

**Neue zellpenetrierende Phosphopeptide
für die molekulare Bildgebung**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden**

von

Diplomchemikerin Susan Richter

geboren am 30.04.1983 in Dresden

Eingereicht am 23.11.2010

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar / 2007 bis März / 2010 im
Institut für Radiopharmazie, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf,
angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Die Positronen-Emissions-Tomographie in der translationalen Tumorforschung	7
1.2	Radioaktiv markierte Peptide in der diagnostischen und therapeutischen Nuklearmedizin	9
1.3	Einführung in die Festphasenpeptidsynthese (SPPS).....	11
1.4	Phosphopeptide und ihre zentrale Bedeutung	16
1.4.1	Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse	16
1.4.2	Synthesewege zur Herstellung von Phosphopeptiden	17
1.4.3	Stabilität von Phosphopeptiden	22
1.4.4	Phosphopeptide als potentielle Pharmaka für das Targeting von Phosphopeptid-bindenden Proteindomänen.....	22
1.4.5	Die Polo-like Kinase-1 als ein onkologisches Target für Phosphopeptide ..	23
1.5	Herausforderungen und Möglichkeiten einer Zellinternalisierung von Phosphopeptiden.....	25
1.6	Zellpenetrierende Peptide.....	27
2.	Konzeption und Zielstellung	33
3.	Ergebnisse.....	35
3.1	Plk1-gerichtete Phosphopeptide und nicht-phosphorylierte Peptidanaloga.....	35
3.1.1	Festphasenbasierte Peptidsynthese von Phosphopeptiden und nicht-phosphorylierten Peptidanaloga.....	35
3.1.2	Radiomarkierung mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Fluor-18	37
3.1.3	Radiopharmakologische Untersuchungen.....	40
3.2	Phosphopeptid-Neurotensin(8-13)-Konjugate.....	47
3.2.1	Synthese Azid- und Alkin-funktionalisierter Peptid-Derivate	48
3.2.2	Kupplung der funktionalisierten Peptide	50
3.2.3	Bindungsstudien der Peptid-Konjugate an den Neurotensin-Rezeptor	52
3.3	Konjugate aus Phosphopeptiden und zellpenetrierenden Peptiden....	53
3.3.1	Zellpenetrierende Pentapeptide (CPP5).....	54
3.3.1.1	Synthese und Charakterisierung von zellpenetrierenden Pentapeptiden....	54

3.3.1.2	Radiomarkierung mit Fluor-18	55
3.3.1.3	<i>In vitro</i> Zellaufnahmeuntersuchungen	56
3.3.2	Calcitonin- und Cathelicidin-abgeleitete zellpenetrierende Strukturen (hCT- und sC18-CPP).....	58
3.3.2.1	Synthese und Charakterisierung einer Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7- und einer Phosphopeptid-sC18-Sequenz	58
3.3.2.2	Fluoreszenzmarkierung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten	61
3.3.2.2.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	62
3.3.2.2.2	Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie	64
3.3.2.2.3	Toxizitätsabschätzung auf Basis des Resazurinassays	65
3.3.2.3	Radiomarkierung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten mit Fluor-18	66
3.3.2.3.1	Synthese mittels klassischer Radiomarkierungstechnik.....	66
3.3.2.3.2	Radiomarkierung mittels Mikrofluidik-Technologie	69
3.3.2.4	Radiopharmakologische Untersuchungen.....	74
3.3.2.4.1	<i>In vitro</i> Zellaufnahme der Phosphopeptid-CPP-Konjugate.....	74
3.3.2.4.2	Kleintier-PET-Untersuchung der Phosphopeptid-CPP-Konjugate.....	76
4.	Diskussion und Schlussfolgerung	79
4.1	Synthese, Radiomarkierung und radiopharmakologische Charakterisierung Plk1-PBD-gerichteter Phosphopeptide.....	79
4.2	Möglichkeiten einer Internalisierung von Phosphopeptiden	83
5.	Zusammenfassung und Ausblick	92
6.	Experimenteller Teil	95
6.1	Material	95
6.2	Methoden.....	99
6.2.1	Ablauf der Peptidsynthese von Phosphopeptiden und nicht-phosphorylierten Peptiden.....	99
6.2.1.1	Allgemeine Prozedur der chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer.....	99
6.2.1.2	Entschützung von Peptiden.....	100
6.2.1.3	Peptidanalytik	100
6.2.1.4	Kaisertest.....	100
6.2.1.5	Reinigung von Peptiden	101

6.2.1.6	Gefriertrocknung.....	101
6.2.2	Peptidsynthese von Plk1-gerichteten Phosphopeptiden und nicht-phosphorylierten Peptidanaloga	102
6.2.2.1	Darstellung der 4-fluorbenzoylierten Referenzpeptide	103
6.2.3	Darstellung von Peptid-Konjugaten mit NT(8-13).....	105
6.2.3.1	Darstellung azid- und alkinfunktionalisierter Peptide in Lösung	105
6.2.3.2	Darstellung von Peptid-NT(8-13)-Konjugaten	106
6.2.3.3	Bindungsassay der Peptid-NT(8-13)-Konjugate.....	107
6.2.4	Synthese zellpenetrierender Pentapeptide (CPP5) und zugehöriger 4-fluorbenzoylierte Referenzpeptide	108
6.2.5	Darstellung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten.....	109
6.2.5.1	Allgemeine Synthesestrategie zum partiellen Aufbau von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten	110
6.2.5.2	Probeabspaltung	112
6.2.6	Fluoreszenzmarkierung von Phosphopeptiden und Phosphopeptid-CPP-Konjugaten.....	113
6.2.7	Biologische Untersuchungen der fluoreszenzmarkierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate.....	114
6.2.7.1	Zellkultur	114
6.2.7.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	114
6.2.7.3	Durchflusszytometrie	114
6.2.7.4	Resazurin-Zytotoxizitätsassay.....	115
6.2.8	Radiomarkierung mit <i>N</i>-Succinimidyl-4-¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB).116	
6.2.8.1	Darstellung von <i>N</i> -Succinimidyl-4- ¹⁸ F]fluorbenzoat ([¹⁸ F]SFB).....	116
6.2.8.2	Radiomarkierung von Phosphopeptiden mit [¹⁸ F]SFB.....	116
6.2.8.2.1	Zeit- und pH-Abhängigkeit der ¹⁸ F-Fluorbenzoylierung (niedriges Aktivitätsniveau)	116
6.2.8.2.2	¹⁸ F-Fluorbenzoylierung auf hohem Aktivitätsniveau	117
6.2.8.3	Radiomarkierung von nicht-phosphorylierten Peptidanaloga mit [¹⁸ F]SFB117	
6.2.8.3.1	pH-Abhängigkeit der ¹⁸ F-Fluorbenzoylierung (niedriges Aktivitätsniveau) 117	
6.2.8.3.2	¹⁸ F-Fluorbenzoylierung auf hohem Aktivitätsniveau	118
6.2.8.4	Radiomarkierung von zellpenetrierenden Pentapeptiden.....	118
6.2.8.5	Radiomarkierung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten	119
6.2.8.5.1	¹⁸ F-Fluorbenzoylierung nach klassischer Methodik (niedriges Aktivitätsniveau)	119
6.2.8.5.2	¹⁸ F-Fluorbenzoylierung nach klassischer Methodik (hohes Aktivitätsniveau-1).....	119

6.2.8.5.3	¹⁸ F-Fluorbenzoylierung nach klassischer Methodik (hohes Aktivitätsniveau-2).....	120
6.2.8.5.4	¹⁸ F-Fluorbenzoylierung mittels Mikrofluidik-Technik (niedriges Aktivitätsniveau)	121
6.2.8.5.5	¹⁸ F-Fluorbenzoylierung mittels Mikrofluidik-Technik (hohes Aktivitätsniveau).	121
6.2.9	Radiopharmakologische Untersuchungen	123
6.2.9.1	Zellkultur	123
6.2.9.2	<i>In vitro</i> Zellaufnahmestudien	123
6.2.9.3	Untersuchungen zur metabolischen Stabilität <i>in vitro</i>	124
6.2.9.4	Untersuchungen zur metabolischen Stabilität <i>in vivo</i>	124
6.2.9.5	Untersuchungen zur Bioverteilung	124
6.2.9.6	Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie	125
	Literaturverzeichnis	126
	Anhang.....	138
	Abkürzungsverzeichnis	138
	Verzeichnis der synthetisierten Peptide	144
	Danksagung.....	147
	Publikationen.....	149
	Eidesstattliche Erklärung und Versicherung	151

1. Einleitung

1.1 Die Positronen-Emissions-Tomographie in der translationalen Tumorforschung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) stellt ein innovatives, nicht-invasives, bildgebendes Diagnoseverfahren in der Nuklearmedizin dar, das im klinischen Bereich wie auch in der Forschung breite Anwendung erfährt und auch die Arzneimittelentwicklung zunehmend unterstützt.

Das Prinzip der PET (Abb. 1) basiert auf der *in vivo* Anwendung kurzlebiger Positronenstrahler, wie Kohlenstoff-11, Fluor-18 und Gallium-68, die häufig Einsatz finden. Andere wichtige Positronenstrahler sind Kupfer-64, Sauerstoff-15 oder Stickstoff-13 und Iod-124.

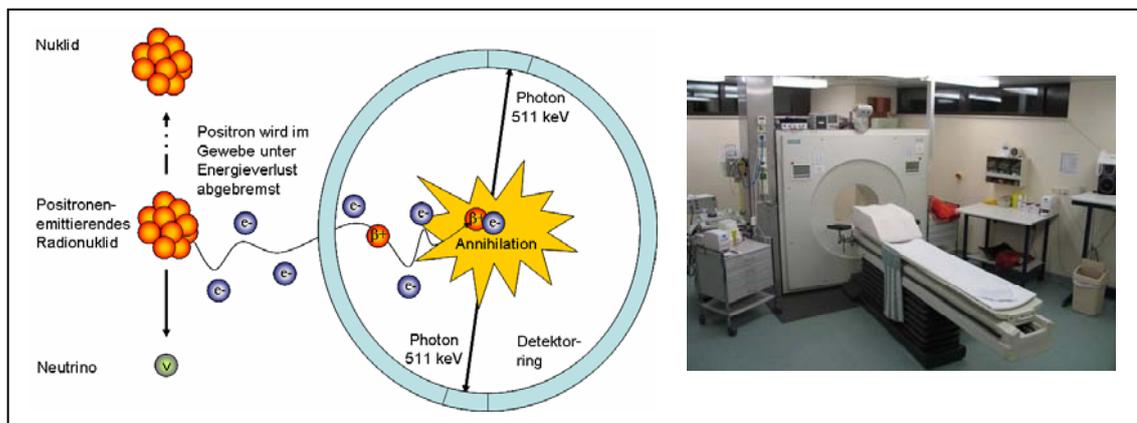


Abb. 1: Das PET-Prinzip und der Positronen-Emissions-Tomograph für die humane Anwendung im Forschungszentrum Dresden-Rossendorf e.V. (FZD)

Durch Injektion gelangen Positronen-emittierende, stoffwechsel-relevante Moleküle, sogenannte PET-Radiotracer, in das Untersuchungsobjekt und bewirken durch das Aussenden von Positronen, die im umgebenden Gewebe auf Elektronen stoßen, eine Anihilation, welche die Emission zweier γ -Quanten mit einer Energie von 511 keV im Winkel von 180° zur Folge hat. Die Detektion dieser γ -Quanten erfolgt in Koinzidenz im Nanosekunden-Bereich mittels vieler ringförmig um das Untersuchungsobjekt angeordneter Szintillationsdetektoren, welche eine Umwandlung in sichtbares Licht, das durch Lichtsensoren analysiert wird, vornehmen. Alle Koinzidenzereignisse, die linear gemessen wurden, werden mit Hilfe einer Ausleseelektronik und Bildbearbeitungssoftware in eine Bildaufnahme rekonstruiert, die die Lokalisation und Konzentration des Radiotracers wiedergibt. Mit entsprechend hoher Sensitivität in einem Konzentrationsbereich von $10^{-11} - 10^{-12}$ mmol/l können mittels PET quantitative

Aussagen zur Verteilung des Radiopharmakons, seiner Kinetik und Dynamik vorgenommen werden [1-4].

Neben der Detektion und Aufklärung neuropsychiatrischer und kardiologischer Erkrankungen stellt die Erkennung und Bewertung onkologischer Fragestellungen ein entscheidendes Arbeitsfeld der PET dar. Im Fokus der Tumorforschung liegt dabei besonders die Aufdeckung molekularer Mechanismen, die sich hinter Zellwachstum und damit einhergehenden Krebserkrankungen verbergen. Der Begriff der translationalen Tumorforschung schlägt dabei eine Brücke zwischen onkologisch-wissenschaftlichen Erkenntnissen auf molekularer Ebene und der klinischen Anwendung am Tumorpatienten.

Damit unterstützt die PET eine transparente Vermittlung biologischen Wissens in das klinische Umfeld von Prävention, Diagnose und Behandlung von Tumorerkrankungen und macht ebenso zunehmend eine individuell auf den Tumorpatienten zugeschnittene Therapie möglich. Gegenwärtige Entwicklungen in der Instrumentierung ermöglichen eine Fusion von PET mit Computer- (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT), wodurch eine verbesserte Sensitivität physiologischer, biochemischer Stoffwechselfvorgänge im Kontext anatomischer Informationen gewährleistet werden kann. Diese kombinierten Methoden werden auf dem Weg der Umsetzung onkologischen Wissensstandes in die klinische Praxis die Diagnose und Abklärung von Tumoren erleichtern und beschleunigen [5, 6].

Stahl *et al.* [6] zeigen mehrere Anwendungen und eine Auswahl zur Tumordetektion verwendeter PET-Radiotracer der translationalen Onkologie auf. Im Rahmen der Untersuchung des Tumormetabolismus spielen neben 2-[¹⁸F]Fluor-2-desoxy-D-glucose ([¹⁸F]FDG) auch radiomarkierte Aminosäuren wie [¹¹C]Methionin und [¹⁸F]Fluorethyltyrosin ([¹⁸F]FET) eine große Rolle. Ein Marker zellulärer Proliferation ist 3'-[¹⁸F]Fluor-3'-desoxythymidin ([¹⁸F]FLT). Apoptose lässt sich z.B. durch radiomarkierte Annexin V-Derivate darstellen. Zur Erforschung des Tumormilieus und dessen Zusammensetzung in Bezug auf hypoxische Areale (O₂-Mangel) finden [¹⁸F]Fluormisonidazol ([¹⁸F]FMISO), [¹⁸F]Fluorazomycinarabinofuranosid ([¹⁸F]FAZA) und [⁶⁰Cu]Diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazon) ([⁶⁰Cu]ATSM) Anwendung. Gerade im Bereich der Erkennung spezifischer Zelloberflächenrezeptoren wie auch Angiogenese eignen sich besonders radiomarkierte Peptide, wie das [⁸⁶Y]Y-DOTATOC, ein stabiles Derivat des Somatostatins, zur Detektion des Somatostatin-Rezeptors 2 (SSTR2) oder ¹⁸F-markierte RGD-Peptide zur Adressierung der Angiogenese [6].

1.2 Radioaktiv markierte Peptide in der diagnostischen und therapeutischen Nuklearmedizin

Auf Basis des humanen Genoms wurden bis 2002 483 Zielmoleküle (Targets) mit Hinblick auf die Anzahl Krankheits-relevanter Gene identifiziert, die zukünftig mit einem Arzneimittel adressiert werden können. Dabei sind Proteintargets hauptsächlich vertreten [7]. Peptide eignen sich besonders aufgrund ihrer vorteilhaften Größe zur Adressierung dieser Targets [8]. In den letzten Jahren wurden zunehmend Anstrengungen zur Entwicklung Peptid-basierter Radiopharmaka für die nuklearmedizinische Anwendung in der Bildgebung und Therapie unternommen. Der einschlägige Fortschritt in der Molekularbiologie zur Erforschung von Krebserkrankungen, die anspruchsvolle Diagnosen und Behandlungsmöglichkeiten erfordern, führte zur Identifizierung einiger Rezeptorsysteme und von Zelloberflächenmolekülen, die als molekulare Targets für peptidische Agenzien dienen [9]. In Abhängigkeit des verwendeten Radionuklides können Peptide für die Diagnose oder Therapie eingesetzt werden. Für diagnostische Applikation sind Radionuklide mit γ -Strahlung notwendig, wie ^{99m}Tc und ^{111}In , die für die Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (SPECT) eingesetzt werden oder aber Positronen-Strahler, wie ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{124}I für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) [10, 11]. Für therapeutische Zwecke eignen sich α -Strahler, wie ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac oder β -Strahler (z.B. ^{90}Y , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{131}I). Alternativ dazu werden Radionuklide, die Auger-Elektronen emittieren, beispielsweise ^{67}Ga , ^{111}In oder ^{125}I diskutiert [10, 12].

Im Vergleich zu Anikörpern zeichnen sich Rezeptor-bindende Peptide durch ihre geringere Molekularmasse, die günstige und automatisierte Synthetisierbarkeit aus. Sie können hohe Affinität zum Peptidrezeptor besitzen. Ihre günstige Pharmakokinetik ist durch eine schnelle Eliminierung aus dem Blut, erhebliche Aufnahme in das Targetgewebe nach Applikation, exzellente Tumorpenetration und hohe Target-zu-Hintergrund-Verhältnisse charakterisiert. Außerdem sind Peptide von hydrophiler Natur, wodurch eine schnelle Eliminierung über den Harntrakt ermöglicht wird. Ferner besitzen Peptide geringe Immunogenität, sowie geringe Akkumulation im Knochenmark [10, 12-14]. Durch diese Charakteristika finden Peptide im Gegensatz zu radiomarkierten Proteinen und Antikörper bevorzugt Anwendung.

