungen zur Optimierung der “Click“-Reaktionen die folgenden optimierten Bedingungen für die Ligation des Prolin-Trimers **13** und der Bombesinderivate **11** und **12** mittels kupferkatalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition:

- 1 eq Azid 1.1 eq Alkin 0.33 eq $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$
- 2:1 DMF/NMP (entgast) Konz. der Edukte **11** und **12** ≈ 75 mM
- 2h Mikrowelle bei 60°C

Beim nächsten Syntheseschritt, dem Zusammensetzen der Bausteine an der festen Phase, zeigte sich eine Nebenreaktion des Kupferkatalysators (Kapitel 3.7.), die zu Abbruchfragmenten führte. Mit polymergebundenem EDTA-Chelator kann das Kupfer jedoch nach der Reaktionslösung entfernt werden.

3.6.2.1. Reinigung der Bombesin-funktionalisierten Prolintrimere **14** und **15**

Es wurde untersucht, ob die Bausteine **14** und **15** mittel MPLC (C-18 Reversed-Phase Kieselgel) gereinigt werden können. Auf der MPLC wurde als Laufmittel ein DMF/Wasser und ein DMF/Acetonitril Gemisch verwendet, um ein Ausfallen des Produkts auf der Säule zu vermeiden^[149]. Die beiden HPLC Chromatogramme von dem Baustein **14** vor und nach der Aufreinigung zeigen (Abb. 39), dass durch die MPLC Reinigung eine Steigerung der Reinheit möglich ist. Aus den 114 mg unaufgereinigtem **14**, das auf die MPLC in 2 Läufen aufgetragen wurde, konnten 73 mg (64 %) aufgereinigtes Peptid gewonnen werden.

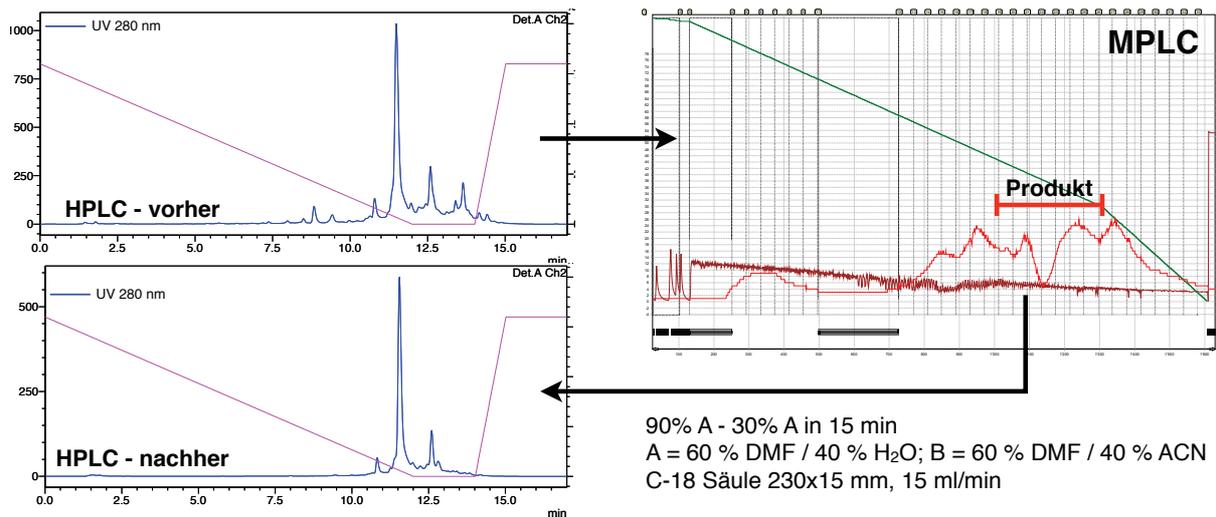


Abbildung 39. Aufreinigung von **14** via MPLC. Die Fraktionen wurden mittels analytischer HPLC charakterisiert. Die reinsten Produktfraktionen (roter Balken) wurden vereinigt und erneut mittels HPLC analysiert ("HPLC nachher"). Das UV-Signal des MPLC Detektors spiegelt nicht die HPLC Chromatogramme wieder. Der Effekt kann auf Probleme mit dem Detektor (Lampe mit geringer Intensität) oder auf eine ungleichmässige Verteilung des Analyten auf der Säule zurückzuführen sein.

3.7. Verknüpfung der Bausteine auf der festen Phase

Für die Verknüpfung der Bausteine **14** und **15** an der festen Phase wurde untersucht, unter welchen Bedingungen die besten Kupplungsausbeuten erzielt werden können. Dazu wurden die Uroniumsalze HATU und COMU,^[150] mit den Phosphoniumsalzen PyBOP und PyBrOP als Kupplungsreagenzien verglichen (Abb. 40). PyBrOP ist ein sehr gutes Kupplungsreagenz für N-methylierte Aminosäuren und lieferte bessere Ergebnisse als das ähnliche PyBOP und wurde daher auch für die Verknüpfung der Bausteine getestet.^[151] Für die Kupplungen wurde direkt die Reaktionslösung der vorherigen "Click"-Reaktion verwendet, mit Kupplungsreagenz und ⁱPr₂NEt versetzt und auf das Harz gegeben.

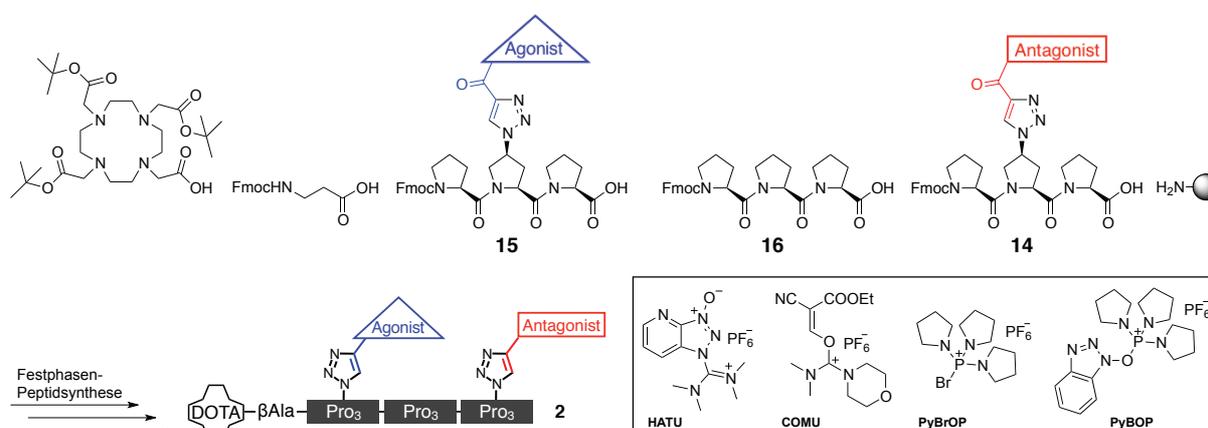


Abbildung 40. Zusammenfügen der Bausteine – hier am Beispiel der Synthese von Hybridligand **2** und die dafür untersuchten Kupplungsreagenzien

Zunächst wurde in zwei parallelen Ansätzen, einer mit HATU und einer mit PyBOP als Kupplungsreagenz, erst Baustein **11** und dann Baustein **12** an die feste Phase gekuppelt. Die LC-MS Analysen von Proben der Reaktionen zeigen, dass HATU das aktivere Reagenz für diese Kupplung ist (Abb. 41), der Produktanteil ist deutlich grösser und überwiegt die Fragmente unvollständiger Kupplungen.

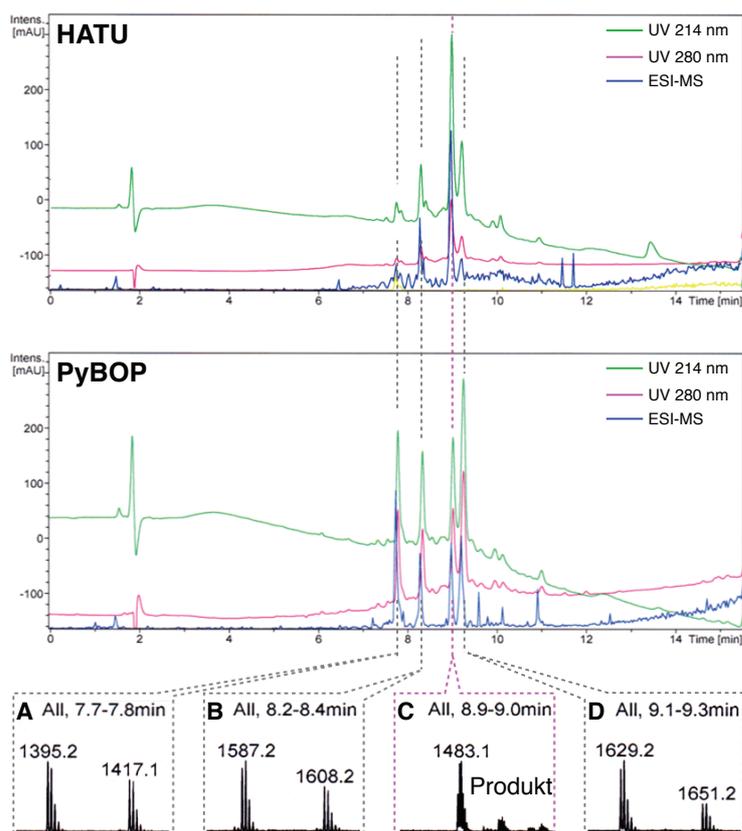


Abbildung 41. Testabspaltungen der beiden Ansätze, analysiert via LC-MS. Der Peak C kann dem Produkt zugeordnet werden ($[M+2H]^2+$, **11** und **12** wurden gekuppelt). **A**, **B** stellen Fragmente unvollständiger Kupplungen dar (nur **12** oder nur **11**), **D** entspricht dem acetylierten Fragment der Kupplung von **11**.

In einem weiteren Vergleich wurde HATU mit PyBroP und dem neuartigen COMU verglichen. Ebenfalls wurde untersucht, ob die Kupplungen auch bei erhöhten Temperaturen in der Mikrowelle durchgeführt werden können, um damit die Reaktionszeiten zu verkürzen.

Dazu wurden in neun parallelen Ansätzen vier Kupplungen mit den Bausteinen **15** und **16** an der feste Phase durchgeführt (Abbildung 42 A). Jede Kupplungsreagenz wurde bei drei Bedingungen evaluiert: 2 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur, 10 min. bei 80° C in der Mikrowelle und 20 min. bei 80°C in der Mikrowelle. Bei den neun Peptidsynthesen wurde jede einzelne Kupplung durch einen quantitativen Fmoc-Test (UV-Absorption bei 301 nm) bewertet, in allen Fällen verringerte sich die Kupplungsausbeute von Schritt zu Schritt deutlich (Abb.42 B).

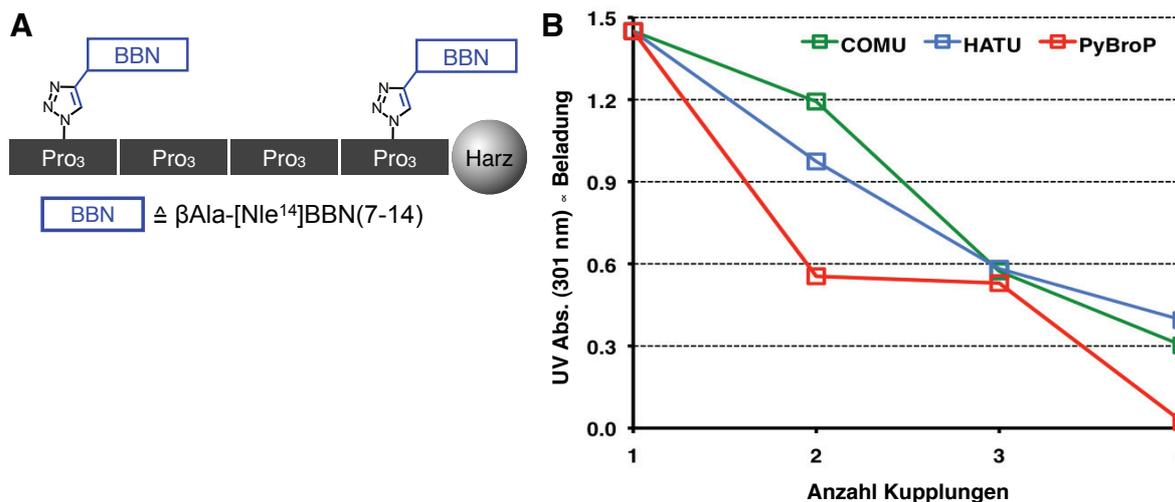


Abbildung 42. A synthetisierte Peptidsequenz **B** Entwicklung der Kupplungsausbeuten (angegeben als UV Absorption des Fmoc-Tests), Fmoc-Test nach der ersten Kupplung als 100% definiert. Jede der drei Kurven stellt den Mittelwert der drei Synthesen dar, die mit der entsprechenden Kupplungsreagenz durchgeführt wurden (2h RT, 10 min MW 80°C, 20 min MW 80°)

HATU und COMU führten zu ähnlichen Ergebnissen, PyBroP lieferte das schlechteste Ergebnis. Die Temperatur (bei angepasster Reaktionszeit) beeinflusst das Ergebnis nicht signifikant, 10 Minuten in der Mikrowelle bei 80°C erwiesen sich als vergleichbar mit 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Zusammenfassen lässt sich, dass die besten Ergebnisse mit HATU und COMU als Kupplungsreagenz erzielt wurden. Durchgeführt wurden die Synthesen der Liganden daraufhin typischerweise mit drei Äquivalenten der Bausteine, bei einer Reaktionsdauer von 2-3 Stunden bei Raumtemperatur. Weitere Optimierungen der Kupplungen gelangen nicht, im Einzelfall wurden Doppelkupplungen angewandt um die Produktausbeute zu erhöhen. Weniger aufwändige Bestandteile der Liganden wie β -Alanin und der Triprolin-Spacer **13** wurden mit 4-5 Äquivalenten gekuppelt.

Die Ausbeuten bei den Kupplungen der Triazole **14** und **15** wurden reduziert durch eine Nebenreaktion des Kupfer-Katalysators $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$: Bei LC-MS Analysen fielen teilweise acetylierte Fragmente (+42 m/z) auf, obwohl in den Synthesen nicht acetyliert wurde. Der Kupferkatalysator wurde als mögliche Ursache für diese Nebenreaktion, die zu einem unvollständigen Fragment führt untersucht. Die Hypothese ist, dass Cu(I) und insbesondere die oxidierte Spezies Cu(II) die Acetonitril-Liganden des Komplexes gegenüber einem nukleophilen Angriff aktivieren, und diese mit einem Amin reagieren.

Spuren von Wasser im Lösungsmittel DMF hydrolisieren das Addukt sofort und es resultiert ein Acetylrest (Abbildung 43).

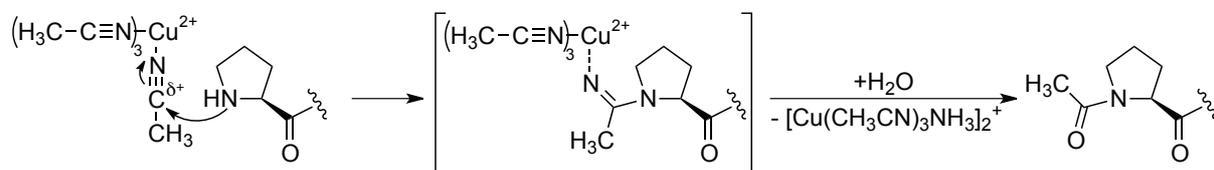


Abbildung 43. Vorgeschlagener Mechanismus der unbeabsichtigten Acetylierung

In einem Experiment mit Prolinmethylester und dem Katalysator $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ wurde die Reaktion nachvollzogen. Es bildete sich das acetylierte Produkt. Mit polymergebundenem-EDTA kann vor der Kupplung das Kupfer aus der Reaktionslösung entfernt werden, um die Produkt/Kupplungsausbeuten zu steigern.

Über Strategie B sind die Hybridliganden **1-3**, wie auch die mono- und bivalenten Liganden **4-10** in geringen Ausbeuten synthetisch zugänglich. Die Ligation des Antagonisten **11** mit dem Oligoprolin-Gerüst gelang nach Strategie B effizienter als mit Strategie A. Strategie A ist für andere alkylierte Substrate trotzdem von Bedeutung und wurde in der Masterarbeit von Patrick Wilhelm erfolgreich für die Synthese von Oligoprolin-Octreotidkonjugaten angewandt.^[146]

3.7.1. HPLC Aufreinigung und Charakterisierung der Liganden

Die geringen Produktausbeuten der Ligandensynthesen machten eine sorgfältige Aufreinigung mittels HPLC notwendig. Nach der Aufreinigung lag die Ausbeute an Bombesin-Oligoprolinkonjugat bei 0.1 – 0.5 μmol (1-5 %), die Reinheiten bei ca. 95 %. Da für die späteren *in vitro* und *in vivo* Evaluierungen pro Assay nur 5 – 8 nmol benötigt wurden, waren die geringen Ausbeuten trotzdem ausreichend.

Die Charakterisierung der Oligoprolin-Bombesinkonjugate mittels ESI-LC-MS und HR-MS bestätigte die Reinheit und Identität der Liganden.

Zur weiteren Charakterisierung der Liganden wurden CD-spektroskopische Untersuchungen mit zwei Modellverbindungen vorgenommen, um die erwartete PPII-Konformation des Oligoprolin-Gerüsts zu bestätigen (Abb. 44).

Die zwei monovalenten Verbindungen **37** und **38** enthalten 8 CD-aktive Prolin-Prolin Bindungen und ein agonistisches oder antagonistisches Bombesinderivat, von dem

ebenfalls ein CD-Signal zu erwarten ist. Analysiert wurden die Verbindungen jeweils als Indium(III)-Komplex.

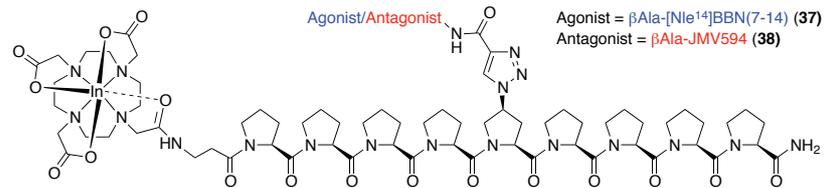


Abbildung 44. Verbindungen für CD-Spektroskopische Untersuchungen

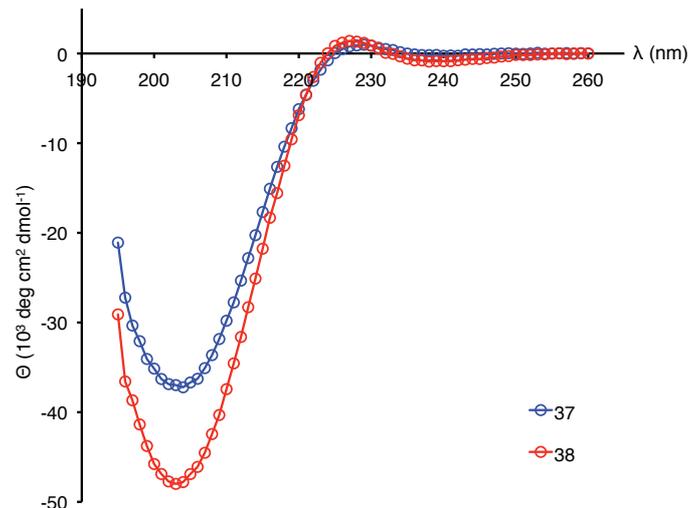


Abbildung 45. CD Spektren der Verbindungen **37** und **48**. Aufgenommen bei einer Konzentration von 35 μ M jeweils als Dreifachmessung, die Werte sind normalisiert auf 260 nm = 0 Θ .

In dem betrachteten Wellenlängen Bereich zeigen die zwei Verbindungen Spektren wie sie für Peptide in der PPII Konformation erwartet werden (Abbildung 45). Die Minima bei 203-204 nm sind stark ausgeprägt und auch die Maxima bei 226-229 nm sind vorhanden. Bemerkenswert ist, dass auf den ersten Blick kein Beitrag der Bombesinderivate zu den Spektren zu erkennen ist – auch wenn das Spektrum des Agonisten **27** ein weniger ausgeprägtes Minimum aufweisen. Weitere CD-spektroskopische Studien finden sich im Anhang (Kapitel 7.3.).

3.8. Neue Syntheseroute für NODAGA(^tBu₃)

NODAGA ist ein bifunktionseller Chelator, der aufgrund der hohen Komplexstabilität insbesondere für die Radiomarkierung mit dem Positronenemitter Gallium(III)-68 (PET) interessant ist, aber auch für Indium(III)-111 (SPECT) und Kupfer(II)-64 (PET) genutzt werden kann. NODAGA(^tBu₃) kann mit der freien Carboxylfunktion einfach an Peptide gekuppelt werden.

Der Chelator ist zu hohen Preisen kommerziell erhältlich (100 mg 250 €, Chematech), die bisher bekannte Synthese geht von dem komplett entschützten 1,4,7-Triazacyclononan (TACN) aus, das bei der Alkylierung mit α -Bromglutarsäure-1-*tert*-butylester-5-benzylester **43** in einem Überschuss eingesetzt werden muss, um eine Überalkylierung zu vermeiden (Abb. 46).^[152,153]

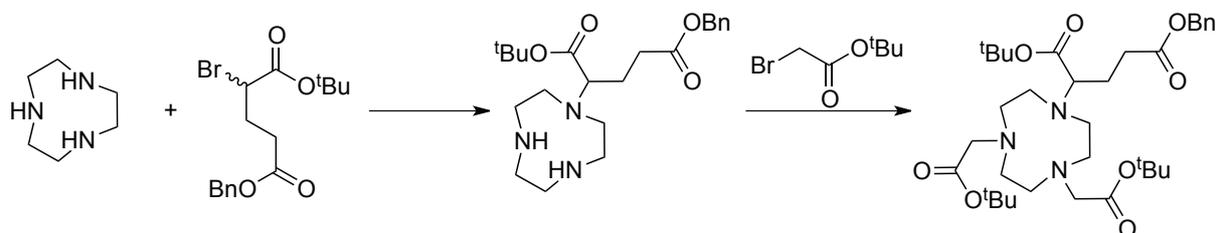


Abbildung 46. Bisherige Syntheseroute zu NODAGA(^tBu₃)

TACN kann entweder gekauft werden (100 mg 105 €, Aldrich) oder selbst synthetisiert werden. Dabei ist die Detosylierung des 1,4,7-Tritosyl-TACN der Schlüsselschritt, der in heißer, konzentrierter Schwefelsäure erfolgt. Das Problem ist die anschließende Extraktion des sehr basischen Produkts aus der konzentrierten Schwefelsäure.

Daher sollte untersucht werden, wie die NODAGA-Synthese optimiert werden kann. Die vorgeschlagene Synthese folgt der Syntheseroute eines anderen TACN-basierten Chelators.^[154,155]

Es wird ausgenutzt, dass in HBr/Eisessig nur zwei der drei Tosylgruppen von 1,4,7-Tritosyl-TACN abgespalten werden (**48**, Abb. 47).^[156] Daraufhin können die beiden freien Amine mit Bromessigsäure-*tert*-butylester alkyliert werden (**49**). Die verbleibende Tosylgruppe kann aufgrund der *tert*-Butylester nicht sauer abgespalten werden, aber mittels Ein-Elektron-Transfer (engl.: Single Electron Transfer = SET) kann reaktiv detosyliert werden (**50**). Anschliessende Alkylierung mit dem bromierten Glutarsäurederivat liefert das dreifach alkylierte TACN (**51**). Nach einer Hydrierung wird das Produkt erhalten (**52**, Abb. 47).

Zur Reduktiven Detosylierung gibt es verschiedene Möglichkeiten,^[157] untersucht wurde eine modifizierte Birch-Reduktion mit Lithium in Propylamin und Ethylendiamin,^[158] und Naphthylnatrium als Reduktionsmittel.^[159,160] Ausserdem wurde die Detosylierung mit Magnesium in Methanol ausprobiert, die aber kein Produkt ergab.

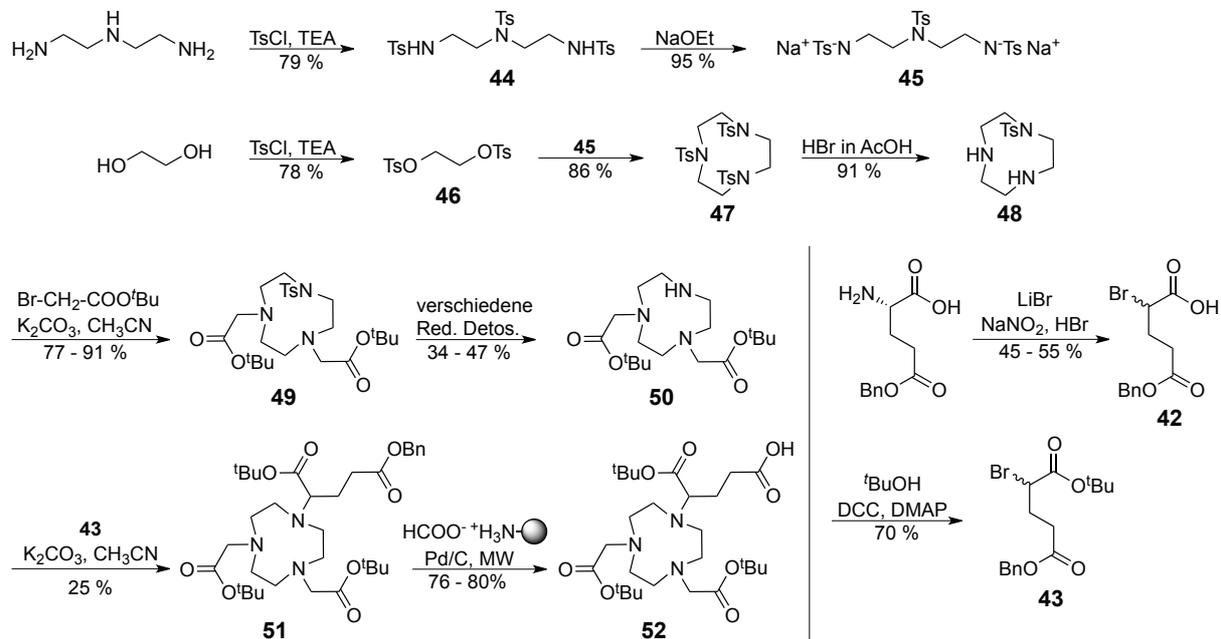


Abbildung 47. Beschriebene Syntheseroute zu NODAGA(^tBu₃)

Zur Synthese des TACN wurde nach Vorschrift von Richman und Atkins gearbeitet.^[154,161] Dazu wurden Diethylentriamin und Ethylenglykol in hohen Ausbeuten tosyliert (**44** und **46**), das Tritosyldiethylentriamin **44** wurde mit Natriumethanolat deprotoniert, das entsprechende Dinatriumsalz **45** konnte in hoher Ausbeute isoliert werden. Der Ringschluss aus **45** und **46** um 1,4,7-Tritosyltriazacyclononan zu synthetisieren gelingt zuverlässig in hoher Ausbeute und liefert ausschliesslich das reine Produkt **47**. Nach Detosylierung in Bromwasserstoffsäure in Eisessig kann leicht 1-Tosyl-1,4,7-triazacyclononan **48** in hoher Ausbeute und Reinheit isoliert werden. Die Alkylierung mit Bromessigsäure-*tert*-butylester gelingt ebenfalls in hoher Ausbeute, nach diesem Schritt ist die erste säulenchromatographische Reinigung notwendig. Alle vorherigen Produkte wurden entweder direkt rein erhalten oder durch Aufkochen in Ethanol gereinigt.

Die modifizierte Birch-Reduktion lieferte das detosylierte Produkt in variierenden Ausbeuten, typisch waren 30 %. Mit der reductiven Detosylierung durch Naphthylnatrium konnten Ausbeuten um 50 % erzielt werden. Vorteil der modifizierten Birch-Reduktion war die einfachere Aufarbeitung und es musste kein Naphthylnatrium

vorbereitet werden, dafür waren die Ausbeuten etwas niedriger. Es konnte kein Einfluss auf die Ausbeute festgestellt werden, wenn die Amine vor der Reaktion getrocknet wurden (z.B. Molekularsieb, Destillation über CaH_2), die sonst verwendeten Amine in hoher kommerzieller Qualität waren ausreichend trocken.

Die Alkylierung mit α -Bromglutarsäure **43**, die vorher in moderater Ausbeute synthetisiert worden war,^[162,163] gelang nur in niedrigen Ausbeuten von 25 %. Für die Transfer Hydrogenierung zur Abspaltung der Benzylgruppe wurde Ammoniumformiat verwendet, das auf Polystyrol immobilisiert war. Das erlaubt eine sehr einfache Aufarbeitung, da der heterogene Palladiumkatalysator und das Ammoniumformiat abfiltriert werden können, und nach Entfernen des Lösungsmittels das reine Produkt **52** in hoher Ausbeute erhalten wird.^[164]

Mit der neuen Strategie konnte NODAGA($t\text{Bu}_3$) synthetisiert werden. Auf der neuen Route wurde umgangen, dass das unter harschen Bedingungen zu synthetisierende TACN im Überschuss eingesetzt werden muss. Die Ausbeuten der reduktiven Detosylierung sind jedoch noch zu niedrig und es bedarf dem Studium weiterer Methoden, um die Detosylierung effizienter ausführen zu können.

4. Biologische Evaluierung der Liganden

Für die biologische Evaluierung der Liganden in *in vitro* Experimenten wurden GRP-R überexprimierende, humane Prostata-Adenokarzinom Zellen (PC-3) verwendet. Die Liganden wurden dazu jeweils mit dem β - und γ -Strahler Lutetium-177 markiert. Die radiomarkierten Liganden **1–10** wurden zu den kultivierten PC-3 Zellen gegeben, um folgende Fragen zu beantworten:

- Werden die Liganden internalisiert oder bleiben sie an der Oberfläche der Zellen gebunden? (Kapitel 4.1.)
- Wie effizient werden die Liganden internalisiert? (Kapitel 4.1.)
- Ist die Bindung und die Aufnahme in die Zellen Rezeptor-vermittelt oder unspezifisch? (Kapitel 4.1.)
- Wie schnell werden die Liganden externalisiert? (Kapitel 4.2.)
- Wie hoch ist die Bindungsaffinität der Liganden zum Rezeptor? Wie viele Bindungsstellen existieren für die verschiedenen Liganden? (Kapitel 4.3.)

Für die Zelleexperimente wurden die Liganden **1–10** mit Lutetium-177 ($t_{1/2} = 6,734$ d, β & γ) markiert (Kapitel 6.9). Alle Liganden konnten mit $^{177}\text{LuCl}_3$ in hoher radiochemische Ausbeute markiert werden (> 90%). Standardmäßig wurden 5 nmol der DOTA-haltigen Liganden verwendet, um 1 – 1.5 mCi (37 – 55 MBq) $^{177}\text{Lu}^{3+}$ zu komplexieren. So resultierte eine spezifische Aktivität von 7 – 11 MBq/nmol.

Für die *in vivo* Experimente (PET und Biodistributionen, Kapitel 6.10) wurden die Liganden **1, 2** und **8** mit dem Positronenemitter Gallium-68 ($t_{1/2} = 67.7$ min, $\bar{E}_{\beta^+} = 740$ keV, 89%) markiert. Es wurden 7 nmol Ligand eingesetzt um etwa 400 MBq frisch-eluiertes $^{68}\text{Ga}^{3+}$ zu komplexieren. Dies gelang mit hoher radiochemischer Ausbeute (> 95 %) und mit einer spezifischen Radioaktivität von 57 MBq/nmol.

4.1. Studien zur Internalisierung der Bombesin-Oligoprolinkonjugate

Die *in vitro* Experimente zur Internalisierung sollen zeigen, in welchem Maß die Liganden an die Rezeptoren binden und internalisiert werden. Anhand des Verhaltens der unterschiedlichen Liganden, sollte eine erste Bewertung vorgenommen werden, welche der Liganden für optimiertes Tumor Targeting geeignet sind. Ausserdem wurde

untersucht, wie die Bivalenz und Heterobivalenz die Internalisierung beeinflusst und welche Rolle dabei der Abstand zwischen den Bindungselementen spielt. Verglichen werden die bivalenten- und heterobivalenten Liganden mit den monovalenten Liganden, die synthetisiert wurden und mit den etablierten Verbindungen AMBA (Agonist) und RM1 (Antagonist).

Die Internalisierungsexperimente erfolgten nach einem etablierten Protokoll. Dafür wurde der radiomarkierte Ligand auf PC-3 Zellen in mehreren Mikrotiterplatten gegeben und inkubiert. Pro untersuchtem Zeitpunkt wurde eine Platte nach dem dargestellten Schema bearbeitet (Abb. 48). Die ungebundenen (freien) Liganden, wurden mit dem Medium entfernt, oberflächlich gebundene Liganden wurden mit saurem Glycin-Puffer von den Rezeptoren gelöst und durch Lysierung der Zellen mit Natronlauge wurden die internalisierten Liganden freigesetzt. Die einzelnen Fraktionen (frei, gebunden und internalisiert) wurden im γ -Counter gemessen. Daraus ergab sich eine prozentuale Verteilung, in den folgenden Diagrammen sind jeweils die gebundene und die internalisierte Fraktion dargestellt.

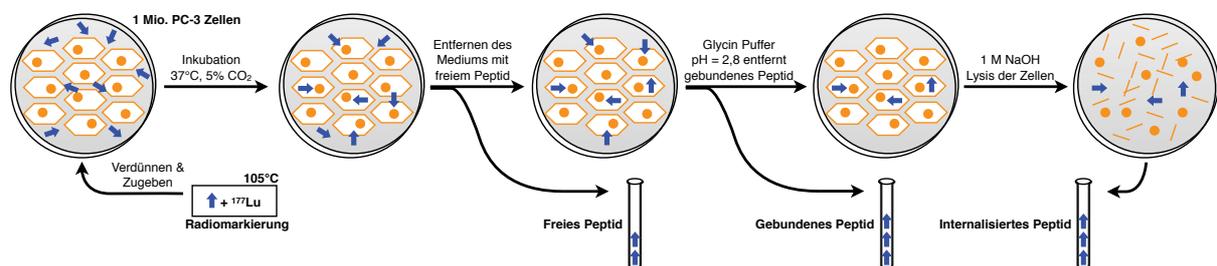


Abbildung 48. Arbeitsschritte des Internalisierungsexperiments. Die blauen Pfeile stellen die Liganden dar, die Zellen sind in orange.

Zur Unterscheidung zwischen unspezifischer und spezifischer, rezeptorvermittelter Bindung und Internalisierung wurde ein Teil der Zellen mit einem Überschuss eines bekannten GRP-R Agonisten bzw. Antagonisten prä-inkubiert, um die GRP-Rezeptoren zu sättigen. Jedwede Bindung und Internalisierung der radiomarkierten Liganden, die trotzdem stattfindet, wird als unspezifisch gewertet. Diese Experimente zeigen, dass alle hier aufgeführten Liganden spezifisch binden und internalisiert werden.

4.1.1. Internalisierungsexperimente mit agonistischen Liganden

Die Ergebnisse der Internalisierungsexperimente mit den vier rein agonistischen Bombesin-Oligoprolinkonjugaten sind in Abbildung 49 und in Tabelle 6 zusammengefasst, sie wurden mit denen des etablierten agonistischen Liganden [¹¹¹In]-AMBA verglichen.

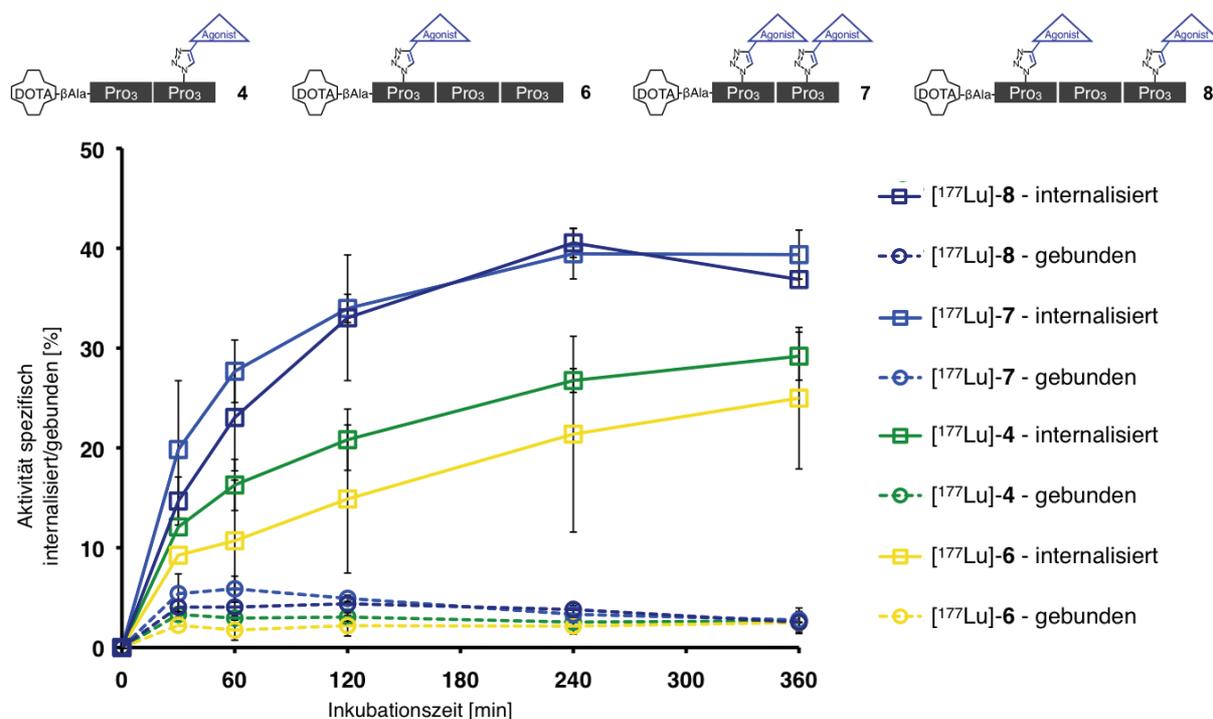


Abbildung 49. Internalisierungsexperimente mit den agonistischen Bombesin-Oligoprolinkonjugaten

Tabelle 6. Internalisierungsexperimente mit den agonistischen Bombesin-Oligoprolinkonjugaten

Ligand	Internalisierung 360 min (%)	Oberflächliche Bindung 360 min (%)	Anzahl Experimente (Wiederholungen)
[¹⁷⁷ Lu]-4	29.2 ± 2.4	2.7 ± 0.6	3
[¹⁷⁷ Lu]-6	25.0 ± 7.1	2.5 ± 1.1	2
[¹⁷⁷ Lu]-7	39.4 ± 2.5	2.8 ± 1.2	2
[¹⁷⁷ Lu]-8	36.9 ± 0.8	2.5 ± 0.1	2
[¹¹¹ In]-AMBA	29.0 ± 2.3	4.3 ± 0.3	

2.5 pmol radiomarkierter Ligand / 1 Mio. Zellen. Daten für [¹¹¹In]-AMBA nach 240 min. aufgenommen.^[22] Die Internalisierungsexperimente zu **8** wurden von Eleni Gourni (Universitätsklinikum Freiburg) durchgeführt.

