

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

**Entwicklung neuer multimerer PET-Tracer  
zur verbesserten Diagnostik von Prostatakarzinomen:  
Eine Studie von der Darstellung multivalenter Grundgerüste bis zum  
applikationsfertigen Radiotracer**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Gabriel Fischer**  
aus  
**Heidelberg**  
Jahr  
**2015**

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuerin: PD Dr. Carmen Wängler

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Kirsten Lauber

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2016

# Eidesstattliche Versicherung

Fischer, Gabriel

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Entwicklung neuer multimerer PET-Tracer zur verbesserten Diagnostik von  
Prostatakarzinomen:  
Eine Studie von der Darstellung multivalenter Grundgerüste bis zum  
applikationsfertigen Radiotracer**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Blaustein, 20.11.2016

---

Ort, Datum

-

Unterschrift Doktorand

## Abstraktum

Die nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren erlangen weltweit immer größere Bedeutung. Insbesondere die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wird in zunehmendem Maße häufiger eingesetzt, was zur Folge hat, dass es einen steigenden Bedarf an Tracern für diagnostische Untersuchungen gibt. Jedoch steht nur eine begrenzte Anzahl von PET-Tracern für Untersuchungen zur Verfügung und oft haben diese Tracer den Nachteil, dass sie sich nicht gut genug im Zielgewebe anreichern. Mittels Multimerisierung lassen sich diverse Eigenschaften von biologisch aktiven Substanzen verbessern, weshalb die Multimerisierung in dieser Arbeit zur Herstellung von PET-Tracern mit verbesserten Bindungseigenschaften untersucht wurde.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst eine neue Synthesestrategie entwickelt, mit dem multimere Grundgerüste (Dendrone), die sich für die Herstellung multivalenter PET-Tracer eignen, hergestellt werden können. Mit dieser Synthesestrategie ist es möglich Dendrone bis zur Größe eines Hexadezimers einfach und schnell herzustellen und es konnte gezeigt werden, dass die Dendrone durch Einbringung verschiedener Oligoethylenglycol-Linker in ihrem Aufbau flexibel verändert werden können. In diese Dendrone wurde zusätzlich der Chelator DOTA, mit dem sich das PET-Nuklid  $^{68}\text{Ga}$  in die Multimere einführen lässt, oder eine Thiol-tragende Aminosäure, über die beliebige Moleküle eingeführt werden können, mit eingebracht. Anschließend wurden testweise verschiedene bioaktive Moleküle sowie DOTA multimerisiert, wobei die Dendrone als Grundgerüst dienten. Die dadurch erhaltenen multivalenten Substanzen wurden mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert, um die Anwendbarkeit des Ansatzes für die Herstellung von PET-Radiotracern zu belegen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden neue bivalente, Prostatakarzinom-affine PET-Radiopharmaka hergestellt. Diese Substanzen enthielten zwei Bombesin-Analoga ( $\text{BBN}_{(7-14)}$ ), die an die *Gastrin Releasing Peptide* (GRP)-Rezeptoren binden, und den Chelator NODAGA, über den sich das PET-Nuklid  $^{68}\text{Ga}$  ebenfalls in Substanzen einführen lässt. In die dimeren  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Analoga wurden zusätzlich verschieden lange Ethylenglycol-Linker eingebracht, wodurch insgesamt fünf  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Dimere mit einem unterschiedlich großen Abstand zwischen den  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Peptiden erhalten werden konnten. Diese  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Dimere wurden im weiteren Verlauf der Arbeit in *in vitro*-Bindungsstudien an einer GRP-Rezeptor exprimierenden Prostata-Adenokarzinomzelllinie ( $\text{PC}_3$ -Zellen) getestet, um den Einfluss des Abstandes der  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Peptide im Dimer auf die Bindungseigenschaften zu untersuchen. Das  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Dimer, das *in vitro* die besten Bindungseigenschaften besaß, wurde

anschließend zusammen mit der monomeren Vergleichssubstanz DOTA-PESIN und dem Dimer DOTA-(PESIN)<sub>2</sub> *in vivo* an PC<sub>3</sub>-tumortragenden Nacktmäusen getestet. Diese Mäuse wurden mittels PET-CT untersucht, womit der Nachweis erbracht werden sollte, dass sich die verbesserten Bindungseigenschaften des neuen BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimers auch positiv auf das Anreicherungsverhalten im Tumor auswirken.

## Abstract

The nuclear medicine imaging is a diagnostic tool of increasing importance and especially the Positron Emission Tomography (PET) is used more frequently, which causes a growing demand for new PET-tracers. However, there is only a limited number of PET-tracers available, and in addition, these tracers often exhibit a poor accumulation behavior in the target-tissue. The multimerization of biological active compounds is a promising alternative to improve the imaging characteristics, and this is why the multimerization was considered in this thesis for the production of new PET-tracers with improved imaging properties.

In the first part of this work, a new synthesis strategy was developed, which allows the assembly of multimeric frameworks (dendrons), and which can be used for the production of multivalent PET-tracers. With this synthesis strategy, dendrons with up to 16 functionalities could efficiently be synthesized, and it could be shown, that these dendrons can flexibly be modified by inserting oligo ethylene glycol-linker (OEG) into the structure. Additionally, these dendrons were derivatized with the chelating agent DOTA, which allows the introduction of the PET-nuclide  $^{68}\text{Ga}$  to multimeric scaffolds, or a thiol-bearing amino-acid, by which arbitrary molecules can be introduced into the dendron-structure. Subsequently, DOTA as well as different bioactive compounds were multimerized, using the dendrons as scaffolds. Finally, to prove the applicability of the synthesis process, these multivalent compounds were radiolabelled with  $^{68}\text{Ga}$ .

In the second part of this work, new bivalent and prostate cancer-affine PET-tracers were established. These compounds comprised two bombesin-analogs ( $\text{BBN}_{(7-14)}$ ), which are known for their affinity to gastrin releasing peptide (GRP)-receptors, as well as the chelator NODAGA, by which  $^{68}\text{Ga}$  can also be introduced into various substances. A total of five dimeric  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -analogs with ethylene glycol-linkers of different length – to vary the distance between the  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -peptides – , were obtained and tested in *in vitro* binding studies to analyze the influence of the  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -peptide distance in relation to the binding characteristics. At last, *in vivo* experiments were performed by the application of either the dimeric  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -analog, that exhibited the best binding characteristics *in vitro*, monomeric DOTA-PESIN (that was used as standard) or dimeric  $\text{DOTA}-(\text{PESIN})_2$  to  $\text{PC}_3$ -tumor-bearing nude mice. Subsequently, these mice were examined by PET-CT, to prove, that the advanced binding avidity of the newly developed dimeric  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -analog positively influences the accumulation in the tumor tissue.

## Inhalt

1	Einleitung: .....	1
1.1	Das Prostatakarzinom .....	1
1.2	Krebsdiagnostik mit Hilfe bildgebender Verfahren .....	2
1.3	Nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren.....	4
1.4	Tracer.....	11
1.5	Dendrone – Träger von Arzneistoffen.....	14
2	Zielsetzung.....	16
3	Ergebnisse und Diskussion .....	18
3.1	Herstellung Festphasendendrone .....	18
3.1.1	Einleitung .....	18
3.1.2	Herstellung modularer Festphasendendrone .....	20
3.1.3	Einfluss der OEG-Linker auf die Reinheit der Dendrone .....	23
3.1.4	Optimierung weiterer Reaktionsparameter der Synthese von Dendronen auf fester Phase .....	29
3.1.5	Anwendung der multivalenten Maleinimide in Multimerisierungsreaktionen .....	31
3.1.6	Radiomarkierung der oktavalenten Substanzen 40–43 mit $^{68}\text{Ga}$ .....	35
3.1.7	Schlussfolgerung .....	35
3.2	Synthese neuer $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Derivate mit verbesserten Bindungseigenschaften zu GRP-Rezeptoren .....	37
3.2.1	Einleitung .....	37
3.2.2	Konzeption neuer Bombesin $_{(7-14)}$ -Derivate .....	40
3.2.3	Herstellung dimerer $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Analoga.....	44
3.2.4	Radiomarkierung der hergestellten $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Dimere sowie der monomeren Vergleichssubstanz DOTA-PESIN mit $^{68}\text{Ga}^{3+}$ zur Durchführung von Serumstabilitätstests und <i>in vivo</i> -Versuchen .....	51
3.2.5	Testung der Serumstabilität von Substanz 61–65 im humanen Serum .....	51
3.2.6	Testung der Substanzen 61–65 in Bindungsstudien .....	54

3.2.7	Evaluierung des BBN <sub>(7-14)</sub> -Dimers 64 <i>in vivo</i> .....	58
3.2.8	Schlussfolgerung .....	65
4	Material und Methoden .....	66
4.1	Allgemeines .....	66
4.2	Dendronsynthese auf fester Phase .....	67
4.2.1	Generelle Durchführung der Synthese von Dendronen auf fester Phase .....	67
4.2.2	Generelle Synthesevorschrift für die Konjugation Thiol-tragender Synthesebausteine an multivalente Maleinimid-Dendrone .....	76
4.2.3	Radiomarkierung der DOTA-derivatisierten Multimere (40–43) mit <sup>68</sup> Ga .....	78
4.3	Synthese bivalenter BBN <sub>(7-14)</sub> -Analoga .....	79
4.3.1	Herstellung grundlegender Synthesebausteine .....	79
4.3.2	Generelle Synthese von Bombesin (47) und der Bombesin-Derivate 49–53:.....	80
4.3.3	Herstellung der Thiol entschützten BBN <sub>(7-14)</sub> -Dimere 56–60 .....	82
4.3.4	Herstellung der NODA-GA konjugierten BBN <sub>(7-14)</sub> -Dimere 61–65: .....	84
4.3.5	Radiomarkierung und Reinigung der NODAGA-modifizierten BBN <sub>(7-14)</sub> -Dimere 61–65 mit <sup>68</sup> Ga für die Durchführung der Serumstabilitätstests .....	85
4.3.6	Untersuchung der Serumstabilitäten der Substanzen [ <sup>68</sup> Ga]61–[ <sup>68</sup> Ga]65 .....	86
4.3.7	Zellkultur .....	86
4.3.8	Zellbindungsassay .....	86
4.3.9	Radiomarkierung und <i>in vivo</i> -Untersuchung von Substanz 64, 65 und DOTA- PESIN .....	87
5	Zusammenfassung .....	88
6	Literatur .....	89
	Anhang .....	94
	Danksagung .....	94
	Abkürzungsverzeichnis .....	94



# 1 Einleitung:

Krebs ist einer der häufigsten Krankheiten in Deutschland. 2011 wurden 26.8 % der krankheitsbedingten Todesfälle durch eine Krebserkrankung verursacht. Krebs ist nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland <sup>[1]</sup>. Nach einer Publikation des Robert Koch Instituts aus dem Jahr 2013 <sup>[2]</sup> müssen 51 % der Männer und 43 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens damit rechnen an Krebs zu erkranken, wobei jeder vierte Mann und jede fünfte Frau an einer Krebserkrankung verstirbt. Die häufigste diagnostizierte Krebsart in Deutschland ist bei Frauen das Mammakarzinom (31.3 %) und bei Männern das Prostatakarzinom (26.1 %) <sup>[2]</sup>.

## 1.1 Das Prostatakarzinom

Ab 35 Jahren nimmt die Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu erkranken mit fortschreitendem Alter zu, wobei ein Mann in Deutschland mit einer Wahrscheinlichkeit von 13.2 % an einem Prostatakarzinom erkrankt, was bedeutet, dass etwa jeder achte Mann in Deutschland im Laufe seines Lebens diese Form von Krebs bekommt <sup>[2]</sup>. Weltweit ist das Prostatakarzinom, nach dem Bronchialkarzinom <sup>[3]</sup>, die zweithäufigste Krebsart bei Männern. Die genauen Ursachen, weshalb Männer an einem Prostatakarzinom erkranken, sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch lässt sich die Entstehung einiger Prostatakarzinome auf genetische Einflüsse zurückführen <sup>[4-6]</sup>. Außerdem gibt es äußere Einflüsse, bei denen das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken steigt, wie beispielsweise starker Alkoholkonsum <sup>[7]</sup>. Daneben gibt es Hinweise, dass Übergewicht sowie Entwicklungsstörungen im Mutterleib und der Kindheit und Jugend, welche das Wachstum beeinflussen, ebenfalls das Risiko erhöhen an einem Prostatakarzinom zu erkranken <sup>[8]</sup>. Zur Verbesserung der Heilungschancen ist eine frühe Diagnose des Prostatakarzinoms von Vorteil. Zusätzlich zu der Gefahr an dem Prostatakarzinom früher zu versterben, wirkt sich das Auftreten eines Tumors auch negativ auf die Lebensqualität der Patienten aus <sup>[9]</sup>, weshalb auch aus diesem Grund eine schnelle Heilung oder ein langsames Tumorwachstum günstig für die Patienten sind.

Für die Diagnose eines Prostatakarzinoms gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie beispielsweise die rektale Untersuchung der Prostata <sup>[10]</sup>, die Durchführung einer Biopsie <sup>[11]</sup>, die Messung des prostataspezifischen Antigens (PSA) <sup>[12]</sup> oder das Screening durch bildgebende Verfahren <sup>[13-15]</sup>. Da es bei allen diagnostischen Verfahren zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen kommen kann, ist es wichtig, dass einem Patienten vor der

Behandlung mehrere Möglichkeiten für die Tumor-Diagnostik zur Verfügung stehen. Jede Methode, die für die Diagnose eines Prostatakarzinoms angewendet werden kann, hat Vor- und Nachteile. Die bildgebenden Verfahren haben beispielsweise den Vorteil, dass sie nicht invasiv sind, weshalb diese Verfahren für Patienten und die behandelnden Ärzte sehr attraktiv sind. Im folgenden Abschnitt werden die Funktionsweisen der bildgebenden Verfahren, sowie ihre Vor- und Nachteile, genauer erörtert.

## **1.2 Krebsdiagnostik mit Hilfe bildgebender Verfahren**

Die derzeit wichtigsten bildgebenden Verfahren sind: die klassische Röntgendiagnostik, die Computertomographie (CT), die Ultraschalldiagnostik, die Magnetresonanztomographie (MRT), die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Einzelphotonen Emissionscomputertomographie (SPECT). Die Verfahren unterscheiden sich vor allem in ihrer Funktionsweise <sup>[16]</sup>: In der klassischen Röntgendiagnostik wird mit Hilfe einer Strahlenquelle hochenergetische Röntgenstrahlung erzeugt, die auf die zu untersuchende Stelle des Patienten gerichtet wird. Beim Durchtritt der Strahlung durch den Patienten werden die Strahlen unterschiedlich stark von den verschiedenen Geweben absorbiert und treffen anschließend auf einen photosensitiven Hintergrund (Radiograph), der sich beim Auftreffen der Röntgenstrahlung schwarz färbt. Auf den Aufnahmen eines Radiographen können Knochen, Fett, Luft und anderes Gewebe differenziert werden, da diese jeweils eine unterschiedlich starke Absorption besitzen.

Eine Weiterentwicklung der klassischen Röntgendiagnostik ist die CT, die deutlich sensitiver ist und mit der sich insbesondere weiches Gewebe leichter differenzieren lässt, als in der klassischen Röntgendiagnostik, was gerade in der Unterscheidung von Tumorgewebe vom gesunden umliegenden Gewebe von Vorteil ist. Die Detektion im CT erfolgt mittels elektronischer Detektoren und da diese nicht wie der Radiograph erneuert werden müssen, können mehrere Aufnahmen innerhalb kurzer Zeit durchgeführt werden. Zusätzlich kann die Röntgenquelle (zusammen mit den Detektoren) um den Patienten bewegt werden, wodurch die Perspektive der Aufnahmen verändert werden kann. Die aufgenommenen Schnittbilder werden anschließend durch Computer rekonstruiert. Die computerunterstützte Auswertung und die höhere Sensitivität der Detektoren (im Vergleich zum Radiographen) machen die CT zu einer Bildgebungsmodalität, die der klassischen Röntgendiagnostik in der Diagnostik von Tumoren deutlich überlegen ist.

Eine weitere Methode, mit der sich morphologische Unterschiede im Körper diagnostizieren lassen, ist die Ultraschalldiagnostik: Hochfrequente Ultraschallwellen, die sich besonders gut in Flüssigkeiten (wie Körperflüssigkeiten) ausbreiten können, werden durch eine Sonde, die direkt auf den Patienten aufgelegt wird, in die zu untersuchende Stelle im Körper des Patienten geleitet. Die Ultraschallwellen treffen während ihres Durchgangs durch den Patienten auf unterschiedlich strukturiertes Gewebe und werden von diesem verschieden stark reflektiert. Dadurch können, wie beim CT, Aufnahmen erzeugt werden, auf denen sich Tumoren vom umliegenden Gewebe abgrenzen lassen und bieten eine wertvolle Ergänzung zu anderen diagnostischen Verfahren. Nachteilig bei der Ultraschalldiagnostik ist jedoch, dass die Aufnahmen keine festen Projektionen besitzen. Zudem dringen die Ultraschallwellen nur wenige Zentimeter in das Gewebe ein und erlauben nur die lokale Aufnahme des Gewebes. Aufgrund der Tatsache, dass die Ultraschallsonde auf dem Körper aufliegen muss, ist die Ultraschalldiagnostik für eine Ganzkörperaufnahme, wie sie bei einer CT- oder MRT-Messung durchgeführt werden kann, ungeeignet.

Die MRT ist ein Verfahren mit dem sich (wie in der CT) hauptsächlich morphologische Aufnahmen erhalten lassen, jedoch liefert die MRT grundlegend andere Informationen. Das Prinzip mit der sich über die MRT Aufnahmen machen lassen beruht auf der Tatsache, dass sich die Atomkerne bestimmter Elemente im Magnetfeld ausrichten, wenn sie einem starken Magnetfeld ausgesetzt sind. Die Protonen von Wasserstoffatomen, die unter anderem in Wassermolekülen oder Fett enthalten sind, besitzen diese Eigenschaft sich in einem Magnetfeld auszurichten. Durch einen elektromagnetischen Puls mit einer Frequenz, die der Resonanzfrequenz eines Wasserstoffatoms entspricht, kann ein Teil der Protonen dazu angeregt werden ihre Ausrichtung um einen bestimmten Winkel zu verändern. Sobald das elektromagnetische Feld verschwindet, nehmen die neu ausgerichteten Protonen ihre ursprüngliche Position wieder ein. Dabei senden die Protonen ein sehr schwaches Signal aus, das mit Hilfe von Kupferspiralen (die um den Patienten angebracht sind) detektiert werden kann. Mit der MRT lassen sich weiche Gewebe sehr gut differenzieren, weshalb die MRT ein weiteres wertvolles Instrument für die Detektion von Prostatakarzinomen ist. Der Vorteil der MRT besteht darin, dass im Gegensatz zur CT während der Aufnahmen keine ionisierende Strahlung erzeugt wird und der Weichteilkontrast erheblich höher ist.

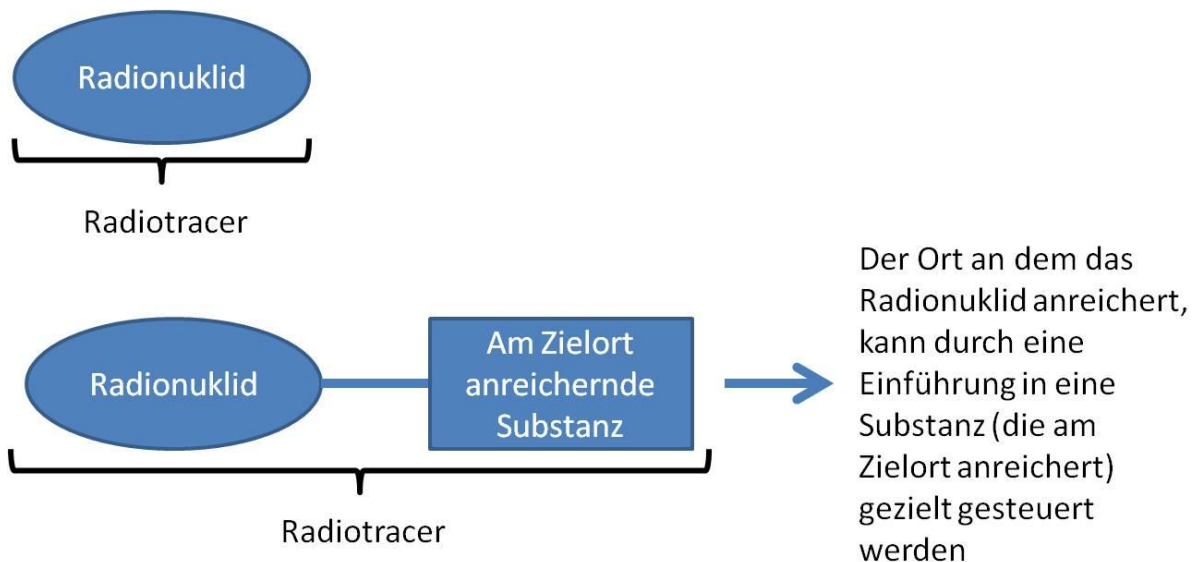
Tumoren können auch mit nuklearmedizinischen Verfahren detektiert werden. Zu den nuklearmedizinischen Verfahren gehören die PET und die SPECT. Bei diesen beiden Verfahren werden dem Patienten vor der Messung Radiotracer verabreicht, die anschließend

mit Hilfe der PET oder der SPECT detektiert werden. Ein Radiotracer kann ein einzelnes Nuklid oder ein komplexes Molekül sein, das die Eigenschaft besitzt, sich im Zielgewebe anzureichern. Diese Vorgehensweise (dass Radiotracer für die Durchführung von Messungen mittels nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren eingesetzt werden) erlaubt eine funktionelle Bildgebung, die mittels klassischer Röntgendiagnostik, CT, MRT oder Ultraschalldiagnostik nicht ohne weiteres oder gar nicht möglich ist.

Es bietet sich auch die Möglichkeit verschiedene Bildgebungsverfahren (im sogenannten multimodalen Imaging) zu vereinen, was entscheidende Vorteile hat. Beispielsweise ist die Kombination eines CTs oder MRTs mit einem SPECT oder PET sehr sinnvoll, denn dadurch lassen sich noch detailliertere Informationen zu dem untersuchten Gewebe erhalten, die für eine Therapieplanung und Therapiekontrolle wichtig sind. Die Kombinationsmöglichkeiten der nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren mit morphologischen bildgebenden Verfahren und die neuen Anwendungsmöglichkeiten in der Onkologie machen die SPECT und die PET zu vielversprechenden Bildgebungsverfahren, auf die im anschließenden Kapitel eingegangen wird.

### **1.3 Nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren**

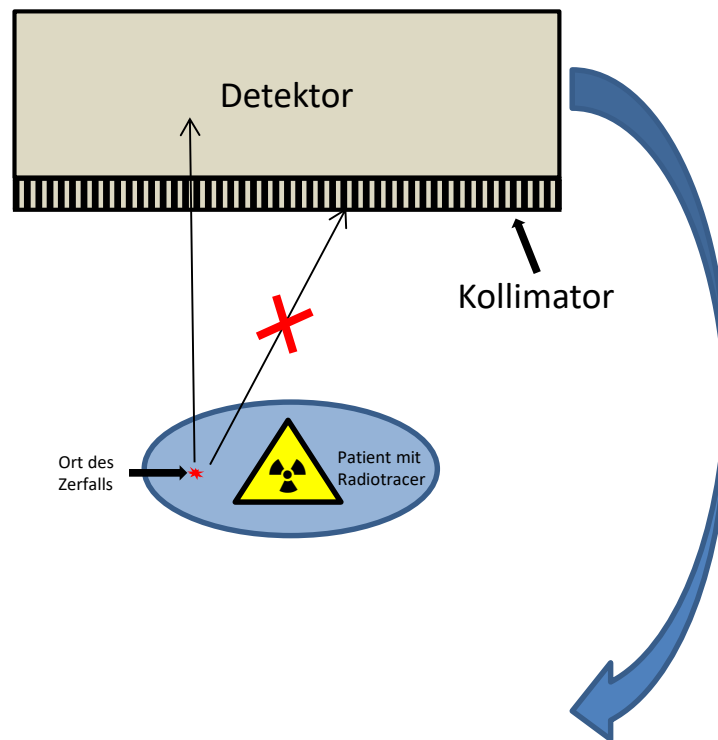
Um mit Hilfe nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren Messungen durchzuführen, werden Radiotracer benötigt. Radiotracer können beispielsweise nur aus einem Radionuklid bestehen, wenn diese sich von Natur aus im Zielgewebe anreichern (wie beispielsweise  $^{18}\text{F}$ , das sich im Knochengewebe anreichert <sup>[17]</sup>). Jedoch werden die Radionuklide in den meisten Fällen in bioaktive Substanzen eingeführt, um dadurch eine Anreicherung im Zielgewebe zu erreichen (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Das Radionuklid wird in eine Substanz eingeführt, die am gewünschten Zielort anreichert. Dadurch wird verhindert, dass das Radionuklid sich in Geweben anreichert, die sich vom Zielgewebe unterscheiden.**

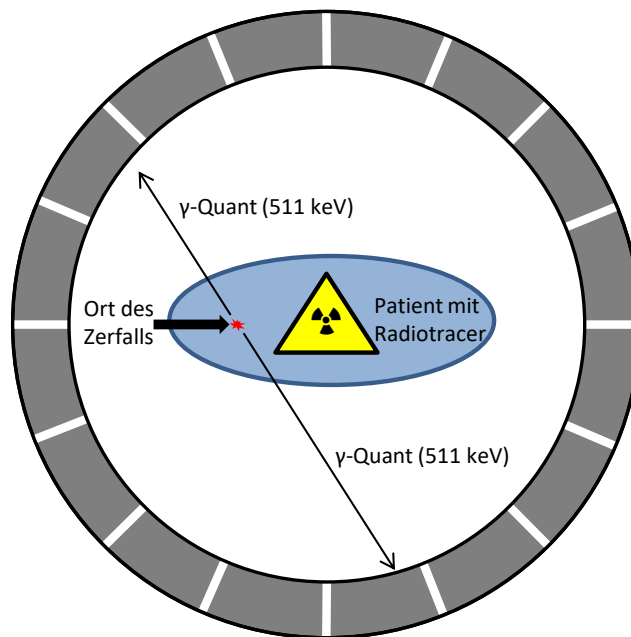
Die SPECT ist seit etwa 1970 auf dem Markt und ist damit im Vergleich zur PET das etabliertere Verfahren. Die PET steht zwar seit etwa 1980 für medizinische Untersuchungen zur Verfügung, jedoch erlangte diese Bildgebungsmodalität erst in den letzten Jahren, durch die Entwicklung geeigneter Radotracer, eine zunehmende Bedeutung. Die PET und die SPECT unterscheiden sich unter anderem aufgrund der Radionuklide, die für eine Messung eingesetzt werden. In der SPECT werden Radionuklide verwendet, die  $\gamma$ -Strahlen emittieren. Im Gegensatz dazu werden in der PET  $\beta^+$ -Strahler verwendet.

Dieser Unterschied spiegelt sich auch im Aufbau der beiden Bildgebungsverfahren wieder: In der SPECT werden die emittierten Strahlen des Radionuklids durch SPECT-Detektoren, die um den Patienten positioniert sind, aufgenommen. Vor den Detektoren sind Kollimatoren aus Blei angebracht, die nur die  $\gamma$ -Strahlen ohne Abschwächung durchlassen, die direkt senkrecht aus der Strahlenquelle auf die SPECT-Detektoren treffen (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines SPECT. Der Detektor kreist für Aufnahmen, die aus verschiedenen Positionen aufgenommen werden, um einen Patienten. Dabei werden nur senkrecht einfallende Strahlen vom SPECT-Detektor gemessen. Die restliche Strahlung wird mit Hilfe eines Kollimators abgeschwächt und nicht von den Detektoren detektiert.**

Diese Kollimatoren sind notwendig, um Streustrahlung vor dem Auftreffen auf den Detektor abzuschwächen und nur die senkrecht einfallenden Strahlen ohne Abschwächung durchzulassen, wodurch über 99 % der Strahlen nicht vom Detektor erfasst werden. Diese Vorgehensweise ist wiederum notwendig, um die Bildschärfe der Aufnahmen zu verbessern, hat jedoch den Nachteil, dass die Ortsauflösung von der Entfernung des Patienten abhängig und die Sensitivität der Detektion gering ist. In der PET werden keine Bleikollimatoren vor den Detektoren eingesetzt, wodurch die Sensitivität deutlich höher ist als in der SPECT und die Ortsauflösung nur gering durch die Entfernung des Patienten beeinflusst wird. Die PET-Detektoren sind, aufgrund messtechnischer Gründe, ringförmig um den Patienten angebracht (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung eines PET-Scanners. Der Patient liegt in der Mitte der ringförmig angeordneten Detektoren.  $\gamma$ -Quanten, die von den applizierten Radiotracern emittiert werden, werden von den Detektoren registriert.**

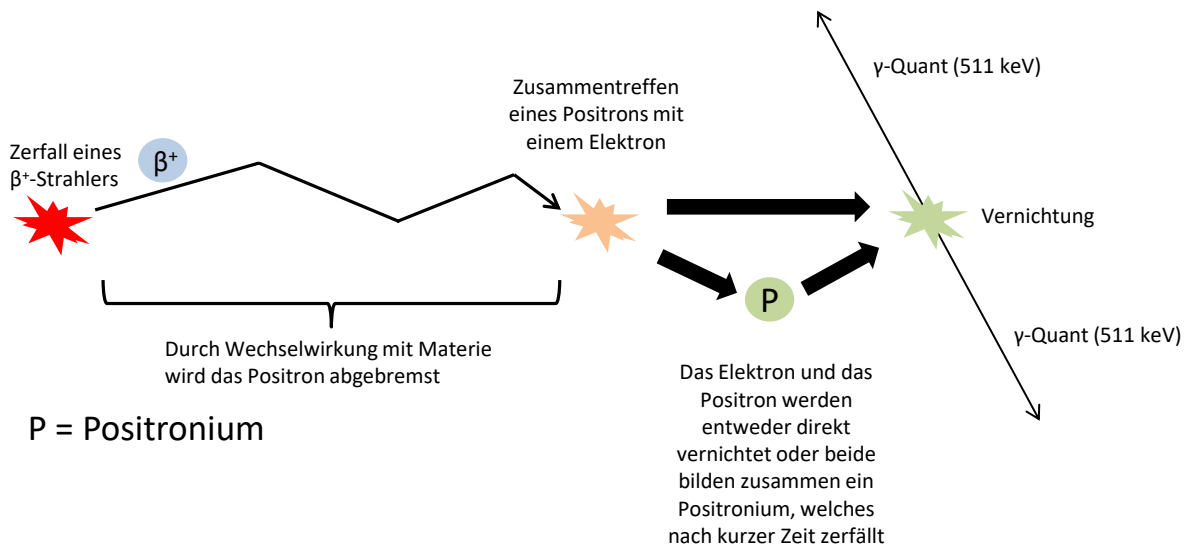
Die Erzeugung der Ortsauflösung der Anreicherung des Radiotracers erfolgt im PET elektronisch (durch eine sogenannte Koinzidenzmessung). Dies ist möglich, da Positronen nach dem Zerfall eines  $\beta^+$ -Strahlers nach einer gewissen Zeit durch das Zusammentreffen mit einem Elektron selbst vernichtet werden und dabei meistens zwei  $\gamma$ -Quanten in einem Winkel von fast exakt  $180^\circ$  emittieren. Durch die Messung dieser  $\gamma$ -Quanten (innerhalb eines kleinen Zeitintervalls) können die von der Strahlenquelle emittierten Strahlen von herkömmlicher Streustrahlung unterschieden werden. Mit Hilfe eines Computers kann der Ursprungsort der detektierten Strahlung dreidimensional errechnet und in einem PET-Bild dargestellt werden. In der SPECT werden die Bilder dagegen nur in einer planaren, zweidimensionalen Ebene erhalten. Jedoch ist es möglich, die SPECT-Bilder ebenfalls in 3D-Bilder umzurechnen.

Die physikalischen Vorgänge, die ein Positron bis zu seinem Zerfall durchläuft und die zur der Entstehung der  $\gamma$ -Quanten führen, lassen sich wie folgt erklären <sup>[18]</sup>: Nuklide mit einem Protonenüberschuss neigen häufig zu einem  $\beta^+$ -Zerfall, um in einen stabileren Kernzustand überzugehen. Während dieses Prozesses wandelt sich ein Proton (p) in ein Neutron (n) um und sendet Teilchen in Form eines Positrons ( $e^+$ ) und eines Elektro-Neutrinos ( $\nu_e$ ) aus (siehe Formel 1).

**Formel 1**



Während seiner Bewegung durch Materie wird das Positron abgebremst. Dies geschieht solange, bis es beim Zusammentreffen mit einem Elektron entweder direkt vernichtet wird oder ein Positronium bildet. Das Positronium besitzt eine Lebenszeit in der Größenordnung von  $10^{-7}$  bis  $10^{-10}$  s und zerfällt nach dieser Dauer unter Aussendung zweier oder dreier  $\gamma$ -Quanten (sog. Vernichtungsstrahlung). Die Anzahl der freiwerdenden  $\gamma$ -Quanten hängt dabei von der Orientierung der Spins des Protons und des Elektrons zum Zeitpunkt der Vernichtung ab <sup>[18]</sup>. Bei den Zerfallsereignissen in denen zwei  $\gamma$ -Quanten gebildet werden (die auftreten können wenn das Positron direkt vernichtet wird oder das Positronium zerfällt), werden diese in einem Winkel von fast exakt  $180^\circ$  in die entgegengesetzte Richtung und einer Energie von 511 keV emittiert (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vorgänge nach dem Zerfall eines  $\beta^+$ -Strahlers am Beispiel eines Zerfallsereignisses, bei dem zwei  $\gamma$ -Quanten gebildet werden.**

Wichtigstes Instrument für die Durchführung einer Messung mittels PET oder SPECT sind die Radionuklide, ohne die keine Bilder erzeugt werden können. Diese müssen mehrere Bedingungen erfüllen, um für nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren geeignet zu sein. Dazu gehören: Eine leichte Produzierbarkeit, eine gute Verfügbarkeit, ein geringer Anteil nicht erwünschter Zerfallsarten (wodurch Strahlung entstehen kann, die unnötigerweise gesundes Gewebe schädigen könnte) und sie sollten eine Halbwertszeit besitzen, die es erlaubt die Messung und gegebenenfalls eine oder mehrere chemische Reaktionen durchzuführen. Ein Radionuklid ist dann leicht herzustellen, wenn das Mutternuklid, aus dem es hergestellt wird, von Natur aus isotonenrein verfügbar ist und nicht erst aufwendig gereinigt werden muss. Ebenfalls ist es günstig, wenn Radionuklide mit einem



niederenergetischen Zyklotron herstellbar sind, die mittlerweile eine immer größere Verbreitung in Kliniken und Forschungsinstituten finden. Die Strahlung, die die Radionuklide emittieren, sollte möglichst niederenergetisch sein, da hochenergetische Strahlung auf Gewebe ein höheres Ionisierungspotential besitzt als niederenergetische Strahlung und durch eine niedrige Positronenenergie eine höhere Bildschärfe im PET erreicht werden kann: Ein Positron legt bis zu seinem Zerfall immer einen bestimmten Weg im Gewebe zurück, wodurch der ursprüngliche Ort des zerfallenen Radionuklids nur ungenau bestimmt werden kann. Diese Ungenauigkeit nimmt mit zunehmender Positronenenergie zu, da der zurückgelegte Weg im Gewebe dann ebenfalls zunimmt. Dadurch entsteht eine Unschärfe, die im PET-Bild zu sehen ist.

Daneben ist die Halbwertszeit eines Radionuklids ebenfalls sehr wichtig, denn sie beeinflusst die Anwendungsmöglichkeiten eines Radionuklids maßgeblich. Kurze Halbwertszeiten limitieren chemische Reinigungsschritte und chemische Modifikationen, die vor der Anwendung durchzuführen sind, sowie die Messdauer der anschließenden Untersuchung. Wenn ein Radionuklid eine lange Halbwertszeit besitzt, steht für die Vorbereitung des Radiotracers mehr Zeit zur Verfügung und es können Langzeitmessungen durchgeführt werden. Jedoch ist der Patient in diesem Fall (vorausgesetzt das langlebige Radionuklid verbleibt auch lange im Körper des Patienten) einer längeren Strahlenbelastung ausgesetzt.

In der SPECT wird fast ausschließlich das Radionuklid  $^{99m}\text{Tc}$  mit einer Halbwertszeit von 6.0 h eingesetzt. Daneben existieren noch weitere SPECT-Nuklide wovon drei in Tabelle 1 gezeigt sind.

**Tabelle 1: Wichtige SPECT-Nuklide (IT = Isomerieübergang,  $\epsilon$  = Elektroneneinfang,  $\beta^-$  = Elektronenzerfall) <sup>[19]</sup>.**

SPECT-Nuklid	Zerfallsart	$\gamma$ -Zerfallsenergie [MeV]	Halbwertszeit	Bindung an Pharmakon
$^{99m}\text{Tc}$	IT	0.141	6.0 h	Ionisch (Chelator)
$^{111}\text{In}$	$\epsilon / \gamma$	0.245, 0.171	2.8 d	Ionisch (Chelator)
$^{123}\text{I}$	$\epsilon / \gamma$	0.159	2.1 h	Kovalent

Die SPECT-Nuklide  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  und  $^{123}\text{I}$  sind allesamt Nuklide, die für die Diagnostik geeignet sind. Der PET stehen ebenfalls eine Vielzahl von Radionukliden zur Verfügung, wovon einige in Tabelle 2 gezeigt sind.

**Tabelle 2: Wichtige PET-Nuklide ( $\epsilon$  = Elektroneneinfang,  $\beta^-$  = Elektronenzerfall,  $\beta^+$  = Positronenzerfall)**  
<sup>[19]</sup>.