Während Radiopeptide für die Diagnostik idealerweise nach der Untersuchung schnell ausgewaschen werden sollen, ist eine Akkumulation des Radiotherapeutikums im Tumor erwünscht, was zur Zerstörung des Tumors durch ionisierende Strahlung führt [15].

Der limitierende Faktor in der Nutzung radiomarkierter Peptide besteht in der eingeschränkten Stabilität unter physiologischen Bedingungen, was die Bewertung des

Radiopeptides hinsichtlich einer potentiellen Anwendung maßgeblich beeinflusst. Jedoch lassen sich durch Eingriff in die Peptidstruktur höhere Stabilitäten *in vivo* erzielen. Zu solchen Modifikationen zählen der Einbau von D-Aminosäuren bzw. anderen unnatürlichen Aminosäuren, N-Methylierung, der Ersatz von α -Aminosäuren durch β -Aminosäuren, Zyklisierung von Peptiden, aber auch Derivatisierung mit Zuckerkomplexen [10]. Darüber hinaus spielt ebenso die Auswahl und Evaluierung der Targets von Radiopeptiden eine große Rolle. Dies demonstriert Reubi ausführlich an Peptidrezeptoren als Targets für die Krebsdiagnose und -therapie. Dabei betont er, dass die Rezeptordichte direkt an Tumorspezies von Patienten untersucht werden soll, da sich Rezeptorexpression und -regulierung ändern können, wenn humane Tumore in Zelllinien kultiviert oder in Tiere transplantiert werden [16].

Allerdings ist die Entwicklung potentieller Peptide für die Diagnose und Therapie bisher auf wenige klinisch zugelassene und kommerziell verfügbare radiomarkierte Peptide mit eingeschränktem Anwendungsbereich begrenzt. Das erste klinisch-zugelassene Peptid-basierte Tumordiagnostikum, welches durch die US Food and Drug Administration (FDA) für den humanen Einsatz genehmigt wurde, ist das ^{111}In -markierte DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure)-derivatisierte Octreotid (Octreoscan[®]), ein stabilisiertes, zyklisches Somatostatin-Derivat, das an die Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5 (SSTR2, SSTR5) bindet. Es wurde zum ‚Goldstandard‘ für die Diagnostik neuroendokriner Tumore [12, 13]. Für die therapeutische Anwendung wird ^{90}Y als Radionuklid verwendet (OctreoTher[®]) [10]. Auch das erste Radiopeptid für die externe Bildgebung wird durch das mit ^{123}I direkt am Tyr³ iodierte Octreotid repräsentiert. Auf dem Gebiet der Radiopeptidtherapie, bei der Tumore durch eine Bestrahlungstherapie oder Chemotherapie nicht mehr zugänglich sind, hat sich besonders das Yttrium-90-markierte DOTA-Phe¹-Tyr³-Octreotid (DOTATOC) bewährt [12], welches auch palliativ verwendet wird. Damit wurde der Somatostatin-Rezeptor als ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor [17] zum Prototyp in Diagnostik und Therapie. Nachteilig hierbei ist, dass SSTR-überexprimierende Tumoren, wie GH (Wachstumshormon)-sekretierende Hypophysenadenome, Pankreaskarzinome, Neuroblastome, medulläre Schilddrüsenkarzinome oder kleinzellige Lungenkarzinome neuroendokrinen Ursprungs sind [16]. Karzinome mit diesen histologischen Charakteristika kommen hingegen nicht häufig unter den Krebsarten mit höchster Inzidenz, wie Kolon-, Brust- und Pankreaskarzinomen vor [9]. Daher wurden weitere regulatorische Peptide untersucht und verschiedene bedeutsame potentielle Peptide gefunden, wie das α -Melanozyt-stimulierende Hormon

(α -MSH), das Vasoaktiv-Intestinal-Peptid (VIP), Cholecystokin-B (CCK-B)/Gastrin, Neurotensin (NT) und Bombesin (BN) [8, 11, 18].

Aufgrund seiner günstigen physikalischen und nuklearen Eigenschaften ist besonders Fluor-18 für eine Markierung bioaktiver Peptide geeignet. Denn eine Halbwertszeit von 109,8 min erlaubt Synthesen und Bildungsprozesse von mehreren Stunden und damit ebenso einen Transport in andere Einrichtungen und Krankenhäuser. Die geringe Positronenenergie von 0,64 MeV macht Aufnahmen mit höchster Auflösung möglich und verursacht in Verbindung mit der kurzen Halbwertszeit bei Patienten nur geringe Strahlendosen und führt zu einer nur kurzen maximalen Reichweite von 2,3 mm in Geweben [14].

Darüberhinaus hat die Entwicklung verschiedener prosthetischer Gruppen eine effiziente Markierung von Peptiden mit Fluor-18 erleichtert. Dabei ist der Markierungsbaustein *N*-Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat (^{18}F SFB) besonders für die ^{18}F -Markierung bioaktiver Peptide in Hinblick auf *in vivo* Stabilität und Ausbeuten geeignet [14]. Ferner führen Dijkgraaf *et al.* [19] und Schirrmacher *et al.* [20] eindrucksvoll einen Überblick zu Methoden der ^{18}F -Markierung auf. ^{18}F -markierte Peptid-basierte Radiopharmaka, wie ^{18}F -markierte Somatostatinanaloga, α -Melanozyt-stimulierendes Hormon (α -MSH), Neurotensin (NT) und RGD-Peptide wurden auf ihr Potential als Diagnostikum untersucht [14]. Gerade ^{18}F -markierte RGD-Peptide, wie das glykosylierte Peptid ^{18}F Galacto-RGD und ein ^{18}F -markiertes tetrameres RGD-Peptid für die nicht-invasive Erkennung von tumor-induzierter Angiogenese auf Basis der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Detektion, sind sehr vielversprechende Radiotracer für die Überführung in die klinische Praxis [21].

1.3 Einführung in die Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Im Rahmen der Wirkstoffentwicklung, Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, aber auch der Nuklearmedizin hat die Synthese von Peptiden in den letzten Jahren zunehmend Bedeutung gewonnen, wobei sich die Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis, SPPS) als effizienteste Methode durchgesetzt hat. Bruce Merrifield, der die Peptidsynthese revolutionierte, indem er das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese 1963 publizierte und damit als Gründer dieser Methode gilt [22], erhielt für diese herausragende Forschungsleistung 1984 den Nobelpreis für Chemie. Einen weiteren Meilenstein legte Merrifield durch die Automatisierung der Peptidsynthese an der festen Phase und stellte 1965 den ersten programmgesteuerten Syntheseapparat für die SPPS vor [23]. Über die letzten Jahrzehnte erfolgte eine

Weiterentwicklung der automatisierten SPPS, die heute bis hin zur vollautomatisierten, mikrowellen-gestützten Festphasenpeptidsynthese reicht, die mit einer deutlichen Zeitersparnis verbunden ist [24, 25]. Die Perfektionierung zu diesem hohen Entwicklungsstand der SPPS wurde parallel durch die maßgebliche Verbesserung der Analytik und Reinigung der Syntheseprodukte möglich [26].

Die Grundlage der chemischen Synthese von Peptiden basiert auf der sukzessiven Verknüpfung von Aminosäuren in einer Kondensationsreaktion unter Bildung einer Säureamidbindung, der sogenannten Peptidbindung (-CO-NH-). Dabei wird der Aufbau des Peptides beginnend vom Carboxy-Terminus aus zum Amino-Terminus realisiert. Im Rahmen der SPPS ist das aufzubauende Peptid an einer chemisch inerten, unlöslichen Matrix verankert. Ein Divinylbenzol-quervernetztes Polystyrol als Polymerträger gewährleistet gute Quelleigenschaften für eine effektive Zugänglichkeit der Reagenzien. Zudem bietet das unlösliche Harz noch einfache Filtrierbarkeit unverbrauchter, im Überschuss eingesetzter Reagenzien, die zu einer Komplettierung der Reaktion führen sollen, sowie entstehender Nebenprodukte. Diese einfache Synthesemethodik verschafft der SPPS große Vorteile gegenüber der klassischen Peptidsynthese in Lösung.

Das in Abb. 2 verdeutlichte Grundprinzip der SPPS zeigt die an das polymere Harz über eine Linkerfunktion geknüpfte C-terminale Aminosäure, die über ihre Aminofunktionalität an die Carboxyfunktion der nächsten Aminosäure in wiederholter Abfolge gekuppelt wird.

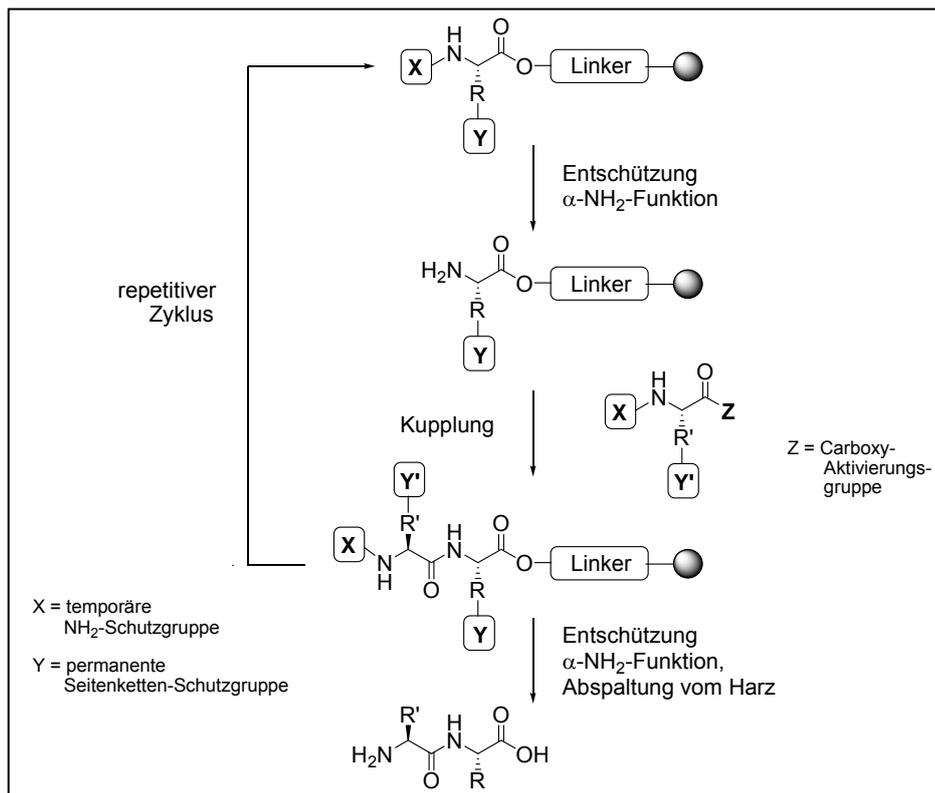


Abb. 2: Prinzip der SPPS nach White und Chan, 2000 [27]

Die reversible spaltbare Linkerfunktion zur Freisetzung des Peptides vom Harz am Ende der Synthese kann säurelabil sein, wie im Falle des *p*-Alkoxybenzylesterlinkers des Wang-Harzes zur Generation der Peptidsäure oder des Rinkamidharzes für die Erzeugung eines Säureamids. Je nach Konzept der Peptidsynthese können auch hypersäurelabile Linker oder photolytisch spaltbare Linker eingesetzt werden [27]. Der korrekte Ablauf der SPPS wird über eine ausgeklügelte Schutzgruppenstrategie gewährleistet. Dazu werden reaktive Seitenketten trifunktioneller Aminosäuren mit permanenten Schutzgruppen, die den Reaktionsbedingungen während der gesamten Peptidsynthese standhalten, versehen. Die Aminogruppe der Aminosäure muss mit einer Schutzgruppe, die temporärer und milder Natur ist, geschützt werden, um einerseits eine Reaktion mit sich selbst nach Carbonsäureaktivierung zu verhindern, und andererseits jedoch nach der Kupplung für eine weitere Elongation des Peptides leicht abspaltbar sein. Es haben sich zwei Schutzgruppenstrategien durchgesetzt, das ursprüngliche von Merrifield eingeführte Boc/Benzyl-Konzept, sowie die Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie. Die Boc/Bzl-Strategie beruht auf der abgestuften Säurelabilität der α-Amino- und Seitenkettenschutzgruppen. Während die α-Aminogruppe temporär mit einer *tert*-Butoxycarbonyl- (Boc-) Schutzgruppe versehen wird, erhalten trifunktionelle Aminosäuren permanente Benzylschutzgruppen, die bei Verwendung von

Dichlormethan/TFA 1:1 zur Entschützung der Boc-Funktionalität stabil bleiben. Der Einsatz des hochtoxischen HF oder der Trifluormethansulfonsäure zur Abspaltung des fertigen Peptides vom Harz macht diese Methode jedoch wenig attraktiv [26, 28, 29]. Die populärere Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie basiert hingegen auf einem orthogonalen Schutzgruppenkonzept, wobei die basenlabile 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- (Fmoc-) Funktionalität zur Blockierung der α -Aminogruppe dient und säurelabile Seitenkettenschutzgruppen zum Einsatz kommen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird mit Piperidin vorgenommen, wobei die Formation eines Carbanions durch Abstraktion des H-Atoms am Kohlenstoffatom 9 des Fluorensystems bewirkt wird. Dieses instabile Intermediat zerfällt in das Eliminierungsprodukt Dibenzofulven und einem Carbaminsäureanion, welches decarboxyliert und so zur Freisetzung der α -Aminogruppe führt. Den Mechanismus dieser Abspaltung zeigt Abb. 3.

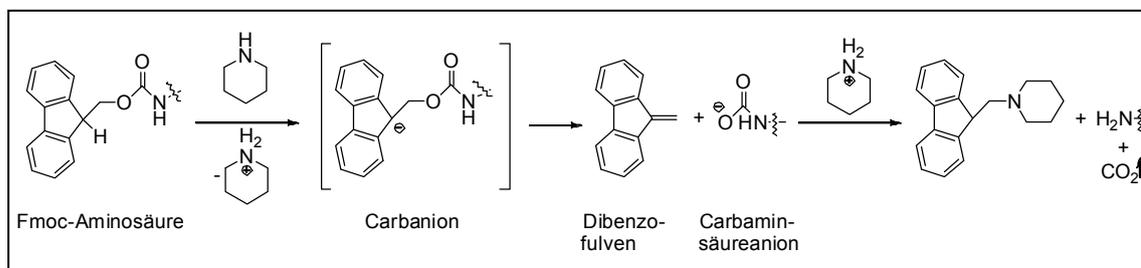


Abb. 3: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach Altmann und Mutter, 1993 [26]

Zur permanenten Schützung trifunktioneller Seitenketten werden *tert*-Butyl-Gruppen eingesetzt, wodurch die Aminosäuren Asp und Glu als *tert*-Butylester, Ser, Thr und Tyr als *tert*-Butylether hervorgehen. Für Cys, Gln, His wird hauptsächlich die Trityl-Schutzgruppe verwendet [30] und Arg wird speziell mit der 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf-) Gruppe geschützt [31].

Aufgrund der geringen Reaktivität der Carboxykomponente muss nach basischer Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe der α -Aminogruppe die Carboxyfunktion der zu kuppelnden Aminosäure aktiviert werden. Dazu stehen eine Vielzahl von Reagenzien zur Verfügung. Neben den klassischen Varianten des Aktivesterverfahrens unter Verwendung von *p*-Nitrophenylester oder Pentafluorphenylester bzw. der Generierung eines gemischten Anhydrides ist das Carbodiimidverfahren mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) unter Bildung eines Harnstoffderivates, weit verbreitet. In den letzten Jahren sind immer mehr Kupplungsreagenzien basierend auf Uroniumsalzen wie HBTU oder HATU bzw. Phosphoniumsalzen, z.B. BOP und PyBOP, attraktiv geworden [26, 32]. Abb. 4 gibt einen strukturellen Überblick zu den im Text erwähnten Kupplungs- und Aktivierungsreagenzien.

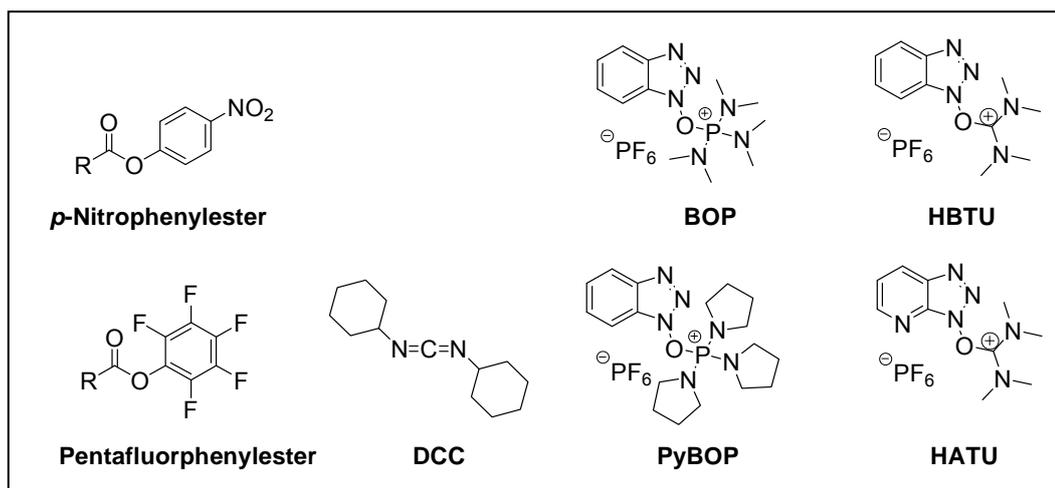


Abb. 4: Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien: Aktivester, Carbodiimid-basiertes Agenz, sowie Phosphonium- (BOP, PyBOP) und Uroniumsalze (HBTU, HATU)

Besonders das Aktivierungs- und Kupplungsreagenz bestehend aus HBTU, HOBT und DIPEA findet vielfach Anwendung [33]. In Abb. 5 ist der Verlauf dieser Reaktion aufgeführt. Im Rahmen der *in situ* Aktivierung vermittelt die Hünig-Base *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) dabei die H-Abstraktion an der Carboxykomponente. Nach Reaktion der deprotonierten Aminosäure mit dem Kupplungsagens HBTU findet 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Additiv Verwendung, um das intermediär gebildete O-Acyl-*N,N,N,N*-Tetramethylisoharnstoffderivat abzufangen und damit die eigentliche aktive Spezies zu generieren. Die so aktivierte Carboxyl-Gruppe reagiert abschließend mit der freien α -Aminogruppe der bereits am Harz verankerten Aminosäure.