Wie für Agonisten erwartet, zeigen die Resultate dass alle vier Verbindungen internalisiert werden. Nur ein kleiner Prozentsatz bleibt gebunden ohne internalisiert zu werden. Die spezifische Internalisierung ist hoch, die internalisierte Fraktion der beiden monovalenten Liganden **4** und **6** liegt im Bereich des bekannten Agonisten [¹¹¹In]-AMBA. Dies zeigt, dass das konjugierte Oligoprolin Gerüst die Internalisierung nicht beeinträchtigt. Die beiden divalenten Liganden **7** ($d = 10 \text{ \AA}$) und **8** ($d = 20 \text{ \AA}$)

werden zu einem grösseren Anteil internalisiert als die monovalenten Liganden **4** und **6**. Die Daten zeigen, dass die Bivalenz zu einer höheren Aufnahme in die Zelle führt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden bivalenten Agonisten mit unterschiedlichem Abstand zwischen den Bindungselementen (10 und 20 Å) beobachtet werden. Das Bombesin-Oligoprolinkonjugat **8** wurde in *in vivo* Experimenten weiter studiert (Kapitel 4.4.4.).

4.1.2. Internalisierungsexperimente mit antagonistischen Liganden

Die Ergebnisse der Internalisierungsexperimente mit den drei Bombesinantagonist-Oligoprolinkonjugaten sind in Abbildung 50 und in Tabelle 7 zusammengefasst, sie wurden mit denen des etablierten Antagonisten [¹¹¹In]-RM1 verglichen.

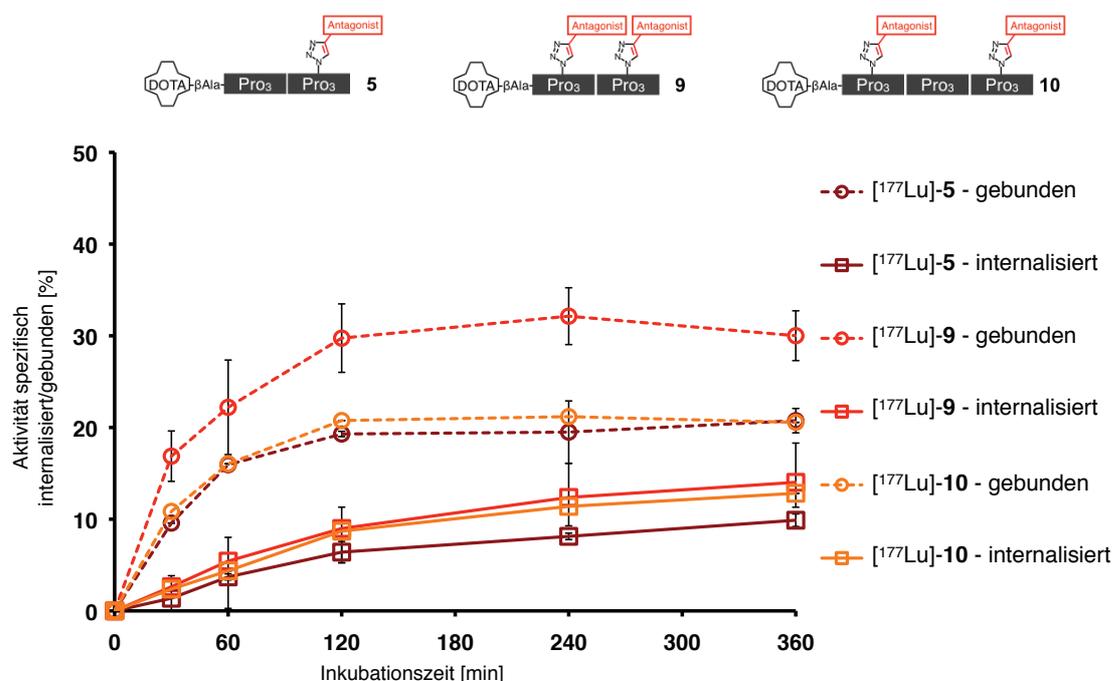


Abbildung 50. Internalisierungsexperimente mit den antagonistischen Bombesin-Oligoprolinkonjugaten

Tabelle 7. Internalisierungsexperimente mit den antagonistischen Bombesin-Oligoprolinkonjugaten

Ligand	Internalisierung 360 min (%)	Oberflächliche Bindung 360 min (%)	Anzahl Experimente (Wiederholungen)
[¹⁷⁷ Lu]-5	9.9 ± 0.7	20.7 ± 1.4	3
[¹⁷⁷ Lu]-9	14.0 ± 4.3	30.0 ± 2.7	2
[¹⁷⁷ Lu]-10	12.3 ± 0.9	21.1 ± 0.7	3 ^[a]
[¹¹¹ In]-RM1	4.7 ± 0.1	21.8 ± 0.9	

2.5 pmol radiomarkierter Ligand / 1 Mio. Zellen. Daten für [¹¹¹In]-RM1^[22] und **10** nach 240 min aufgenommen. ^a Bei zwei der drei Internalisierungsexperimente wurde nur zu einem Zeitpunkt (240 min) die Internalisierung und oberflächliche Bindung bestimmt. Diese zwei Experimente wurden von Andreas Jodal, Martin Behe und Stefanie Dobitz am Paul Scherer Institut durchgeführt (Villigen, Schweiz).

Wie für antagonistische Verbindungen erwartet, bleiben die drei untersuchten Liganden überwiegend an der Zelloberfläche gebunden und werden nur zu einem geringeren Teil internalisiert. Allerdings ist der Anteil an internalisierten Liganden verhältnismäßig hoch. Im Vergleich zum etablierten Antagonisten RM1 ist die oberflächlich gebundene Fraktion ähnlich, die internalisierte Fraktion aber zwei- bis dreimal so hoch (Tabelle 7). Dies ist überraschend und zeigt, dass das Oligorprolin-Gerüst einen Einfluss auf die Art und Weise hat, mit der das antagonistische Bindungselement mit dem Rezeptor interagiert und die Internalisierung unterstützt. In diesem Zusammenhang ist erneut festzuhalten, dass die Menge an unspezifisch gebundenem und internalisiertem Liganden unauffällig niedrig war, Bindung und Internalisierung also rezeptorvermittelt sind.

Die gebundene Fraktion des bivalenten Liganden **9** ($d = 10 \text{ \AA}$) ist höher als die des monovalenten Liganden **5**. Der zweite bivalente Ligand **10** mit dem grösseren Abstand von 20 \AA zwischen den Bindungselementen zeigt eine geringere Bindung an die Zellen die mit der des monovalenten Liganden **5** und RM1 vergleichbar ist. Die Steigerung der Bindung durch Bivalenz konnte im Falle der Antagonisten nicht eindeutig belegt werden, ein geringerer Abstand zwischen den beiden Bindungselementen scheint dafür von Vorteil.

4.1.3. Internalisierungsexperimente mit Hybridliganden

Die drei in Internalisierungsexperimenten (Abb. 51, Tabelle 8) untersuchten Hybridliganden **1-3** bestehen alle aus den gleichen Bausteinen und unterscheiden sich nur im Abstand zwischen dem Agonisten und dem Antagonisten. Während er bei Hybridligand **1** 10 Å beträgt, sind es bei Hybridligand **2** 20 Å und bei Hybridligand **3** 30 Å.

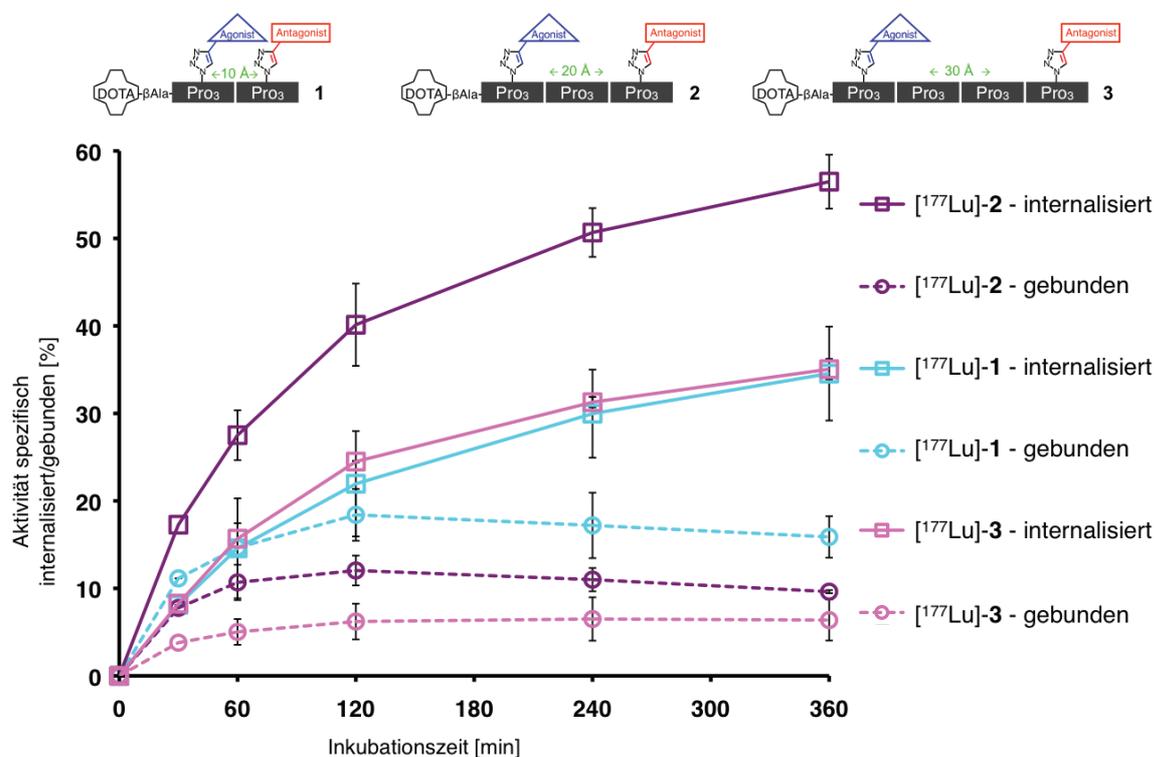


Abbildung 51. Internalisierungsexperimente mit den Hybridliganden

Tabelle 8. Internalisierungsexperimente mit den Hybridliganden und Vergleich zu den Kontrolleexperimenten

#	Ligand	Internalisierung 360 min (%)	Oberflächliche Bindung 360 min (%)	Anzahl Experimente (Wiederholungen)
1	[177Lu]-1	34.6 ± 5.4	15.9 ± 1.4	3
2	[177Lu]-2	56.5 ± 3.1	9.6 ± 0.2	3
3	[177Lu]-3	35.1 ± 1.2	6.4 ± 2.3	2
4	[177Lu]-6	25.0 ± 7.1	2.5 ± 1.1	2
5	[177Lu]-4 + [177Lu]-5	18.4 ± 0.3	8.0 ± 0.4	1

2.5 pmol radiomarkierter Ligand / 1 Mio. Zellen. Bei der Kombination von **4** und **5** wurden jeweils 2.5 pmol verwendet.

Die drei Hybridliganden werden in einem hohen Maß spezifisch internalisiert und ähneln in ihrem Verhalten damit reinen Agonisten. Die Menge an internalisiertem Liganden liegt für die Hybridliganden **1** (34.6 % nach 360 min) und **3** (35.1 %) zwischen dem monovalenten Agonisten **4** (29.2 %) und dem bivalenten Agonisten **7** (39.4 %).

Auffälliger Unterschied ist, dass eine nennenswerte Fraktion des Hybridliganden **1** auf der Oberfläche gebunden bleibt (15.9 %). Das zeigt, dass auch die antagonistische JMV594-Sequenz eine Rolle spielt. Die Summe aus gebundenem und internalisiertem Liganden ist für Hybridligand **1** höher (50.5 %) als für den entsprechenden bivalenten Agonisten **7** (42.2 %), der auch einen Abstand von 10 Å zwischen den beiden Bindungselementen aufweist.

Der herausragende Ligand in dieser Evaluierung ist Hybridligand **2**, mit einem Abstand von 20 Å zwischen dem Agonisten und dem Antagonisten. Über die Hälfte des im Assay eingesetzten Radioliganden wird in die Tumorzelle internalisiert (56.5 %), das ist rund 60 % mehr als für die beiden anderen Hybridliganden und fast doppelt so viel wie für den bekannten Agonisten AMBA gefunden wird.

Da die Fraktion oberflächlich gebundener Liganden verhältnismäßig niedrig war, wurde untersucht, ob die antagonistische Sequenz eine Rolle bei der hohen Aufnahme spielt. Dafür wurde der monovalente Agonist **6** untersucht, der bis auf das Fehlen der antagonistischen Sequenz dem Hybridliganden **2** entspricht (Abb. 49). Die Internalisierung von **6** entspricht etwa einem Drittel der Internalisierung von **2** und zeigt den grossen Einfluss des Antagonisten auf die Aufnahme in die Tumorzelle.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurden die beiden monovalenten Verbindungen **4** (Agonist) und **5** (Antagonist) gemeinsam zu den Zellen gegeben. Damit befand sich die doppelte Menge an Liganden, aber die gleiche Menge an Bindungselementen (Agonisten + Antagonisten) auf den Zellen, wie bei der Inkubation mit einem Hybridliganden. Die Aufnahme in die Zelle war deutlich niedriger (Tabelle 8, # 5, Internalisierung nach 360 min 18.4 %).

All diese Experimente zeigen, dass die Kombination aus Agonist und Antagonist in einem Molekül zu einer sehr hohen Internalisierung führt. Die Unterschiede im Internalisierungsverhalten der drei Hybridliganden sind beachtlich, der Abstand hat einen starken Einfluss auf die rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zelle. Der optimale Abstand zwischen den beiden Bindungselementen für eine besonders hohe Aufnahme in die Tumorzellen waren 20 Å.

4.1.4. Hypothese zum Internalisierungsergebnis von Hybrid 2

Um die Ergebnisse die mit den Hybridliganden 1-3 in Internalisierungsexperimenten erzielt wurden zu verstehen, wurde ein möglicher Zusammenhang mit der Struktur des GRP-Rezeptors untersucht. Wenig ist bekannt über die genaue Struktur des Gastrin-releasing Peptide Rezeptors. Noch ist keine durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie aufgeklärte Struktur bekannt. Mit der bekannten Sequenz^[165] (Abb. 52 A) und den aufgeklärten Strukturen verwandter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren lässt sich mit dem Programm Swiss-Modell eine Struktur Computer-gestützt simulieren ("Homology Modelling", Abb. 52 B).^[166-168]

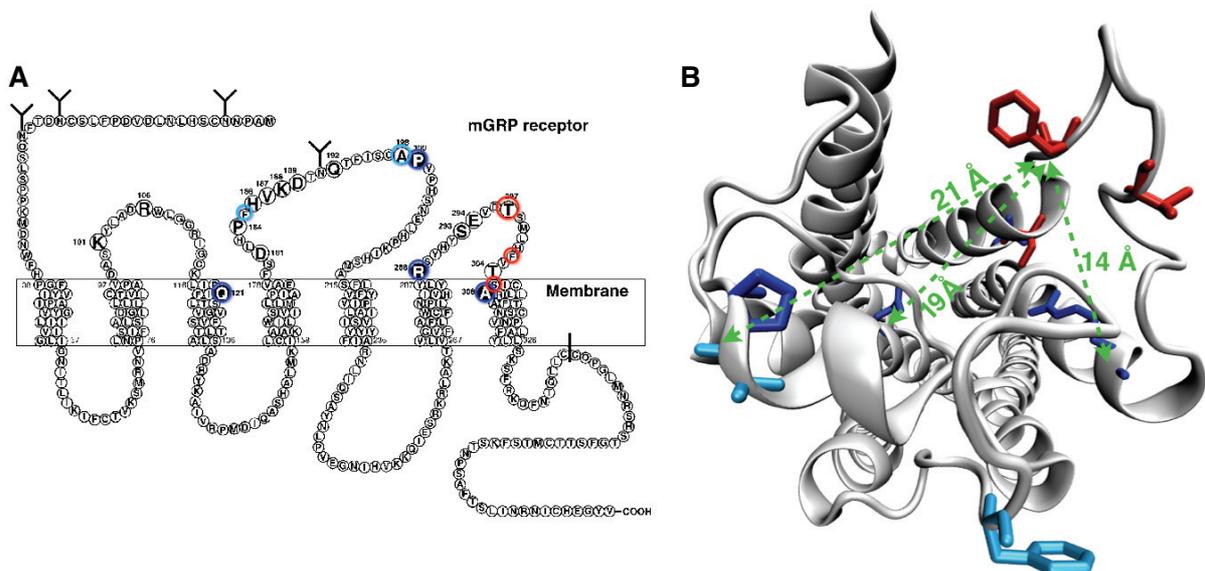


Abbildung 52. A Sequenz des GRP-R – in blau die Aminosäuren, die entscheidend für die Bindung des Agonisten sind, in rot die Aminosäuren die entscheidend für die Bindung des Antagonisten sind, die hellblauen Aminosäuren tragen zur Spezifität von BBN für GRPR gegenüber dem verwandten NMB-R bei (Grafik übernommen aus ^[169] und bearbeitet); **B** Homologie Modell der GRPR Rezeptorstruktur, die im Text erwähnten Aminosäuren sind hervorgehoben, rot/blau gibt die Zuordnung Antagonist/Agonist wieder. Blau: Gln121, Pro199, Arg288, Ala308; hellblau: Phe185, Ala198; rot: Thr297, Phe302, Ser305.

Dank den Mutagenese-Studien von Nakagawa *et al.* ^[169] und Akeson *et al.* ^[170] sind die Aminosäuren in der Sequenz bekannt, die für die hohe Affinität der Bindung von Bombesin an den GRP-R verantwortlich sind. Desweiteren wurde gezeigt, welche Aminosäuren des GRP-R für die Selektivität für GRP/BBN gegenüber dem eng verwandten Neuromedin B-Rezeptor (NMB-R) wichtig sind.^[171] Es wird davon ausgegangen, dass diese Aminosäuren, die orthosterische Bindungsstelle des Agonisten flankieren, die sich an der Grenzfläche zwischen den Transmembrandomänen und den

extrazellulären Domänen befindet. Zudem sind die Aminosäuren bekannt, die für die Bindung des Antagonisten JMV594 notwendig sind.^[76] Da sich diese Aminosäuren allesamt in dem dritten extrazellulären Loop des Rezeptors befinden, gehen wir davon aus, dass diese Aminosäuren zu einer allosterischen Bindungsstelle beitragen könnten. Dass sich eine orthosterische Bindungsstelle auf Höhe der Membrangrenzfläche zwischen den helikalen Domänen befindet, und die allosterische Bindungsstelle von einem extrazellulären Loop gebildet wird, ist auch für andere GPCR bekannt.^[172]

Die Aminosäuren, die die Affinität gegenüber dem Agonisten und dem Antagonisten bestimmen, sind blau und rot in der Struktur des Rezeptors hervorgehoben (Abb. 52 B). Der Abstand zwischen den beiden potentiellen Bindungsstellen liegt im Bereich von 15 bis 20 Å, dieser Abstand entspricht der Distanz zwischen den beiden Bindungselementen in Hybridligand **2**. Im Rahmen der Rezeptortheorie ist es unwahrscheinlich,^[86] dass beide Bindungselemente gleichzeitig ihre jeweilige Bindungsstelle belegen. Vorstellbar ist aber, dass wenn **2** über den Antagonisten allosterisch bindet und wieder "wegdissoziiert", der agonistische Teil des Liganden so positioniert ist, dass er orthosterisch binden kann. Damit stünden für die Liganden zunächst mehr Bindungsstellen zur Verfügung, und nach der Bindung wäre eine Internalisierung wahrscheinlich – unabhängig, ob zunächst mit dem Agonisten oder dem Antagonisten gebunden wurde. Das würde bedeuten, dass die erhöhte Aufnahme auf einen „Rebinding-Effekt“^[94,173] zurückzuführen ist, der durch die definierte Struktur des Ligandens begünstigt wird. Dieser mögliche Mechanismus ist in Abbildung 53 dargestellt.

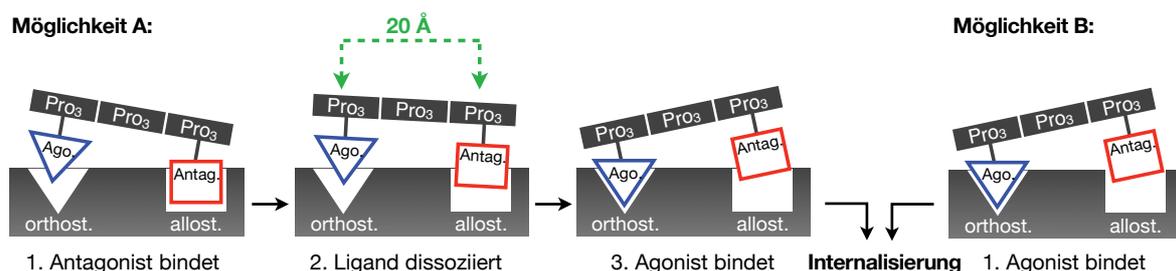


Abbildung 53. Zwei hypothetische Möglichkeiten die zur Internalisierung von Hybrid **2** führen

Eine Voraussetzung dafür, dass wie in Abbildung 53 gezeigt, schnell und direkt ein Wechsel zwischen gebundenem Antagonist und Agonist möglich ist, ist dass der Rezeptor auch im Antagonist-gebundenen Zustand mit dem G-Protein interagieren kann. Dies wurde in mehreren Arbeiten zum Einfluss von Agonisten, inversen Agonisten und Antagonisten auf die Rezeptorkonformation festgestellt. Nur der inverse Agonist

verhindert die Interaktion des Rezeptors mit dem für die Signalübertragung notwendigen G-Protein. [174,175]

Die Mechanismen, die der Reaktion von GPCR auf verschiedene Liganden zugrunde liegen sind bisher nur wenig verstanden. Daher sollen hier noch weitere Arbeiten und Erkenntnisse präsentiert werden, die zum Verständnis der Interaktion zwischen Hybridligand und Rezeptor beitragen könnten.

Interaktionen zwischen dem Liganden und dem Rezeptor finden nicht nur in der Bindungsstelle selbst, sondern zum Beispiel auch in einem der orthosterischen Bindungsstelle vorgelagerten Vestibül statt.[176,177] Am Beispiel von β 1- und β 2-adrenergen Rezeptoren wurde mit Molekulardynamik (MD) Simulationen gezeigt, dass die initiale Bindung der Liganden, unabhängig von ihrer Funktion (verschiedene beta-Blocker/Antagonisten und ein Agonist), an die extrazellulären Loops eine grössere Energiebarriere darstellt, als der anschliessende Eintritt in die eigentliche Bindungsstelle.[176] In der zitierten Arbeit wurde ein Abstand von 15 Å zwischen Vestibül und orthosterischer Bindungsstelle ermittelt, ein Abstand der wiederum von Hybrid **2** überbrückt werden könnte. Dementsprechend kann zur Interaktion des Hybridliganden **2** mit dem GRPR auch die Hypothese aufgestellt werden, dass während der Antagonist gebunden ist, der Agonist bereits mit dem Vestibule interagiert. Nach der möglichen Dissoziation des Antagonisten aus der eigentlichen Bindungsstelle könnte der Agonist in diese migrieren. Dieses Modell wäre im Einklang mit der Möglichkeit, dass Agonist und Antagonist die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor besetzen. Genau wie bei der ersten Hypothese würde zunächst die wahrscheinlichere Bindung des Antagonisten ausgenutzt, die dann zu einer, durch den Agonist ausgelösten, Internalisierung führen würde. Eine weitere Arbeit zum allosterischen Vestibule untersucht das Konzept am Beispiel des muskarinischen Acetylcholinrezeptors.[177]

Auch die Möglichkeit, dass sich Rezeptordimere durch die Interaktion mit den Liganden bilden, soll nicht ausser acht gelassen werden. Die ungefähre Distanz, die zum Verbinden zweier GPCRs notwendig ist, hängt vom jeweiligen Rezeptor ab und liegt im Bereich von 20-60 Å.[105,178,179] Es ist unklar, wie eine durch einen bivalenten Liganden ausgelöste Dimerisierung der Rezeptoren zu einer gesteigerten Internalisierung beitragen könnte. Einfluss könnte eine allosterische Aktivierung durch einen zweiten Rezeptor haben (studiert am Beispiel der Dopamin Rezeptoren).[180] Dabei wird ein GPCR zusätzlich durch einen benachbarten Rezeptor aktiviert. Ein bivalenter Ligand wie

Hybrid **2** könnte entsprechend einen zweiten Rezeptor binden und so positionieren, dass er mit dem ersten Rezeptor interagiert. Für diese Aktivierung wäre die richtige Distanz zwischen den Bindungselementen entscheidend, was die Unterschiede zu dem kürzeren 10 Å Hybrid **1** und dem längeren Hybrid **3** erklären könnte. Der Vorteil gegenüber dem bivalenten Agonisten **8**, mit dem selben Abstand wie Hybrid **2**, könnte darin bestehen, dass der Antagonist wiederum eine grössere Rezeptorpopulation binden kann, ein Dimer von dem Hybrid also wahrscheinlicher geformt werden könnte als mit dem bivalenten Agonisten. Ebenso wäre es möglich, dass der Antagonist in einer anderen Konformation bindet, so dass die Geometrie des Hybrids vorteilhafter zur Bindung von zwei GPCR sein könnte.

Um das Internalisierungsverhalten der Hybridliganden genauer zu studieren und gegebenenfalls zur Aufklärung des Mechanismus beizutragen, sind mikroskopische Studien mit Fluorophor-markierten Liganden geplant.^[181] Ebenso kann die Internalisierung der Rezeptoren durch die Hybridliganden mit Immunofluoreszenz-Studien weiter untersucht werden.^[21] Eine Möglichkeit zur Aufklärung der genauen Bindungsstellen des Agonisten und des Antagonisten und daraus resultierend, der Bindungsmodus des Hybridliganden, wäre die Verwendung photolabiler Proben.^[182] Dafür müsste in Bombesin- und Antagonist- Analoga zum Beispiel ein p-Benzoylphenylalanin (Bpa) inkorporiert werden, das, wenn es mit Licht angeregt wird (366 nm), ein Radikal formt und somit kovalent an den Rezeptor binden kann. Anschliessender Abbau des Rezeptors mit einer Protease und massenspektroskopische Analyse der Fragmente kann dann die Frage beantworten, wo das Bpa-markierte Peptide gebunden hat.

Die mögliche Dimerisierung des Rezeptors durch die Hybridliganden könnte mit modifizierten beziehungsweise markierten Rezeptoren studiert werden, denkbare Methoden hierfür wären FRET oder auch split-Luciferase/GFP Komplementierungs-Assays.^[183,184]

4.2. Studien zur Externalisierung und Dissoziation

Um zu bestimmen, wie lange die Liganden, nachdem sie internalisiert oder gebunden wurden, in und an der Zelle verbleiben, wurde die Externalisierung und Dissoziation der Liganden **2**, **4** und **5** untersucht. In einem Externalisierungsexperiment wird gemessen, wie schnell die PC-3 Zellen die internalisierten Liganden freisetzen. Der vergleichbare Assay für nicht-internalisierende Antagonisten, ist ein Dissoziationsexperiment. Dabei wird die Menge Radioligand bestimmt, die durch Dissoziation vom gebundenen in den ungebundenen Zustand übergeht.

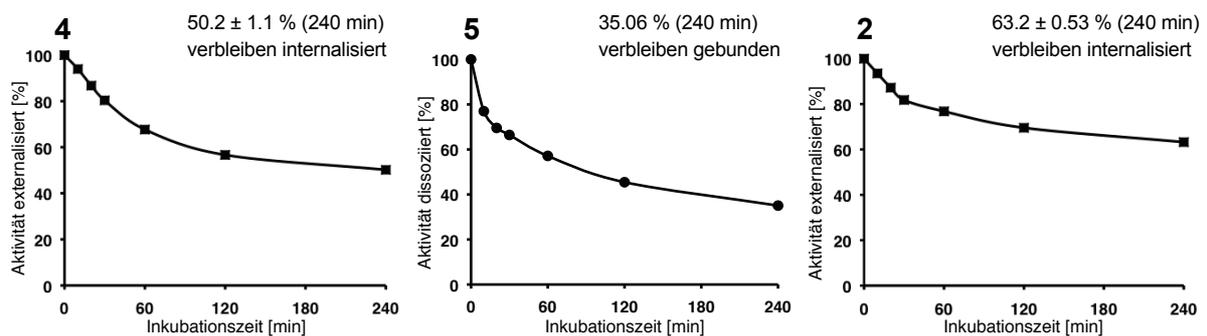


Abbildung 54. Externalisierung des monovalenten Agonisten **4**, Dissoziation des Antagonisten **5** und Externalisierung des Hybridliganden **2** nach jeweils 240 min vorheriger Inkubationszeit auf PC-3 Zellen

Wie aus den Messergebnissen hervorgeht und zu erwarten war, dissoziiert der monovalente Antagonist **5** schneller, als der Agonist **4** externalisiert wird (Abb. 54). Hybridligand **2** verbleibt länger in der Zelle als die monovalenten Verbindungen. Die Externalisierung des Rezeptors mitsamt des Hybridliganden **2** ist entweder an sich langsamer oder es besteht die Möglichkeit, dass der dissoziierende Hybridligand **2** nach der Externalisierung den Rezeptor unmittelbar wieder bindet. Im Vergleich zu den monovalenten Liganden wäre das für den Hybridliganden eher zu erwarten.

4.3. Bestimmung der Dissoziationskonstante und der Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen

Um einen noch tieferen Einblick in die Wechselwirkungen der Oligoprolin-Bombesinkonjugate mit dem GRP-Rezeptor zu erhalten, wurden Studien zur Bestimmung der Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen für die Liganden und der Affinität der Liganden gegenüber dem Rezeptor durchgeführt. Untersucht wurde dafür die Bindung der monovalenten Liganden **4** und **5** und der Hybridliganden **1** und **2** an den GRP-Rezeptor auf PC-3 Zellen nach einem etablierten Protokoll,^[25] was sich jedoch

als schwierig erwies. Es wurden PC-3 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der radiomarkierten Liganden bei 4°C (um die aktive Internalisierung zu unterbinden) inkubiert um die Dissoziationskonstante K_D zu bestimmen. Die Dissoziationskonstante gibt in diesem Fall die Konzentration an Radioligand an, bei der die Hälfte als gebunden an den Rezeptor vorliegt.^[20] Je kleiner der K_D ist, desto höher ist die Affinität des Rezeptors für den Liganden. Eine hohe Affinität im nanomolaren Bereich wird typischerweise angestrebt, jedoch korreliert die Affinität oft nicht direkt mit der Aufnahme in den Tumor.^[22,185,186] Mit den Experimenten wurde auch die Konzentration bestimmt, bei der eine Sättigung aller Rezeptoren auf den PC-3 Zellen auftritt (B_{max}), was ein Maß für die Anzahl an verfügbaren Bindungsstellen ist.

Die Resultate der Experimente mit dem radiomarkierten Hyridligand **1** sind detailliert in Abbildung 55 aufgeführt. Die Resultate der anderen Liganden und der Vergleich mit RM1 und AMBA sind in Tabelle 9 dargestellt.

Das abgebildete Diagramm A in Abbildung 55 zeigt die Konzentration an Rezeptorgebundenem Liganden abhängig von der Konzentration des freien Liganden. Von den im Experiment bestimmten Daten (schwarz) wurde die unspezifische Bindung (parallel bestimmt, roter Graph) abgezogen, um zur spezifischen Bindung zu gelangen (blau).

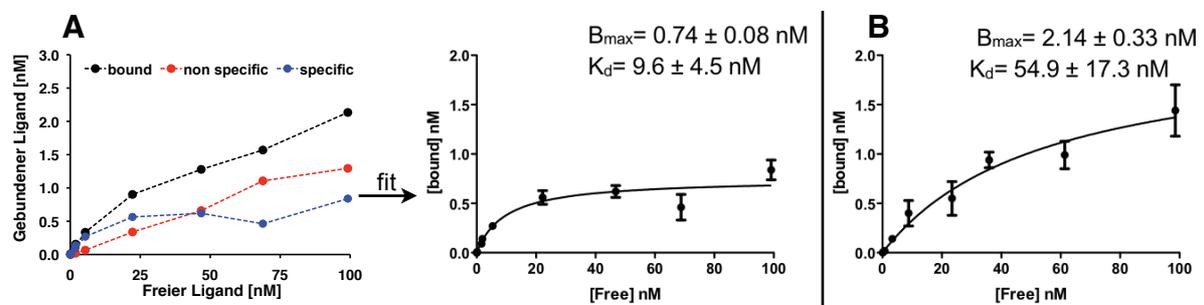


Abbildung 55. Sättigungsexperimente mit **1**; Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente, **A** inklusive des gesamten Datensatzes. Von der Menge an gebundenem Liganden (schwarz) wurde die Menge an unspezifisch-gebundenem Liganden (rot) subtrahiert, um zu der Menge spezifisch, also rezeptorgebundener Liganden, zu gelangen. Für **B** ist nur der Fit der spezifisch gebundenen Fraktion gezeigt.

Wie erwartet, hat die rote Kurve der unspezifischen Bindung einen linearen Verlauf, da die unspezifische Bindung alleine konzentrationsabhängig ist, und nicht von einer sättigbaren Rezeptorpopulation abhängt. Die blaue Kurve zeigt eine Sättigung zwischen

0.5 und 0.8 nM. Die Dissoziationskonstante und B_{\max} sind aus dem "Fit" der Daten ersichtlich.

Abbildung 55 B zeigt ein zweites Experiment mit Hybridligand **1** mit unterschiedlichem Resultat, das unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde, sich jedoch deutlich von dem ersten Experiment unterscheidet. Auch bei der Untersuchung der anderen radiomarkierten Liganden traten hohe Abweichungen von Experiment zu Experiment auf (Tabelle 9). Diese Experimente wurden daraufhin mehrmals wiederholt (mind. 3x), jedoch unterschieden sich die Resultate weiterhin sehr stark. In der Tabelle 9 sind nur Daten von Experimenten aufgeführt, deren Resultate einigermaßen im Einklang miteinander waren.

Tabelle 9. Zusammenfassung der Sättigungsexperimente und der Vergleich zu den Ergebnissen der Internalisierungsexperimente. Angegeben sind die Mittelwerte der durchgeführten Experimente, Standardabweichungen sind zusammengeführt aus den Standardabweichungen der einzelnen Experimente.

Ligand	Beschreibung	B_{\max} (nM) ^[a]	K_D (nM) ^[a]	Internalisierung + Bindung ^[b] 360 min (%)
[¹⁷⁷ Lu]- 4	Agonist	1.1 ± 0.7	74.6 ± 38.3	31.9
[¹⁷⁷ Lu]- 5	Antagonist	3.6 ± 1.1	101 ± 19.9	30.6
[¹⁷⁷ Lu]- 1	Hybrid, 10 Å	1.4 ± 0.8	32.3 ± 28.1	50.5
[¹⁷⁷ Lu]- 2	Hybrid, 20 Å	1.1 ± 0.2	23.6 ± 12.9	66.1
[¹¹¹ In]-AMBA	Agonist	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.3	33.3
[¹¹¹ In]-RM1	Antagonist	2.4 ± 0.2	8.5 ± 2.7	26.5

^a Bestimmt nach 2 bzw. 4h Inkubation bei 4°C. ^b Separates Experiment bei 37°C (siehe Kapitel 4.1.), Daten für [¹¹¹In]-RM1 und [¹¹¹In]-AMBA nach 240 min aufgenommen.^[22]

Auch wenn die Daten je Ligand nicht reproduzierbar waren, lässt sich aus den Ergebnissen eine gewisse Aussage ableiten. Die im Vergleich der Oligoprolin-Bombesinkonjugate beste Affinität weist wie erwartet der Hybridligand **2** ($K_D \approx 23.6$ nM) auf, gefolgt von dem kürzeren Hybridliganden **1** ($K_D \approx 32.3$ nM). Die beiden monovalenten Verbindungen **4** und **5** haben eine niedrigere Affinität ($K_D \approx 74.6$ nM und $K_D \approx 101.8$ nM). Mit den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die bivalenten Liganden eine höhere Affinität haben als die monovalenten Liganden. Die Affinitäten der Vergleichssubstanzen AMBA und RM1 sind besser, dass damit jedoch nicht eine höhere Aufnahme in die Zellen verbunden ist, hatten die Internalisierungsexperimente gezeigt (Tabelle 9).

Wie erwartet, wurden in jedem Experiment für den Antagonisten **5** mehr Bindungsstellen ($B_{\max} \approx 3.6 \text{ nM}$) als für den Agonist **4** ($B_{\max} \approx 1.1 \text{ nM}$) auf den PC-3 Zellen gefunden. Wie bei dem Paar AMBA/RM1 ist das Verhältnis in etwa 3:1, wobei die Werte, die für AMBA und RM1 bestimmt wurden, etwas geringer sind als die der Oligoprolin-Bombesinkonjugaten **4** und **5**. Die B_{\max} Werte für die beiden Hybridliganden **1** ($\approx 1.4 \text{ nM}$) und **2** ($\approx 1.1 \text{ nM}$) ähneln den Werten, die für die Agonisten gefunden wurden. Dieses Resultat ist überraschend, da nach den Internalisierungsexperimenten erwartet wurde, dass den Hybridliganden aufgrund des antagonistischen Bindungselements mehr Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Es könnte auf die hohen Abweichungen zurückzuführen sein.