<b>PET-Nuklid</b>	<b>Zerfallsart</b>	<b><math>\beta^+</math> Zerfallsenergie [MeV]</b>	<b>Halbwertszeit</b>	<b>Bindung an Pharmakon</b>
<sup>11</sup> C	$\beta^+$	1.0	20.4 min	Kovalent
<sup>13</sup> N	$\beta^+$	1.2	10.0 min	Kovalent
<sup>15</sup> O	$\beta^+$	1.7	2.0 min	Kovalent
<sup>18</sup> F	$\beta^+$	0.6	109.7 min	Kovalent
<sup>64</sup> Cu	$\beta^+ / \beta^- / \epsilon / (\gamma)$	0.7	12.7 h	Ionisch (Chelator)
<sup>68</sup> Ga	$\beta^+ / \gamma$	1.9	67.6 min	Ionisch (Chelator)

Die PET-Nuklide unterscheiden sich, wie zuvor die SPECT-Nuklide, in ihren Eigenschaften und werden daher auch für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt. <sup>64</sup>Cu kann beispielsweise sowohl für die PET-Diagnostik als auch für die Therapie verwendet werden, da es bei seinem Zerfall Positronen und Auger-Elektronen emittiert. Mit <sup>11</sup>C und <sup>18</sup>F existieren zwei PET-Nuklide, die, wenn sie für eine Radiomarkierung eingesetzt werden, ihre Trägersubstanz nur minimal verändern und sich daher für die Bildgebung von Geweben, in denen sich die Strukturveränderung eines Radiotracers besonders schnell auf die Aufnahme am Zielort auswirkt, eignen <sup>[20]</sup>. Ein solches Gewebe ist beispielsweise das Gehirn, das aufgrund der Blut-Hirn-Schranke für eine Vielzahl pharmakokinetisch aktiver Substanzen nicht durchlässig ist. Nährstoffe, die das Gehirn benötigt, können dagegen die Blut-Hirn-Schranke passieren und mit Fluordesoxyglucose (FDG) wurde eine Substanz gefunden, die diese Eigenschaft auch nach ihrer Radiomarkierung mit <sup>18</sup>F beibehält. Zudem besitzen die PET-Nuklide <sup>18</sup>F und <sup>64</sup>Cu im Vergleich zu anderen PET-Nukliden (wie <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>68</sup>Ga) eine niedrige Positronenenergie von jeweils 0.6 und 0.7 MeV und erzeugen dadurch eine geringe Unschärfe im PET. Ein weiteres wichtiges PET-Nuklid mit großem Potential ist <sup>68</sup>Ga <sup>[21]</sup>, denn es lässt sich leicht über Generatoren erhalten (im Gegensatz zu Radionukliden, wie <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>18</sup>F <sup>[22]</sup> und <sup>64</sup>Cu <sup>[23]</sup>, die in einem Zyklotron hergestellt werden) und die ionische Form <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> kann mittels eines Chelators in biologisch aktive Substanzen eingeführt werden.

Beide in diesem Kapitel vorgestellten nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren eignen sich für die Diagnose von Tumoren. Generell wird der PET aufgrund der deutlich besseren räumlichen Auflösung, der höheren Sensitivität, der Möglichkeit, die Tracerkonzentration in

absoluten Zahlen zu bestimmen und einer besseren Attenuationskorrektur eine bessere Zukunft als der SPECT vorausgesagt. Und obwohl die PET im Gegensatz zur SPECT das deutlich kostenintensivere Verfahren ist, wurden 2012 etwa viermal so viele Publikationen über die PET veröffentlicht als über die SPECT, was die zunehmende Wichtigkeit der PET verdeutlicht <sup>[20]</sup>. Ob sich die PET langfristig gegen die SPECT durchsetzen kann, entscheidet sich auch aufgrund der Radiotracer, die der PET für Messungen zur Verfügung stehen. Daher besteht ein großer Forschungs- und Entwicklungsbedarf für neue PET-Tracer.

## 1.4 Tracer

Tumorgewebe und gesundes Gewebe unterscheiden sich meist in ihrem morphologischen Aufbau und in ihrem Stoffwechsel. Radiotracer müssen so konzipiert sein, dass sie sich aufgrund spezifischer Merkmale möglichst nur im Tumorgewebe anreichern können. Dadurch wird gewährleistet, dass mit diesen Radiotracern ein gutes Tumor-zu-Hintergrundverhältnis und in Folge dessen eine hohe Sensitivität erreicht werden kann. Es gibt verschiedene Ansätze, wie eine Anreicherung von Radiotracern im Tumorgewebe erreicht werden kann: Die Anreicherung über den Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention (EPR, Englisch: *Enhanced Permeability and Retention*) beruht auf einer passiven Diffusion von Molekülen, bei denen sich vermehrt große Moleküle, wie Makromoleküle oder Nanopartikel, in der Tumorzelle anreichern. Dieser Effekt tritt auf, da sich Tumorzellen meist sehr viel schneller teilen als gesunde Zellen und es während des beschleunigten Wachstums der Tumorzellen zu Fehlern in der Gewebestruktur der Kapillargefäße kommt. Dadurch werden diese durchlässiger für große Moleküle. Das ebenfalls meist fehlerhaft arbeitende lymphatische System der Tumorzellen trägt wiederum seinen Teil zu dieser Anreicherung bei, indem Makromoleküle oder Nanopartikel nur noch langsam oder gar nicht abgeführt werden <sup>[24-25]</sup>. Kleinere Moleküle wie Aminosäuren, DNA-Bausteine, Zucker und andere Stoffe, die wichtig für den Stoffwechselvorgang in einer Zelle sind, können ebenfalls für eine Tumoranreicherung genutzt werden, da Tumoren meistens eine erhöhte Zellteilungsrate und dadurch einen erhöhten Stoffwechselrate (was wiederum zu einem erhöhten Verbrauch von stoffwechselrelevanten Substanzen führt), im Vergleich zu gesunden Zellen, vorweisen <sup>[26]</sup>. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass neben dem Tumorgewebe auch andere Gewebe mit hohen Stoffwechselumsätzen diese stoffwechselrelevanten Substanzen anreichern können (wie beispielsweise das Gehirn, der Herzmuskel oder entzündetes Gewebe) und dadurch eine eindeutige Abgrenzung des Tumors von anderen Geweben nicht immer möglich ist. Zudem weisen nicht alle Tumoren einem hohen Stoffwechselumsatz auf (wie es bei

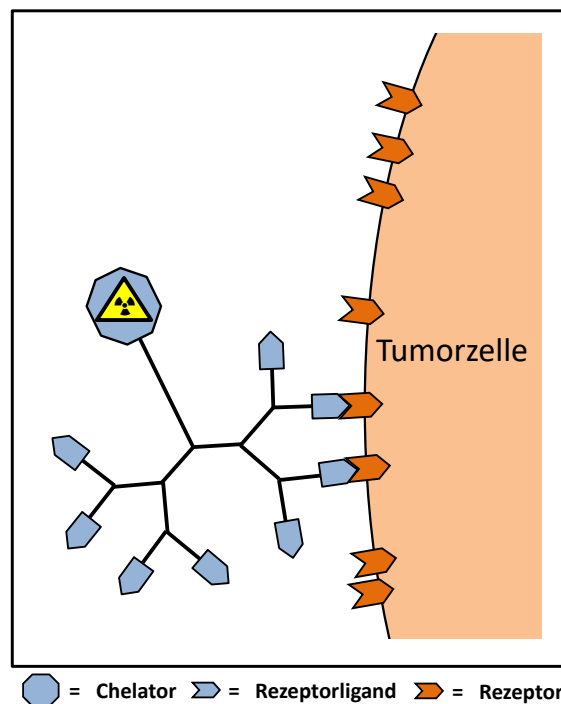
Prostatakarzinomen häufig der Fall ist) und diese können mit stoffwechselrelevanten Substanzen in der nuklearmedizinischen Bildgebung nicht sichtbar gemacht werden. Der bekannteste Vertreter dieser Stoffgruppe ist FDG, für das es viele klinische Anwendungen gibt <sup>[27]</sup>. Antikörper <sup>[28-29]</sup>, Antikörperfragmente <sup>[29-30]</sup> oder Peptide <sup>[31-32]</sup> sind weitere Substanzen, die sich im Tumorgewebe anreichern können. Das Besondere an diesen Molekülen ist, dass sie gezielt an Zelloberflächenmerkmale (wie Antigene oder Rezeptoren) binden. Diese Substanzen werden häufig als „spezifisch“ bezeichnet, wohingegen die stoffwechselrelevanten Substanzen oder über den EPR-Effekt anreichernde Substanzen meist als „unspezifisch“ bezeichnet werden. Die „spezifisch“ anreichernden Substanzen sind vielversprechende Tumortracer, da für eine Anreicherung der Stoffwechselumsatz einer Zelle nicht das entscheidende Kriterium ist und sich diese dadurch auch in langsam wachsendem Gewebe anreichern können.

Neben der Art der Anreicherung gibt es noch weitere Kriterien, die für die Wahl eines Tracers für die nuklearmedizinische Bildgebung entscheidend sind. Dazu gehören: die biologische Halbwertszeit (gibt an wie lange es dauert bis nur noch die Hälfte des Tracers im Organismus vorhanden ist), die *in vivo*-Stabilität (die möglichst hoch sein sollte) und die Toxizität (die möglichst gering sein sollte). Substanzen die eine große molekulare Größe besitzen, wie beispielsweise Antikörper oder Makromoleküle, weisen eine deutlich längere biologische Halbwertszeit auf als kleinere Moleküle, wie Zucker, DNA-Bausteine, Aminosäuren oder Peptide. Aufgrund der langsameren Ausscheidung aus dem Körper verbleiben diese Substanzen auch über einen längeren Zeitraum im Körper des Patienten. Das hat zur Folge, dass es bei Verwendung von Radiotracer, die eine große molekulare Größe besitzen, häufig zu einer stärkeren Strahlenbelastung des Patienten kommt, als bei Verwendung von Molekülen mit einer kleinen molekularen Größe. Eine weitere Eigenschaft die Radiotracer besitzen sollten ist eine möglichst hohe *in vivo*-Stabilität, da Fragmente der Radiotracer andere pharmakokinetische Eigenschaften besitzen können als die intakten Tracer. Dies wiederum kann dazu führen, dass die Fragmente sich in Geweben anreichern, welches nicht dem Zieltarget entspricht, wodurch es zu falschen Diagnosestellungen oder einer verfehlten Therapie kommen kann.

Für die Diagnostik mittels nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren eignen sich besonders Radiotracer, die eine kurze biologische Halbwertszeit besitzen – wodurch diese schneller aus dem Körper des Patienten wieder ausgeschieden werden – und die spezifisch im Tumorgewebe anreichern können. Das setzt jedoch auch eine schnelle Anreicherung der

Radiotracer im Tumorgewebe voraus. Die physikalische Halbwertszeit des Radiotracers sollte deshalb der biologischen Halbwertszeit angepasst sein. Eine geeignete Substanzgruppe, die sich für eine Radiomarkierung mit diagnostischen oder therapeutischen Nukliden eignet und mit denen sich Radiotracer mit den gesuchten Eigenschaften erhalten lassen, sind Peptide. Peptide haben meist eine kurze biologische Halbwertszeit, weisen oft eine ausreichend hohe Stabilität *in vivo* auf und können (abhängig von dem gewählten Peptid) schnell und spezifisch an das Zielgewebe binden. Jedoch gibt es, je nach Peptid, auch Nachteile. Beispielsweise reichern sich manche Peptide nicht schnell genug im Tumorgewebe an, werden zu schnell ausgeschieden, haben keine ausreichend hohe Retention im Tumorgewebe oder einen zu geringen Tumor-zu-Hintergrund-Kontrast.

Um diese Probleme zu lösen, können Peptide (= Rezeptorliganden) multimerisiert werden. Bei einer Multimerisierung werden mehrere identische oder verschiedene Rezeptorliganden an ein Grundgerüst konjugiert (siehe Abbildung 5).

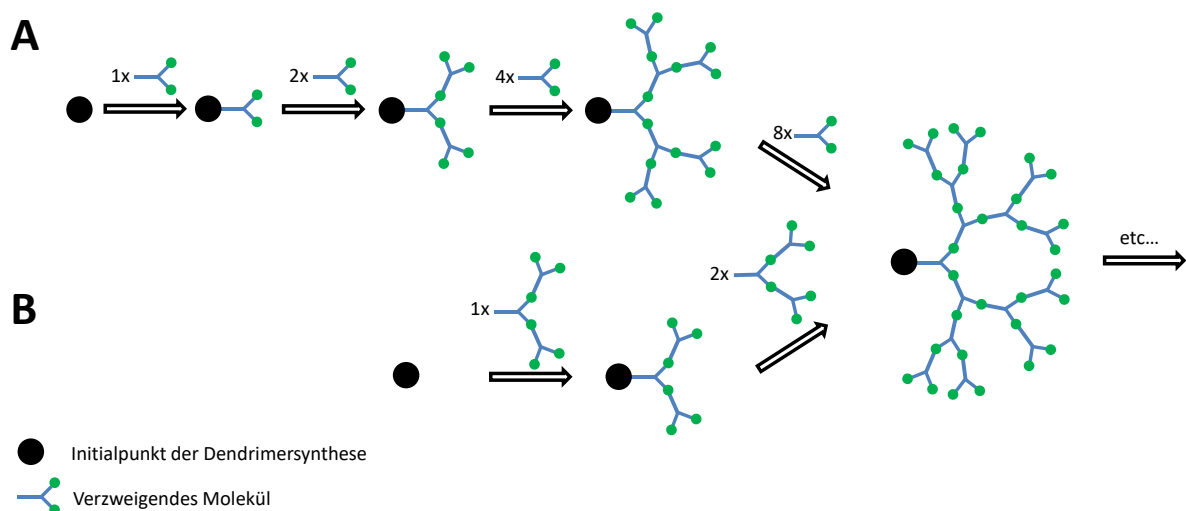


**Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Radiotracers mit acht Rezeptorliganden. Der Radiotracer bindet gleichzeitig an zwei Rezeptoren der Tumorzelloberfläche, was zu einer höheren Verweildauer des Radiotracers am Ort der Anreicherung führt.**

Für die Multimerisierung von Peptiden eignen sich sogenannte Dendrone, die ausgehend von einem Initialpunkt eine verzweigte Struktur besitzen und an deren Oberfläche Moleküle konjugiert werden können.

## 1.5 Dendrone – Träger von Arzneistoffen

Dendrone sind Moleküle, die aufgrund ihrer verzweigten Struktur an ihrer Oberfläche eine große Zahl von Funktionalitäten besitzen. Durch Konjugation von Molekülen an die Oberfläche der Dendron-Gerüste lässt sich eine große Anzahl von Molekülen durch den Blutkreislauf und durch Stoffwechselprozesse *in vivo* transportieren. Dies macht Dendrone zu idealen Trägern von pharmakokinetisch aktiven Substanzen, weshalb diese bereits Forschungsgrundlage vieler Studien über mehrere Jahrzehnte waren [33-34]. Dendrone, die eine symmetrische und homogene Struktur besitzen, bestehen aus gleichen, sich immer wieder wiederholenden Synthesebausteinen und können entweder divergent oder konvergent aufgebaut sein (Abbildung 6).

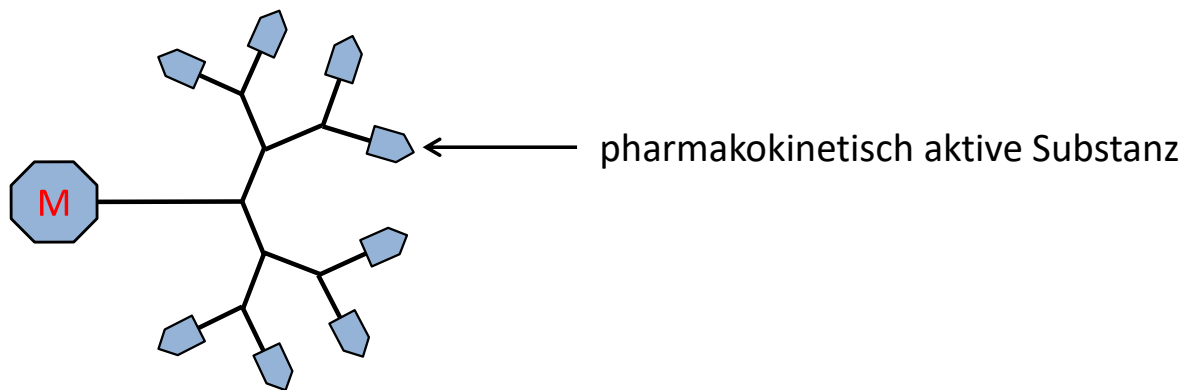


**Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Dendronsynthese. Ausgehend von einem Startpunkt (beispielsweise einem monomeren Startmolekül) wird das Dendron aufgebaut. Dabei wird zwischen (A) einer divergenten Synthese und (B) einer konvergenten Synthese unterschieden.**

Bei einer divergenten Synthese wird das Dendron nach jedem Syntheseschritt, bei dem ein verzweigendes Molekül in das Dendrongerüst eingeführt wird, um jeweils eine Generation größer. Im Vergleich dazu wird bei einer konvergenten Synthese ein bereits aus mehreren verzweigenden Molekülen bestehender Synthesebaustein für die Synthese des Dendrons verwendet, wodurch das Dendron nach jedem Syntheseschritt um mehr als eine Generation größer wird. Die Vorteile der konvergenten Synthese sind die kürzere Herstellungszeit und die leichtere Reinigung (beispielsweise über chromatographische Methoden) stark verzweigter Dendrone, da sich die Nebenprodukte mit ein- oder mehreren nicht reagierten Synthesebausteinen chemisch stark vom Produkt unterscheiden. Die divergente Synthese

dagegen hat den Vorteil, dass während der vielen Syntheseschritte bis zum fertigen Dendron, durch Einbau verschiedener Bausteine, leicht Einfluss auf die Struktur und dadurch auch auf die Eigenschaften des Dendrons genommen werden kann.

Dendrone lassen sich in der *in vivo*-Bildgebung einsetzen, wenn in deren Struktur sowohl pharmakokinetisch aktive Substanzen als auch Marker eingeführt werden (siehe Abbildung 7).



**M** = Marker

**Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Oktamers mit einem Marker, der an initialer Position am Dendron fixiert ist und acht pharmakokinetisch aktiver Substanzen, die auf der Oberfläche des Dendrons immobilisiert sind.**

Marker sind beispielsweise Radionuklide für die SPECT oder PET, Nuklide mit besonders paramagnetischen Eigenschaften für die MRT oder Farbstoffe für die NIR-Bildgebung. In der Vergangenheit wurden radiomarkierte Multimere mit pharmakokinetisch aktiven Substanzen bereits für die Diagnose verschiedener Tumorarten *in vitro* <sup>[35]</sup>, *in vivo* in Versuchstieren <sup>[36-42]</sup> und in klinischen Studien mit Patienten <sup>[43]</sup> eingesetzt.

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines neuen Radiotracers, der sich für die PET-Diagnostik von Prostatakarzinomen eignet. Als Tracer wurde das Peptid Bombesin<sub>(7-14)</sub> (BBN<sub>(7-14)</sub>) gewählt, das bereits in zahlreichen Studien gezeigt hat, dass es spezifisch an *Gastrin Releasing Peptide* (GRP)-Rezeptoren bindet, die wiederum von einem großen Teil der Prostatakarzinomzellen überexprimiert werden<sup>[44]</sup>. Um ein BBN<sub>(7-14)</sub>-Analog zu erhalten, das bessere Bildgebungseigenschaften besitzt als zuvor entwickelte BBN<sub>(7-14)</sub>-Analoge, sollte das BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptid in dieser Arbeit multimerisiert werden. Eine solche Multimerisierung wurde bereits in der Vergangenheit am Beispiel von verschiedenen Peptiden, wie  $\alpha_v\beta_3$  Integrin-affinem cRGD<sup>[35]</sup> und Bombesin-Analoga<sup>[36]</sup>, durchgeführt und es hat sich gezeigt, dass durch die Multimerisierung eine verbesserte Bildgebung ermöglicht werden kann.

Um eine Multimerisierung durchzuführen, sind verzweigte Moleküle, die als Grundgerüst dienen, notwendig. Dafür eignen sich beispielsweise PAMAM-Dendrone. Weil diese Dendrone jedoch aufwändig in ihrer Herstellung sind und es Tage bis Wochen dauern kann bis eine PAMAM-Dendronsynthese abgeschlossen ist, war eine zusätzliche Aufgabe dieser Dissertationsarbeit die Herstellung von Dendronen, die schnell synthetisiert werden können, die die Möglichkeit bieten verschiedene Moleküle in die Dendronstruktur einzuführen, die bis zu 16 derivatisierbare Funktionalitäten aufweisen und die durch das Einbringen verschiedener Oligoethylenglycol (OEG)-Linker eine hohe Variabilität dieser Strukturen ermöglichen. Es sollte gezeigt werden, dass sich diese Dendrone für die Herstellung von Peptid-Multimeren eignen.

Die Struktur der Ziel-BBN<sub>(7-14)</sub>-Derivate sollte sich an den Ergebnissen einer, während des Beginns dieser Dissertationsarbeit durchgeführten Studie<sup>[36]</sup> (untersucht wurde der Einfluss der Multiplizität der BBN<sub>(7-14)</sub>-Derivate und der Einfluss der Bindungsabstände zwischen den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden im Multimer auf das Anreicherungsverhalten *in vitro* und *in vivo*), orientieren. Da in dieser Studie gezeigt wurde, dass BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere im Vergleich zu BBN<sub>(7-14)</sub>-Monomeren und anderen BBN<sub>(7-14)</sub>-Multimeren die besten Bindungseigenschaften zu den GRP-Rezeptoren von PC<sub>3</sub>-Zellen (Prostata-Adenokarzinomzelllinie) aufweisen und der Peptid-Abstand einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung hat, sollten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere mit unterschiedlich großem Peptid-Abstand hergestellt werden. Durch Einführung eines Chelators in die Dendronstruktur, sollten die dimeren BBN<sub>(7-14)</sub>-Derivate sich zudem mit dem PET-Nuklid <sup>68</sup>Ga radiomarkieren lassen. Unter den hergestellten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimeren, sollte mittels Durchführung von *in vitro*-Experimenten mit GRP-Rezeptor exprimierenden



PC<sub>3</sub>-Tumorzellen das Dimer ermittelt werden, das aufgrund seines optimalen Abstandes zwischen beiden Peptiden die besten Bindungseigenschaften zu den GRP-Rezeptoren aufweist. Zudem sollte das Dimer, das *in vitro* die besten Bindungseigenschaften besaß, in anschließenden Experimenten an PC<sub>3</sub>-tumortragenden Nacktmäusen hinsichtlich seiner *in vivo*-Eigenschaften untersucht werden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Themenbereiche: Die Synthese von Dendronen auf einem Harz unter optimierten Synthesebedingungen (Kapitel 3.1) und die Herstellung und Testung neuer dimerer BBN<sub>(7-14)</sub>-basierter <sup>68</sup>Ga-Tracer, konzipiert für die Diagnose von Prostatakarzinomen (Kapitel 3.2).

### 3.1 Herstellung Festphasendendrone

Die Herstellung der modularen Festphasendendrone wurde bereits im *open access* Online-Fachjournal *Molecules* beschrieben und veröffentlicht <sup>[45]</sup>.

#### 3.1.1 Einleitung

Um eine Multimerisierung durchzuführen, werden molekulare Grundgerüste benötigt. Dafür eignen sich beispielsweise Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrone, die jedoch (wenn sie in einer flüssigen Phase hergestellt werden) aufwendig in ihrer Herstellung sind. Unter anderem haben Wängler et al. eine Arbeit publiziert, in der die Synthese solcher PAMAM-Dendrone beschrieben ist: Diese PAMAM-Dendrone besitzen, neben einer hoch symmetrischen und homogenen Struktur, bis zu 16 endständige Maleinimid-Funktionen auf der Oberfläche, ein OEG-Linker zwischen dem Initialpunkt und der verzweigten Struktur des Dendrons und es besteht die Möglichkeit einen Chelator einzuführen <sup>[35]</sup>. Es existieren aber auch Dendrone, die einfacher herzustellen sind, wie beispielsweise die Festphasendendrone <sup>[46]</sup>. Dendrone die auf einer festen Phase hergestellt werden können sind beispielsweise PAMAM-Dendrone <sup>[47-49]</sup>, Polylysin-Dendrone <sup>[50-52]</sup>, Polyaminosäure-Dendrone <sup>[53-58]</sup>, aromatische Polyether <sup>[59-62]</sup> und auf Polyharnstoff basierende Dendrone <sup>[63-65]</sup>. Ein Großteil dieser Dendrone wird mit Synthesebausteinen hergestellt, die die finale Struktur des Dendrons festlegen und eine variable, den Anforderungen angepasste Synthese nicht zulassen. Nur eine kleine Anzahl der auf fester Phase synthetisierten Dendrone lässt sich flexibel verändern und den gewünschten Bedingungen anpassen, was durch Einführung verschiedener Linker bewerkstelligt werden kann <sup>[50, 66]</sup>. Eine variable Synthese von Dendronen ist von Vorteil, wenn diese als Träger von pharmakokinetisch aktiven Substanzen dienen und ein bestimmter Abstand zwischen den Substanzen erreicht werden soll. Dass der Abstand zweier pharmakokinetisch aktiver Substanzen im Multimer einen deutlichen Einfluss auf die Bindungsavidität zu den Oberflächenrezeptoren einer Tumorzelle hat, wurde bereits am Beispiel von PESIN-Peptiden, die an GRP-Rezeptoren binden, gezeigt <sup>[36]</sup>. Solche dendritischen Strukturen, die ein symmetrisches Grundgerüst, eine homogene Struktur und dabei ein für den Bedarf

anpassbares molekulares Design besitzen, sind ideale Ausgangsverbindungen für Peptid-Multimere.

Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften von Festphasendendronen wurde ein neues Konzept entwickelt, mit dem sich Festphasendendrone schnell, einfach und flexibel herstellen lassen, die sich an der Struktur von bereits erfolgreich eingesetzten PAMAM-Dendronen <sup>[35-36]</sup> orientieren und die sich für die Herstellung von multimeren Radiotracern für die PET-Bildgebung eignen. Damit dieses Konzept umgesetzt werden konnte, wurden die Dendrone nach bestimmten Kriterien hergestellt. Diese Kriterien sollten folgende Punkte erfüllen:

- i. Eine auf Säureamiden basierende Struktur, da diese *in vivo* eine hohe Stabilität und eine niedrige Immunogenität aufweisen und mittels Standard-Fmoc-Peptidsynthese hergestellt werden können (wodurch effiziente Synthesen und eine einfache Reinigung ermöglicht wird);
- ii. eine hohe Flexibilität im Aufbau der molekularen Strukturen, welche wichtig für den Aufbau von Peptid-Dendronen ist und die Verwendung strukturell unterschiedlicher Synthesebausteine ermöglicht;
- iii. die Möglichkeit OEG-Linker zu verwenden, da sich mit Hilfe dieser Strukturen die Abstände zwischen den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Dendrons beeinflussen lassen, sie die Hydrophilie der dendritischen Strukturen erhöhen und diese sich positiv auf die Blutverweildauer und Tumor-Verweilzeiten auswirken <sup>[67]</sup>;
- iv. die Möglichkeit eine funktionelle Gruppe (für die Konjugation pharmakokinetisch aktiver Substanzen) oder ein Chelator am Initialpunkt des Dendrons einzuführen und;
- v. eine effiziente Herstellung der gewünschten Produkte (monovalente/multivalente Maleinimide bis zur Größe von Hexadezimeren, einsetzbar für die Multimerisierung pharmakokinetisch aktiver Substanzen) in hoher Homogenität.

Die endständigen funktionellen Gruppen der Dendrone sollten zudem mit Maleinimiden funktionalisierbar sein, da es sich bei der Michaeladdition zwischen Thiolen und Maleinimiden um eine „Klick“-Reaktion handelt und diese Reaktionen im Vergleich zu anderen Reaktionen entscheidende Vorteile bieten. Die „Klick“-Reaktionen zeichnen sich unter anderem aus durch: ihre chemoselektive Reaktion, leichte Durchführbarkeit (unter milden Reaktionsbedingungen), vielseitige Anwendbarkeit, hohen Ausbeuten, leicht abtrennbaren Nebenprodukte, leicht zu erhaltenden Edukte, wenig gefährlichen oder leicht abtrennbaren Lösungsmittel und ihre gute Skalierbarkeit <sup>[68]</sup>, was sich positiv auf die Reinigung und die Ausbeuten der Dendrone auswirkt. Zudem hat sich die Michaeladdition

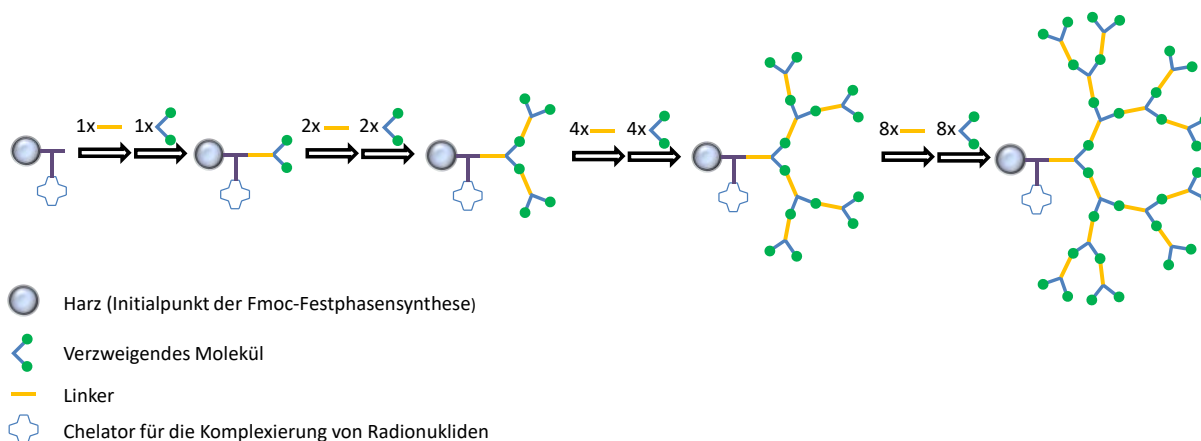
von Maleinimiden und Thiolen als die bessere Variante bei der Konjugation und damit der Multimerisierung von pharmakokinetisch aktiven Substanzen an Dendrone im Vergleich zu anderen chemoselektiven „Klick“-Reaktionen (wie der Oximformationsreaktion zwischen Aminoxy-Verbindungen und Aldehyden oder der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden) erwiesen <sup>[35]</sup>.

Das in diesem Kapitel erläuterte neue Synthesekonzept wurde in dieser Arbeit für die Herstellung verschiedener Maleinimid-derivatisierter Dendron-Gerüste, bis hin zum vollständig konjugierten und für die PET-Bildgebung geeigneten radiomarkierbaren Multimer, angewendet.

Im nächsten Abschnitt wird die Herstellung der Dendrone auf fester Phase diskutiert, wobei neben dem neuen Synthesekonzept auch die Optimierung der Synthese (durch Anpassung der Synthesenzeiten sowie eingesetzten Menge an Edukten, die Ermittlung der optimalsten Dendronstruktur oder Testung verschiedener Herstellungswege) ein Schwerpunkt darstellt.

### 3.1.2 Herstellung modularer Festphasendendrone

In Abbildung 8 ist schematisch die Herstellung eines Dendrons auf einer festen Phase zu sehen, welche die grundlegende Vorgehensweise bei der Durchführung der Dendronsynthese auf fester Phase zeigt, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Für die Synthese wurde eine divergente Synthesestrategie gewählt, da durch die größere Anzahl von Reaktionsschritten im Vergleich zur konvergenten Synthesestrategie und der Möglichkeit nach jedem Reaktionsschritt Synthesebausteine in das Dendrongerüst einzubauen sehr leicht Einfluss auf die Struktur und den Abstand zwischen zwei Funktionalitäten an der Oberfläche des Dendrons genommen werden kann.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung einer Synthese eines Dendrons auf fester Phase. Nach jedem Syntheseschritt mit einem verzweigenden Molekül lassen sich Linker einführen und ermöglichen eine

Synthese von „maßgeschneiderten“ Dendron-Gerüsten mit definierten Abständen zwischen den endständigen funktionellen Gruppen. Ein Radionuklid kann mittels eines Chelators in das Dendrongerüst eingeführt werden.

Die Synthese des Dendrons auf einer festen Phase lässt sich in folgende Schritte einteilen:

- i. Die Konjugation der ersten Aminosäure, über die eine funktionelle Gruppe nahe am Initialpunkt des Dendrons eingeführt wird. Über die funktionelle Gruppe lässt sich im weiteren Verlauf der Synthese ein Chelator oder ein anderer Synthesebaustein einbringen (wobei sich der Synthesebaustein von den in Punkt iii erwähnten pharmakokinetisch aktiven Substanzen unterscheiden kann);
- ii. die Einführung verzweigender Moleküle oder Linker nach jedem einzelnen Syntheseschritt;
- iii. die Derivatisierung der Aminogruppen auf der Oberfläche des Dendrons mit Maleinimiden, um anschließend eine effiziente Konjugation von pharmakokinetisch aktiven Substanzen zu ermöglichen;
- iv. die Abspaltung des Dendrons von der festen Phase in einem sauren Milieu;
- v. die Analyse und/oder Reinigung des Rohmaterials mittels HPLC.

In Abbildung 9 ist der generelle Aufbau der Dendrone, die mit dem neuen Synthesekonzept hergestellt werden können, gezeigt.

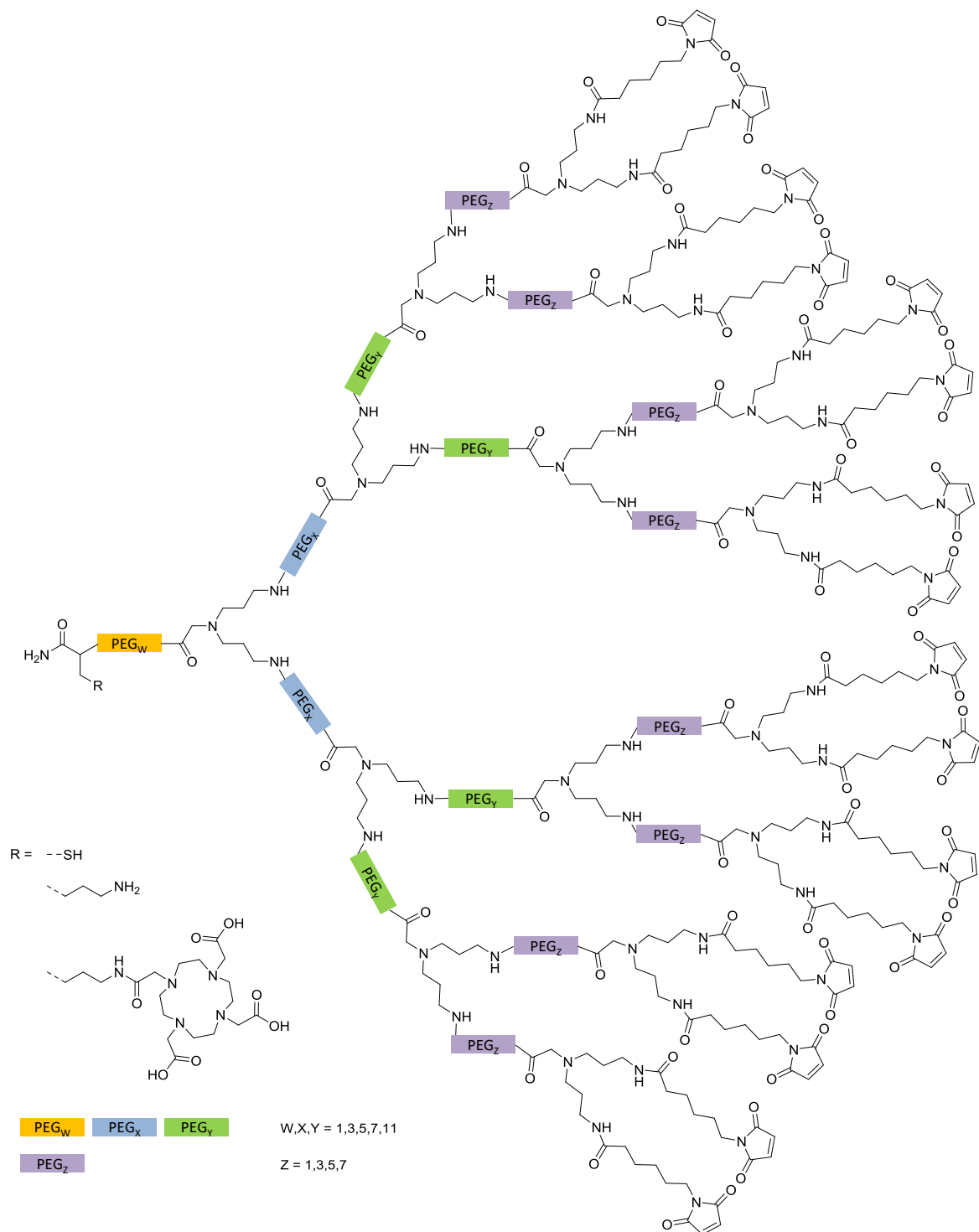
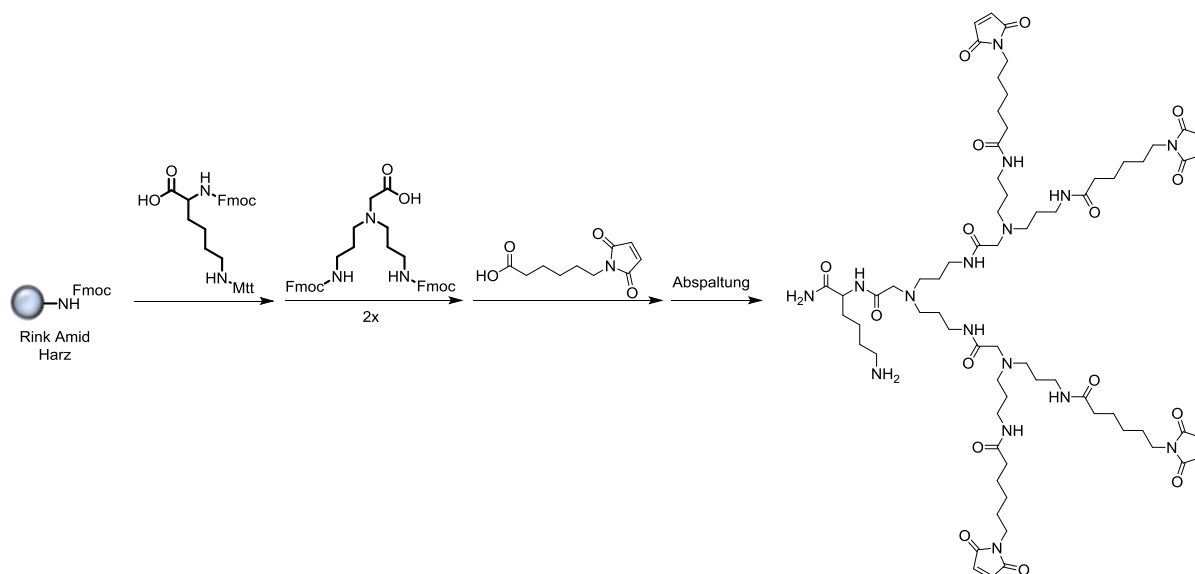


Abbildung 9: Schematische Darstellung des generellen Aufbaus eines auf fester Phase synthetisierten Dendrons. Das Dendron enthält endständige Maleinimid-Funktionen (über die sich Thiol-tragende Synthesebausteine einführen lassen), symmetrische verzweigende Moleküle (um Dendrone mit nur einem Stereozentrum zu erhalten), OEG-Linker in unterschiedlicher Länge (über die die Abstände der Dendron-Verzweigungen und der Maleinimide untereinander variiert werden können) und eine Aminosäure am Initialpunkt des Dendrons (die es erlaubt Moleküle oder Chelatoren über eine funktionelle Gruppe einzuführen).