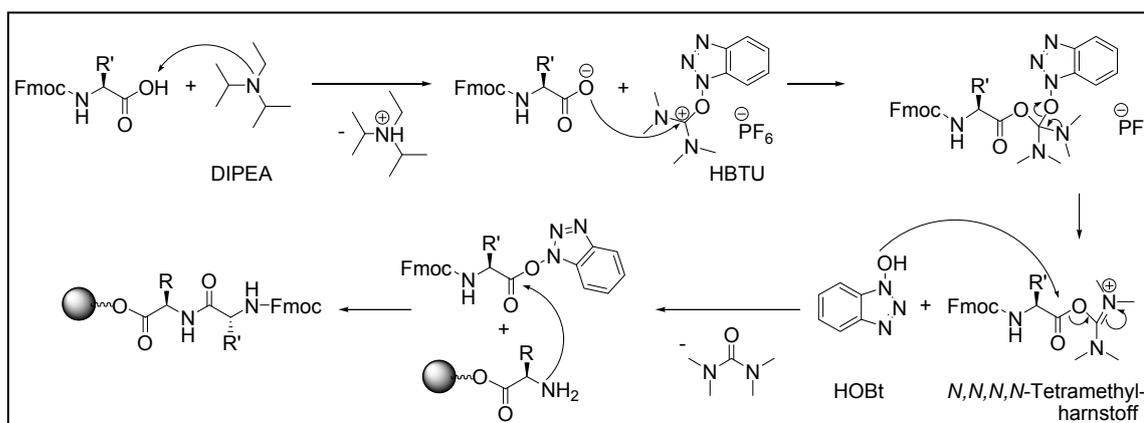


Abb. 5: Reaktionsmechanismus zur Aktivierung und Kupplung mit HBTU, HOBt und DIPEA

Nach Elongation bis zur gewünschten Peptidsequenz erfolgt die saure vollständige Entschützung des Peptides und dessen Abspaltung von der festen Phase. Das Spaltreagenz wird je nach Zusammensetzung des Peptides und der Beschaffenheit des Linkers gewählt. Die Hauptkomponenten bilden Trifluoressigsäure (TFA) (meist zu 90-95%) und Wasser. Durch Zusatz von ‚Scavengern‘, beispielsweise thiolhaltige Reagenzien wie Thioanisol oder 1,2-Ethandithiol (EDT) werden bei Met-, Cys- und Trp-haltigen Peptiden reaktive, während des Spaltprozesses gebildete Carbokationen abgefangen [34], [AppliedBiosystems, Technical Bulletin].

1.4 Phosphopeptide und ihre zentrale Bedeutung

1.4.1 Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse

Edmond H. Fischer und Edwin G. Krebs wurden 1992 für ihre Pionierarbeiten zur Entdeckung der reversiblen Proteinphosphorylierung als einen Schlüsselmechanismus innerhalb der Regulierung zellulärer, lebenswichtiger Prozesse mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Ihnen gelang es 1955 am Glycogenphosphorylase-Enzymsystem den ersten physiologischen Prozess, der durch reversible Proteinphosphorylierung reguliert wird, zu identifizieren [35]. Sie demonstrierten später auch an diesem Enzym die Abhängigkeit der Proteinphosphorylierung von der Ausschüttung von „second messenger“-Molekülen, wie das klassische cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch wiederum messenger-abhängige Proteinkinasen aktiviert werden [36].

Der Prozess der reversiblen Phosphorylierung besitzt immense Bedeutung, da fast jeder Aspekt zellulären Lebens derart reguliert wird und dabei etwa 30% aller Zellproteine kovalent gebundenes Phosphat enthalten [37]. Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung agieren als molekulare Schalter zur Modulierung lebenswichtiger, physiologischer Prozesse. Dabei regulieren diese Reaktionen den Aktivierungsstatus, d.h. phosphorylierter oder nicht-phosphorylierter Zustand, sowie dessen Dauer, wodurch eine präzise Kontrolle über die Transmission extrazellulärer Signale, subzelluläre Lokalisation, Kommunikation mit anderen Proteinen, aber auch über die Degradationsrate erreicht wird [38]. Damit wird der gesamte zelluläre Informationstransfer über die Regulation von Enzymaktivitäten und Protein-Protein-Wechselwirkungen gesteuert. Die Aktivierung und Termination solcher zellulärer Vorgänge, wie Signalkaskaden [39], Zellwachstum und -differenzierung gelingt durch die Induktion von Konformationsänderungen innerhalb des Proteins; ausgelöst durch Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsprozesse [40-44].

Die Phosphorylierungsreaktion als eine ubiquitär vorkommende posttranslationale Modifikation geschieht hauptsächlich an der Hydroxyfunktion eines Ser-, Thr- oder Tyr-Restes, wobei die γ -Phosphorylgruppe eines Nukleotidtriphosphates, für gewöhnlich ATP, transferiert wird [45]. In eukaryotischen Zellen repräsentieren pSer und pThr über 99% aller phosphorylierten Aminosäuren, wobei pTyr zu weniger als 0,1% vorkommt [46, 47]. Aminosäurereste, wie His, Lys oder Glu können ebenso phosphoryliert werden; deren Phosphoderivate hingegen sind chemisch wenig stabil und deren physiologische Prozesse schlecht verstanden [47]. Während die Phosphorylierung durch Proteinkinasen vermittelt wird, stehen für die Dephosphorylierung Proteinphosphatasen zur Verfügung. Die fundamentale biologische Bedeutung der Proteinphosphorylierung wird außerdem durch die Existenz von 518 Proteinkinasegenen innerhalb des humanen Genoms verdeutlicht [48]. Die Dephosphorylierung wird jedoch nur durch 100 Phosphatasen katalysiert [49-52]. Abweichungen im Rahmen der Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsprozesse sind eng verknüpft mit der Entwicklung und dem Verlauf von Krankheiten metabolischer Natur wie Diabetes, aber auch Inflammation und Krebs [53]. Elchebly *et al.* stellen die Proteintyrosinphosphatase-1B als potentiell therapeutisches Target für die Behandlung der Typ2-Diabetes vor [54]. Proteinkinasen sind ausgezeichnete Targets für die Wirkstoffforschung und -entwicklung im Rahmen der Krebsforschung und für Entzündungsprozesse [55].

1.4.2 Synthesewege zur Herstellung von Phosphopeptiden [47, 56-59]

Eine Aufklärung der Mechanismen und biologischen Schlussfolgerungen, die hinter den fundamentalen Prozessen der Proteinphosphorylierung/-dephosphorylierung stehen, bedarf einer leichten und selektiven Synthese von Phosphopeptiden.

Es werden zwei generelle Synthesestrategien unterschieden, wobei beide vollkompatibel mit der SPPS-Methodik sind [56]:

- (1) Der globale Ansatz verkörpert die Einführung der Phosphatgruppe über post-synthetische Phosphorylierung an einer frei vorliegenden Hydroxyl-Gruppe am Peptid-gebundenen Harz.
- (2) Der Synthon-basierte Ansatz hingegen verwendet bereits vorgefertigte und entsprechend geschützte phosphorylierte Aminosäuren als Bausteine zum direkten Einbau an die im Peptid vorgesehene Stelle.

Im Folgenden werden beide Methoden bezüglich der Verwendung des Fmoc-Schutzgruppen-Modus betrachtet.

Das allgemeine *Syntheschema zur globalen Phosphorylierung* ist in Abb. 6 aufgezeigt. Nach Kupplung des zu phosphorylierenden Ser-, Thr- oder Tyr-Restes mit

ungeschützter Hydroxyl-Gruppe wird das Peptid bis zum *N*-Terminus synthetisiert. Dabei wird die *N*-terminale Aminosäure als *N*^α-Boc geschütztes Derivat eingeführt, damit die *N*^α-Schutzgruppe unter den basischen Bedingungen der folgenden Phosphorylierungsreaktion erhalten bleibt und so eine Konkurrenzreaktion ausgeschlossen werden kann.

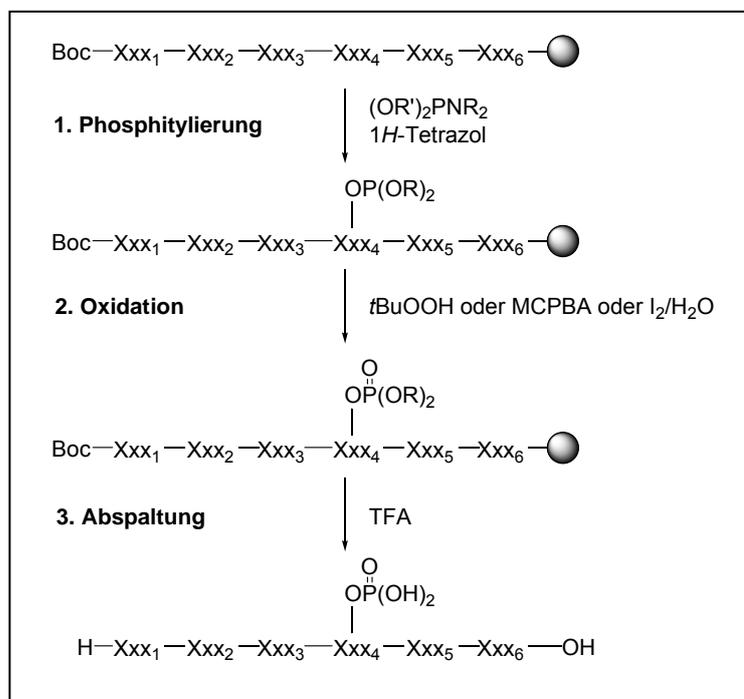


Abb. 6: Allgemeines Syntheschema der globalen Phosphorylierung mit Phosphoramiditen

Während in frühen Studien harsche Phosphorylierungsreagenzien wie Phosphoryltrichlorid/Pyridin und Orthophosphorsäure/Phosphorpentoxid Anwendung fanden, bereitete die Einführung neuer Phosphorylierungsreagenzien der Diäryl-/Dialkylphosphorsäureesterchloride $(\text{RO})_2\text{POCl}$ und symmetrischer Phosphoramidit-Derivate $(\text{RO})_2\text{PNR}'_2$ einen vielversprechenden Weg zur milden Herstellung von Phosphopeptiden [60]. Auch wenn die Oxidationsstufe des Phosphors in Diäryl- und Dialkylphosphorsäureesterchloriden bereits +V beträgt, womit auf eine folgende Oxidationsreaktion verzichtet werden kann, werden *N,N*-Dialkylphosphoramidite (Phosphorigsäuredialkylesteramid) aufgrund ihrer höheren Reaktivität und dem selektiveren Reaktionsverlauf vorzugsweise eingesetzt. Im Rahmen der Phosphitylierungsreaktion mit *N,N*-Dialkyl/*N,N*-Diärylphosphoramiditen $(\text{RO})_2\text{PNR}'_2$, die auch kommerziell erhältlich sind ($\text{R} = \text{Bzl}, \text{tBu}$; $\text{R}' = \text{Et}, \text{iPr}$), wird unter milden sauren Bedingungen durch den Einsatz von 1*H*-Tetrazol gearbeitet. Für die Oxidation des generierten dreiwertigen Phosphitesters steht eine Auswahl geeigneter

Oxidationsmittel, wie *m*-Chlorperbenzoesäure (MCPBA), wässriges Iod oder *tert*-Butylhydroperoxid zur Verfügung [57].

Eine vielfach beschriebene Nebenreaktion der globalen Phosphorylierung ist die sauerkatalysierte Bildung von H-Phosphonaten, die am Phosphittriestert-Intermediat während der Phosphitylierung durch einen Überschuss an 1*H*-Tetrazol bewirkt wird. Durch das Einhalten einer kurzen Zeitspanne zwischen dem Phosphitylierungsschritt und der Oxidationsreaktion lässt sich diese Nebenreaktion weitgehend einschränken [58, 59].

Die Alternative zur globalen Phosphorylierung bildet der Synthon-basierte Ansatz, wobei bereits phosphorylierte Aminosäurebausteine eingesetzt werden (Abb. 7).

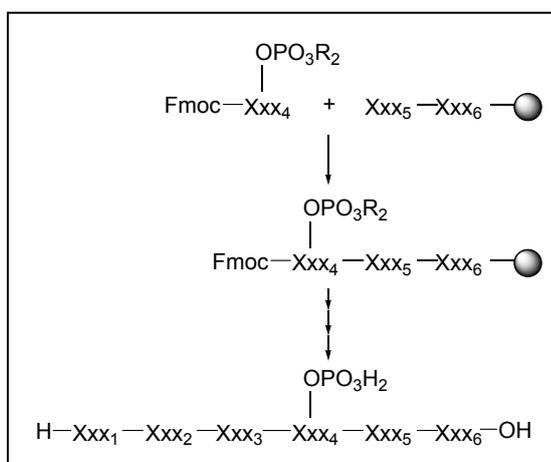


Abb. 7: Prinzip des Synthon-Ansatzes zur Herstellung von Phosphopeptiden

Im Falle des Phosphotyrosins wird als einfachster Baustein ein ungeschützter Monophosphatester $\text{Fmoc-Tyr(PO}_3\text{H}_2\text{)-OH}$ beschrieben, der sich jedoch aufgrund seiner begrenzten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und der sequenzabhängigen Pyrophosphatbildung als möglicher Nebenreaktion während der Peptidelongation nur begrenzt einsetzen lässt. Während eine Vielzahl bis-geschützter Derivate für das pTyr ($\text{Fmoc-Tyr(PO}_3\text{R}_2\text{)-OH}$, $\text{R} = t\text{Bu, Bzl, Me, Allyl und NMe}_2$) als $\text{Fmoc-Tyr(PO(NMe}_2\text{))}_2\text{-OH}$ -Baustein in der SPPS von Phosphopeptiden Verwendung finden, sind Fmoc-Phosphoserin und $\text{Fmoc-Phosphothreonin}$ mit vollständig geschützter Phosphatgruppe ausgeschlossen. Die Ursache dafür ist in der unter den basischen Bedingungen der Fmoc-Schutzgruppenabspaltung während der Peptidsynthese stattfindenden β -Eliminierung und dem damit einhergehenden Verlust der Phosphatgruppe zu finden.

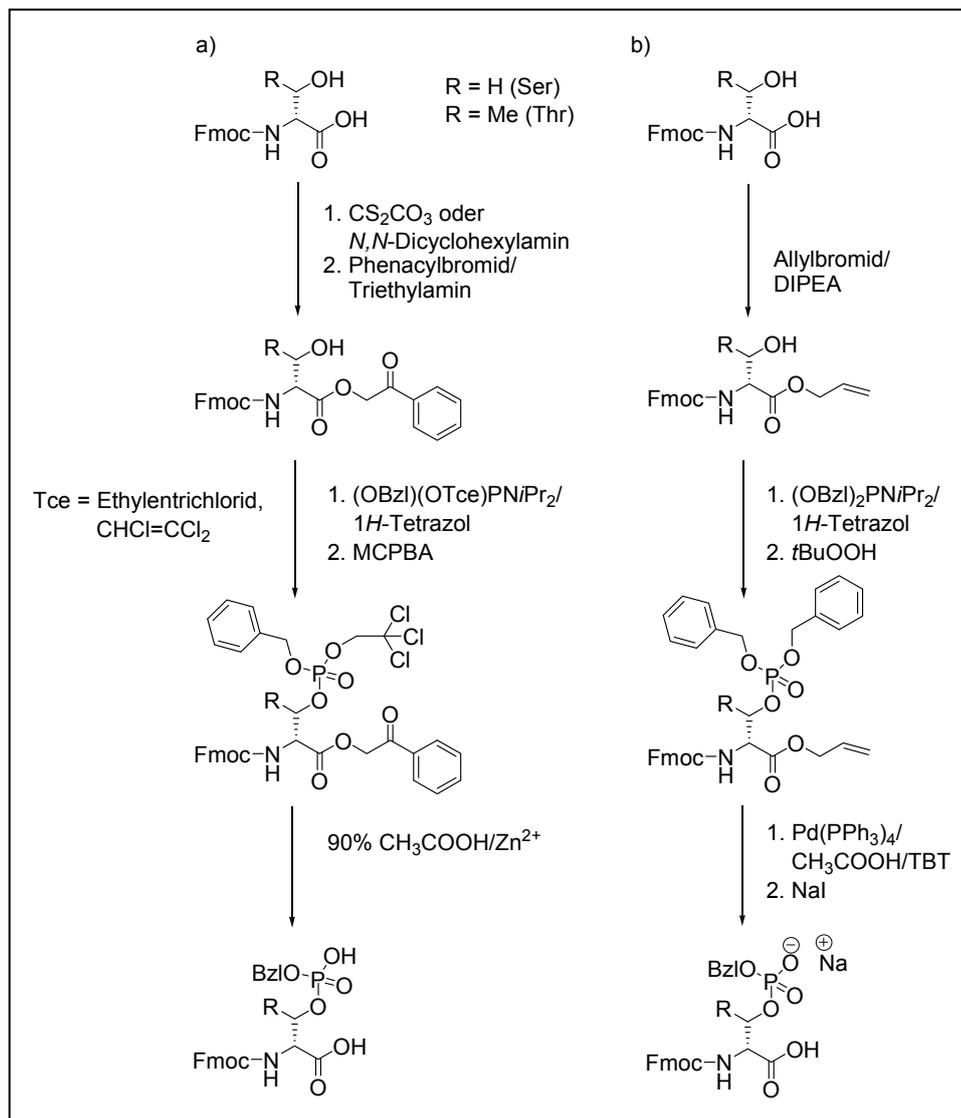


Abb. 8: Synthese der monobenzylierten Bausteine $\text{Fmoc-Xxx}(\text{PO}(\text{OBzl})\text{OH})\text{-OH}$ ($\text{Xxx} = \text{Ser, Thr}$) mittels Phenacylester-Schützung nach Wakamiya *et al.* [61] (a) und Allylester-Schützung nach Vorherr und Bannwarth [62] (b)

Durch die Einführung eines monobenzylierten pSer-Derivates ($\text{Fmoc-Ser}(\text{PO}(\text{OBzl})\text{-OH})\text{-OH}$) von Wakamiya *et al.* [63] und des monobenzylierten pThr-Derivates ($\text{Fmoc-Thr}(\text{PO}(\text{OBzl})\text{-OH})\text{-OH}$) durch Vorherr und Bannwarth [62] gelang die entscheidende Verbesserung des Synthons-Ansatzes. Die Piperidin-vermittelte β -Eliminierung wird bei Einsatz der monobenzyl-geschützten pSer/pThr-Bausteine durch Deprotonierung der ungeschützten Phosphorsäurefunktion unterdrückt ([63], Novabiochem). Eine geeignete Darstellung der beiden Bausteine lässt sich durch die in Abb. 8 verdeutlichten Methoden der Phenacylester-, aber auch der Allylesterschützung, vornehmen.