Die Ursachen für die hohen Abweichungen sind unklar, theoretisch möglich wären die folgenden Faktoren:

1. Die Rezeptoren waren nicht vollständig blockiert, da zum Beispiel die Konzentration an kalten Liganden zu niedrig gewählt wurde. Die Unterscheidung spezifisch – unspezifisch wäre nicht verlässlich möglich. Dem widerspricht, dass bei den Experimenten ein hoher Überschuss (100-500x) an kaltem Liganden verwendet wurde. Von einer unvollständigen Blockierung wären die Datenpunkte der hohen Konzentrationen am meisten betroffen gewesen, das heißt es wäre eher eine "falsche Sättigung" beobachtet worden. Das Gegenteil war aber der Fall (keine Sättigung, konstanter Anstieg der Kurve).
2. Die Liganden binden in einem hohen Maße unspezifisch, daher kann keine Sättigung erreicht werden. Die Internalisierungsexperimente wie auch die *in vivo* Studien (Kapitel 4.4) widersprechen jedoch dieser These.
3. Der gewählte Konzentrationsbereich war falsch. Das würde bedeuten, dass die Liganden eine ungewöhnlich hohe, sub-nanomolare oder ungewöhnlich schlechte micromolare-Affinität hätten. Beides ist jedoch auch unwahrscheinlich, basierend auf den bisherigen Erfahrungen mit den bekannten Bombesinderivaten.
4. Die Liganden internalisieren bereits bei 4°C oder befinden sich nach 2 h Inkubationszeit noch nicht in einem Gleichgewicht. Diesem Punkt wurde in einem Internalisierungsexperiment mit den monovalenten Liganden **4** und **5** bei 4°C nachgegangen (Abb. 56).

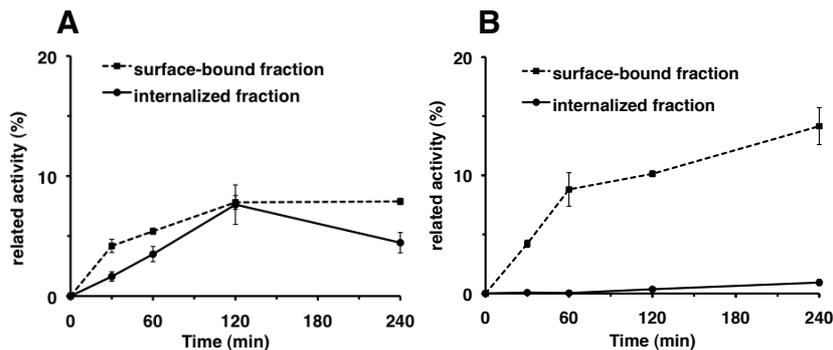


Abbildung 56. Internalisierungsexperiment bei 4°C mit **4** (A) und **5** (B)

Wie für **4** zu erkennen ist, ändert sich an der Bindung zwischen 2 und 4 Stunden nichts, die Internalisierung beträgt nach 4 h etwa 20% der Internalisierung, die man bei 37°C beobachtet (siehe Kapitel 4.1.1.), die oberflächliche Bindung überwiegt wie erwartet. Der Antagonist **5** wird überhaupt nicht bei 4°C internalisiert, die oberflächliche Bindung steigt zwischen 2 und 4 h von 10 auf 14 %. Diese Ergebnisse stehen in keinem Widerspruch zu den Erwartungen, und können die Resultate auch nicht erklären. Trotzdem wurde ein Teil der Experimente daraufhin für 4 Stunden inkubiert, es konnten jedoch keine Unterschiede oder eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit festgestellt werden.

Letztendlich bleibt daher unklar, was die Gründe für die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind. Für die praktische Anwendung ist jedoch die hohe Aufnahme der radiomarkierten Liganden in Tumorzellen entscheidender, so dass der Frage nach der Affinität im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr nachgegangen wurde.

4.4. Präklinische *in vivo* Experimente

Die Zellexperimente zeigten eine hohe Aufnahme der Bombesin-Oligoprolinkonjugate in kultivierte Tumorzellen (Kapitel 4.1.). Um einen noch tieferen Einblick in die Eigenschaften der Bombesin-Oligoprolinkonjugate **1**, **2** und **8** zu erhalten, wurden Tierexperimente durchgeführt. Das *in vivo* Verhalten der Liganden ist insbesondere für potentielle klinische Anwendungen wichtig. Die Hybridliganden **1** und **2** und der divalente Agonist **8** wurden wegen ihrer hohen Internalisierungs- und Bindungsraten ausgewählt, und wurden mit den bekannten monovalenten Liganden AMBA und RM1 verglichen. Ziel der Tierexperimente war es zu sehen, wie zielgerichtet die radiomarkierten Liganden den Tumor ansteuern, wie hoch die Aufnahme in den Tumor ist und wie schnell die Verbindungen wieder aus dem Tumor ausgewaschen werden. Ausserdem lag ein Augenmerk darauf, wie schnell die nicht im Tumor angereicherten Liganden ausgeschieden werden und in welche Organe sie aufgenommen werden. Dafür wurde die Radioaktivitätsverteilung in den Tieren mit einem Positronen-Emissions Tomographen (PET) bildlich dargestellt. Um die Verteilung der Liganden im Organismus genauer zu quantifizieren, wurden die Mäuse seziiert und die Radioaktivitätsaufnahme jedes einzelnen Organs gemessen (Biodistribution). Eine Übersicht der durchgeführten Experimente ist in Tabelle 10 gegeben.

Tabelle 10. Übersicht über die durchgeführten Tierexperimente.

Ligand	Nuklid	PET (1 h p.i.)	PET/CT	Biodistribution
1	⁶⁸ Ga	3 Mäuse + 1 block.	-	3 Mäuse 1 h p.i. + 1 block.
2	⁶⁸ Ga	3 Mäuse + 2 block.	2 von 3 Mäusen	-
	¹⁷⁷ Lu			5 Mäuse 4 h p.i.; 4 Mäuse 21 h p.i.
8	⁶⁸ Ga	2 Mäuse	-	

Für die *in vivo* Experimente wurden PC-3 Tumorexograft-tragende Nacktmäuse als Tiermodell für Prostatakarzinome verwendet. Die Liganden wurden für die Experimente mit Gallium-68 markiert. Den Tieren wurden jeweils 100 pmol radiomarkierter Ligand injiziert, die Aktivität betrug je nach Zeitpunkt 1-5 MBq Gallium-68 pro Tier für die PET-Aufnahmen, und 1 MBq Lu-177 für die Biodistributionen.

Um zu zeigen, dass die Aufnahme in den Tumor rezeptorvermittelt ist, wurde einzelnen Mäuse fünf Minuten vor der Injektion des Radioliganden ein Überschuss an nicht-markiertem Liganden verabreicht. Dadurch wurden die vorhandenen Rezeptoren gesättigt und die rezeptorvermittelte Aufnahme des Radioligand blockiert.

4.4.1. PET/CT-Studien mit Hybridligand 2

Hybridligand 2, mit einem Abstand von 20 Å zwischen Agonist und Antagonist, wurde am intensivsten in *in vivo* Studien untersucht, da er von allen Hybridliganden die höchste Internalisierung im Zellexperiment gezeigt hatte. Es standen neun Nacktmäuse zur Verfügung, in sieben davon war der implantierte PC-3 Tumor gut herangewachsen. Zunächst wurde untersucht, wie schnell sich der Ligand im Tumor anreichert und aus dem übrigen Gewebe geklärt wird. Dafür wurde ein dynamischer PET-Scan angefertigt. Die Maus wurde direkt nach der Injektion mit [⁶⁸Ga]-2 in den Tomographen gelegt und die Aufzeichnung sofort gestartet (Abb. 57).

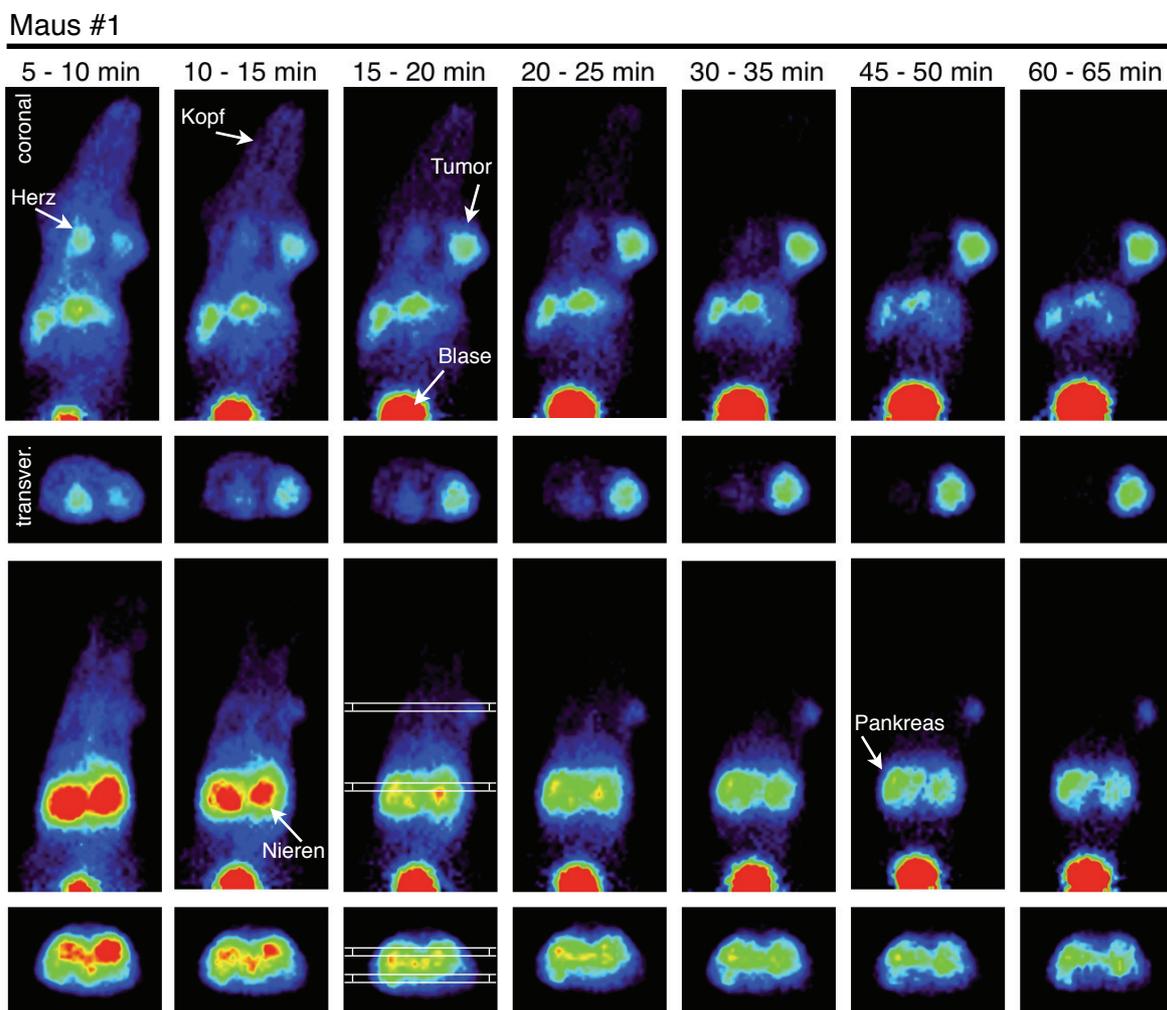


Abbildung 57. Zeitfenster aus einer dynamischen PET Aufnahme. Die Kontrasteinstellungen wurden konstant gehalten, die abgebildeten Schichten (2 mm) sind jeweils gleich, und in den oberen Bildreihen auf den Tumor fokussiert, in den unteren beiden Reihen auf die Nieren (die Lage der Schichten sind im 15-20 min Zeitfenster eingezeichnet).

Der dynamische PET-Scan zeigt, wie sich der Radioligand zunächst im ganzen Körper verteilt. Da der Ligand zunächst im Blut zirkuliert, ist zu Beginn viel Aktivität im

gesamten Tier (Hintergrund) zu sehen. Dies ist auch daran zu erkennen, dass das Herz in den ersten 10 Minuten zu sehen ist. Mit fortschreitender Zeit sammelt sich zunehmend Radioligand im Tumor. Die Aufnahme des Liganden in die Nieren beginnt sofort, man erkennt wie sich im Laufe der Zeit mehr Aktivität in der Blase sammelt und die Nierenaufnahme zurückgeht. Nach einer Stunde ist fast kein Hintergrund mehr zu sehen, Liganden die nicht am Tumor und dem ebenfalls GRP-rezeptorpositiven Pankreas gebunden sind, sammeln sich in der Nieren und werden über die Blase ausgeschieden. Die weiteren PET Aufnahmen wurden alle eine Stunde nach der Injektion des radiomarkierten Liganden gestartet.

Maus #3

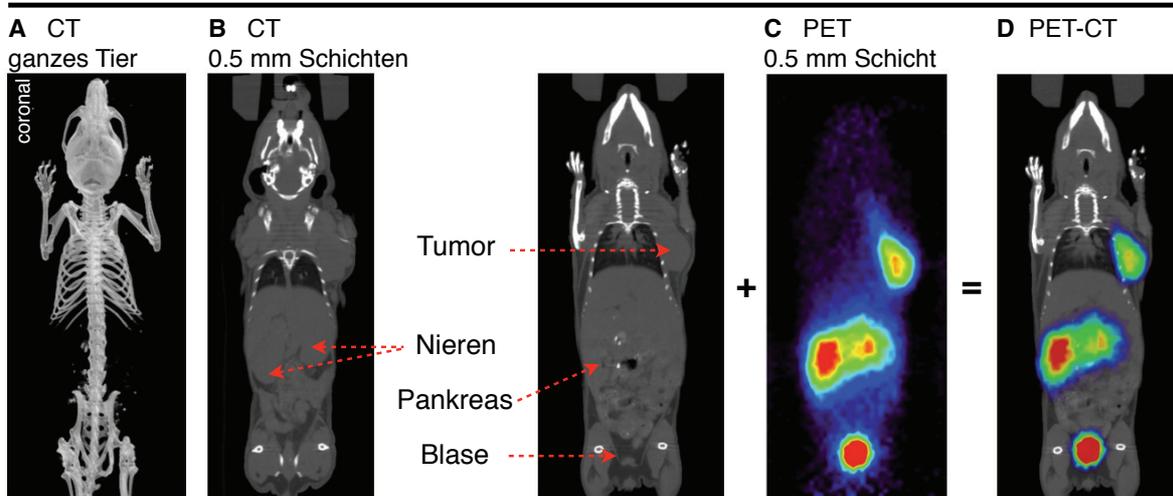


Abbildung 58. Erläuterung zu PET/CT Bildern am Beispiel von Hybridligand **2**: Je nach Kontrasteinstellung sind in der Computertomographie (CT) nur das Skelett (A) oder auch Weichteile (B) zu erkennen. Die Kombination mit der Aktivitätsverteilung aus der PET-Aufnahme (C) ergibt ein PET/CT Bild, bei dem die funktionelle Bildgebung (Aufnahme des Liganden) in einen morphologischen Kontext gesetzt wird.

Die Tumoretention von Hybridligand **2** ist bei allen PET-Studien (Abb. 58 und 59) hoch, wogegen der Ligand im restlichen Gewebe effektiv ausgewaschen wird. Die Aufnahme in Nieren und Pankreas ist ebenfalls hoch. Während die Aufnahme in den Tumor selbstverständlich erwünscht ist, ist die Aufnahme der Liganden in Nieren und Pankreas kritisch. Die Niere ist ein strahlenempfindliches Organ ^[43,44] und die Aufnahme in den Pankreas war der limitierende Faktor bei der bisherigen Patientenstudie mit [Lu¹⁷⁷]-AMBA.^[52,71] Um die genaue Menge der Liganden in einzelnen Organen zu quantifizieren, und über einen längeren Zeitraum (4 h und 24 h) zu verfolgen, wurde im Anschluss eine Biodistribution durchgeführt (Kapitel 4.4.2.).

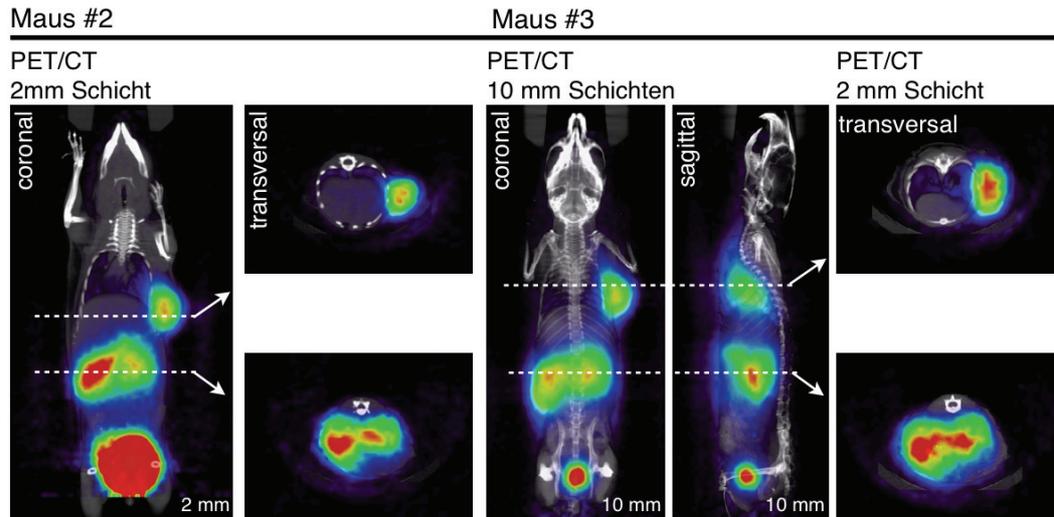


Abbildung 59. PET/CT Aufnahmen von 3 MBq / 100 pmol [⁶⁸Ga]-2, 1 h p.i.; 30 min Scan

Die Blockierung der GRP-Rezeptoren im Tumor und im Pankreas gelingt sowohl mit einem Überschuss an nicht-markiertem Agonist **4** wie auch mit dem Antagonist **5** (Abb. 60). Wenn die beiden nicht-radiomarkierten Liganden vor der Injektion des eigentlichen, radiomarkierten Liganden [⁶⁸Ga]-2 appliziert wurden, konnte damit die Aufnahme von Aktivität in den Tumor und in den Pankreas verhindert werden. Das heisst, dass die Aufnahme in diese Organe rezeptorvermittelt geschieht, wogegen die Aufnahme in die Nieren unspezifisch ist und so nicht blockiert werden kann.

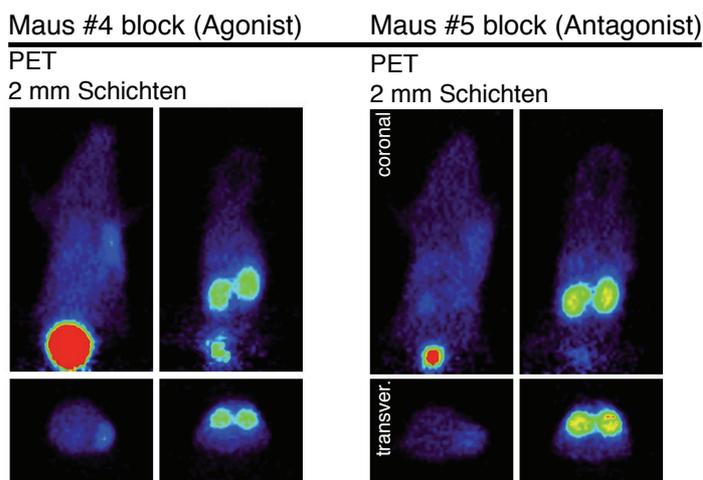


Abbildung 60. PET Aufnahmen von Mäusen mit blockierten GRP-Rezeptoren. 1 MBq / 100 pmol [⁶⁸Ga]-2 1 h p.i., 45 bzw. 60 min Scan

4.4.2. Biodistributionsstudien mit Hybridligand 2

Für die Biodistributionsexperimente wurde Hybridligand **2** mit Lutetium-177 markiert. Dieses Nuklid hat eine deutlich längere Halbwertszeit als Gallium-68 und erlaubt daher, Biodistributionen über mehrere Stunden bis hin zu Tagen zu untersuchen. Experimente mit anderen Liganden für den GRP-R zeigen, dass die Wahl des metallischen Nuklids keinen entscheidenden Einfluss auf das biologische Profil hat.^[186]

Für die Experimente wurden die gleichen Tiere verwendet wie für die PET Studien. Es wurden 3 Tage zwischen den Experimenten abgewartet, um eine Regeneration der Rezeptoren, insbesondere bei den Tieren mit blockierten Rezeptoren, zu gewährleisten. Die sieben Mäuse mit Tumor und die beiden Tiere ohne Tumor wurden mit 0.5 MBq [¹⁷⁷Lu]-**2** injiziert. Die ersten fünf Mäuse wurden nach 4 Stunden eingeschläfert und sezziert, die nächsten vier nach 21 Stunden. Den Tieren wurden die relevanten Organe entnommen, die Organe wurden gewogen und die akkumulierte Strahlung im γ -Counter gemessen. Aus der Menge an injizierter Aktivität, dem Gewicht der Organe und der Strahlung wurden die Daten der Biodistribution in % IA/g (Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm) berechnet (Tabelle 11)

Tabelle 11. Biodistribution von [¹⁷⁷Lu]-**2** nach 4 h (n = 4 Mäuse + 1 Maus ohne Tumor) und 21 h p.i. (n = 3 + 1). Die Daten für jedes einzelne Tier sind im Anhang aufgeführt (7.4.)

Organ	Mittelwert (% IA/g) 4h	Mittelwert (% IA/g) 21h
Blut	0.13 ± 0.09	0.03 ± 0.01
Herz	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02
Leber	0.88 ± 0.10	0.70 ± 0.09
Milz	0.86 ± 0.18	0.69 ± 0.06
Lunge	0.53 ± 0.08	0.82 ± 0.37
Nieren	29.35 ± 3.60	22.69 ± 3.97
Magen	1.41 ± 0.14	0.74 ± 0.04
Darm	1.15 ± 0.30	0.89 ± 0.51
Nebenniere	2.50 ± 0.37	1.65 ± 0.07
Pankreas	21.74 ± 6.21	20.38 ± 3.40
Muskel	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Knochen	0.72 ± 0.35	0.37 ± 0.27
Tumor	18.60 ± 3.31	15.17 ± 1.74

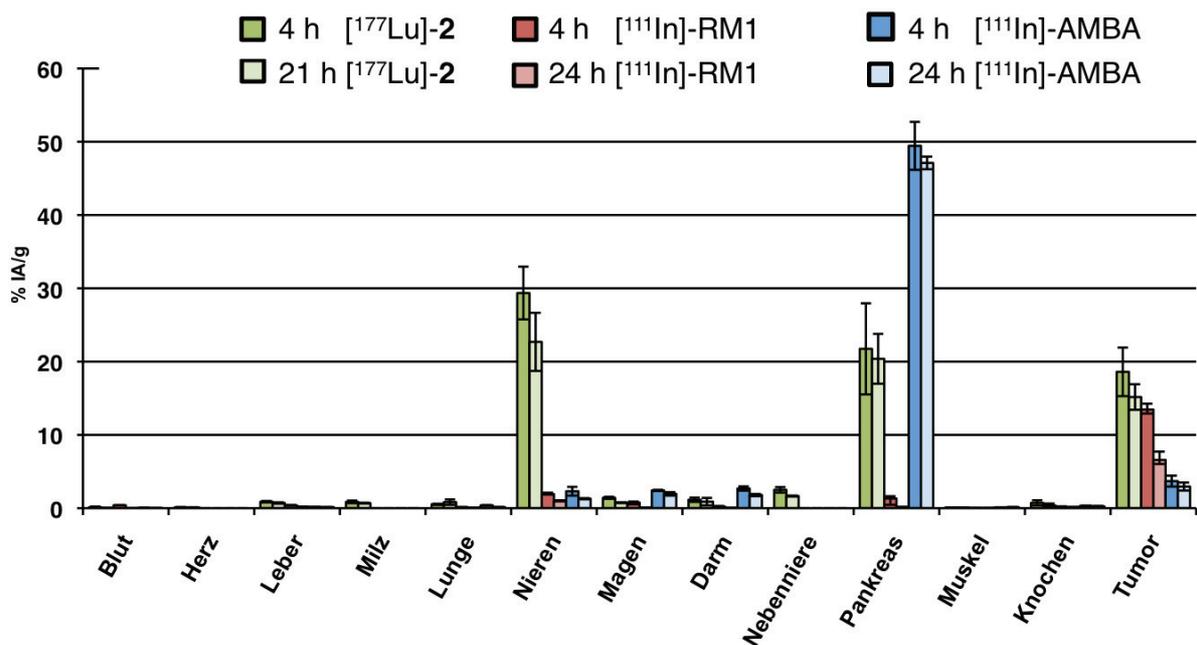


Abbildung 61. Biodistribution von [¹⁷⁷Lu]-2 im Vergleich zu [¹¹¹In]-RM1 und [¹¹¹In]-AMBA

Die Bioverteilung zeigt eine sehr hohe und lang anhaltende Retention des Hybridliganden **2** im Tumor (Tabelle 11, Abb, 61). Im Vergleich der *in vivo* Daten mit den beiden als Referenzen herangezogenen hekömmlich-monovalenten Verbindungen AMBA (Agonist) und RM1 (Antagonist) weist das neu entwickelte Hybrid **2** einige markante Unterschiede auf. Die Tumoraufnahme ist nach 4 h deutlich höher als bei den anderen Liganden (4h: 18.6 % IA/g) und verbleibt annähernd auf diesem Niveau. 17 Stunden später sind nur 18 % des Liganden aus dem Tumor ausgewaschen worden (linear extrapoliert auf 24 h Stunden: 21.5 %). Das entspricht ziemlich genau dem relativen "Washout" des Agonisten AMBA (Abb 62 B), nur dass die initiale Aufnahme von AMBA nur ein Fünftel des Wertes von **2** beträgt (4h: 3.7 %). Die Aufnahme des Antagonisten RM1 ist nach vier Stunden geringfügig niedriger (13.5 % IA/g) als die von Hybrid **2**, aber der Antagonist wird deutlich schneller ausgewaschen. Nach 24 Stunden sind bereits mehr als 50 % der Aktivität aus dem Tumor ausgewaschen (Abbildung 62). Die Aufnahme des Hybridliganden **2** in Nieren und Pankreas ist etwas höher als die in den Tumor und damit hoch. Der Vergleich zu AMBA zeigt jedoch, dass die Aufnahme von Hybridligand **2** in den Pankreas weniger als halb so hoch ist, was sich in einem signifikant besseren Tumor:Pankreas Verhältnis zeigt (**2**: 0.9; AMBA: 0.1; Tab. 12). Die Aufnahme in den Pankreas von Patienten wäre voraussichtlich nicht so hoch, die GRP-R Rezeptorendichte im humanen Pankreas ist niedriger als im Pankreas von Nagetieren.^[187]

Die Aufnahme der radiomarkierten Liganden in die Nieren ist das grössere Problem. Ungewöhnlich ist vor allem die nur geringe Reduktion des Wertes zwischen den beiden Zeitpunkten, erwartet würde eine schnellere Ausscheidung der Liganden über die Blase. Die Niere ist ein sehr strahlungssensitives Organ, so dass bei der therapeutischen Anwendung von radiomarkierten Peptiden die Niere einer der Strahlungsdosis-limitierenden Faktoren ist. Deshalb wird Radiotherapiepatienten im Vorfeld der Behandlung eine Infusion von kationischen Aminosäuren gegeben, um die Nierenfunktion zu sättigen und die Aufnahme des Radioliganden zu reduzieren.^[44] Die Ursache der hohen Nierenaufnahme ist schwer zu erklären, ein möglicher Grund ist die potentiell höhere Nettoladung des heterobivalenten Liganden, die durch die beiden schwach basischen Histidine doppelt so hoch sein könnte, als bei RM1 oder AMBA. Dagegen spricht, dass RM2, ein weiterentwickeltes RM1 mit einem basischen Piperidin-Spacer zwischen DOTA und JMV594, keine höhere Aufnahme in die Nieren zeigt als RM1.^[186] Auch das deutlich höhere Molekulargewicht von **2** könnte eine Rolle spielen.

Grundsätzlich ist die Aufnahme des radiomarkierten Hybridliganden **2** in alle anderen Organe niedrig, die Klärung des Hintergrunds ist sehr gut, was auch in dem sehr vorteilhaften Tumor:Blut und Tumor:Muskel Verhältnis widergespiegelt wird (Tabelle 12).

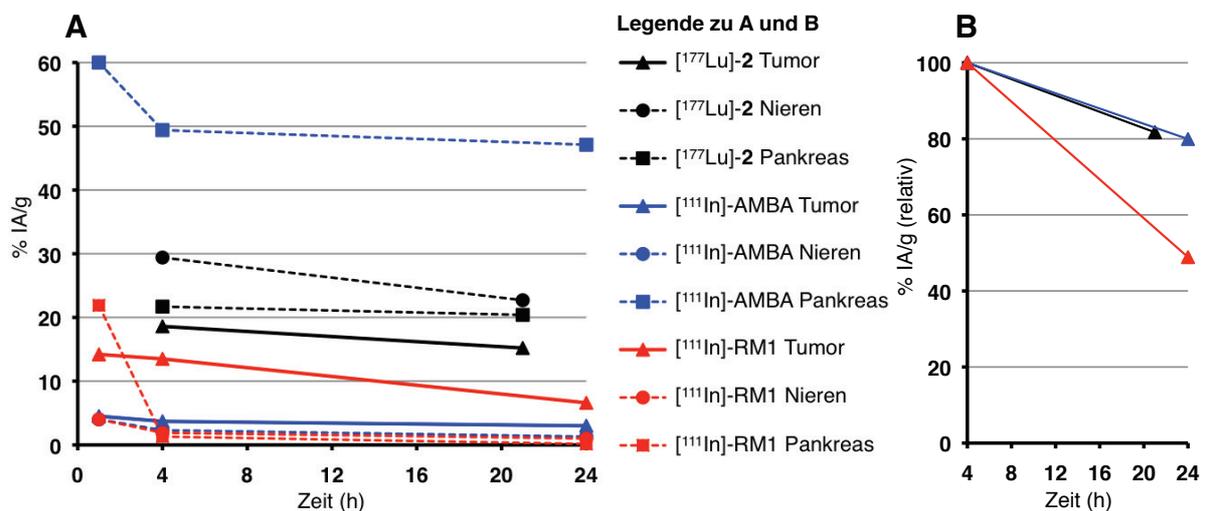


Abbildung 62. **A** Diagramm zur zeitlichen Entwicklung der Anreicherung der Liganden in Tumor, Niere und Pankreas in % IA/g. **B** Die Aufnahme der Liganden nach 4 h Stunden wurde als 100 % definiert, die Graphen zeigen die relative Entwicklung der Aktivitätsanreicherung im Tumor.

Tabelle 12. Vergleich der Tumor:Organ Verhältnisse des Hybrids **2**, des Agonists AMBA und des Antagonists RM1

Ratio	[¹⁷⁷Lu]-2		[¹¹¹In]-AMBA		[¹¹¹In]-RM1	
	4h	21h	4h	24h	4h	21h
Tumor:Blut	199.9	487.3	74.0	147.0	336.0	658.0
Tumor:Leber	20.7	22.2	23.1	21.1	35.4	34.6
Tumor:Nieren	0.6	0.7	1.6	2.3	7.0	6.5
Tumor:Muskel	215.6	225.9	36.9	21.1	448.0	219.0
Tumor:Darm	15.5	17.8	1.4	1.6	67.3	164.5
Tumor:Pankreas	0.9	0.8	0.1	0.1	10.2	43.9

Die *in vivo* Experimente belegen genau wie die *in vitro* Studien, dass es mit dem Hybridkonzept und einem optimierten Abstand zwischen den beiden Bindungselementen gelungen ist, die niedrige Auswaschung des Agonisten mit der hohen Aufnahme des Antagonisten in den Tumor zu kombinieren.

4.4.3. PET und Biodistribution von Hybrid 1

Mit dem Gallium-68 markierten Hybridliganden **1**, der einen Abstand von 10 Å zwischen Agonist und Antagonist aufweist, wurden ebenfalls Tierexperimente durchgeführt, um sein Verhalten *in vivo* zu untersuchen. Dafür wurden PET-Studien gemacht und die Biodistribution bestimmt. Für diese Tierexperimente standen leider nur vier Mäuse zur Verfügung, bei denen die Tumore sehr unterschiedlich angewachsen waren. Während bei Maus #1 und #3 die Tumore gut gewachsene waren (307 mg und 445 mg), waren bei Maus #2 und #4 nur kleine Tumore vorhanden. Demensprechend heterogen waren die Ergebnisse (Abb. 63).

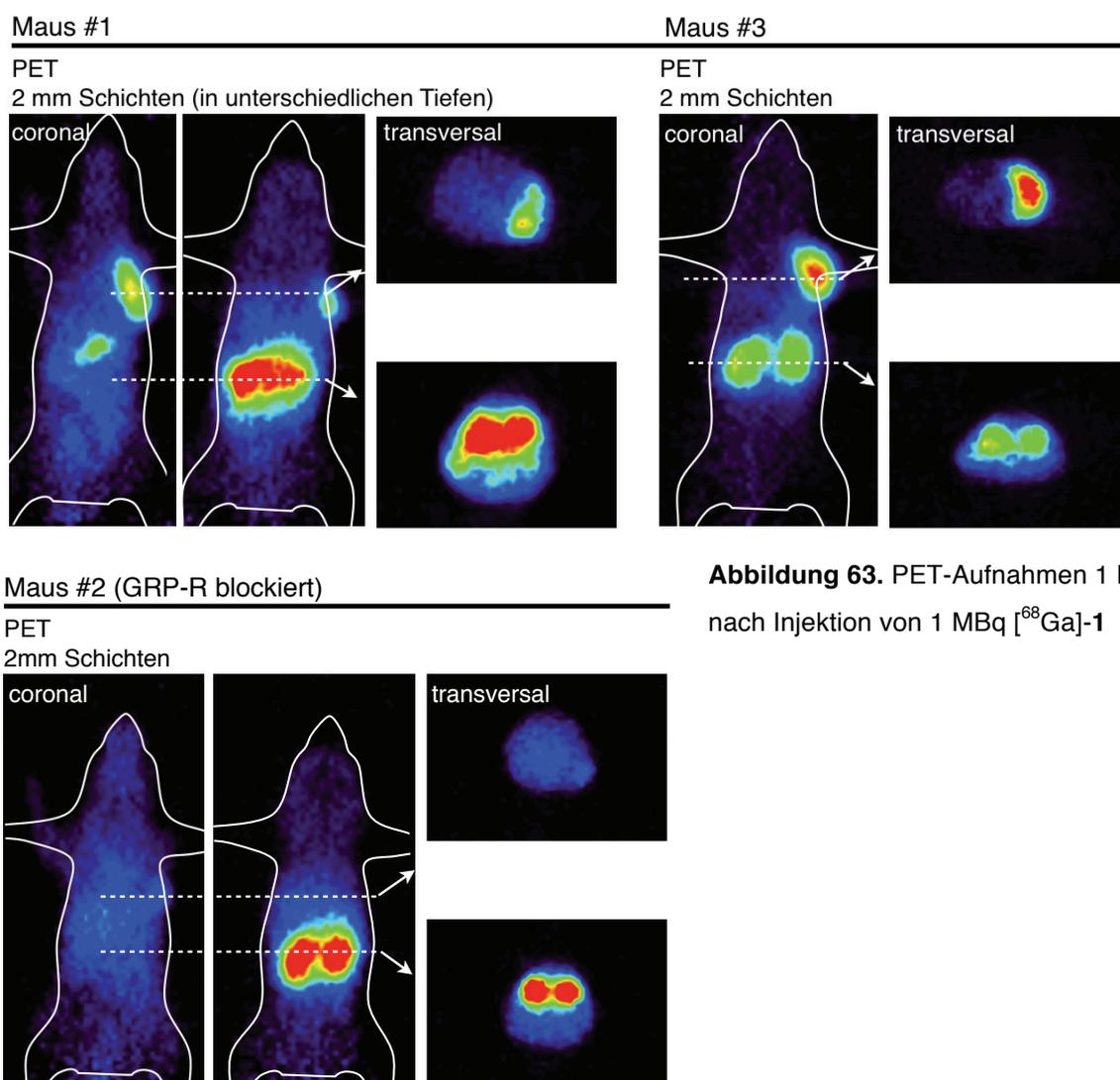


Abbildung 63. PET-Aufnahmen 1 h nach Injektion von 1 MBq [⁶⁸Ga]-1

Maus #3 zeigt im PET eine sehr hohe Retention von [⁶⁸Ga]-1 im Tumor und fast keine Aufnahme in den Bauchraum, nur die Nieren sind zu erkennen. Die Beobachtung deckt sich mit den Daten aus der Biodistribution, die direkt im Anschluss an die PET-

Aufnahmen durchgeführt wurde (Tabelle 13). Im Vergleich zu Maus #3 hat Maus #1 nur die Hälfte der Aktivitätsanreicherung im Tumor, dafür deutlich mehr im Bauchraum, und das obwohl beide Mäuse ähnlich grosse Tumore hatten.

Maus #4 zeigt nur eine sehr niedrige Aufnahme von [⁶⁸Ga]-1 in den Tumor, dafür sehr viel Aufnahme in die Nieren. Das Tier hatte nur einen sehr kleinen Tumor von 75 mg (Tabelle 13).

Maus #2, die mit einem Überschuss an kaltem Liganden präinjiziert wurde, um die GRP-R Rezeptoren zu blockieren, zeigte keine Aufnahme in den Tumor, ebenso ist keine Aufnahme in den GRP-rezeptorpositiven Pankreas zu erkennen (siehe Abb. 63 und Tabelle 13). Daraus folgt, dass die Aufnahme rezeptorvermittelt ist. Die Aufnahme des Liganden in die Nieren bleibt unbeeinflusst, sie ist unspezifisch.

Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in den drei tumortragenden Mäusen die mit Hybridligand **1** erzielt wurden, ist eine Aussage über die Qualität des Liganden und ein Vergleich mit den *in vivo* Daten von Hybridligand **2** nur schwer möglich. Grundsätzlich kann daher nur festgestellt werden, dass die genaue bildliche Darstellung des Tumors auch mit Hybridligand **1** schon nach kurzer Zirkulationszeit (1 h) gewährleistet war. Die Aufnahme des Hybridliganden **1** in den Tumor liegt bei allen Tieren unter dem Wert, der mit Hybridligand **2** erzielt wurde. Das Niveau der Anlagerung im Hintergrund ist niedrig, nur die Aufnahme in Nieren und Pankreas ist hoch.

Tabelle 13. Biodistribution von [⁶⁸Ga]-1, 1 h p.i. .