In Abbildung 9 ist leicht zu erkennen, wie mit Hilfe der OEG-Linker Einfluss auf die Struktur der Dendrone genommen werden kann. Jedoch hat die Einführung von OEG-Linkern in das Dendrongerüst auch einen Einfluss auf die Reinheit, und damit auf die Ausbeuten, die nach der Reinigung der Rohprodukte erhalten werden können. Deshalb ist es wichtig diesen Einfluss der OEG-Linker auf die Reinheit der Dendrone zu untersuchen und zu zeigen, dass effiziente Synthesen von Dendronen, die diese OEG-Linker enthalten, auf fester Phase möglich sind.

### 3.1.3 Einfluss der OEG-Linker auf die Reinheit der Dendrone

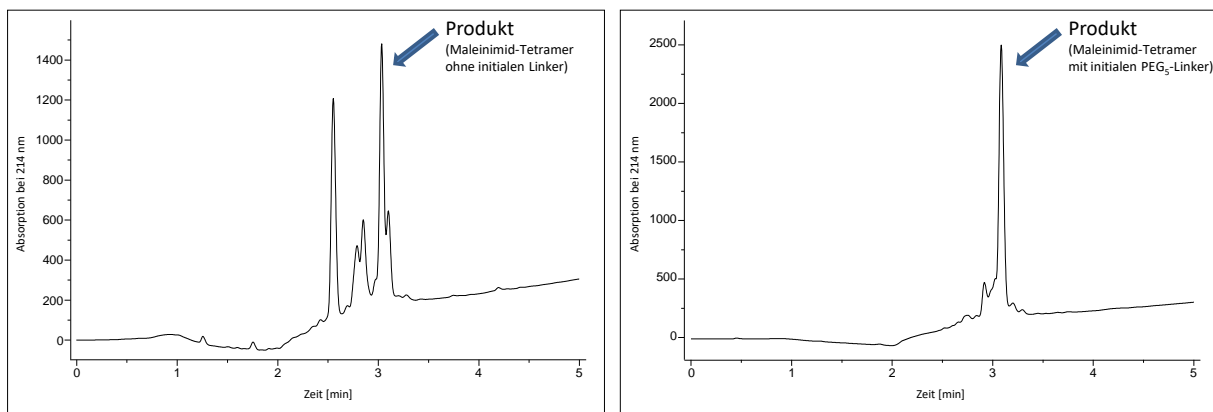
In den ersten Syntheseversuchen des praktischen Teils der Dissertationsarbeit wurde zunächst ein Lysin als erste Aminosäure in das Dendrongerüst eingeführt. Dies war der erste Versuch Dendrone zu erhalten, die sich als Gerüst für die Multimerisierung von beliebigen Thiol-tragenden Molekülen verwenden lassen und in deren Grundgerüst sich gleichzeitig ein weiteres beliebiges Molekül oder ein Chelator für die Komplexierung von Radionukliden einführen lässt. Auf das Lysin wurden anschließend verzweigende Moleküle für den Aufbau des Dendron-Gerüsts konjugiert. Zunächst wurde für die ersten Syntheseversuche als feste Phase ein Standard-Rink-Amid-Harz mit einer Beladungsdichte von 0.74–0.79 mmol/g verwendet und die Reaktionen wurden nach der Standard-Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (mit vierfachen Reaktantüberschüssen für jede zu derivatisierende Amino-Funktion) durchgeführt. Als verzweigendes Molekül wurde *N,N*-bis(*N'*-Fmoc-3-aminopropyl)-Glyzin-Kalium-Hemisulfat (APG) verwendet, weil die Verwendung dieser Aminosäure, im Gegensatz zu der Verwendung der verzweigenden Aminosäure Lysin, symmetrische Dendron-Gerüste ohne mehrfache Stereozentren erzeugt (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Dargestellt ist das Reaktionsschema einer Synthese eines ohne OEG-Linker hergestellten Dendrons am Beispiel eines Maleinimid-Tetramers.**

Die mit der in Abbildung 10 gezeigten Synthesestrategie hergestellten Dimere und Tetramere wurden, nach der Abspaltung des Rohmaterials vom Harz, nur mit niedriger Reinheit erhalten (Abbildung 11, links). Die ineffiziente Synthese dieser Gerüste ist auf die relativ voluminösen Strukturen des Dendrons und auf die geringen Abstände zwischen den einzelnen Verzweigungen untereinander sowie den Abständen zwischen den Verzweigungen und dem Harz zurückzuführen. Die im weiteren Verlauf durchgeführten Dendron-Synthesen wurden ebenfalls unter den Bedingungen einer Fmoc-Peptidsynthese hergestellt, jedoch wurde ein Harz mit einer geringeren Belegungsichte von 0.21–0.23 mmol/g für die Synthese gewählt. Zusätzlich wurde ein OEG-Linker zwischen dem Lysin oder Cystein und dem Initialpunkt des Dendrons eingeführt. Durch diese Maßnahmen ergaben sich für Maleinimid-Tetramere deutlich verbesserte Produkt-Reinheiten von 83 % im Vergleich zu 31 % (Abbildung 11).

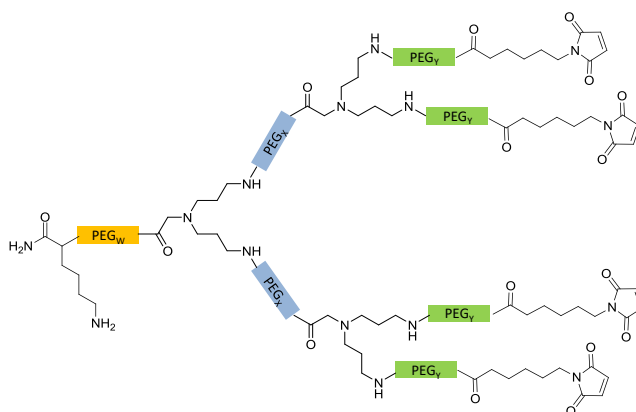




**Abbildung 11: HPLC-Chromatogramme der Rohprodukte eines auf einem Standard-Rink-Amid-Harz hergestellten Maleinimid-Tetramers ohne initialen OEG-Linker (links) und eines Maleinimid-Tetramers, welches auf einem Harz mit niedriger Beladungsdichte hergestellt und in dessen Gerüst ein initialer PEG<sub>5</sub>-Linker (rechts) eingeführt wurde.**

Hohe Reinheiten der vom Harz abgespaltenen Rohmaterialien sind eine Voraussetzung für die Synthese eines homogenen Produktes und einer hohen isolierbaren Syntheseausbeute und wurden im weiteren Verlauf dieses Kapitels als Maß für die Effizienz der Synthese herangezogen. In den nachfolgenden Dendron-Synthesen wurden OEG-Linker verschiedener Längen (PEG<sub>1</sub>, PEG<sub>3</sub>, PEG<sub>5</sub>, PEG<sub>7</sub>, PEG<sub>11</sub>; die OEG-Linker werden als „PEG“ beschrieben, da dies die gebräuchlichen Handelsnamen der beschriebenen OEGs sind) systematisch zwischen der initialen Aminosäure und dem Initialpunkt des Dendrons (PEG<sub>w</sub>-Linker, Abbildung 12 und Abbildung 13) in tetramere und oktamere Maleinimid-Dendrone eingeführt. Die Einführung eines OEG-Linkers in initialer Position hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Reinheiten der nach der Synthese vom Harz abgespaltenen Maleinimid-Tetramere, solange er die Länge eines PEG<sub>1</sub>-Linkers übertraf (Substanz **1–5**, Abbildung 12). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen, wurden im Falle des Maleinimid-Oktamers die höchsten Reinheiten erhalten, wenn ein PEG<sub>11</sub> an der Position des PEG<sub>w</sub>-Linkers (**11–15**, Abbildung 13) für die Synthese verwendet wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es bei Dendron-Gerüsten, die größer sind als das Maleinimid-Tetramer, wichtig ist, initial einen langen Linker in die Struktur einzuführen. Diese Beobachtung ist auf die Größe des Dendrons und damit auf dessen sterische Raumforderung zurückzuführen. Für eine effiziente Synthese ist somit ein bestimmter Abstand zwischen den voluminösen Verzweigungen des Dendrons und dem Harz erforderlich, der durch das Einbringen von OEG-Linkern zwischen der initialen Aminosäure und dem Harz erreicht wird.

Maleimid Tetramere				
Substanz	PEG <sub>w</sub>	PEG <sub>x</sub>	PEG <sub>y</sub>	Reinheit
1	1	-	-	72%
2	3	-	-	85%
3	5	-	-	83%
4	7	-	-	83%
5	11	-	-	82%
6	1	1	1	42%
7	3	3	3	58%
8	5	5	5	61%
9	7	7	7	37%
10	11	11	11	24%



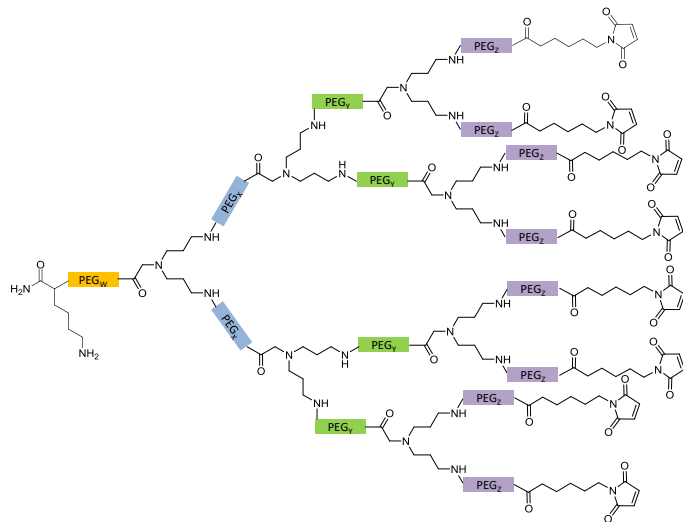
**A**

**B**

**Abbildung 12: Mittels analytischer HPLC ermittelte Reinheiten der vom Harz abgespaltenen Maleinimid-Tetramere (A) und die schematische Darstellung der Strukturen der Substanzen 1–10 (B).**

Um zu ermitteln, ob die Effizienz der Synthese durch die Einführung weiterer OEG-Linker in anderen Positionen des Dendrons (PEG<sub>x</sub>-, PEG<sub>y</sub>- und PEG<sub>z</sub>-Linker, Abbildung 13) weiter verbessert werden kann, wurden neben dem initialen OEG-Linker (PEG<sub>w</sub>-Linker) zusätzliche OEG-Linker unterschiedlicher Länge nach jedem verzweigenden Molekül in das Dendron-Gerüst eingeführt. Dabei hat sich herausgestellt, dass durch zusätzliches Einbringen von Linkern (PEG<sub>x</sub> und PEG<sub>y</sub>, Substanz **6–10**) in das Gerüst der Maleinimid-Tetramere keine reineren Rohprodukte erzielt werden konnten, jedoch wurden im Gegensatz dazu bei den Maleinimid-Oktameren durch das Einbringen von zusätzlichen OEG-Linkern (PEG<sub>x</sub>, PEG<sub>y</sub> und PEG<sub>z</sub>) deutlich höhere Reinheiten beim Rohprodukt erreicht (Substanz **16–27**). Es hat sich somit gezeigt, dass der positive Einfluss der OEG-Linker auf das Dendron-Gerüst abhängig von der Länge der Linker ist, die in das Dendron-Gerüst eingeführt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Linker nach jedem verzweigenden Molekül die Reinheiten des Rohprodukts steigern konnten (wie der Vergleich zwischen den Reinheiten der Rohprodukte von Substanz **11** und **16** (Abbildung 14), **12** und **17**, **13** und **18** sowie **14** und **19** zeigt) und durch das Einbringen von PEG<sub>1</sub>-Linkern an jeder Position (PEG<sub>w</sub>, PEG<sub>x</sub>, PEG<sub>y</sub> und PEG<sub>z</sub>) des Dendrons konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Bei Verwendung und Einbringung von längeren PEG-Linkern in das Dendron-Gerüst (wie der Vergleich zwischen den Reinheiten der Rohprodukte von Substanz **16**, **17**, **18** und **19** zeigt) wurden dagegen keine besseren Ergebnisse erzielt, sondern es hat sich gezeigt, dass sich diese längeren Linker sogar negativ auf die Reinheiten auswirken.

Maleimid Oktamer					
Substanz	PEG <sub>w</sub>	PEG <sub>x</sub>	PEG <sub>y</sub>	PEG <sub>z</sub>	Reinheit
11	1	-	-	-	25%
12	3	-	-	-	29%
13	5	-	-	-	34%
14	7	-	-	-	28%
15	11	-	-	-	56%
16	1	1	1	1	58%
17	3	3	3	3	57%
18	5	5	5	5	47%
19	7	7	7	7	38%
20	3	3	3	-	53%
21	3	3	-	-	44%
22	11	3	3	3	49%
23	11	3	3	-	56%
24	11	3	1	-	65%
25	5	3	1	-	58%
26	11	1	1	1	61%
27	11	1	1	-	71%



**A**

**B**

Abbildung 13: Mit analytischer HPLC ermittelte Reinheiten der vom Harz abgespaltenen Maleinimid-Oktamere (A) und die schematische Darstellung der Strukturen der Substanzen 11–27 (B).

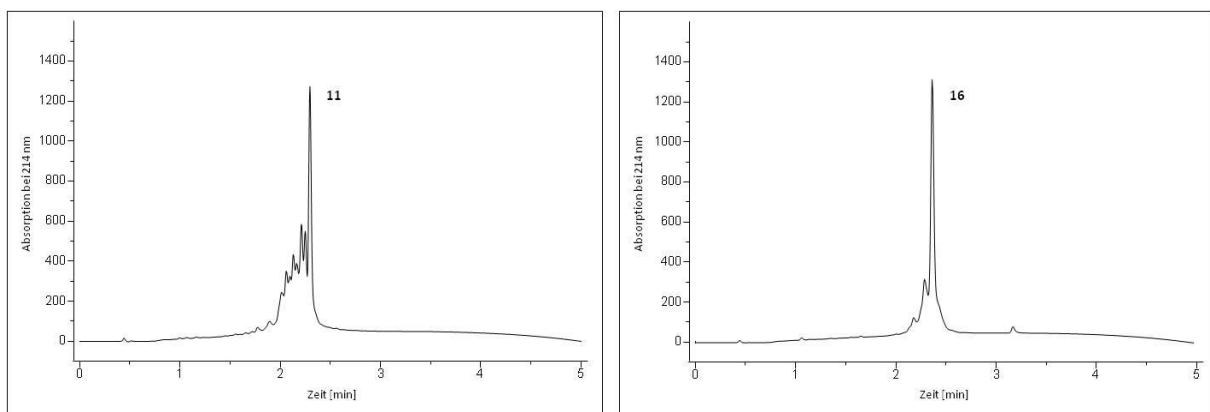
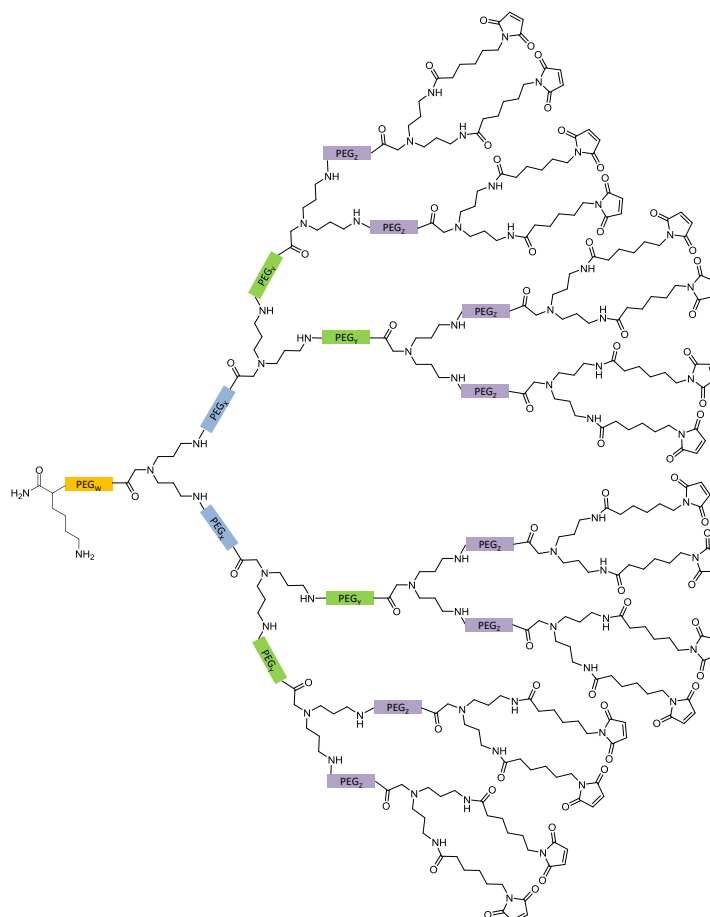


Abbildung 14: HPLC-Chromatogramme der Rohmaterialien von Maleinimid-Oktameren mit einem initialen PEG<sub>1</sub> (Substanz 11, linkes Chromatogramm) oder PEG<sub>1</sub>-Linkern in jeder möglichen Position des Dendrons (Substanz 16, rechts).

Der negative Effekt in der Syntheseausbeute bei Verwendung von längeren Linkern in allen Positionen im Dendron-Gerüst könnte auf die deutlich höhere Flexibilität der einzelnen Verzweigungen des Dendrons zurückzuführen sein. Wenn lange OEG-Linker in allen Positionen des Dendron-Gerüsts eingesetzt werden, kann die sterische Hinderung der Nachfolgereaktionen zwar reduziert werden, aber es kommt auch zu entropischen Effekten (wie der „Verknäulung“ einzelner Verzweigungen im Dendron), die eine effiziente Konjugation von Synthesebausteinen verhindern und dadurch die positiven Effekte, die sich bei einer Einführung langer Linker ergeben, wieder neutralisieren.

Die höchste Syntheseeffizienz bei der Herstellung der Maleinimid-Oktamere wurde beobachtet, wenn PEG<sub>11</sub>-Linker zwischen der ersten Aminosäure und dem Initialpunkt (PEG<sub>w</sub>) des Dendrons sowie zusätzlich PEG<sub>1</sub>-Linker nach den ersten zwei verzweigenden Molekülen (PEG<sub>x</sub> und PEG<sub>y</sub>) eingeführt wurden. Die Einführung von OEG-Linkern vor der finalen Konjugation der Maleinimide an die endständigen Amino-Gruppen der Dendrone (PEG<sub>z</sub>) konnte keine Verbesserungen erzielen, sondern führte sogar zu schlechteren Ergebnissen in den ermittelten Reinheiten (wie der Vergleich der erhaltenen Reinheiten von Substanz **22** und **23**, sowie **26** und **27** zeigt). Die ermittelten Ergebnisse zeigen, dass nicht nur durch die sterische Hinderung zwischen dem Dendron-Gerüst und dem Harz die Konjugation von Synthesebausteinen gehemmt wird, sondern auch durch das dendritische Gerüst selbst, sobald eine bestimmte Größe überschritten ist. Ausgehend von diesen neuen Erkenntnissen wurden Maleinimid-Hexadezimere hergestellt. Die Hexadezimere konnten mit einer Reinheit von bis zu 38 % erhalten werden (Abbildung 15). Obwohl die Reinheiten der Maleinimid-Hexadezimere zunächst niedrig erscheinen, können sie mit denen der von PAMAM-Dendronen (die in flüssiger Phase hergestellt wurden) unter Berücksichtigung folgender Gegebenheiten verglichen werden: Bei einer mehrstufigen Reaktion von PAMAM-Dendronen in flüssiger Phase wird eine nicht unerhebliche Menge von Nebenprodukten nach jedem Syntheseschritt erzeugt, die jedoch wieder entfernt werden. Im Falle des auf fester Phase hergestellten Dendrons verbleiben die Nebenprodukte nach jedem Syntheseschritt auf dem Harz, wobei die nicht reagierten Reagenzien wieder entfernt werden. Dadurch ist der Reinigungsaufwand der fertigen und auf fester Phase hergestellten Dendrone im Vergleich zu dem in flüssiger Phase hergestellten Äquivalent deutlich geringer, wenn auch im Vergleich etwas aufwendiger, was aber keinen Einfluss auf die Reinheit der Endprodukte hat.

Maleimid Hexadezimer					
Substanz	PEG <sub>w</sub>	PEG <sub>x</sub>	PEG <sub>y</sub>	PEG <sub>z</sub>	Reinheit
28	11	1	1	1	34%
29	11	3	1	1	33%
30	11	3	3	1	38%
31	11	3	3	3	37%
32	11	5	3	1	29%



**A**

**B**

Abbildung 15: Mit analytischer HPLC ermittelte Reinheiten der vom Harz abgespaltenen Maleinimid-Hexadezimere (A) und die schematische Darstellung der Strukturen der Substanzen 28–32 (B).

### 3.1.4 Optimierung weiterer Reaktionsparameter der Synthese von Dendronen auf fester Phase

Neben der konsequenten Optimierung des molekularen Aufbaus des Dendrons zur Verbesserung der Syntheseeffizienz und damit der Reinheiten der fertigen Produkte, wurden noch weitere Syntheseparameter untersucht, die ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Synthese der Dendron-Gerüste haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Konjugationszeiten einzelner Syntheseschritte bei zunehmender Raumforderung eines Dendrons eine Rolle spielen und im Vergleich zu den Konjugationszeiten in einer Standard-Fmoc-Peptidsynthese für lineare Peptide deutlich länger sein müssen, um die Reinheiten der Festphasen-Dendrone zu verbessern. Für lineare Synthesebausteine, wie im Falle der OEG-Linker und der Maleimidohexansäure, konnten optimale Ergebnisse erzielt werden, wenn die Reaktionszeiten von 30 auf 45 Minuten und von 60 auf 120 Minuten verlängert wurden, je nachdem welchen

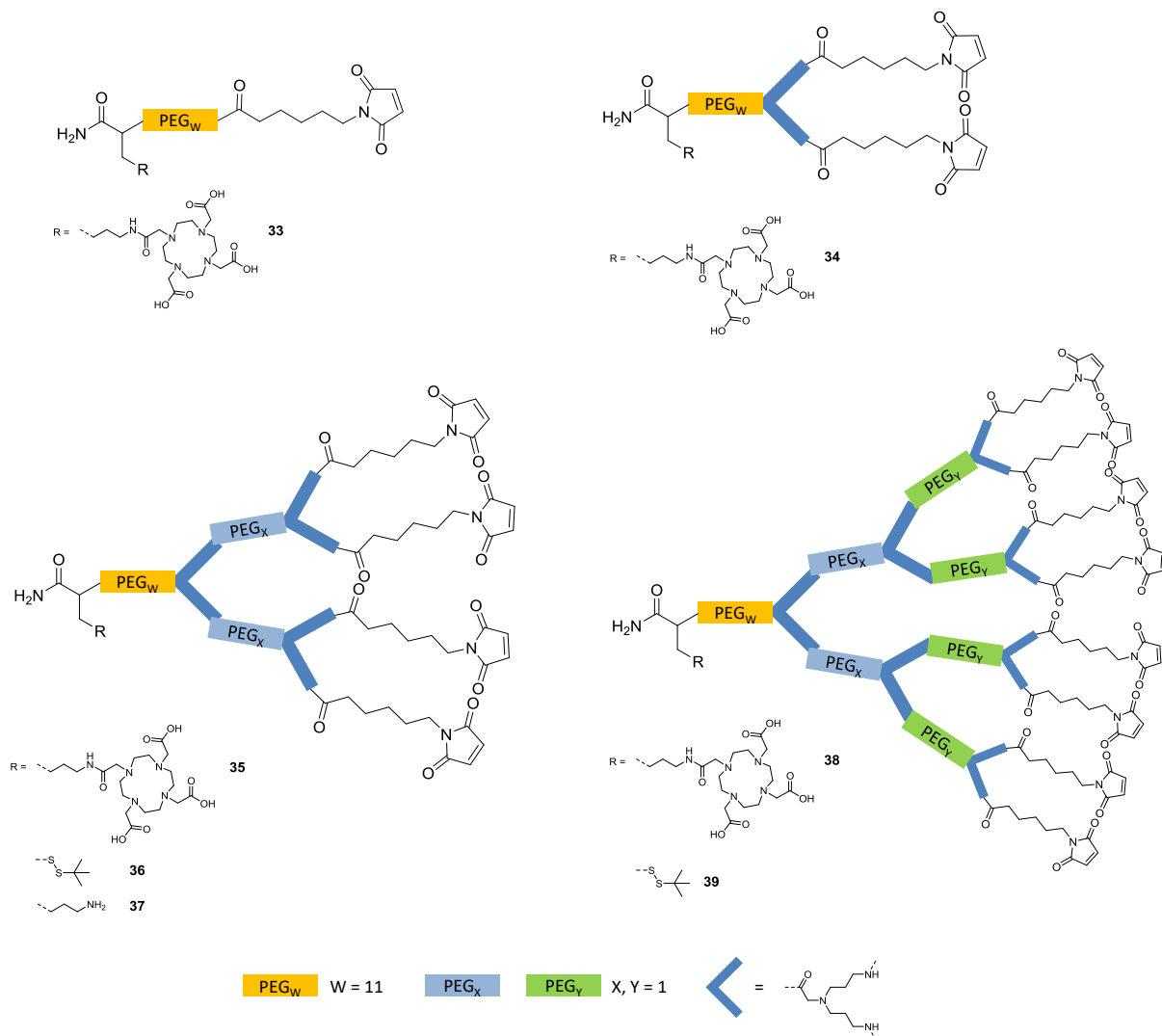
Verzweigungsgrad das Dendron auf dem Harz bereits hatte und in welcher Position im Gerüst des Dendrons der Synthesebaustein eingefügt wurde. Für die Konjugation des verzweigenden Moleküls APG wurden grundsätzlich längere Reaktionszeiten benötigt, die beginnend bei 60 Minuten mit dem ersten verzweigenden Molekül sich bis auf 120 Minuten für das zweite verzweigende Molekül erhöhten. Jedes weitere verzweigende Molekül wurde schließlich über Nacht reagieren gelassen, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Noch längere Reaktionszeiten zeigten dagegen keine weitere Verbesserung in den Produkt-Reinheiten der Dendron-Gerüste. Neben den Reaktionszeiten hat auch der Reaktantüberschuss, der während einer Reaktion zum Einsatz kommt, Einfluss auf die Reaktionseffizienz. Interessanterweise wurden die besten Resultate nicht bei einem Reaktant-Überschuss von 4 Äquivalenten des Synthesebausteins für jede reagierende funktionelle Gruppe erhalten, wie es bei einer Standard-Fmoc-Peptidsynthese der Fall ist, sondern es zeigte sich, dass ein Reaktant-Überschuss von 2 Äquivalenten die besten Ergebnisse lieferte. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass während der Synthese von Substanz **17** der Reaktant-Überschuss von 4 Äquivalenten in einer Produkt-Reinheit von 41 % resultierte, wohingegen 3.0, 2.0 und 1.5 Äquivalente eine verbesserte Reinheit von jeweils 51 %, 57 % und 57 % ergaben. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnten die längeren Reaktionszeiten während der Dendron-Synthese sein, die in Kombination mit den höheren Reaktant-Überschüssen zu einer vermehrten Bildung von Nebenprodukten und so zu verminderten Produkt-Reinheiten führt, im Vergleich zu den Reaktionen, die unter den Bedingungen der Standard-Fmoc-Peptidsynthese durchgeführt wurden.

Letztendlich konnte gezeigt werden, dass die Synthese von sogar vergleichsweise großen multivalenten Strukturen (bis zur Größe eines Hexadezimers) auf einer festen Phase durchgeführt werden konnte. Durch Variationen in der Struktur des Dendron-Gerüsts konnten die Produkte in ausreichend hohen Reinheiten (und dadurch auch in vernünftigen Ausbeuten) erhalten werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass es ein Optimum in der Struktur gibt, bei der die Maleinimid-Dendrone in den höchsten Reinheiten erhalten werden können, jedoch konnten auch von dieser optimalen Struktur abweichende Dendrone in zufriedenstellenden Reinheiten hergestellt werden. Weiterhin konnten die Dendrone (abhängig von der Größe ihrer Struktur) auf fester Phase in 1 bis 3 Tagen hergestellt werden, was deutlich kürzer ist als die Zeit, die für die nass-chemische Herstellung von Dendronen in flüssiger Phase benötigt wird. So konnten beispielsweise oktamere Dendrone auf fester Phase durch Anwendung der optimierten Synthese in weniger als 24 Stunden hergestellt werden, wohingegen die Synthese der vergleichbaren PAMAM-Dendrone einen Zeitraum von über 30 Tagen (alle Reaktionen

zusammengenommen), ohne die Zeit für die obligatorische Reinigung mit einzuberechnen, in Anspruch nehmen würde <sup>[69]</sup>. Um zu zeigen, dass die hergestellten multivalenten Maleinimid-Dendrone in Konjugationsreaktionen mit Thiol-tragenden Synthesebausteinen eingesetzt werden können und sich zudem radiomarkieren lassen, wurden verschiedene Dendron-Gerüste nach den zuvor vorgestellten optimierten Synthesebedingungen hergestellt.

### 3.1.5 Anwendung der multivalenten Maleinimide in Multimerisierungsreaktionen

Generell können mehrere multivalente Strukturen für die *in vivo*-Bildgebung interessant sein, wie zum Beispiel multivalente Peptide, die bereits gezeigt haben, dass sie mit hoher Affinität an Tumoren binden können und das Potential haben in der Tumor-Diagnostik eingesetzt zu werden <sup>[35, 70]</sup>. DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure)-Multimere können interessante Synthesebausteine sein, wenn sie an ein Tumor-bindendes Molekül konjugiert werden, um verbesserte spezifische Aktivitäten während der Radiomarkierung zu erhalten <sup>[69]</sup>. In dieser Arbeit wurden verschiedene mono-, di-, tetra- und oktamere Maleinimid-Dendrone (**33–39**, Abbildung 16) hergestellt: Mono/Multivalente Maleinimide, die entweder eine *t*Bu-thio-geschützte Thiol-Funktion (die sich reaktiv entschützen lässt und an die ein Maleinimid-enthaltendes Molekül konjugiert werden kann) oder ein DOTA enthielten.



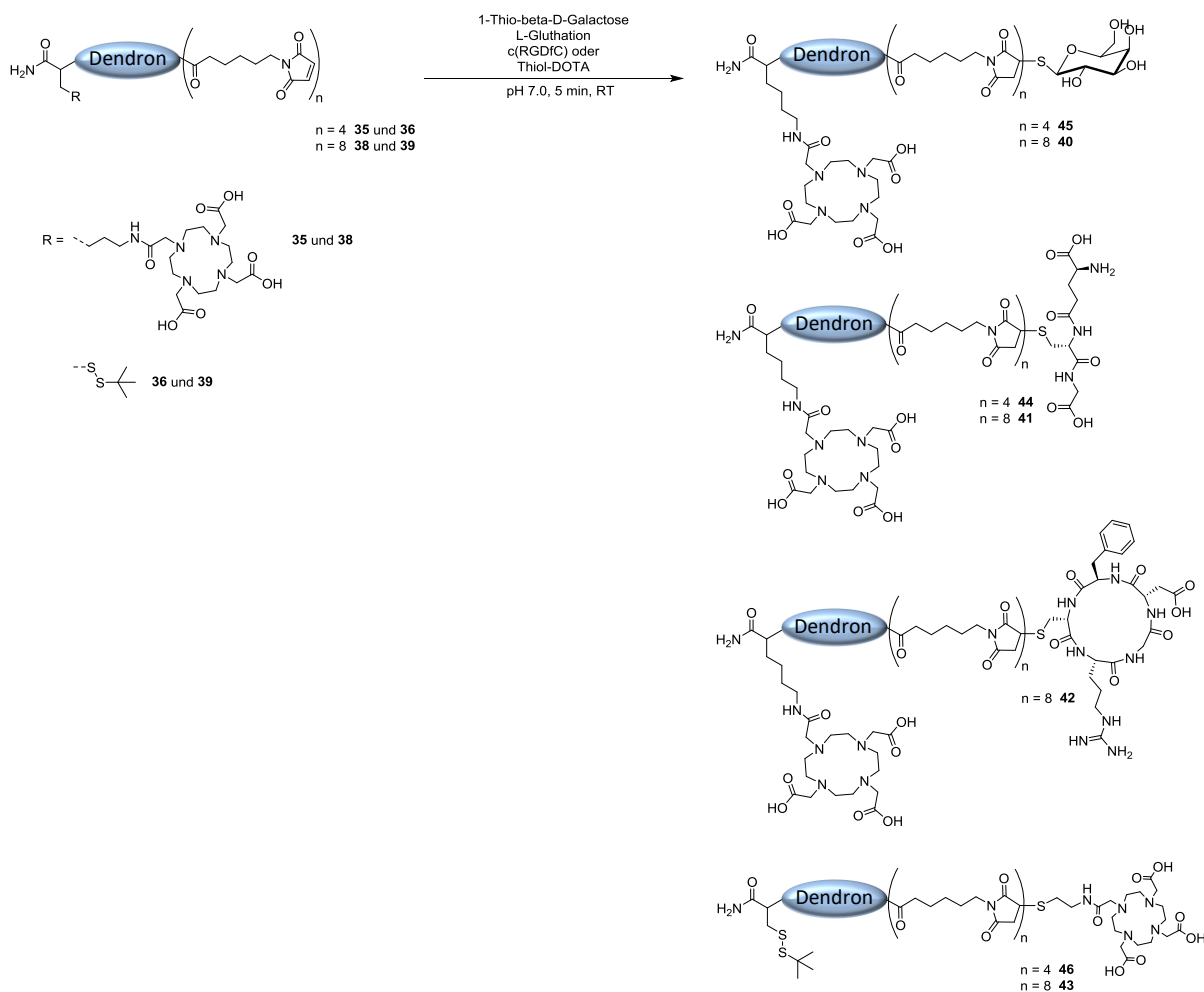
**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der hergestellten mono/multivalenten Maleimid-Dendrone 33–39, die entweder eine *t*Bu-thio-geschützte Thiol-Funktion (für die Konjugation eines beliebigen Moleküls) oder ein DOTA-Chelator (für die Komplexierung von Radionukliden) besitzen.

Die Konjugation des DOTA-Chelators an das Dendron-Gerüst wurde zu zwei verschiedenen Syntheszeitpunkten durchgeführt: Im ersten Fall wurde das DOTA direkt nach Konjugation des Lysins und vor der Synthese des Dendron-Gerüsts und im zweiten Fall nach der Synthese des kompletten Dendron-Gerüsts eingeführt, jedoch waren die Reinheiten der am Ende erhaltenen Rohprodukte mit ~4 % Unterschied nur sehr gering (bei der Durchführung der DOTA-Konjugation nach Synthese des Dendron-Gerüsts wurde eine Reinheit von 25 % erzielt, die Einführung des DOTAs vor der Synthese des Dendron-Gerüsts resultierte dagegen in einer Reinheit von 21 %). Ursprünglich wurde aufgrund der sterischen Hinderung des Dendron-Gerüsts erwartet, dass die Einführung des DOTAs nach der Synthese des Dendrons-Gerüsts im Vergleich zu der Konjugation des DOTAs vor der Synthese des Dendron-Gerüsts zu signifikant niedrigeren Reinheiten beim Endprodukt führt.



Die Maleinimid-Dendrone, die in weiteren Multimerisierungsreaktionen verwendet wurden, konnten nach der Reinigung über die HPLC nur in relativ niedrigen Ausbeuten zwischen 2.9 % und 17.0 % erhalten werden, obwohl die Reinheiten der Rohmaterialien nach der Abspaltung vom Harz (zwischen 53 % und 78 %) größere Ausbeuten vermuten ließen. Zusätzlich lassen sich die erhaltenen isolierten Ausbeuten nicht auf die Größe des Dendrons oder dessen Komplexität zurückführen (z. B. hätten hohe Ausbeuten bei Di- und Tetrameren und geringe Ausbeuten bei Oktameren auf Verluste der Produkte während der HPLC-Reinigung hindeuten können, die auf eine größere Interaktion der größeren Dendrone mit dem Säulenmaterial hingedeutet hätten). Eine mögliche Erklärung für die geringen Ausbeuten könnte eine unvollständige Abspaltung der Produkte vom Harz sein, aber sogar längere Abspaltzeiten führten nicht zu besseren Ergebnissen. Eine weitere Möglichkeit könnte auch sein, dass nicht alle funktionellen Amide auf dem Harz für die chemischen Reaktionen zugänglich waren, was der Gewichtsunterschied zwischen den gewogenen Rohprodukten und den theoretischen Ausbeuten, berechnet aus den Herstellerangaben zu den Beladungsdichten des Harzes, nahelegt. Um diese Vermutung zu erhärten, wurde das Harz vor und nach der Synthese der Dendron-Gerüste gewogen. Die Experimente zeigten z. B., dass nach der Synthese von Substanz **36** nur maximal  $\frac{2}{3}$  des theoretischen Massezuwachses erhalten wurden, was einen unzureichenden Zugang der Amide auf dem Harz zu chemischen Synthesen nahelegt und deswegen die tatsächlich erhaltbaren Produktausbeuten geringer als erwartet ausfielen.