Auch monobenzylisiertes pTyr wurde für die Phosphopeptidsynthese entwickelt [61], dass gegenüber nicht-geschütztem pTyr, vor allem aber dibenzyl-geschütztem pTyr von Vorteil ist, da auch hier die im Fmoc-Modus der SPPS benötigte Piperidinbehandlung zur Nebenreaktion unter Abspaltung einer Benzylschutzgruppe führt.

Das Problem schlechter Kupplungsausbeuten bei Verwendung monobenzyl-geschützter Phosphoaminosäuren, wobei besonders das Fmoc-Thr(PO(OBzl)-OH)-OH-Derivat eine Herausforderung darstellt, lässt sich durch den Einsatz uroniumbasierter Kupplungsagenzien und einem dreifachen Überschuss an DIPEA umgehen. Perich *et al.* untersuchten dazu die Effizienz verschiedener Kupplungsmethoden für den Einbau der monobenzylierten Phosphoaminosäuren pSer, pThr und pTyr anhand der multiplen Peptidsynthese, wobei sich die Kombinationen der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA, sowie HATU/HOAt/DIPEA als überlegen herausgestellt haben. Phosphonium-basierte Kupplungsreagenzien wie BOP und PyBOP zeigten schlechte Kupplungsausbeuten [64].

Ferner lässt sich die „Online“-Phosphorylierung, welche für die Darstellung längerer Peptidsequenzen beschrieben wird, als eine Kombination der globalen Phosphorylierung und des Synthons-Ansatzes verstehen. Wie in Abb. 9 aufgezeigt, findet die Phosphorylierung der gewünschten Aminosäure direkt nach deren Einbau statt.

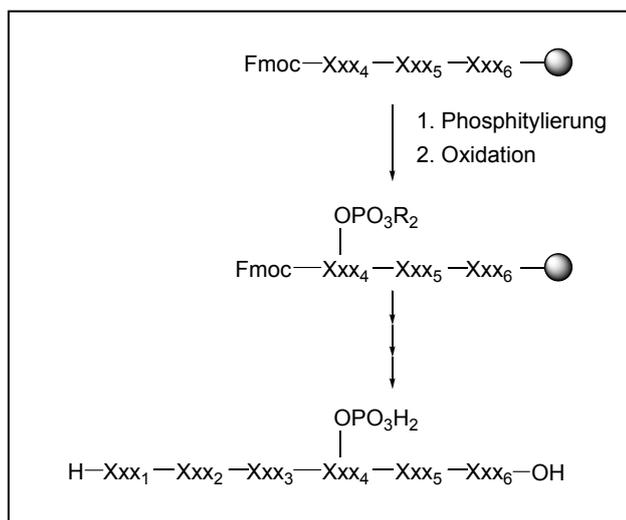


Abb. 9: Synthese von Phosphopeptiden mittels „Online“-Phosphorylierung nach Attard, 2007 [59]

Anschließend wird die Peptidsequenz mit Hilfe eines symmetrischen Dialkyl-/Diarylphosphoramidites komplettiert und das Peptid durch Abspaltung vom Harzträger isoliert.

Dieser Ansatz ist wiederum nur auf die Synthese pTyr-haltiger Peptide beschränkt aufgrund der Gefahr einer potentiellen β -Eliminierung an der Phosphatgruppe pSer-/pThr-haltiger Peptide nach Piperidinbehandlung zur Fmoc-Abspaltung [59].

1.4.3 Stabilität von Phosphopeptiden

Phosphopeptide sind aufgrund ihrer hydrophilen Natur überaus für die Untersuchung physiologisch relevanter Prozesse geeignet. Am Beispiel Phosphothreonin-haltiger Peptide wurde erhöhte Stabilität in humanem und Schafserum festgestellt - ein Vorteil gegenüber metabolisch instabilen nicht-modifizierten Peptiden [65, 66]. Hoffmann *et al.* untersuchten eine Reihe synthetischer nicht-, mono- und diphosphorylierter Peptide in humanem Serum. Diese Phosphoserin- und Phosphothreonin-haltigen Peptide entsprechen den immundominanten Regionen abweichender hyperphosphorylierter Sequenzen des humanen τ -Proteins, die den gepaarten helikalen Filamenten der Proteinablagerungen des Alzheimer-erkrankten Gehirns entstammen. Nicht-phosphorylierte Peptiden weisen im Vergleich zu den phosphorylierten Analoga eine wesentlich höhere Serumstabilität auf. Weiterhin ist die Bindung der Phosphatgruppe an die Seitenkette von Ser und Thr stabiler als das Peptidrückgrat in humanem Serum. Sequenzierung mittels Edman-Abbau ergab eindeutig das phosphorylierte Threonin an entsprechender Stelle; die Degradationsprodukte wurden einer Spaltung durch Aminopeptidase zugeordnet.

Die höchste Stabilität wurde für die Phosphopeptide detektiert, deren Phosphat-Seitenkette am nächsten zum *N*-Terminus lokalisiert ist. Zudem erweist sich die Anwesenheit eines zur Phosphorylierungsstelle benachbarten Pro-Restes als positiv, denn dadurch wird die Spaltung mittels Prolin-gerichteter Peptidasen reduziert [67, 68]. Neben dieser Studie zur Stabilität *in vitro*, sind in der Literatur bisher keine Abhandlungen zur *in vivo*-Stabilität von Phosphopeptiden erschienen.

1.4.4 Phosphopeptide als potentielle Pharmaka für das Targeting von Phosphopeptid-bindenden Proteindomänen

Synthetische Phosphopeptide sind geeignete Werkzeuge, um Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsprozesse aufzuklären. Dabei imitieren Phosphopeptide einerseits Phosphoproteinfragmente, die Untersuchungen und Charakterisierung der Funktionen

von Proteinkinasen und -phosphatasen zulassen, insbesondere für ein Hochdurchsatz-Screening von Kinase- und Phosphataseinhibitoren.

Synthetische Phosphopeptide selbst sind interessante privilegierte Strukturen für die Wirkstoffentwicklung [58, 69, 70]. Der erste bedeutsame Wirkstoff, der durch die US Food and Drug Administration (FDA) 2001 für die klinische Anwendung zugelassen wurde, ist der ABL-Tyrosinkinaseinhibitor Gleevec der Firma Novartis [71]. Als vielversprechende intrazelluläre Modulatoren Proteinkinase-vermittelter Signaltransduktionsprozesse sind Phosphopeptidliganden in der Lage, den Signalmechanismus zu stimulieren oder zu inhibieren. Dazu ist die Verwendung verschiedener Phosphopeptide für das Targeting von Phosphopeptid-bindenden Proteindomänen bedeutsam. Zu den Phosphotyrosin-bindenden Proteindomänen zählen die Src Homology-2 (SH2), die als erste modulare Signaldomäne identifiziert wurde, aber auch die PTB (Phosphotyrosin-bindende Proteindomänen) [72]. Beide Proteindomänen erkennen phosphorylierte Tyrosinsequenzen. Kürzlich wurden auch Proteinmodule entdeckt, die Phosphoserin-/Phosphothreonin-Reste binden. Dazu zählen die 14-3-3 Proteine, die FHA, BRCT [73, 74], WD-40, Pin1 und die Polo-Box Domäne der Plk1 [41, 75-78].

1.4.5 Die Polo-like Kinase-1 als ein onkologisches Target für Phosphopeptide

Die Polo-like Kinase-1 (Plk1) als ein Mitglied der Familie der Polo-like Kinasen ist eine Zellzykluskinase, die den Zellzyklusverlauf kontrolliert und dabei ganz besonders in mehreren Phasen der Mitose und an Zellzykluskontrollpunkten Schlüsselfunktionen einnimmt. So initiiert die Plk1 den Eintritt in die Mitose durch Aktivierung des cyclin-abhängigen Cdk1/Cyclin B-Komplexes am G2-M-Übergang, ist weiterhin an der Bildung der bipolaren Spindel, der Chromosomenreifung und -separation beteiligt, reguliert den APC/C-Komplex (anaphase-promoting complex/cyclosome) und ist auch in die Cytokinese involviert [79-83]. Währenddessen wird die Plk1 selbst reguliert und unterliegt einer Änderung der Lokalisation hin zu verschiedensten subzellulären Strukturen. Neben der Lokalisation werden auch die Expression und Aktivität der Plk1 im Zellzyklus dynamisch reguliert, die in der G0-, G1- und S-Phase gering sind, hin zur G2-Phase steigen und in der M-Phase ihr Maximum erreichen. Beginnend in der Anaphase wird die Plk1 durch den APC/C-Komplex für die Degradation mittels ubiquitin-abhängigen Proteolyse am Mitoseaustritt gekennzeichnet, was anschließend zu einer signifikanten Senkung der Plk1-Konzentration in der Zelle führt [84, 85].

Die Plk1 wird als ein entscheidender Proliferationsmarker beschrieben und ist in vielen humanen Tumoren überexprimiert. Dazu zählen das Nichtkleinzellige

Bronchialkarzinom, maligne Tumore im Hals-Kopf-Bereich, Speiseröhrenkrebs, Magenkarzinome, Melanome, Brustkrebs, Eierstockkrebs, endometriale Karzinome, kolorektale Tumore, Gliome und Schilddrüsen-Karzinome. Dabei korreliert das Expressionsniveau der Plk1 im Tumor stark mit der Aggressivität und Prognose für den Tumorpatienten [86-88]. Damit besitzt die Plk1 Potential als onkologisches Target für die Krebsforschung.

Der Aufbau der Plk1, wie in Abb. 10 aufgezeigt, ist durch eine Domänenstruktur gekennzeichnet. Unter den 11 Subdomänen werden zwei charakteristische Regionen definiert, die am N-Terminus befindliche Serin/Threonin Kinasedomäne und die C-terminale Polo-Box-Domäne (PBD).

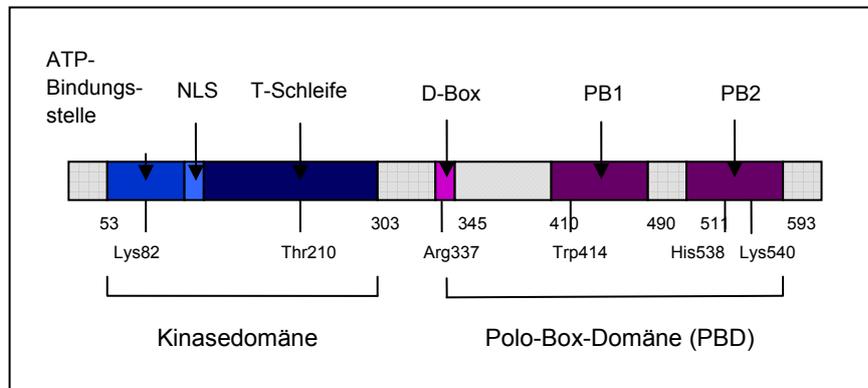


Abb. 10: Domänenstruktur der humanen Plk1 nach Strebhardt und Ullrich, 2006 [88]

Die stark konservierte, katalytische Kinasedomäne beinhaltet neben der ATP-Bindungsstelle ein entscheidendes Element für die nukleäre Lokalisation (NLS) sowie die T-Schleife mit dem Thr210-Rest, dessen Phosphorylierung eine Aktivierung der Plk1 hervorruft. Die Polo-Box-Domäne (PBD) der carboxyterminalen Region ist ein einzigartiges Strukturmotiv, wie es nur in der Familie der Polo-like Kinasen zu finden ist. So wird jener Region eine außerordentlich bedeutende Rolle bei der funktionellen Kontrolle dieser Kinase zuteil [81, 88].

Innerhalb der PBD befinden sich zwei Polo-Boxen (PB1 und PB2), wobei die Aminosäurereste Trp414, His538 und Lys540 die Phosphoselektivität ermöglichen. Die D-Box (destruction box) enthält eine entscheidende Sequenz zur Auflösung des Plk1-Komplexes am Ende der Mitose.

Die PBD stellt eine nichtkatalytische, autoregulatorische Domäne dar, die mit der katalytisch wirksamen Kinasedomäne wechselwirken kann. Alternativ dazu haben Elia

et al., 2003 anhand orientierender Peptidbibliotheken ein Phosphopeptid-bindendes Konsensusmotiv mit der Sequenz Ser-[pSer/pThr]-Pro/Xxx (Xxx = Gly, Cys) identifiziert. Für die humane Plk1 wird ein optimal-bindendes Phosphopeptid vorgestellt; es weist die Sequenz Pro-Met-Gln-Ser-pThr-Pro-Leu auf und besitzt einen K_d -Wert von 280 nM [89].

Aus dem strukturellen Aufbau der Plk1 lässt sich schlussfolgern, dass besonders Plk1-PBD-bindende Phosphopeptide als Werkzeuge für das selektive Targeting der Plk1 in Tumoren vielversprechend sind. Im Rahmen der Tumorforschung sind bisher einige niedermolekulare Inhibitoren der Plk1 publiziert, die ihre Wirkung ATP-kompetitiv an der Kinasedomäne entfalten [90]. So induziert Scytonemin Apoptose ohne einen G2/M-Arrest zu bewirken [91], Wortmannin inhibiert die Plk1 *in vitro* [92], das Dihydropteridinon-Derivat BI2536 führt zu einem M-Arrest und Apoptose und wird klinisch in Phase I untersucht [93]. Mit Cyclapolin-1 [94] und Compound-1 [95] werden Spindeldefekte wie auch M-Arretierung beobachtet. Lee und Idle stellten 2008 das Poloxin als einen Inhibitor der Polo-Box-Domäne *in vitro* vor, der zu subzellulärer Delokalisation verbunden mit mitotischem Arrest und Apoptose führt [96].

1.5 Herausforderungen und Möglichkeiten einer Zellinternalisierung von Phosphopeptiden

Phosphopeptide sind potentielle Liganden zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen, die auf Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsprozessen beruhen. Diese modifizierten Peptide besitzen hydrophile Aminosäureseitenketten und eignen sich damit außerordentlich für die Pharmakaforschung und -entwicklung. Die Phosphatgruppe selbst ist eine der biologisch essentiellen Funktionalitäten, ob als Hauptkomponente von DNA und RNA, in ATP, der Universalenergiequelle biologischer Systeme oder als reversible, kovalente Modifikation einer Vielzahl von Biomolekülen, wie Proteinen, Zuckern oder Lipiden. Gleichzeitig ist die Phosphatgruppe jedoch aufgrund ihrer hohen negativen Ladung zu einer schlechten zellulären Biokompatibilität verurteilt und damit das Überqueren der Zellmembran durch das phosphatierte Biomolekül kaum erreichbar.

Das Ermöglichen eines intrazellulären Zuganges von Phosphopeptiden als anionische Strukturen, um so ihr intrazelluläres Schicksal zu verfolgen, stellt eine große Herausforderung dar und bedarf einer ausgeklügelten Strategie.

Während Methoden wie Mikroinjektion oder Membranpermeabilisation zu harsche Bedingungen erfordern und auf *in vitro*-Anwendungen limitiert sind, stellen Ansätze

über molekulare Transporter für die Anwendung an biologischen Systemen mildere und vielversprechende Methoden dar. Eine Möglichkeit besteht in der Anwendung rezeptorinternalisierender Peptide, welche eine spezifische Internalisierung von Phosphopeptiden vermitteln. Peptide, die über einen bekannten Mechanismus in die Zelle aufgenommen werden, wären dazu gut geeignet. So bieten sich vor allem G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Peptide an, wie beispielsweise das Neurotensin (NT) mit seinem Neurotensin-Rezeptor-1 (NTR1) oder das stabilisierte Somatostatin-Derivat Octreotid, welches über den Somatostatin-Rezeptor 2 (SSTR2) internalisiert.

Eine weitere Alternative stellen zellpenetrierende Peptide (CPP) dar. Während der letzten beiden Dekaden wurden verschiedenste CPPs im Rahmen der Pharmakaentwicklung und biomedizinischen Forschung vorgestellt, die eine Aufnahme geladener Therapeutika oder anderer Verbindungen zulassen. Der Internalisierungsmechanismus ist dabei unspezifischer und oftmals endozytotischer Natur.