Organ	Maus #1 (% IA/g)	Maus #3 (% IA/g)	Maus #4 (% IA/g)	Durchschnitt (% IA/g)	Maus #2 (block.)
Blut	1.02		1.49	1.25 ± 0.34	1.37
Herz	0.25	0.28	0.59	0.37 ± 0.18	0.49
Leber	0.90	1.15	1.52	1.19 ± 0.31	1.52
Milz	0.66	1.10	1.06	0.94 ± 0.24	1.11
Lunge	1.23	1.43	1.87	1.51 ± 0.33	2.08
Nieren	10.72	9.97	27.97	16.22 ± 10.2	15.04
Magen	2.92	2.28	3.35	2.85 ± 0.54	1.18
Darm	2.30	1.71	2.65	2.22 ± 0.47	1.88
Nebenniere	2.60	1.52	3.01	2.37 ± 0.77	1.92
Pankreas	18.68	9.44	25.08	17.73 ± 7.86	2.43
Muskel	0.20	0.21	3.08	1.17 ± 1.66	0.39
Knochen	0.33	0.65	1.18	0.72 ± 0.43	0.33
Tumor	6.18	14.30	3.54	8.01 ± 5.61	2.32

4.4.4. PET-Studien des divalenten Agonists **8**

Der divalente Agonist **8**, mit einem Abstand von 20 Å zwischen den beiden Agonisten, wurde aufgrund seiner hohen Internalisierungsrate, die sich in Zellexperimenten gezeigt hatte (Kap. 4.1.1.), ebenfalls in PET-Studien untersucht. Die PET-Bilder zeigen deutlich den Tumor (Abbildung 64). Im Vergleich zu den Hybridliganden [⁶⁸Ga]-**1** und [⁶⁸Ga]-**2** ist die spezifische Aufnahme in den Tumor schlechter. Die Anlagerung im Bauchraum, vermutlich insbesondere im Pankreas, ist bedeutend höher als mit den beiden anderen untersuchten Oligoprolin-Bombesinkonjugaten **1** und **2** (Abb. 58, 59, 63).

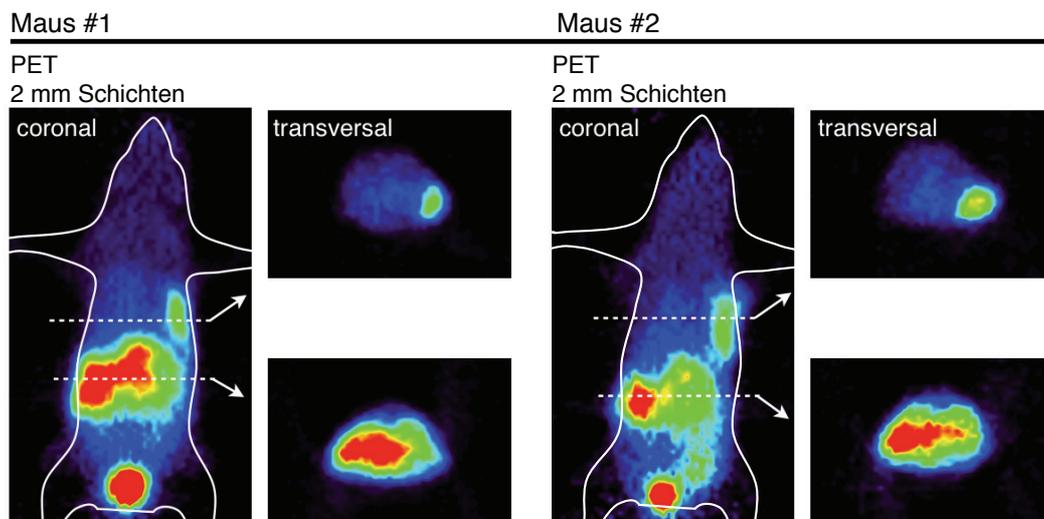


Abbildung 64. PET Aufnahmen 1 h nach Injektion von 100 pmol (1 MBq) [⁶⁸Ga]-**8**

Das *in vivo* Profil des bivalenten Agonisten ähnelt damit dem monovalenten Agonisten AMBA, der ebenfalls eine besonders hohe Aufnahme in den Pankreas zeigt. Es konnte keine Biodistribution erstellt werden, da die Mäuse auch noch für die Experimente mit Hybridligand **2** benötigt wurden. Daher ist kein genauer, quantitativer Vergleich möglich. Die verfügbaren PET Bilder zeigen im Vergleich zu den Studien die mit Hybridligand **2** durchgeführt wurden, dass die spezifische Aufnahme in den Tumor mit den Hybridliganden höher ist und ein besseres Tumor:Organ Verhältnis erzielt wird.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Durch die Kombination von Agonisten und Antagonisten in einem Molekül und die gezielte Variation des Abstands zwischen den beiden Bindungselementen konnte die Tumoraufnahme von radiomarkierten GRP-R Liganden deutlich gesteigert werden. Es ist erstmals gelungen die Vorteile von Agonisten und Antagonisten in einem Ansatz zu kombinieren.

Dazu wurden Azidoprolin-haltige Oligoproline, die sich durch ihre Rigidität und leichte Funktionalisierbarkeit auszeichnen, als molekulare Gerüste genutzt. Es wurde eine modulare Synthesestrategie erarbeitet, die das Zusammensetzen verschiedener Peptidbausteine erlaubt. Die Bausteine wurden *via* "Click"-Reaktion aus einem funktionalisierten Prolintrimer und einem geschützten Agonisten oder Antagonisten für den GRP-Rezeptor zusammengesetzt. Über diese Strategie wurden zehn verschiedene mono-, bi- und heterobivalente Liganden zum gezielten Targeting von Prostatakarzinomen mit überexprimierten GRP-Rezeptoren untersucht.

Zellexperimente zeigten, dass die Hybridpeptide deutlich besser internalisiert werden als zuvor bekannte Bombesinderivate. Zudem zeigten die Experimente, dass die Menge an internalisiertem Peptid von dem Abstand zwischen Agonist und Antagonist abhängt, und es einen optimalen Abstand gibt, der bei den untersuchten Hybridliganden bei 20 Å liegt. Daraufhin wurde der Hybridligand mit der höchsten Internalisierungsrate in Tierexperimenten mit tumortragenden Mäusen untersucht. In PET/CT-Scans konnte der Tumor deutlich abgebildet werden. Die Aufnahme in den Tumor war verglichen mit den Referenzen höher: Der Hybridligand [¹⁷⁷Lu]-2 zeigte eine Aufnahme von 18.6 % IA/g (4h p.i.), der bekannte Antagonist [¹¹¹In]-RM1 zeigt zum gleichen Zeitpunkt eine etwas geringere Aufnahme (13.5 % IA/g 4h p.i.), der Agonist AMBA eine deutlich niedrigere Aufnahme (3.7 % IA/g 4 h p.i.). Gleichzeitig gelang es durch das Hybridkonzept, die Auswaschung aus dem Tumor deutlich zu reduzieren. Nach 21 h waren noch 15.2 % der injizierten Aktivität im Tumor, mehr als doppelt so viel als für den Antagonisten [¹¹¹In]-RM1 gefunden wird (6.6 % IA/g 24 h p.i.). Für die hohe Aufnahme in die Tumorzelle wurde eine Hypothese entwickelt, die darauf beruht, dass die Distanz zwischen den

beiden Bindungselementen dem Abstand der beiden möglichen Bindungsstellen des Rezeptors entspricht.

In der Zukunft wird der Fokus darauf liegen, wie die optimierten Tumor Targeting-Eigenschaften beibehalten werden können aber die Aufnahme in die Nieren reduziert werden kann. Dafür sind sowohl neue Moleküle mit variierter Polarität als auch Studien zur Blockade der Nieren z.B. mit kationischen Aminosäuren notwendig.

Die vorliegende Arbeit öffnet die Tür für die Erweiterung des Konzepts auf andere Ligand-Rezeptorsysteme. So wurden im Rahmen einer Masterarbeit bereits multivalente Octreotid-Liganden für den Somatostatinrezeptor synthetisiert und vorläufig evaluiert.^[146] Da das modulare Konzept auch die Synthese heterovalenter Liganden mit Bindungselementen für zwei unterschiedliche Rezeptoren zulässt, könnten in Zukunft auch Liganden synthetisiert und untersucht werden, die für die Diagnose von Prostatakarzinomen nicht nur den GRP-R binden können, sondern auch den ebenfalls überexprimierten PSMA Rezeptor^[188] oder $\alpha_v\beta_3$ -Integrine.^[60]

6. Experimenteller Teil

6.1. Geräte und Materialien

¹H-NMR-Spektren wurden auf einem Bruker DPX 400 und einem DP 500 Spektrometer gemessen. Chemische Verschiebungen werden in ppm angegeben, und auf das Lösungsmittel referenziert.

Zur Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde ein Bruker esquire 3000plus verwendet, in Kombination mit einer Agilent 1100series HPLC wurden LC-MS Analysen durchgeführt. Für MALDI-TOF MS-Spektren wurde ein Applied Biosystems Voyager benutzt. Hochaufgelöste Massenspektren (HR-ESI-MS) wurden im Massenzentrum der ETH Zuerich auf einem Bruker maXis ESI-QTOF mit einer Präzision von 5 ppm aufgenommen. Die HR-MS Daten sind dekonvolviert angegeben.

Zur automatisierten Peptidsynthese wurde ein Syro I von MultisynTech (Witten, Deutschland) verwendet. Als Mikrowelle stand ein Initiator von Biotage (Uppsala, Schweden) zur Verfügung.

HPLC Chromatogramme wurden auf Shimadzu HPLC Systemen (LC-10 und Prominence Series) aufgenommen, Aufreinigung via semipräparativer HPLC erfolgte ebenfalls an einem LC-10 System von Shimadzu. Die verwendeten Säulen sind bei der jeweiligen Analyse/Aufreinigung angegeben. Die mobile Phase setzte sich in allen Fällen zusammen aus A (Acetonitril, HPLC Grade) und B (0.1% TFA in nanopure-Wasser, + 1% Acetonitril).

Das verwendete UV-Vis Spektrometer war ein Varian CARY 300 Bio, CD-Messungen wurden auf einem Applied Photophysics Chirascan durchgeführt.

Für Dünnschichtchromatographien wurden Merck Kieselgel-60 F₂₅₄ Aluminiumfolienplatten verwendet, zur präparativen Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 von Fluka und Acros mit einer Korngröße von 40-63 µm eingesetzt.

Die verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders beschrieben ohne vorherige Purifikation oder Trocknung eingesetzt und waren von den bekannten Distributoren. Aminosäuren und Harze wurden von Bachem und Novabiochem bezogen. DOTA(tBu₃) wurde bei CheMatech MDT (Dijon, Frankreich) gekauft.

Alle radioaktiven Arbeiten wurden am Universitätsklinikum Freiburg in entsprechend ausgerüsteten Labors durchgeführt. Die Qualitätskontrollen der Radiomarkierungen

erfolgten auf einer Knauer HPLC, ausgestattet mit einem Raytest-Radioaktivitätsdetektor. Die Proben der *in vitro* und *in vivo* Experimente wurden in einem Cobra II Model 5003 Gamma-Counter von Packard gemessen. Lutetium-177 wurde von itm (isotopen technologie münchen AG) geliefert, Gallium-68 wurde von einem Generator von Eckert & Ziegler (Berlin) eluiert, ein automatisiertes Synthesemodul, ebenfalls von Eckert & Ziegler, stand für die ⁶⁸Ga-Markierungen zur Verfügung. Die PET und PET/CT Studien wurden mit einem Kleintier-microPET (Focus 120, Concorde Microsystems, Knoxville, Tennessee USA) und einem Kleintier-CT (CT Imaging GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

6.2. Synthese der geschützten Bombesin-Peptidsequenzen

6.2.1. Generelle Protokolle zur Festphasensynthese von geschützten, alkylierten Bombesinderivaten

Zur Darstellung der geschützten mit C-terminalem Carboxamid wurde Sieber Amid Harz (Novabiochem) verwendet.

A Kupplung der ersten Aminosäure auf Sieber Amid Harz

Das Harz (Novabiochem, 0.6-0.7 mmol/g) wurde in einen Spritzenreaktor mit PE oder Teflon Fritte eingewogen, 2-3 mal mit Dichlormethan gewaschen und dann in 15 Minuten in DMF quellen gelassen. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde nach Protokoll **D** abgespalten. Das Harz wurde sorgfältig (5 x 1 min) mit DMF gewaschen.

5 eq Aminosäure und 4.9 eq HCTU wurden in DMF gelöst (ca. 1 ml/100 mg Harz) und mit 10 eq *i*Pr₂NEt (1:1 mit NMP v/v) versetzt, die Lösung wurde 2 min präaktiviert und dann auf das Harz gegeben.

Während der Reaktion wurde der Spritzenreaktor für 60 Minuten auf einem Thermoshaker radial geschüttelt, es wurde darauf geachtet dass das gesamt Harz agitiert wurde. Nach der angegebenen Zeit wurde die Reaktionslösung am Wasserstrahlvakuum abgesaugt und das Harz mit DMF gewaschen (4 x 1 min). Der Erfolg der Kupplung wurde per Kaiser Test und gegebenenfalls photometrischer Quantifizierung der Fmoc-Abspaltung überprüft. Vor Kupplung der zweiten Aminosäure (Protokoll **B**) wurde die Fmoc Schutzgruppe abgespalten (Protokoll **C**).

B Kupplung von Aminosäuren auf der festen Phase

Die weiteren Aminosäuren wurden gekuppelt wie in Protokoll A für die erste Aminosäure beschrieben, Equivalente und Kupplungszeiten waren identisch.

Variante von B: Automatisierte Peptidsynthese mit dem Synthesizer

Der Ansatz zur automatisierten Peptidsynthese wurde typischerweise mit 4 Äquivalenten Aminosäure berechnet. Die Fmoc-Aminosäuren und HCTU wurden je in DMF gelöst und als 0.5 M Lösung automatisiert zum Harz gegeben. 12 eq $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, als 3 M Lösung in NMP, wurden ebenfalls automatisiert dazugegeben. Die anschließende Kupplungszeit betrug 90 Minuten.

Variante II von B: Peptidsynthese in der Mikrowelle

Abweichend von den sonstigen Peptidsynthesen wurde für Kupplungen in der Mikrowelle COMU als Kupplungsreagenz verwendet. Auf das Harz wurde in einem verschliessbaren Mikrowellen-Vial (Biotage) die Mischung aus Fmoc-Aminosäure (5eq), COMU (5 eq) und $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (10 eq) in DMF gegeben. Das Gemisch wurde gerührt und für 10 Minuten auf 80°C erhitzt. Nach jeder Kupplung wurde das Harz mit einer Pipette in einen Spritzenreaktor mit PE/Teflon-Fritte überführt, um gewaschen werden zu können (4x DMF). Auch die Fmoc-Abspaltung wurde konventionell durchgeführt (C).

C Fmoc-Entschützung & Quantitativer Fmoc-Test

20 % Piperidin in DMF wurden zum gewaschenen Harz gegeben (ca. 1 ml/100 mg Harz), nach 2 min Agitation wurde die erste Portion Abspalllösung abgesaugt und durch eine zweite Portion 20 % Piperidin in DMF ersetzt, es wurde für weitere 15 min abgespalten. Nach Absaugen der Abspalllösung wurde das Harz sorgfältig mit DMF gewaschen (5 x 1 min).

Fmoc-Test, Variante 1 - Abspaltung einer kleinen Menge Harz: Mit einem Spatel wurde ein kleines Aliquot Harz dem Spritzenreaktor entnommen, in einem separaten Spritzenreaktor mit Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das Harz wurde gewogen (1-2 mg) und in einer definierten Menge 20 % Piperidin in DMF für 20 min abgespalten. Die Absorption der Abspalllösung bei 301 nm wurde im UV Spektrometer gemessen, als Referenz diente eine Küvette mit 20 % Piperidin in DMF.

Fmoc-Test, Variante 2 - Abspaltung der gesamten Menge Harz: Diese Variante lässt keine Reaktion mehr auf eine unvollständige Kupplung zu und dient damit nur der Kontrolle! Die Fmoc-Abspaltung wurde wie gewohnt durchgeführt, die verwendete Menge Abspatlösung wurde genau bemessen, eine dritte Portion 20 % Piperidin in DMF zum Nachspülen verwendet. Ein Aliquot der gesammelten Abspatlösungen (50-100 μ l) wurde mit DMF auf 3 ml aufgefüllt und in eine Küvette gegeben. Die Absorption der verdünnten Abspatlösung bei 301 nm wurde im UV Spektrometer gemessen, als Referenz diente eine Küvette mit der entsprechenden Menge 20 % Piperidin in DMF, mit DMF aufgefüllt auf 3 ml.

D Kupplung von Alkensäuren auf der festen Phase

Die N-terminale Alkensäure wurde mit EEDQ auf der festen Phase an das Peptid gekuppelt. Das Harz wurde zuvor sorgfältig mit Dichlormethan anh. gewaschen. Es wurden 3 eq Propionsäure (in einigen Fällen: Pentinsäure) und 3.1 eq EEDQ abgewogen und in Dichlormethan anh. (ca. 1ml / 100 mg Harz) gelöst. Die hellgelbe Mischung wurde sofort auf das Harz gegeben und für 3 h bei RT agitiert. Im Laufe der Reaktion verfärbte sich die Reaktionslösung dunkelbraun. Danach wurde das Harz sorgfältig mit Dichlormethan gewaschen und die vollständige Kupplung mit einem Kaiser Test überprüft. Anmerkung: Trotz vollständiger Kupplung verfärbten sich die Harzkügelchen während dem Kaiser Test rot-braun.

E Abspaltung geschützter Peptide von Sieber Amid Harz

Das sorgfältig mit Dichlormethan gewaschene Peptid wurde etappenweise mit 1% TFA in DCM abgespalten. Dafür wurden 5 eq 10% Pyridin in Methanol (ca. 2.2 ml auf 10 ml 1%iger TFA) in einem Zweihalskolben zum Neutralisieren der TFA vorgelegt. Die Abspatlösung (1.5 ml/100 mg Harz) wurde zu dem Harz gegeben und nach 2 Minuten Agitation in den Zweihalskolben abgesaugt (Abbildung 65). Dieser Schritt wurde 10 mal wiederholt. Das Harz wurde dann noch zweimal mit 9:1 DCM/MeOH gewaschen, die Waschlösungen wurden mit der Peptid/TFA/Pyridin Lösung vereinigt. Die Lösung wurde im Vakuum eingeeengt, bis nur noch wenige ml Flüssigkeit zurückblieben, es wurde darauf geachtet,

dass kein Feststoff ausfällt. Die Peptidlösung wurde in einem mit eiskaltem Wasser gefüllten Falcon ausgefällt und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert, durch frisches Wasser ersetzt, durchmischt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Abdekantieren wurde das ausgefallene Peptid in 4:1 Acetonitril / Wasser gelöst, eingefroren und lyophilisiert.

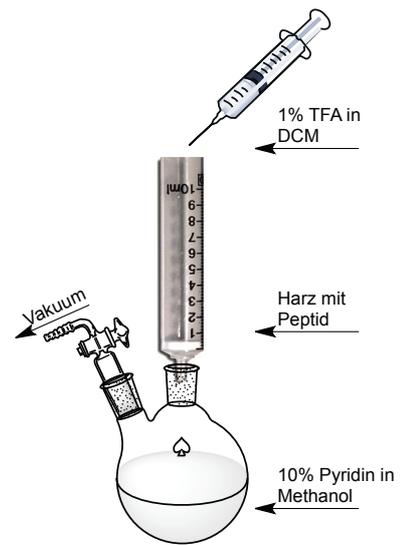
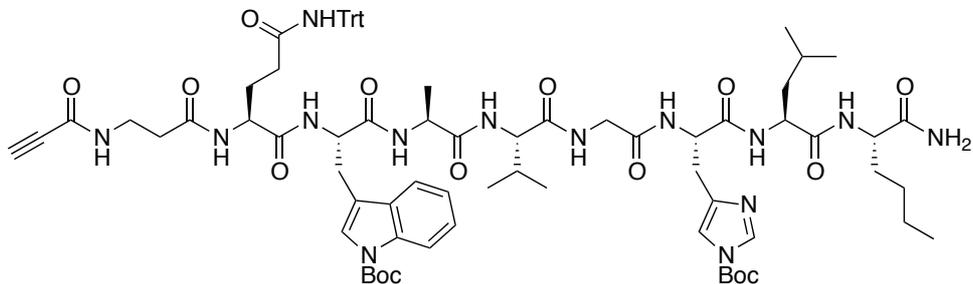


Abbildung 65. Aufbau zum Abspalten eines Peptides von Sieber Amid Harz

6.2.2. Synthese von alkylierten Bombesinderivaten

Synthese von Prs-βAla-[Nle¹⁴]Bombesin(7-14) 12

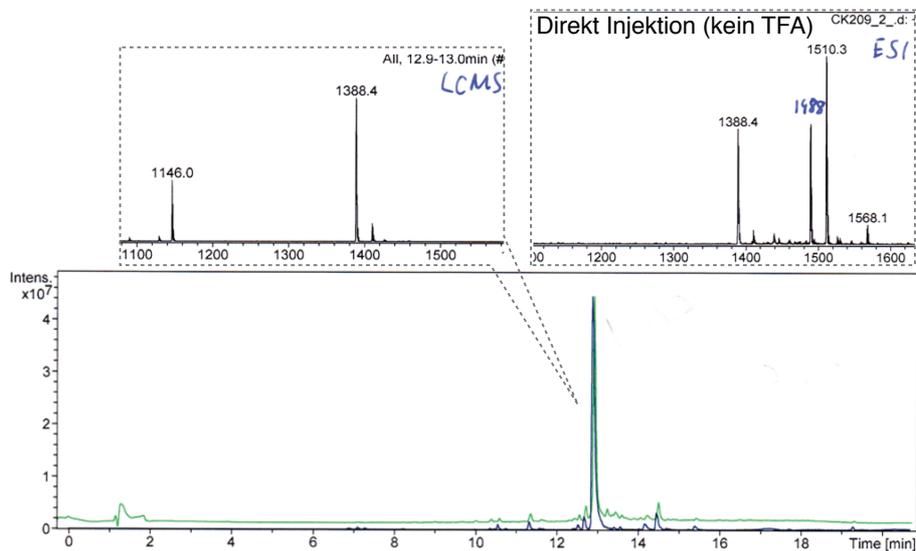


Die Synthese erfolgte entsprechend der Protokolle **A-E**, sie wurde sowohl manuell wie auch am Peptidsynthesizer durchgeführt.

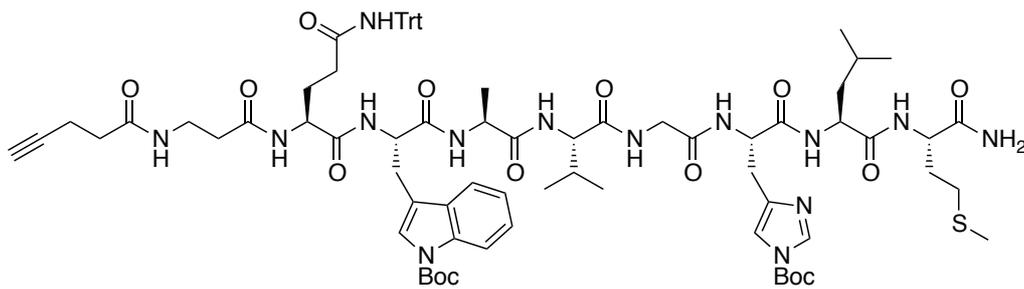
LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120 C18, 3µm, 125x3 mm, 90-0 % B in 16 min, 0.5 ml/min, 50°C
R_t = 13.16 min, Reinheit 70-80 % (214 nm)
Pos. Mode: m/z = 1146.3 [(M-Boc-Trt)+H⁺]⁺, 1388.4 [M-Boc+H⁺]⁺
(1487.74 g/mol gerechnet für C₇₉H₁₀₂N₁₄O₁₅)

Die Unversehrtheit der Schutzgruppen wurde durch eine direkte Injektion in das Massenspektrometer (320°C statt 365°C im ESI-Injektor, keine TFA) bestätigt:

ESI, direct Inj.: Pos. Mode: m/z = 1388.4 [(M-Boc)+H⁺]⁺, 1488.4 [M+H⁺]⁺, 1510.3 [M+Na⁺]⁺



Synthese von Pes-βAla-Bombesin(7-14) 20



Die Synthese erfolgte entsprechend der Protokolle **A-E**, sie wurde am Peptidsynthesizer durchgeführt.

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 85-0 % B in 25 min, 0.7 ml/min, 50°C

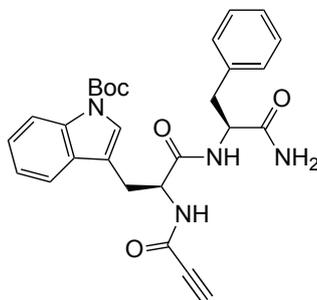
R_t = 18.75 min, Reinheit 91 % (254 nm)

Pos. Mode: m/z = 1434.4 [M-Boc+H⁺]⁺, 1456.4 [M-Boc+Na⁺]⁺

Neg. Mode: m/z = 1546.4 [M-Boc+TFA]⁻

(1533.83 g/mol gerechnet für C₈₀H₁₀₄N₁₄O₁₅S)

Synthese von Prs-Trp(Boc)-D-Phe-OH 33



Die Synthese erfolgte entsprechend der Protokolle **A-E**.

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 75-0 % B in 30 min, 0.5 ml/min, 50°C

R_t = 18.26 min

m/z = 403.3 [M-Boc+H⁺]⁺, 503.2 [M+H⁺]⁺

(502.56 g/mol gerechnet für C₂₈H₃₀N₄O₅S)

6.3. Synthese geschützter Peptide auf Chlortritylchlorid-harz

6.3.1 Generelle Protokolle zur Peptidsynthese auf 2-Chlortritylchlorid-Harz

Für die Synthese geschützter Peptide mit einer C-terminalen Carboxylfunktion wurde 2-Chlortritylchlorid-Harz (Rapp, 0.95 mmol/g) verwendet. Neben den bereits beschriebenen Protokollen **A-D** (Kapitel 2.1), wurden die folgenden speziellen Protokolle angewendet:

F Kupplung der ersten Aminosäure auf 2-Chlortritylchlorid-Harz

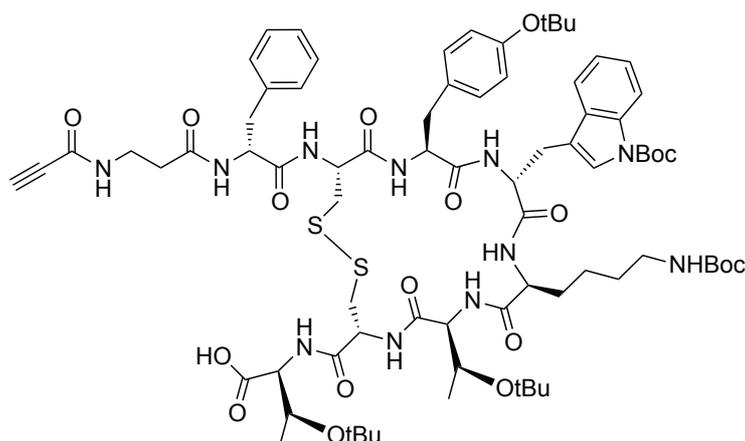
Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor mit PE oder Teflon Fritte eingewogen, 2-3 mal mit DCM gewaschen und dann in 15 Minuten in DCM quellen gelassen. 1 eq der Aminosäure und 4 eq $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ wurden in möglichst wenig DCM (1.5 ml/0.1 mmol) gelöst und auf das Harz gegeben. Nach 90 min bei RT wurde das Harz mit DCM und DMF gewaschen. Die nicht reagierten Chloride des Harzes wurden mit einem DCM/MeOH/ $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ -Gemisch (17:2:1) gesättigt (3 x 2 min) und die Beladung des Harzes durch einen Fmoc-Test bestimmt. Typischerweise wurden Beladungen von 92 – 95 % erreicht.

Die Kupplung der weiteren Aminosäuren wurde analog zu Protokollen **B**, **C** und **D** durchgeführt.

G Abspaltung geschützter Peptide von 2-Chlortritylchlorid-Harz

Das Harz mit dem fertigen Peptid wurde sorgfältig mit Dichlormethan gewaschen, und dann für 2 Stunden mit einer 6:2:2 Mischung aus DCM, Trifluorethanol und Essigsäure behandelt. Die Lösung mit dem abgespaltenen Peptid wurde im Vakuum eingengt, zum vollständigen Entfernen der Essigsäure wurde zweimal mit Toluol azeotrop co-evaporiert.

Synthese von Prs-βAla-[Tyr³]-Octreotat 21

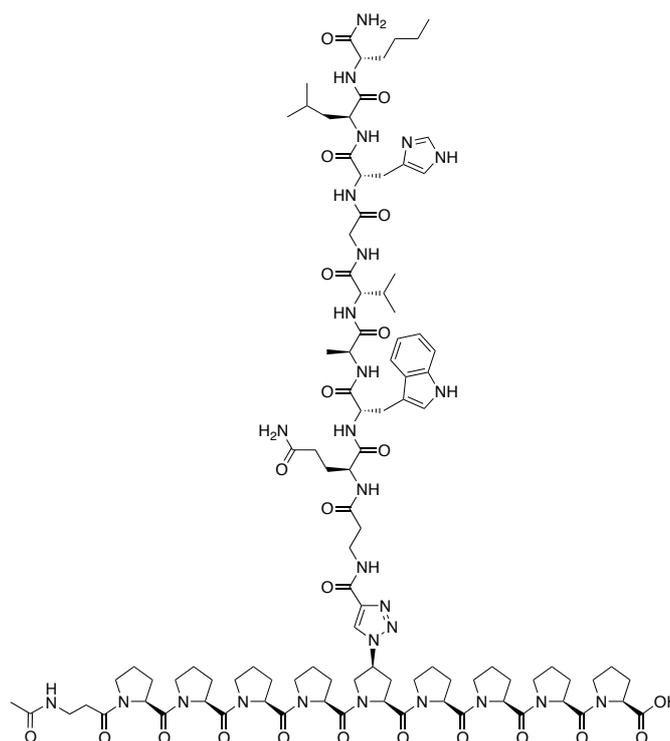


Das Octreotat wurde nach den Protokollen **B** (Variante in der Mikrowelle), **C** und **D** und **G** auf 250 mg (0.195 mmol) vorbeladenem H-Thr(O^tBu)-2-chlortrityl Harz (Novabiochem, 0.78 mmol/g) synthetisiert. Nach Abspaltung vom Harz wurden 131 mg (40 % d. Th.) Rohprodukt erhalten. Zur reduktiven Cyclisierung nach der Abspaltung wurde das Peptid in 1 ml MeOH gelöst und mit 10 eq Iod (190 mg) versetzt. Nach einer Stunde wurde das Methanol im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch in 10 ml DCM aufgenommen und zweimal mit 5 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde im Vakuum bis zur Trockne eingengt, in Wasser/Acetonitril 1:4 gelöst und lyophilisiert. Es wurden 100 mg (0.065 mmol, 33 %) des Produkts erhalten.

HPLC: Reposil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 90-0 % B in 15 min, 1 ml/min, 50°C
R_t = 12.84 min, Reinheit 87 % (214 nm)

MALDI: m/z = 1563.83 [M+Na⁺]⁺
(1540.88 g/mol gerechnet für C₇₇H₁₀₉N₁₁O₁₈S₂)

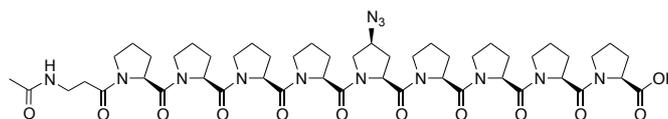
Synthese von Ac-βAla-Pro₄-(4*S*)Azp(Triazolyl-βAla-[Nle¹³]Bombesin(7-14))-Pro₄-OH **39**



Durchgeführt wurde die Synthese auf 50 mg 2-Chlortritylchlorid Harz (0.048 mmol, 1 eq), es wurden für die erste Kupplung 0.5 eq Prolin-Trimer **16** eingesetzt, die Beladung betrug nach der ersten Kupplung (Protokoll F) 0.022 mmol/50 mg. Der Bombesin-Baustein **15** (3eq) und Fmoc-Pro₃-OH **16** wurden mit HATU (3eq) gekuppelt (angepasstes Protokoll **B**). Fortgefahren wurde mit Protokoll **B**, nach der Kupplung des β-Alanins wurde mit 42 μl Essigsäureanhydrid (20 eq), 76 μl *i*Pr₂NEt (20 eq) und 0.5 ml DCM acetyliert. Zur Abspaltung wurde das Harz für 3 x 30 min mit 2.5 % TFA und 1 % TIS in DCM behandelt, die vereinten Abspalllösungen wurden im Vakuum eingeeengt, bis nur ein Öl zurückblieb. Zum Entfernen der Schutzgruppen wurden 2 ml 1:1 TFA/DCM mit 1 % TIS für 2 h zu dem Peptid gegeben. Das Lösungsmittel und die meiste TFA wurden im Vakuum entfernt und das Peptid in 8 ml Et₂O ausgefällt. Das ausgefällte Peptid wurde zentrifugiert, in Ether aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethers wurde das Peptid in Wasser gelöst und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 33.6 mg (0.016 mmol, 73 % bezogen auf die Beladung mit der ersten Aminosäure). Nach HPLC Aufreinigung wurden 15 mg reines Produkt erhalten (7.2 μmol, 32 %).

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120, C18, 3μm, 125x3 mm, 95-50 % B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C
R_t = 14.15 min
m/z = 1046.8 [M+2H⁺]²⁺
(2091.37 g/mol gerechnet für C₁₀₀H₁₄₃N₂₇O₂₃)

Synthese von Ac-βAla-Pro₄-(4S)Azp-Pro₄-OH 40



Durchgeführt wurde die Synthese auf 48 mg 2-Chlortritylchlorid Harz (0.046 mmol 1 eq), es wurden für die erste Kupplung 0.5 eq Prolin-Trimer **13** eingesetzt, die Beladung betrug nach der ersten Kupplung 0.021 mmol/50 mg (Protokoll **F**). Die trimeren Bausteine **13** und **16** und das β-Alanin wurden in der Mikrowelle gekuppelt (Protokoll **B**, Variante II). Die Acetylierung erfolgte mit 42 µl Essigsäureanhydrid (20 eq), 76 µl ^tPr₂NEt (20 eq) in 0.5 ml DCM. Zur Abspaltung wurde das Harz für 1 x 120 min + 1 x 5 min mit 2.5 % TFA und 1 % TIS in DCM behandelt, die vereinten Abspalllösungen wurden im Vakuum eingengt, bis nur ein Öl zurückblieb und an der HPLC aufgereinigt.

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120, C18, 3µm, 125x3 mm, 95-50 % B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C

R_t = 8.76 min

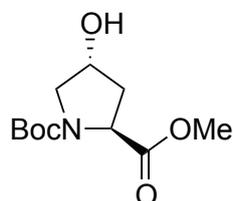
m/z = 1046.9 [M+H⁺]⁺, 1068.9 [M+Na⁺]⁺

(1046.18 g/mol gerechnet für C₅₀H₇₁N₁₃O₁₂)

6.4. Peptidsynthesen in Lösung

6.4.1 Synthese des Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH 13

Synthese von Boc-(4R)Hydroxyprolinmethylester 22



Hydroxyprolinmethylester Hydrochlorid (3,93 g, 21,62 mmol, 1 eq.) wurde in 65 ml 1M Kaliumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. Unter Stickstoffatmosphäre wurde in 15 ml Dioxan gelöstes Boc₂O (7,55 g, 34,6 mmol, 1,6 eq.) über 30 Minuten verteilt zu der Lösung gegeben. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 100 ml Ethylacetat versetzt und zweimal mit jeweils 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zweimal mit je 50 ml Ethylacetat rückextrahiert. Die daraufhin kombinierten organischen Phasen wurden mit 50 ml 1 M Salzsäure gewaschen, dann wurde die saure wässrige Lösung re-extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

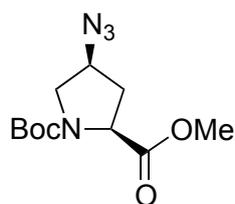
Das erhaltene bräunliche Öl wurde in einer minimalen Menge Diethylether aufgenommen (ca. 20 ml) und mit 100 ml Pentan gefällt. Die Suspension wurde unter Rückfluss erhitzt, und solange Diethylether dazugegeben, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Aus der erkalteten Lösung kristallisierten farblosen Kristalle aus, nach Filtration wurde das Produkt in 74 % Ausbeute erhalten.

DC (SiO₂, EtOAc/Pentan 1:1): R_f=0.3

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (s-cis und s-trans Konformation um die Carbamatbindung)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=4.42 – 4.33 (m, 2H, Hyp-H^α, Hyp-H^γ), 3.67 (s, 3H, -CH₃), 3.58 – 3.47 (m, 2H, Hyp-H^δ), 2.33 (s, 1H, -OH), 2.23 (m, 1H, Hyp-H^β), 1.99 (m, 1H, Hyp-H^β), 1.39 + 1.34 (2 s, 9H, ^tBu, 2 Konformere)

Synthese von Boc-(4S)Azidoprolinmethylester 23



4 g Boc-hydroxyprolinmethylester (**1**, 16.3 mmol, 1 eq) wurden in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst, 2.8 ml Triethylamin (20 mmol, 1.2 eq) wurden als Base dazugegeben und die Lösung im Eisbad auf -5°C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurden 1.55 ml Mesylchlorid (20 mmol, 1.2 eq) dazugetropft, die Temperatur wurde bei unter 0°C gehalten. Nach einer Stunde konnte im DC (SiO_2 , DCM/MeOH 9:1) kein Edukt mehr festgestellt werden. Die weissliche Suspension wurde dreimal mit gesättigter NaHCO_3 Lösung gewaschen und die wässrigen Phasen mit Dichlormethan rückextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat anh. getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt.

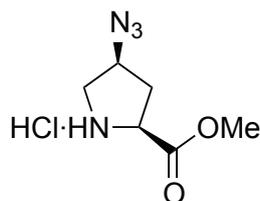
Das erhaltene Mesylat wurde in 20 ml absolutem Dimethylformamid gelöst, es wurden 5.2 g Natriumazid (80 mmol, 5eq) dazugegeben und das Gemisch auf 80°C erhitzt. Nach 15 h konnte im DC kein Edukt mehr beobachtet werden (SiO_2 , EA/Pentan 1:1). Das DMF wurde im Hochvakuum abdestilliert und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Das Gemisch wurde dreimal mit gesättigter NaHCO_3 Lösung gewaschen, die wässrigen Phasen mit Et_2O rückextrahiert, die vereinigten organischen Extrakte kombiniert und über Na_2SO_4 anh. getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde, wurde das Produkt über eine kurze Säule chromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , EA/Pentan 1:2) und in einer Ausbeute von 3.83 g (14.1 mmol, 89 % d. Th.) als gelbliches Öl erhalten.