Die tetra- und oktavalenten Maleinimide **35**, **36**, **38**, und **39** wurden mit verschiedenen Thioltragenden Testsubstanzen zur Reaktion gebracht (1-thio- $\beta$ -D-Galactose, L-Glutathion, c(RGDfC) und Thiol-DOTA, Abbildung 17). Die jeweiligen multivalenten Substanzen (Galactose<sub>8</sub>-DOTA (**40**), L-Glutathion<sub>8</sub>-DOTA (**41**), c(RGDfC)<sub>8</sub>-DOTA (**42**), DOTA<sub>8</sub>-SS-*t*Bu (**43**), L-Glutathion<sub>4</sub>-DOTA (**44**), Galactose<sub>4</sub>-DOTA (**45**) und DOTA<sub>4</sub>-SS-*t*Bu (**46**) wurden nach der Reinigung mittels HPLC, je nachdem welcher Thioltragende Synthesebaustein in der Reaktion verwendet wurde, in Ausbeuten von 18.1 %–45.2 % erhalten.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung der Reaktionen der multivalenten Maleinimide **35**, **36**, **38** und **39** mit 1-Thio- $\beta$ -D-Galactose, L-Glutathion, c(RGDfC) und Thiol-DOTA, mit denen die Produkte **40–46** erhalten werden konnten.**

Um die Synthese weiter zu vereinfachen, wurden (neben der in Lösung durchgeführten Reaktion von Thiol-tragenden Molekülen mit den endständigen Maleinimid-Funktionen des Dendrons) Thiol-tragende Synthesebausteine direkt auf dem Harz mit den terminalen Maleinimiden des Dendron-Gerüsts zur Reaktion gebracht. Diese Versuche wurden am Beispiel der tetravalenten Substanzen **44**, **45** und **46** durchgeführt, in denen die finale Konjugation der Maleinimide mit Thiol-tragenden Synthesebausteinen im ersten Fall nach der Abspaltung und Reinigung und im zweiten Fall direkt auf dem Harz, vor der Abspaltung (aber ohne Reinigung) des Dendrons, durchgeführt wurde. In beiden Fällen wurden vergleichbare Ergebnisse in der Reinheit der Rohprodukte erzielt (69 %–70 % für **44**, 64 %–67 % für **45** und 56 % für **46**), die sich nur um bis zu 3 % unterscheiden. Daraus lässt sich schließen, dass die Maleinimide sowohl auf dem Harz als auch in flüssiger Phase quantitativ umgesetzt werden konnten und die Herstellung des Dendron-Gerüsts der Schritt in der Synthese ist, der

die Ausbeute limitiert. Die Ergebnisse belegen, dass sich die auf einer festen Phase hergestellten multivalenten Maleinimid-Dendrone für die Multimerisierung verschiedener und strukturell unterschiedlicher Synthesebausteine einsetzen lassen.

Damit die Dendrone prinzipiell für die *in vivo*-Bildgebung im PET eingesetzt werden können, müssen diese radiomarkierbar sein. Deswegen wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich DOTA-tragende Multimere mit dem PET-Nuklid  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkieren lassen.

### 3.1.6 Radiomarkierung der oktavalenten Substanzen 40–43 mit $^{68}\text{Ga}$

Um die Radiomarkierbarkeit multimerer Substanzen, die nach dem neuen Synthesekonzept hergestellt wurden, zu belegen, wurden die Oktamere **40–43** mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkiert. Das  $^{68}\text{Ga}$  wurde durch die Elution eines  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators <sup>[71]</sup> erhalten und die Radiomarkierung der Oktamere **40–43** wurde unter Standardbedingungen <sup>[36]</sup> durchgeführt. Die Radiomarkierung der Oktamere **40–43** konnte erfolgreich durchgeführt werden, jedoch wurden nicht alle Produkte in ausreichend hoher Reinheit erhalten. Bei Substanz **41** wurde ein signifikanter Zerfall direkt nach der Radiomarkierung beobachtet, der durch Zugabe von Ascorbinsäure verlangsamt, aber nicht verhindert werden konnte, was eine radiolytische Zersetzung des Glutathions nahelegt. Im Gegensatz dazu konnten die Substanzen **40**, **42** und **43** nach ihrer Radiomarkierung mit  $^{68}\text{Ga}$  (bei einer Startaktivität von  $\sim 260 \text{ MBq } ^{68}\text{Ga}^{3+}$ ) in hohen radiochemischen Ausbeuten und Reinheiten von  $\geq 95 \%$  und hohen spezifischen Aktivitäten (von bis zu  $147 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  für **40**, bis zu  $55 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  für **42** und bis zu  $163 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  für **43**) erhalten werden.

### 3.1.7 Schlussfolgerung

Mit der hier beschriebenen Herangehensweise konnten Dendrone sehr effizient hergestellt werden, die in ihrer Struktur sehr flexibel verändert werden und bis zu 16 funktionelle Gruppen enthalten können. Durch die Optimierung der Synthese hinsichtlich der Ausbeuten wurde eine Dendronstruktur ermittelt, die sich am effizientesten mit dem vorgestellten Synthesekonzept herstellen lässt. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass Dendrone, die in ihrer Struktur vom Optimum abweichen, hergestellt werden können und sich somit bei Bedarf für die Multimerisierung pharmakokinetisch aktiver Moleküle einsetzen lassen. In anschließenden „Klick“-Reaktionen der Maleinimid-funktionalisierten Dendrone, in denen verschiedene Thiol-tragende Synthesebausteine multimerisiert wurden, konnte deren Anwendbarkeit in dieser Arbeit gezeigt werden. Zusätzlich wurde am Initialpunkt des Dendrons erfolgreich ein Chelator eingeführt und die fertigen multivalenten Produkte konnten mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  radiomarkiert werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die nach dem neuen

Synthesekonzept hergestellten Dendrone sich für die Herstellung multimerer Radiotracer, die in der PET-Bildgebung zum Einsatz kommen sollen, geeignet sind. Prinzipiell eignen sich diese Dendrone auch für die im zweiten Teil dieser Arbeit vorgestellten  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Dimere, wodurch eine Aufgabenstellung der Zielsetzung (siehe Kapitel 2: Zielsetzung) erfolgreich umgesetzt werden konnte.

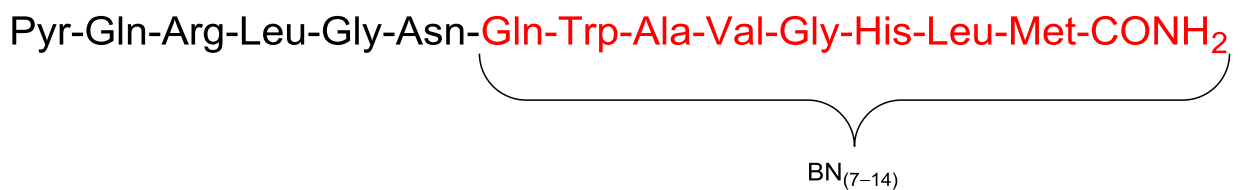
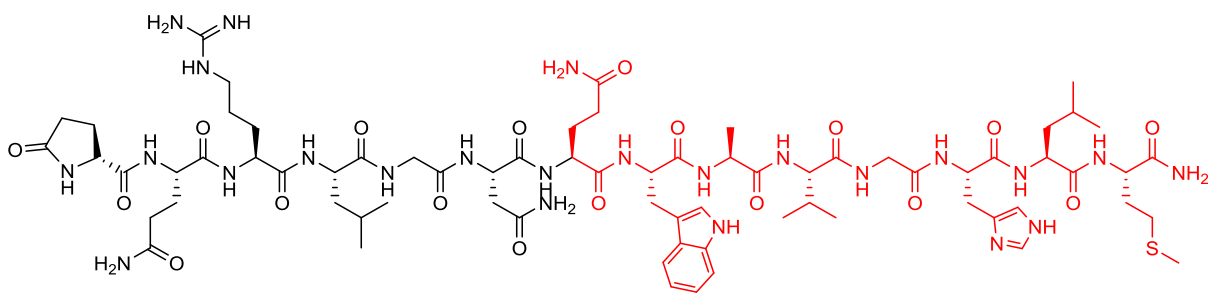
## 3.2 Synthese neuer BBN<sub>(7-14)</sub>-Derivate mit verbesserten Bindungseigenschaften zu GRP-Rezeptoren

Die in diesem Kapitel beschriebene Darstellung neuer BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere, und die in diesem Rahmen durchgeführten Serumstabilitätstests sowie *in vitro*-Versuche, wurden bereits im Online-Fachjournal *Bioconjugate chemistry* beschrieben und veröffentlicht <sup>[72]</sup>.

### 3.2.1 Einleitung

Bombesin **47** (Abbildung 18) ist ein aus 14 Aminosäuren bestehendes Polypeptid (Primärstruktur: Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-CONH<sub>2</sub>), welches an den *Gastrin Releasing Peptide* (GRP)-Rezeptor bindet und wurde zuerst in einem Extrakt entdeckt, das aus der Haut der Rotbauchunke (*Bombina bombina*) gewonnen werden konnte <sup>[73]</sup>.

### Bombesin (47)



**Abbildung 18: Strukturformel und Aminosäuresequenz von Bombesin. Rot hervorgehoben ist die Sequenz von BBN<sub>(7-14)</sub>, das in dieser Dissertationsarbeit für die Synthese der Peptid-Dimere verwendet wurde.**

Der GRP-Rezeptor, der zu der Familie der Bombesin-Rezeptoren gehört, wird in vielen humanen Tumorarten, wie dem Prostatakarzinom, dem Mammakarzinom, kolorektalen Tumoren, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren überexprimiert <sup>[74]</sup>. Deshalb ist der GRP-Rezeptor ein ideales Target für die Diagnostik mittels nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren. In der Vergangenheit wurden Bombesin-

Derivate für die diagnostische Bildgebung von Tumoren entwickelt, die in ihrer Struktur sehr ähnlich dem Ursprungspeptid BBN<sub>(1-14)</sub> sind und in die sich Radionuklide für die molekulare Bildgebung mittels Komplexierung einführen lassen <sup>[75-77]</sup>. Jedoch wird häufig nur das C-terminale Ende des Bombesins bei der Herstellung von GRP-Rezeptor-affinen Tracern verwendet, da bereits wenige Aminosäuren für eine Bindung an den GRP-Rezeptor ausreichen, wie im Falle von BBN<sub>(6-14)</sub>- und BBN<sub>(7-14)</sub>-Derivaten gezeigt werden konnte <sup>[78-83]</sup>. Diese Beschränkung der Bombesin-Analoga auf die bindende Aminosäuresequenz vereinfacht nicht nur die Herstellung der BBN<sub>(7-14)</sub>-Derivate, sondern es hat sich auch gezeigt, dass Bombesin-Analoga aufgrund kleiner Modifikationen in ihrer Sequenz sogar eine höhere Stabilität als das Bombesin selbst besitzen <sup>[84]</sup>. Während es kein Problem darstellt das Ursprungspeptid Bombesin auf seine bindende Aminosäuresequenz zu reduzieren, ist eine Veränderung einzelner Aminosäuren, ohne dass die pharmakokinetischen Eigenschaften des Peptids verloren gehen oder sich verändern, nicht ohne weiteres durchführbar. Beispielsweise darf die Aminosäuresequenz der Aminosäuren 8–14 (in der Sequenz des Bombesins) nicht oder nur sehr gering vom Ursprungspeptid abweichen, da sonst die Bindungsaffinität der BBN-Peptide zu den GRP-Rezeptoren verloren geht.

Aufgrund dessen, dass sich Bombesin-Derivate im Laufe der letzten Jahre als geeignete Tracer für die Bildgebung von Prostatakarzinomen erwiesen haben, gibt es bereits erste klinische Studien <sup>[85-88]</sup>. Die untersuchten Bombesin-Derivate konnten sich in der klinischen Routine jedoch nicht durchsetzen, was unter anderem auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften zurückzuführen ist, wie z. B. eine zu geringe Stabilität *in vivo*, eine zu schnelle Ausscheidung aus dem Körper des Patienten, eine zu hohe Blutverweildauer (welche bei der Durchführung von diagnostischen Messungen mittels nuklearmedizinischer Bildgebungsverfahren einen zu hohen Hintergrund erzeugt) oder eine zu geringe Tumoraufnahme. Diese Tatsache war der Auslöser einer Reihe von Studien zur Verbesserung der Anreicherungs- und Bildgebungscharakteristika von Bombesin-Derivaten <sup>[83, 89-96]</sup>.

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Radiotracern können unter anderem verbessert werden, indem die pharmakokinetisch aktiven Moleküle des jeweiligen Radiotracers multimerisiert werden. So konnte gezeigt werden, dass durch die Multimerisierung von cRGD-Peptiden die Bindungsavidität zu  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, die Plasmahalbwertszeit, die Anreicherung und Retention im Tumorgewebe sowie das Tumor-zu-Hintergrundverhältnis, im Vergleich zu monomeren Peptid-Analoga, verbessert werden kann <sup>[37, 97-98]</sup>. Diese

Verbesserungen der pharmakokinetischen Eigenschaften von Multimeren, im Vergleich zu Monomeren, sind auf folgende Gründe zurückzuführen:

- i. eine höhere statistische Bindungswahrscheinlichkeit der Multimere an Rezeptoren;
- ii. eine höhere Wahrscheinlichkeit wieder an die Rezeptoren zu binden, wenn das Multimer zuvor von seiner Bindungsstelle dissoziiert ist;
- iii. eine höhere Peptidkonzentration bei Multimeren am Ort der Bindungsstelle, die wiederum in einer höheren Bindungswahrscheinlichkeit resultiert;
- iv. die Möglichkeit, dass Multimere mit mehreren Peptiden gleichzeitig binden können und damit eine stabilere Bindung eingehen als einfach bindende pharmakokinetisch aktive Substanzen.

Jedoch wurden in der Vergangenheit nicht nur c-RGD-Multimere hergestellt, sondern es wurden sogar bereits multimeres Bombesin-Derivate synthetisiert und untersucht <sup>[36, 38, 99-100]</sup>, mit dem Ziel, die *in vivo*- und *in vitro*-Eigenschaften im Vergleich zu den jeweiligen Monomeren (durch den Vorgang der Peptid-Multimerisierung) zu verbessern. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die bessere *in vivo*-Pharmakokinetik von Bombesin-Analoga in einer verbesserten Tumor-Visualisierung in der PET-Bildgebung resultierte <sup>[36]</sup>. Sowohl die Multiplizität als auch der Abstand zwischen zwei Peptiden im Multimer haben einen entscheidenden Einfluss auf die Avidität von multimeren Substanzen:

In der Arbeit von Lindner et al. <sup>[36]</sup> wurde die Bindungsaffinität (die in *in vitro*-Versuchen an PC<sub>3</sub>-Zellen ermittelt wurde) von monomeren PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>(PESIN)-Verbindungen mit denen von di-, tetra- und oktameren PESIN-Verbindungen verglichen. Zwischen den monomeren und multimeren Grundgerüsten und den PESIN-Peptiden wurden PEG-Linker mit unterschiedlicher Länge eingefügt, um den Abstand zwischen den Peptiden zu variieren. Dabei hat sich gezeigt, dass dimere PESIN-Peptide ohne Linker zwischen den Peptiden und dem dimeren Grundgerüst die höchste Bindungsavidität zu den GRP-Rezeptoren der PC<sub>3</sub>-Zellen besitzen (im Vergleich zu den monomeren, tetrameren und oktameren Substanzen mit dem selben Linker). Im Gegensatz dazu wurde bei cRGD-Multimeren, die an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden (und die im Gegensatz zu den GRP-Rezeptoren bei einer Bindung Cluster bilden), beobachtet, dass mit zunehmender Multimerisierung eine höhere Bindungsavidität erreicht werden kann <sup>[35, 101]</sup>. Daher gibt es die Vermutung, dass GRP-Rezeptoren keine Cluster bilden und deswegen nur maximal zwei PESIN-Peptide gleichzeitig an die GRP-Rezeptoren binden

können. Zusätzliche BBN-Peptide im Multimer können in diesem Fall keine weitere Bindung eingehen und würden sich aufgrund sterischer Hinderung und entropischer Effekte negativ auf die Bindung auswirken<sup>[36]</sup>. Für eine Mehrfachbindung eines multimeren Pharmakons ist es außerdem hilfreich, wenn die Peptide, die an ein multimeres Grundgerüst gebunden sind, einen bestimmten Abstand zueinander besitzen. Der Abstand der Peptide in den multimeren Substanzen kann durch das Einfügen von Linkern in das Grundgerüst beeinflusst werden. So konnte in der Vergangenheit bereits erfolgreich nachgewiesen werden, dass die Bindungseigenschaften von pharmakokinetisch aktiven Substanzen nicht nur durch die Multimerisierung, sondern auch durch die Anpassung der Abstände zwischen den bindenden Peptiden verbessert werden können, wie das Beispiel einer Studie zu multimeren cRGD-Peptiden zeigt<sup>[102]</sup>. Der selbe Effekt (dass der Abstand zwischen zwei Peptiden in einem Multimer Einfluss auf die Bindungsavidität der Peptid-Multimere hat) wurde auch in der Studie von Linder et al. bei BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimeren beobachtet: PESIN-Dimere, die einen größeren Abstand zwischen den PESIN-Peptiden besaßen als das Dimer mit dem kleinsten Peptid-Abstand, zeigten eine schlechtere Bindungsavidität gegenüber PC<sub>3</sub>-Zellen, was nahelegt, dass es ein Optimum bei dem Abstand zwischen den Peptiden gibt, bei der die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere die höchste Bindungsavidität zu den GRP-Rezeptoren der PC<sub>3</sub>-Zellen vorweisen. Um zu beweisen, dass das Dimer, welches die höchste Bindungsavidität *in vitro* gezeigt hat, auch besser bindet als ein monomeres PESIN-Peptid (DOTA-PESIN), wurden in der Studie von Lindner et al. Tierstudien sowohl mit dem am besten bindenden PESIN-Dimer als auch mit der monomeren Referenzsubstanz DOTA-PESIN durchgeführt. Diese Tierstudien wurden *in vivo* an PC<sub>3</sub>-tumortragenden SCID-Mäusen durchgeführt und nach Auswertung der experimentellen Daten hat sich gezeigt, dass sich das Dimer stärker im Tumorgewebe anreichert als das monomere DOTA-PESIN.

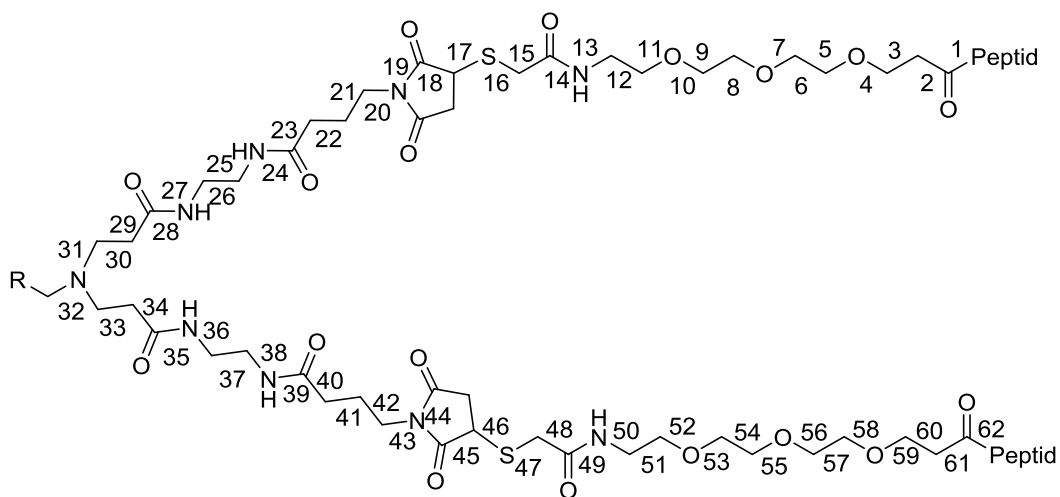
Daneben gibt es noch weitere Arbeiten, in denen ebenfalls dimere Bombesin-Analoga hergestellt und untersucht wurden<sup>[38, 99-100, 103-104]</sup>. In keiner der Studien über Bombesin-Dimere wurde bisher der optimalste Abstand zwischen den BBN-Peptiden ermittelt, was jedoch eine sehr attraktive Möglichkeit ist, um die Bindungseigenschaften von dimeren BBN-Analoga weiter zu verbessern.

### 3.2.2 Konzeption neuer Bombesin<sub>(7-14)</sub>-Derivate

In dieser Arbeit wurden vier neue BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere hergestellt, die jeweils einen unterschiedlich großen Abstand zwischen beiden Peptiden besaßen. Zusätzlich wurde das am besten bindende PESIN-Dimer aus der Arbeit von Lindner et al. hergestellt, das als



Vergleichssubstanz diene. Als dimeres Grundgerüst wurden Dimere auf Basis von PAMAM-Dendronen gewählt, um die Vergleichbarkeit mit der Vorgängerstudie zu gewährleisten und aufgrund der Tatsache, dass sich durch Verwendung dieser Dendrone homogene und symmetrische Multimere herstellen lassen <sup>[35]</sup>. Die im ersten Teil dieser Arbeit vorgestellten Festphasendendrone wurden nicht als Grundgerüst für die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere verwendet, da die in dieser Arbeit erhaltenen Daten bei Verwendung der Festphasendendrone mit den Daten der Studie von Linder et al. schlechter vergleichbar gewesen wären und es während der Durchführung erster Serumstabilitätstests Anzeichen einer geringeren Stabilität im Vergleich zu PAMAM-Dendronen gab, obwohl dieser Effekt nicht systematisch untersucht wurde. Um den Abstand zwischen den Peptiden der hergestellten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere zu veranschaulichen, wurde die Anzahl der atomaren Bindungen, die zwischen zwei BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden liegen, gezählt. Diese Abstände wurden ermittelt, indem die Bindungen zwischen dem letzten Amin der letzten Aminosäure des ersten Peptides bis zum Amin der letzten Aminosäure des zweiten Peptides gezählt wurden (siehe Abbildung 19).

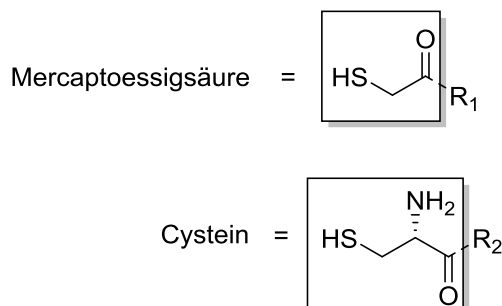


**Abbildung 19:** Die gezeigte Struktur ist Bestandteil von Substanz 64 und es wird beispielhaft gezeigt, wie die Bindungen zwischen den einzelnen Peptiden zur Bestimmung des Abstandes gezählt wurden.

Der optimale Abstand zwischen zwei GRP-Rezeptor-bindenden Peptiden wurde aufgrund von bereits publizierten Studien zu dimeren BBN-Analoga zwischen einem minimalen Abstand von 28 <sup>[38]</sup> und einem maximalen Abstand von 78 Bindungen <sup>[36]</sup> vermutet, weshalb die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Linker in ihrer Länge so gewählt wurden, dass diese den Bereich zwischen dem Maximalabstand von 78 Bindungen und dem Minimalabstand von 28 Bindungen abdeckten. Das BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer mit dem kleinsten Abstand zwischen zwei BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden enthielt keinen Linker, sondern nur die Verknüpfungseinheit (VE) Mercaptoessigsäure. Die anderen BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere enthielten

sowohl die Verknüpfungseinheit Mercaptoessigsäure als auch Ethylenglycole (Handelsnamen der Ethylenglycole: O<sub>1</sub>Pen ([2-(Fmoc-Amino)ethoxy]essigsäure), PEG<sub>1</sub> und PEG<sub>2</sub>) als Linker. Die Vergleichssubstanz aus der Studie von Lindner et al. enthielt die Verknüpfungseinheit Cystein und als Linker PEG<sub>3</sub>. Dadurch ergaben sich für die fertig hergestellten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere Abstände zwischen den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden von 74, 62, 54, 48 und 36 Bindungen. Die Thiol-tragenden Verknüpfungseinheiten Mercaptoessigsäure und Cystein wurden während der Festphasensynthese der BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptide in die Aminosäuresequenz eingeführt. Durch diese Verknüpfungseinheiten lassen sich die BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptide sehr einfach und effizient über eine Michaeladdition an das dimere Grundgerüst konjugieren <sup>[36]</sup>. Die Verknüpfungseinheiten Mercaptoessigsäure und Cystein sind in Abbildung 20 zu sehen.

## Verknüpfungseinheit (VE)

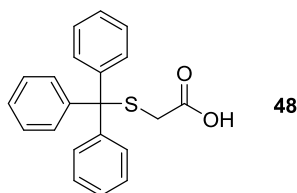


**Abbildung 20: Verknüpfungseinheiten Mercaptoessigsäure und Cystein, wie sie nach der Abspaltung der Peptide 49–53 vom Harz vorliegen (R<sub>1</sub> = OEG-Linker-BBN<sub>(7-14)</sub> oder BBN<sub>(7-14)</sub>; R<sub>2</sub> = PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>).**

Die Michaeladdition wurde für die Konjugation der BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptide an das dimere Grundgerüst gewählt, da die Michaeladdition im Vergleich zu anderen „Klick“-Reaktionen (wie der Oximformationsreaktion zwischen Aminoxy-Verbindungen und Aldehyden oder der 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen Alkinen und Aziden) den Vorteil hat, dass diese effizient und mit hohen Ausbeuten verläuft <sup>[35]</sup>. Dies ist besonders bei multimeren Verbindungen, die möglichst homogen hergestellt werden müssen, ein entscheidender Faktor, da Verunreinigungen (die durch eine unvollständige Reaktion verursacht werden) mit zunehmender Größe des Multimers nur mit hohem Aufwand abgetrennt werden können. Die Verknüpfungseinheit Mercaptoessigsäure wurde für die Substanzen **49–52** verwendet (siehe Abbildung 23), da diese im Gegensatz zu Cystein im lebenden Organismus nicht vorkommt und vermutet wurde, dass diese schlechter von körpereigenen Enzymen erkannt wird. Dadurch sollte die *in vivo*-Stabilität der BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptide **49–52** im Vergleich zu der Substanz **53** (für die als Verknüpfungseinheit Cystein verwendet wurde) erhöht werden. Diese

These konnte mittels Serumstabilitätstests, die mit den Dimeren **61–65** durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3.2.5), bestätigt werden. Zudem existiert eine Studie, die im selben Arbeitskreis wie diese Dissertation durchgeführt wurde und in der die Stabilität von verschiedenen Monomeren und Dimeren BBN<sub>(7–14)</sub>-Substanzen in humanem Serum untersucht wurde <sup>[105]</sup>. Unter anderem wurde ein Dimer in Serumstabilitätstests untersucht, das BBN<sub>(7–14)</sub>-Peptide mit Mercaptoessigsäure als Verknüpfungseinheit enthielt und es hat sich gezeigt, dass dieses im Gegensatz zu einem vergleichbaren Dimer, das sich nur darin unterschied, dass es BBN<sub>(7–14)</sub>-Peptide mit Cystein als Verknüpfungseinheit enthielt, deutlich stabiler war.

Um die Mercaptoessigsäure, wie jede andere Aminosäure, während einer Fmoc-Peptidsynthese in die Peptidsequenz einführen zu können, wurde zunächst die S-Trityl-Mercaptoessigsäure (siehe Abbildung 21) nach Vorlage von Tang et al. <sup>[106]</sup> hergestellt.



**S-Trityl-Mercaptoessigsäure**

**Abbildung 21: S-Trityl-geschützte Mercaptoessigsäure, die für diese Arbeit hergestellt und mittels Fmoc-Peptidsynthese in die Peptidsequenz der BBN<sub>(7–14)</sub>-Peptide als Verknüpfungseinheit eingebracht wurde.**

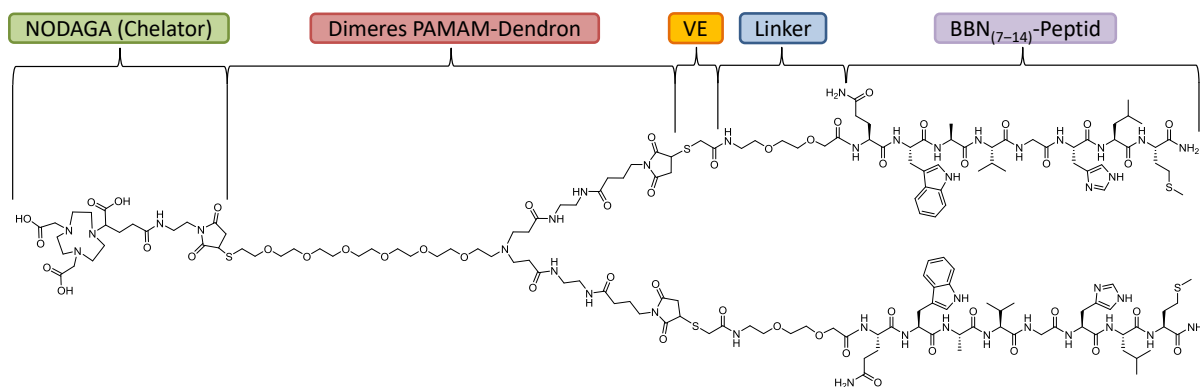
Das Thiol der Mercaptoessigsäure wurde durch eine Trityl-Schutzgruppe geschützt und war dadurch für Nebenreaktionen während der Peptidsynthese nicht zugänglich.

Die Linker der BBN<sub>(7–14)</sub>-Dimere bestehen aus Ethylenglycolen und sind ein weiterer wichtiger Baustein in der Struktur der Multimere. Ethylenglycole, bzw. ihre polymere Form, die Polyethylenglycole (PEGs), wurden in der Vergangenheit häufig eingesetzt, um beispielsweise die Struktur oder die pharmakokinetischen Eigenschaften von Tracern zu beeinflussen und konnten somit bereits ihre Tauglichkeit für die Anwendung als Strukturbausteine von Substanzen, die im lebenden Organismus zum Einsatz kommen, unter Beweis stellen <sup>[107]</sup>. Zudem wurde festgestellt, dass Ethylenglycole einen positiven Einfluss auf die Zytotoxizität von Dendronen, wie z. B. PAMAM-Dendronen, haben <sup>[108]</sup>. Eine weitere Studie zeigte zudem, dass eine zusätzliche Einbringung eines PEGs in ein BBN-Analog, das durch seine Einführung in die Struktur des Radiotracers nichts veränderte (keine Veränderung an der Struktur zwischen Chelator, Peptid und Linker), keine negativen Auswirkungen auf die Bindungsaffinität hatte und, im Gegenteil, sogar die Stabilität des BBN-Analogs *in vitro* und

*in vivo* erhöhte <sup>[109]</sup>. Aufgrund dieser Eigenschaften kommen die Ethylenglycole auch in dieser Arbeit als Strukturbausteine zum Einsatz, um unterschiedliche Abstände zwischen beiden GRP-Rezeptor-bindenden Peptiden zu erzielen.

Um die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere später mit <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> radiomarkieren zu können, wurde ein weiterer Synthesebaustein, das NODAGA (1,4,7-Triazacyclononan-1-Glutarsäure-4,7-Diessigsäure), in die Struktur der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere eingebracht, da dieser Chelator (im Gegensatz zum häufig verwendeten DOTA) eine schnelle Komplexierung bei Raumtemperatur ermöglicht <sup>[110]</sup>.

In Abbildung 22 wird das BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer **63** gezeigt und dessen einzelne Strukturbestandteile werden benannt, um den baukastenartigen Aufbau der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere zu veranschaulichen.

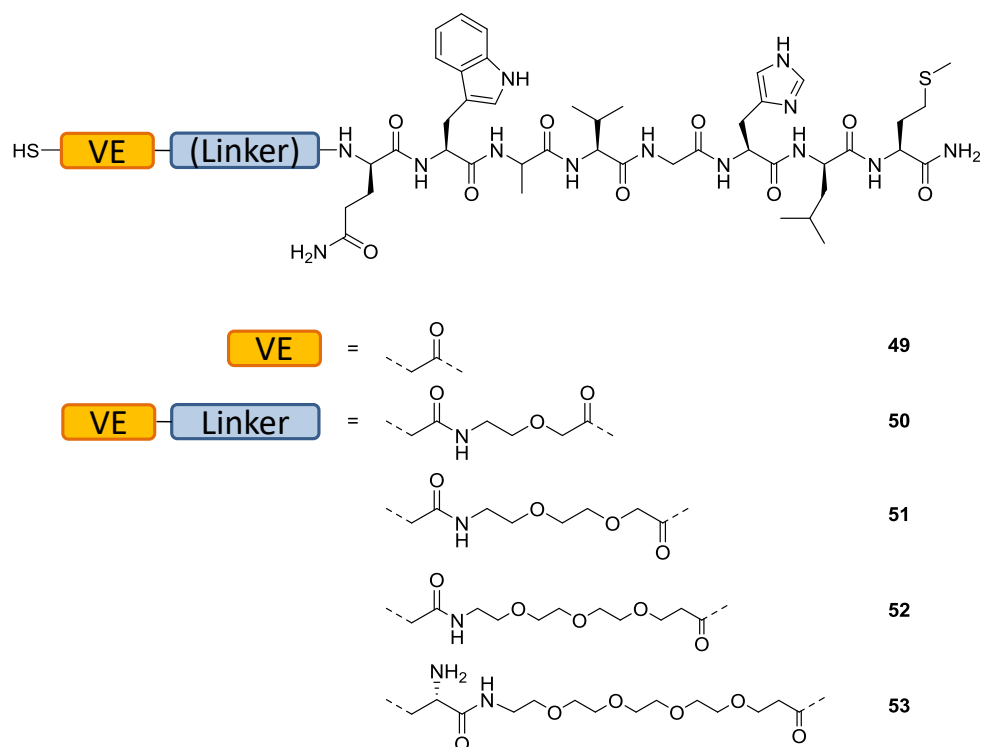


**Abbildung 22: Darstellung von Verbindung 63, an dem die einzelnen Strukturbestandteile verdeutlicht sind.**

Die einzelnen Syntheseschritte, bis zum Erhalt der fertigen BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere, werden im folgenden Abschnitt erläutert.

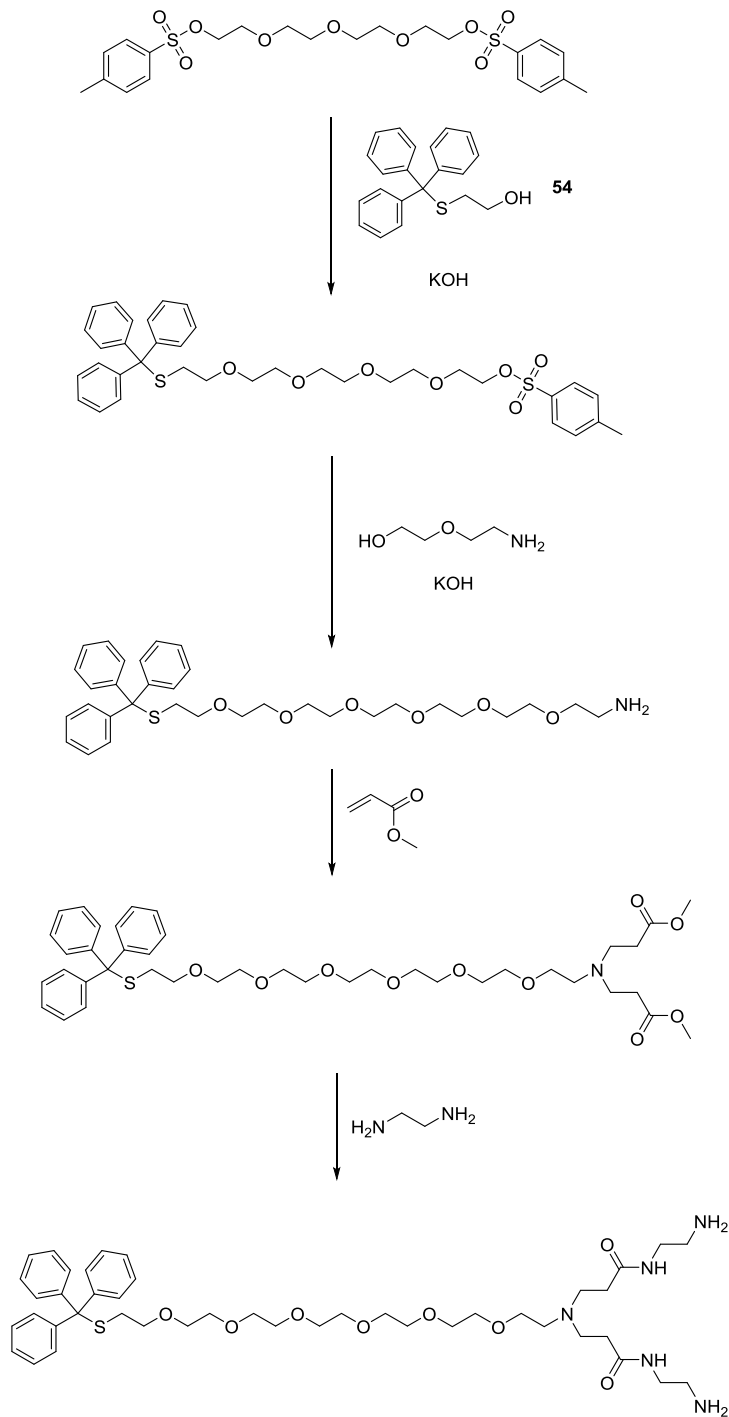
### 3.2.3 Herstellung dimerer BBN<sub>(7-14)</sub>-Analoga

Zunächst wurden die einzelnen Peptide, bestehend aus der Verknüpfungseinheit Mercaptoessigsäure oder Cystein und einem Ethylenglycol-Linker (mit Ausnahme der Verbindung **49**), mittels Fmoc-Peptidsynthese hergestellt. In Abbildung 23 sind die verschiedenen BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptide Mercaptoessigsäure-BBN<sub>(7-14)</sub> **49**, Mercaptoessigsäure-O<sub>1</sub>Pen-BBN<sub>(7-14)</sub> **50**, Mercaptoessigsäure-PEG<sub>1</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub> **51**, Mercaptoessigsäure-PEG<sub>2</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub> **52** und Cys-PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub> **53** gezeigt.