Bisher sind nur wenige Studien, die eine Zellaufnahme von Phosphopeptiden untersuchen, in der einschlägigen Literatur bekannt. Mit dem Konzept der Ladungsmaskierung, konnten Allentoff *et al.* eine erleichterte Zellaufnahme Tritium-, Iod-125- und 5(6)-Carboxyfluorescein-markierter Phosphopeptide für das Targeting der SH2-Domäne der Phosphatidylinositol-3-kinase unter Zuhilfenahme der Ionenpaar-Reagenzien Hexadecyl-trimethylammoniumbromid (HDTMABr) und Tetrabutylammoniumchlorid (TBACl) erreichen [97]. Auch auf Basis zellpenetrierender Peptide wurde eine intrazelluläre Aufnahme von Phosphopeptiden versucht. So machten sich Hall *et al.* [98] und Dunican *et al.* [99] die Internalisierungssequenz der dritten Helix der Antennapedia Homeodomäne als molekularen Transporter für den phosphorylierten Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) FGFR⁷³⁰pT der hochaffinen Bindungsstelle der Phospholipase C γ (PLC γ) zu Nutze. Kürzlich wurde das Phosphopeptid P20, ein Modellpeptid aus dem Bereich der Hautforschung, kovalent und nicht-kovalent mit den Proteintransduktionsdomänen (PTD) YARA und WLR verknüpft, um eine erhöhte Penetration durch die Haut zu erreichen [100]. Zudem konnte das CPP Penetratin als Chimär mit verschiedenen Phosphopeptiden erfolgreich angewendet werden [101]. Ye *et al.* publizierten 2007 die Synthese tripodaler GpYEEI-Phosphopeptide als Templat für die pTyr-Bindungstasche der Src SH2-Proteindomäne in Konjugation mit amphiphatischen linearen Peptidanaloga (LPA) bestehend aus Arg- und Lys-Resten, welche die Zellinternalisierung steigern [102].

1.6 Zellpenetrierende Peptide

Zellpenetrierende Peptide (cell-penetrating peptides, CPPs) sind definiert als Peptide mit einer maximalen Sequenz von 30 Aminosäuren, die in der Lage sind, die schützende Barriere, d.h. die Zellmembran, zu überwinden. Von natürlichen Proteinsequenzen abgeleitete CPPs werden auch als Proteintransduktionsdomänen (PTD) bezeichnet [103]. Die Verwendung zellpenetrierender Peptide als molekulare Transporter für den intrazellulären Zugang einer Vielfalt an Biomolekülen wurde bereits in vielen Übersichtsartikeln thematisch erfasst [104-109]. Dies demonstriert die Leistungsfähigkeit der CPPs als transmembranäre Transporter und eröffnet so neue Möglichkeiten in der biomedizinischen Forschung.

CPPs können Makromoleküle mit einem Vielfachen ihres eigenen Molekulargewichtes transportieren [104]. Neben Peptiden, Proteinen und Oligonukleotiden konnten auch Liposomen mit Hilfe von CPPs in die Zelle eingeschleust werden. Zudem wurde auch verschiedenen molekularen Bildgebungsagencien durch Konjugation an CPPs ein intrazellulärer Zugang gewährt. Dazu zählen Halbleiter-Nanopartikel, Fluorophore und paramagnetische Lanthanoidchelate für die optische Bildgebung und Magnetresonanztomographie. Ferner finden Versuche für die Anwendung von CPPs in der Gentherapie statt, beispielsweise in Konjugation mit PNA (Peptidnukleinsäure), einem stabilisierten DNA-Derivat, zur Regulation der Genexpression [103], aber auch potentiell in der Impfstoffentwicklung. Lineare SynB-Vektoren sind sogar in der Lage die Blut-Hirn-Schranke als komplexe biologische Membran zu überwinden, was anhand eines SynB1-Doxorubicin-Konjugates *in vivo* gezeigt wurde [110]. Dietz und Bähr vergleichen das erfolgreiche intrazelluläre Einschleusen bioaktiver Moleküle auf Basis von zellpenetrierenden Peptiden mit der historischen Begebenheit des Trojanischen Pferdes. Dazu betrachten die Autoren die Technologie und deren Anwendungsbeispiele in einer umfassenden Abhandlung [111].

Das erste CPP entstammt dem Transkriptionsaktivator des humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) – das Tat [112]. Danach wurde an der dritten Helix der Antennapedia-Homeodomäne die Fähigkeit zur Translokation festgestellt [113, 114] und viele weitere folgten. Bisher hat sich keine einheitliche Terminologie oder Klassifikation der CPPs durchgesetzt. Einen Überblick zu häufig genutzten CPPs vermittelt Tabelle 1.

Tabelle 1: Häufig verwendete CPP-Sequenzen (Mögliche Klassifikation nach Langel, 2007 [115])

CPP	Sequenz
Protein-/Peptid-abgeleitet:	
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
Tat ₄₉₋₅₇	RKKRRQRRR
hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂
Synthetische CPPs:	
MAP	KLALKLALKALKAAALKLA
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
Polyarginin	RRRRRRRRR (R ₉)
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKRKY
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR

Die einzige gemeinsame Charakteristik aller CPPs besteht in einem hohen Gehalt an basischen Aminosäuren (Arg, Lys), die für eine positive Nettoladung sorgen. Die positive Ladung ist zwar entscheidend für die membranäre Translokation, jedoch hängt die Penetration auch von der Sekundärstruktur ab. Besonders die α -helikale Konformation ist vorteilhaft [116]. Eine mögliche Toxizität von CPPs steht in Abhängigkeit zur Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur und Gesamtladung [103]. Während für das stark positiv-geladene Polyarginin eine Toxizität mit einer effektiven Dosis (EC₅₀) von 10 μ M nachgewiesen wurde, zeigt das zellpenetrierende Peptid Tat im Vergleich geringere Toxizität (EC₅₀ > 100 μ M). Diese Studie wurde an HeLa (humane Epithelzelllinie des Zervixkarzinoms), A549 (Adenokarzinomzelllinie der Lunge) und CHO Zellen (Chinese Hamster Ovary, immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters) durchgeführt [117].

Der Mechanismus der Internalisierung von CPPs ist Thematik kontroverser Diskussionen und auch bis heute noch nicht vollständig verstanden. Aufgrund der Vielfältigkeit der physikochemischen Eigenschaften bekannter CPPs sind unterschiedliche und ebenso konkurrierende Zellaufnahmemechanismen für verschiedene CPPs denkbar. Im Allgemeinen scheinen CPPs einer rezeptor- und energieunabhängigen Translokation zu folgen, die aber auch Endozytose-vermittelt sein kann. Es liegt eine Kinetik erster Ordnung zugrunde [118]. CPPs können über

zwei Hauptwege in die Zelle gelangen: Neben dem Endozytose-Prozess (I) als energieabhängigen, vesikulären Mechanismus, kann auch die direkte Translokation (II) über die Lipiddoppelschicht erfolgen (Abb. 11).

Endozytose (I) berücksichtigt Phagozytose und Pinozytose, wobei diese in vier weitere Mechanismen klassifiziert wird: die Makropinozytose, die Clathrin-vermittelte, die Caveolin/Lipid Raft-vermittelte und die Clathrin/Caveolin-unabhängige Endozytose. Alle extrazellulären Moleküle werden dabei in Lipidvesikel eingeschlossen; ihr weiteres Schicksal hängt dann von der Fähigkeit des Moleküls ab, diesen Endosomen zu entkommen, bevor es zu Recyclingzwecken zur Plasmamembran zurücktransportiert wird oder mit Lysosomen fusioniert [107]. Tat- und Antennapedia-vermittelte Zellaufnahme beispielsweise wird nach Jones *et al.* hauptsächlich durch „Lipid Raft“-abhängige Endozytose gesteuert [117].

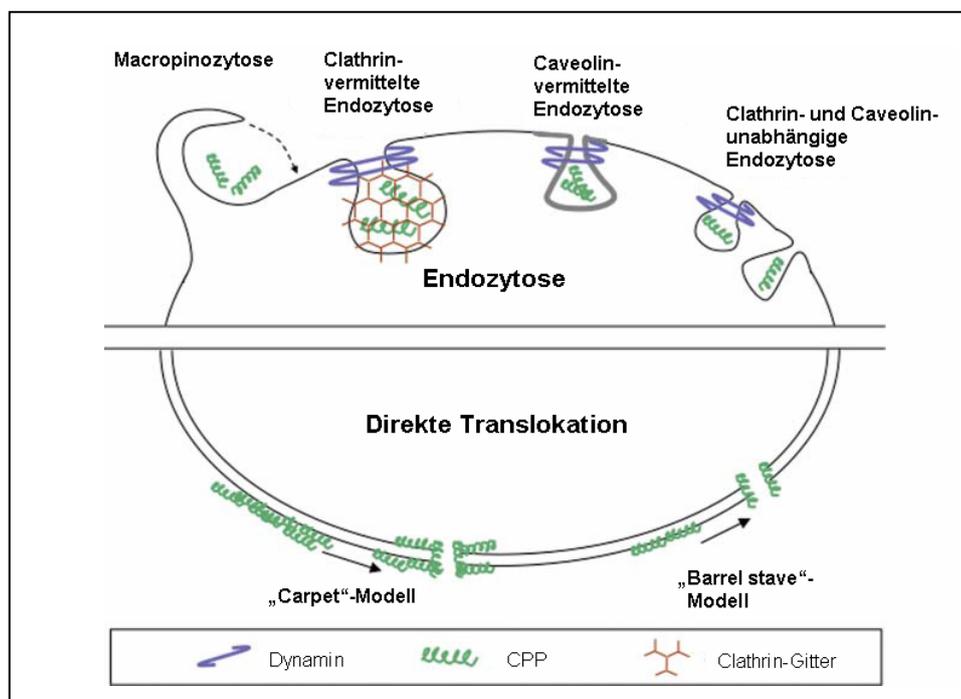


Abb. 11: Vorgeschlagene Zellaufnahmemechanismen zellpenetrierender Peptide (CPPs) nach Stewart *et al.*, 2008 [107]

Ansätze zum weiteren intrazellulären Schicksal zellpenetrierender Peptide sowie von CPP-Wirkstoff-Konjugaten liefern Patel *et al.* [119]. Dabei kann man durch gezielte Beeinflussung der Konjugation zwischen CPP und Wirkstoff eine intrazelluläre Freisetzung des Wirkstoffs vom CPP erreichen. Dazu bietet sich einerseits der Einbau chemisch spaltbarer Linker an. So können pH-sensitive Linker, wie Disulfide oder Hydrazone, nach endozytotischer Aufnahme in der reduktiven Umgebung des Endosomen/Lysosomen-Systems gespalten werden [120]. Aber auch die Inkorporation

eines enzymatisch spaltbaren Linkers ist denkbar, welcher beispielsweise durch Cathepsin B erkannt und lysosomal gespalten wird [121]. Die Gruppe um den Nobelpreisträger der Chemie von 2008, R. Tsien, synthetisierte sogar aktivierbare CPPs (ACPPs), die durch einen Matrixmetalloprotease (MMP2/MMP9)-spaltbaren Linker verbunden sind [122]. Eine permanente Verknüpfung von CPP und dem zu internalisierenden Makromolekül lässt sich durch Synthese in Tandem oder in Form eines Fusionsproteins anfertigen [109].

Auch in der Radiopharmazie haben CPPs Einzug gehalten. DOTA-konjugierte CPPs wurden zur Bestimmung von Tumorspezifitäten einer Radiomarkierung mit ^{64}Cu und ^{111}In unterzogen [123]. Für ein $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiomarkiertes Tat-Peptidchelat wurden stabile Komplexe nachgewiesen, die für eine potentielle Anwendung in der molekularen Bildgebung und Radiotherapie zur Verfügung stehen. Auch Untersuchungen zu radiomarkierten, aus dem humanen Calcitonin (hCT) abgeleiteten CPPs sind bekannt [124]. Jedoch wurden bisher keine Studien mit radiomarkierten CPP-Wirkstoff-Konjugaten angefertigt.

Zellpenetrierende Pentapeptide (CPP5)/Bax-Inhibitoren

Als Bax-inhibierende Peptide (BIP) werden die kürzesten, aus dem Ku70-Protein abgeleiteten Sequenzen bezeichnet, die essentiell sind, um Bax, ein Schlüsselprotein der Apoptose in Säugerzellen, zu binden und zu inhibieren. Durch Zell- und apoptotischen Stress gelangt das Bax-Protein vom Cytosol in die Mitochondrien und löst dort die Ausschüttung apoptotischer Faktoren aus, die den Zelltod bewirken. Das Protein Ku70 ist nun in der Lage, mittels seiner Bax-Bindungsdomäne das Bax-Protein an der Translokation vom Cytosol in das mitochondriale System zu hindern und damit die Apoptose zu unterdrücken. Gomez *et al.* gelang es, mit Hilfe eines Hefe-basierten, funktionellen Screening-Systems unter Verwendung einer humanen cDNA-Expressionsbibliothek Bax-Inhibitoren zu identifizieren, wobei jedes Peptid zellpenetrierende Eigenschaften vergleichbar mit etablierten CPPs wie Tat und Arg-haltigen Peptiden aufweist [125]. Humanes (VPMLK), Maus- (VPTLK) und Ratten-CPP5 (VPALR) besitzen an Position 1 (V), 2 (P) und 4 (L) konservierte Aminosäurereste, die essentiell für die Bax-Inhibition sind, sowie einen geladenen Aminosäurerest an Position 5 als weiteres Struktur-Aktivitäts-Merkmal. Aber auch für BIP-Mutanten, wie KLPVM oder IPMIK wurde zellpenetrierende Aktivität nachgewiesen [126]. Für die CPP5 VPTLK und KLPVM wurde sogar Proteintransduktionsaktivität (PTA) durch intrazelluläre Aufnahme der N-terminal mit dem Grünen

Fluoreszenzprotein (GFP)-gekoppelten CPP5 festgestellt, die jedoch durch weitere biochemische Analysen noch zu bestätigen ist [125].

Bax-basierte Pentapeptide sind die derzeit kleinsten, bekannten zellpenetrierenden Peptide. Deren exakter molekularer Mechanismus zur Zellinternalisierung ist jedoch noch unbekannt. Derzeitige Annahmen schließen auf einen energieunabhängigen Prozess, da eine Zellaufnahme bei 0°C und 4°C beobachtet wird, der mit einem energieabhängigen Mechanismus - hier wird eine rezeptor-vermittelte Pinozytose vorgeschlagen - gekoppelt ist, da bei 37°C eine weitaus höhere Internalisierung zu erkennen ist. Zudem wird eine sehr effiziente Internalisierung bei schnell-wachsenden, adherenten Zellen wie HeLa und HEK293T beschrieben; frei bewegliche Zellen, z.B. Jurkat-Zellen oder primär-kultivierte Mausneuronenzellen, nehmen die CPP5 nur sehr langsam auf.

Als zellschützende Peptide wird für die CPP5 nur äußerst geringe Zytotoxizität nachgewiesen, die noch wesentlich geringer ist als die der Arginin-haltigen, zellpenetrierenden Peptide, wie R₄ und R₈, sowie des Tat-Peptides YGRKKRRQRRR, besonders bei höheren Peptidkonzentrationen >10 µM. Die negativen Bax-Kontrollpeptide, wie KLPVM hingegen zeigen auch bei 400 µM keine cytotoxische Aktivität [115, 125, 126].

Zellpenetrierende Peptide abgeleitet vom humanen Calcitonin (hCT) und Cathelicidin

Das von der Schilddrüse sekretierte, 32 Aminosäuren lange, humane Peptidhormon Calcitonin (hCT) dient nativ zur Aufrechterhaltung der Calciumhomeostase, besitzt aber auch zellpenetrierende Eigenschaften. Das zellpenetrierende Potential wurde bereits an mehreren abgeleiteten Sequenzen systematisch untersucht [127], wobei auf den Calcitoninrezeptor-aktivierenden *N*-Terminus (Aminosäuren 1-8) verzichtet werden kann. Ein sehr vielversprechendes Derivat ist das verzweigte, nicht-toxische Peptid der zweiten Generation hCT(18-32)-k7, welches ursprünglich als effizientes Vehikel für die intrazelluläre Translokation von DNA in Primärzellen beschrieben wurde. Durch die Interaktion mit Proteoglykanen der Zelloberfläche gelangt es Endozytose-vermittelt in die Zelle [124]. Dabei wird eine 6-10-fach höhere Transfektionsrate in HEK293 Zellen für dieses CPP im Vergleich zu Tat(48-69) erreicht. An Quantum Dot-hCT(18-32)-k7-Konjugaten konnte der Internalisierungsmechanismus noch vertieft werden. So wird hauptsächlich ein „Lipid Raft“-vermittelter Aufnahmeprozess vermutet. Der Weg der Clathrin-vermittelten Endozytose und Makropinozytose wird nur durch einen geringen Anteil beschränkt [128]. Ferner wurde ein Ga-DOTA-Komplex-gekoppeltes hCT(18-32)-k7 untersucht, dessen stabile Modifikation jedoch einer verminderten Zellaufnahme unterliegt [129].

Alternativ dazu wurde von der Forschungsgruppe um Neundorf eine neuartige, antimikrobielle Peptidsequenz sC18 mit herausragenden zellpenetrierenden Eigenschaften publiziert. Antimikrobielle Peptide selbst sind kurze, kationische Sequenzen mit hoher Affinität zu Membranen [130]. Das CPP sC18 repräsentiert das C-terminale Fragment des antimikrobiellen Peptides Cathelicidin (CAP18) bestehend aus den Aminosäureresten 106-121, das eine Ähnlichkeit zur Sequenz des Tat(48-60) aufweist. Das chimäre Konstrukt aus sC18 und dem N-terminalen Fragment HA2 des Influenzavirus Hemagglutinin (HA), welches eine endosomale Freisetzung bewirken soll, weist in niedrigen Konzentrationsbereichen keine Zytotoxizität auf. Anhand von HeLa, MCF-7 und HEK293 Zellen wird eine effektive Zellinternalisierung über Endozytose nachgewiesen [131].