DC (SiO_2 , EtOAc/Pentan 1:1): $R_f=0.8$

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (s-cis und s-trans Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 1.3:1

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=4.26$ (dd, $J=8.8$ Hz, 4.4 Hz 1H, Azp- H^{α}), 4.08 (m, 1H, Azp- H^{γ}), 3.69 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.66 (m, 1H, Hyp- H^{δ}), 3.41 (m, 1H, Hyp- H^{δ}), 2.40 (m, 1H, Hyp- H^{β}), 2.10 (m, 1H, Hyp- H^{β}), 1.39 (s, 9H, ^tBu). Isolierte Signale des Nebenkonformers: $\delta=4.36$ (dd, $J=8.9$ Hz, 3.8 Hz, 1H, Azp- H^{α}), 1.41 (s, 9H, ^tBu)

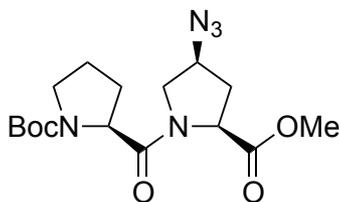
Synthese von (4S)Azidoprolinmethylester Hydrochlorid 24



3.83 g Boc-(4S)Azidoprolinmethylester (**2**, 14.1 mmol, 1 eq) wurden in 30 ml 4 M HCl in Dioxan (120 mmol, 8.5 eq) gelöst und bei Raumtemperatur für 1 h gerührt. Das Gemisch wurde im Hochvakuum mit doppelter Kühlfalle aufkonzentriert, bis nur ein farbloser Feststoff zurückblieb. Dieser wurde 30 ml DCM und 10 ml MeOH gelöst, nach Zugabe von 100 ml eiskaltem Diethylether bildete sich ein feiner weißer Niederschlag, der mit einer Filternutsche abgetrennt wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum aufkonzentriert, bis ein Rest von 15 ml blieb. Dieser wurde noch einmal mit 100 ml eiskaltem Diethylether versetzt, es bildete sich eine geringe Menge Niederschlag, der ebenfalls abfiltriert wurde. Die kombinierten Filterkuchen wurden im Hochvakuum getrocknet, das Produkt wurde als farbloses Salz in einer Ausbeute von 2.86 g (98 % d. Th.) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ =4.61 (m, 1H, Azp- H^γ), 4.56 (dd, J =9.4 Hz, 4.7 Hz, 1H, Azp- H^α), 3.78 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.42 (dd, 1H, J =12.5 Hz, 5.7 Hz Hyp- H^δ), 3.26 (m, 1H, Hyp- H^δ), 2.58 – 2.52 (m, 1H, Hyp- H^β), 2.22 – 2.19 (m, 1H, Hyp- H^β)

Synthese von Boc-Pro-(4S)Azp-OMe 25



2.98 g Boc-Pro-OH (13.85 mmol, 1 eq) wurden in 20 ml trockenem THF gelöst und unter Stickstoffatmosphäre mit 2.6 ml $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (15.24 mmol, 1.1 eq) und 250 mg 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP, 2 mmol, 0.15 eq) versetzt. Zu der Lösung wurden 3.02 g Boc_2O (13.85 mmol, 1 eq) gelöst in 2 ml THF gegeben und es wurde bei Raumtemperatur 30 min. gerührt. Zu der präaktivierten Aminosäure wurden in einer Portion 2.86 g (4S)Azidoprolinmethylester Hydrochlorid (**3**, 13.85 mmol, 1 eq) gelöst in 30 ml THF und 2.37 ml $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ (13.85 mmol, 1 eq) gegeben und weiter bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 100 ml Ethylacetat gelöst und dann nacheinander mit 1 M Salzsäure (2 x 50 ml), gesättigter NaHCO₃ Lösung (2 x 50 ml) und gesättigter Kochsalzlösung (50 ml) gewaschen. Das Ethylacetat mit dem Produkt wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Zurück blieb ein farblose Öl welches säulenchromatographisch (SiO₂, 2:1 Pentan/EtOAc -> 1:2 Pentan/EA) aufgereinigt wurde. Von dem Dipeptid wurden 1.74 g (34 % d. Th.) erhalten.

DC (SiO₂, EtOAc/Pentan 1:1): R_f=0.35

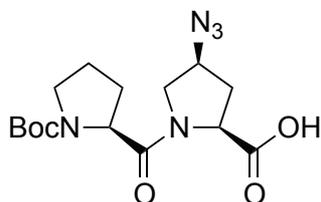
Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 2.6:1

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ=4.63 (m, 1H, Azp-H^α), 4.37 (dd, J=8.2 Hz, 3.1 Hz, 1H, Pro-H^α), 4.21 (m, 1H, Azp-H^γ), 4.04 (dd, J=10.6 Hz, 6.2 Hz, 1H, Azp-H^δ), 3.67 (s, 3H, -CH₃), 3.58 - 3.38 (m, 3H, Pro-H^δ, Azp-H^{δ'}), 2.40 (m, 1H, Azp-H^β), 2.17-1.98 (m, 4H, Azp-H^β, Pro-H^β, Pro-H^γ), 1.82 (m, 1H, Pro-H^γ), 1.38 (s, 9H, ^tBu)

Isolierte Signale des Nebenkonformers: δ=4.27 (dd, J=8.4 Hz, 3.7 Hz, 1H, Pro-H^α), 3.85 (dd, J=10.6 Hz, 6.2 Hz, 1H, Azp-H^β), 3.32 (m, 2H, Pro-H^δ), 1.32 (s, 9H, ^tBu)

ESI-MS: m/z = 390.1 [M+Na⁺]⁺
(367.40 berechnet für C₁₆H₂₅N₅O₅)

Synthese von Boc-Pro-(4*S*)Azp-OH 26

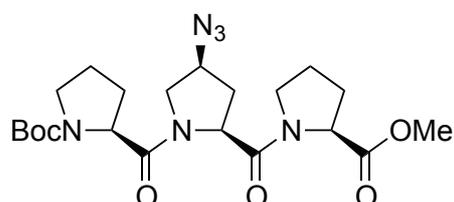


1.74 g Methylester (**4**, 4,7 mmol, 1 eq) wurden in 8 ml Methanol/THF 1:1 gelöst und mit 0.39 g Lithiumhydroxid Monohydrat (9.4 mmol, 2 eq) gelöst in 2.5 ml Wasser bei Raumtemperatur (29°C, Juni) versetzt und für 1 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion (DC, SiO₂, 1:1 Pentan/EA) wurden 40 ml Ethylacetat zu der Reaktionslösung gegeben, die mit 1 M HCl gewaschen wurde (3x, insgesamt 40 ml). Die organische Phase wurde

mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Die Ausbeute betrug 1.69 g (100 % d. Th.).

ESI-MS: m/z = 376.1 [M+Na⁺]⁺, 729.4 [2M+Na⁺]⁺, 1082.6 [3M+Na⁺]⁺
Negativer Modus: 352.2 [M-H⁺]⁻, 705.5 [2M-H⁺]⁻
(353.37 g/mol berechnet für C₁₅H₂₃N₅O₅)

Synthese von Boc-Pro-(4S)Azp-Pro-OMe 27



a) 1700 mg Boc-Pro-(4S)Azp-OH (**5**, 4.6 mmol, 1 eq) wurde in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst, unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 1058 mg EDC·HCl (5.52 mmol, 1.2 eq) und 473 µl *i*Pr₂NEt (2.76 mmol, 0.6 eq) dazugegeben. Nach 30 minütiger Präaktivierung wurden 914 mg Prolinmethylester Hydrochlorid (5.52 mmol, 1.2 eq) gelöst in 5 ml DCM und 473 µl *i*Pr₂NEt (2.76 mmol, 0.6 eq) dazugetropft.

Da in einer LC-MS Analyse noch EDC-aktivierte Carbonsäure (m/z = 509.2) zu sehen war, wurden weitere 274 mg Prolinmethylester Hydrochlorid (1.38 mmol, 0.3 eq) und 473 µl *i*Pr₂NEt (2.76 mmol, 0.6 eq) dazugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ein weiterer Peak in der LC-MS Analyse mit den gleichen Masse wurde dem deaktivierten N-Acylharnstoff zugeordnet.

Zur Aufarbeitung der Reaktion wurden 50 ml DCM dazugegeben und die organische Phase mit 3 x 20 ml 0.1 M HCl gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das farblose Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, EA mit steigendem Anteil *i*PrOH, 0-5 %), es wurden 662 mg Produkt (1.43 mmol, 31 % d. Th.) erhalten.

b) Die Reaktion wurde mit 2326 mg Boc-Pro-(4S)Azp-OH nach der gleichen Vorschrift wiederholt, die Zugabe des Prolinmethylesters erfolgte in einer Portion. Nach 3 d Reaktion bei Raumtemperatur (Wochenende) wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet, es wurden 1.96 g Produkt (4.2 mmol, 64 % d. Th.) erhalten.

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 2.3:1

Hauptkonformer: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.68$ (t, $J = 8$ Hz, 1H, Azp- H^α); 4.50 (dd, $J = 8.8$ Hz, 4 Hz, 1H, Pro C - H^α); 4.39 (dd, $J = 7.6$ Hz, 3.2 Hz, 1H, Pro N - H^α); 4.14-4.08 (m, 2H, Azp- H^γ , Azp- H^δ); 3.74-3.68 (m, 1H, Pro C - H^δ); 3.64 (s, 3H, OCH_3); 3.56-3.25 (m, 4H, Pro C - H^δ , 2x Pro N - H^δ , Azp- H^δ); 2.60-2.50 (m, 1H, Azp- H^β); 2.20-1.85 (m, 8H, 2x Pro C - H^β , 2x Pro N - H^β , 2x Pro C - H^γ , Azp- H^β , Pro N - H^γ); 1.81-1.71 (m, 1H, Pro N - H^γ); 1.37 (s, 9H, ^tBu)

Isolierte Signale des Nebenkofomers: $\delta = 4.61$ (t, $J = 8$ Hz, 1H, Azp- H^α); 4.29 (dd, $J = 7.6$ Hz, 3.2 Hz, 1H, Pro N - H^α); 4.08-3.94 (m, 2H, Azp- H^γ , Azp- H^δ); 3.65 (s, 3H, OCH_3); 1.33 (s, 9H, ^tBu)

LC-ESI-MS: Reprisil Gold 120 C18, 3 μm , 125x3 mm, 95-0 % B in 16 min, 0.5 ml/min, 50°C

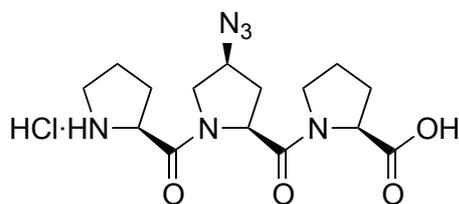
$R_t = 10.1$ min

$m/z = 365.2$ [M-Boc+ H^+] $^+$, 465.1 [M+ H^+] $^+$

ESI-MS: $m/z = 487.2$ [M+ Na^+] $^+$, 951.5 [2M+ Na^+] $^+$

(464.52 g/mol berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6$)

Synthese von H-Pro-(4*S*)Azp-Pro-OH*HCl 28



1.) 2.6 g Methylester (**6**, 5.6 mmol, 1 eq) wurden in 40 ml Methanol/THF 1:1 gelöst und mit 0.47 g Lithiumhydroxid Monohydrat (11.2 mmol, 2 eq) gelöst in 3 ml Wasser bei Raumtemperatur versetzt und für 2 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion (DC, SiO_2 , 1:1 Pentan/EA) wurden 50 ml Ethylacetat zu der Reaktionslösung gegeben, die mit 1 M HCl gewaschen wurde (3x, insgesamt 40 ml). Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Die Ausbeute betrug 2.55 g (100 % d. Th.).

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 2.6:1

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 4.66 (t, J = 8 Hz, 1H, Azp- H^α); 4.52 (dd, J = 8 Hz, 3.6 Hz, 1H, Pro $^{\text{C}}$ - H^α); 4.40 (dd, J = 8 Hz, 2.8 Hz, 1H, Pro $^{\text{N}}$ - H^α); 4.14 (m, 2H, Azp- H^γ , Azp- H^δ); 3.77-3.65 (m, 2H); 3.56-3.27 (m, 4H, Pro $^{\text{C}}$ - H^δ , 2x Pro $^{\text{N}}$ - H^δ , Azp- H^δ); 2.52 (m, 1H, Azp- H^β); 2.17-1.88 (m, 8H, 2x Pro $^{\text{C}}$ - H^β , 2x Pro $^{\text{N}}$ - H^β , 2x Pro $^{\text{C}}$ - H^γ , Azp- H^β , Pro $^{\text{N}}$ - H^γ); 1.81-1.73 (m, 1H, Pro $^{\text{N}}$ - H^γ); 1.37 (s, 9H, ^tBu)

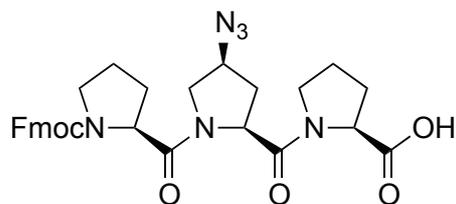
Isolierte Signale des Nebenkofomers: δ = 4.60 (t, J = 8 Hz, 1H, Azp- H^α); 4.30 (dd, J = 7.6 Hz, 3.2 Hz, 1H, Pro $^{\text{N}}$ - H^α); 4.08-3.94 (m, 2H, Azp- H^γ , Azp- H^δ); 1.33 (s, 9H, ^tBu)

ESI-MS: m/z = 473.2 $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$, 923.5 $[2\text{M}+\text{Na}^+]^+$
Negative mode: m/z = 449.3 $[\text{M}-\text{H}^+]^-$
(450.49 g/mol berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_6$)

2.) 2.55 g Boc-Pro-(4*S*)Azp-Pro-OH (5.6 mmol, 1 eq) wurden in 15 ml 4 M HCl in Dioxan (60 mmol, 10.7 eq) gelöst und bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Das Gemisch wurde im Hochvakuum mit doppelter Kühlfalle aufkonzentriert, bis nur ein farbloser Feststoff zurückblieb. Dieser wurde 10 ml DCM/MeOH 9:1 gelöst, und in 100 ml eiskaltem Diethylether geschüttet, es bildete ein feiner weisser Niederschlag, der mit einer Filternutsche abgetrennt wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum aufkonzentriert, bis ein Rest von 15 ml blieb. Dieser wurde noch einmal mit 100 ml eiskaltem Diethylether versetzt, es bildete sich eine geringe Menge Niederschlag, der ebenfalls abfiltriert wurde. Die kombinierten Filterkuchen wurden im Hochvakuum getrocknet, das Produkt wurde als farbloses Salz in einer Ausbeute von 1.95 g (5.05 mmol, 90 % d. Th.) erhalten.

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120 C18, 3 μm , 125x3 mm, 95-40% B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C
 R_t = 4.80 min
 m/z = 351.2 $[\text{M}+\text{H}^+]^+$, 701.4 $[2\text{M}+\text{H}^+]^+$
(350.37 g/mol berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4$)

Synthese von Fmoc-Pro-(4S)Azp-Pro-OH 13



1.95 g H-Pro-(4S)Azp-Pro-OH·HCl (**7**, 5.05 mmol, 1 eq) wurden in 9 ml Dioxan und 18 ml Wasser mit 1.07 g NaHCO₃ (12.78 mmol, 2.5 eq) gelöst (Schaumbildung, NaHCO₃ langsam zugeben!). Dann wurden bei Raumtemperatur 1.57 g Fmoc-Cl, gelöst in 11 ml Dioxan, dazugetropft und die Reaktion über Nacht gerührt. Die Lösung wurde mit einigen Tropfen 1M HCl angesäuert, bevor alles Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Der weisse Rückstand wurde in 100 ml 2%iger NaHCO₃-Lösung gelöst und mit 100 ml EtOAc gewaschen, die organische Phase wurde mit 50 ml 2%iger NaHCO₃-Lösung re-extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden kombiniert, mit 1 M HCl wurde angesäuert (pH = 2), um das Produkt auszufällen. Das Produkt wurde dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt (Produkt schäumt stark auf!). Das Produkt, ein zäher Feststoff wurde in einer minimalen Menge Dichlormethan gelöst und mit 200 ml kaltem Pentan als farbloser Feststoff gefällt. Das Fmoc-geschützte Produkt wurde nach Filtration und Trocknung als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 2.64 g (82 % d. Th) erhalten.

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 2.9:1

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ =

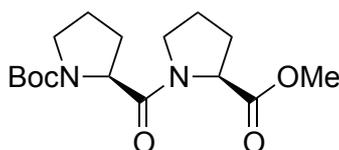
7.78 (m, 2H, Fmoc), 7.64-7.56 (m, 2H, Fmoc), 7.46-7.32 (m, 2H, Fmoc), 4.75 (t, *J* = 8.1 Hz), 1H, Azp-H^α), 4.63 (dd, *J* = 8.4 Hz, 3.4 Hz, 1H, Pro^C-H^α), 4.57 (m, 1H, Pro^N-H^α), 4.38-4.31 (m, 2H, Fmoc CH₂), 4.28-4.23 (m, 3H, Fmoc CH, Azp-H^γ, Azp-H^β), 3.79-3.70 (m, 2H, Pro^N-H^δ, Pro^C-H^δ), 3.60-3.42 (m, 3H, Pro^N-H^δ, Pro^C-H^δ, Azp-H^δ), 2.61 (m, 1H, Azp-H^β), 2.27-1.90 (m, 9H, Azp-H^β, alle Pro-H^β, alle Pro-H^γ)

Isolierte Signale des Nebenkonformers: δ = 4.15 (t, *J* = 5 Hz, 1H, Fmoc CH), 4.02 (dd, *J* = 8.4 Hz, 3.3 Hz, 1H, Pro^N-H^α), 3.93 (q, 1H, Azp-H^γ), 3.23 (dd, *J* = 9.8 Hz, 8.0 Hz, 1H, Azp-H^δ), 2.47 (m, 2H, Azp-H^β) 2.46 (m, 1H, Azp-H^β)

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120 C18, 3 μ m, 125x3 mm, 95-40% B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C
R_t = 15.83 min
m/z = 573.2 [M+H]⁺
(572.61 g/mol berechnet für C₃₀H₃₂N₆O₆)

6.4.2. Synthese des Fmoc-(Pro)₃-OH Bausteins 16

Synthese von Boc-Pro-Pro-OMe 29



6.97 g Boc-Pro-OH (32.4 mmol, 1.2 eq) wurde in 40 ml trockenem Dichlormethan gelöst, unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 5.69 g EDC*HCl (29.7 mmol, 1.1 eq) und 5.1 ml ⁱPr₂NEt (29.7 mmol, 1.1 eq) dazugegeben. Nach 30 minütiger Präaktivierung wurden 914 mg Prolinmethylester Hydrochlorid (27 mmol, 1 eq) dazugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Da im DC noch H-Pro-OMe erkennbar war, wurden 1.5 g Boc-Pro-OH (6.5 mmol, 0.2 eq) dazugegeben, die Reaktion wurde nach insgesamt 18 h aufgearbeitet. Zur Aufarbeitung der Reaktion wurden 60 ml DCM dazugegeben und die organische Phase nacheinander mit 3 x 50 ml 0.5 M HCl und gesättigter NaHCO₃ Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das farblose Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, 5 % MeOH in DCM), es wurden 5.85 g Produkt (17.9 mmol, 66 % d. Th.) erhalten.

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 1.5:1

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.56-4.45 (m, 2H, Pro-H α), 3.66 (s, 3H, -CH₃), 3.58-3.41 (m, 4H, Pro-H δ), 2.15-1.81 (m, 8H, Pro-H β/γ), 1.41 (s, 9H, ^tBu)

Isolierte Signale des Nebenkonformers:

δ = 4.36 (dd, 1H, Pro^N-H α), 1.35 (s, 9H, ^tBu)

ESI: m/z = 349.2 [M+Na]⁺, 675.4 [2M+Na]⁺

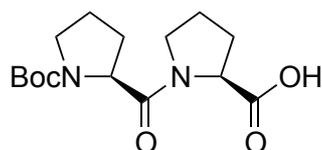
(326.39 g/mol berechnet für C₁₆H₂₆N₂O₅)

Fragmentierung:

MS²; Base Peak m/z = 349.2; Resultierend: m/z = 249.0 [(M - Boc)+Na]⁺

MS³, Base Peak m/z = 249.0; Resultierend: m/z = 152.0 [(H-Pro-OCH₃)+Na]⁺

Synthese von Boc-Pro-Pro-OH 30



5.85 g Methylester (**9**, 17.92 mmol, 1 eq) wurden in 35 ml Methanol/THF 1:1 gelöst und mit 1.5 g Lithiumhydroxid Monohydrat (35.84 mmol, 2 eq) gelöst in 10 ml Wasser bei Raumtemperatur versetzt und für 1 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion (DC, SiO₂, 1:1 Pentan/EA) wurden 100 ml Ethylacetat zu der Reaktionslösung gegeben, die mit 1 M HCl gewaschen wurde (3x, insgesamt 100 ml). Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Die Ausbeute betrug 5.4 g (97 % d. Th.).

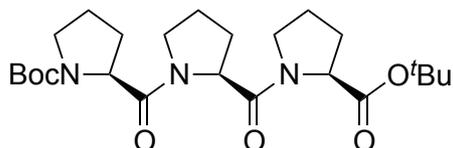
LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 95-5 % B in 20 min, 0.7 ml/min, 50°C

R_t = 9.6 min, Reinheit 99 % (214 nm)

Pos. Mode: m/z = 213.1 [(M - Boc)+H⁺]⁺, 647.3 [2M+Na⁺]⁺

(312.36 g/mol berechnet für C₁₅H₂₄N₂O₅)

Synthese von Boc-Pro-Pro-Pro-O^tBu 31



5.4 g Boc-Pro-Pro-OH (**10**, 17.28 mmol, 1 eq) wurde in 30 ml trockenem Dichlormethan gelöst, unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 3.65 g EDC·HCl (19 mmol, 1.1 eq) dazugegeben. Nach 30 minütiger Präaktivierung wurden 3.26 g Prolin-*tert*-butylester (19 mmol, 1 eq) dazugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Da im LC-MS noch Edukt erkenntlich war, wurden noch einmal 1 g Prolin-*tert*-butylester (5.8 mmol) und 1 ml *i*Pr₂NEt (5.8 mmol) dazugegeben und für noch einen Tag gerührt. Zur Aufarbeitung der Reaktion wurden 50 ml DCM dazugegeben und die organische Phase nacheinander mit 3 x 40 ml 0.5 M HCl und gesättigter NaHCO₃ Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das farblose Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, 3 % MeOH in DCM), es wurden 2.8 g Produkt (6 mmol, 35 % d. Th.) erhalten.

Anmerkung: Der verwendete Prolin-*tert*-butylester war 5 Jahre alt, bräunlich verfärbt und könnte eine mögliche Erklärung für die geringe Ausbeute sein.

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 1.6:1

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) Hauptkonformer: δ = 4.77 (dd, 1H, Pro-H α); 4.54-4.44 (m, 2H, Pro-H α); 3.88 - 3.7 (m, 2H, Pro-H δ); 3.72 - 3.51 (m, 4H, Pro-H δ); 2.28 - 1.75 (m, 12H, Pro-H β/γ); 1.47-1.41 (m, 18H, ^tBu, Boc);

Isolierte Signale des Nebenkonformer: δ = 4.72 (dd, 1H Pro-H α), 4.41 (dd, 1H, Pro-H α), 3.50 - 3.35 (m, 2H Pro-H δ),

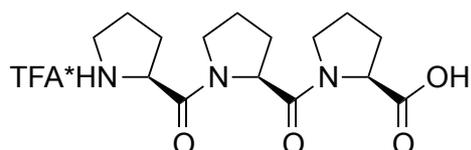
LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5 μ m, 150x4 mm, 90-5 % B in 20 min, 0.7 ml/min, 50°C

R_t = 12.6 min

m/z = 366.3 [(M-Boc)+H⁺]⁺, 466.3 [M+H⁺]⁺, 953.8 [2M+Na⁺]⁺

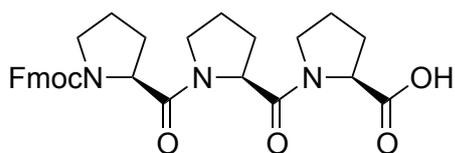
(466.58 g/mol berechnet für C₂₄H₃₉N₃O₆)

Synthese von H-Pro-Pro-Pro-OH*TFA **32**



2.7 g Boc-(Pro)₃-OtBu (**11**, 5.8 mmol, 1 eq) wurden in 15 ml TFA und 7.5 ml DCM gelöst und für 2.5 h bei RT gerührt. Die Abspatlösung wurde im Vakuum des Rotationsverdampfers auf 5 ml eingengt und auf 60 ml eiskalten Diethylether gegeben. Das TFA-Salz des Tripeptids fiel als farbloser Niederschlag aus, der abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet wurde. Ausbeute: 1.55 g (63 % d. Th.). Das Produkt wurde direkt weiter umgesetzt zu **16**

Synthese von Fmoc-Pro-Pro-Pro-OH 16



1.55 g H-(Pro)₃-OH*TFA (**12**, 5 mmol, 1 eq) wurden in 8 ml Dioxan und 16 ml Wasser mit 1.05 g NaHCO₃ (12.5 mmol, 2.5 eq) gelöst (Schaumbildung, NaHCO₃ langsam zugeben!). Dann wurden bei Raumtemperatur 1.55 g Fmoc-Cl (6 mmol, 1.2 eq), gelöst in 9 ml Dioxan, dazugetropft und die Reaktion über Nacht gerührt. Dioxan wurde im Vakuum des Rotationsverdampfers entfernt, es wurden 50 ml gesättigte NaHCO₃ Lösung hinzugegeben und 3 mal mit je 30ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 M Salzsäure angesäuert (pH = 2) und mit 3 mal je 50 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Fmoc-geschützte Produkt wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 1.55 g (58 % d. Th) erhalten.

Die NMR Spektren weisen zwei Konformere auf (*s-cis* und *s-trans* Konformation um die Carbamatbindung), im Verhältnis 1.6:1

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.74 (m, 2H, Fmoc); 7.60 (m, 2H, Fmoc); 7.39 (m, 2H, Fmoc); 7.29 (m, 2H, Fmoc); 4.73 (dd, *J* = 7,6 Hz, 4,4 Hz, 1H, Pro-H^α); 4.58-4.12 (m, 5H, 2x Pro-H^α, Fmoc-CH₂ / CH); 3.81 - 3.40 (m, 6H, Pro-H^δ); 2.22 - 1.72 (m, 12H, Pro-H^{β/γ});
Isolierte Signale des Nebenkonformer: δ = 4.44 (dd, *J* = 7.4 Hz, 4.4 Hz, 1H Pro-H^α)

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5μm, 150x4 mm, 90-5 % B in 20 min, 0.7 ml/min, 50°C

R_t = 12.13 min

Reinheit 95 %

m/z = 532.2 [M+H]⁺

(531.60 g/mol berechnet für C₃₀H₃₃N₃O₆)

6.5. Kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloadditionen (“Click“)

6.5.1. “Click“-Reaktionen in Lösung

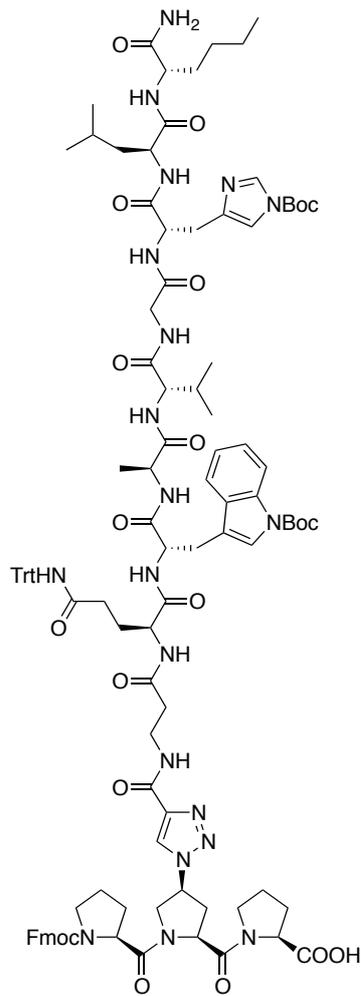
Zur Ligation der azidfunktionalisierten Prolin Bausteine mit den Bombesinderivaten wurde folgende Standardprozedur verwendet:

Eine 2:1 Mischung DMF/NMP wurde unter Argon im Ultraschallbad für 10 – 15 Minuten entgast. Das lyophilisierte, geschützte Bombesinderivat (**11** oder **12**, 1.1 eq) wurde in so wenig der entgasten DMF/NMP Mischung gelöst wie möglich und in ein Mikrowellen-Glasvial transferiert. Es wurde darauf geachtet, in dem Vial eine Argonatmosphäre beizubehalten. Azid (**13**, 1 eq) und 0.3 eq $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ wurden eingewogen und ebenfalls in das Vial gegeben. Das Vial wurde verschlossen und in die Mikrowelle gesetzt (2h, 80°C).

Um den Kupferkatalysator zu entfernen, wurde die Reaktionslösung über Nacht mit Festphasen-gebundenem EDTA (5 eq) gerührt.

Die Reaktionslösung wurde anschliessend direkt zur Festphasenpeptidsynthese weiterverwendet.

Analytik zu Fmoc-Pro-(4S)Azp(Triazolyl-βAla-[Nle¹⁴]Bombesin(7-14))-Pro-OH 15



LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120 C18, 3μm 125x3 mm

90-0 % B in 16 min 0.5 ml/min, 50°C

R_t = 14.08 min

m/z = 1961.5 [M-Boc+H⁺]⁺

(2060.35 g/mol gerechnet für

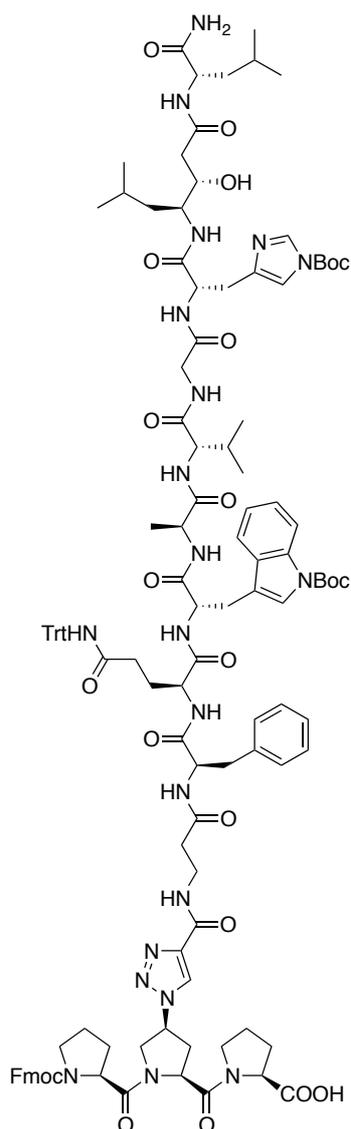
C₁₀₉H₁₃₄N₂₀O₂₁)

Nicht reagiertes **13**:

R_t = 11.24 min

m/z = 1168.0 [2M+Na⁺]⁺

Analytik zu Fmoc-Pro-(4S)Azp(Triazol-βAla-[MV594])-Pro-OH 14



LC-ESI-MS: Reprisil Gold 120 C18, 3μm 125x3 mm
90-0 % B in 16 min, 0.5 ml/min, 50°C

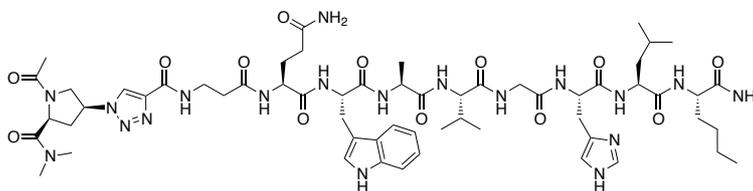
R_t = 14.39 min

m/z = 2152.9 [M-Boc+H]⁺

(2251.58 g/mol gerechnet für

C₁₂₀H₁₄₇N₂₁O₂₃)

Ac-(4S)Azp(Triazolyl-βAla-[Nle¹⁴]Bombesin(7-14))-dimethylamid 41



46 mg (0.031 mmol, 1 eq) des geschützten Peptids **12** wurden in entgastem DMF (1 ml) gelöst. 3.7 mg des Katalysators [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ (0.01 mmol, 0.3 eq) und 7 mg N-Acetyl-(4S)-azidoprolindimethylamid (0.031 mmol, 1 eq, von Roman Erdmann) wurden dazugegeben und die Lösung bei RT für 7 h gerührt, ESI-MS zeigte quantitativen Umsatz.

Kupfer wurde mit 40 mg (ca. 5 eq) Polymerbound-EDTA (Aldrich) entfernt – dafür wurde das Gemisch über Nacht gerührt, der Harz verfärbte sich dabei grün.

Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde mit 1 ml TFA/DCM für 1 h entschützt, in Et₂O ausgefällt und das Peptid an der HPLC gereinigt. Es wurden 17 mg reines Produkt (44 % d. Th.) isoliert.

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120 C18, 3µm 125x3 mm, 95-50 % B in 16 min, 0.5 ml/min, 50°C

R_t = 12.73 min

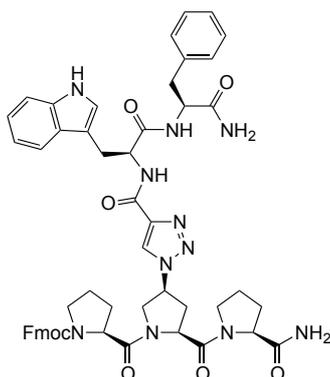
m/z = 1271.0 [M+H]⁺

(1270.44 g/mol gerechnet für C₅₉H₈₇N₁₉O₁₃)

Reinheit: 94 %

6.5.2. "Click"-Reaktionen an der festen Phase

Fmoc-Pro-(4S)Azp(Triazolyl-Trp-D-Phe-NH₂)-Pro-NH₂ **34**



Die Durchführung und Bedingungen sind anhand der Synthese von **34** beispielhaft erklärt und wurden so auch für die anderen "Click"-Versuche an der festen Phase angewendet.

Typischerweise wurden 1.5 eq alkinyliertes Peptid (pro Azid) **33** in so wenig entgastem DMF wie möglich gelöst. 0.3 eq [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ wurden dazu gegeben und das Gemisch wurde in ein verschliessbares Mikrowellengefäß mit 1eq **17** (Fmoc-Pro-(4S)-Pro-Rink-Amid Harz) gegeben und unter Argonatmosphäre für 2h bei 80°C erhitzt. Das Harz wurde danach gewaschen (0.5 % (w/v) Diethyldithiocarbamat + 0.5 % (v/v) ⁱPr₂NEt in DMF) um den Kupferkatalysator zu entfernen (min. 3-5 mal, jeweils 1-3 Minuten, bis keine Verfärbung mehr zu beobachten war). Anschliessend wurde noch dreimal mit DMF gewaschen. Das Konjugat wurde vom Harz abgespalten (Vorschrift siehe Kapitel 6).

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5 μ m 150x4 mm, 85-0 % B in 28 min, 0.5 ml/min, 50°C
R_t = 13.3 min
m/z = 975.0 [M+H]⁺
(974.07 g/mol gerechnet für C₅₃H₅₅N₁₁O₈)

6.6. Festphasensynthese der Oligoprolin-Bombesinkonjugate 1-10

Kupplung des ersten Bausteins

ChemMatrix Rink-Amid Harz (1eq) wurde mit DCM gewaschen (3x) und mit DMF für 15 Minuten quellen gelassen. 3 eq des Bausteins (**11** oder **12**, Stoffmenge anhand des Volumens der "Click"-Reaktionslösung berechnet) wurden mit HATU (2.95 eq) und ⁱPr₂NEt (6 eq) präaktiviert (2 min) und auf das Harz gegeben, das auf dem Thermoshaker bei RT agitiert wurde. Nach 3h wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz 3 mal mit DMF gewaschen. Cu(I / II) dass sich im Harz adsorbiert hatte, wurde mit einer Waschlösung (0.5 % (w/v) Diethyldithiocarbamat + 0.5 % (v/v) ⁱPr₂NEt in DMF) entfernt (min. 3-5 mal, jeweils 1-3 Minuten, bis keine Verfärbung mehr zu beobachten war). Anschliessend wurde noch dreimal mit DMF gewaschen. Fmoc-Abspaltung erfolgte nach dem beschriebenen Standardprotokoll (6.2.1.).

Kupplung eines Fmoc-(Pro)₃-OH Spacers

3 eq des Bausteins (**16**) wurden mit HATU (2.95 eq) in der kleinstmöglichen Menge DMF gelöst, ⁱPr₂NEt (6 eq) wurde dazugegeben und nach kurzer Präaktivierung wurde die Kupplungslösung auf das Harz gegeben, das auf dem Thermoshaker bei RT agitiert wurde. Nach 3h wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz 4 mal mit DMF gewaschen.

Kupplung des zweiten Bausteins:

3 eq des Bausteins (**11** oder **12**, Stoffmenge anhand des Volumens der "Click"-Reaktionslösung berechnet) wurden mit HATU (2.95 eq) und ⁱPr₂NEt (6 eq) präaktiviert (2 min) und auf das Harz gegeben, das auf dem Thermoshaker bei RT agitiert wurde. Nach 3h wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz 3 mal mit DMF gewaschen. Cu(I / II) dass sich im Harz adsorbiert hatte, wurde mit einer Waschlösung (0.5 % (w/v) Diethyldithiocarbamat + 0.5 % (v/v) ⁱPr₂NEt in DMF) entfernt (min. 3-5 mal, jeweils 1-3 Minuten, bis keine Verfärbung mehr zu beobachten war). Anschliessend wurde noch dreimal mit DMF gewaschen.

Kupplung von Fmoc- β -Alanin-OH und DOTA(^tBu₃)

Zur Kupplung der beiden letzten Bestandteile der Liganden wurde nach dem Protokoll B verfahren (Kapitel 2). Als Kupplungsreagenz wurde abweichend vom Protokoll HATU verwendet.

Abspaltung vom Harz mit TFA

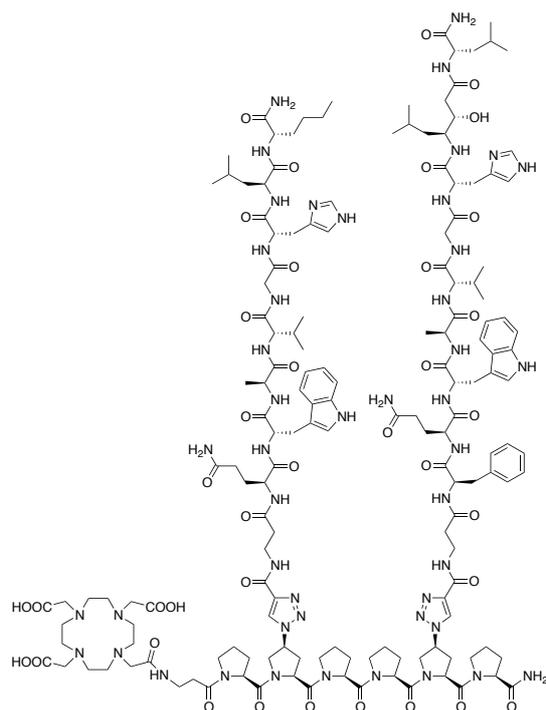
Das Harz wurde sorgfältig mit DCM gewaschen. Dann wurde eine Mischung aus 95% TFA, 2.5% TIS und 2.5% Wasser für 90 Minuten auf das Harz gegeben (ca. 0.7 ml auf 20 mg Harz). Mit einer zweiten Portion TFA/TIS/Wasser wurde für weitere 60 Minuten abgespalten. Die beiden Portionen wurden vereint, im Vakuum eingeeengt (ca. 0.2 ml) und in eiskaltem, trockenem Ether (ca. 10 ml) ausgefällt. Das Gefäß wurde zentrifugiert, der Ether abdekantiert und das ausgefallene Peptid in Wasser gelöst und lyophilisiert um Reste an Ether zu entfernen. Dann wurde der Ligand an der HPLC aufgereinigt (Reprosil Gold 120 5 μ m, 150x16 mm, 8 ml/min, verschiedene Gradienten).