**Abbildung 23:** Dargestellt sind die BBN<sub>(7-14)</sub>-Analoga 49–53, die jeweils unterschiedliche Linker (mit Ausnahme des BBN<sub>(7-14)</sub>-Analog 49, das keinen Linker enthält) und Verknüpfungseinheiten enthalten.

Als Grundgerüst für die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere wurden PAMAM-Dendrone verwendet, die ausgehend von einem Trityl-geschützten PEG<sub>5</sub>-Linker aufgebaut wurden. Die Synthese des PAMAM-basierten dimeren Dendrons wurde bereits zuvor beschrieben <sup>[69]</sup> und ist in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24:** Syntheschema des PAMAM-Dendrons, das als Grundgerüst für die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere verwendet wurde.

Der PEG<sub>5</sub>-Linker zwischen den Verzweigungen des PAMAM-Dendrons und dem Tritylgeschütztem Thiol erlaubt, nach Fertigstellung des raumfordernden Dendron-Gerüsts, die Einführung eines Chelators mit hoher Syntheseeffizienz. Das Amino-PAMAM-Dendron, das nach dem Reaktionsschema in Abbildung 24 hergestellt wurde, wurde im ersten Reaktionsschritt mit Maleimidobutansäure oder Maleimidohexansäure durch Zugabe von

PyBOP und DIPEA in DMF zur Reaktion gebracht, sodass nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur die Verbindungen Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 4-Maleimidobutansäure) **55** und Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 6-Maleimidohexansäure) erhalten werden konnten (siehe Abbildung 25). Nach der Reinigung der Maleinimid-funktionalisierten PAMAM-Dendrone mittels HPLC, wurde die jeweilige BBN<sub>(7-14)</sub>-Verbindung **49–53** in PBS/MeCN 1:1 (pH neutral) gelöst und zu dem Maleinimid-Dendron Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 4-Maleimidobutansäure) **55** oder Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 6-Maleimidohexansäure) gegeben. Die dadurch gestartete Michaeladdition wurde nach 5 Minuten durch Lyophilisierung der gesamten Reaktionslösung beendet. Zu den Rohprodukten wurde im Anschluss eine Lösung aus TFA:TIS 95:5 gegeben, um die Trityl-Schutzgruppe abzuspalten. Nach anschließender HPLC-Reinigung konnten die Produkte **56–60** (siehe Abbildung 25) in Ausbeuten zwischen 19.3 % und 39.2 % erhalten werden.

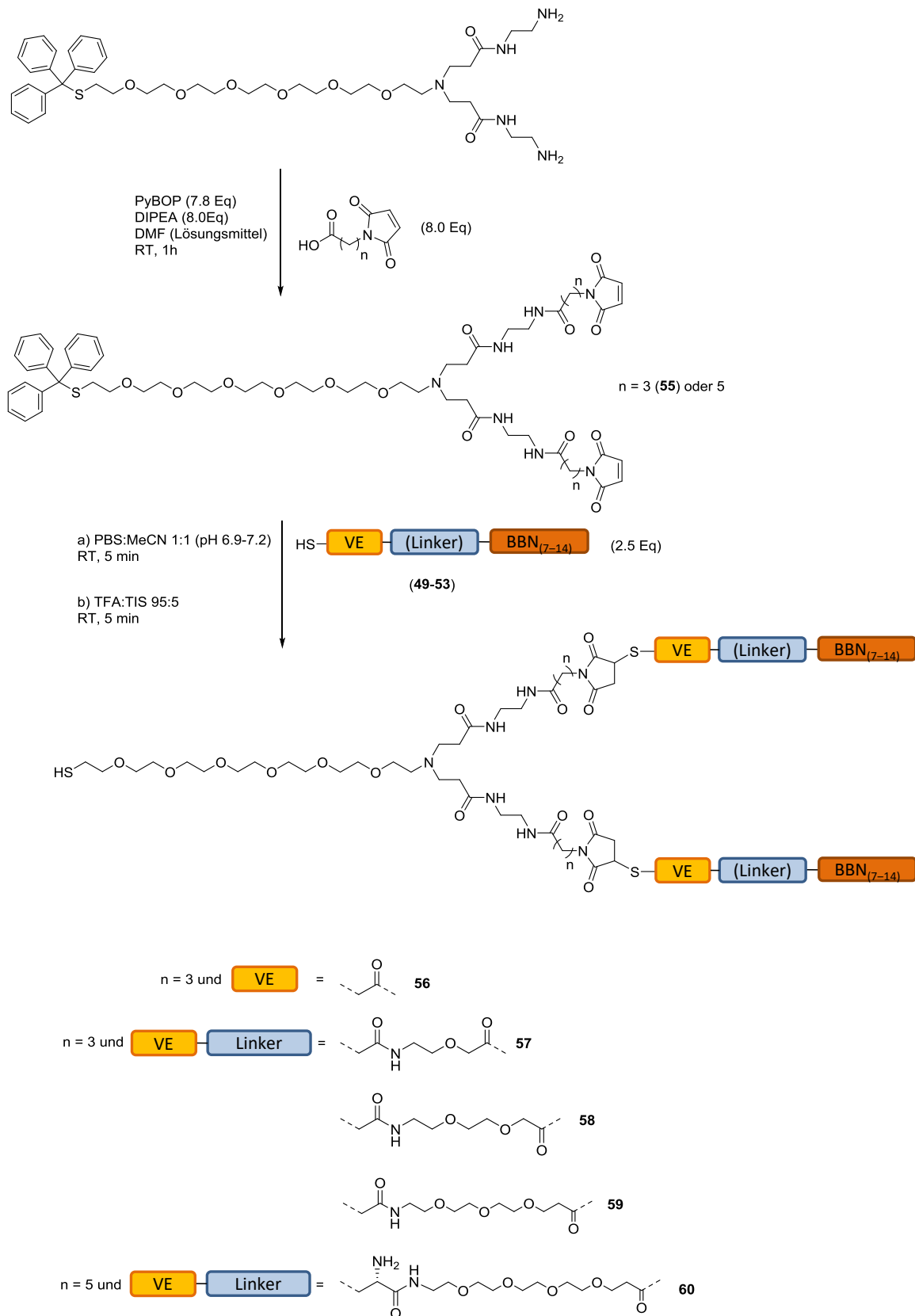
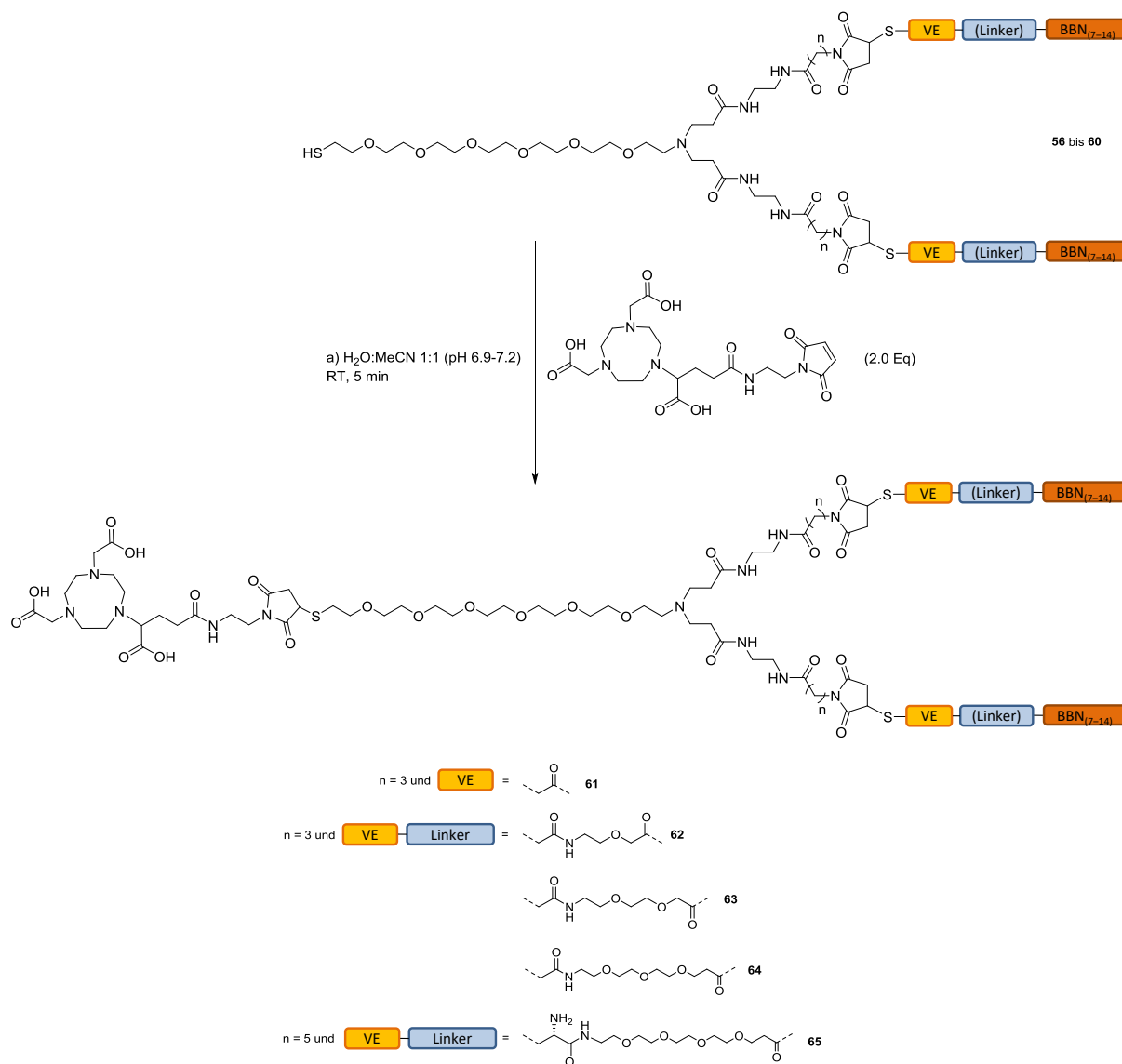


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Synthese der Maleimid-funktionalisierten Dendrone Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleimid (mit 4-Maleimidobutansäure) 55 und Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleimid (mit 6-Maleimidohexansäure), die in einer weiteren Reaktion mit den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden 49–53 reagiert wurden. Nach saurer Entschützung konnten die Verbindungen 56–60 erhalten werden.



In einer weiteren, anschließenden Michaeladdition wurden die Substanzen **56–60** mit Maleinimid-NODAGA zur Reaktion gebracht (Abbildung 26) und erneut mittels HPLC gereinigt, wodurch die Substanzen **61–65** in Ausbeuten von 40.3 % bis 73.4 % erhalten werden konnten.



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung der Synthese der dimeren Substanzen **61–65**, die durch die Reaktion von Substanz **56–60** mit Maleinimid-NODAGA erhalten werden konnten.

In Tabelle 3 sind die Abstände zwischen den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden, wie sie in den BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimeren **61–65** vorliegen, aufgelistet.

**Tabelle 3: Abstände der BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptide zueinander (angegeben in Bindungslängen), der Verbindungen 61–65.**

<b>Substanz</b>	<b>Peptid-Abstand in Bindungslängen</b>
<b>61</b>	<b>36</b>
<b>62</b>	<b>48</b>
<b>63</b>	<b>54</b>
<b>64</b>	<b>62</b>
<b>65</b>	<b>74</b>

In der Arbeit von Linder et al. <sup>[36]</sup> wurden die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere durch ein von der soeben beschriebenen Synthese abweichendes Verfahren hergestellt: Die PESIN-Peptide wurden zunächst über eine Michaeladdition an die Maleinimid-derivatisierten PAMAM-Dendrone konjugiert und das entstehende Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt. Anschließend wurde die Trityl-Schutzgruppe unter Zugabe einer TFA:TIS-Lösung abgespalten. Nach 5 Minuten wurde die TFA:TIS-Lösung entfernt und die Rohprodukte wurden direkt ohne weitere Reinigung mit Maleinimid-NODAGA in einer weiteren Michaeladdition umgesetzt. Die Synthesestrategie dieser Dissertationsarbeit weicht von dem zuvor beschriebenen Vorgehen von Lindner et al. ab (vor der Zugabe der TFA:TIS-Lösung wird keine Reinigung der Rohprodukte durchgeführt), da die Maleinimid-Dendrone Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 4-Maleimidobutansäure) **55** oder Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 6-Maleimidohexansäure) nach ihrer Reaktion mit den BBN<sub>(7-14)</sub>-Substanzen **49–53** ein schlechtes Löslichkeitsverhalten in unpolaren und sauren Lösungsmitteln zeigten. Damit die bei dieser Reaktion entstehenden Rohprodukte mittels HPLC gereinigt werden können, müssen diese jedoch zuvor vollständig gelöst werden. Dieses Problem konnte umgangen werden, indem die Rohprodukte nicht mittels HPLC gereinigt wurden und deshalb nicht gelöst werden mussten. Jedoch entstanden mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren, nach der Zugabe der TFA:TIS-Lösung zu den nicht-gereinigten Rohprodukten, viele Nebenprodukte und beeinflussten dadurch die finale Ausbeute der Produkte **56–60** negativ.

Die fertig synthetisierten und mittels HPLC gereinigten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **61–65** wurden anschließend radiomarkiert und *in vitro* in humanem Serum auf ihre Stabilität und in Zelltests auf ihre Bindungseigenschaften (zwei der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere später auch *in vivo* in Nacktmäusen) getestet.

### 3.2.4 Radiomarkierung der hergestellten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere sowie der monomeren Vergleichssubstanz DOTA-PESIN mit <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> zur Durchführung von Serumstabilitätstests und *in vivo*-Versuchen

Die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **61–65** konnten erfolgreich mit <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> radiomarkiert werden, das durch die fraktionierte Elution eines <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generators erhalten wurde [111]. Die Radiomarkierung der Substanzen **61–65** wurde 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) und einem pH von 3.5 bis 4.0 durchgeführt. Die radiochemische Ausbeute betrug ohne weitere Reinigung  $\geq 95\%$ . Um Radiolyseeffekte zu vermeiden, wurden die radiomarkierten Substanzen mittels C<sub>18</sub>-Light Kartusche (SepPak, Waters), durch Auftragung, Spülen mit H<sub>2</sub>O und Elution mit EtOH, gereinigt. In wässrigen Lösungen kann es aufgrund von Radiolyse, die durch Radioaktivität ausgelöst wird, zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen und dadurch zu einer beschleunigten Zersetzung der radiomarkierten Substanzen kommen, was sich jedoch durch deren Überführung in EtOH vermeiden lässt [112-113]. Vorversuche mit BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimeren und -Monomeren, die in ihrer wässrigen Radiomarkierungslösung stehen gelassen wurden ohne diese zuvor durch eine Kartuschenreinigung in das Lösungsmittel EtOH zu überführen, haben gezeigt, dass die meisten auf diese Weise behandelten BBN<sub>(7-14)</sub>-Analoge deutlich schneller zerfielen, als die BBN<sub>(7-14)</sub>-Analoge, die über eine Kartuschenreinigung in EtOH überführt wurden. Die Substanzen **61–65** konnten ausgehend von einer Startaktivität von 162–190 MBq <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> in spezifischen Aktivitäten von 11 bis 13 GBq/μmol erhalten werden. Die radiomarkierten Substanzen **61–65** wurden anschließend für die Durchführung von Serumstabilitätstests verwendet. DOTA-PESIN, das in den *in vivo*-Versuchen als monomere Vergleichssubstanz diente, wurde ebenfalls auf seine Serumstabilität hin überprüft und konnte ausgehend von einer Startaktivität von 182 MBq mit einer spezifischen Aktivität von 12 GBq/μmol erhalten werden. Für die Durchführung der *in vivo*-Versuche wurden die Substanzen **64**, **65** und DOTA-PESIN erneut mit <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> radiomarkiert und ausgehend von einer Startaktivität von bis zu 315 MBq, wurden die Substanzen in maximalen spezifischen Aktivitäten von 21 GBq/μmol erhalten. Die Startaktivitäten waren während der Durchführung der *in vivo*-Versuche höher als während der Durchführung der Serumstabilitätstests, da zu niedrige spezifische Aktivitäten die Messergebnisse der *in vivo*-Versuche negativ beeinflussen können (dieser Sachverhalt wird im Kapitel 3.2.7. genauer erläutert).

### 3.2.5 Testung der Serumstabilität von Substanz **61–65** im humanen Serum

Nach ihrer Radiomarkierung mit <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> wurden die Serumstabilitäten der Substanzen **61–65** jeweils einmal mittels einer bestimmten Vorgehensweise untersucht:

- i) Zugabe der jeweiligen Substanz zu 37 °C warmen humanem Serum,
- ii) Entnahme eines Aliquots aus der Serum-Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten (die ersten 90 Minuten jeweils alle 10 Minuten und ein weiteres Mal nach 120 Minuten),
- iii) Fällung der Serumproteine bei 0 °C in EtOH,
- iv) Abtrennung der Serumproteine über Zentrifugation (die Radioaktivität der Serumproteine wurde untersucht, um auszuschließen, dass die radiomarkierte Substanz zusammen mit den Serumproteinen ausgefällt wurde) und
- v) Untersuchung des flüssigen Überstandes mittels radioanalytischer HPLC.

Die untersuchten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **61–64**, in denen Mercaptoessigsäure ein Teil der Linkerstruktur ist, zeigten während der Serumstabilitätstests die Tendenz stabiler zu sein als Substanz **65**. Nach 120 Minuten waren von den Substanzen **61–64**  $\geq 68$  % intakt (**61** = 84 %, **62** = 68 %, **63** = 81 % und **64** = 88 %), während die Vergleichssubstanz **65** dagegen nach 120 Minuten nur zu 36 % intakt war. Diese Beobachtung ist eine erste Bestätigung für die These, dass Cystein enthaltende Substanzen im Vergleich zu Mercaptoessigsäure enthaltenden Substanzen instabiler sind. Die unterschiedliche Stabilität der Substanzen **61–64** im Vergleich zu der Substanz **65** kommt vermutlich dadurch zustande, dass Peptid-zersetzende Enzyme Peptide, die natürliche Aminosäuren enthalten, leichter zersetzen können als Peptide, die unnatürliche Aminosäuren enthalten. DOTA-PESIN, die einzige monomere Substanz, war nach 120 Minuten im humanen Serum noch zu 81 % intakt.

In Abbildung 27 sind die Chromatogramme der radioanalytischen HPLC der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **64** und **65** nach den Zeitpunkten 0, 60 und 120 Minuten gezeigt, die im Gegensatz zu den anderen BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimeren in *in vivo*-Experimenten (in denen die Serumstabilität der Substanzen eine wichtige Rolle spielt) getestet wurden und deshalb für einen bildlichen Vergleich gewählt wurden.

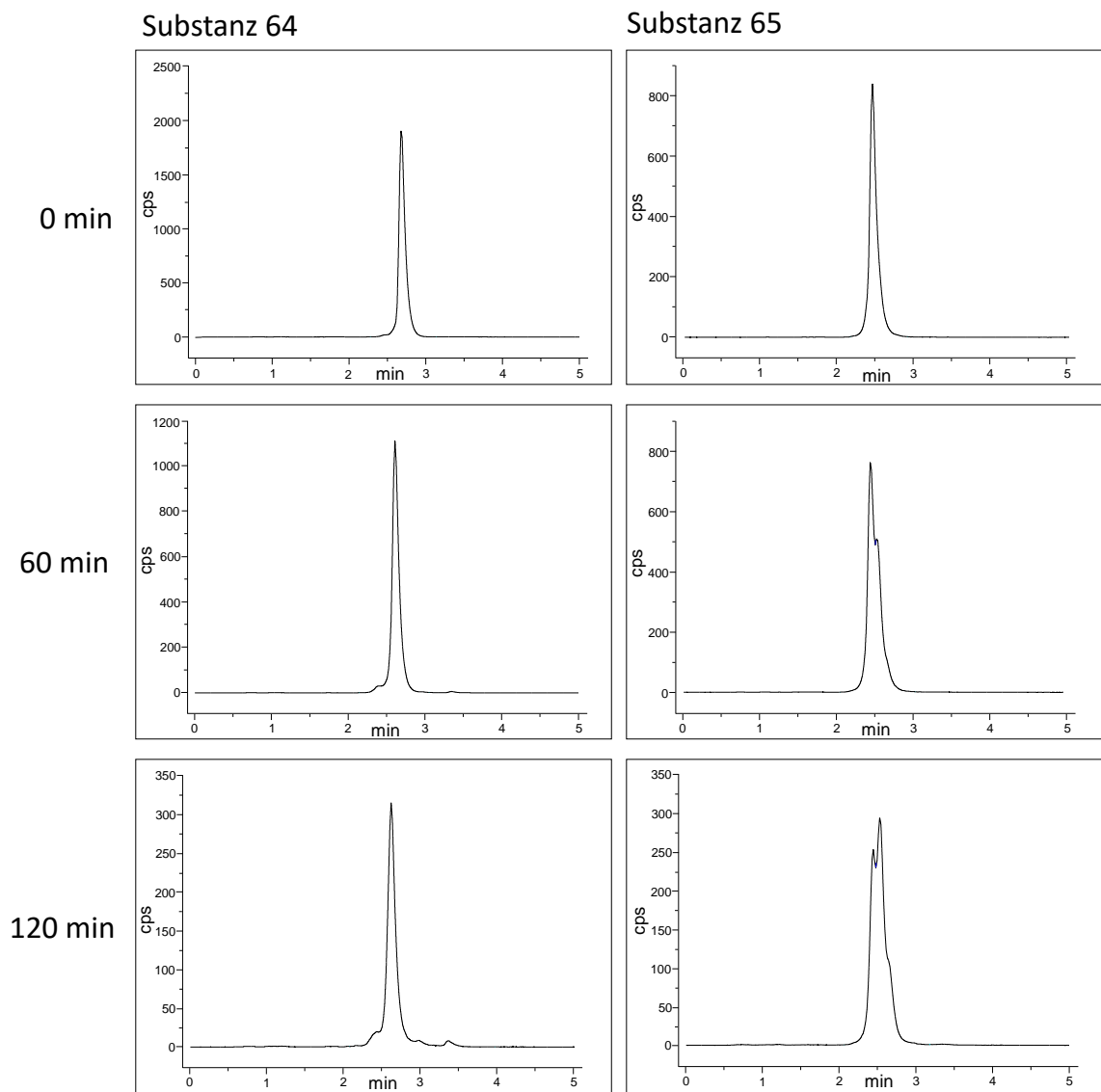


Abbildung 27: Radio-HPLC-Chromatogramme der Substanzen 64 und 65 nach jeweils 0, 60 und 120 Minuten (cps = counts per second, n = 1).

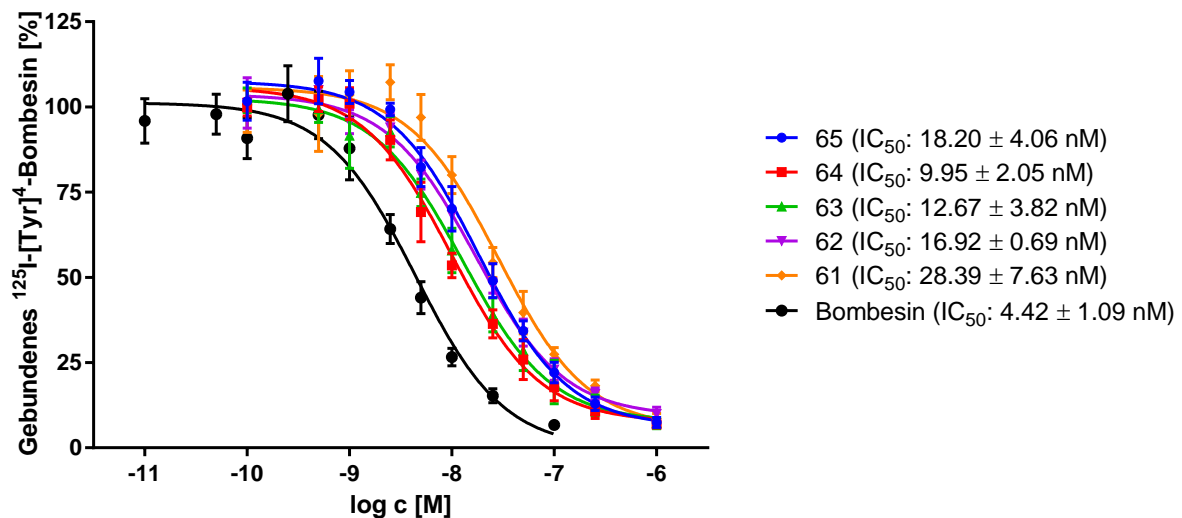
Wie in Abbildung 27 leicht zu erkennen ist, und wie bereits erwähnt wurde, unterscheiden sich die Stabilitäten der Substanzen mit der Verknüpfungseinheit Mercaptoessigsäure sehr stark von der Stabilität der Vergleichssubstanz, die Cystein als Verknüpfungseinheit enthält. Die höhere Stabilität von Substanz **64** (die nach 120 Minuten noch zu 88% intakt war), im Vergleich zu der Stabilität von Substanz **65** (die nach 120 Minuten nur noch zu 36 % intakt war), sollte sich theoretisch auch deutlich in *in vivo*-Messungen durch eine höhere Anreicherung und eine längere Verweildauer am Ort der Anreicherung bemerkbar machen. Es wurde erwartet, dass sich dies auch in PET-Messungen beobachten lässt (siehe Kapitel 3.2.7).

Im nächsten Schritt wurden mit den Substanzen **61–65** Bindungsstudien mit PC<sub>3</sub>-Zellen durchgeführt, um die Bindungsaviditäten der einzelnen Substanzen zu ermitteln.

### 3.2.6 Testung der Substanzen 61–65 in Bindungsstudien

Die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **61–65** wurden in einem kompetitiven Zellbindungsassay an humanen PC<sub>3</sub>-Prostatakarzinomzellen getestet, um das BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer mit den besten Bindungseigenschaften zu ermitteln. Während der Durchführung dieser Tests wurde zu einer definierten Anzahl von Zellen (die auf einer 96-Well Platte in die einzelnen Wells gegeben wurden) zunächst eine definierte Menge an <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin gegeben. Danach wurde in jedes einzelne Well der 96-Well Platte eine definierte Menge eines BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimers gegeben und diese wurde für eine Stunde auf einen „Schüttler“ gelegt, der die Flüssigkeiten in den Wells gleichmäßig durchmischte. Während dieser Zeit hatte das <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin und das jeweilige BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer die Möglichkeit an die GRP-Rezeptoren auf der PC<sub>3</sub>-Zelloberfläche zu binden, bzw. die jeweils andere Substanz zu verdrängen. In der Zeit von einer Stunde konnte sich ein Gleichgewicht zwischen beiden bindenden Substanzen ausbilden. Wie dieses Gleichgewicht letztendlich aussieht (wie viel <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin und wie viele BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere auf der Zelloberfläche binden), hängt davon ab, wie gut die Bindungsaffinität bzw. Bindungsavidität der jeweiligen Substanz ist und in welcher Menge sie im Well vorliegt. Nach Beendigung der Kompetition wurden die nicht gebundenen Substanzen aus den Wells entfernt. Die Wells wurden aus der 96-Well Platte „gestanzt“ und die Aktivität jedes einzelnen Wells wurde anschließend mit Hilfe eines  $\gamma$ -Counters bestimmt. Da <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin die einzige radioaktive Substanz war, die während der *in vitro*-Versuche verwendet wurde, konnte die Menge der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere, die auf den Zellen gebunden hatte, berechnet werden. Die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **61–65** wurden in Konzentrationen zwischen 0–1  $\mu$ M in die Wells zu den Zellen gegeben (ein Well in dieser Testreihe enthielt nur radioaktives <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin zur Bestimmung des Bindungsmaximums von <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin) und für jede getestete Substanz und jede eingesetzte Konzentration wurde anschließend ein eigenes Gleichgewicht ermittelt. Alle ermittelten Gleichgewichte wurden als Datenpunkt in ein Diagramm (in dem das gebundene <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin gegen den logarithmischen Wert der Konzentration *c* aufgetragen wurde) eingetragen. Für jeden Datenpunkt wurden mindestens drei Messungen gleichzeitig durchgeführt, um die statistische Abweichung berechnen zu können. Zudem wurden die Messungen zum Erhalt der Datenpunkte zusätzlich an drei verschiedenen Tagen durchgeführt, um Fehler durch äußere Einflüsse ausschließen zu können. Dadurch wurden für jeden einzelnen Datenpunkt mindestens neun verschiedene Messergebnisse erhalten, was die Berechnung von statistischen Fehlern ermöglichte. Durch die einzelnen Datenpunkte wurden Bindungskurven gelegt, die für die Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>-Wert) benötigt wurden.

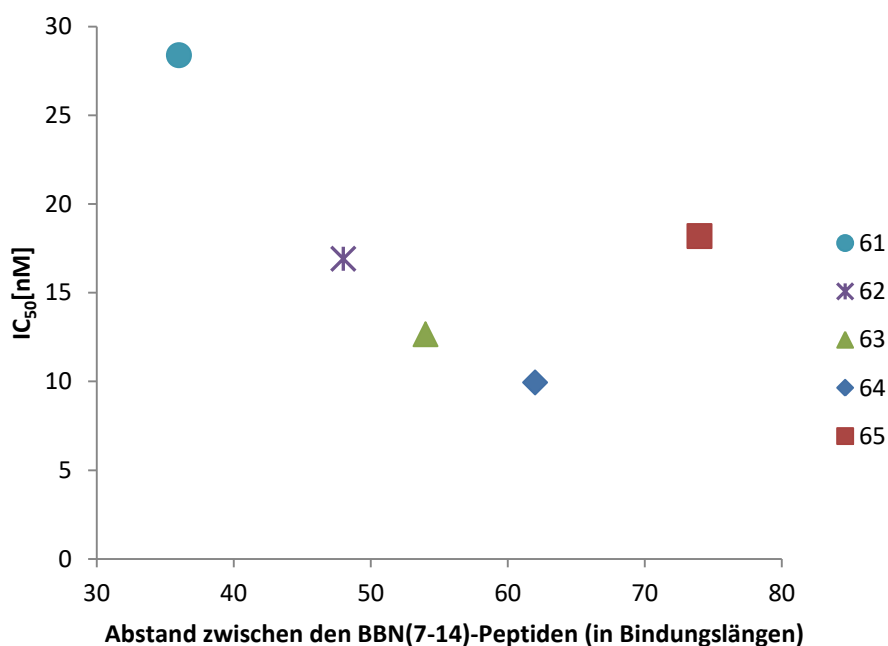
Der  $IC_{50}$ -Wert gibt an, an welchem Punkt der durch Zelltests ermittelten Kurve die Höhe der y-Achse genau 50 % beträgt. Dieser Wert wird als Maß für die Bindungsaffinität verschiedener Substanzen (wie beispielsweise der  $BBN_{(7-14)}$ -Dimere **61–65**) im Vergleich zu einer Testsubstanz (in dieser Arbeit  $^{125}I$ -[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin) verwendet. Die  $IC_{50}$ -Werte für die  $BBN_{(7-14)}$ -Dimere **61–65** und für ebenfalls getestetes, nicht radiomarkiertes, endogenes Bombesin, das als interner Standard diente, sind zusammen mit den Bindungskurven in Abbildung 28 gezeigt.



**Abbildung 28:** Bindungskurven und  $IC_{50}$ -Werte (die in einem kompetitiven Bindungsassay ermittelt wurden) der  $BBN_{(7-14)}$ -Dimere **61–65** und Bombesin ( $n = 9$ ).

Die Fehler der einzelnen ermittelten Datenpunkte sind, je nach Konzentrationsbereich, unterschiedlich groß. So zeigt sich in einem höheren Konzentrationsbereich (im Bereich von  $\log c$  [-8]–[-6]) ein geringer Fehler, der dadurch zu erklären ist, dass sich Fehler während der Versuchsdurchführung (wie z. B. beim Pipettieren der Substanzen) nicht so stark bemerkbar machen, wie in den niedrigen Konzentrationsbereichen ( $\log c$  [-11]–[-8]). Es gibt unter den Fehlern einzelne Ausreißer, in denen die Datenpunkte um bis zu 10 % nach oben oder nach unten abweichen. Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass die Fehler nicht auf große Unregelmäßigkeiten während der Versuchsdurchführung und der Auswertung hindeuten, die die Messergebnisse in Frage stellen würden.

In Abbildung 29 wurden die  $IC_{50}$ -Werte der  $BBN_{(7-14)}$ -Dimere **61–65** gegen den jeweiligen, in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Abstand (in Bindungslängen) der  $BBN_{(7-14)}$ -Peptide zueinander, in einem Diagramm aufgetragen, um den Zusammenhang zwischen dem Peptid-Abstand und den ermittelten Bindungsaviditäten zu verdeutlichen.

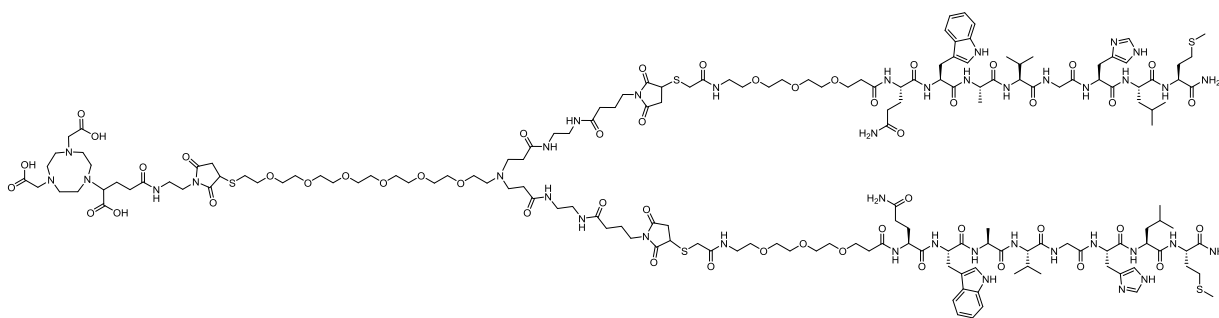


**Abbildung 29: Grafische Darstellung der IC<sub>50</sub>-Werte in Relation zu den Abständen zwischen den Peptiden des jeweiligen BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimers 61–65.**

Bei Betrachtung der IC<sub>50</sub>-Werte wird ersichtlich, dass Substanz **65**, welche in der Studie von Lindner et al. <sup>[36]</sup> die höchste Bindungsavidität aller getesteten BBN<sub>(7-14)</sub>-Derivate hatte, in dieser Arbeit nicht die höchste Bindungsavidität zu den GRP-Rezeptoren der PC<sub>3</sub>-Zellen besaß und damit nicht den optimalsten Abstand zwischen den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden hatte. Eine deutliche Verbesserung der Bindungsavidität konnte bei Substanz **64** festgestellt werden, für die ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $9.95 \pm 2.05$  nM ermittelt wurde (und die ein Peptid-Abstand von 62 Bindungen vorweist) und der im Vergleich zu dem IC<sub>50</sub>-Wert von Verbindung **65** ( $18.20 \pm 4.06$  nM, mit einem Peptid-Abstand von 74 Bindungen) nur etwa halb so hoch ist. Die getesteten Substanzen **61**, **62** und **63**, deren Bindungsabstände von jeweils 54, 48 und 36 im Vergleich zu denen der Substanzen **64** und **65** kürzer sind, wiesen alle mit IC<sub>50</sub>-Werten von jeweils  $28.39 \pm 7.63$ ,  $16.92 \pm 0.69$  und  $12.67 \pm 3.82$  schlechtere Werte als Substanz **64** auf. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das Optimum des Peptid-Abstandes bei, oder nahe bei 62 Bindungen liegt und die Bindungsavidität der getesteten Substanzen proportional zu der Differenz vom optimalen Peptid-Abstand abnimmt.

Durch die Testung der verschiedenen BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere konnte das in Abbildung 30 gezeigte BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer **64**, das zu PC<sub>3</sub>-Zellen die höchste Bindungsavidität aller getesteten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere besitzt, ermittelt werden.





**Abbildung 30: Strukturformel des BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimers (64) mit der höchsten, in *in vitro*-Tests ermittelten, Bindungsavidität, aller in dieser Arbeit getesteten Substanzen.**

Die Tatsache, dass es einen optimalen Abstand zwischen den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden im Dimer gibt, lässt sich auf sterische Hinderung und Entropie-Effekte zurückführen, die bei BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimeren mit einem größerem Peptid-Abstand als dem Optimum zunehmen und irgendwann so groß sind, dass diese negative Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften haben (Vergleich Substanz **64** und **65**). Aber auch bei Substanzen mit geringeren Bindungsabständen als dem Optimum, wie es bei den Substanzen **61–63** der Fall ist, werden negative Einflüsse auf die Bindungseigenschaften beobachtet, obwohl die negativen Einflüsse durch sterische Hinderung und die entropischen Effekte geringer sein sollten, als im Vergleich zu Substanz **64**. Dies könnte auf die Anordnung der GRP-Rezeptoren auf der PC<sub>3</sub>-Tumorzelloberfläche zurückzuführen sein. Denn dadurch, dass die GRP-Rezeptoren keine Cluster bilden <sup>[36]</sup> und während der *in vitro*-Experimente ihre Abstände zueinander nur gering oder gar nicht ändern, haben Dimere mit einem zu geringem Abstand zwischen den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden eine geringe Wahrscheinlichkeit mit beiden BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden gleichzeitig zu binden, was sich negativ auf die Bindungsavidität auswirken kann.