2. Konzeption und Zielstellung

Im Kontext komplexer zellulärer Prozesse stellen Phosphopeptide essentielle bioaktive Verbindungen dar, die mit Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen eng verbunden sind. Diese Prozesse sind in die Regulation nahezu jeder zellulären Funktion involviert und spielen damit ebenso im Falle von Erkrankungen eine tragende Rolle. Synthetische Phosphopeptide könnten in Form molekularer Sonden zur Charakterisierung dieser physiologisch fundamentalen Prozesse beitragen.

Im Rahmen der Dissertation sollen grundlegende Erkenntnisse zur Synthese und radiopharmakologischen Charakterisierung von Phosphopeptiden, die mit dem kurzlebigen Positronenemitter Fluor-18 markiert wurden, gewonnen werden. ¹⁸F-markierte Phosphopeptide stellen dabei neuartige Radiotracer dar, die für die Untersuchungen wichtiger zellulärer Prozesse, die auf Phosphorylierung und Dephosphorylierung basieren, zur Verfügung stehen sollen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit exemplarischen Phosphopeptiden, die als Liganden für die Polo-Box Domäne (PBD) der Zellzykluskinase Polo-like Kinase-1 (Plk1) geeignet sind. Als Mitglied der Polo-like Kinasefamilie stellt die Plk1 nicht nur ein essentielles Zellzykluskontrollelement dar, welches besonders im Verlauf der Mitose regulierend eingreift, sondern ebenso ein interessantes onkologisches Target, da eine Überexpression in vielen humanen Tumoren beschrieben wird.

Im ersten Abschnitt der Promotion sollen besonders folgende Aspekte bearbeitet werden:

- Ausarbeitung einer Methode zur Darstellung von Phosphopeptiden mit einer Ser-pThr-Kernsequenz nach dem Konsensusmotiv der Plk1-PBD-Liganden, einschließlich derer Charakterisierung
- Entwicklung einer zuverlässigen Radiomarkierung mit Fluor-18 am *N*-Terminus der Phosphopeptide mit dem bifunktionellen Markierungsreagenz *N*-Succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB)
- Radiopharmakologische Untersuchung der ¹⁸F-markierten Phosphopeptide in Hinblick auf Zellaufnahme und *in vitro* Metabolismus, sowie Aussagen zur *in vivo* Stabilität und orientierende Bioverteilung mit Hilfe des bildgebenden Verfahrens der Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Basierend auf den Ergebnissen des ersten Teilabschnittes der vorliegenden Promotion wurde die Problematik der Internalisierung erkannt und so Strategien zur Zellaufnahme von Phosphopeptiden ausgearbeitet. Dabei werden zwei Ansätze in Betracht gezogen. Einerseits die Untersuchung einer rezeptorvermittelten Zellaufnahme, wobei der Neurotensin-Rezeptor mit seinem kleinsten noch bindenden Peptidfragment Neurotensin(8-13) (NT(8-13)) als Model gewählt wurden, um eine Phosphopeptid-Internalisierung zu überprüfen.

Des Weiteren wird die aktuelle Thematik der zellpenetrierenden Peptide (CPP) aufgegriffen. Die Dissertation konzentriert sich hier auf zellpenetrierende Pentapeptide (CPP5), die auch als Bax-Inhibitoren bekannt geworden sind.

Zudem wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Biochemie (Prof. A.G. Beck-Sickinger, AG Dr. I. Neundorf) der Universität Leipzig an der Synthese von Konjugaten aus Phosphopeptid und einem Cathelicidin-Fragment, dem sC18 bzw. auch einer dem humanen Calcitonin abgeleiteten zellpenetrierenden Sequenz, dem hCT(18-32)-k7 als potente Vehikel zur Vermittlung einer Zellaufnahme gearbeitet. Zur Prüfung der Internalisierung werden fluoreszenzaktive Phosphopeptid-CPP-Konjugate mit dem Fluorophor 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) synthetisiert, sowie ¹⁸F-fluorbenzoylierte Konjugate hergestellt. Dahingehend wird nicht nur die klassische [¹⁸F]SFB-Markierung, sondern auch die [¹⁸F]SFB-Markierbarkeit unter Anwendung der in der Radiopharmazie neuartigen Mikrofluidik-Technologie betrachtet. Die Arbeiten unter Einsatz eines Mikrofluidik-Systems wurden während eines Aufenthaltes am Department of Oncology der University of Alberta, Kanada in der Arbeitsgruppe von Prof. F. Wüst durchgeführt und bewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Plk1-gerichtete Phosphopeptide und nicht-phosphorylierte Peptidanaloga

3.1.1 Festphasenbasierte Peptidsynthese von Phosphopeptiden und nicht-phosphorylierten Peptidanaloga

Die Basis zur Darstellung der Peptide bildet die Festphasen-Peptidsynthese (solid-phase peptide synthesis, SPPS), die in Kombination mit der orthogonalen Fmoc-Schutzgruppen-Strategie eingesetzt wird. Der Aufbau der jeweiligen Peptidsequenz wird automatisiert mit einem Peptidsyntheseapparat vollzogen und erfolgt kontinuierlich an der Festphase vom C- zum N-Terminus des Peptides. Als Festphase wird ein mit der Fmoc-geschützten C-terminalen Aminosäure beladenes TentaGel-Harz verwendet. Bei den Phosphopeptiden, die für die Promotion exemplarisch ausgewählt wurden, handelt es sich um Liganden einer pSer/pThr-bindenden Proteindomäne, der Polo-like Kinase-1 (Plk1)-Polo-Box Domäne (PBD). Elia *et al.* identifizierten dazu eine Serie von Phosphopeptiden mit einer Ser-[pSer/pThr]-Pro/Xxx (Xxx = Gly, Cys)-Kernsequenz, die als gemeinsames Konsensusmotiv hochspezifischer Plk1-PBD-Peptidliganden hervorgeht [89]. Neben dem hinsichtlich seiner Affinität optimalen Heptaphosphopeptid PMQSpTPL **1**, wurde das Hexaphosphopeptid MQSpTPL **2** hergestellt, sowie deren nicht-phosphorylierte Analoga PMQSTPL **Dephospho-1** und besonders MQSTPL **Dephospho-2** für eine Gegenüberstellung in Hinblick auf eine Radiomarkierung, aber auch für die Durchführung von Vergleichsstudien hinsichtlich radiopharmakologischer Charakterisierung. Eine Übersicht zu den synthetisierten Verbindungen findet sich im Anhang, S. 144 ff.

Eine einfache und komfortable Synthese der Phosphopeptide wird mit dem Synthonbasierten Ansatz realisiert, d.h. die in den Phosphopeptiden enthaltene phosphorylierte Aminosäure wird direkt als Baustein in die Peptidkette eingebaut und ist ferner voll kompatibel mit den Fmoc-Synthesebedingungen. Im Rahmen der Arbeit wird der kommerziell verfügbare Phosphothreonin-Baustein Fmoc-L-Thr(PO(OBzl)-OH)-OH verwendet, der an der Phosphatfunktionalität eine Monobenzyl-Schutzgruppe trägt.

Die Aktivierung und Kupplung der einzelnen Aminosäuren, die sich an die Fmoc-Entschützung jeder einzelnen Aminosäure mit der Base Piperidin anschließt, wird mit dem Uronium-basierten Reagenz HBTU in Kombination mit dem Additiv HOBt und der Hünig-Base DIPEA erzielt. Dieses Reagenzgemisch bewirkt die effektive Generierung einer Peptidbindung im Rahmen einer Kondensationsreaktion. Dabei erweist es sich für die zuverlässige Synthese speziell von Phosphopeptiden als erforderlich, DIPEA in

dreifachem Überschuss zu verwenden, um einer potentiellen Neutralisation der Base in Gegenwart der Phosphatfunktionalität entgegenzuwirken. Die nicht-phosphorylierten Peptide werden in einem Mol-Verhältnis 5 äq. HBTU zu 5 äq. HOBt zu 10 äq. DIPEA pro 5 äq. Aminosäure synthetisiert. Während alle Aminosäuren für 1 h gekuppelt werden, wird für das pThr die doppelte Reaktionszeit veranschlagt.

Hinsichtlich einer Radiomarkierung mit Fluor-18 am *N*-Terminus der Peptide werden zudem 4-fluorbenzoylierte Referenzpeptide hergestellt. Auch diese können automatisiert am Peptidsynthesizer synthetisiert werden, wobei die 4-Fluorbenzoesäure als kompatibler Baustein in die Peptidsynthese integriert und so *N*-terminal mit den Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA kondensiert wird.

Das nach der Peptidsynthese erhaltene Peptidylharz wird einer Reaktion unter sauren Bedingungen unterzogen, um eine Abspaltung des gewünschten Peptides vom Harz, sowie die Entschützung der Aminosäureseitenketten, zu erreichen. Hierbei findet für Phosphopeptide als auch Met-haltige Peptide eine modifizierte Form des Reagenz K Anwendung, bestehend aus TFA/Wasser/Thioanisol/EDT im Volumen-Verhältnis 87:5:5:3. Nach 4-stündiger Inkubation bei RT wird mit Diethylether eine Peptidfällung erzwungen. Die Rohpeptide werden mittels HPLC gereinigt und nach Lyophilisation als weißer Feststoff erhalten. Tabelle 2 gibt einen Überblick zu den synthetisierten Phosphopeptiden, nicht phosphorylierten Analoga, sowie Referenzpeptiden.

Tabelle 2: Synthetisierte Peptidsequenzen, deren Ausbeuten und Charakterisierung

Peptid	Peptidsequenz	Masse/Ausbeute	M _{berechnet} [g/mol]	M _{exp} m/z
1	PMQSpTPL	7 mg/ 42%	852,4	853,8 [M+H] ⁺
2	MQSpTPL	19 mg/ 78%	755,3	756,6 [M+H] ⁺
Dephospho-1	PMQSTPL	12 mg/ 49%	772,4	773,4 [M+H] ⁺
Dephospho-2	MQSTPL	19 mg/ 86%	675,3	676,4 [M+H] ⁺
3	4FBz-PMQSpTPL	8 mg/ 41%	974,4	975,6 [M+H] ⁺
4	4FBz-MQSpTPL	15 mg/ 51%	877,3	876,5 [M-H] ⁺
Dephospho-4	4FBz-MQSTPL	12 mg/ 46%	797,3	798,6 [M+H] ⁺

Ausgehend von 30-50 mg Fmoc-L-Leu-beladenem Harz können nach dieser Vorschrift Peptide im Multimilligramm-Maßstab mit Ausbeuten von 42-86% hergestellt werden, wobei die Hexapeptide **2** und **Dephospho-2** in sehr guten Ausbeuten von 78% und 86% synthetisiert werden können. Die Heptapeptide mit dem *N*-terminalen Pro-Rest

wie auch alle 4-fluorbenzoylierten Referenzpeptide sind in weniger guten Ausbeuten synthetisierbar. Geeignete Lagerung der Peptide bei -20°C gewährleistet die Stabilität der Peptide über einen Zeitraum von einigen Monaten.

3.1.2 Radiomarkierung mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Fluor-18

Für die Radiomarkierung mit Fluor-18 werden das Heptaphosphopeptid **1**, das Hexaphosphopeptid **2**, sowie sein nicht-phosphoryliertes Analogon **Dephospho-2** eingesetzt. Um den Anforderungen einer Peptidradiomarkierung gerecht zu werden, wird der Weg über eine indirekte ^{18}F -Markierung mit dem Bolton-Hunter-Derivat *N*-Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat (^{18}F SFB) gewählt. ^{18}F SFB stellt ein bifunktionelles Markierungsagens dar, das in einer Aminolyse sensitiv mit primären Aminogruppen reagiert. Die Herstellung des ^{18}F SFB erfolgt in einem ferngesteuerten Synthesemodul nach einer im FZD erarbeiteten 3-Stufensynthese inklusive Festphasenextraktion, die radiochemisch reines ^{18}F SFB mit spezifischen Aktivitäten um 20-40 GBq/ μmol liefert [132].

Um die Markierbarkeit mit ^{18}F SFB am *N*-Terminus des optimalen Plk1-PBD-Phosphopeptidliganden **1** hinsichtlich der Gegenwart einer sekundären Aminogruppe des Pro-Restes zu bewerten, wird unter Standardbedingungen mit Kolthoff KH_2PO_4 -Boratpuffer (pH 8,4) markiert. Der Einsatz von 0,5 mg **1** in 300 μl Kolthoff-Puffer unter Zugabe von 100 μl ^{18}F SFB in MeCN ergibt bei RT und 30 min Reaktionszeit wie auch bei erhöhter Temperatur von 40°C und 20 min Reaktionszeit das gewünschte ^{18}F -fluorbenzoylierte Heptaphosphopeptid ^{18}F **3**. Laut analytischer HPLC beträgt der Anteil des Peptides ^{18}F **3** im Reaktionsgemisch 16%.

Die Radiomarkierung von Phosphopeptiden mit ^{18}F SFB wurde am Beispiel des Hexaphosphopeptides MQSpTPL **2** in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Reaktionszeit optimiert. Eine geringe Peptidmenge von 0,5 mg **2** wird für diesen Zweck in je 300 μl Puffer verschiedener pH-Werte und Zusammensetzung gelöst. Es finden Kolthoff-Boratpuffer (pH 7,6 und 8,4) und 0,05 M Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9,0) Anwendung. Nach Reaktion bei 40°C mit je 100 μl ^{18}F SFB werden Aliquote der Reaktionsgemische mittels HPLC auf die Umsetzung zum *N*-terminal ^{18}F -fluorbenzoylierten Hexaphosphopeptid ^{18}F **4** überprüft. Tabelle 3 zeigt den Anteil des Peptides ^{18}F **4** im Reaktionsgemisch in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Zeit.

Tabelle 3: Zeit- und pH-abhängige [^{18}F]SFB-Radiomarkierung von Phosphopeptid **2** zu [^{18}F]**4**

Anteil von [^{18}F] 4 im Reaktionsgemisch in %					
Zeit	Kolthoff-Puffer (pH 7,6)	Zeit	Kolthoff-Puffer (pH 8,4)	Zeit	Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9,0)
5 min	0,3	5 min	2	5 min	2
35 min	2	15 min	9	32 min	15
60 min	4	30 min	7	60 min	18

Es zeigt sich eine deutliche pH-Abhängigkeit dieser Reaktion. Bei Verwendung von Kolthoff-Puffer (pH 7,6 und 8,4) bleibt der Anteil an [^{18}F]**4** im Reaktionsgemisch unter 10%. Es werden nur geringe Unterschiede in der Markierungseffizienz ersichtlich, wenn man beide pH-Werte vergleichend betrachtet, wobei auch längere Reaktionszeiten kaum Einfluss auf die Bildung von [^{18}F]**4** nehmen. Die Reaktion in reinem Phosphatpuffer 0,05 M Na_2HPO_4 (pH 9) trägt zur Verbesserung der Markierung bei. Die Steigerung des Anteils an [^{18}F]**4** im Reaktionsgemisch nach 60 min fällt eher gering aus, so dass eine 30 minütige Reaktionszeit ausreichend ist, was sich ebenso positiv hinsichtlich der Halbwertszeit von Fluor-18 ($t_{1/2} = 109.8$ min) auswirkt.

Diese Reaktionsbedingungen (300 μl 0,05 M Na_2HPO_4 -Puffer pH 9, $T = 40^\circ\text{C}$, $t_R = 30$ min) wurden ferner auf ein hohes Aktivitätsniveau übertragen. Reduktion des Volumens an MeCN auf 50 μl und die Anwendung größerer ^{18}F -Aktivitätsmengen (1000-2000 MBq) führen zu einer weiteren Steigerung des Anteils von [^{18}F]**4** auf 32-52% im Reaktionsgemisch. Ein typisches HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches zeigt Abb. 12. Es wird deutlich, dass [^{18}F]SFB nicht vollständig umgesetzt wird. Zudem entsteht 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure ([^{18}F]FB) zu geringem Anteil, was bei pH 9 als Benzoat vorliegt.

Zur Reinigung des ^{18}F -markierten Phosphopeptides [^{18}F]**4** aus dem Reaktionsgemisch wird im Weiteren eine semipräparative HPLC-Trennung unter Verwendung eines MeCN/Wasser/0,1% TFA-Gradienten angeschlossen und die das gewünschte [^{18}F]**4** enthaltende repräsentative Fraktion abgetrennt. Durch Entfernen des Laufmittels am Rotationsverdampfer lässt sich das radiomarkierte Phosphopeptid [^{18}F]**4** in 25-35% radiochemischer Ausbeute isolieren.

Zusätzlich ergab die Untersuchung der Stabilität von [^{18}F]**4** im verwendeten Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9) bei 37°C über 120 min keine Abspaltung der Phosphatgruppe im basischen Medium oder sonstige Metaboliten.