Synthese der "kalten" Lutetium und Indium Komplexe

1 eq DOTA-Peptid wurde in 0.4 M Ammoniumacetat-Puffer (pH = 5.0, 100 μ l / 0.1 μ mol DOTA-Peptid) gelöst. Für eine Indium-Stammlösung wurden 10 mg InCl₃ anh. in 1 ml 0.04 M HCl gelöst, 3 eq InCl₃ wurden für die Komplexierung verwendet und zum DOTA-Peptid in ein Eppendorf-Tube pipettiert (typische Menge DOTA-Peptid: 0.2 μ mol). Das Tube wurde in einem Thermoshaker bei 95°C für 20-25 min erhitzt. Nach erfolgter Komplexierung wurde der Indium-Komplex über eine Sep-Pak C18 Kartusche aufgereinigt. Die Sep-Pak C18 Kartusche wurde mit 10 ml EtOH und anschliessend 10 ml Wasser präkonditioniert, dann wurde die Reaktionslösung langsam mit einer Spritze auf den Sep-Pak aufgetragen. Zunächst wurde das überschüssige Metallsalz und der Puffer mit 4.5 ml H₂O eluiert, dann wurde der retardierte Komplex mit 1.5 ml MeOH eluiert. Angeschlossen wurde eine Reinigung des Komplexes an der HPLC (Reprosil Gold 120 5 μ m, 150x16 mm, 8 ml/min, verschiedene Gradienten).

Die Synthese der Lutetium-Komplexe erfolgte auf die gleiche Weise mit LuCl₃*H₂O.

Hybridligand **1**



HR-MS	Gemessen	Berechnet für $C_{160}H_{231}CuN_{47}O_{38}^*$	Abweichung (ppm)
Isotopen:	3481.6780 (57%)	3481.6884 (58%)	3.0
	3482.6931 (100%)	3482.6918 (100%)	0.4
	3483.6652 (62%)	3483.6951 (86%)	8.6
	3484.6746 (50%)	3484.6985 (49%)	6.9

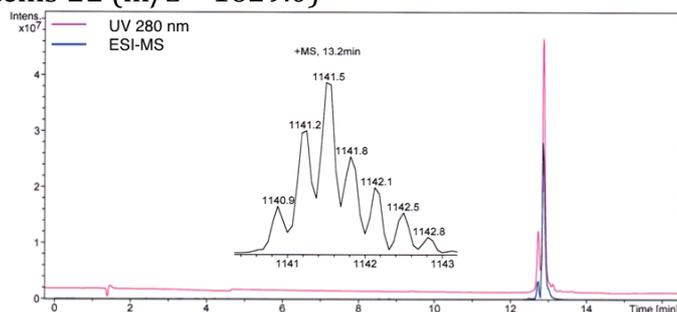
* Die gefundene Masse entspricht der Masse des Kupfer-Adduktes. Das LC-MS zeigt die korrekte, metallfreie Masse, da es in Gegenwart von Protonen (0.1% TFA) aufgenommen wurde. Auch die erfolgreichen Radiomarkierungen zeigen, dass es sich nur um Kupfer-Spuren gehandelt hat.

LC-ESI-MS: Reprisil Gold 120, C18, 3 μ m, 125x3 mm, 95-50 % B in 14 min, 0.5 ml/min, 50°C

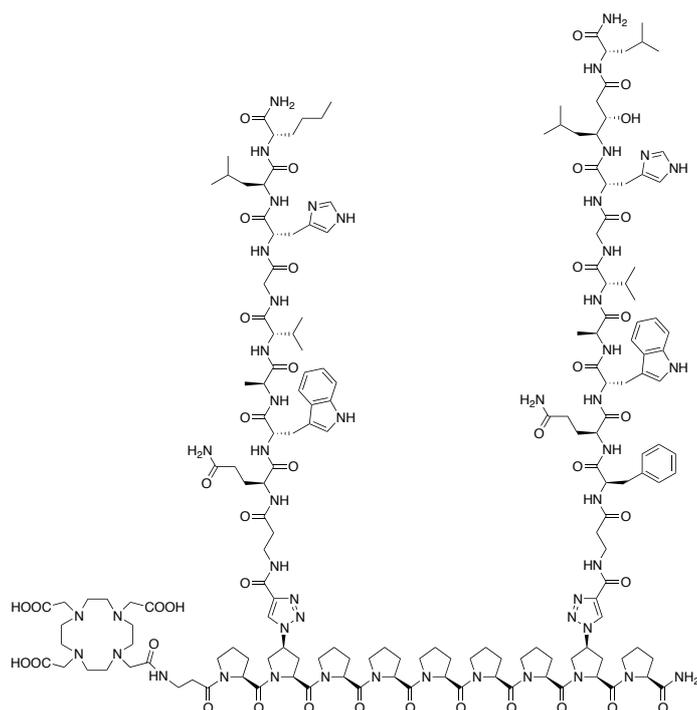
R_t = 12.85 min

m/z = 1141.5 $[M+3H]^+_{3+}$, 1711.5 $[M+2H]^+_{2+}$

Reinheit 85 % - der Peak bei 12.7 min hat die Masse des acetylierten Bausteins **11** (m/z = 1629.0)

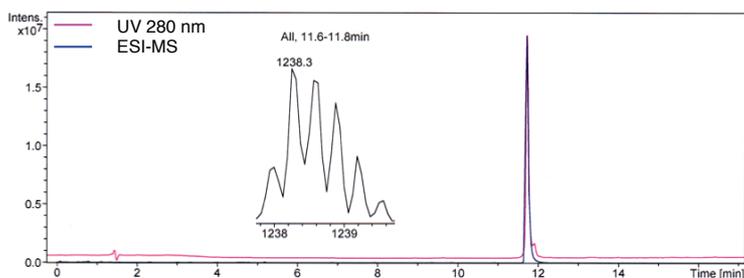


Hybridligand 2



HR-MS	Gemessen	Berechnet für C ₁₇₅ H ₂₅₂ N ₅₀ O ₄₁	Abweichung (ppm)
Isotopen:	3709.9011 (38%)	3709.9171 (53%)	4.3
	3710.9050 (83%)	3710.9205 (100%)	4.2
	3711.9130 (100%)	3711.9238 (94%)	2.9
	3712.9077 (87%)	3712.9272 (59%)	5.3
	3713.9030 (47%)	3713.9305 (27%)	7.4

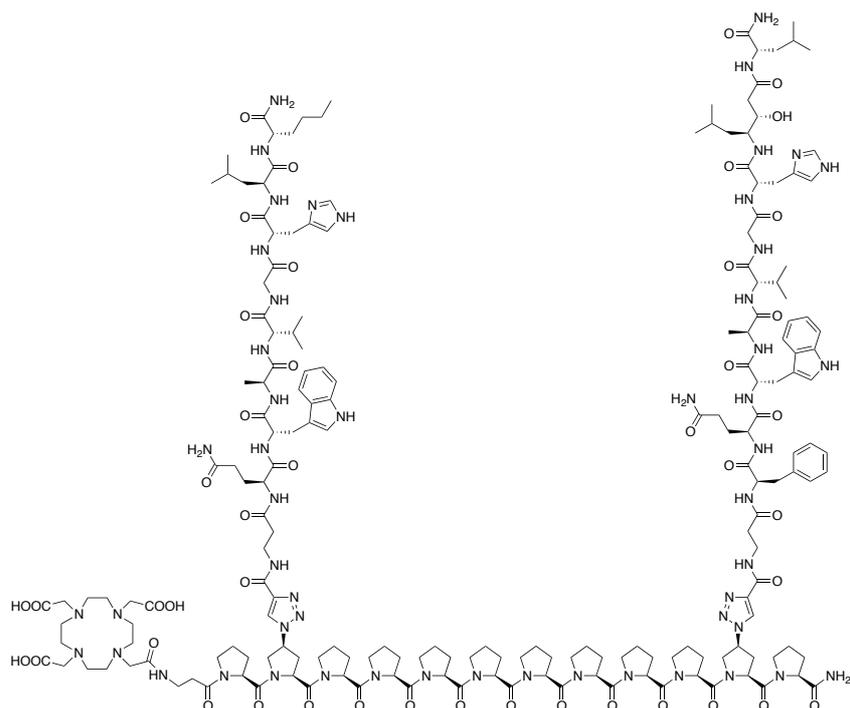
LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120, C18, 3µm, 125x3 mm, 95-50 % B in 14 min, 0.5 ml/min, 50°C
 R_t = 12.81 min
 m/z = 1238.3 [M+3H⁺]³⁺
 Reinheit 96 %



Analytik des ^{nat}Lutetium(III)-Komplexes (gleiche LC-MS Methode):

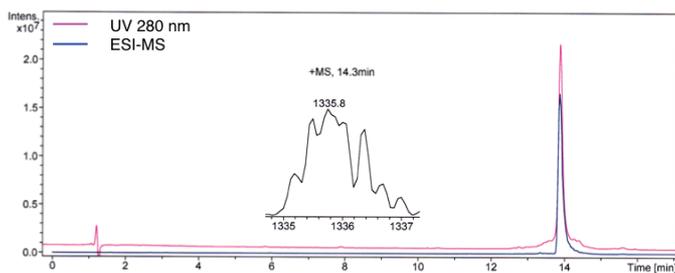
LC-ESI-MS: R_t = 14.25 min m/z = 972.1 [M+4H⁺]⁴⁺ m/z = 1296.0 [M+3H⁺]³⁺
 (3884.13 g/mol berechnet für C₁₇₅H₂₄₉LuN₅₀O₄₁)

Hybridligand **3**

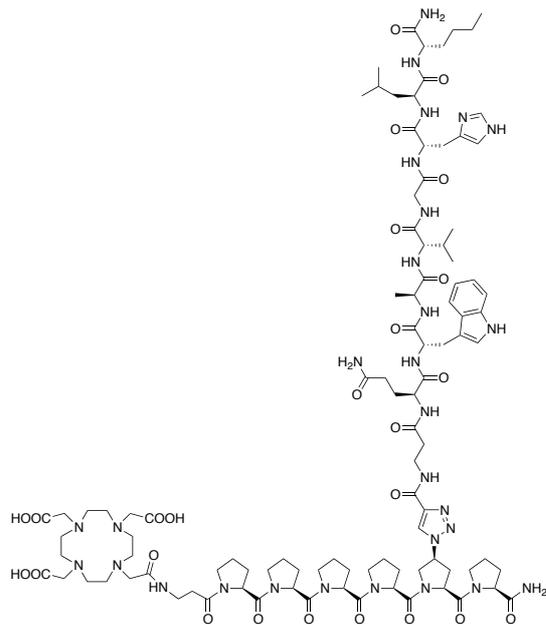


HR-MS	Gemessen	Berechnet für C ₁₉₀ H ₂₇₃ N ₅₃ O ₄₄	Abweichung (ppm)
Isotopen:	4001.0798 (44%)	4001.0754 (48%)	1.1
	4002.0721 (89%)	4002.0788 (98%)	1.7
	4003.0726 (96%)	4003.0821 (100%)	2.4
	4004.0917 (100%)	4004.0855 (68%)	1.5
	4005.0987 (79%)	4005.0888 (34%)	2.5
	4006.0852 (41%)	4006.0922 (10%)	1.7

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120, C18, 3µm, 125x3 mm, 95-50 % B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C
 R_t = 14.15 min
 m/z = 1335.8 [M+3H⁺]³⁺
 Reinheit 90%



Monovalenter Agonist 4



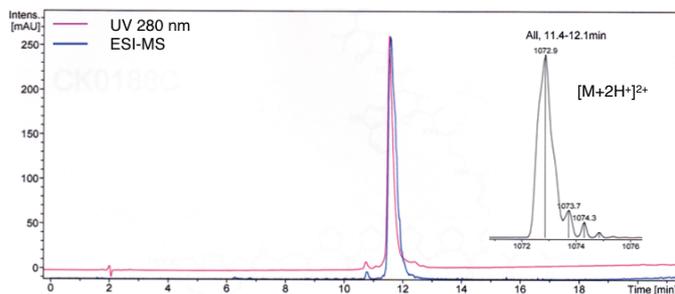
HR-MS	Gemessen	Berechnet für C ₉₉ H ₁₄₇ N ₂₉ O ₅	Abweichung (ppm)
Isotopen:	2142.1218 (86%)	2142.1123 (93%)	4.4
	2143.1263 (100%)	2143.1156 (100%)	5.0
	2144.1244 (69%)	2144.1190 (53%)	2.5
	2145.1221 (33%)	2145.1224 (19%)	0.1

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 90-35 % B in 19 min, 0.7 ml/min, 50°C

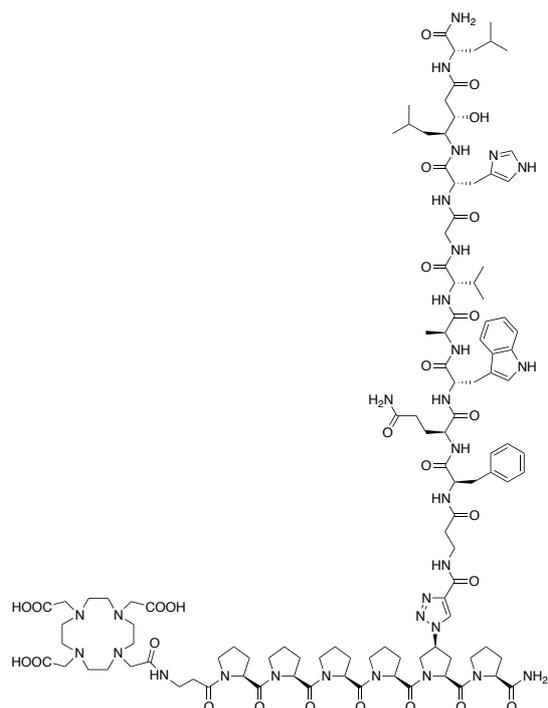
R_t = 11.72 min

m/z = 1072.9 [M+2H]²⁺

95 % pur



Monovalenter Antagonist 5



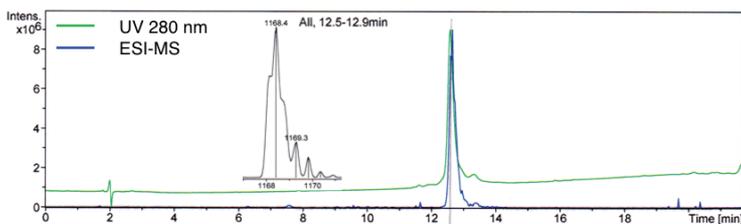
HR-MS	Gemessen	Berechnet für $C_{110}H_{160}N_{30}O_{27}$	Abweichung (ppm)
Isotopen:	2333.2253 (86%)	2333.2069 (84%)	7.9
	2334.2246 (100%)	2334.2103 (100%)	6.1
	2335.2247 (82%)	2335.2136 (59%)	4.8
	2336.2252 (41%)	2336.2170 (23%)	3.5
	2337.2203 (7 %)	2337.2202 (18 %)	0.0

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5 μ m, 150x4 mm, 90-35 % B in 19 min, 0.7 ml/min, 50°C

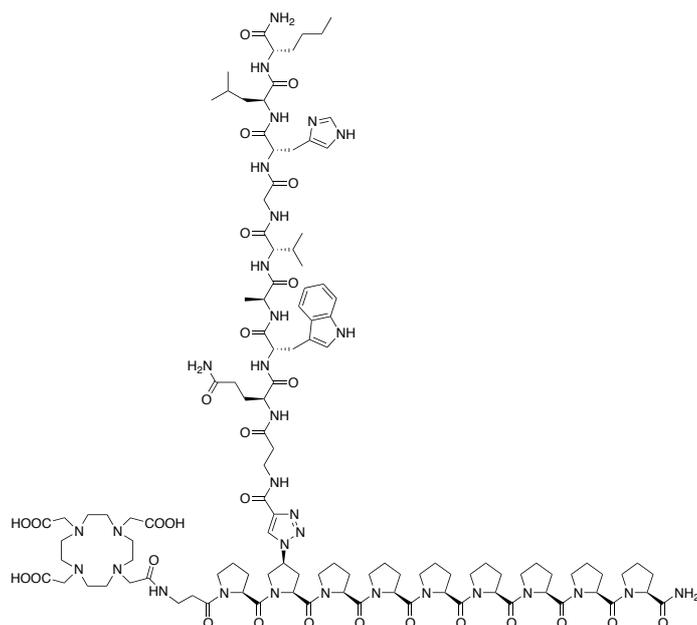
R_t = 12.76 min

m/z = 1168.4 $[M+2H]^2+$

Reinheit 91 %



Monovalenter Agonist 6



HR-MS	Gemessen	Berechnet für C ₁₁₄ H ₁₆₈ N ₃₂ O ₂₈	Abweichung (ppm)
Isotopen:	2433.3195 (84%)	2433.2706 (81%)	20.1
	2434.2980 (100%)	2434.2739 (100%)	9.9
	2435.2960 (49%)	2435.2773 (61%)	7.7

Aufgrund der Abweichungen > 5 ppm wurden auch die Kalium-Addukte betrachtet:

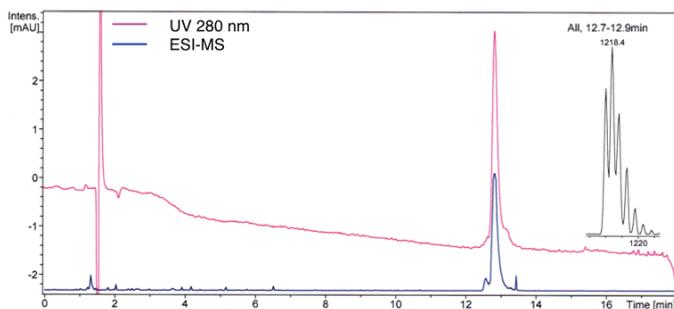
HR-MS:	Gemessen	Berechnet für C ₁₁₄ H ₁₆₇ KN ₃₂ O ₂₈	Abweichung (ppm)
Isotopen:	2471.2293 (100%)	2471.2270	0.9
	2472.2363 (91%)	2472.2303	2.4

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120, C18, 3µm, 125x3 mm, 90-60 % B in 15 min 0.5 ml/min, 50°C

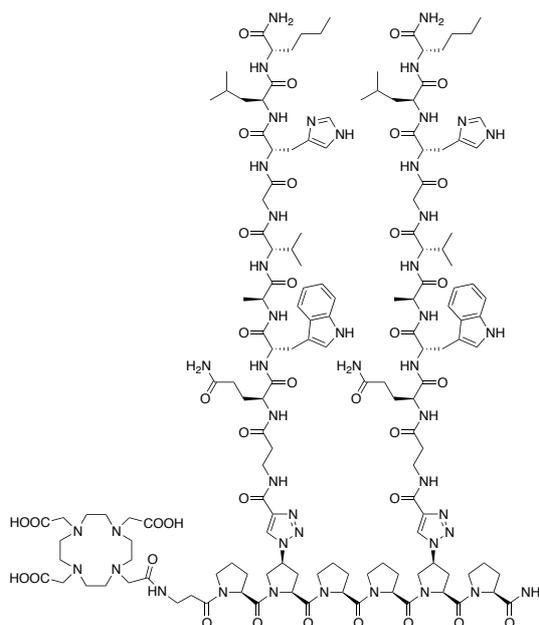
R_t = 12.81 min

m/z = 1218.4 [M+2H⁺]²⁺; 812.7 [M+3H⁺]³⁺

90 % pur

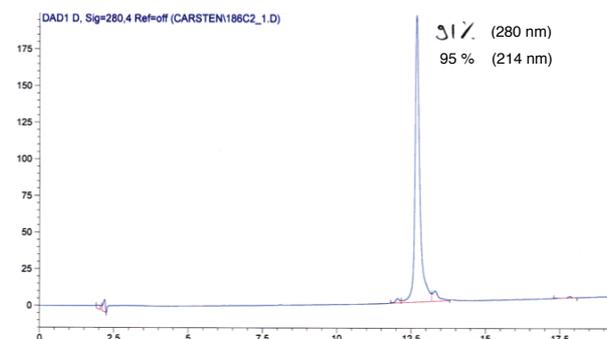


Divalenter Agonist 7



HR-MS	Gemessen	Berechnet für C ₁₄₉ H ₂₁₈ N ₄₆ O ₃₆	Abweichung (ppm)
Isotopen:	3227.6866 (62%)	3227.6642 (62%)	6.9
	3228.6789 (100%)	3228.6675 (100%)	3.5
	3229.6877 (98%)	3229.6709 (80%)	5.2
	3230.6914 (33%)	3230.6743 (42%)	5.3

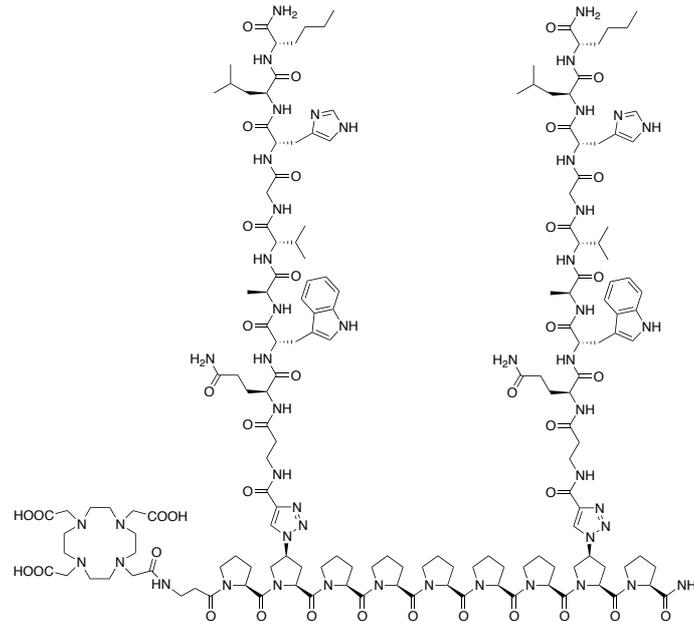
LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 90-35 % B in 19 min, 0.7 ml/min, 50°C
 R_t = 12.68 min
 m/z = 1616.1 [M+2H⁺]²⁺; 1077.8 [M+3H⁺]³⁺
 Reinheit 91 %



Analytik des ^{nat}Indium(III)-Komplexes (gleiche LC-MS Methode):

R_t = 13.82 min, m/z = 1671.7 [M+2H⁺]²⁺, 1115.1 [M+3H⁺]³⁺
 (3341.41 berechnet für C₁₄₉H₂₁₅InN₄₆O₃₆)

Divalenter Agonist **8**



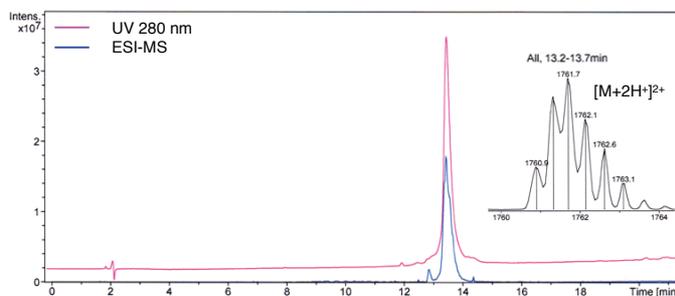
HR-MS	Gemessen	Berechnet für C ₁₆₄ H ₂₃₉ N ₄₉ O ₃₉	Abweichung (ppm)
Isotopen:	3518.8354 (51%)	3518.8225 (56%)	3.7
	3519.8446 (64%)	3519.8258 (100%)	5.3
	3520.8323 (100%)	3520.8292 (88%)	0.9
	3521.8345 (73%)	3521.8325 (52%)	0.6
	3522.8295 (25%)	3522.8359 (22%)	1.8

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 90-35 % B in 19 min, 0.7 ml/min, 50°C

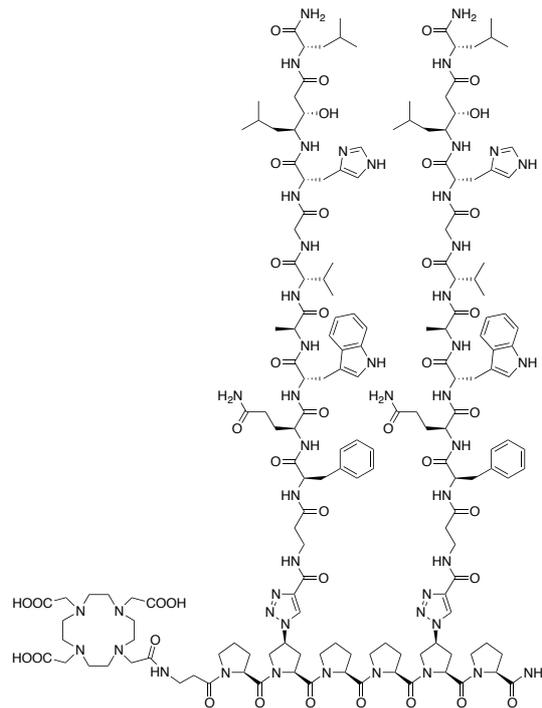
R_t = 13.55 min

m/z = 1174.9 [M+2H]²⁺, 1761.7 [M+3H]³⁺

Reinheit 95 %



Divalenter Antagonist 9



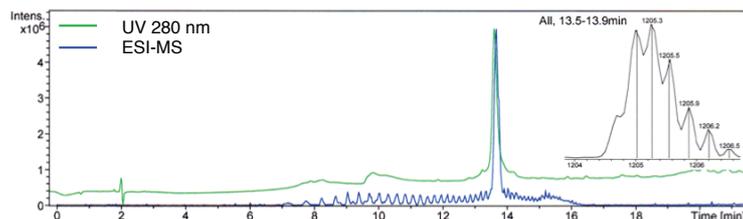
HR-MS	Gemessen	Berechnet für $C_{171}H_{244}N_{48}O_{40}$	Abweichung (ppm)
Isotopen:	3609.8587 (38%)	3609.8534 (54%)	1.5
	3610.8542 (90%)	3610.8568 (100%)	0.7
	3611.8652 (78%)	3611.8602 (92%)	1.4
	3612.8428 (100%)	3612.8635 (56%)	5.7
	3613.8519 (44%)	3613.8669 (25%)	4.2

LC-ESI-MS: Reprisil 100 C18, 5 μ m, 150x4 mm, 90-35 % B in 19 min, 0.7 ml/min, 50°C

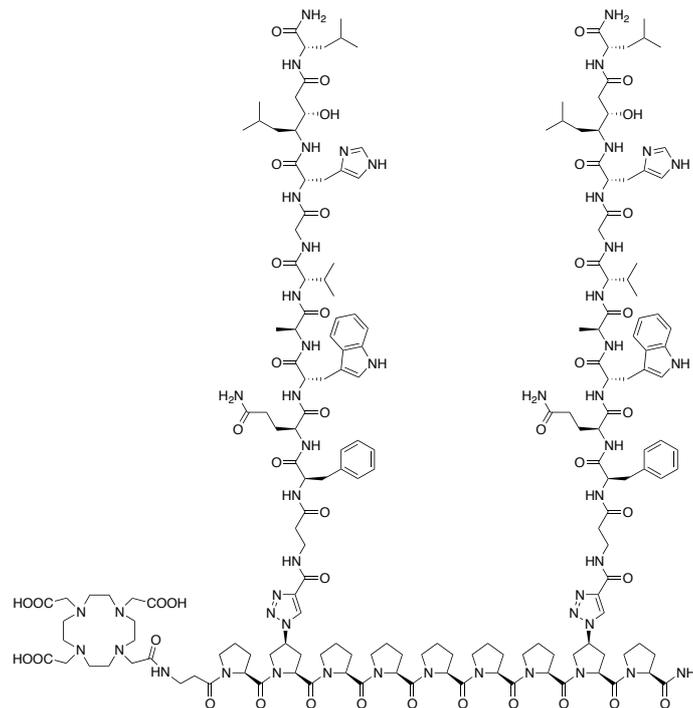
R_t = 13.78 min

m/z = 1807.1 $[M+2H]^+_{2+}$, 1205.3 $[M+3H]^+_{3+}$

Reinheit 90 %



Divalenter Antagonist **10**



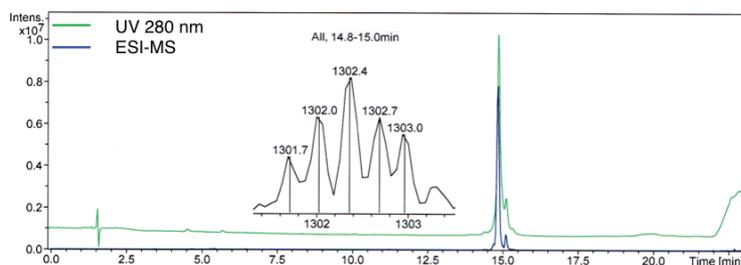
HR-MS	Gemessen	Berechnet für C ₁₈₆ H ₂₆₅ N ₅₁ O ₄₃	Abweichung (ppm)
Isotopen:	3901.0156 (35%)	3901.0117 (50%)	1.0
	3902.0074 (95%)	3902.0151 (100%)	2.0
	3903.0218 (100%)	3903.0184 (100%)	0.9
	3904.0122 (66%)	3904.0218 (66%)	2.5
	3905.0236 (37%)	3905.0252 (32%)	0.4

LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120, C18, 3µm, 125x3 mm, 90-50 % B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C

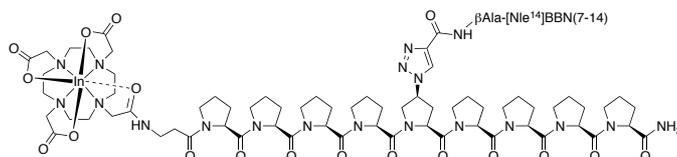
R_t = 14.91 min

m/z = 977.1 [M+4H⁺]⁴⁺, 1302.4 [M+3H⁺]³⁺

Reinheit 86% - der Peak bei 15.1 min hat die Masse des entsprechenden Kupferkomplexes (1323.3 [M+3H⁺]³⁺)



^{nat}In-DOTA-Pro₄-(4S)Azp(Triazolyl-β-Ala-[Nle¹⁴]Bombesin(7-14)-Pro₄-NH₂) 37



LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120 C18, 3μm, 125x3 mm, 95-50 % B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C

Vorläufer (metallfrei): $R_t = 11.02$ min

$m/z = 1218.6 [M+2H^+]^{2+}$

(2434.75 g/mol gerechnet für C₁₁₄H₁₆₈N₃₂O₂₈)

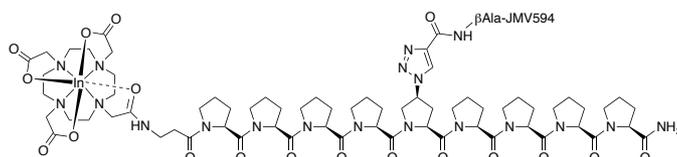
Indium-Komplex: $R_t = 11.42$ min

$m/z = 1274.4 [M+2H^+]^{2+}$

(2546.55 g/mol gerechnet für C₁₁₄H₁₆₅InN₃₂O₂₈)

Reinheit 95 %

^{nat}In-DOTA-Pro₄-(4S)Azp(Triazolyl-β-Ala-[Nle¹⁴]Bombesin(7-14)-Pro₄-NH₂) 38



LC-ESI-MS: Reprosil Gold 120 C18, 3μm, 125x3 mm, 95-50 % B in 15 min, 0.5 ml/min, 50°C

Vorläufer (metallfrei): $R_t = 11.82$ min

$m/z = 1314.5 [M+2H^+]^{2+}$

(2625.98 g/mol gerechnet für C₁₂₅H₁₈₁N₃₃O₃₀)

Indium-Komplex: $R_t = 12.41$ min

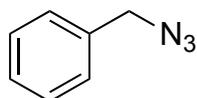
$m/z = 1369.9 [M+2H^+]^{2+}$

(2737.77 g/mol gerechnet für C₁₂₅H₁₇₈InN₃₃O₃₀)

Reinheit 95 %

6.7. Synthese von TBTA

Benzylazid 35



5.40 g Benzylalkohol (50 mmol, 1 eq) wurden in 50 ml absolutem Dichlormethan gelöst, 8.35 ml Triethylamin (60 mmol, 1.2 eq) wurden als Base dazugegeben und die Lösung im Eisbad auf -5°C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurden 4.66 ml Mesylchlorid (60 mmol, 1.2 eq) dazugetropft, die Temperatur wurde bei unter 0°C gehalten. Nach einer Stunde konnte im DC kein Edukt mehr festgestellt werden. 50 ml Dichlormethan wurden zu der weissliche Suspension gegeben, die dreimal mit gesättigter NaHCO_3 Lösung gewaschen wurde. Die wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan rückextrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat anh. getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingengt.

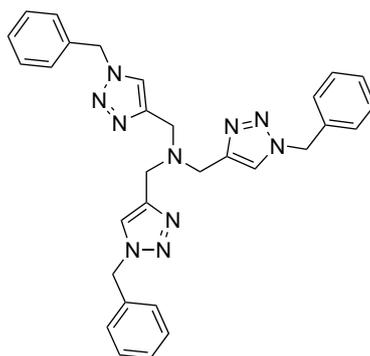
Ausbeute: 8.8 g (47 mmol, 94 %)

Das erhaltene Mesylat wurde in 100 ml absolutem Dimethylformamid gelöst, es wurden 16.25 g Natriumazid (250 mmol, 5eq) dazugegeben und das Gemisch auf 80°C erhitzt. Nach 15 h konnte im DC kein Edukt mehr beobachtet werden (SiO_2 , EA/Pentan 1:1). Das DMF wurde im Hochvakuum abdestilliert und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Das Gemisch wurde dreimal mit gesättigter NaHCO_3 Lösung gewaschen, die wässrigen Phasen mit Et_2O rückextrahiert, die vereinigten organischen Extrakte kombiniert und über Na_2SO_4 anh. getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde, wurde das Produkt in einer Ausbeute von 2.77 g (20.8 mmol, 44 % d. Th.) als gelbliches Öl erhalten.