Die Bindungsavidität der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere ist aber sehr wahrscheinlich auch abhängig von der lokalen Konzentration der GRP-Rezeptoren auf der PC<sub>3</sub>-Zelloberfläche, da mit steigender Konzentration auch der durchschnittliche Abstand zwischen den GRP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche abnehmen und umgekehrt bei abnehmender Rezeptor-Konzentration zunehmen sollte. Das gefundene Optimum des Abstandes zwischen den Peptiden der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere, das zu der höchsten Bindungsavidität führt, gilt daher nur für PC<sub>3</sub>-Zellen. Für andere GRP-Rezeptor exprimierende Zellen (mit einer GRP-Rezeptor-Konzentration auf der Zelloberfläche, die von der der PC<sub>3</sub>-Zellen abweicht) ist es somit ratsam das Optimum des Abstandes zwischen zwei GRP-Rezeptor bindenden Peptiden im Dimer neu zu bestimmen.

### 3.2.7 Evaluierung des BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimers **64** *in vivo*

Die höhere Bindungsavidität von Substanz **64** (im Vergleich zu den Substanzen **61–63** und **65**), die während der *in vitro*-Versuche ermittelt wurde, sollte sich auch *in vivo* durch eine bessere Tumoranreicherung bemerkbar machen. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden die Substanzen <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN (das als monomeres Goldstandard diente), [<sup>68</sup>Ga]**64** (das in dieser Arbeit die besten Bindungseigenschaften in den *in vitro*-Tests zeigte) und [<sup>68</sup>Ga]**65** (das in der Publikation von Lindner et al. die besten Bindungseigenschaften im Vergleich zu anderen Di-, Tetra- und Oktameren sowie auch gegenüber dem monomeren <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN gezeigt hat) <sup>[36]</sup> in PC<sub>3</sub>-tumortragenden weiblichen CD1 nu/nu Mäusen getestet. Jede einzelne Substanz wurde an fünf verschiedenen Mäusen getestet. Zusätzlich wurde mit drei Mäusen ein Blockade-Experiment durchgeführt, während dessen den Mäusen die Substanz [<sup>68</sup>Ga]**64** und Bombesin gleichzeitig appliziert wurde. Insgesamt kamen 18 Mäuse während der *in vivo*-Experimente zum Einsatz. Nach der Durchführung der PET-Messungen wurden die PET-Bilder mit Hilfe der Software PMod 3.6 ausgewertet, um die Anreicherung der untersuchten Substanzen <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN, [<sup>68</sup>Ga]**64** und [<sup>68</sup>Ga]**65** in den Bereichen, in denen sich der Tumor, das Herz, die Leber, die Niere, Muskeln und Knochen befanden, zu ermitteln. Die Daten wurden in Form von Zahlenwerten (in der Einheit kBq/cc) erhalten. Diese Zahlenwerte wurden anschließend mittels Microsoft Excel 2007 ausgewertet, sodass Zeit-Aktivitätskurven und Tumor-zu-Organ-Verhältnisse ermittelt und grafisch dargestellt werden konnten (siehe Abbildung 31).

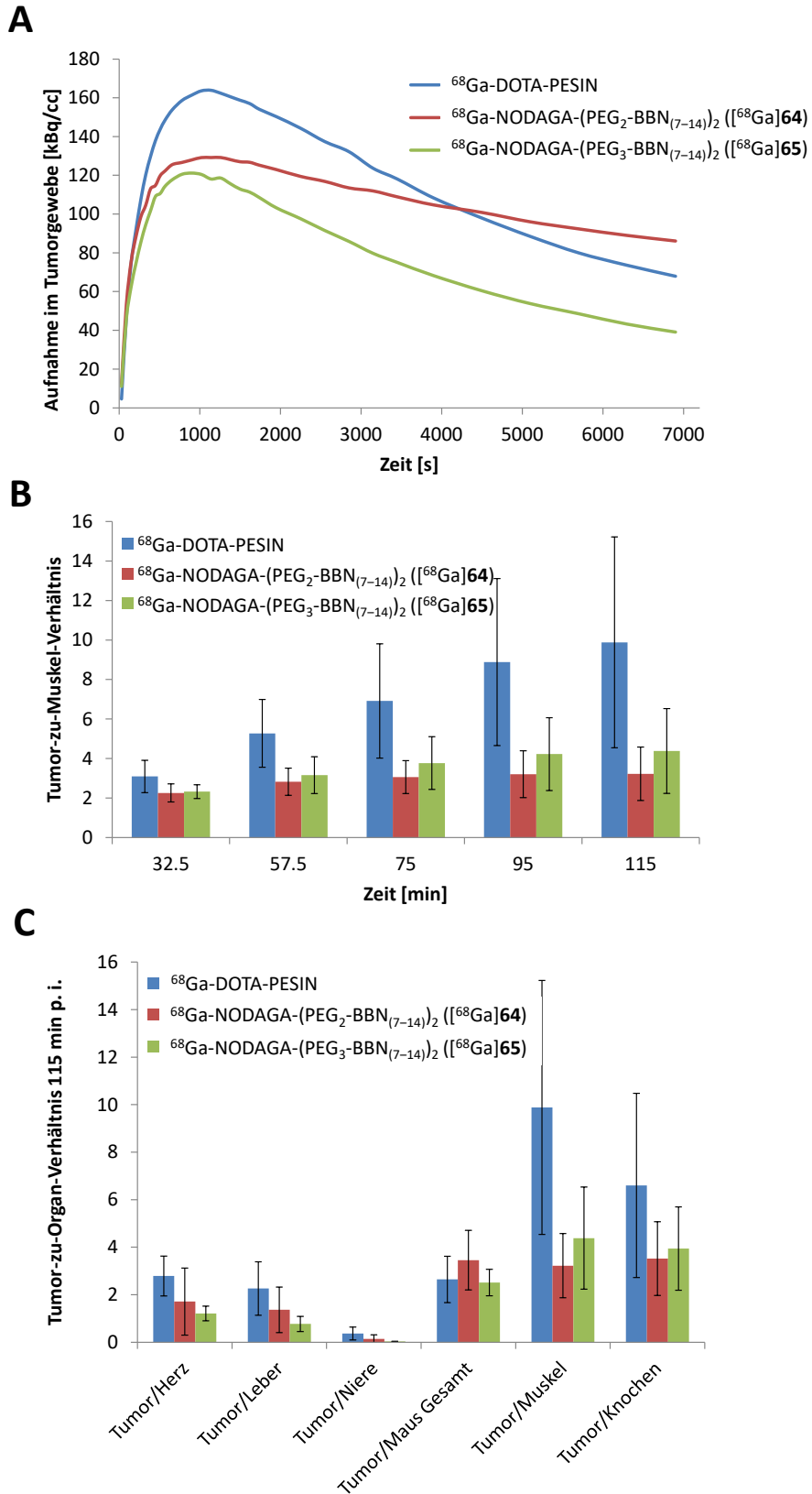


Abbildung 31: Abgebildet sind die Zeit-Aktivitätskurven für das Tumorgewebe (A), die Tumor-zu-Muskel-Verhältnisse zu verschiedenen Zeitpunkten (B) und die Tumor-zu-Organ Verhältnisse nach 115 Minuten *p. i.* (post injection) der Substanzen  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PESIN ( $n = 5$ ),  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-(PEG<sub>2</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>)<sub>2</sub> ( $^{68}\text{Ga}$ ]64) ( $n = 5$ ) und  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-(PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>)<sub>2</sub> ( $^{68}\text{Ga}$ ]65) ( $n = 5$ ).

In Abbildung 32 sind die PET-CT-Bilder der PC<sub>3</sub>-tumortragenden Mäuse zu sehen, denen [<sup>68</sup>Ga]64, [<sup>68</sup>Ga]65 oder <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN verabreicht wurde. Zusätzlich wurde mit einer Maus ein Blockade-Experiment durchgeführt.

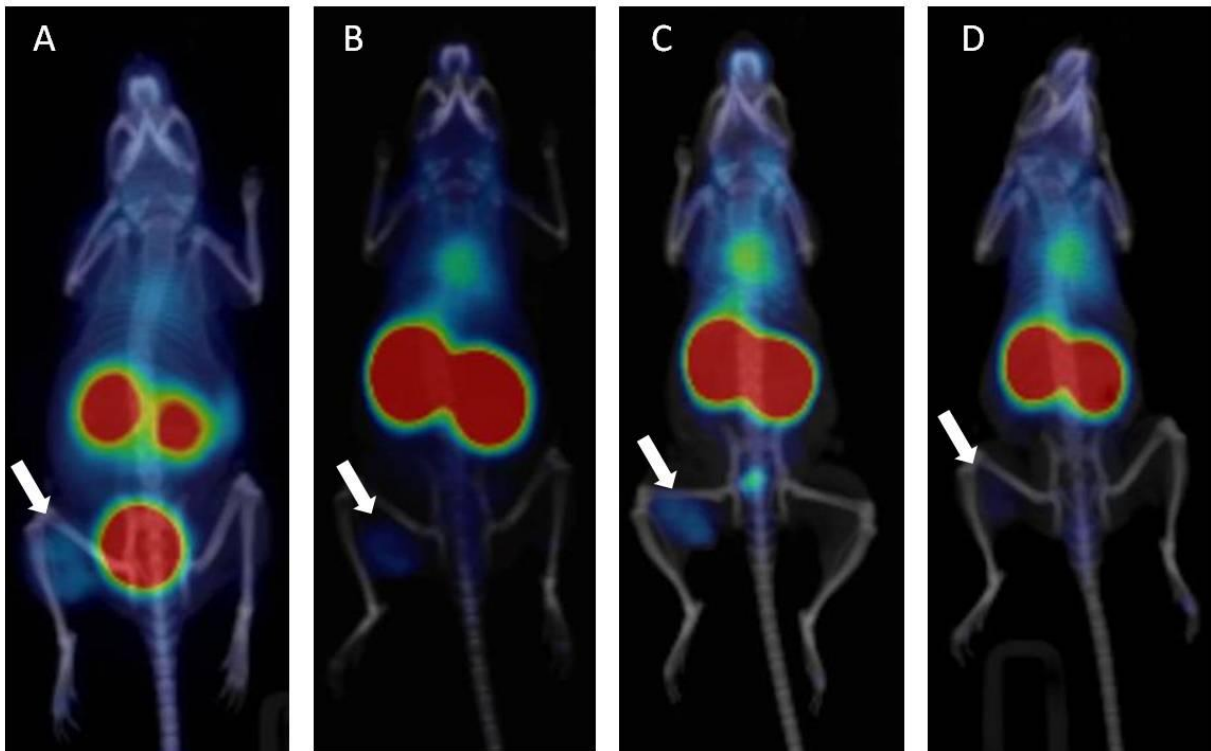


Abbildung 32: Untersuchung der einzelnen Tracer <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN (A), <sup>68</sup>Ga-NODAGA-(PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>)<sub>2</sub> ([<sup>68</sup>Ga]65) (B) und <sup>68</sup>Ga-NODAGA-(PEG<sub>2</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>)<sub>2</sub> ([<sup>68</sup>Ga]64) (C) in PC<sub>3</sub>-tumortragenden Nacktmäusen mittels PET-CT. Abbildung D zeigt das Blockade-Experiment von [<sup>68</sup>Ga]64. Die einzelnen Abbildungen (A, B, C, D) zeigen jeweils die *Maximum Intensity Projections (MIPs)* über einen Untersuchungszeitraum von 120 Minuten.

In Tabelle 4 sind die Tumor-zu-Organverhältnisse der Substanzen <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN, [<sup>68</sup>Ga]64 und [<sup>68</sup>Ga]65 zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt.

Tabelle 4: Tumor-zu-Organ-Verhältnisse zu verschiedenen Zeitpunkten p. i..

Zeitpunkte [s]	<sup>68</sup> Ga-DOTA-PESIN			
	Tumor/Muskel	Tumor/Herz	Tumor/Leber	Tumor/Niere
3450	5.27 ± 1.71	1.37 ± 0.32	1.40 ± 0.53	0.24 ± 0.23
4500	6.91 ± 2.89	1.70 ± 0.38	1.63 ± 0.69	0.30 ± 0.26
5700	8.88 ± 4.23	2.16 ± 0.55	1.93 ± 0.91	0.32 ± 0.22
6900	9.88 ± 5.34	2.79 ± 0.84	2.26 ± 1.13	0.37 ± 0.27
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-(PEG <sub>2</sub> -BBN <sub>(7-14)</sub> ) <sub>2</sub> ([ <sup>68</sup> Ga]64)			
	Tumor/Muskel	Tumor/Herz	Tumor/Leber	Tumor/Niere
3450	2.82 ± 0.69	1.04 ± 0.50	1.09 ± 0.52	0.15 ± 0.19
4500	3.06 ± 0.83	1.22 ± 0.70	1.16 ± 0.62	0.14 ± 0.18
5700	3.20 ± 1.19	1.45 ± 1.04	1.26 ± 0.81	0.14 ± 0.18
6900	3.22 ± 1.35	1.71 ± 1.41	1.37 ± 0.96	0.14 ± 0.17
	<sup>68</sup> Ga-NODAGA-(PEG <sub>3</sub> -BBN <sub>(7-14)</sub> ) <sub>2</sub> ([ <sup>68</sup> Ga]65)			
	Tumor/Muskel	Tumor/Herz	Tumor/Leber	Tumor/Niere
3450	3.16 ± 0.93	0.81 ± 0.08	0.84 ± 0.18	0.07 ± 0.02
4500	3.77 ± 1.33	0.91 ± 0.11	0.84 ± 0.24	0.05 ± 0.02
5700	4.22 ± 1.84	1.06 ± 0.20	0.84 ± 0.31	0.04 ± 0.01
6900	4.38 ± 2.15	1.21 ± 0.31	0.77 ± 0.32	0.03 ± 0.01

Insgesamt lässt sich bei Betrachtung der Diagramme in Abbildung 31, der PET-Bilder in Abbildung 32 und der Tumor-zu-Organ-Werte in Tabelle 4 feststellen, dass die erhaltenen Ergebnisse der *in vivo*-Experimente nicht mit den Erwartungen (dass die BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere bessere Tumor-zu-Organ und Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse besitzen als das monomere DOTA-PESIN) überein stimmen. Weiterhin stimmen die hier gewonnenen Ergebnisse auch nicht mit denen der Vorgängerstudie von Lindner et al. überein <sup>[36]</sup>. Zudem sind die Ergebnisse nur begrenzt aussagekräftig, da die ermittelten Standardabweichungen teilweise sehr groß sind. Insbesondere bei Substanz [<sup>68</sup>Ga]64 und [<sup>68</sup>Ga]65 hätten sich in weiteren Messungen aufgrund statistischer Unregelmäßigkeiten auch gegenteilige Ergebnisse ergeben können, wodurch eine andere Ergebnis-Interpretation möglich gewesen wäre. Die Standardabweichung von <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN ist ebenfalls sehr groß, teilweise sogar bis zu ca. 50 %. Dies wiederum spricht ebenfalls dafür, dass sich mit Hilfe der erhaltenen *in vivo*-

Daten nur sehr vage Aussagen über das Anreicherungsverhalten der getesteten Substanzen machen lassen.

Wenn die Ergebnisse trotz ihres hohen Fehlers ausgewertet und interpretiert werden, dann lässt sich folgendes feststellen: Die Substanz [<sup>68</sup>Ga]**64** hat nach 70 min eine höhere absolute Tumoranreicherung als [<sup>68</sup>Ga]**65** und <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN (Abbildung 31 A). Bei den Tumor-zu-Herz, Tumor-zu-Leber und Tumor-zu-Maus-Verhältnissen sind minimale Verbesserungen durch Verwendung von [<sup>68</sup>Ga]**64** anstelle der Vergleichssubstanz [<sup>68</sup>Ga]**65** erreicht worden, jedoch wurden mit Verbindung [<sup>68</sup>Ga]**64** keine Verbesserungen im Tumor-zu-Muskel und Tumor-zu-Knochen Verhältnis erzielt (Abbildung 31 B und C, Tabelle 4). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hohe Anreicherung von [<sup>68</sup>Ga]**64** und [<sup>68</sup>Ga]**65** im Muskel- und Organewebe in einer hohen Hintergrundstrahlung resultiert, die sich negativ auf den Tumor-zu-Hintergrund-Kontrast auswirkt, wodurch sich die Tumoren in den PET-Bildern schwerer vom umliegenden Gewebe abgrenzen lassen. Dies ist z. B. sehr deutlich in den PET-Bildern der Abbildung 32 zu sehen. Das mit den Substanzen [<sup>68</sup>Ga]**64** und [<sup>68</sup>Ga]**65** im Vergleich zu der monomeren Substanz <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN kein eindeutigeres Ergebnis erhalten werden konnte und sich das Tumorgewebe nur schwer vom umliegenden Gewebe abgrenzen lässt, könnte auf eine hohe unspezifische Anreicherung sowie auf eine hohe Blutverweildauer der dimeren Substanzen zurückzuführen sein. Ein Test, der die These über die höhere Blutverweildauer der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere im Vergleich zum DOTA-PESIN untermauert, wurde während der *in vitro*-Tests mit humanen Serum durchgeführt. Während der Serumstabilitätstests wurden nicht nur die Stabilitäten der Substanzen **61–65** und des DOTA-PESINs untersucht, sondern es wurde durch das Ausmessen der Radioaktivität der ausgefällten Serumproteine auch untersucht, welche Menge der jeweiligen radiomarkierten Substanz an den Serumproteinen „haften“ geblieben ist. Dieser Test wurde wie folgt durchgeführt: Nach Ausfällung der Serumproteine mittels EtOH wurde der flüssige Überstand entfernt. Das Proteinpellet wurde durch Spülen mit EtOH von nicht gebundener Aktivität getrennt und anschließend auf seine Radioaktivität überprüft. Dabei zeigte keines der Proteinpellets, die 10 Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanz aus einer Serumprobe erhalten wurden, eine erhöhte Bindungsaffinität an Serumproteine. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist somit nicht erkennbar, dass eine der getesteten Substanzen wegen einer hohen Bindung an Serumproteine dazu neigt, lange im Blut der Mäuse zu verbleiben.

Ein weitere Möglichkeit, die längere Blutverweildauer der [<sup>68</sup>Ga]BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere im Vergleich zum monomeren <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN nachzuweisen, ist die Auswertung der

Biodistributionsdaten der Mäuse (die Biodistributionen wurden im Anschluss an die PET-Messungen durchgeführt). Im Blut der Mäuse, die zuvor eine der dimeren Substanzen verabreicht bekommen hatten, wurde eine höhere Aktivität festgestellt, als im Blut der Mäuse, denen  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PESIN appliziert wurde. Jedoch sind diese Ergebnisse kein eindeutiger Beweis für die längere Blutverweildauer der [ $^{68}\text{Ga}$ ]BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere im Vergleich zu dem monomeren  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PESIN, da die Biodistributionen der Mäuse nicht standardisiert durchgeführt wurden, sondern diese zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Radiotracergabe durchgeführt wurden. Dadurch ist kein wissenschaftlich zu rechtfertigender Vergleich zwischen den Biodistributionsdaten möglich. Diese Biodistributionsdaten dienten zur Kontrolle und zur leichteren Auswertung der PET-Bilder und sind deshalb auch nicht in dieser Arbeit gezeigt.

Neben der langen Blutverweildauer gibt es noch weitere Ursachen, die für den unzureichenden Tumor-zu-Hintergrund-Kontrast der Substanzen  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PESIN, [ $^{68}\text{Ga}$ ]64 und [ $^{68}\text{Ga}$ ]65 verantwortlich sein könnten. Das selbst die Ergebnisse des  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-PESINs nicht mit denen der Vorgängerstudie <sup>[36]</sup> vergleichbar sind, könnte darauf hinweisen, dass möglicherweise das verwendete Studienmodell für die unerwarteten Ergebnisse verantwortlich ist. Eine unzureichende Bindung der Substanzen kann auftreten, wenn sich die GRP-Rezeptordichte auf der PC<sub>3</sub>-Zelloberfläche *in vivo* verändert. Das die GRP-Rezeptordichte der PC<sub>3</sub>-Zellen nicht die selbe ist, wie während der *in vitro*-Versuche, könnte durch den Einsatz von weiblichen CD1 nu/nu Mäusen begünstigt worden sein. Diese CD1 nu/nu Mäuse kamen während der praktischen Arbeiten dieser Dissertation in den *in vivo*-Versuche zum Einsatz. Im Unterschied dazu wurden in der Studie von Lindner et al. (in der die *in vivo*-Versuche erfolgreich waren) männliche SCID Mäuse verwendet <sup>[36]</sup>. Die Vermutung, dass die Verwendung von weiblichen Mäusen während der *in vivo*-Versuche Probleme verursachen kann, lässt sich wie folgt begründen: Bei PC<sub>3</sub>-Zellen handelt es sich um Prostatakarzinomzellen, und da Prostatazellen (und somit auch Prostatakarzinomzellen) natürlicherweise nur im männlichen Organismus vorkommen, sind die PC<sub>3</sub>-Zellen bei Studien im weiblichen Tier einer veränderten hormonellen Umgebung ausgesetzt. Diese veränderte hormonelle Umgebung könnte sich auch auf das Rezeptor-Expressionsverhalten der PC<sub>3</sub>-Zellen auswirken und dadurch die GRP-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche verändern. Wenn sich die Rezeptordichte auf der Tumorzelloberfläche verändert, dann führt das im Fall von dimeren BBN-Analoga dazu, dass das in den *in vitro*-Versuchen ermittelte Optimum des Abstandes zwischen zwei BBN-Peptiden nicht zu der gewünschten verbesserten Anreicherung *in vivo* führt. Jedoch gab es in der Vergangenheit Studien über Bombesin-

Analoga, die trotz der Verwendung von PC<sub>3</sub>-tumortragenden weiblichen CD1 nu/nu Mäusen vielversprechende und auswertbare Ergebnisse in den *in vivo*-Experimenten präsentieren konnten, was zeigt, dass es durchaus möglich ist mit diesem Tumormodell Versuche durchzuführen, ohne dass es zu negativen Einflüssen kommt <sup>[114-117]</sup>.

Eine Veränderung der GRP-Rezeptordichte auf der PC<sub>3</sub>-Zelloberfläche kann auch eintreten, wenn sich die Zellen durch häufiges Teilen genetisch verändern, wie während des Züchtens von Zellen in Zellkulturflaschen. Jedoch wurde während der Durchführung der *in vivo*-Versuche darauf geachtet, dass dieselbe Zellpassage verwendet wurde, die auch während der *in vitro*-Versuche zum Einsatz kam. Deshalb ist eine Veränderung der PC<sub>3</sub>-Zellen während der Zucht wenig wahrscheinlich.

Ein weiterer Grund für ein unzureichendes Anreicherungsverhalten der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere könnte auch auf die niedrige spezifische Aktivität der applizierten Substanzen <sup>68</sup>Ga-DOTA-PESIN, [<sup>68</sup>Ga]**64** und [<sup>68</sup>Ga]**65** zurückzuführen sein, die in dieser Dissertationsarbeit zwischen 15.8 und 21.0 GBq/μmol lag. Lindner et al. konnten das BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer **65** und das DOTA-PESIN nach der Radiomarkierung in spezifischen Aktivitäten zwischen jeweils 38–39 GBq/μmol bzw. 76–79 GBq/μmol erhalten <sup>[36]</sup>. Eine nicht ausreichend hohe spezifische Aktivität wird als der wahrscheinlichste Grund für den Erhalt der nicht reproduzierbaren und wenig aussagekräftigen Ergebnisse der *in vivo*-Versuche gesehen. Warum eine zu niedrige spezifische Aktivität einen negativen Einfluss auf die Qualität der PET-Bilder haben kann, lässt sich folgendermaßen erklären: Die spezifische Aktivität gibt an in welcher Menge der Radiotracer im Vergleich zu der Gesamtmenge der pharmakokinetisch aktiven Substanz vorliegt <sup>[118]</sup>. Bei einem zu hohen Anteil an nicht radiomarkierter Substanz (d. h. bei einer zu niedrigen spezifischen Aktivität) kann es dazu kommen, dass die Zelloberflächenrezeptoren, auf denen der Radiotracer bindet, mit „kalter“ (= nicht radiomarkierter) Substanz gesättigt werden. Das wiederum führt dazu, dass zu wenig der radiomarkierten Substanz an den Rezeptoren binden kann und diese deshalb ungebunden im Blut zirkuliert (was sich in den PET-Bildern durch einen hohen Hintergrund und eine schlechte Anreicherung im Tumor bemerkbar macht).

Eine weitere Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere ist durch Veränderung der Abstände zwischen den BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptiden nicht zu erwarten, da die Substanz mit dem optimalen Peptid-Abstand bereits ermittelt werden konnte (Substanz **64**) und kleinste Veränderungen in der Linkerstruktur (und damit im Peptid-Abstand) bereits negative Auswirkungen auf die Avidität zeigen. Da die *in vivo*-Ergebnisse nicht nur die



Erwartungen nicht erfüllen konnten, sondern im Widerspruch zu den von Lindner et al. publizierten Ergebnissen stehen <sup>[36]</sup>, sollten die in dieser Arbeit präsentierten *in vivo*-Ergebnisse nicht zu dem Schluss führen, dass die untersuchten bivalenten BBN<sub>(7-14)</sub>-Substanzen unzureichende pharmakokinetische Eigenschaften für zukünftige Diagnostik am PET besitzen. Stattdessen sollte untersucht werden welche äußeren Einflüsse (wie z. B. die Gattung der Mäuse, die GRP-Rezeptordichte von PC<sub>3</sub>-Zellen und insbesondere die spezifischen Aktivitäten der verabreichten Radiotracer) Auswirkungen auf die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche haben.

### 3.2.8 Schlussfolgerung

Es konnten erfolgreich vier neue, auf Bombesin-Analoga basierende, bivalente Verbindungen hergestellt werden. Diese Bombesin-Analoga enthielten jeweils zwei BBN<sub>(7-14)</sub>-Peptide, wobei diese Peptide, je nach Substanz, einen unterschiedlich großen Abstand zueinander besaßen. In Bindungsstudien wurde nachgewiesen, dass der Peptid-Abstand der BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere einen Einfluss auf die Bindungsavidität zu den GRP-Rezeptoren von PC<sub>3</sub>-Zellen hat. Zudem konnte das BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer mit dem optimalen Bindungsabstand ermittelt werden, dessen Bindungsavidität zu den GRP-Rezeptoren der PC<sub>3</sub>-Zellen am höchsten ist. In anschließenden *in vivo*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Substanz, die in *in vitro*-Versuchen die höchsten Bindungsaffinität zu PC<sub>3</sub>-Zellen hatte, nach 70 Minuten eine höhere absolute Tumoranreicherung besaß, als mitgetestete monomere und dimere Vergleichssubstanzen. Jedoch entsprachen die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche nicht den Erwartungen, sodass für zukünftige *in vivo*-Versuche das Studienmodell angepasst werden sollte.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Allgemeines

Alle kommerziell erhältlichen Materialien hatten mindestens einen analytischen Reinheitsgrad (p.A.) und wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Alle Harze für die Festphasensynthese, sowie Kopplungsreagenzien für die Fmoc-Peptidsynthese, Fmoc-geschützte Aminosäuren, Fmoc-NH-PEG<sub>1</sub>-COOH und Fmoc-PEG<sub>3</sub>-COOH wurden von NovaBiochem (Schwalbach, Deutschland) käuflich erworben. Die Chemikalien 1-thio-β-D-Galactose Natriumsalz, Fmoc-O<sub>1</sub>Pen-OH (Fmoc-5-amino-3-oxapentanoic acid), Fmoc-NH-PEG<sub>2</sub>-COOH, Fmoc-NH-PEG<sub>5</sub>-COOH, Fmoc-PEG<sub>7</sub>-COOH und Fmoc-NH-PEG<sub>11</sub>-COOH wurden von Iris Biotech (Marktrechwitz, Deutschland) erworben. 6-Maleimidohexansäure und L-Gluthation (reduziert) wurden bei Sigma Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) bestellt. N,N-bis(N'-Fmoc-3-aminopropyl)-Glycin-Kalium-Hemisulfat (APG) wurde von PolyPeptide (Strasbourg, France) und tris-t-Bu-DOTA wurde von CheMatech (Dijon, Frankreich) erworben. RPMI 1640 Medium, L-Gluthamin, 0.05 % Trypsin (versetzt mit EDTA und Phenolrot) und Opti-MEM 1 (GlutaMAX 1) wurden von Invitrogen, Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, modifiziert, ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>) und BSA von Sigma Aldrich und fötales Kälberserum von der Firma PAA erworben.

Für analytische und semipräparative HPLC-Nachweise und Reinigungen wurde ein Dionex UltiMate 3000 System (Idstein, Deutschland) zusammen mit einem Gabi-Star (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) Radioaktivitätsdetektor verwendet. Für analytische und semipräparative Nachweise und Reinigungen mittels HPLC wurde eine Chromolith Performance (RP-18e, 100–4.6 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) oder eine SemiPrep (RP-18e, 100–10 mm, Merck) Säule verwendet, die mit einem Lösungsmittelfluss von 4 ml/min betrieben wurden. Als Laufmittel wurden Wasser und Acetonitril mit 0.1 % TFA oder AS verwendet. ESI (Elektrospray Ionisation) und MALDI (Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation)-Messungen wurden mit einem Finnigan MAT95Q (Dreieich, Deutschland) und einem Bruker Daltonics Microflex (Bremen, Deutschland) Spektrometer zusammen mit der Matrixsubstanz Gentisin- oder Sinapinsäure durchgeführt. Die NMR-Messungen wurden mit einem 300 MHz Varian-Mercury-Plus-System durchgeführt. Für die Auswertung der Zellbindungsassays wurde ein γ-Counter von Perkin Elmer verwendet (2480 WIZARD). Für die Durchführung der Serumstabilitätstests und für die *in vivo*-Versuche wurde <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> verwendet, das durch eine fraktionierte Elution eines <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generators erhalten wurde. Für die Durchführung der Serumstabilitätstests wurde ein <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-

Generator von Eckert & Ziegler (Obninsk Typ, Berlin, Deutschland) verwendet, für die Durchführung der *in vivo*-Versuche wurde ein  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator von ITG (Garching, Deutschland) verwendet.

Die Substanzen c(RGDfC) und Thiol-DOTA wurden von C. Wängler zur Verfügung gestellt. Die Konjugation des tris-t-Bu-DOTA an eine  $\epsilon$ -Aminofunktion des Lysins während der Festphasensynthese wurde durchgeführt wie zuvor beschrieben<sup>[119]</sup>. Die Synthese des DOTA-PESIN und des Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 6-Maleimidohexansäure) wurde durchgeführt wie in Quelle<sup>[36]</sup> beschrieben. Die Synthese der PAMAM-Dimere ist bereits von Wängler et al.<sup>[69]</sup> beschrieben worden. Die Reaktionen, die ohne Angabe einer Reaktionstemperatur beschrieben sind, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

## 4.2 Dendronsynthese auf fester Phase

### 4.2.1 Generelle Durchführung der Synthese von Dendronen auf fester Phase

Die Dendrone wurden auf einem Harz nach der Standard-Fmoc-Festphasenpeptidsynthese hergestellt<sup>[120]</sup>. Die verwendeten Aminosäuren wurden dafür im 2-fachen Überschuss (2.0 Äq.) pro Funktionalität eingesetzt und die Standardkonjugationszeit betrug 30 Minuten. Als Harz wurde entweder ein Standard-Rink-Amid-Harz mit einer Belegungsdichte von 0.74–0.79 mmol/g (für die Substanzen **6–10**) oder ein NovaPEG-Rink-Amid-Harz mit einer Belegungsdichte von 0.21–0.23 mmol/g (für die Substanzen **1–5** und **11–39**) verwendet. Als Synthesebausteine wurden N $\alpha$ -Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-N $\omega$ -PEG-Aminosäuren, N,N-bis(N'-Fmoc-3-Aminopropyl)-Glyzin-Kalium-Hemisulfat (APG) als verzweigende Aminosäure und 6-Maleimidohexansäure als reaktionsfähiger Baustein für „Klick“-chemische Reaktionen verwendet. Die vollständig synthetisierten Dendron-Gerüste wurden durch Zugabe von einer Lösung aus TFA (Trifluoressigsäure)/TIS (Triisopropylsilane)/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) für 60 min, bei Dendronen mit tris-t-Bu-DOTA 2 h, vom Harz abgespalten und anschließend in Diethylether aufgenommen. Die Feststoffe und Öle von Substanz **1–32** und **44–46** wurden von dem Lösungsmittel getrennt, getrocknet und mittels HPLC analysiert. Die Feststoffe und Öle der Substanzen **33–43** wurden von dem Lösungsmittel getrennt, getrocknet und mittels HPLC gereinigt. Die Rohprodukte der Substanzen **1–32** und **44–46** sowie die Produkte der Substanzen **33–43** wurden als weiße Feststoffe oder farblose Öle erhalten. Die Reaktionsbedingungen die von der Vorgehensweise der Standard-Kopplungsbedingungen abweichen, die HPLC-Gradienten, die Lösungsmittel, die für eine Analyse oder Reinigung

verwendet wurden, und die Massen-analytischen Daten, sind für jede Substanz einzeln beschrieben.

### Maleinimid-Tetramere

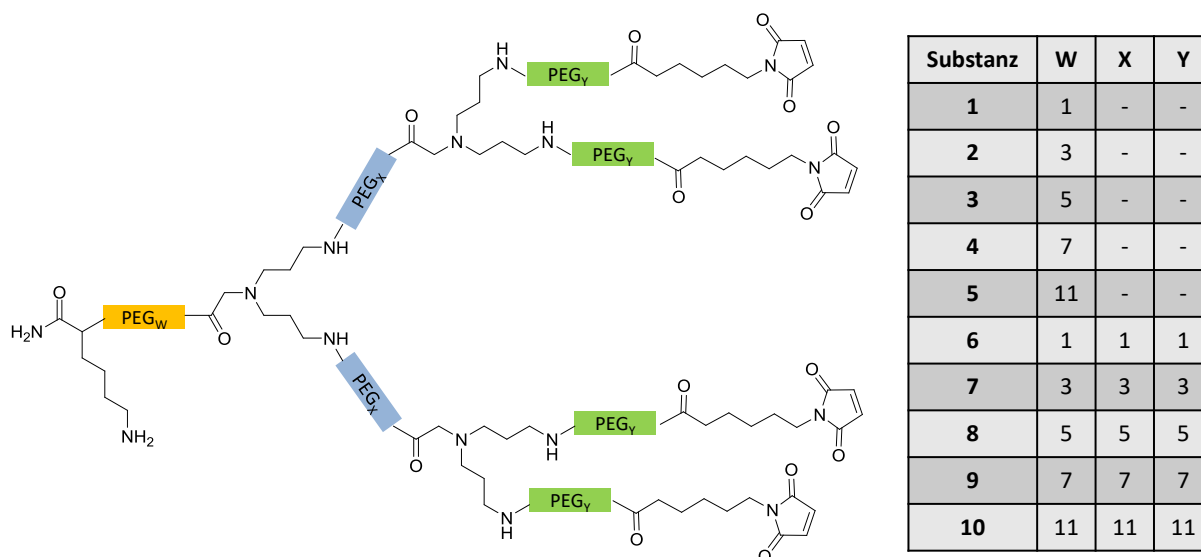


Abbildung 33: Schematische Darstellung der tetrameren Substanzen 1–10.

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>4</sub>* **1**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 10 %–50 % MeOH + 0.1 % Ameisensäure (AS) in 5 min,  $R_t = 3.4$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+3H]^{3+}$  (berechnet): 526.31 (526.31);  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 788.96 (788.96);  $[M + 2Na]^{2+}$  (berechnet): 810.94 (810.94).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>3</sub>-Mal<sub>4</sub>* **2**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 10 %–50 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.5$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+3H]^{3+}$  (berechnet): 560.33 (560.33);  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 839.99 (839.99);  $[M + H + Na]^{2+}$  (berechnet): 850.98 (850.98);  $[M + 2Na]^{2+}$  (berechnet): 861.97 (861.97);  $[M + Na + K]^{2+}$  (berechnet): 869.96 (870.03).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>5</sub>-Mal<sub>4</sub>* **3**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 10 %–50 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.7$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1766.55 (1767.03);  $[M + Na]^+$  (berechnet): 1788.98 (1789.01);  $[M + K]^+$  (berechnet): 1805.58 (1805.12).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>7</sub>-Mal<sub>4</sub>* **4**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 10 %–50 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.8$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+3H]^{3+}$  (berechnet): 619.04 (619.03);  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet):

928.05 (928.04);  $[M+H+Na]^{2+}$  (berechnet): 939.04 (939.04);  $[M + 2Na]^{2+}$  (berechnet): 950.03 (950.03);  $[M+Na+K]^{2+}$  (berechnet): 958.02 (958.08).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-Mal<sub>4</sub>* **5**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 10 %–50 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 4.1$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 2031.36 (2031.19);  $[M + Na]^+$  (berechnet): 2053.29 (2053.17).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>1</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>4</sub>* **6**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, 6-Maleimidohexansäure: 1h; Gradient: 20 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 2.9$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+3H]^{3+}$  (berechnet): 816.46 (816.46);  $[M+2H+Na]^{3+}$  (berechnet): 823.78 (823.78).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>4</sub>* **7**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 20 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.8$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+4H]^{4+}$  (berechnet): 791.21 (791.21);  $[M+Na+3H]^{4+}$  (berechnet): 796.71 (796.71);  $[M+2Na+2H]^{4+}$  (berechnet): 802.20 (802.20);  $[M+4Na]^{4+}$  (berechnet): 813.20 (813.19);  $[M+3H]^{3+}$  (berechnet): 1054.61 (1054.61);  $[M+Na+2H]^{3+}$  (berechnet): 1061.94 (1061.94);  $[M+H+2Na]^{3+}$  (berechnet): 1069.27 (1069.27);  $[M+3Na]^{3+}$  (berechnet): 1076.60 (1076.60).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>5</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>4</sub>* **8**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 20 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 4.3$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3779.96 (3778.20).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>7</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>4</sub>* **9**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 20 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 4.8$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+5H+Na]^{6+}$  (berechnet): 736.93 (736.93);  $[M+4H+2Na]^{6+}$  (berechnet): 740.59 (740.59);  $[M+3H+3Na]^{6+}$  (berechnet): 744.43 (744.26);  $[M+5H]^{5+}$  (berechnet): 879.72 (879.72);  $[M+4H+Na]^{5+}$  (berechnet): 884.12 (884.11);  $[M+3H+2Na]^{5+}$  (berechnet): 888.91 (888.51).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>11</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>4</sub>* **10**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 0 %–100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min,  $R_t = 3.2$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+7H]^{7+}$  (berechnet): 804.76 (804.76);  $[M+6H+Na]^{7+}$  (berechnet): 807.9 (807.9);  $[M+5H+2Na]^{7+}$  (berechnet): 811.04 (811.04);

$[M+6H]^{6+}$  (berechnet): 938.72 (938.72);  $[M+5H+Na]^{6+}$  (berechnet): 942.39 (942.39);  
 $[M+4H+2Na]^{6+}$  (berechnet): 946.05 (946.05).