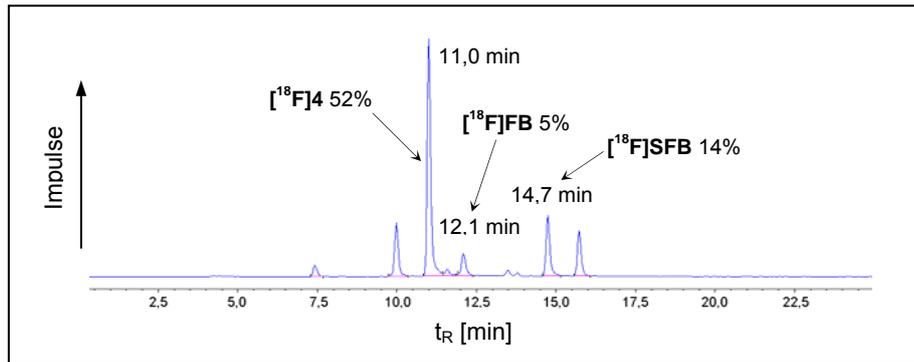
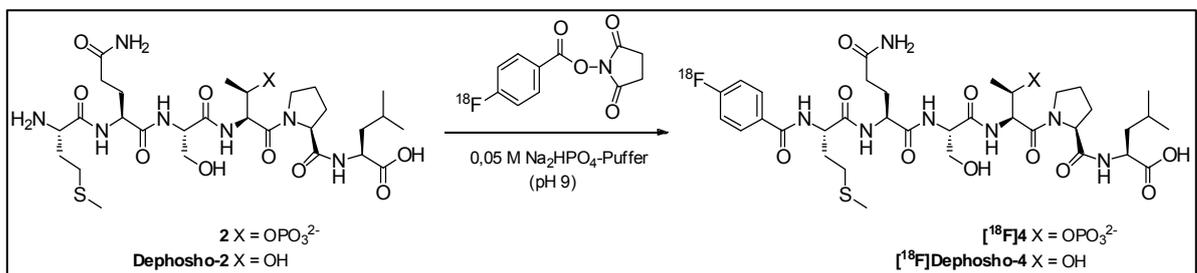


Abb. 12: Typisches analytisches HPLC-Radiochromatogramm des Reaktionsgemisches der $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ -Markierung von Phosphopeptid **2** zu $[^{18}\text{F}]\text{4}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FB}$ - 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorbenzoesäure}$, bei pH 9 vorliegend als 4- $[^{18}\text{F}]\text{Fluorbenzoat}$)



Optimale Bedingungen für die ^{18}F -Radiomarkierung des Phosphopeptides **2** und seiner nicht-phosphorylierten Form **Dephosho-2**

	Phosphopeptid 2	Peptid Dephosho-2
Peptidmenge	0,5 mg	0,7 mg
Markierungsmedium	300 μl 0,05 M Na_2HPO_4 -Puffer (pH = 9)	
Markierungsreagenz	$[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ in MeCN	
Volumen Markierungsreagenz	50 μl	70 μl
Reaktionsbedingungen	40°C, 30 min	
Gesamtsynthesezeit ab Verfügbarkeit von $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$	95-109 min	75-83 min
Radiochemische Ausbeute (zerfallskorrigiert)	25-35%	18-33%
Radiochemische Reinheit	>97%	>97%

Abb. 13: Optimierte Bedingungen und Ergebnisse für die ^{18}F -Radiomarkierung von Phosphopeptid **2** und seiner nicht-phosphorylierten Form **Dephosho-2** mit $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$

Im Vergleich zum Hexaphosphopeptid **2** wurde auch sein nicht-phosphoryliertes Analogon **Dephospho-2** einer [¹⁸F]SFB-Markierung unterzogen. Bei Verwendung von Kolthoff-Puffer (pH 7,6 und 8,4) als Markierungsmedium wurde das ¹⁸F-markierte Peptid [¹⁸F]**Dephospho-4** zu 8-12% bei 40°C Reaktionstemperatur und 30 min Reaktionszeit im Reaktionsgemisch gefunden. Bei Verwendung gleicher Bedingungen in 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) wird jedoch wiederum ein höherer Anteil [¹⁸F]**Dephospho-4** von 19% gefunden. Ähnliche Ergebnisse von 18-33% lassen sich für die ¹⁸F-Fluorbenzoylierung von **Dephospho-2** zu [¹⁸F]**Dephospho-4** unter Verwendung einer höheren Peptidmenge auf höherem Aktivitätsniveau erzielen.

Abb. 13 gibt einen zusammenfassenden Überblick zu den optimierten Reaktionsbedingungen sowie den Markierungsergebnissen für die [¹⁸F]SFB-Radiomarkierung des Phosphopeptides **2** und seiner nicht-phosphorylierten Form **Dephospho-2** wider.

3.1.3 Radiopharmakologische Untersuchungen

Die erfolgreiche Synthese des ¹⁸F-fluorbenzoylierten Hexaphosphopeptides [¹⁸F]**4** ermöglicht die Bereitstellung des Radiotracers zur radiopharmakologischen Charakterisierung. Vergleichend dazu wird das nicht-phosphorylierte Derivat [¹⁸F]**Dephospho-4** in die Untersuchungen mit einbezogen.

In vitro Zellaufnahme

Die ¹⁸F-markierten Peptide [¹⁸F]**4** und [¹⁸F]**Dephospho-4** werden hinsichtlich einer Zellaufnahme an einer humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie (HT-29) und an einem humanen Plattenepithelkarzinom (FaDu) getestet. Abb. 14 zeigt die Internalisierung des radiomarkierten Phosphopeptides [¹⁸F]**4** und seines nicht-phosphorylierten Derivates [¹⁸F]**Dephospho-4** bei 4°C und 37°C.

Das Phosphopeptid [¹⁸F]**4** wird mit <0,5% ID/mg Protein bei 37°C und <0,1% ID/mg Protein bei 4°C in HT-29 Zellen internalisiert. In FaDu Zellen wird bei beiden Temperaturen eine Zellaufnahme kleiner 1% ID/mg Protein erreicht. Die Werte für die Zellaufnahme des nicht-phosphorylierten Peptides [¹⁸F]**Dephospho-4** befinden sich ebenso bei unter 1% ID/mg Protein in beiden getesteten humanen Tumorzelllinien. Auffällig hier ist eine bessere Internalisierung bei 4°C vergleichend zu 37°C.

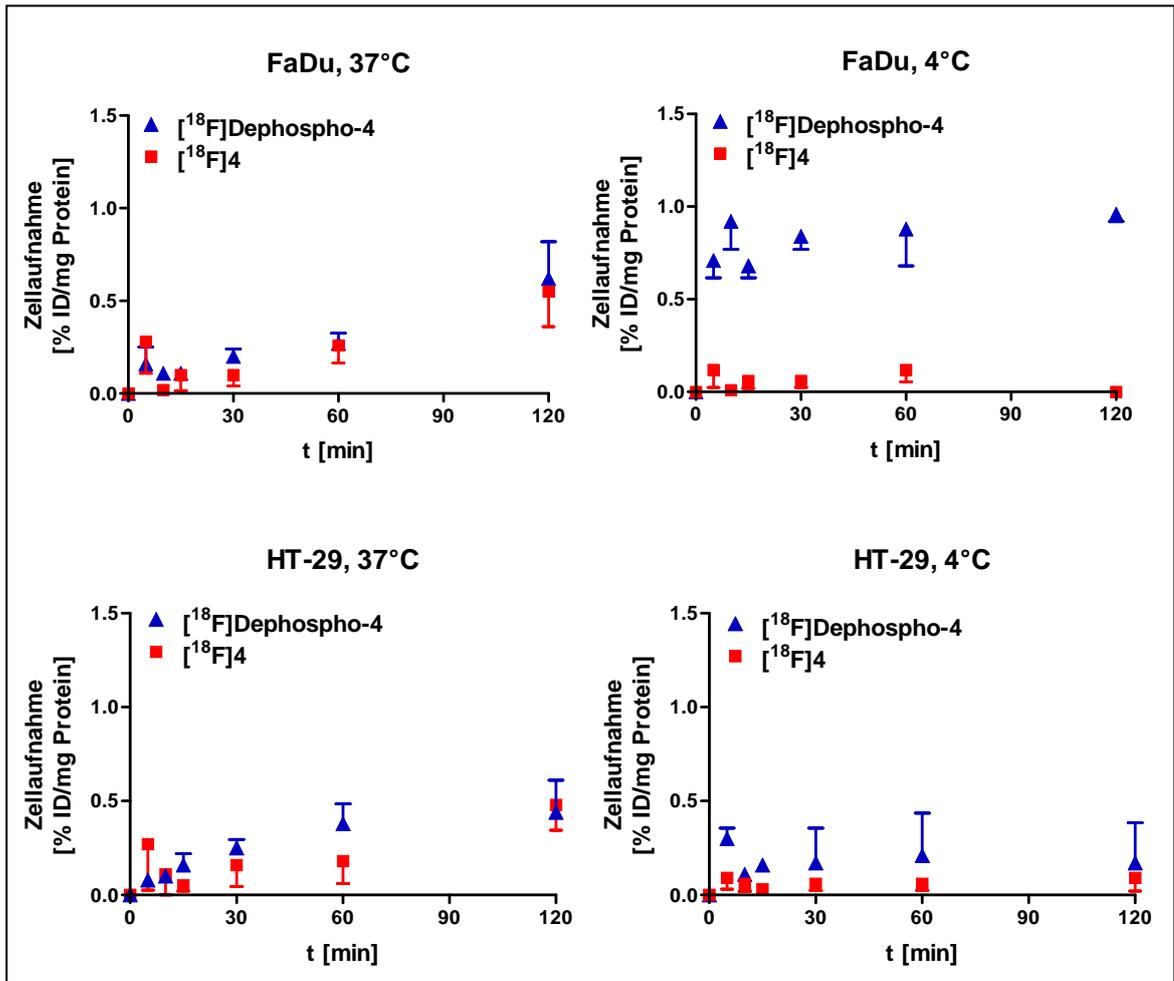


Abb. 14: *In vitro* Zellinternalisierung von $[^{18}\text{F}]\text{FBz-MQSpTPL}$ $[^{18}\text{F}]\text{4}$ (rot) und $[^{18}\text{F}]\text{FBz-MQSTPL}$ $[^{18}\text{F}]\text{Dephospho-4}$ (blau) in den humanen Tumorzellen FaDu und HT-29 bei 4°C und 37°C, $\text{MW} \pm \text{SD}$ ($n = 4$)

In vitro und *in vivo* Metabolismus

Die metabolische Stabilität wurde einleitend *in vitro* im Vollblut und Plasma von Wistar-Unilever-Ratten untersucht. Inkubation des Phosphopeptides $[^{18}\text{F}]\text{4}$, sowie des nicht-phosphorylierten Peptides $[^{18}\text{F}]\text{Dephospho-4}$ für ausgewählte Zeitintervalle von 5, 30 und 60 min bei 37°C in beiden Medien und anschließende Analyse der Aliquote mittels HPLC geben einen repräsentativen Überblick zur *in vitro*-Stabilität wieder, zusammengefasst in Abb. 15.

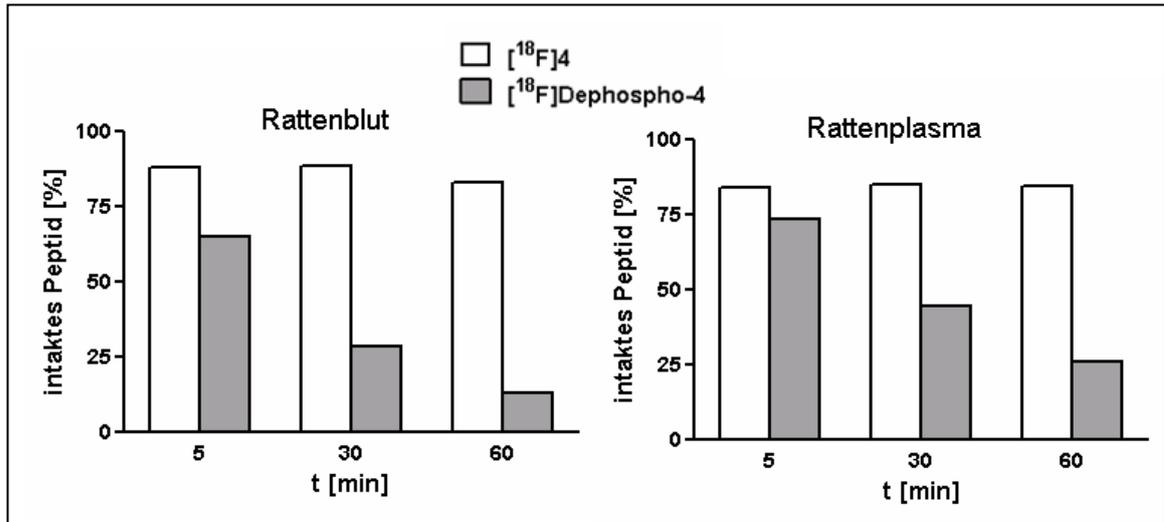


Abb. 15: Metabolische Stabilität des Phosphopeptides $[^{18}\text{F}]4$ (weiß) und des nicht-phosphorylierten Derivates $[^{18}\text{F}]\text{Dephospho-4}$ (grau) *in vitro* in Wistar-Unilever-Rattenblut und -plasma ($n = 2$)

Es zeigt sich deutlich, dass Phosphopeptid $[^{18}\text{F}]4$ und seine nicht-phosphorylierte Form $[^{18}\text{F}]\text{Dephospho-4}$ unterschiedliche Stabilitäten aufweisen. Das Phosphopeptid $[^{18}\text{F}]4$ weist über den gesamten untersuchten Zeitraum *in vitro* Stabilitäten größer 80% auf - im Rattenvollblut wie auch im Plasma. Seine nicht-phosphorylierte Form $[^{18}\text{F}]\text{Dephospho-4}$ hingegen ist signifikant instabiler. Anhand der Werte lässt sich auf eine ausgeprägtere Resistenz des nicht-phosphorylierten Peptides $[^{18}\text{F}]\text{Dephospho-4}$ gegenüber Degradation im Rattenplasma (5 min 72% intaktes Peptid, 30 min 43% und 60 min 23%) als im Vollblut (5 min 65% intaktes Peptid, 30 min 28% und 60 min 13%) schließen.

Zur Untersuchung der metabolischen Stabilität beider Peptide $[^{18}\text{F}]4$ und $[^{18}\text{F}]\text{Dephospho-4}$ *in vivo* werden Blutproben von Wistar-Unilever-Ratten HPLC-analytisch betrachtet und ausgewertet. Abb. 16 gibt die erzielten Ergebnisse wieder. Es lässt sich wiederum eine Tendenz hinsichtlich einer Abnahme des jeweiligen intakten Peptides über den Zeitrahmen von 60 min erkennen. Zudem zeigt sich eine noch ausgeprägtere Variation der metabolischen Stabilität beider Peptide zu Gunsten des Phosphopeptides $[^{18}\text{F}]4$.

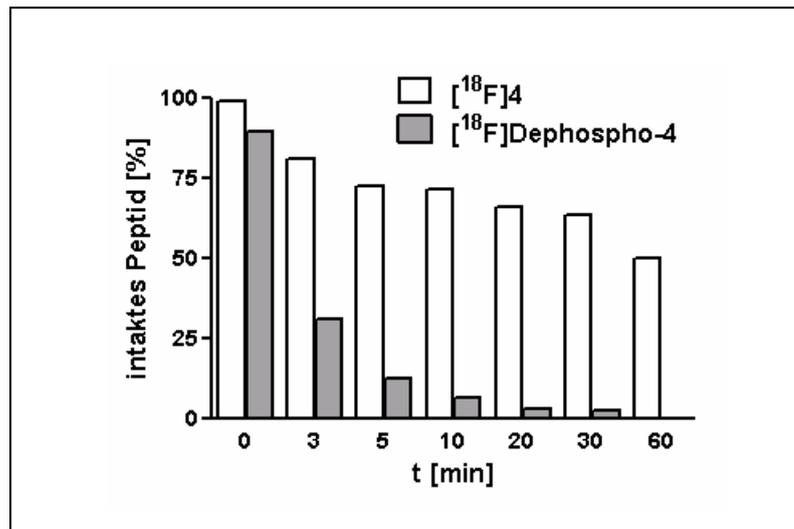


Abb. 16: Metabolische Stabilität von [¹⁸F]FBz-MQSpTPL [¹⁸F]4 (weiß) und [¹⁸F]FBz-MQSTPL [¹⁸F]Dephospho-4 (grau) *in vivo* (n = 2)

Nach 1 min sind 97%, nach 3 min 81%, nach 10 min 70%, nach 30 min 64% und nach 60 min noch 52% intakt. Sein nicht-phosphoryliertes Analogon zeigt eine deutlich geringere Resistenz gegenüber seinem Abbau *in vivo*. So sinkt der Anteil des intakten Peptides [¹⁸F]Dephospho-4 von 97% nach 1 min schon auf 33% nach 3 min, 11% nach 5 min. Schon 10 min nach Injektion des Radiotracers lassen sich weniger als 10% intaktes Peptid nachweisen.

Dynamische Kleintier-PET-Studie

Um einen Überblick zur radiopharmakologischen Verteilung beider Peptide [¹⁸F]4 und [¹⁸F]Dephospho-4 *in vivo* zu bekommen, wurden Kleintier-PET-Aufnahmen von normalen Wistar-Unilever-Ratten angefertigt. Dazu wurden mit der Kleintier-PET-Kamera Siemens microPET® P4 dynamische Aufnahmen über einen Zeitraum von 60 min nach Injektion des jeweiligen Peptides aufgezeichnet. Die in Abb. 17 dargestellten Kleintier-PET-Aufnahmen 5 min und 30 min p.i. zeigen repräsentativ die *in vivo* Bioverteilung von [¹⁸F]FBz-MQSpTPL [¹⁸F]4 und [¹⁸F]FBz-MQSTPL [¹⁸F]Dephospho-4.

Nach intravenöser Applikation der radioaktiven Peptide erfolgt der Transport mit dem Blutstrom in das Herz. Die Elimination der Radiotracer erfolgt maßgeblich über die Nieren und geschieht sehr schnell, denn schon 5 min p.i. befindet sich bereits viel Aktivität im Nierenbecken und hat damit den Nierenkortex passiert. Es ist keine spezifische Gewebeakkumulation feststellbar.