DC (SiO_2 , EA/Hexan 1:1): $R_f=0.1$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta=7.42 - 7.31$ (m, 5H, H^{arom}), 4.34 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{N}_3$)

tris-(Benzyltriazolylmethyl)amin (TBTA) 36



0.44 g Trispropargylamin (3.3 mmol, 1eq) wurde in 10 ml Acetonitril gelöst und nacheinander wurden 2 g Benzylazid **35** (15 mmol, 4.5 eq), 357 mg 2,6-Lutidine (3.3 mmol, 1eq) und 48 mg $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ (0.13 mmol 1.3 mol % bezogen auf Alkin) dazugegeben. Vor der Zugabe des Kupfersalzes wurde das Reaktionsgemisch in einem Eisbad gekühlt, und danach 3 Tage bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde in etwa zur Hälfte im Vakuum entfernt, das Produkt wurde dann mit kaltem Diethylether ausgefällt, abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Rekristallisation in 50 ml Wasser/ t BuOH ergab das reine Produkt als farbloses Pulver in 61 % Ausbeute (2.03 mmol, 1077 mg)

DC (SiO_2 , EA/Hexan 1:1): $R_f=0.1$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 8.10$ (s, 3H, Triazol), 7.39 – 7.27 (m, 15H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5.60 (s, 6H, $\text{CH}_2^{\text{benzyl}}$), 3.62 (s, 6H, N- CH_2)

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, $5\mu\text{m}$, 150×4 mm, 90-0 % B in 22 min, 0.7 ml/min, 50°C

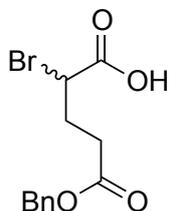
$R_t = 11.41$ min

$m/z = 531.3$ $[\text{M}+\text{H}^+]^+$

(530.63 g/mol gerechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_{10}$)

6.8. Synthese von NODAGA(^tBu₃)

2-Bromglutarsäure-5-benzylester 42

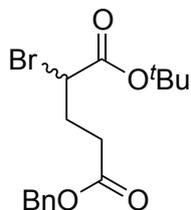


2.5 g Glutaminsäurebenzylester (10.54 mmol, 1 eq) und 3.1 g Lithiumbromid (3.4 eq) wurden in 19 ml 1M HBr gelöst und auf 10°C gekühlt. Über 20 Minuten verteilt wurden 1.31 g (19 mmol, 1.8 eq) dazugegeben. Es wurde für 6 h bei 10-15°C gerührt, dann wurde 1 ml konz. Schwefelsäure dazugegeben und das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat anh. getrocknet, das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂, 7:3 Hexan/EtOAc, 1% AcOH) konnten 1.44 g (55 % d. Th.) pures Produkt isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.40 – 7.34 (m, 5H, Bn); 5.14 (s, 2H, CH₂-Bn); 4.43 (dd, J = 8.4 Hz, 5.6 Hz, 1H, C^αH); 2.61 (m, 2H, C^γH₂); 2.46 (m, 1H, C^βH₂), 2.35 (m, 1H, C^βH₂)

ESI-MS: m/z = 622.8 (2M+Na⁺)⁺
(300.00 gerechnet für C₁₂H₁₃BrO₄)

2-Bromglutarsäure-1-tert-butylester-5-benzylester 43



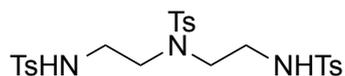
Unter Argonatmosphäre wurden 1.4 g 2-Bromglutarsäure-5-benzylester **43** (4.64 mmol, 1 eq) gemeinsam mit 1.4 g *tert*-Butanol (19 mmol, 4 eq) und 10 mg 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) in 10 ml DCM abs. gelöst. Bei 0°C wurden 1.05 g Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 5.11 mmol, 1.1 eq) dazugegeben, nach 20 Minute wurde

dem Gemisch erlaubt sich langsam auf RT zu erwärmen und es wurde für 3 Stunden bei RT gerührt. Anschliessend wurde der gebildete DCC-Harnstoff abfiltriert, das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, wieder in 10 ml DCM aufgenommen und für 2 h bei -18°C gekühlt, danach wurde erneut filtriert. Das Filtrat wurde mit DCM auf 50 ml aufgefüllt und nacheinander mit 0.5 M HCl (2x 25 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (2x 25 ml) und ½-ges. NaCl-Lösung (1x 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat anh. getrocknet, im Vakuum eingeeengt und säulenchromatographisch (SiO₂, 9:1 Hexan/EtOAc) aufgereinigt. Ausbeute: 1.16 g (70 % d. Th.).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.41 – 7.35 (m, 5H, Bn); 5.16 (s, 2H, CH₂-Bn); 4.27 (dd, J = 8.4 Hz, 5.6 Hz, 1H, C^αH); 2.58 (m, 2H, C^γH₂); 2.39 (m, 1H, C^βH₂), 2.30 (m, 1H, C^βH₂'), 1.50 (s, 9H, ^tBu)

HPLC Reprosil 100 C18, 5µm, 150x4 mm, 90-0 % B in 19 min, 1 ml/min, 50°C
 R_t = 11.87 min
 Reinheit 95 %

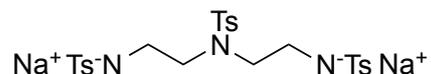
1,4,7-Tritosyldiethylentriamin **44**



Eine Mischung aus 32 g Diethylentriamin (0.31 mol, 1 eq), 101.19 g Triethylamin (1 mol, 3.2 eq) und 1.4 l DCM wurde auf 0°C herabgekühlt. 190.6 g Tosylchlorid (1 mol, 3.2 eq) wurde in 300 ml DCM gelöst und innerhalb von 90 min. zu der gekühlten Mischung gegeben. Anschliessend wurde die Kühlung entfernt und die Mischung erwärmte sich langsam auf RT. Es wurde über Nacht gerührt. Das ausgefallene TEA·HCl wurde abfiltriert, und das Filtrat im Vakuum aufkonzentriert. Der erhaltene Feststoff wurde zur Aufreinigung in 600 ml Ethanol aufgeköcht. Nach Filtration wurde 1,4,7-Tritosyldiethylentriamin als ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 139.2 g (79 % d.Th.) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.67 (m, 6H, C^{Ar}H); 7.39 (m, 6H, C^{Ar}H); 3.02 (t, J = 8 Hz, 4H, CH₂NTsCH₂); 2.82 (t, J = 8 Hz, 4H, TsHNCH₂); 2.40 (s, 6H, Ar-CH₃); 2.39 (s, 6H, Ar-CH₃)

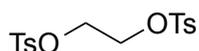
1,4,7-Tritosyldiethylentriamin Dinatriumsalz 45



In einem 1 l 1-Halskolben mit Dimrothkühler wurden 139 g 1,4,7-Tritosyldiethylentriamin **44** in 330 ml Ethanol abs. vorgelegt. Die Suspension wurde unter Rühren zum Rückfluss erhitzt, die Wärmequelle wurde entfernt und 330 ml 1.5 M Natriumethanolat-Lösung (frisch zubereitet, noch warm) wurde über den Kühler in einem Schwung zur refluxierenden Suspension gegeben. Die augenblicklich entstandene klare Lösung wurde sofort von allen ungelösten Rückständen in einen grossen Erlenmeyerkolben abdekantiert. Das Dinatriumsalz kristallisiert schnell aus. Nach Absaugen und Trocknen im Vakuum wurde ein farbloser Feststoff in 95 % iger Ausbeute (141 g) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.46 (m, 6H, $C^{\text{Ar}}\text{H}$); 7.29 (m, 2H, $C^{\text{Ar}}\text{H}$); 7.11 (m, 4H, $C^{\text{Ar}}\text{H}$); 2.88 (t, J = 8.8 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{NTsCH}_2$); 2.62 (t, J = 8.8 Hz, 4H, TsHNCH_2); 2.37 (s, 6H, Ar-CH_3); 2.31 (s, 6H, Ar-CH_3)

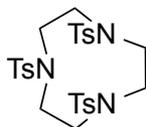
Ditosylethylenglycol 46



214.48 g Tosylchlorid (1.125 mol, 2.25 eq) wurde mit 156.6 ml Triethylamin (1.125 mol, 2.25 eq) in 800 ml Dichlormethan gelöst und auf ca. 5°C gekühlt. Dann wurden 27.9 ml Ethylenglykol (0.5 mol, 1 eq) über 1 h verteilt dazugegeben, und es wurde darauf geachtet, dass die Temperatur im Kolben unter 10°C blieb. Nach 24 h Rühren bei RT wurde der ausgefallene Feststoff abfiltriert, das Lösungsmittel des Filtrats im Vakuum entfernt und der Rückstand in 500 ml DCM und 500 ml Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit weiterem Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat anh. getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der erhaltene beige-braune Feststoff wurde zur Aufreinigung in 600 ml Ethanol aufgeköcht. Nach Filtration wurde Ditosylethylenglykol als ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 146.26 g (79 % d.Th.) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.76$ (d, $J = 8.4$ Hz, 4H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 7.35 (d, $J = 8.4$, 4H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 4.21 (s, 4H, CH_2); 2.48 (s, 6H, Ar-CH_3)

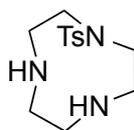
1,4,7-Tritosyl-1,4,7-triazacyclononan 47



75.52 g 1,4,7-Tritosyldiethylentriamin Dinatriumsalz **45** (0.125 mol, 1.02 eq) wurde in 1 l DMF anh. gelöst und unter Rühren auf 100°C erwärmt. Die Lösung wurde auf 100°C gehalten, während 45.65 g Ditosylethylenglycol **46** (0.123 mol, 1 eq), in 400 ml DMF gelöst, über drei bis vier Stunden tropfenweise hinzugegeben wurde. Nach 2 h wurde die Heizquelle entfernt, über Nacht bei RT gerührt, und anschliessend die Reaktionsmischung im Vakuum auf 1/3 des Volumens eingeengt (ein Feststoff begann sich zu bilden). Das Produkt wurde in 2.2 l Eiswasser gefällt. Nach Filtration und Trocknung im Vakuum wurde das Produkt in siedendem Ethanol gereinigt. Es wurde im Vakuum getrocknet, das Produkt wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 63 g (86 % d. Th.) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.67$ (d, $J = 8.4$ Hz, 6H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 7.30 (d, $J = 8.2$, 6H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 2.41 (s, 9H, Ar-CH_3)

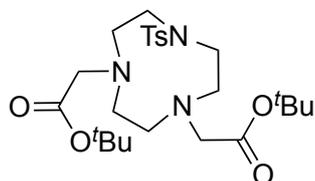
1-Tosyl-1,4,7-triazacyclononan 48



20 g 1,4,7-Tritosyl-1,4,7-triazacyclononan **47** (33.79 mmol, 1 eq) wurden gemeinsam mit 24 g Phenol (255 mmol, 7.5 eq) in 266 ml 33 %iger HBr in Eisessig gelöst und für 36 h bei 90°C gerührt. Das Gemisch wurde abgekühlt, der Feststoff wurde abfiltriert, mehrfach mit Diethylether gewaschen und 80 ml 1 M Natronlauge gelöst. Die leicht rötliche Lösung wurde dreimal mit 80 ml DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das reine Produkt wurde mit 91 % Ausbeute (8.7 g) isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.68 (d, J = 8.4, 2H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 7.42 (d, J = 8.4, 2H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 3.20-2.78 (m, 12H, CH_2), 2.40 (s, 3H, Ar- CH_3)

1-Tosyl-4,7-di-*tert*-butylacetat-1,4,7-triazacyclononan 49

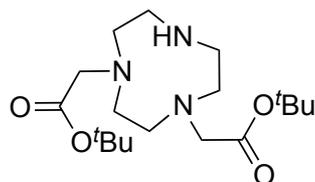


2.17 g 1-Tosyl-1,4,7-triazacyclononan **48** (7.66 mmol, 1 eq) wurde in 50 ml Acetonitril anh. gelöst. Über einen Zeitraum von einer Stunde wurden 3.14 g Bromessigsäure-*tert*-butylester (16.08 mmol, 2.1 eq), gelöst in 20 ml Acetonitril anh., tropfenweise dazugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur nicht über 28°C stieg. Es wurde über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 , Chloroform \rightarrow Chloroform/EtOH 10:1) wurden 3.17 g (81 %) reines Produkt erhalten.

R_f = 0.75 (Chloroform/EtOH 10:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.68 (d, J = 8.4, 2H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 7.31 (d, J = 8.4, 4H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{H}$); 3.31 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-COO}^t\text{Bu}$); 3.26 (m, 4H, NCH_2); 3.12 (m, 4H, NCH_2); 2.81 3.26 (s, 4H, NCH_2); 2.43 (s, 3H, Ar- CH_3), 1.46 (s, 18H, ^tBu)

1,4-Di-*tert*-butylacetat-1,4,7-triazacyclononan 50



a) Reduktive Detosylierung mit Lithium in Aminen

634 mg **49** (1.24 mmol, 1 eq) wurde unter Argon in einem Kolben in 5 ml Propylamin und 0.83 ml Ethylendiamin (beide getrocknet/so trocken wie möglich) gelöst. Die Lösung war hellgelb und klar. 60 mg Lithium (Draht, 8.7 mmol, 7 eq) wurde dazugegeben. Die Temperatur stieg leicht an, innerhalb von 20 Minuten war das Lithium gelöst, die Lösung eingetrübt. Eine DC Kontrolle zeigte noch Edukt (Chloroform/EtOH 10:1), daraufhin wurden weitere 60 mg Lithium dazugegeben. Nach insgesamt 2:30 war per DC kein Edukt mehr nachweisbar. Die Reaktion wurde auf 30 ml Eiswasser gequenched und mit 3x 40 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurden 150 mg (34 % d. Th.) Produkt erhalten.

b) Reduktive Detosylierung mit Naphthylnatrium

Zunächst wurde Naphthylnatrium präpariert. Dafür wurden in einen getrockneten Kolben mit 790 mg Naphthalin (6.16 mmol), 6 ml THF abs. und kleine Stücke Natrium (118 mg, 5.13 mmol) gegeben. Die Mischung wurde bei RT über Nacht unter Argon intensiv gerührt. Die Lösung war tief-dunkelgrün.

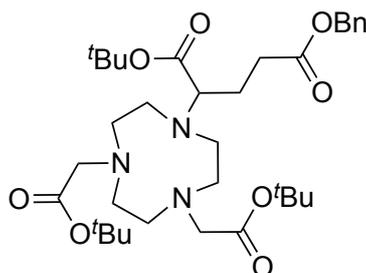
403 mg **49** (0.78 mmol) wurden in 6 ml THF abs. gelöst und auf -78°C gekühlt. Langsam wurde das Naphthylnatrium durch eine Kanüle hinzugetropft – verteilt über 90 min. Nach weiteren 30 min Rühren wurde die Kühlung entfernt und es wurden 10 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung dazugegeben. Die Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Naphthalin/Produkt-Gemisch wurde säulenchromatographisch (SiO₂) gereinigt, das Naphthalin wurde zunächst mit 10:1 Chloroform/Ethanol eluiert, dann konnte mit steigendem Ethanol Anteil (bis zu 1:2 CHCl₃/EtOH) das Produkt erhalten werden (130 mg, 47 % d. Th.), das noch Spuren von Toluolsulfonsäure aufwies.

R_f = 0.1 (Chloroform/EtOH 10:1)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.35-2.60 (m, 16H, NCH_2); 1.47 (s, 18H, ^tBu)

ESI-MS: m/z = 358.1 $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ (357.26 berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$)

1-(2-Glutarsäure-1-*tert*-butylester-5-benzylester)-4,7-di-*tert*-butylacetat-1,4,7-triazacyclononan **51**



128 mg **50** (0.35 mmol, 1 eq) wurden in 10 ml Acetonitril abs. gelöst und es wurden 387 mg Kaliumcarbonat (2.8 mmol, 8 eq) dazugegeben. 125 mg **43** (0.35 mmol, 1 eq) wurden in 5 ml Acetonitril abs. gelöst und portionsweise innerhalb von 30 min. bei RT dazugegeben. Es wurde über Nacht gerührt, die Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bis zur Trockne eingedunstet und anschliessend säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 , Chloroform/EtOH 10:1). Es konnten 56 mg reines Produkt (25 % d.Th.) isoliert werden.

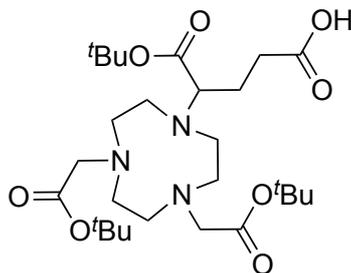
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.35 (m, 5H, Bn); 5.11 (s, 2H, Bn- CH_2); 3.26 – 2.51 (m, 19H, N- CH_2 , Glu- C^αH , Glu- $\text{C}^\gamma\text{H}_2$); 1.99 (m, 1H, Glu- C^βH_2); 1.88 (m, 1H, Glu- C^βH_2); 1.46 (s, 18H, ^tBu), 1.45 (s, 9H, ^tBu)

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5 μm , 150x4 mm, 85-0 % B in 22 min, 0.7 ml/min, 50°C

R_t = 20.5 min

m/z = 634.2 $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ (633.82 g/mol gerechnet für $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_8$)

1-(2-Glutarsäure-1-tert-butylester)-4,7-di-tert-butylacetat-1,4,7-triazacyclononan
NODAGA(^tBu₃) 52



Zunächst wurde das Reduktionsmittel, Ammoniumformiat an Polystyrol-Harz vorbereitet. Dafür wurden 255 mg Polystyrol-NH₂ (0.262 mmol, Rapp, 1.03 mmol/g) sorgfältig mit DCM gewaschen und anschliessend 3x mit 3 ml 1:1 HCOOH/DCM behandelt (jeweils 2 min, Shaker). Der behandelte Harz wurde sorgfältig mit DCM und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

30 mg **51** (47.3 μmol) wurden mit 5 mg Pd/C und 190 mg Ammoniumformiat an Polystyrol-Harz (189 μmol, 4 eq) unter Argon in ein verschliessbares Mikrowellengefäß (Biotage) gegeben. Nach insgesamt 2h bei 85°C (LC-MS Kontrolle zwischendurch) konnte kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Eine zweite Reaktion mit gleicher Ansatzgrösse wurde 60 min. bei 100°C in der Mikrowelle prozessiert, die Ergebnisse waren vergleichbar.

Nach der Reaktion musste nur der Katalysator und das Harz über Celite abfiltriert werden, das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt um das Produkt zu erhalten. Ausbeute: 20 mg (76 %)

LC-ESI-MS: Reprosil 100 C18, 5μm, 150x4 mm, 85-0 % B in 22 min, 0.7 ml/min, 50°C

R_t = 16.1 min

m/z = 544.2 [M+H⁺]⁺ (543.69 g/mol gerechnet für C₂₇H₄₉N₃O₈)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.5-3.3 (m, 5H, Glu-C^αH, N-CH₂) 3.15-2.80 (m, 12H, N-CH₂); 2.49 (m, 2H, Glu-γ-CH₂); 1.95 (m, 2H, Glu-C^βH₂); 1.44 (s, 18H, ^tBu), 1.43 (s, 9H, ^tBu)

6.9. *in vitro* Experimente mit kultivierten Tumorzellen

Alle beschriebenen Zellexperimente folgen etablierten Protokollen aus dem Arbeitskreis von Prof. Helmut Maecke und entsprechen den Methoden beschrieben in [25].

Zellkultur Humane Prostata Adenokarzinoma Zellen (PC-3) wurden über die American Type Culture Collection bezogen und in Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 2 mmol/L L-Glutamin, 10% (v/v) Fetal Bovin Serum (FBS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 % (v/v) Natrium Pyruvat (100 nM), bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturreagenzien waren von Invitrogen.

Ausplattieren Am Tag vor dem Zellexperiment wurde die benötigte Anzahl an Mikrotiterplatten mit sechs Vertiefungen/Näpfchen ("Six-Well Plates") mit PC-3 Zellen bestückt. Dazu wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt, die Kulturflasche mit den adhären Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und 2 ml 0.25 % Trypsin-EDTA (für eine grosse Kulturflasche) dazugegeben. Nach Inkubation für vier Minuten bei 37°C wurden die abgelösten Zellen mit 10 ml Medium in ein 50 ml Kunststoffprobenröhrchen ("Falcon") gespült, gegebenenfalls mit den Zellen weiterer Kulturflaschen vereinigt, und zentrifugiert. Das überstehende Medium – Trypsin Gemisch wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet am Boden des Falcons wurde durch leichtes Klopfen an das Falcon aufgebrochen und erneut in frischem Medium suspendiert und zentrifugiert. Nach Entfernen des Mediums wurde das Pellet wie beschrieben aufgebrochen und in einer definierten Menge Medium (z.B. 25 ml) resuspendiert. Von der Suspension wurde ein kleines Aliquot (100 µl) zum Zählen der Zellen (Vitalfärbung mit Trypanblau, Neubauer Kammer) entnommen. Nach Bestimmung der Zellanzahl wurde die Zellsuspension so aufgefüllt, dass in 1 ml Suspension 2 Millionen Zellen enthalten waren. Typischer Inhalt einer grossen Kulturflasche waren 20 Millionen PC-3 Zellen.

Die Six-Well Plates wurden mit 1 ml Medium pro Well befüllt und von der Zellsuspension wurden 0,5 ml pro Well hinzu pipettiert (1 Million Zellen / Well). Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator adhäsirt.

Radioaktive Markierung mit Lutetium-177 In einem 1.7 ml Eppendorf Tube (mit HCl gewaschen oder prelubricated) wurden 5 nmol des zu markierenden DOTA-Peptid Konjugats (in reinwässriger Stammlösung als TFA-Salz) zu 250 µl Ammoniumacetat-Puffer (0.5 M, pH=5.4) gegeben. 1 mCi (37 MBq, \cong 0.05 nmol, 0.01

eq) $^{177}\text{LuCl}_3$ in wässriger Lösung wurden hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde für 30 Minuten in einem Heizblock bei 105°C inkubiert. Nach erfolgter Qualitätskontrolle ($4\mu\text{l}$ Markierlösung + $20\mu\text{l}$ 0.1 M DTPA, HPLC mit Radiodetektor, Chromolith Säule, Abb. 66) wurde das nicht reagierte DOTA mit $^{\text{nat}}\text{LuCl}_3$ (4.5 nmol , 0.9 eq) gesättigt. Dafür wurde die Lösung weitere 20 Minuten bei 105°C inkubiert. Danach wurde die Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 1 nmol/ml verdünnt.

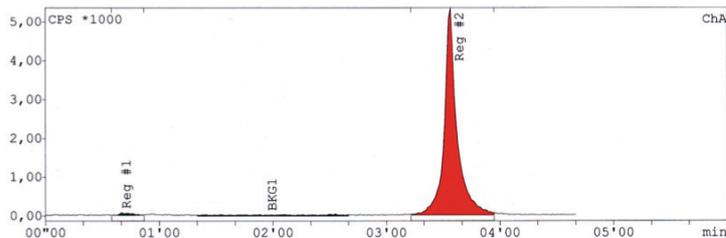


Abbildung 66. Radiochromatogramm zur QC, in rot das markierte Produkt [^{177}Lu]-1 (Peak 2, 99%), in grün das freie Lutetium (Peak 1, 1%).

6.9.1. Internalisierungsexperiment

Das Medium der am Vortag ausplattierten Zellen wurde gegen 1.3 ml frisches Medium (1% FBS) ausgetauscht. Die Zellen wurden bis zum Experiment mindestens 1 h im Inkubator akklimatisiert.

$100\mu\text{l}$ der 1 nmol/ml Lösung mit radiomarkiertem Peptid wurden auf 4 ml mit 0.9% iger Kochsalzlösung aufgefüllt, so dass eine Konzentration von $2,5\text{ pmol}/100\mu\text{l}$ resultierte. Um spezifische von unspezifischer Bindung zu unterscheiden, wurden die Rezeptoren mit einem Überschuss an nicht-markiertem Liganden blockiert. Dafür wurden als Agonist [Tyr^4]-Bombesin und als Antagonist BIM26226 verwendet, pro Well ein $200 - 1000$ facher Überschuss im Vergleich zum radiomarkierten Peptid. Für jeden benötigten Zeitpunkt (typischerweise 30 min , 1 h , 2 h , 4 h , 6 h) wurde eine vorbereitete Six-well Plate bereitgestellt, in die nun wie folgt pipettiert wurde:

- Untere Reihe (3 wells): $100\mu\text{l}$ Blocking Lösung
- Obere Reihe (3 wells): $100\mu\text{l}$ PBS als Volumenausgleich
- Alle wells: $100\mu\text{l} \cong 2.5\text{ pmol}$ Radiomarkiertes Peptid

$3 \times 100\mu\text{l}$ mit radiomarkiertem Peptid wurden mit der selben Pipettenspitze in drei γ -Counter Röhren pipettiert, und mit $1,9\text{ ml}$ Kochsalzlösung aufgefüllt, um später als Referenz im Vergleich zu den Fraktionen zu dienen.

Die Platten wurden nun bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, nach dem festgelegten Zeitpunkt auf Eis gestellt und wie folgt bearbeitet (Abb. 67) – die Schritte sind für alle sechs Wells gleich:

- Das Medium mit dem nicht gebundenen Peptid wurde entfernt und in ein γ -Counter Röhrchen gefüllt – pro Well ergibt sich ein Röhrchen. Die Wells wurden vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen, die Waschlösung wurde zu dem Medium aus dem gleichen Well ins Röhrchen gegeben.
- In jede Well wurden nacheinander 2x1 ml Glycin Puffer (0.05 M, pH 2.8) gegeben, nach je 5 Minuten wurde der saure Puffer mit dem von der Oberfläche der Zellen gewaschenen Peptid entfernt und in ein Röhrchen gegeben.
- Die Zellen wurden zuletzt mit 1 ml Natronlauge (1 M) lysiert, dafür wurden sie mindestens 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Natronlauge mit den Zellen wurde entfernt, die Wells mit 1 ml Natronlauge gewaschen und beide Fraktionen in einem γ -Counter Röhrchen vereinigt.

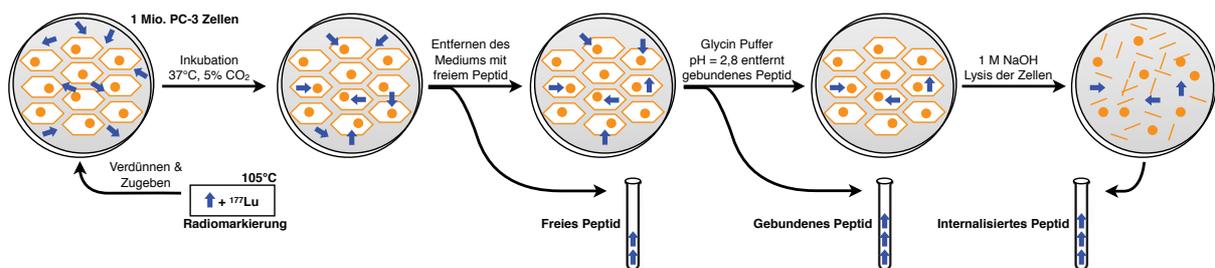


Abbildung 67. Arbeitsschritte im Internalisierungsexperiment

Pro Platte wurden 18 Röhrchen gefüllt:

- 6 x Medium, PBS und freies Peptid (2.5 ml)
- 6 x Glycin Puffer und gebundenes Peptid (2 ml)
- 6 x Natronlauge und internalisiertes Peptid (2 ml)

Dazu kamen noch die 3 Röhrchen mit dem Peptid in Kochsalzlösung als Standard (2 ml)

Eine Six-well Plate wurde zum Zählen der Zellen zurückbehalten und nicht mit Peptid versetzt. Zum Zählen wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und 0,4 ml Trypsin Lösung dazugegeben. Nach 4 Minuten Inkubation wurden die Wells mit 0.6 ml Medium auf 1 ml Flüssigkeit aufgefüllt und die Zellsuspension von je 3 Wells in ein Röhrchen gegeben. 100 μ l der 3 ml Zellsuspension wurden mit 100 μ l PBS und 200 μ l Trypanblau versetzt und mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt.

Die Aktivität der Röhren wurden im γ -Counter bestimmt, zur Auswertung wurden die Ergebnisse auf 1 Million Zellen normalisiert und die unspezifische Bindung und Internalisierung sowie die Hintergrundstrahlung abgezogen.

Internalisierungsexperiment bei 4°C Das Experiment wurde durchgeführt wie das zuvor beschriebene Internalisierungs-experiment, mit dem Unterschied, dass die Inkubation bei 4°C durchgeführt wurde und die Platten mit den Zellen vor Beginn des Experiment 1h auf Eis gestellt wurden. Konzentrationen, Arbeitsschritte und Auswertung waren gleich.

6.9.2. Sättigungsexperiment zur Bestimmung der Dissoziationskonstante

Das Medium der am Vortag ausplattierten Zellen (1 Million/well) wurde gegen 0.8 ml frisches Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden vor dem Experiment 1 h auf Eis gestellt und auf ca. 4° C abgekühlt.

Um spezifische von unspezifischer Bindung zu unterscheiden, wurden die Rezeptoren mit einem Überschuss an nicht-markiertem Liganden gesättigt. Dafür wurden als Agonist [Tyr⁴]-Bombesin und als Antagonist BIM26226 verwendet, pro Well ein 200 – 1000 facher Überschuss im Vergleich zum radiomarkierten Peptid.

Pro verwendete Peptidkonzentration wird eine Six-Well Plate benötigt, typisch sind neun oder zehn verschiedene Konzentrationen in einem Bereich von 0.1 – 500 nM. Dazu werden die folgenden Verdünnungen angesetzt – pro Verdünnung werden 900 µl benötigt (6 wells a 100 µl, 3 x 100 µl für Standards)

	Konzentration in der Well	Peptid/Well	µl Tracer	µl 0.9 % NaCl	Verd.
A	0.1 nM	0.1 pmol	200 µl C	1800 µl	1:10
B	0.5 nM	0.5 pmol	200 µl E	1800 µl	1:10
C	1 nM	1 pmol	200 µl F	1800 µl	1:10
D	2.5 nM	2.5 pmol	250 µl F	750 µl	1:4
E	5 nM	5 pmol	200 µl H	1800 µl	1:10
F	10 nM	10 pmol	200 µl J	1800 µl	1:10
G	25 nM	25 pmol	250 µl J	750 µl	1:4
H	50 nM	50 pmol	1000 µl J	1000 µl	1:2
I	75 nM	75 pmol	750 µl Lsg. J	250 µl	1:1 ½
J	100 nM	100 pmol	Entspricht den 5 ml Markierlösung		

Die Platten wurden wie folgt pipettiert:

- Untere Reihe (3 wells): 100 µl Blocking Lösung
- Obere Reihe (3 wells): 100 µl PBS als Volumenausgleich
- Alle wells: 100 µl Radiomarkiertes Peptid

Nach 4 h auf Eis oder im 4°C kalten Kühlschrank wurden die Platten wie folgt bearbeitet, die Schritte sind für alle Wells gleich, die Kühlung wurde dabei aufrecht erhalten:

- Das Medium mit dem nicht gebundenen Peptid wurde mit Hilfe einer 1 ml Pipette entfernt und in ein γ-Counter Röhrchen pipettiert – pro Well ergibt

sich ein Röhrchen. Die Wells wurden vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen, die Waschlösung wurde mit dem Medium aus dem gleichen Well vereinigt.

- Die Zellen wurden mit 1 ml Natronlauge (1 M) lysiert, dafür wurden sie min. 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Natronlauge mit den Zellen wurde entfernt, die Wells mit 1 ml Natronlauge gewaschen und beide Fraktionen in einem γ -Counter Röhrchen vereinigt.

Pro Platte wurden 15 Röhrchen gefüllt:

- 6 x Medium, PBS und freies Peptid (2.5 ml)
- 6 x Natronlauge und internalisiertes Peptid (2 ml)
- 3 x radiomarkiertes Peptid in Kochsalzlösung als Standard (2 ml)

Eine six-well Plate wurde zum Zählen der Zellen zurückbehalten und nicht mit Peptid versetzt.

Die Aktivität der Röhrchen wurden im γ -Counter bestimmt, zur Auswertung wurden die Ergebnisse auf 1 Million Zellen normalisiert und die unspezifische Bindung und Internalisierung sowie die Hintergrundstrahlung abgezogen.

6.9.3. Externalisierung

Das Medium der am Vortag ausplattierten Zellen wurde gegen 1.3 ml frisches Medium ausgetauscht. Für ein Externalisierungsexperiment wird nur eine 6-Well Plate mit Zellen benötigt.

Die Zellen wurden bis zum Experiment mindestens 1 h im Inkubator akklimatisiert.

100 μ l der 1 nmol/ml Lösung mit radiomarkierten Peptid wurden auf 4 ml mit 0.9 %iger Kochsalzlösung aufgefüllt, so dass eine Konzentration von 2,5 pmol/100 μ l resultierte.

Um spezifische von unspezifischer Bindung zu unterscheiden, wurden die Rezeptoren mit einem Überschuss an nicht-markiertem Liganden blockiert. Dafür wurden als Agonist [Tyr⁴]-Bombesin und als Antagonist BIM26226 verwendet, pro Well ein 200 – 1000 facher Überschuss im Vergleich zum radiomarkierten Peptid.

Die Platte wurde wie folgt pipettiert:

- Untere Reihe (3 wells): 100 μ l Blocking Lösung
- Obere Reihe (3 wells): 100 μ l PBS als Volumenausgleich
- Alle wells: 100 μ l \cong 2.5 pmol Radiomarkiertes Peptid

3 x 100 μ l mit radiomarkiertem Peptid wurden mit der selben Pipettenspitze in drei γ -Counter Röhrchen pipettiert, und mit 1,9 ml Kochsalzlösung aufgefüllt, um später als Referenz im Vergleich zu den Fraktionen zu dienen.

Die Platte mit den Zellen wurden bei 37°C für 2 h inkubiert, und dann wie folgt bearbeitet:

- Das Medium mit dem nicht gebundenen Peptid wurde entfernt und in ein γ -Counter Röhrrchen gefüllt – pro Well ergibt sich ein Röhrrchen. Die Wells wurden vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen, die Waschlösung wurde zu dem Medium aus dem gleichen Well ins Röhrrchen gegeben.
- In jede Well wurden nacheinander 2x1 ml Glycin Puffer (pH 2.8) gegeben, nach je 5 Minuten wurde der saure Puffer mit dem von der Oberfläche der Zellen gewaschenen Peptid entfernt und in ein Röhrrchen gegeben.
- 1 ml frisches Medium wurde auf die Zellen gegeben, sie wurden wieder in den Inkubator gestellt. Nach 10, 20, 30, 60, 120, 240 min wurde das Medium gegen frisches getauscht (je 1x mit PBS waschen), das entfernte Medium enthält die externalisierte Aktivität.
- Nach dem letzten Zeitpunkt wurden die Zellen mit 1 ml Natronlauge (1 M) lysiert, dafür wurden sie mindestens 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Natronlauge mit den Zellen wurde entfernt, die Wells mit 1 ml Natronlauge gewaschen und beide Fraktionen in einem γ -Counter Röhrrchen vereinigt.

Zur Auswertung wurden die Daten der externalisierten Fraktionen aufsummiert und zusammen mit der internalisierten Fraktion (letzter Zeitpunkt) als 100 % ($t = 0$) gesetzt. Für jeden Zeitpunkt wurde dann die externalisierte Fraktion von dem vorherigen Zeitpunkt abgezogen.

6.10. *in vivo* Experimente mit Tumor-tragenden Mäusen

Alle Tierexperimente wurden entsprechend der deutschen Regularien für die Behandlung von Tieren durchgeführt..

Für die Biodistributionen und die PET Studien wurde weiblichen Nacktmäusen (3 Wochen alt) jeweils 5 Millionen PC-3 Zellen (in 1:1 PBS/Matrigel, ca. 100 μ l) subkutan in die rechte Schulter der narkotisierten Mäuse implantiert. Nach 20 Tagen Inokulation waren die Tumore ausreichend herangewachsen (0.5 – 1 cm^3) und die Tiere wurden für die Experimente verwendet.

6.10.1. PET

Das zur Radiomarkierung benötigte Gallium-68 wurde von einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator eluiert, auf eine 50W-X8 Kationenaustauschersäule (Bio-Rad, <400 mesh) geladen und purifiziert.^[189] Elution von der Kationenaustauschsäule erfolgte mit 97.6% Aceton/0.05 M HCl (400 μL). Die eluierte Fraktion (ca. 400 MBq) wurde direkt zum Markieren der Liganden (7 nmol in 400 μl 0.25 M HEPES, pH 3.6 – 3.9) verwendet, die Markierung erfolgte in einem automatisierten Synthesemodul (Eckert & Ziegler, Berlin). Die erreichte spezifische Aktivität lag bei 57 MBq/nmol. Reinheit und Markierausbeute wurden auf einer HPLC mit Radiodetektor kontrolliert.

Für die Aufnahmen wurde ein Concorde microPET Kleintierscanner verwendet. Den PC-3 tumortragenden Mäusen (20-22 g) wurde der Gallium-68 markierte Ligand in die Schwanzvene injiziert (100 pmol in 100 μl PBS verdünnt, entsprechend 1-5 MBq). Für die Blockierung der Rezeptoren mit kaltem Liganden wurde einem Teil der Mäuse 5 Minuten vor Injektion des Radioliganden unmarkierter Agonist **4** oder Antagonist **5** injiziert (100 nmol in 100 μl PBS).

Die Mäuse wurden mit 4% Isofluran/Sauerstoff für den PET-Scan anästhesiert, eine Stunde nach der Injektion wurde die Akquisition gestartet (20 – 60 min). Die Auswertung und Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit Amide (0.92) (<http://amide.sourceforge.net>). Im Fall von PET/CT Studien wurden die Tiere vor dem PET-Scan auf dem selben Bett in einem Kleintiercomputertomographen geröntgt. Die Bilder wurden manuell via Amide mit den PET-Daten fusioniert.

6.10.2. Biodistribution

Den PC-3 tumortragenden Nacktmäusen (20-22 g) wurde der Lutetium-177 (oder Gallium-68) markierte Ligand in (100 pmol in 100 μl PBS verdünnt, entsprechend 0.5 MBq) die Schwanzvene injiziert. Für die Blockierung der Rezeptoren mit kaltem Liganden wurde einem Teil der Mäuse 5 Minuten vor Injektion des Radioliganden unmarkierter Agonist **4** oder Antagonist **5** injiziert (100 nmol in 100 μl PBS).

Zu den angegebenen Zeitpunkten (1h, 4h, 21h) wurde die entsprechende Gruppe an Mäusen durch eine Überdosierung von Isofluran getötet. Der Tumor und die Organe von Interesse wurden in Kochsalzlösung gewaschen, gewogen und im Gamma-Counter gemessen. Die gewichtsnormierte Aufnahme (% IA/g) konnte so für jedes Gewebe bestimmt werden.

7. Anhang

7.1. Referenzen

- [1] E. M. L. Haagedorn, J. Oldhoff, W. Bender, W. D. Clarke, D. T. Sleijfer, *Basiswissen Onkologie*, Ullstein Mosby, Berlin/Wiesbaden, **1996**.
- [2] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, Springer, Berlin/Heidelberg, **2005**.
- [3] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [4] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [5] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239–257.
- [6] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. Harris, *Science* **1991**, *253*, 49–53.
- [7] H. Symonds, L. Krall, L. Remington, M. Saenz-Robles, S. Lowe, T. Jacks, T. Van Dyke, *Cell* **1994**, *78*, 703–711.
- [8] K. Dameron, O. Volpert, M. Tainsky, N. Bouck, *Science* **1994**, *265*, 1582–1584.
- [9] R. A. Weinberg, *The Biology of Cancer*, Garland Science, New York, **2007**.
- [10] Statistisches Bundesamt Deutschland, **2010**.
- [11] Schweizerisches Bundesamt für Statistik, **2008**.
- [12] Robert Koch Institut, *Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten Und Trends*, Berlin, **2010**.
- [13] J. C. Reubi, *Endocrine Reviews* **2003**, *24*, 389–427.
- [14] A. Schally, A. Nagy, *European Journal of Endocrinology* **1999**, *141*, 1–14.
- [15] S. Lee, J. Xie, X. Chen, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 3087–3111.
- [16] J. C. Reubi, H. R. Mäcke, E. P. Krenning, *Journal of Nuclear Medicine* **2005**, *46*, 67S–75S.
- [17] S. E. Pool, E. P. Krenning, G. A. Koning, C. H. J. van Eijck, J. J. M. Teunissen, B. Kam, R. Valkema, D. J. Kwekkeboom, M. de Jong, *Seminars in Nuclear Medicine* **2010**, *40*, 209–218.
- [18] H. Richard O., *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [19] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H.-J. Wester, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 969–980.
- [20] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Gerok, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, Georg Thieme Verlag, **2005**.
- [21] M. Ginj, H. Zhang, B. Waser, R. Cescato, D. Wild, X. Wang, J. Erchegyi, Jean Rivier, H. R. Mäcke, J. C. Reubi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**,

- 103, 16436–16441.
- [22] R. Mansi, X. Wang, F. Forrer, S. Kneifel, M.-L. Tamma, B. Waser, R. Cescato, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *Clin. Cancer. Res.* **2009**, *15*, 5240–5249.
- [23] R. Cescato, T. Maina, B. Nock, A. Nikolopoulou, D. Charalambidis, V. Piccand, J. C. Reubi, *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49*, 318–326.
- [24] M. H. Perrin, S. W. Sutton, L. A. Cervini, J. E. Rivier, W. W. Vale, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1999**, *288*, 729–734.
- [25] D. B. Bylund, M. L. Toews, in *Receptor Signal Transduction Protocols* (Eds.: G.B. Willars, R.A.J. Challiss), Humana Press, Totowa, NJ, **2011**, pp. 135–164.
- [26] F. Zoller, M. Eisenhut, U. Haberkorn, W. Mier, *European Journal of Pharmacology* **2009**, *625*, 55–62.
- [27] M. R. McDevitt, D. Ma, L. T. Lai, J. Simon, P. Borchardt, R. K. Frank, K. Wu, V. Pellegrini, M. J. Curcio, M. Miederer, et al., *Science* **2001**, *294*, 1537–1540.
- [28] *New York Times* **1921**.
- [29] B. A. Chabner, T. G. Roberts, *Nat Rev Cancer* **2005**, *5*, 65–72.
- [30] B. A. Chabner, D. L. Longo, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, Lippincott Williams & Wilkins, **2010**.
- [31] C. Sawyers, *Nature* **2004**, *432*, 294–297.
- [32] A. Otte, R. Herrmann, A. Heppeler, M. Behe, E. Jermann, P. Powell, H. R. Maecke, J. Muller, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **1999**, *26*, 1439–1447.
- [33] A. Otte, E. Jermann, M. Behe, M. Goetze, H. C. Bucher, H. W. Roser, A. Heppeler, J. Mueller-Brand, H. R. Maecke, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **1997**, *24*, 792–795.
- [34] G. Foerster, M. Engelbach, J. Brockmann, H. Reber, H.-G. Buchholz, H. Maecke, F. Roesch, H. Herzog, P. Bartenstein, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2001**, *28*, 1743–1750.
- [35] D. J. Kwkkeboom, W. H. Bakker, B. L. Kam, J. J. M. Teunissen, P. P. M. Kooij, W. W. Herder, R. A. Feelders, C. H. J. Eijck, M. Jong, A. Srinivasan, et al., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2003**, *30*, 417–422.
- [36] S. C. Srivastava, “*Therapeutic Radionuclides: Making the Right Choice*” in: *Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development*, Springer, **1996**.
- [37] A. Frilling, F. Weber, F. Saner, A. Bockisch, M. Hofmann, J. Mueller-Brand, C. E. Broelsch, *Surgery* **2006**, *140*, 968–977.