### Maleinimid-Oktamere 11–27

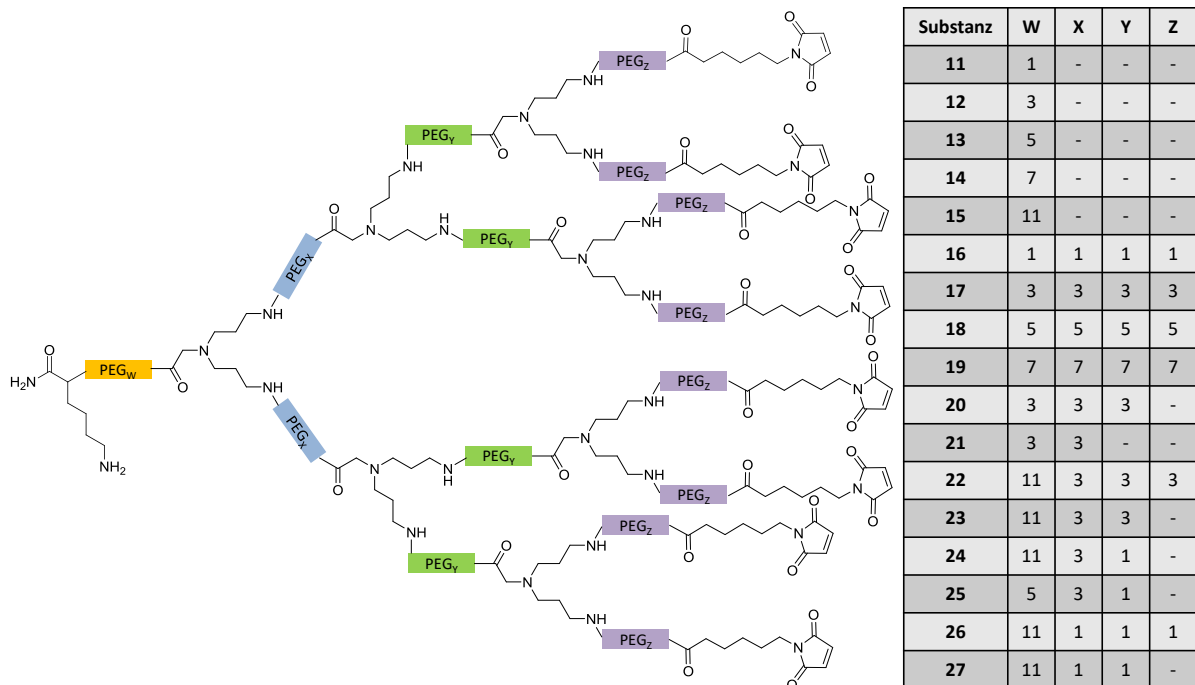


Abbildung 34: Schematische Darstellung der oktameren Substanzen 11–27.

$H_2N-CO-Lys-PEG_1-Mal_8$  **11**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 2.0$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3033.76 (3033.75).

$H_2N-CO-Lys-PEG_3-Mal_8$  **12**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 2.0$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+5H]^{5+}$  (berechnet): 627.97 (627.77);  $[M+4H]^{4+}$  (berechnet): 784.46 (784.46);  $[M+3H]^{3+}$  (berechnet): 1046.28 (1045.61).

$H_2N-CO-Lys-PEG_5-Mal_8$  **13**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 2.0$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3224.24 (3223.87).

$H_2N-CO-Lys-PEG_7-Mal_8$  **14**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, APG-2: 2 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 1.9$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3312.95 (3311.93).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-Mal<sub>8</sub>* **15**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1h, APG-2: 2h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2h; Gradient: 20 %–50 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.5$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3488.57 (3488.03).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>1</sub>)<sub>4</sub>-Mal<sub>8</sub>* **16**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 2.4$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 5071.36 (5064.79);  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 2533.63 (2532.90).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>3</sub>)<sub>4</sub>-Mal<sub>8</sub>* **17**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.5$  min; ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M+7H]^{7+}$  (berechnet): 943.12 (943.12);  $[M+Na+6H]^{7+}$  (berechnet): 946.41 (946.26).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>5</sub>)<sub>4</sub>-Mal<sub>8</sub>* **18**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 4.1$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 7946.57 (7938.58);  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 3962.96 (3958.80).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>7</sub>)<sub>4</sub>-Mal<sub>8</sub>* **19**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 4.7$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 9283.40 (9275.47);  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 4626.83 (4619.19).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>8</sub>* **20**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 20 %–50 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.7$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 4623.72 (4618.67);  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 2310.27 (2309.84).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-(PEG<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Mal<sub>8</sub>* **21**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 20 %–50 % MeOH + 0.1 % FA in 5 min,  $R_t = 3.3$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3631.08 (3630.11).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>8</sub>* **22**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min,  $R_t = 3.3$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + Na]^+$  (berechnet): 6970.43 (6970.00).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Mal<sub>8</sub>* **23**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.4 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>1+</sup> (berechnet): 4975.39 (4970.88).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-PEG<sub>3</sub>-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>8</sub>* **24**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.3 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 4567.08 (4562.61).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>5</sub>-PEG<sub>3</sub>-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>8</sub>* **25**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 20 %–50 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 3.4 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 4303.96 (4298.46).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>1</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>8</sub>* **26**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.4 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 5526.38 (5519.07), [M + 2H]<sup>2+</sup> (berechnet): 2760.11 (2760.04).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>1</sub>)<sub>2</sub>-Mal<sub>8</sub>* **27**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–45 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.8 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 4361.71 (4358.48).



## Maleimid-Hexadezimere 28–32

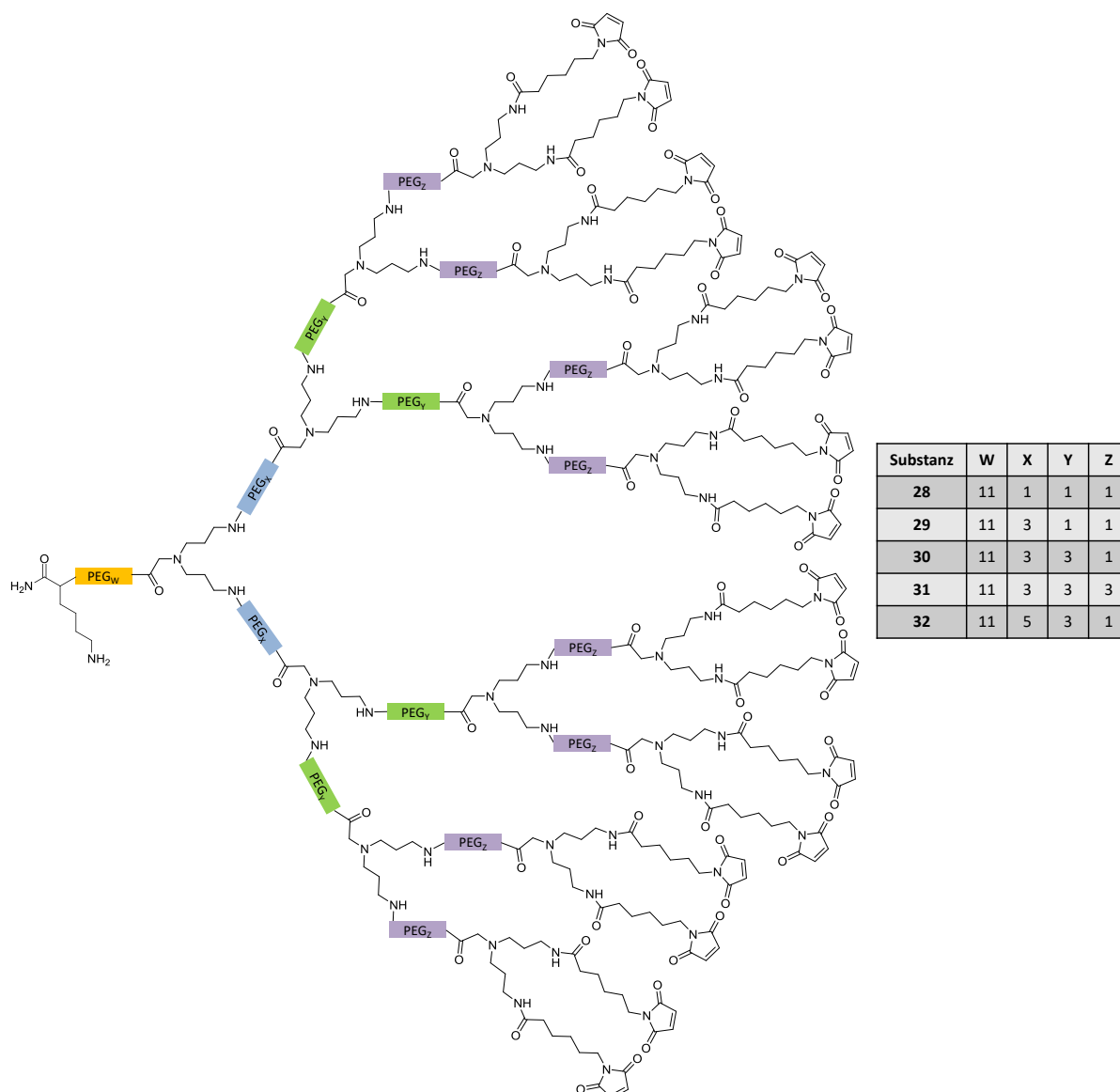


Abbildung 35: Schematische Darstellung der hexadezimeren Substanzen 28–32.

$H_2N-CO-Lys-PEG_{11}-(PEG_1)_3-Mal_{16}$  **28**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h,  $PEG_X$ : 45 min, APG-2: 2 h,  $PEG_Y$ : 1 h, APG-3: über Nacht,  $PEG_Z$ : 2 h, APG-4: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min,  $R_t = 2.3$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + K]^+$  (berechnet): 8469.42 (8470.84).

$H_2N-CO-Lys-PEG_{11}-PEG_3-(PEG_1)_2-Mal_{16}$  **29**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h,  $PEG_X$ : 45 min, APG-2: 2 h,  $PEG_Y$ : 1 h, APG-3: über Nacht,  $PEG_Z$ : 2 h, APG-4: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min,  $R_t = 2.4$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + K]^+$  (berechnet): 8673.61 (8674.98),  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 4324.72 (4318.95).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>16</sub>* **30**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, APG-4: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.5 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 9086.1 (9083.25), [M + 2H]<sup>2+</sup> (berechnet): 4527.44 (4523.09).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-Mal<sub>16</sub>* **31**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, APG-4: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.8 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 9914.00 (9899.80), [M + 2H]<sup>2+</sup> (berechnet): 4938.16 (4931.36).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-PEG<sub>5</sub>-PEG<sub>3</sub>-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>16</sub>* **32**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, APG-4: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % AS in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.6 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 9259.57 (9259.36), [M + 2H]<sup>2+</sup> (berechnet): 4615.74 (4611.14).

## Weitere Multimere 32–39

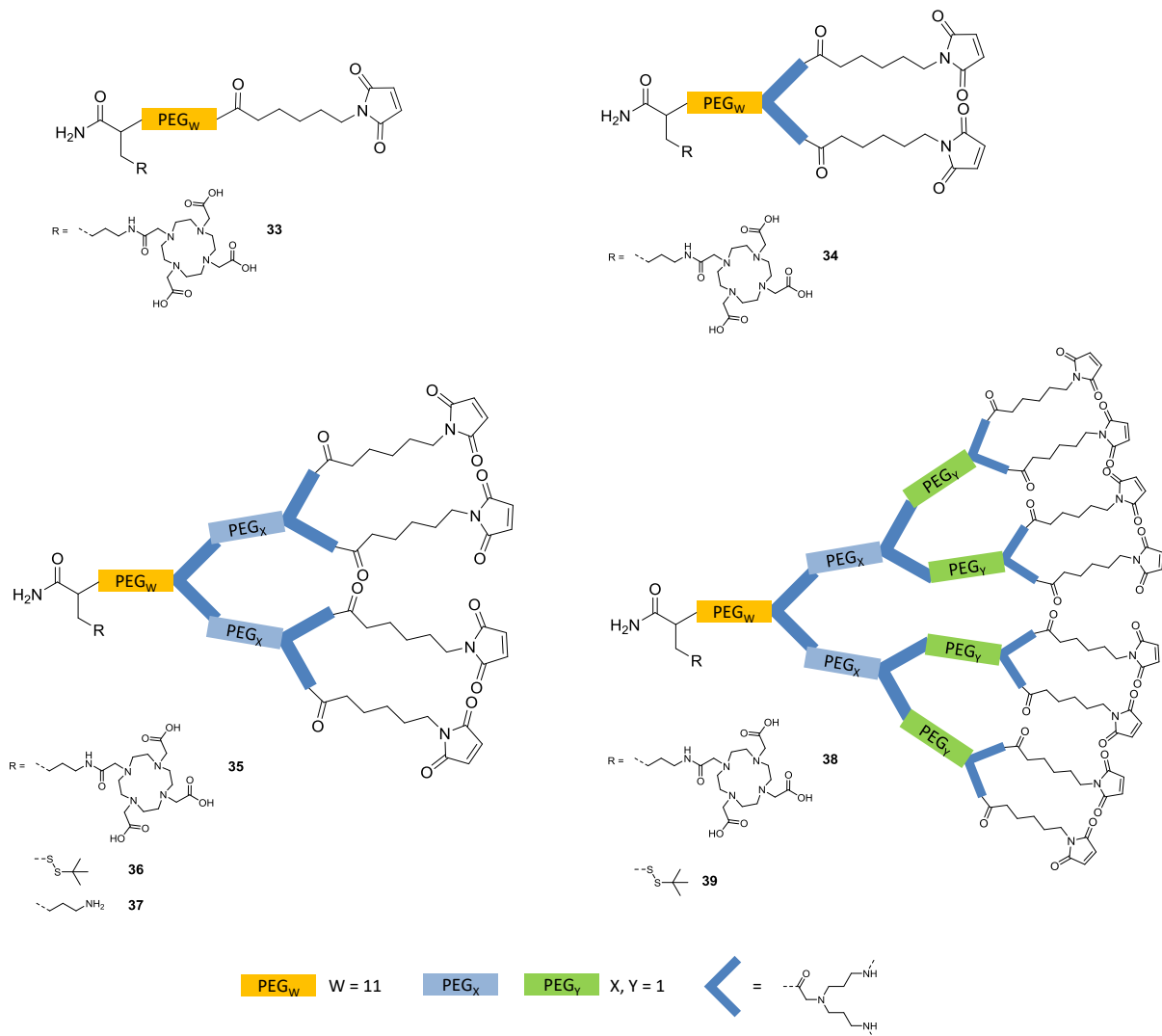


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Substanzen 32–39.

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys(DOTA)-PEG<sub>11</sub>-Mal<sub>1</sub>* **33**: Gradient: 35 %–60 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5.1$  min; Ausbeute: 2.9 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1324.60 (1324.73),  $[M + Na]^+$  (berechnet): 1347.37 (1346.72),  $[M + K]^+$  (berechnet): 1362.67 (1362.82).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys(DOTA)-PEG<sub>11</sub>-Mal<sub>2</sub>* **34**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, 6-Maleimidohexansäure: 45 min; Gradient: 35 %–60 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 6.0$  min; Ausbeute: 11.2 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1688.97 (1688.95),  $[M + Na]^+$  (berechnet): 1711.39 (1710.93).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys(DOTA)-PEG<sub>11</sub>-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>4</sub>* **35**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 45 %–55 % MeOH +

0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5.0$  min; Ausbeute: 14.1 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 2707.90 (2707.52).

*H<sub>2</sub>N-CO-Cys(S-tBu)-PEG<sub>11</sub>-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>4</sub>* **36**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 45 %–65 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 6.9$  min; Ausbeute: 6.4 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 2384.42 (2384.28),  $[M + Na]^+$  (berechnet): 2406.62 (2406.27),  $[M + K]^+$  (berechnet): 2422.40 (2422.37).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys-PEG<sub>11</sub>-PEG<sub>1</sub>-Mal<sub>4</sub>* **37**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, 6-Maleimidohexansäure: 1 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 7.7$  min; Ausbeute: 17.0 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 2321.25 (2321.34).

*H<sub>2</sub>N-CO-Lys(DOTA)-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>1</sub>)<sub>2</sub>-Mal<sub>8</sub>* **38**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 4.8$  min; Ausbeute: 10.7 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 4748.32 (4744.66),  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 2372.99 (2372.83).

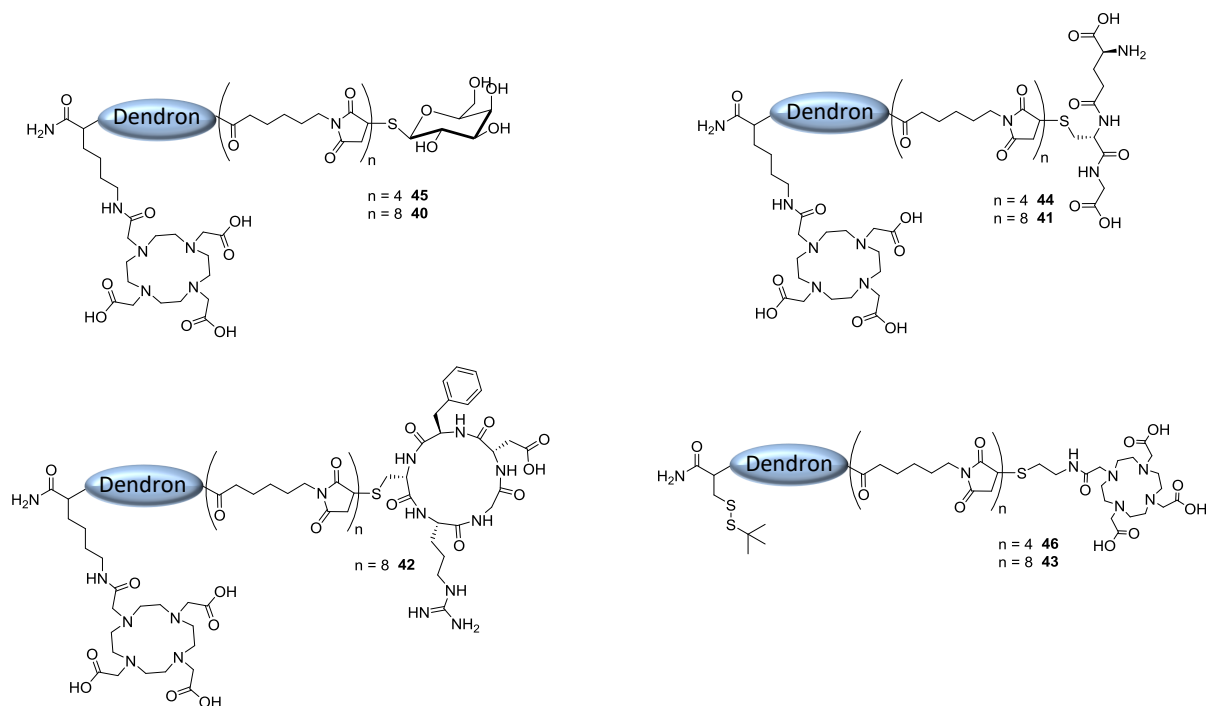
*H<sub>2</sub>N-CO-Cys(S-tBu)-PEG<sub>11</sub>-(PEG<sub>1</sub>)<sub>2</sub>-Mal<sub>8</sub>* **39**: Reaktionszeiten für die Konjugation von APG-1: 1 h, PEG<sub>X</sub>: 45 min, APG-2: 2 h, PEG<sub>Y</sub>: 1 h, APG-3: über Nacht, PEG<sub>Z</sub>: 2 h, APG-4: über Nacht, 6-Maleimidohexansäure: 2 h; Gradient: 45 %–65 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 6.7$  min; Ausbeute: 13.0 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 4424.95 (4421.42),  $[M + Na]^+$  (berechnet): 4448.00 (4443.41),  $[M + K]^+$  (berechnet): 4465.11 (4459.51).

#### 4.2.2 Generelle Synthesevorschrift für die Konjugation Thiol-tragender Synthesebausteine an multivalente Maleinimid-Dendrone

Synthese in Lösung: Zu einer Lösung des Maleinimid-Multimers (**35**, **36**, **38** oder **39**, 0.46–2.5  $\mu$ mol) in MeCN (100–400  $\mu$ l) wurde eine Lösung des jeweiligen Thiol-tragenden Synthesebausteins (1-thio- $\beta$ -D-Galactose Natriumsalz, L-Glutathion (reduziert), c(RGDfC) oder Thiol-DOTA, mindestens 1.25 Äq. pro Maleinimid-Funktion) in PBS (0.1 M, pH 7.0, 300  $\mu$ l) gegeben, sodass ein finaler pH-Wert zwischen pH 6.8 und 7.2 erhalten wurde. Nach 5 min wurde die Reaktionslösung mittels HPLC gereinigt und die Produkte wurden als weißes Pulver oder farbloses Öl erhalten. Die Gradienten, die während der HPLC-Reinigung

angewendet wurden, und die Daten der Massenanalytik, sind für jede Substanz einzeln angegeben.

Synthese auf fester Phase: Das Harz, auf dem zuvor das entsprechende multivalente Maleinimid-Dendron (**35** oder **36**) synthetisiert wurde, wurde nach dem letzten Reaktionsschritt (Konjugation der 6-Maleimidohexansäure an das Dendrongerüst) zunächst mit MeCN und anschließend mit PBS (0.1 M, pH 7.0) gespült. Die Konjugation der Thiol-tragenden Synthesebausteine an das Maleinimid-Dendron wurde durch die Zugabe einer Lösung aus der jeweiligen Thiol-Verbindung (mindestens 1.25 Äq. pro Maleinimid-Funktion) in PBS (0.1 M, pH 7.0, 500–750  $\mu$ l) gestartet. Nach 1 h wurden die Produkte durch Zugabe einer Lösung aus TFA (Trifluoressigsäure)/TIS (Triisopropylsilan)/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) für 60 min von dem Harz abgespalten und anschließend in Diethylether gefällt. Die Rohprodukte wurden von dem Lösungsmittel getrennt, im Vakuum getrocknet und anschließend mittels HPLC analysiert. Die Gradienten, die während der HPLC-Reinigung angewendet wurden, und die Daten der Massenanalytik, sind für jede Substanz einzeln angegeben.



**Abbildung 37: Schematische Darstellung der Substanzen 40–46.**

*Galactose*<sub>8</sub>-DOTA **40**: Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 4.3$  min; Ausbeute: 22.8 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + Na]^+$  (berechnet): 6334.62 (6334.96),  $[M + 2H]^{2+}$  (berechnet): 3162.4 (3156.99).

*L*-glutathione<sub>8</sub>-DOTA **41**: Gradient: 30 %–55 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 4.8 min; Ausbeute: 45.2 %; MALDI-MS (*m/z*) für [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 7222.99 (7223.31), [M + 2H]<sup>2+</sup> (berechnet): 3601.52 (3600.16).

*c*(RGDfC)<sub>8</sub>-DOTA **42**: Gradient: 45 %–65 % MeOH + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 4.3 min; Ausbeute: 19.8 %; MALDI-MS (*m/z*) für [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 9397.17 (9392.45), [M + 2H]<sup>2+</sup> (berechnet): 4686.46 (4685.74).

DOTA<sub>8</sub>-SS-*t*Bu **43**: Gradient: 20 %–30 % MeCN + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 5.5 min; Ausbeute: 18.1 %; MALDI-MS (*m/z*) für [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 8156.95 (8149.09), [M + 2H]<sup>2+</sup> (berechnet): 4068.7 (4064.06).

*L*-glutathione<sub>4</sub>-DOTA **44**: Gradient: 0 %–100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min, R<sub>t</sub> = 1.8 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 3935.32 (3935.85).

*Galactose*<sub>4</sub>-DOTA **45**: Gradient: 0 %–100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min, R<sub>t</sub> = 1.8 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 3491.79 (3491.68), [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 3514.30 (3513.66), [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 3529.59 (3529.77), [M+Na+K]<sup>+</sup> (berechnet): 3552.07 (3551.75), [M + 2K]<sup>+</sup> (berechnet): 3567.82 (3567.86).

DOTA<sub>4</sub>-SS-*t*Bu **46**: Gradient: 0 %–100 % MeCN + 0.1 % TFA in 5 min, R<sub>t</sub> = 2.2 min; MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 4239.60 (4237.12).

#### 4.2.3 Radiomarkierung der DOTA-derivatisierten Multimere (40–43) mit <sup>68</sup>Ga

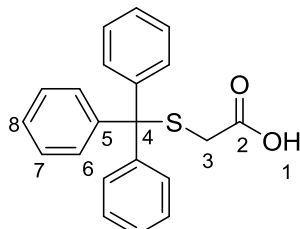
Die jeweiligen DOTA-derivatisierten Multimere (1.5–5 nmol) wurden in Tracepur H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurden die gelösten DOTA-derivatisierten Multimere zu einer Lösung mit 244–277 MBq <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> gegeben, die folgendermaßen erhalten wurde: Das <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> wurde durch eine fraktionierte Elution eines <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generators (Obninsk Typ, Eckert & Ziegler) mit einer HCl-Lösung (0.1 M, 1.2 ml) erhalten. Diese HCl-saure Lösung wurde anschließend durch Zugabe einer Natrium-Acetat-Lösung (1.25 M, 120–125 µl) auf einen pH-Wert von 3.5–4.0 eingestellt.

Nach 10 min bei 99 °C und anschließender Kühlung der Reaktionslösung auf RT, wurden die Reaktionsgemische mittels Radio-HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Die radiomarkierten Produkte [<sup>68</sup>Ga]**40**, [<sup>68</sup>Ga]**42** und [<sup>68</sup>Ga]**43** hatten eine Reinheit von ≥ 95 % und wurden in spezifischen Aktivitäten von bis zu 147 GBq/µmol ([<sup>68</sup>Ga]**40**), 55 GBq/µmol ([<sup>68</sup>Ga]**42**) und 163 GBq/µmol ([<sup>68</sup>Ga]**43**) erhalten.

## 4.3 Synthese bivalenter BBN<sub>(7-14)</sub>-Analoga

### 4.3.1 Herstellung grundlegender Synthesebausteine

*S*-Trityl-mercaptoessigsäure **48**: Die *S*-Tritylmercaptoessigsäure wurde nach Anleitung von Tang et al. hergestellt <sup>[106]</sup>.



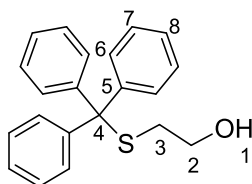
Mercaptoessigsäure (921.3 mg, 0.695 ml, 10.0 mmol, 1.1 Äq.) und Tritylchlorid (2.65 g, 9.51 mmol, 1.0 Äq.) wurden in 30 ml DCM gelöst. Es kann dadurch eine grünliche Reaktionslösung entstehen, aus der während der Dauer der Reaktion saure Gase entweichen können! Das Lösungsmittel wurde nach 5 h Reaktion im Vakuum entfernt und das gelbe Rohprodukt wurde in einem Minimum Diethylether gelöst, wodurch es farblos wurde. Im Anschluss wurde die farblose Lösung filtriert und der Diethylether wurde im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (2.35 g, 7.03 mmol, Ausbeute: 73.4 %).

Gradient: 0–100 % + 0.1 % TFA in 5 min,  $R_t = 3,2$  min;

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz): 7.37–7.31 (m, 6H, H-6); 7.25–7.11 (m, 9H, H-7+H-8); 2.96 (s, 2H, H-3).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz): 174.99 C-2; 143.83 C-5; 129.48 C-7; 128.11 C-6; 127.01 C-8; 34.39 C-3.

*S*-Trityl-mercaptoethanol **54**: Das *S*-Tritylmercaptoethanol wurde nach Vorlage von Maltese et al. hergestellt.



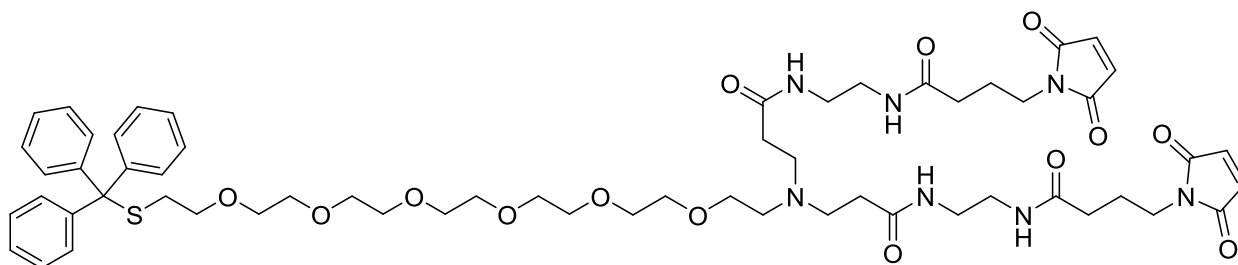
Triphenylcarbinol (16.7 g, 64.1 mmol, 1.0 Äq.) mmol wurde zügig zu einer Lösung aus Mercaptoethanol (5.0 g 64.0 mmol, 1.0 Äq.) und HCl (37 %, 5.25 ml) in 80 ml MeCN

gegeben. Die Lösung wurde für 10 min bei RT gerührt und anschließend wurde der kristalline Feststoff filtriert und mit MeCN gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten (11.7 g, 36.5 mmol, Ausbeute: 57.1 %).

$^1\text{H-NMR}$  (Aceton- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz): 7.44–7.41 (m, 6H, H-7); 7.34–7.30 (m, 6H, H-6); 7.26–7.22 (m, 3H, H-8); 3.76 (t, 1H,  $J^3 = 6.0$ , H-1); 3.42 (dt, 2H,  $J^3 = 6.7, 6.0$ , H-2); 2.35 (t, 2H,  $J^3 = 6.7\text{Hz}$ , H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$  (Aceton- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz): 146.69 C-5; 131.07 C-7; 129.35 C-6; 128.15 C-8; 67.70 C-4; 61.84 C-2, 36.43 C-3.

*Trityl-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 4-Maleimidobuthansäure) 55:*



PyBOP (249.9 mg, 480.3  $\mu\text{mol}$ , 7.8 Äq.) und DIPEA (63.7 mg, 83.8  $\mu\text{l}$ , 492.6  $\mu\text{mol}$ , 8.0 Äq.) in 1 ml DMF wurden zu 4-Maleimidobutansäure (90.2 mg, 492.6  $\mu\text{mol}$ , 8.0 Äq.) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Das Gemisch wurde zu einer Lösung aus G<sub>1</sub>-PAMAM-Dendron (50.0 mg, 61.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) in 0.5 ml DMF gegeben. Nach 1 h wurden die flüchtigen Komponenten entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde als ölige gelbliche Flüssigkeit erhalten (41.1 mg, 35.9  $\mu\text{mol}$ , Ausbeute: 58.3 %).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1142.22 (1142.55);  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (berechnet): 1164.38 (1164.53);  $[\text{M} + \text{K}]^+$  (berechnet): 1180.37 (1180.64).

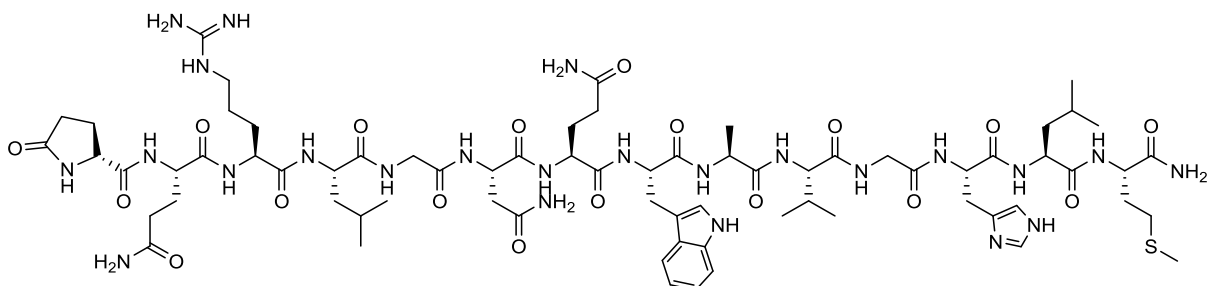
#### 4.3.2 Generelle Synthese von Bombesin (47) und der Bombesin-Derivate 49–53:

Die Peptide wurden nach der Standard-Fmoc-Peptidsynthese hergestellt <sup>[120]</sup>. Als Harz wurde kommerziell erhältliches Standard-Rink-Amid-MBHA-Harz verwendet. Als Synthesebausteine wurden N $_{\alpha}$ -Fmoc-Aminosäuren, teilweise N $_{\omega}$ -PEG-Aminosäuren und Tritylmercaptoessigsäure verwendet. Die auf dem Harz hergestellten Peptide wurden mit einer Lösung aus TFA (Trifluoressigsäure):TIS (Triisopropylsilan): H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5) für 60 min abgespalten, in Diethylether ausgefällt und mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Die

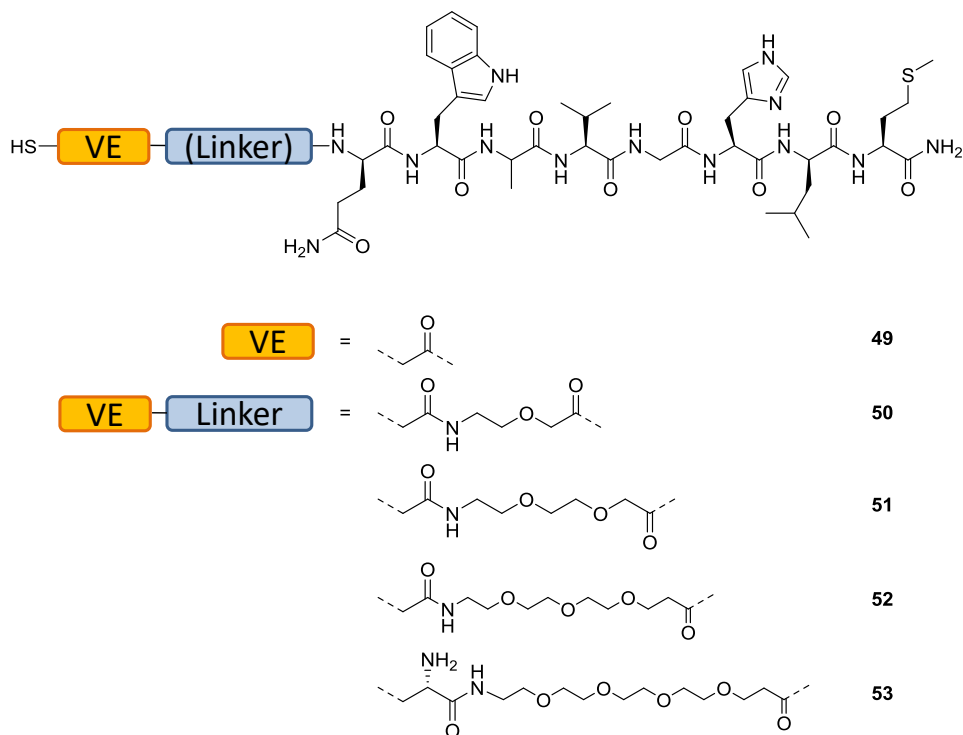


Produkte wurden nach Trocknung am Laborgefrierdetrockner als weiße Feststoffe erhalten. Die Gradienten der HPLC-Reinigung und die Daten der Massenanalytik sind für jede Substanz einzeln angegeben.

**Bombesin 47:**



Gradient: 22.5–27.5 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 4.6$  min; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1619.66 (1619.82);  $[M + Na]^+$  (berechnet): 1641.58 (1641.8);  $[M + K]^+$  (berechnet): 1657.75 (1657.91).



**Abbildung 38: Schematische Darstellung der Substanzen 49–53.**

**Mercaptoessigsäure- $BBN_{(7-14)}$  49:** Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5.0$  min; Ausbeute: 37.1 %; MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1014.20 (1014.47);  $[M + Na]^+$  (berechnet): 1036.14 (1036.45);  $[M + K]^+$  (berechnet): 1052.32 (1052.56).

*Mercaptoessigsäure-O<sub>1</sub>Pen-BBN<sub>(7-14)</sub>* **50**: Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 4.6 min; Ausbeute: 30.1 %; MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1115.57 (1115.51); [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 1137.61 (1137.49); [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 1153.56 (1153.6).