- [38] F. Forrer, H. Uusijarvi, C. Waldherr, M. Cremonesi, P. Bernhardt, J. Mueller-Brand, H. R. Maecke, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2004**, *31*, DOI 10.1007/s00259-004-1553-6.
- [39] M. Hofmann, H. Maecke, E. Weckesser, P. Schoeffski, M. Oei, J. Schumacher, M. Henze, A. Heppeler, G. Meyer, W. H. Knapp, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2001**, *28*, 1751–1757.
- [40] M. de Jong, W. H. Bakker, E. P. Krenning, W. A. P. Breeman, M. E. van der Pluijm, B. F. Bernard, T. J. Visser, E. Jermann, M. Behe, P. Powell, et al., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **1997**, *24*, 368–371.
- [41] O. Boerman, W. Oyen, F. Corstens, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2001**, *28*, 1447–1449.
- [42] B. Emami, J. Lyman, A. Brown, L. Cola, M. Goitein, J. E. Munzenrider, B. Shank, L. J. Solin, M. Wesson, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **1991**, *21*, 109–122.
- [43] B. F. Bernard, E. P. Krenning, W. A. P. Breeman, E. J. Rolleman, W. H. Bakker, T. J. Visser, H. Mäcke, M. de Jong, *Journal of Nuclear Medicine* **1997**, *38*, 1929–1933.
- [44] E. Rolleman, B. Bernard, W. Breeman, F. Forrer, E. de Blois, J. Hoppin, M. Gotthardt, O. Boerman, E. Krenning, M. de Jong, *Nuklearmedizin* **2008**, DOI 10.3413/nukmed-0069.
- [45] S. S. Kelkar, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1879–1903.
- [46] W. Weber, *Bundesgesundheitsblatt* **2010**, *53*, 810–817.
- [47] A. Rahmim, H. Zaidi, *Nuclear Medicine Communications* **2008**, *29*, 193–207.
- [48] S. S. Gambhir, *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 683–693.
- [49] T. Ido, C. Wan, V. Casella, J. S. Fowler, A. P. Wolf, M. Reivich, D. E. Kuhl, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1978**, *14*, 175–183.
- [50] O. Warburg, **1932**, 129–169.
- [51] J. Kowalski, M. Henze, J. Schuhmacher, H. R. Mäcke, M. Hofmann, U. Haberkorn, *Molecular Imaging & Biology* **2003**, *5*, 42–48.
- [52] V. Ambrosini, M. Fani, S. Fanti, F. Forrer, H. R. Maecke, *Journal of Nuclear Medicine* **2011**, *52*, 42S–55S.
- [53] D. Wild, M. Fani, M. Behe, I. Brink, J. E. F. Rivier, J. C. Reubi, H. R. Maecke, W. A. Weber, *Journal of Nuclear Medicine* **2011**, *52*, 1412–1417.
- [54] R. P. Baum, V. Prasad, N. Mutloka, M. Frischknecht, H. R. Maecke, J. C. Reubi, *Journal of Nuclear Medicine* **2007**, *48*, 79P.

- [55] D. Wild, H. Mäcke, E. Christ, B. Gloor, J. C. Reubi, *New England Journal of Medicine* **2008**, *359*, 766–768.
- [56] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman, C. J. Anderson, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2858–2902.
- [57] M. Fani, S. Good, H. R. Maecke, in *Handbook of Nuclear Chemistry* (Eds.: A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, R.G. Lovas, F. Rösch), Springer US, Boston, MA, **2011**, pp. 2143–2178.
- [58] R. S. Taichman, R. D. Loberg, R. Mehra, K. J. Pienta, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 2351–2361.
- [59] J.-E. Damber, G. Aus, *The Lancet* **2008**, *371*, 1710–1721.
- [60] S. Lütje, O. C. Boerman, C. M. van Rij, M. Sedelaar, W. Helfrich, W. J. G. Oyen, P. F. A. Mulders, *The Prostate* **n.d.**, DOI 10.1002/pros.22462.
- [61] K. Bouchelouche, B. Turkbey, P. Choyke, J. Capala, *Curr Urol Rep* **2010**, *11*, 180–190.
- [62] K. Brindle, *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 94–107.
- [63] L. Bubendorf, A. Schöpfer, U. Wagner, G. Sauter, H. Moch, N. Willi, T. C. Gasser, M. J. Mihatsch, *Human Pathology* **2000**, *31*, 578–583.
- [64] R. Markwalder, J. C. Reubi, *Cancer Research* **1999**, *59*, 1152–1159.
- [65] A. Anastasi, V. Erspamer, M. Bucci, *Experientia* **1971**, *27*, 166–167.
- [66] D. N. Carney, F. Cuttitta, T. W. Moody, J. D. Minna, *Cancer Research* **1987**, *47*, 821–825.
- [67] V. Sancho, A. Di Florio, T. W. Moody, R. T. Jensen, *Current Drug Delivery* **2011**, *8*, 79–134.
- [68] J. C. Reubi, M. Koerner, B. Waser, L. Mazzucchelli, L. Guillou, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2004**, *31*, 803–810.
- [69] R. T. Jensen, J. F. Battey, E. R. Spindel, R. V. Benya, *Pharmacological Reviews* **2008**, *60*, 1–42.
- [70] M. Gugger, J. C. Reubi, *Am J Pathol* **1999**, *155*, 2067–2076.
- [71] L. Bodei, M. Ferrari, A. D. Nunn, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **n.d.**, *34*, S221.
- [72] R. P. J. Schroeder, C. Müller, S. Reneman, M. L. Melis, W. A. P. Breeman, E. Blois, C. H. Bangma, E. P. Krenning, W. M. Weerden, M. Jong, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2010**, *37*, 1386–1396.
- [73] H. Zhang, J. Schuhmacher, B. Waser, D. Wild, M. Eisenhut, J. C. Reubi, H. R.

- Maecke, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2007**, *34*, 1198–1208.
- [74] J. Schuhmacher, H. Zhang, J. Doll, H. R. Mäcke, R. Matys, H. Hauser, M. Henze, U. Haberkorn, M. Eisenhut, *Journal of Nuclear Medicine* **2005**, *46*, 691–699.
- [75] K. Abiraj, R. Mansi, M.-L. Tamma, M. Fani, F. Forrer, G. Nicolas, R. Cescato, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *Journal of Nuclear Medicine* **2011**, *52*, 1970–1978.
- [76] K. Tokita, T. Katsuno, S. J. Hocart, D. H. Coy, M. Llinares, J. Martinez, R. T. Jensen, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36652–36663.
- [77] F. W. Lichtenthaler, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *33*, 2364–2374.
- [78] P. Ehrlich, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1909**, *42*, 17–47.
- [79] M. Chabre, *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **1985**, *14*, 331–360.
- [80] J. M. Baldwin, *EMBO J* **1993**, *12*, 1693–1703.
- [81] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. L. Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, et al., *Science* **2000**, *289*, 739–745.
- [82] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 993–996.
- [83] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L.-G. Lundin, H. B. Schiöth, *Molecular Pharmacology* **2003**, *63*, 1256–1272.
- [84] V. Katritch, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Trends in Pharmacological Sciences* **2012**, *33*, 17–27.
- [85] K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, et al., *Nature* **2012**, *advance online publication*, DOI 10.1038/nature10753.
- [86] A. Gilchrist, *GPCR Molecular Pharmacology and Drug Targeting*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, **2010**.
- [87] C. Valant, P. M. Sexton, A. Christopoulos, *Molecular Interventions* **2009**, *9*, 125–135.
- [88] A. L. Banerjee, D. Eiler, B. C. Roy, X. Jia, M. K. Haldar, S. Mallik, D. K. Srivastava, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3211–3224.
- [89] A. Nagy, A. V. Schally, *Current Pharmaceutical Design* **2005**, *11*, 1167–1180.
- [90] D. M. Crothers, H. Metzger, *Immunochemistry* **1972**, *9*, 341–357.
- [91] M. Mammen, S. Choi, G. M. Whitesides, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2754–2794.

- [92] J. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *Science* **1998**, *280*, 708–711.
- [93] M. Nieto, H. R. Perkins, *Biochem J* **1971**, *123*, 789–803.
- [94] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348–2368.
- [95] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933.
- [96] M. D. Carrithers, M. R. Lerner, *Chemistry & Biology* **1996**, *3*, 537–542.
- [97] S. Liu, *Mol. Pharmaceutics* **2006**, *3*, 472–487.
- [98] W. Liu, G. Hao, M. A. Long, T. Anthony, J. Hsieh, X. Sun, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 7346–7349.
- [99] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717–2725.
- [100] Z. Li, W. Cai, Q. Cao, K. Chen, Z. Wu, L. He, X. Chen, *Journal of Nuclear Medicine* **2007**, *48*, 1162–1171.
- [101] I. Dijkgraaf, J. A. W. Kruijtzter, S. Liu, A. C. Soede, W. J. G. Oyen, F. H. M. Corstens, R. M. J. Liskamp, O. C. Boerman, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2006**, *34*, 267–273.
- [102] C.-B. Yim, O. C. Boerman, M. de Visser, M. de Jong, A. C. Dechesne, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1323–1331.
- [103] C.-B. Yim, I. Dijkgraaf, R. Merckx, C. Versluis, A. Eek, G. E. Mulder, D. T. S. Rijkers, O. C. Boerman, R. M. J. Liskamp, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3944–3953.
- [104] K. Abiraj, H. Jaccard, M. Kretzschmar, L. Helm, H. R. Maecke, *Chem. Commun.* **2008**, 3248–3250.
- [105] Y. Yan, X. Chen, *Amino Acids* **2010**, *41*, 1081–1092.
- [106] A. Capello, E. P. Krenning, B. F. Bernard, W. A. P. Breeman, M. P. van Hagen, M. de Jong, *Journal of Nuclear Medicine* **2004**, *45*, 1716–1720.
- [107] B. Bernard, A. Capello, M. van Hagen, W. Breeman, A. Srinivasan, M. Schmidt, J. Erion, A. van Gameren, E. Krenning, M. De Jong, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **2004**, *19*, 173–180.
- [108] Z.-B. Li, Z. Wu, K. Chen, E. K. Ryu, X. Chen, *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49*, 453–461.
- [109] J. Vagner, L. Xu, H. L. Handl, J. S. Josan, D. L. Morse, E. A. Mash, R. J. Gillies, V. J. Hruby, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 1685–1688.

- [110] J. S. Josan, J. Vagner, H. L. Handl, R. Sankaranarayanan, R. J. Gillies, V. J. Hruby, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2008**, *14*, 293–300.
- [111] J. S. Josan, H. L. Handl, R. Sankaranarayanan, L. Xu, R. M. Lynch, J. Vagner, E. A. Mash, V. J. Hruby, R. J. Gillies, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1270–1278.
- [112] Z. Liu, G. Niu, F. Wang, X. Chen, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2009**, *36*, 1483–1494.
- [113] C. J. White, A. K. Yudin, *Nat Chem* **2011**, *3*, 509–524.
- [114] J. Engel, H. P. Bächinger, Springer Berlin / Heidelberg, **2005**, pp. 7–33.
- [115] B. Brodsky, G. Thiagarajan, B. Madhan, K. Kar, *Biopolymers* **2008**, *89*, 345–353.
- [116] A. Rath, A. R. Davidson, C. M. Deber, *Peptide Science* **2005**, *80*, 179–185.
- [117] B. Bochicchio, A. M. Tamburro, *Chirality* **2002**, *14*, 782–792.
- [118] B. K. Kay, M. P. Williamson, M. Sudol, *The FASEB Journal* **2000**, *14*, 231–241.
- [119] B. J. Stapley, T. P. Creamer, *Protein Science* **1999**, *8*, 587–595.
- [120] M. Kümin, L.-S. Sonntag, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 466–467.
- [121] S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173–180.
- [122] L.-S. Sonntag, S. Schweizer, C. Ochsenfeld, H. Wennemers, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 14697–14703.
- [123] Y. A. Nagel, M. Kümin, H. Wennemers, *Chimia* **2011**, *65*, 264–7.
- [124] R. S. Erdmann, M. Kümin, H. Wennemers, *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2009**, *63*, 197–200.
- [125] Y. A. Nagel, Cell Penetrating Peptides - Based on Polyproline Scaffolds, Universität Basel (CH), **2012**.
- [126] I. Geisler, J. Chmielewski, *Chemical Biology & Drug Design* **2009**, *73*, 39–45.
- [127] B. A. Smith, D. S. Daniels, A. E. Coplin, G. E. Jordan, L. M. McGregor, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2948–2949.
- [128] S. Pujals, E. Giralt, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 473–484.
- [129] G. Upert, F. Bouillère, H. Wennemers, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, DOI 10.1002/anie.201107183.
- [130] K. M. Bonger, V. V. Kapoerchan, G. M. Grotenbreg, C. J. van Koppen, C. M. Timmers, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1881–1884.
- [131] R. S. Erdmann, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13957–13959.
- [132] W. Kirmse, L. Horner, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1958**, *614*, 1–3.
- [133] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 565–598.

- [134] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [135] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [136] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [137] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- [138] A. Tam, U. Arnold, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12670–12671.
- [139] S. R. Vigna, A. S. Giraud, J. R. Reeve Jr., J. H. Walsh, *Peptides* **1988**, *9*, 923–926.
- [140] H. Zhang, Dissertation: “Design, Synthesis, and Preclinical Evaluation of Radiolabeled Bombesin Analogues for the Diagnosis and Targeted Radiotherapy of Bombesin Receptor Expressing Tumors,” Basel, **2007**.
- [141] W. P. Cacheris, S. K. Nickle, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 958–960.
- [142] B. Belleau, G. Malek, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1651–1652.
- [143] D. Seebach, A. Thaler, D. Blaser, S. Y. Ko, *Helvetica Chimica Acta* **1991**, *74*, 1102–1118.
- [144] C. R. Millington, R. Quarrell, G. Lowe, *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 7201–7204.
- [145] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1982**, *20*, 451–454.
- [146] P. Wilhelm, *Synthese Und in Vitro Studien von Octreotid-Oligoprolin-Konjugaten*, Universität Basel (CH), **2011**.
- [147] D. K. Mohapatra, A. Datta, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6879–6880.
- [148] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- [149] M. Gairí, P. Lloyd-williams, F. Albericio, E. Giralt, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1995**, *46*, 119–133.
- [150] R. Subiros-Funosas, G. A. Acosta, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 6200–6202.
- [151] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 1967–1970.
- [152] K.-P. Eisenwiener, M. I. M. Prata, I. Buschmann, H.-W. Zhang, A. C. Santos, S. Wenger, J. C. Reubi, H. R. Mäcke, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 530–541.
- [153] J. P. André, H. R. Maecke, J. P. André, M. Zehnder, L. Macko, K. G. Akyel, *Chem. Commun.* **1998**, 1301–1302.
- [154] C. Kroll, *Synthese Makrozyklischer Liganden Für Gallium(III)*, Diplomarbeit, Mainz, **2007**.
- [155] P. J. Riss, C. Kroll, V. Nagel, F. Rösch, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*

- 2008**, *18*, 5364–5367.
- [156] J. L. Sessler, J. W. Sibert, V. Lynch, *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 4143–4146.
- [157] B. Nyasse, L. Grehn, U. Ragnarsson, H. L. S. Maia, L. S. Monteiro, I. Leito, I. Koppel, J. Koppel, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2025–2031.
- [158] M. E. Garst, L. J. Dolby, S. Esfandiari, N. A. Fedoruk, N. C. Chamberlain, A. A. Avey, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7098–7104.
- [159] S. A. Reed, M. C. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3316–3318.
- [160] K. J. Fraunhoffer, M. C. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7274–7276.
- [161] J. E. Richman, T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268–2270.
- [162] K.-P. Eisenwiener, P. Powell, H. R. Mäcke, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10*, 2133–2135.
- [163] B. Neises, W. Steglich, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, *17*, 522–524.
- [164] K. Abiraj, G. R. Srinivasa, D. C. Gowda, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2005**, *11*, 153–157.
- [165] J. F. Battey, J. M. Way, M. H. Corjay, H. Shapira, K. Kusano, R. Harkins, J. M. Wu, T. Slattery, E. Mann, R. I. Feldman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88*, 395–399.
- [166] F. Kiefer, K. Arnold, M. Kunzli, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D387–D392.
- [167] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195–201.
- [168] M. C. Peitsch, *Nat Biotech* **1995**, *13*, 658–660.
- [169] T. Nakagawa, S. J. Hocart, M. Schumann, J. A. Tapia, S. A. Mantey, D. H. Coy, K. Tokita, T. Katsuno, R. T. Jensen, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 579–593.
- [170] M. Akeson, E. Sainz, S. A. Mantey, R. T. Jensen, J. F. Battey, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17405–17409.
- [171] K. Tokita, S. J. Hocart, D. H. Coy, R. T. Jensen, *Molecular Pharmacology* **2002**, *61*, 1435–1443.
- [172] A. Christopoulos, *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 198–210.
- [173] G. Vauquelin, S. J. Charlton, *British Journal of Pharmacology* **2010**, *161*, 488–508.
- [174] Y. Kofuku, T. Ueda, J. Okude, Y. Shiraishi, K. Kondo, M. Maeda, H. Tsujishita, I. Shimada, *Nat Commun* **2012**, *3*, 1045.
- [175] M. P. Bokoch, Y. Zou, S. G. F. Rasmussen, C. W. Liu, R. Nygaard, D. M. Rosenbaum, J. J. Fung, H.-J. Choi, F. S. Thian, T. S. Kobilka, et al., *Nature* **2010**, *463*,

108–112.

- [176] R. O. Dror, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. W. Borhani, P. Maragakis, Y. Shan, H. Xu, D. E. Shaw, *PNAS* **2011**, *108*, 13118–13123.
- [177] A. Bock, N. Merten, R. Schrage, C. Dallanoce, J. Bätz, J. Klöckner, J. Schmitz, C. Matera, K. Simon, A. Kebig, et al., *Nat Commun* **2012**, *3*, 1044.
- [178] J. Shonberg, P. J. Scammells, B. Capuano, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 963–974.
- [179] T. Tanaka, W. Nomura, T. Narumi, A. Masuda, H. Tamamura, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15899–15901.
- [180] E. Urizar, H. Yano, R. Kolster, C. Galés, N. Lambert, J. A. Javitch, *Nat Chem Biol* **2011**, *7*, 624–630.
- [181] S. Dobitz, *Dissertation*, ETH Zürich, **2013**.
- [182] L. J. Miller, Q. Chen, P. C.-H. Lam, D. I. Pinon, P. M. Sexton, R. Abagyan, M. Dong, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 15895–15907.
- [183] R. Paulmurugan, S. S. Gambhir, *Cancer Res* **2005**, *65*, 7413–7420.
- [184] N. Kato, J. Jones, in *Plant Developmental Biology* (Eds.: L. Hennig, C. Köhler), Humana Press, **2010**, pp. 359–376.
- [185] T. Kenakin, O. Onaran, *Trends in Pharmacological Sciences* **2002**, *23*, 275–280.
- [186] R. Mansi, X. Wang, F. Forrer, B. Waser, R. Cescato, K. Graham, S. Borkowski, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2010**, *38*, 97–107.
- [187] B. Waser, V. Eltschinger, K. Linder, A. Nunn, J. C. Reubi, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2006**, *34*, 95–100.
- [188] S. A. Kularatne, K. Wang, H.-K. R. Santhapuram, P. S. Low, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 780–789.
- [189] K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *J Nucl Med* **2007**, *48*, 1741–1748.
- [190] D. F. Sargent, R. Schwyzer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 5774–5778.
- [191] M. Kümin, Konformationsanalyse von C(4)-Substituierten Prolinderivaten Und Ihre Strukturdirigierenden Eigenschaften Auf Die Polyprolin II Helix - Entwicklung Funktionalisierbarer Molekularer Gerüste, Universität Basel (CH), **2009**.
- [192] “Avanti Polar Lipids - Preparation of Liposomes,” can be found under http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1384&Itemid=372, **1997**.

[193] P. Carmona, A. Lasagabaster, M. Molina, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1995**, 1246, 128–134.

Bildnachweis: Abbildung 3, Rotbauchunke: <http://de.wikipedia.org/wiki/Rotbauchunke>

7.2. Abkürzungen

% IA/g	Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm – standardisierte Einheit zur Aufnahme von Radioliganden in Organe und Gewebe
AA	Amino Acid
anh.	Anhydrous, wasserfrei
BBN	Bombesin
BRS3	Bombesin Rezeptor Subtyp 3
Boc ₂ O	Boc-Anhydrid, Di-tert-butyldicarbonat
CD	Zirkulardichroismus
COMU	1-[(1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)-dimethylamino-morpholinomethylen)] methanaminium hexafluorophosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
d. Th.	der Theorie / der theoretischen Ausbeute
DIPEA	N-Ethyldiisopropylamin
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetat
EEDQ	N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolin
Et ₂ O	Diethylether
EDC*HCl	
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GRP	Gastrin Releasing Peptide
GRP-R	Gastrin Releasing Peptide Receptor
h	Stunde
HCTU	O-(1H-6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat

HMBA	4-Hydroxymethylbenzoic acid
MeOH	Methanol
NMBR	Neuromedin B Rezeptor
NMB	Neuromedin B
NMP	N-Methylpyrrolidin
PBS	Phosphate Buffered Saline, physiologischer Puffer, pH = 7.4
iPrOH	Isopropanol
PyBOP	(1H-Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidin-1-yl)phosphoniumhexafluorophosphat
PyBroP	Bromo-tris-pyrrolidino phosphoniumhexafluorophosphat
p.i.	post injectionem (lat.: »nach einer Injektion«)
Prs	Propionsäure
PET	Positronen Emissions Tomographie
RT	Raumtemperatur
SPECT	Einzel-Photonen Emissions Computertomographie
SPPS	Solid Phase Peptide Syntesis
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
TOPPA	total protected peptide amide
TBTA	tris-(Benzyltriazolylmethyl)amin
TIS	Triisopropylsilan
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.3. CD-spektroskopische Analyse von Bombesin-konjugierten Oligoprolinen in Gegenwart von Phospholipid-Vesikeln

In detaillierteren CD-Spektroskopischen Studien sollte überprüft werden, ob die Oligoprolin-Helix der Oligoprolin-Bombesinkonjugate mit der Zellmembran interagieren kann. Wenn Oligoproline als amphiphile Peptide mit der Zellmembran interagieren würden, könnte diese Interaktion die Bindung der Liganden an die Rezeptoren beeinflussen.^[190]

Dafür wurde Modellpeptid **31** zusammen mit Phospholipid-Vesikeln untersucht. Falls das Oligoprolin in die lipophile Membran eintauchen würde, könnte man diese Interaktion möglicherweise durch eine Konformationsänderung von PPII zu PPI im CD-Spektrum verfolgen. Es ist bekannt, dass eine C-terminales Carboxamid die Oligoprolin-Helix in der PPII Konformation stabilisiert^[191]. Daher wurde die Modellverbindung **31** mit einer C-terminalen Carbonsäure auf 2-Chlorotrityl-Harz synthetisiert (Abbildung 68), damit in einer unpolaren Umgebung eine Konforamtionsänderung, hin zur PPI Struktur, beobachtet werden kann.

Die beiden Phospholipide DPPC (neutral) und DMPG (anionisch) sind Bestandteile eukaryotischer Zellmembranen (Abbildung 68). Aus ihnen wurden erfolgreich Vesikel gebildet, die als Modell für die Zellmembran genutzt werden sollen.^[192] Die Vesikel wurden durch dynamische Lichtstreuung (DLS) charakterisiert, ihre Radien wurden zu ca. 160 nm bestimmt.

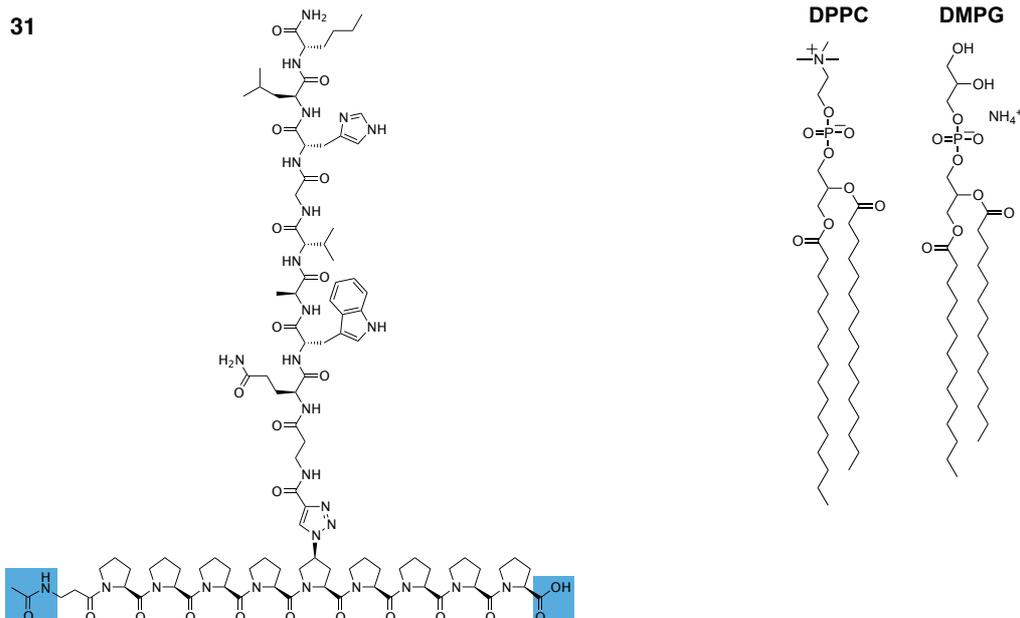


Abbildung 68. Carboxyl-funktionalisierte CD-Modellverbindung **31** und Phospholipide DPPC und DMPG

Als Kontrollexperiment, um die Konformation des Peptids **31** in einer unpolaren Umgebung zu studieren, wurde das Peptid in verschiedenen Mischungsverhältnissen n-Propanol / PBS gelöst und CD-Spektren der Lösungen gemessen. Es ist bekannt, dass in einem hohen Anteil n-Propanol Oligoproline in PPI Konformation vorliegen.^[120] Parallel wurde das Peptid in 3 verschiedenen Konzentrationen beider Phospholipid-Vesikel gelöst (1 mM, 2 mM, 3 mM bezogen auf das ursprünglich eingewogene Phospholipid, emulgiert in PBS).

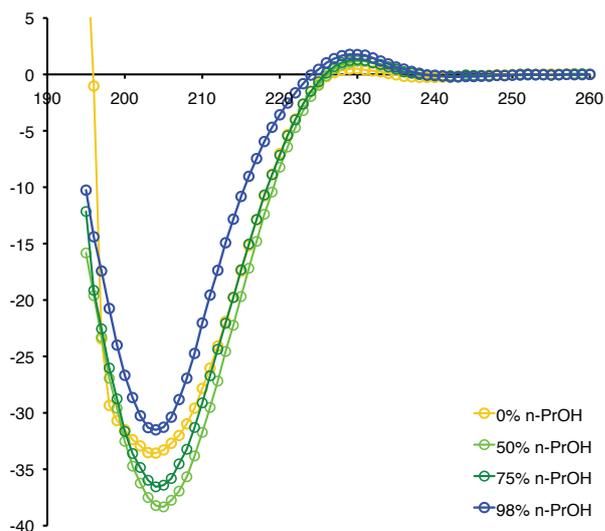


Abbildung 69. Carbonsäure-Modellverbindung **31** in PBS / n-Propanol, 40 μ M, 24 h inkubiert bei 37°C.

Die in Abbildung 69 gezeigten Spektren weisen zwei Auffälligkeiten auf: Im Vergleich mit vergangenen Konformationsanalysen von Ac-Pro₁₂-OH wäre zu erwarten gewesen,^[191] dass das Minimum bei 205 nm für die rein-wässrige Lösung von **31** (gelb) am ausgeprägtesten wäre. Die Abfolge der Spektren (starkes Minimum -> schwächeres Minimum) ist nur für die drei höheren n-Propanol Konzentrationen wie erwartet. Die zweite Besonderheit ist, dass auch bei 98 % n-Propanol offensichtlich noch ein grosser Anteil des untersuchten Peptids in der PPII Konformation vorliegt.

Abbildung 70 zeigt das gleiche Experiment mit verschiedenen Vesikel Konzentrationen in PBS. Die beobachteten Auswirkungen sind minimal.

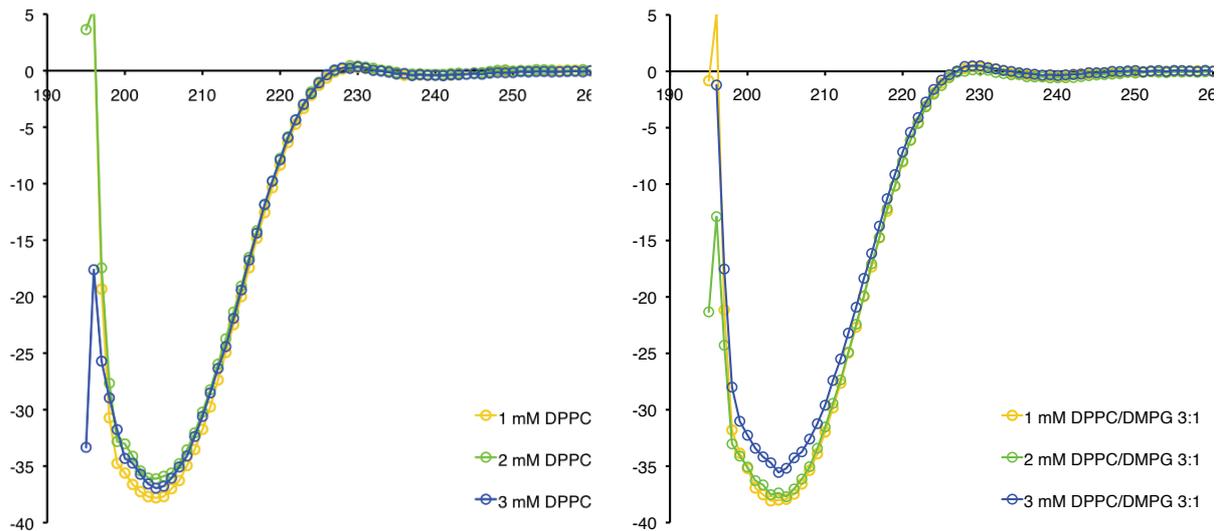


Abbildung 51. Carboxyl-funktionalisierte CD-Modellverbindung **31**, $40 \mu\text{M}$ in PBS, $\text{pH} = 7.4$, Zusatz von DPPC und DMPG Phospholipid-Vesikeln, 24 h inkubiert, 37°C , leichte Agitation (Thermoshaker)

Im Durchschnitt verringert sich das Minima in den Spektren zwar mit zunehmender Vesikel-Konzentration, doch der gemessene Einfluss auf das Signal ist nicht signifikant genug um eine eindeutige Aussage zur Interaktion zwischen **31** und den Phospholipid-Vesikeln treffen zu können.

Um die CD-Spektren von **31** generell besser zu verstehen und den Beitrag der einzelnen Bestandteile einordnen zu können, wurden die beiden maßgeblichen Bestandteile, das Oligoprolin-Rückgrat **32** und die Bombesin-Seitenkette **33**, separat von einander untersucht (Abbildung 52).

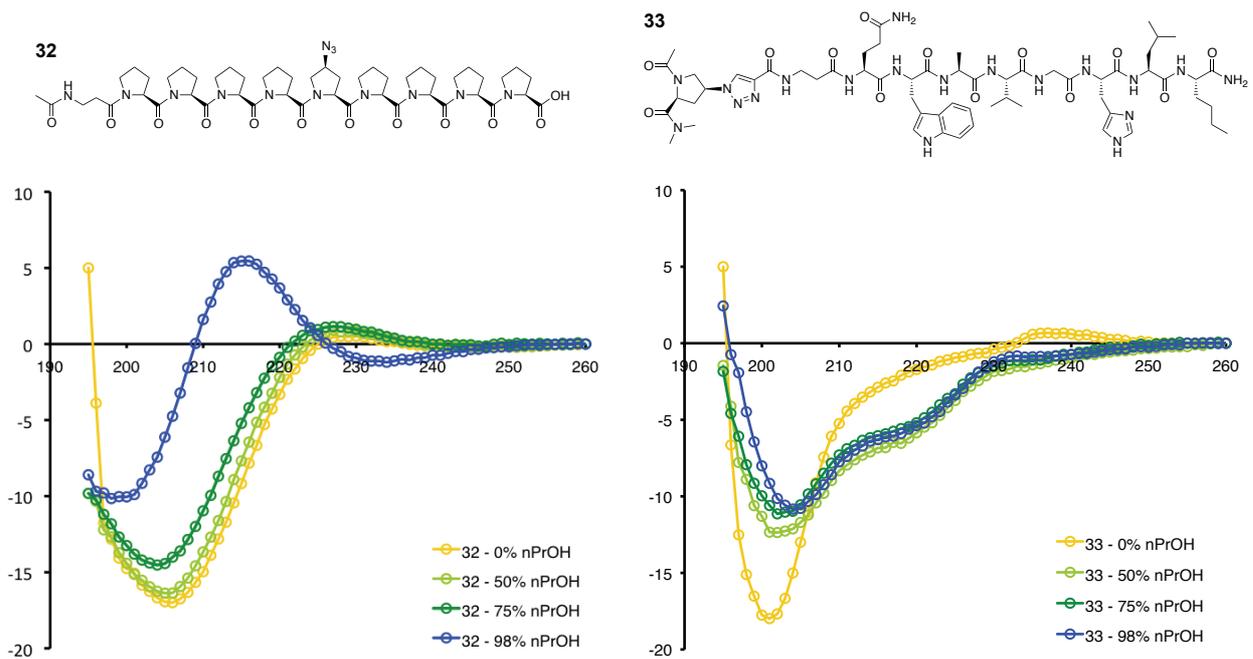


Abbildung 52. CD Spektren des Oligoprolins **32** und des Bombesinderivats **33**, jeweils 40 μM in PBS, pH = 7.4, inkubiert für 24 h bei 37°C

Die Signale des Oligoprolins **32** stimmen mit den Erwartungen überein, der PPII-Anteil nimmt mit steigender n-Propanol Konzentration zu, bei 98 % n-Propanol wird ein Spektrum wie es für eine PPI Konformation charakteristisch ist, beobachtet.

Die CD-Spektren des Bombesinderivats **33** zeigen eine weitestgehend ungeordnete Sekundärstruktur des Peptids, was im Einklang mit den bekannten CD-Spektren für Bombesin ist.^[193] Das Minimum bei ca. 200 nm ist charakteristisch für ein random coil. Mit steigendem n-Propanol Anteil wird das Minimum weniger ausgeprägt, und im Bereich von 215-220 nm formt sich ein zweites Minimum. Dieses ist charakteristisch für β -Faltblätter. Von Bombesinen ist es bekannt, dass sie aggregieren wenn sie in hoher Konzentration vorliegen, und dann Merkmale von β -Faltblättern in den CD-Spektren gesehen werden können. Die gleichen Effekte treten möglicherweise auch in unpolaren Lösungsmitteln auf.^[193]

7.4. Detaillierte Biodistributionsdaten von Hybridligand 2

Tabelle 14. Biodistribution von [¹⁷⁷Lu]-2, 4 h p.i. .

Organ	Maus #1 (% IA/g)	Maus #2 (% IA/g)	Maus #3 (% IA/g)	Maus #4 (% IA/g)	Maus #5 (% IA/g)	Durchschnitt (% IA/g)
Blut	0.16	0.06	0.05	0.10	0.28	0.13 ± 0.09
Herz	0.16	0.13	0.13	0.09	0.10	0.12 ± 0.03
Leber	0.90	0.93	1.01	0.76	0.80	0.88 ± 0.10
Milz	0.79	1.17	0.75	0.75	0.84	0.86 ± 0.18
Lunge	0.59	0.47	0.63	0.43	0.52	0.53 ± 0.08
Nieren	32.55	29.45	31.77	23.38	29.60	29.35 ± 3.60
Magen	1.24	1.53	1.39	1.33	1.58	1.41 ± 0.14
Darm	0.92	1.04	1.63	1.22	0.93	1.15 ± 0.30
Nebenniere	2.99	2.04	2.23	2.69	2.55	2.50 ± 0.37
Pankreas	12.45	21.15	20.79	25.16	29.16	21.74 ± 6.21
Muskel	0.10	0.08	0.09	0.09	0.11	0.09 ± 0.01
Knochen	0.53	0.54	0.79	1.30	0.45	0.72 ± 0.35
Tumor	17.52	23.52	16.39	16.97	-	18.60 ± 3.31

Tabelle 15. Biodistribution von [¹⁷⁷Lu]-2, 21 h p.i. .

Organ	Maus #6 (% IA/g)	Maus #7 (% IA/g)	Maus #8 (% IA/g)	Maus #9 (% IA/g)	Durchschnitt (% IA/g)
Blut	0.02	0.04	0.04	0.03	0.03 ± 0.01
Herz	0.12	0.11	0.12	0.08	0.11 ± 0.02
Leber	0.64	0.80	0.61	0.75	0.70 ± 0.09
Milz	0.67	0.66	0.64	0.77	0.69 ± 0.06
Lunge	1.32	0.82	0.68	0.45	0.82 ± 0.37
Nieren	21.20	26.43	17.79	25.34	22.69 ± 3.97
Magen	0.72	0.80	0.75	0.71	0.74 ± 0.04
Darm	0.37	0.63	1.56	1.00	0.89 ± 0.51
Nebenniere	1.69	1.73	1.63	1.56	1.65 ± 0.07
Pankreas	16.74	20.37	19.48	24.93	20.38 ± 3.40
Muskel	0.06	0.07	0.08	0.05	0.06 ± 0.01
Knochen	0.30	0.58	0.57	0.02	0.37 ± 0.27
Tumor	14.28	17.18	14.04	-	15.17 ± 1.74