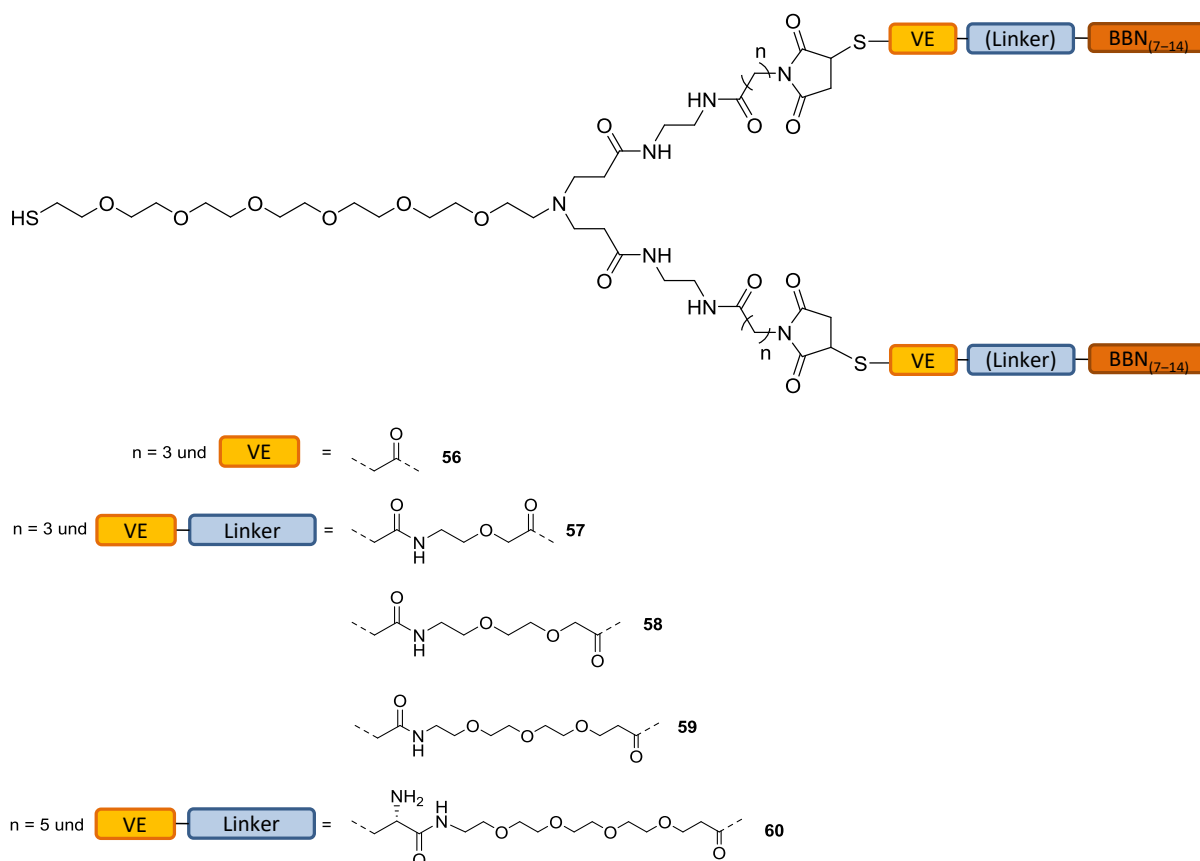
*Mercaptoessigsäure-PEG<sub>1</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>* **51**: Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 4.7 min; Ausbeute: 31.8 %; MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1159.31 (1159.54), [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 1181.24 (1181.52); [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 1197.27 (1197.63).

*Mercaptoessigsäure-PEG<sub>2</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>* **52**: Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 4.9 min; Ausbeute: 38.6 %; MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1217.66 (1217.58); [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 1239.72 (1239.56); [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 1255.68 (1255.67).

*Cys-PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>* **53**: Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 4.2 min; Ausbeute: 36.8 %; MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1290.79 (1290.63); [M + Na]<sup>+</sup> (berechnet): 1313.04 (1312.62); [M + K]<sup>+</sup> (berechnet): 1328.89 (1328.72).

### 4.3.3 Herstellung der Thiol entschützten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere 56–60

Das Dimer **55** (1.0 Äq.) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus PBS-Puffer (0.2M, pH 5.0 bis 6.0, 350 bis 500 µl) und MeCN (1:1) gelöst. Anschließend wurde das Dimer zu dem jeweiligen Peptid **49**, **50**, **51** oder **52** (2.5 Äq.) in PBS-Puffer (0.2M, pH 5 bis 6, 350 bis 500 µl) gegeben und der pH-Wert wurde mittels PBS-Puffer (0.2M, pH 7.5) auf pH 6.9 bis 7.2 eingestellt, um die Reaktion zu starten. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden ausgefallene Nebenprodukte entfernt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Laborgefrieretrockner über Nacht getrocknet und im folgenden Schritt in einer Lösung aus 950 µl TFA und 50 µl TIS gelöst. Nach weiteren 5 min Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt.



**Abbildung 39: Schematische Darstellung der Substanzen 56–60.**

*HS-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-BBN<sub>(7-14)</sub> Dimer 56:* Ausbeute: 30.1 %; Gradient: 30–80 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 2927.08 (2927.35).

*HS-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-O<sub>1</sub>Pen-BBN<sub>(7-14)</sub> Dimer 57:* Ausbeute: 19.3 %; Gradient: 25–40 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 6.1$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3130.46 (3129.45).

*HS-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-PEG<sub>1</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub> Dimer 58:* Ausbeute: 19.7 %; Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5.8$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3217.90 (3217.50).

*HS-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-PEG<sub>2</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub> Dimer 59:* Ausbeute: 22.5 %; Gradient: 30–45 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 4.1$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3333.60 (3333.59),  $[M + Na]^+$  (berechnet): 3355.56 (3355.57)  $[M + K]^+$  (berechnet): 3372.18 (3371.68).

Trytil-S-G<sub>1</sub>-Maleinimid (mit 6-Maleimidohexansäure) (1.0 Äq.) wurde in einem

Lösungsmittelgemisch aus PBS-Puffer (0.2M, pH 5.0 bis 6.0, 350 bis 500  $\mu$ l) und MeCN (1:1) gelöst. Anschließend wurde das Dimer zu dem Peptid **53** (2.5 Äq.) in PBS-Puffer (0.2M, pH 5 bis 6, 350 bis 500  $\mu$ l) gegeben und der pH-Wert wurde mittels PBS-Puffer (0.2M, pH 7.5) auf pH 6.9 bis 7.2 eingestellt. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden ausgefallene Nebenprodukte entfernt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Laborgefrieretrockner über Nacht getrocknet und danach in einer Lösung aus 950  $\mu$ l TFA und 50  $\mu$ l TIS gelöst. Nach weiteren 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels HPLC gereinigt.

*HS-G<sub>1</sub>-Maleimidohexansäure-Cys-PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub> Dimer **60***: Ausbeute: 39.2 %; Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 5.7 min; MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 3535.82 (3535.75).

#### 4.3.4 Herstellung der NODA-GA konjugierten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **61–65**:

Das jeweilige Dimer **56**, **57**, **58**, **59** oder **60** (1.0 Äq.) wurde in H<sub>2</sub>O/MeCN 1:1 (500–750  $\mu$ l, metallarm) gelöst. Anschließend wurde das Dimer zu Maleinimid-NODA-GA (2.0 Äq.) gegeben und durch Einstellen des pH-Wertes mittels PBS-Puffer (0.2M, pH 7.5, metallarm) auf pH 6.9 bis 7.2 wurde die Reaktion gestartet. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurde das Rohprodukt mittels HPLC gereinigt. Die Produkte wurden als weiße Feststoffe erhalten.

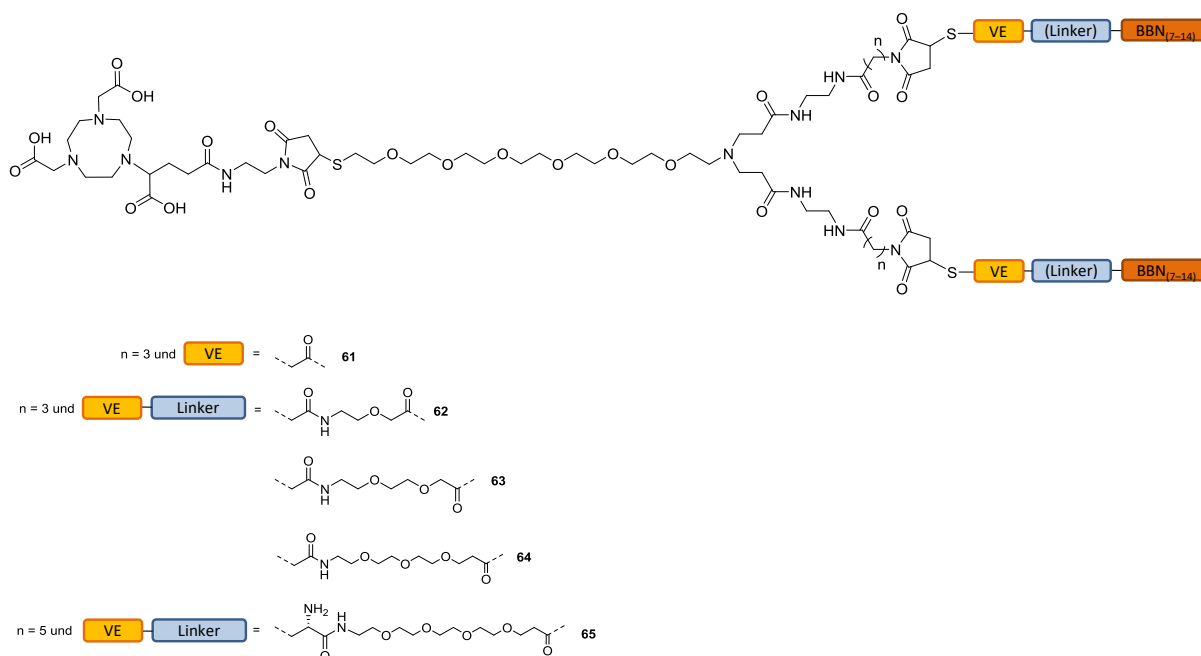


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Substanzen **61–65**.

*NODAGA-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-BBN<sub>(7-14)</sub> Dimer **61***: Ausbeute: 40.3 %; Gradient: 10–60 % + 0.1 % TFA in 8 min, R<sub>t</sub> = 5.7 min; MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup>

(berechnet): 3424.58 (3424.57),  $[M + Na]^+$  (berechnet): 3447.45 (3446.55);  $[M + K]^+$  (berechnet): 3462.78 (3462.66).

*NODAGA-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-O<sub>1</sub>Pen-BBN<sub>(7-14)</sub>* Dimer **62**:  
Ausbeute: 73.4 %; Gradient: 25–40 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3626.29 (3626.66).

*NODAGA-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-PEG<sub>1</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>* Dimer **63**:  
Ausbeute: 52.8 %; Gradient: 20–50 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5.2$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3714.31 (3714.71).

*NODAGA-G<sub>1</sub>-Maleimidobutansäure-Mercaptoessigsäure-PEG<sub>2</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>* Dimer **64**:  
Ausbeute: 61.0 %; Gradient: 25–40 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 5.4$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3831,5 (3830,8);  $[M + Na]^+$  (berechnet): 3853.93 (3852.78);  $[M + K]^+$  (berechnet): 3870.21 (3868.89);  $[M+Na+K]^+$  (berechnet): 3892.55 (3891.88).

*NODAGA-G<sub>1</sub>-Maleimidohexansäure-Cys-PEG<sub>3</sub>-BBN<sub>(7-14)</sub>* Dimer **65**: Ausbeute: 55.2 %; Gradient: 25–40 % + 0.1 % TFA in 8 min,  $R_t = 4.9$  min; MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 4032.71 (4032.97).

#### 4.3.5 Radiomarkierung und Reinigung der NODAGA-modifizierten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimere **61–65** mit <sup>68</sup>Ga für die Durchführung der Serumstabilitätstests

Eine Stoffmenge von 15 nmol des jeweiligen NODAGA-derivatisierten BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimers **61–65** wurde in 15 µl H<sub>2</sub>O (Tracepur, versetzt mit Chelex 100) gelöst. Anschließend wurden die gelösten NODAGA-derivatisierten Multimere zu einer Lösung mit 162–190 MBq <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> gegeben, die folgendermaßen erhalten wurde: Das <sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup> wurde durch eine fraktionierte Elution eines <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generators (Obninsk Typ, Eckert & Ziegler) mit einer HCl-Lösung (0.1 M, 1.2 ml) erhalten. Diese HCl-saure Lösung wurde anschließend durch Zugabe einer Natrium-Acetatlösung (1.25 M, 120–125 µl) auf einen pH-Wert von 3.5–4.0 eingestellt. Nach 10 min bei RT, wurden die Reaktionsgemische mittels Radio-HPLC auf ihre Reinheit überprüft. Die radiochemischen Ausbeuten betragen ohne weitere Reinigung  $\geq 95$  % und die radiomarkierten Substanzen konnten in spezifischen Aktivitäten von 11 bis 13 GBq/µmol erhalten werden. Um Radiolyseeffekte zu vermeiden, wurden die radiomarkierten Substanzen über eine mit 5 ml EtOH und 10 ml H<sub>2</sub>O vorkonditionierte C<sub>18</sub>-Light Kartusche (SepPak, Waters), durch Auftragung, Spülen (mit 5 ml H<sub>2</sub>O) und Elution (mit 0.5 ml EtOH) gereinigt.

#### 4.3.6 Untersuchung der Serumstabilitäten der Substanzen [<sup>68</sup>Ga]61–[<sup>68</sup>Ga]65

Von der Radiomarkierungslösung der jeweiligen Verbindung [<sup>68</sup>Ga]61–[<sup>68</sup>Ga]65 wurden 125 µl entnommen, zu 500 µl humanem Serum gegeben und bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots (50 µl) entnommen und zu 50 µl Ethanol gegeben. Die Ausfällung der Serumproteine wurde durch Kühlung mit Eis (für eine Dauer von 2 min) beschleunigt. Der Überstand und die Ausfällungen wurden auf ihre Radioaktivität überprüft. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mittels Radio-HPLC analysiert.

#### 4.3.7 Zellkultur

Die PC<sub>3</sub>-Prostatakarzinomzellen wurden in RPMI 1640 Medium, das mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum und 1 % (v/v) L-Glutamin versetzt wurde, bei 37 °C in einer mit CO<sub>2</sub> (5 %) angereicherten Atmosphäre gezüchtet.

#### 4.3.8 Zellbindungsassay

Die *in vitro*-Bindungsaviditäten wurden mittels kompetitiver Verdrängungsexperimente, durch Verwendung eines Millipore Multiscreen Punch Kit Systems, ermittelt. Mikrotiterplatten mit 96 Wells von Millipore wurden hierzu mit 200 µl pro Well mit Dulbecco's Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (versetzt mit 1g/100 ml Bovine Serum Albumin) eine Stunde vor Gebrauch versetzt. Die PC<sub>3</sub>-Zellen wurden aus den Zellkulturflaschen gelöst, in Opti-MEM 1 suspendiert und in die Mikrotiterplatten (10<sup>5</sup> Zellen pro Well) verteilt. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei RT auf einem Schüttler zusammen mit 0.1 nM <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-Bombesin (81.4 GBq/µmol) und dem jeweiligen BBN<sub>(7-14)</sub>-Dimer 61–65, das in Konzentrationen zwischen 0–1 µM hinzugegeben wurde, inkubiert. Die in den Wells befindliche Zell-Substrat-Lösung hatte dabei insgesamt ein Gesamtvolumen von 100 µl. Nach der Inkubation wurden die Zellpellets 3x (2x mit 100 µl und 1x mit 200 µl) mit PBS gespült und unter Einsatz eines *Millipore Multiscreen Vacuum Manifold* filtriert. Die Filter wurden aus der Mikrotiterplatte gelöst, gesammelt und ihre Radioaktivität wurde im γ-Counter ausgemessen. Die Experimente wurden mindestens 3x wiederholt, wobei jedes Experiment in dreifacher Ausführung durchgeführt wurde. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden ermittelt, indem die Daten mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse durch Verwendung der Software GraphPad Prism (v.5.04) berechnet wurden. Zusätzlich wurden die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte von Substanz 61–65 mit den IC<sub>50</sub>-Werten von natürlichem Bombesin (Substanz 47) verglichen, die unter selben Bedingungen untersucht wurde.

#### 4.3.9 Radiomarkierung und *in vivo*-Untersuchung von Substanz **64**, **65** und DOTA-PESIN

Alle Tierstudien am PET wurden unter Einhaltung geltender deutscher Tierschutzgesetze und den Vorschriften des lokalen Tierschutzkomitees durchgeführt. 18 weiblichen CD1 nu/nu Mäusen (mit einem Gewicht zwischen 19 und 30 g) wurden jeweils  $5 \times 10^6$  PC<sub>3</sub>-Zellen pro Maus subkutan in die rechte Flanke injiziert. Nach der Zelinokulation wurden die Tumoren für 3 bis 10 Wochen wachsen gelassen, bis sie etwa eine Größe von etwa 0.7 cm<sup>3</sup> erreicht hatten. Für die PET-Bildgebung wurde jeweils 3 bis 10 MBq des jeweiligen Radiotracers über die laterale Schwanzvene unter Isofluran-Narkose verabreicht. Während den Blockade-Experimenten wurde den Versuchstieren 10 min vor Applikation des Radiotracers Bombesin (Konzentration: 100 µg Bombesin/100 µl appliziertem Radiotracer) appliziert. Dynamische Tier-PET Messungen wurden für 120 min mit einem Albira PET/SPECT/CT-System von Bruker (Bruker Biospin, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Die gesammelten PET-Daten wurden über die Software Albira Suite 09-00128 von Bruker rekonstruiert und mit dem Programm PMod 3.6 ausgewertet.

Radiomarkierung von DOTA-PESIN, **64** und **65** mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ : Eine Stoffmenge von 15 nmol der jeweiligen Substanz wurden zunächst in 15 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde Substanz zu einer Lösung gegeben, die bis zu 315 MBq  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  enthielt und die folgendermaßen erhalten wurde: Das  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  wurde durch eine fraktionierte Elution eines  $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ -Generators (ITG, Garching, Deutschland) mit einer 0.05 M HCl-Lösung (Suprapur, 2.2 ml) und anschließender Titration der Lösung bis zu einem pH-Wert zwischen 3.5–4.0, durch Zugabe einer Natrium-Acetatlösung (1.25 M, 60–70 µl), erhalten. Nach 10 minütiger Reaktion bei einer Temperatur von 99 °C, wurde die Reaktionslösung über eine mit 5 ml EtOH und 10 ml H<sub>2</sub>O vorkonditionierte C<sub>18</sub>-Light Kartusche (SepPak, Waters), durch Auftragung, Spülen (mit 5 ml H<sub>2</sub>O) und Elution (mit 0.5 ml EtOH) gereinigt. Anschließend wurde die ethanolische Lösung mit isotonischer Kochsalzlösung soweit verdünnt, sodass der Anteil an EtOH 10 % nicht überstieg. Die radiochemische Ausbeute und Reinheit wurde durch eine Messung mittels Radio-HPLC ermittelt. DOTA-PESIN wurde mit  $\geq 90$  % radiochemischer Reinheit und spezifischen Aktivitäten von 15.8 bis 21.0 GBq/µmol erhalten (nicht optimiert). Die Substanz **64** wurde mit  $\geq 97$  % radiochemischer Reinheit und spezifischen Aktivitäten von 16.0 bis 20.2 GBq/µmol erhalten (nicht optimiert). Die Substanz **65** wurde mit  $\geq 96$  % radiochemischer Reinheit und spezifischen Aktivitäten von 13.3 bis 17.6 GBq/µmol erhalten (nicht optimiert).

## 5 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Maleinimid-funktionalisierte Dendrone, die auf einem Säure-Amid-Gerüst basieren und in ihrer Struktur flexibel sind, hergestellt. Diese Dendrone wurden auf einen Harz synthetisiert und benötigen im Vergleich zu PAMAM-Dendronen, die in flüssiger Phase hergestellt werden und die den auf dem Harz hergestellten Dendronen in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, deutlich geringere Synthesezeiten. Die auf dem Harz hergestellten Dendrone konnten hinsichtlich ihrer Ausbeuten optimiert und in hohen Reinheiten erhalten werden. Die Dendrone enthielten bis zu 16 funktionelle Gruppen, über die verschiedene Moleküle eingeführt werden konnten. Zusätzlich konnten die Dendrone erfolgreich mit einem Chelator konjugiert und anschließend mit  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  radiomarkiert werden. Die derart hergestellten Dendrone sind für die Herstellung von Peptid-Multimeren und für eine Bildgebung mittels PET geeignet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden vier neue, auf Bombesin-Analoga basierende bivalente und mit  $^{68}\text{Ga}$  radiomarkierbare Verbindungen hergestellt, die jeweils zwei  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Peptide enthielten. Die verschiedenen Bombesin-Analoga unterschieden sich strukturell dadurch, dass die Abstände der Peptide zueinander variierten. Durch Bindungsstudien sollte ermittelt werden, bei welchem Peptid-Abstand die Bindungsavidität an die GRP-Rezeptoren der verwendeten  $\text{PC}_3$ -Zellen am höchsten ist. Tatsächlich konnte während der *in vitro*-Bindungsstudien mit  $\text{PC}_3$ -Zellen das  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Analog ermittelt werden, das die höchste Bindungsavidität aller getesteten dimeren Verbindungen aufwies und das somit den optimalsten Peptid-Abstand besaß (= das  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Analog, welches den geringsten Abstand der Peptide zueinander hat, bei dem beide  $\text{BBN}_{(7-14)}$ -Peptide noch gleichzeitig eine Bindung mit den GRP-Rezeptoren der  $\text{PC}_3$ -Zellen eingehen können). In anschließenden *in vivo*-Experimenten zeigte sich, dass die Substanz, die in *in vitro*-Versuchen die höchste Bindungsaffinität zu  $\text{PC}_3$ -Zellen hatte, nach 70 Minuten eine höhere absolute Tumoranreicherung besaß, als mitgetestete monomere und dimere Vergleichssubstanzen. Jedoch zeigten sich auch grundlegende Schwierigkeiten mit dem Studienmodell, was dazu führte, dass während der *in vivo*-Experimente Ergebnisse erhalten wurden, die aufgrund der aktuell öffentlich zugänglichen Literatur nicht vermutet wurden und daher nicht den Erwartungen entsprachen.



## 6 Literatur

- [1] Datenreport 2013 Bonn: Statistisches Bundesamt (Destatis), Bundeszentrale für politische Bildung/bpb, Wissenschaftszentrum Berlin für Sozialforschung (WZB); **2013**. Verfügbar unter: <http://www.bpb.de/nachschlagen/datenreport-2013/>, [www.destatis.de/publikationen](http://www.destatis.de/publikationen).
- [2] Krebs in Deutschland 2009/2010 Berlin: Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; **2013**. Verfügbar unter: [www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de), [www.gekid.de](http://www.gekid.de).
- [3] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; **2012**. Verfügbar unter: <http://globocan.iarc.fr>.
- [4] Z. Kote-Jarai, A. A. Olama, G. G. Giles, et al., *Nat Genet* **2011**, *43*, 785-791.
- [5] A. Brandt, J. L. Bermejo, J. Sundquist, K. Hemminki, *Eur Urol* **2010**, *58*, 275-280.
- [6] K. Hemminki, R. Rawal, J. L. Bermejo, *Int J Cancer* **2005**, *113*, 312-315.
- [7] Z. Gong, A. R. Kristal, J. M. Schenk, et al., *Cancer* **2009**, *115*, 3661-3669.
- [8] Diet, Nutrition, Physical Activity, and Prostate Cancer: World Cancer Research Fund International/American Institute for Cancer Research; **2014**. Verfügbar unter: [www.wcrf.org/sites/default/files/Prostate-Cancer-2014-Report.pdf](http://www.wcrf.org/sites/default/files/Prostate-Cancer-2014-Report.pdf).
- [9] L. Appleton, D. Wyatt, E. Perkins, et al., *Eur J Cancer Care (Engl)* **2015**, *24*, 71-84.
- [10] M. J. Steggall, *Nurs Stand* **2008**, *22*, 46-48.
- [11] H. G. Welch, E. S. Fisher, D. J. Gottlieb, M. J. Barry, *J Natl Cancer Inst* **2007**, *99*, 1395-1400.
- [12] F. H. Schroder, J. Hugosson, M. J. Roobol, et al., *N Engl J Med* **2009**, *360*, 1320-1328.
- [13] A. Afshar-Oromieh, U. Haberkorn, M. Eder, et al., *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2012**, *39*, 1085-1086.
- [14] A. Tanimoto, J. Nakashima, H. Kohno, et al., *J Magn Reson Imaging* **2007**, *25*, 146-152.
- [15] D. T. Schmid, H. John, R. Zweifel, et al., *Radiology* **2005**, *235*, 623-628.
- [16] A. G. Rockall, A. Hatrick, P. Armstrong, M. Wastie, in *Diagnostic Imaging Seventh Edition*, Wiley-Blackwell, **2013**.
- [17] F. D. Grant, F. H. Fahey, A. B. Packard, et al., *J Nucl Med* **2008**, *49*, 68-78.
- [18] H. J. Ache, *Angew Chem* **1972**, *84*, 234-255.

- [19] G. Pfennig, H. Klewe-Nebenius, W. Seelmann-Eggebert, *Karlsruher Nuklidkarte*, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, **1995**.
- [20] S. Pascu, J. Dilworth, *J Labelled Comp Radiopharm* **2014**, *57*, 191-194.
- [21] D. L. Smith, W. A. Breeman, J. Sims-Mourtada, *Appl Radiat Isot* **2013**, *76*, 14-23.
- [22] A. Mushtaq, *Ann Nucl Med* **2009**, *23*, 321-323.
- [23] S. M. Qaim, *Q J Nucl Med Mol Imaging* **2008**, *52*, 111-120.
- [24] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, et al., *J Control Release* **2000**, *65*, 271-284.
- [25] V. Torchilin, *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63*, 131-135.
- [26] H. J. Machulla, *Pharm Unserer Zeit* **2005**, *34*, 490-497.
- [27] S. S. Gambhir, J. Czernin, J. Schwimmer, et al., *J Nucl Med* **2001**, *42*, 1S-93S.
- [28] G. A. van Dongen, A. J. Poot, D. J. Vugts, *Tumour Biol* **2012**, *33*, 607-615.
- [29] S. M. Knowles, A. M. Wu, *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 3884-3892.
- [30] T. Olafsen, A. M. Wu, *Semin Nucl Med* **2010**, *40*, 167-181.
- [31] A. L.-N. A, S. Fanti, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2012**, *39 Suppl 1*, S1-3.
- [32] K. P. Koopmans, A. W. Glaudemans, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2012**, *39 Suppl 1*, S4-10.
- [33] S. T. Lo, A. Kumar, J. T. Hsieh, X. Sun, *Mol Pharm* **2013**, *10*, 793-812.
- [34] B. Yavuz, S. B. Pehlivan, N. Unlu, *ScientificWorldJournal* **2013**, *2013*, 732340.
- [35] C. Wangler, S. Maschauer, O. Prante, et al., *Chembiochem* **2010**, *11*, 2168-2181.
- [36] S. Lindner, C. Michler, B. Wangler, et al., *Bioconjug Chem* **2014**, *25*, 489-500.
- [37] I. Dijkgraaf, C. B. Yim, G. M. Franssen, et al., *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2011**, *38*, 128-137.
- [38] P. Fournier, V. Dumulon-Perreault, S. Ait-Mohand, et al., *EJNMMI Res* **2012**, *2*, 8.
- [39] O. Jacobson, L. Zhu, G. Niu, et al., *Mol Imaging Biol* **2011**, *13*, 1224-1233.
- [40] L. Lang, W. Li, N. Guo, et al., *Bioconjug Chem* **2011**, *22*, 2415-2422.
- [41] J. Oxboel, M. Brandt-Larsen, C. Schjoeth-Eskesen, et al., *Nucl Med Biol* **2014**, *41*, 259-267.
- [42] S. Liu, *Bioconjug Chem* **2009**, *20*, 2199-2213.
- [43] E. S. Mittra, M. L. Goris, A. H. Iagaru, et al., *Radiology* **2011**, *260*, 182-191.
- [44] R. Markwalder, J. C. Reubi, *Cancer Res* **1999**, *59*, 1152-1159.
- [45] G. Fischer, B. Wangler, C. Wangler, *Molecules* **2014**, *19*, 6952-6974.
- [46] S. Lebreton, S. Monaghan, M. Bradley, *Aldrichim Acta* **2001**, *34*, 75-83.
- [47] A. Y. Huang, C. H. Tsai, H. Y. Chen, et al., *Chem Commun (Camb)* **2013**, *49*, 5784-5786.

- [48] N. J. Wells, A. Basso, M. Bradley, *Biopolymers* **1998**, *47*, 381-396.
- [49] V. Swali, N. J. Wells, G. J. Langley, M. Bradley, *J Org Chem* **1997**, *62*, 4902-4903.
- [50] W. Kowalczyk, M. Monso, B. G. de la Torre, D. Andreu, *J Pept Sci* **2011**, *17*, 247-251.
- [51] E. A. Kantchev, C. C. Chang, S. F. Cheng, et al., *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 1377-1385.
- [52] E. A. Kantchev, C. C. Chang, D. K. Chang, *Biopolymers* **2006**, *84*, 232-240.
- [53] T. Darbre, J. L. Reymond, *Accounts Chem. Res.* **2006**, *39*, 925-934.
- [54] A. Clouet, T. Darbre, J. L. Reymond, *Biopolymers* **2006**, *84*, 114-123.
- [55] G. Sanclimens, L. Crespo, E. Giralt, et al., *J Org Chem* **2005**, *70*, 6274-6281.
- [56] G. Sanclimens, L. Crespo, E. Giralt, et al., *Biopolymers* **2004**, *76*, 283-297.
- [57] L. Crespo, G. Sanclimens, B. Montaner, et al., *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 8876-8883.
- [58] L. Crespo, G. Sanclimens, M. Royo, et al., *Eur J Org Chem* **2002**, 1756-1762.
- [59] H. Tsushima, K. Matsumoto, M. Jikei, *Polym Advan Technol* **2011**, *22*, 1292-1296.
- [60] L. Spasser, M. Portnoy, *J Polym Sci Pol Chem* **2010**, *48*, 6009-6013.
- [61] A. Dahan, M. Portnoy, *Macromolecules* **2003**, *36*, 1034-1038.
- [62] A. Basso, B. Evans, N. Pegg, M. Bradley, *Chem Commun* **2001**, 697-698.
- [63] S. E. How, A. Unciti-Broceta, R. M. Sanchez-Martin, M. Bradley, *Org Biomol Chem* **2008**, *6*, 2266-2269.
- [64] S. Lebreton, S. E. How, M. Buchholz, et al., *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3945-3953.
- [65] S. Lebreton, N. Newcombe, M. Bradley, *Tetrahedron Lett* **2002**, *43*, 2475-2478.
- [66] J. Gao, P. Chen, Y. Singh, et al., *Bioconjug Chem* **2013**, *24*, 1332-1344.
- [67] E. R. Gillies, E. Dy, J. M. Frechet, F. C. Szoka, *Mol Pharm* **2005**, *2*, 129-138.
- [68] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [69] C. Wangler, G. Moldenhauer, M. Eisenhut, et al., *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 813-820.
- [70] S. Liu, *Mol Pharm* **2006**, *3*, 472-487.
- [71] W. A. Breeman, A. M. Verbruggen, *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, *34*, 978-981.
- [72] G. Fischer, S. Lindner, S. Litau, et al., *Bioconjug Chem* **2015**, (DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00362).
- [73] A. Anastasi, V. Erspamer, M. Bucci, *Experientia* **1971**, *27*, 166-167.
- [74] D. B. Cornelio, R. Roesler, G. Schwartzmann, *Ann Oncol* **2007**, *18*, 1457-1466.
- [75] K. S. Lin, A. Luu, K. E. Baidoo, et al., *Bioconjug Chem* **2005**, *16*, 43-50.

- [76] G. B. Biddlecombe, B. E. Rogers, M. de Visser, et al., *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 724-730.
- [77] Y. S. Yang, X. Zhang, Z. Xiong, X. Chen, *Nucl Med Biol* **2006**, *33*, 371-380.
- [78] P. K. Nanda, U. Pandey, B. N. Bottenus, et al., *Nucl Med Biol* **2012**, *39*, 461-471.
- [79] J. J. Parry, T. S. Kelly, R. Andrews, B. E. Rogers, *Bioconjug Chem* **2007**, *18*, 1110-1117.
- [80] A. F. Prasanphanich, L. Retzliff, S. R. Lane, et al., *Nucl Med Biol* **2009**, *36*, 171-181.
- [81] B. E. Rogers, D. D. Manna, A. Safavy, *Cancer Biother Radiopharm* **2004**, *19*, 25-34.
- [82] N. K. Wagh, Z. Zhou, S. M. Ogbomo, et al., *Bioconjug Chem* **2012**, *23*, 527-537.
- [83] S. R. Lane, P. Nanda, T. L. Rold, et al., *Nucl Med Biol* **2010**, *37*, 751-761.
- [84] T. P. Davis, S. Crowell, J. Taylor, et al., *Peptides* **1992**, *13*, 401-407.
- [85] S. J. Mather, B. A. Nock, T. Maina, et al., *Mol Imaging Biol* **2014**, *16*, 888-895.
- [86] E. Kahkonen, I. Jambor, J. Kemppainen, et al., *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 5434-5443.
- [87] H. J. Ananias, Z. Yu, H. D. Hoving, et al., *Nucl Med Biol* **2013**, *40*, 933-938.
- [88] A. Roivainen, E. Kahkonen, P. Luoto, et al., *J Nucl Med* **2013**, *54*, 867-872.
- [89] M. Honer, L. Mu, T. Stellfeld, et al., *J Nucl Med* **2011**, *52*, 270-278.
- [90] K. L. Chatalic, G. M. Franssen, W. M. van Weerden, et al., *J Nucl Med* **2014**, *55*, 2050-2056.
- [91] D. Pan, Y. P. Xu, R. H. Yang, et al., *Amino Acids* **2014**, *46*, 1481-1489.
- [92] C. Schweinsberg, V. Maes, L. Brans, et al., *Bioconjug Chem* **2008**, *19*, 2432-2439.
- [93] H. Zhang, K. Abiraj, D. L. Thorek, et al., *PLoS One* **2012**, *7*, e44046.
- [94] Y. Liu, X. Hu, H. Liu, et al., *J Nucl Med* **2013**, *54*, 2132-2138.
- [95] B. L. Faintuch, R. Teodoro, A. Duatti, et al., *Nucl Med Biol* **2008**, *35*, 401-411.
- [96] S. Richter, M. Wuest, S. S. Krieger, et al., *Nucl Med Biol* **2013**, *40*, 1025-1034.
- [97] Z. Wu, Z. B. Li, K. Chen, et al., *J Nucl Med* **2007**, *48*, 1536-1544.
- [98] S. Liu, Z. Liu, K. Chen, et al., *Mol Imaging Biol* **2010**, *12*, 530-538.
- [99] G. Carlucci, H. J. Ananias, Z. Yu, et al., *Mol Pharm* **2013**, *10*, 1716-1724.
- [100] Z. Yu, G. Carlucci, H. J. Ananias, et al., *Amino Acids* **2013**, *44*, 543-553.
- [101] L. Sancey, E. Garanger, S. Foillard, et al., *Mol Ther* **2009**, *17*, 837-843.
- [102] L. Wang, J. Shi, Y. S. Kim, et al., *Mol Pharm* **2009**, *6*, 231-245.
- [103] S. L. Gawlak, P. A. Kiener, G. R. Braslawsky, R. S. Greenfield, *Growth Factors* **1991**, *5*, 159-170.
- [104] M. D. Carrithers, M. R. Lerner, *Chem Biol* **1996**, *3*, 537-542.

- [105] L. Bacher, G. Fischer, S. Litau, et al., *J Labelled Comp Radiopharm* **2015**, (DOI: 10.1002/jlcr.3315).
- [106] C. Tang, L. Li, Z. Pang, Z. Yuan, *Chin J Chem* **2009**, *27*, 195-201.
- [107] P. Bailon, C. Y. Won, *Expert Opin Drug Deliv* **2009**, *6*, 1-16.
- [108] K. Jain, P. Kesharwani, U. Gupta, N. K. Jain, *Int J Pharm* **2010**, *394*, 122-142.
- [109] S. Dapp, E. Garcia Garayoa, V. Maes, et al., *Nucl Med Biol* **2011**, *38*, 997-1009.
- [110] C. Wangler, B. Wangler, S. Lehner, et al., *J Nucl Med* **2011**, *52*, 586-591.
- [111] W. A. Breeman, M. de Jong, E. de Blois, et al., *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2005**, *32*, 478-485.
- [112] P. J. Scott, B. G. Hockley, H. F. Kung, et al., *Appl Radiat Isot* **2009**, *67*, 88-94.
- [113] T. Fukumura, R. Nakao, M. Yamaguchi, K. Suzuki, *Appl Radiat Isot* **2004**, *61*, 1279-1287.
- [114] S. Dapp, C. Muller, E. G. Garayoa, et al., *EJNMMI Res* **2012**, *2*, 24.
- [115] E. Garcia Garayoa, D. Ruegg, P. Blauenstein, et al., *Nucl Med Biol* **2007**, *34*, 17-28.
- [116] R. La Bella, E. Garcia-Garayoa, M. Bahler, et al., *Bioconjug Chem* **2002**, *13*, 599-604.
- [117] R. La Bella, E. Garcia-Garayoa, M. Langer, et al., *Nucl Med Biol* **2002**, *29*, 553-560.
- [118] R. Schirmacher, C. Wängler, E. Schirmacher, in *Munich Molecular Imaging Handbook Series*, (Ed.: H. J. Wester), **2010**.
- [119] C. Cheng, L. Pan, A. Dimitrakopoulou-Strauss, et al., *EJNMMI Res* **2011**, *1*, 34.
- [120] D. A. Wellings, E. Atherton, *Methods Enzymol* **1997**, *289*, 44-67.

## Anhang

### Danksagung

Mein Dank geht an Frau PD Dr. Carmen Wängler für die hervorragende und sehr kompetente Betreuung, die interessanten Themenstellungen und die uneingeschränkte Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Molekulare Bildgebung & Radiochemie und Biomedizinische Chemie* des *Instituts für Klinische Radiologie und Nuklearmedizin* möchte ich für das sehr gute Arbeitsklima, die große Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bedanken. Bei auftretenden Schwierigkeiten konnte ich mich auf den Rückhalt der Arbeitsgruppe verlassen, was mir während der Durchführung meiner Arbeit sehr geholfen hat.

Dem *Fonds der Chemischen Industrie* möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Dem Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) möchte ich für die Bereitstellung der PC<sub>3</sub>-Zellen danken.

### Abkürzungsverzeichnis

APG	<i>N,N</i> -bis( <i>N'</i> -Fmoc-3-aminopropyl)-Glyzin-Kalium-Hemisulfat
AS	Ameisensäure
BBN	Bombesin
BSA	Bovines Serumalbumin
cps	<i>counts per second</i>
CT	Computertomographie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure
EPR	erhöhte Permeabilität und Retention ( <i>Enhanced Permeability and Retention</i> )
ESI	Elektrospray Ionisation
FDG	Fluordesoxyglucose

GRP	<i>Gastrin Releasing Peptide</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MIP	<i>Maximum Intensity Projection</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
OEG	Oligoethylenglycol
p.i.	<i>post injection</i>
PAMAM	Polyamidoamin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC <sub>3</sub>	Prostata-Adenokarzinomzelllinie
PEG	Polyethylenglycol
PESIN	PEG <sub>3</sub> -Bombesin
PET	Positronenemissionstomographie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
SPECT	Einzelphotonen Emissionscomputertomographie
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
VE	Verknüpfungseinheit