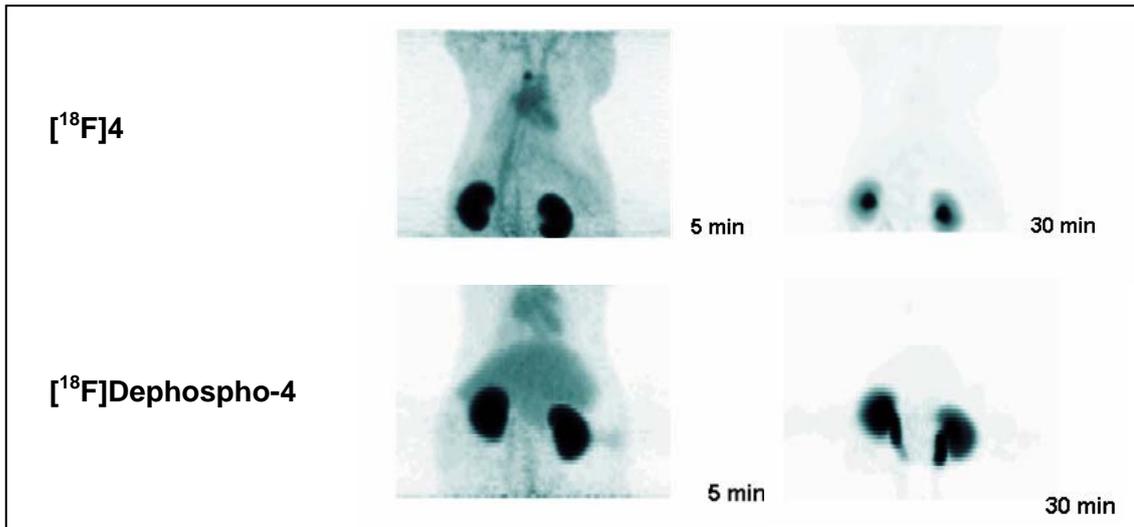


Abb. 17: Typische koronale Kleintier-PET-Aufnahmen der abdominalen Region einer Wistar-Unilever-Ratte 5 und 30 min nach Injektion von $[^{18}\text{F}]$ FBz-MQSpTPL $[^{18}\text{F}]4$ (oben) und $[^{18}\text{F}]$ FBz-MQSTPL $[^{18}\text{F}]$ Dephospho-4 (unten)

Damit zeigen beide Radiotracer ein für radiomarkierte Peptide typisches und charakteristisches *in vivo* Bioverteilungsprofil.

Die Generierung von Zeit-Aktivitätskurven lassen Aussagen zur Kinetik der radiomarkierten Peptide $[^{18}\text{F}]4$ und $[^{18}\text{F}]$ Dephospho-4 zu. In Abb. 18 sind die Zeit-Aktivitätskurven zur Beurteilung der ^{18}F -Aktivitätskonzentration im Blut und in den Nieren dargestellt.

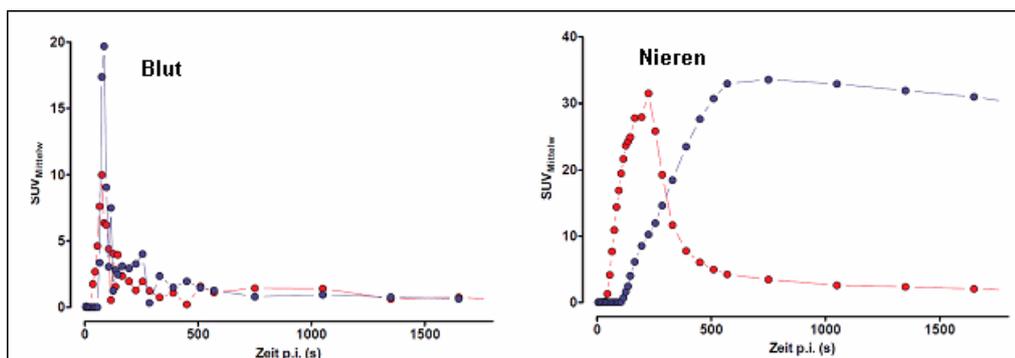


Abb. 18: Zeit-Aktivitätskurven, die Kinetik der Radiotracer $[^{18}\text{F}]$ FBz-MQSpTPL $[^{18}\text{F}]4$ (rot) und $[^{18}\text{F}]$ FBz-MQSTPL $[^{18}\text{F}]$ Dephospho-4 (blau) im Blutpool (links) und Nieren (rechts) wiedergeben. Generation aus dynamischer Kleintier-PET-Studie 60 min p.i. durch Festlegung und Kalkulation von ROIs (region of interest) über das Herz (kardialer Blutpool) und Nieren

Es zeigen sich klare Unterschiede in der Eliminierung des Phosphopeptides und des nicht-phosphorylierten Peptides aus dem Blut und den Nieren. Das nicht-phosphorylierte Peptid [^{18}F]Dephospho-4 wird langsamer aus dem Blut entfernt als das Phosphopeptid [^{18}F]4. Drastischer stellt sich der Unterschied bei Betrachtung der Nieren da. Während das Phosphopeptid [^{18}F]4 nach schnellem Anfluten schnell über den betrachteten Zeitraum aus den Nieren eliminiert wird, findet eine Akkumulation des nicht-phosphorylierten Peptides [^{18}F]Dephospho-4 und seinen entstandenen Metaboliten statt.

Bioverteilung

Ferner wurden Biodistributionsstudien der beiden Peptide [^{18}F]4 und [^{18}F]Dephospho-4 an männlichen Wistar-Unilever-Ratten durchgeführt, um eine Verteilung der ^{18}F -Radioaktivitätsmengen in den einzelnen Organen und Geweben festzustellen und quantitativ zu erfassen.

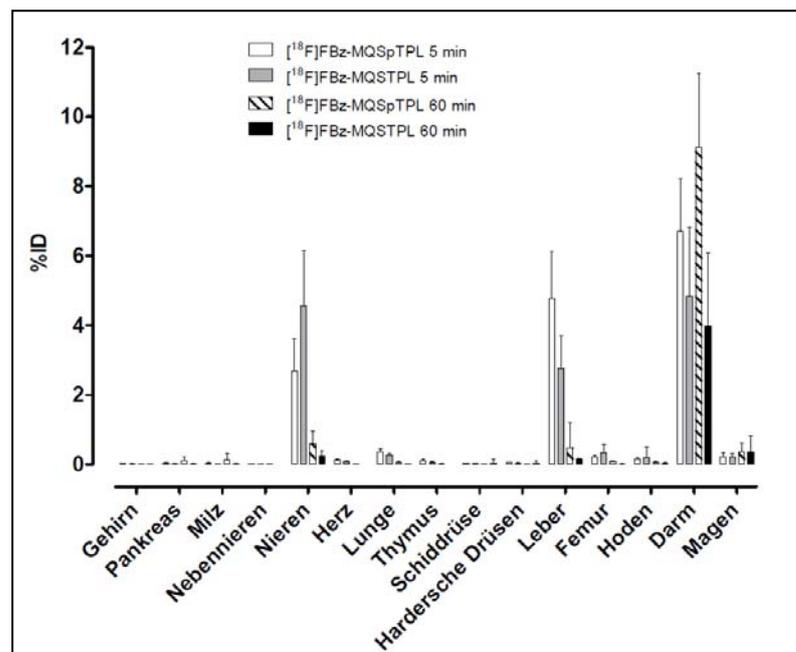


Abb. 19: Bioverteilung von [^{18}F]FBz-MQSpTPL [^{18}F]4 und [^{18}F]FBz-MQSTPL [^{18}F]Dephospho-4 und ihren Metaboliten in Wistar-Unilever-Raten angegeben in %ID, MW \pm SD (n = 4 pro Zeitwert)

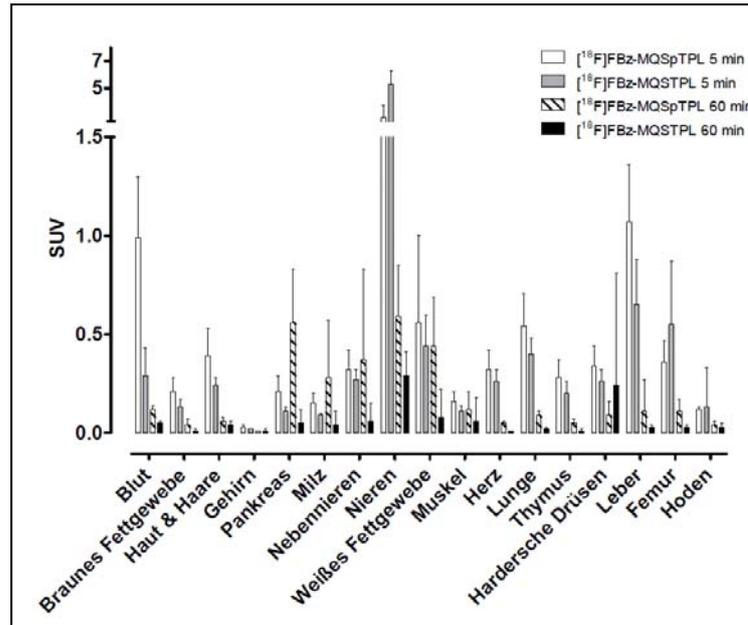


Abb. 20: Bioverteilung von [¹⁸F]FBz-MQSpTPL [¹⁸F]4 und [¹⁸F]FBz-MQSTPL [¹⁸F]Dephospho-4 in Wistar-Unilever-Ratten angegeben als SUV (standard uptake value), MW ± SD (n = 4 pro Zeitwert)

Die Aktivitätsdistribution wird 5 min und 60 min p.i. gemessen und als Prozent der injizierten Dosis (%ID) angegeben, sowie in standardisierte Radioaktivitätskonzentrationen (SUVs, standard uptake values, dimensionslose Größe) umgerechnet, aufgezeigt in Abb. 19 und Abb. 20. Der SUV repräsentiert die Organ- oder Gewebe-Aktivitätskonzentration im Verhältnis zur injizierten Aktivität normiert auf die Körpermasse [133]. Neben einer Aktivitätsanreicherung in den Nieren, was auf eine renale Eliminierung der ¹⁸F-markierten Peptide [¹⁸F]4 und [¹⁸F]Dephospho-4 hinweist, ist auch eine Aktivitätsakkumulation beider Peptide 5 min p.i. innerhalb der Leber und besonders im Intestinaltrakt ersichtlich. Die Anreicherung des Phosphopeptides [¹⁸F]4 in der Leber ist im Vergleich zu seinem nicht-phosphorylierten Analogon [¹⁸F]Dephospho-4 stärker ausgeprägt. Dieses Verteilungsmuster lässt ebenso eine hepatobiliäre Eliminierung der beiden Peptide zu. Diese Erkenntnis im Rahmen der Bioverteilung steht im Kontrast zu den Ergebnissen der Kleintier-PET-Studie.

Eine weitere Betrachtung zum Zeitpunkt 60 min p.i. wäre nicht sinnvoll, da die Studien zum *in vivo* Metabolismus besonders im Falle des nicht-phosphorylierten Peptides [¹⁸F]Dephospho-4 fast ausschließlich Metaboliten zeigen.

Bei Betrachtung der standardisierten Radioaktivitätskonzentrationen (SUVs), die auf die Körpermasse normiert sind, zeigt sich in allen Organen und Geweben eine tendenzielle Abnahme der standardisierten ¹⁸F-Konzentrationen nach 60 min.

Betrachtet man das Phosphopeptid [¹⁸F]4 lässt sich im Pankreas hingegen ein repräsentativer Aktivitätsanstieg nach 60 min verzeichnen. Der zugehörige SUV-Wert beträgt jedoch <1, womit diese Tatsache weniger relevant ist. Die Aktivitätsanreicherung in der Leber beträgt gerade ≤1. Es fällt besonders die starke Akkumulation in den Nieren 5 min p.i. ins Auge, die auf die renale Exkretion beider Peptide als Hauptweg der Eliminierung schließen lässt. Ferner können keine spezifischen Gewebeanreicherungen detektiert werden. Beide ¹⁸F-markierten Peptide werden nicht im Hirn angereichert und sind erwartungsgemäß somit nicht in der Lage, die Blut-Hirnschranke zu passieren. Damit sind die Ergebnisse der dynamischen Kleintier-PET-Untersuchungen bestätigt.

3.2 Phosphopeptid-Neurotensin(8-13)-Konjugate

Das folgende Kapitel befasst sich mit dem Erreichen einer verbesserten intrazellulären Internalisierung von Phosphopeptiden, um einen weiteren Schritt hin zu deren intrazellulärem Targeting zu ermöglichen. Einen Ansatz bildet die rezeptor-vermittelte Internalisierung unter Verwendung von Peptidrezeptorsystemen, deren Aufnahmemechanismus bekannt ist. Als Modell wurde dazu das Neurotensin (NT) mit seinem G-Protein-gekoppelten Neurotensin-Rezeptor (NTR), dessen Internalisierungsmechanismus durch rezeptorvermittelte Endozytose charakterisiert ist [134], gewählt. Das aus 13 Aminosäuren bestehende Neurotensin gehört zu den Neuropeptiden. Es wird im zentralen Nervensystem und in peripheren Geweben wie dem Gastrointestinaltrakt exprimiert. Für den NT-Rezeptor wurden drei verschiedene Subtypen definiert, bezeichnet mit NTR1, NTR2 und NTR3 [135, 136]. Vielerlei Studien beschreiben den NTR1 als ein vielversprechendes Target für die Krebsdiagnose und -therapie [16, 137] mit radiomarkierten Neurotensinderivaten, wie ¹⁸F-markiertes, stabilisiertes multimeres NT(8-13) [138, 139], ^{99m}Tc-markierte, stabilisierte NT-Analoga [140], vierfach verzweigtes NT [141] oder ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-markiertes, stabiles NT-XIX [142].

Die Strategie dieser Arbeit verfolgt hier die Synthese eines Konjugates aus Phosphopeptid mit dem NT(8-13), dem kleinsten an den NTR1 bindenden Fragment. Unter Berücksichtigung eines freien Carboxyterminus des NT(8-13), der für die Bindung an den NTR1 entscheidend ist und so zugänglich bleiben muss, liegt das Konzept in der Schaffung einer kovalenten Bindung zwischen den *N*-Termini des Phosphopeptides und des NT(8-13). Dazu wird das Synthesekonzept der auch in die Radiopharmazie eingeführten „Click-Chemie“ zugrunde gelegt.

Die Click-Chemie wird als eine Reihe zuverlässiger Reaktionen definiert, die Molekülbausteine für die selektive Bildung einer kovalenten Bindung über Heteroatome involviert. Einen prominenten Vertreter stellt die Huisgen-1,3-dipolare [3+2]Cycloaddition dar, bei der ein terminales Alkin mit einer Azid-funktionalisierten Komponente in einer Kupfer(I)-Katalyse unter Bildung eines 1,2,3-Triazols reagiert. Die biokompatible Cycloaddition der bioorthogonalen Funktionen Alkin und Azid lässt sich aufgrund ihrer milden Natur, sowie hohen Reaktivität und Selektivität im wässrigen Medium sehr gut auf die Kupplung zweier Peptide anwenden [143, 144]. Einen ausführlichen Überblick zu Kupfer-katalysierten Alkin-Azid-Cycloadditionen verfassten die Entdecker der Kupfer(I)-Katalyse (2001) Medal und Tornøe 2008. Zudem zeigten im gleichen Jahr Moorhouse und Moses die elementare Bedeutung der Click-Chemie in einer Vielzahl von Anwendungen auf dem Gebiet der medizinischen Chemie [145]. Gerade in der Radiopharmazie ist die Click-Chemie in den letzten Jahren zu einem beliebten und alternativen Ansatz besonders für die ^{18}F -Markierung von Peptiden geworden. Marik und Sutcliffe leisteten dazu Pionierarbeit, indem diese ω -Fluoralkine mit einem *N*-(3-Azidopropionyl)-modifizierten Peptid umsetzten [146]. Zudem beschrieben Ramenda *et al.* erfolgreich ein ^{18}F -benzoyliertes Neurotensin-Derivat [147, 148], sowie erstmals die Click-Chemie-vermittelte ^{18}F -Radiomarkierung von Proteinen am Beispiel des humanen Serumalbumins (HSA) [149]. Glaser *et al.* (2009) publizierten zudem eine Click-Chemie-basierte Methode zur Darstellung ^{18}F -markierter RGD-Peptide als eine attraktive Alternative zur konventionellen Aminoxyaldehyd-Kondensation [150]. Es wurde weiterhin eine Modifizierungsmöglichkeit von Peptiden mittels Click-Chemie in Form einer ^{18}F -Glycosylierung von RGD- und NT-Derivaten vorgestellt, die neue PET-Radiopeptide mit verbesserter *in vivo* Kinetik schafft [151].

3.2.1 Synthese Azid- und Alkin-funktionalisierter Peptid-Derivate

Am Beginn der Synthese eines Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugates mittels der Click-Chemie steht die Einführung einer Azid-Funktion in eine Peptidsequenz und einer Alkin-Funktion in die jeweilige andere. Dazu werden hochreaktive Succinimidyl-Aktivester eingesetzt, die jeweils *N*-terminal in einer Amidierung mit den Peptiden bei 40°C zur Reaktion gebracht werden. Als Reaktionsmedium dient ein Gemisch aus Kolthoff KH_2PO_4 -Boratpuffer (pH 8,4) und Acetonitril im Verhältnis 7:3, in dem das zu azidierende bzw. alkinierende Peptid mit einem Überschuss von 2,1 äq. an Succinimidyl-Aktivester für 6 h reagiert.

Zum Zwecke der Azidierung wird der Aktivester Succinimidyl-5-azidovalerat nach Seo *et al.* verwendet [152]. Die *N*-terminale Azidierung des Phosphopeptides MQSpTPL 2 zeigt Abb. 21.

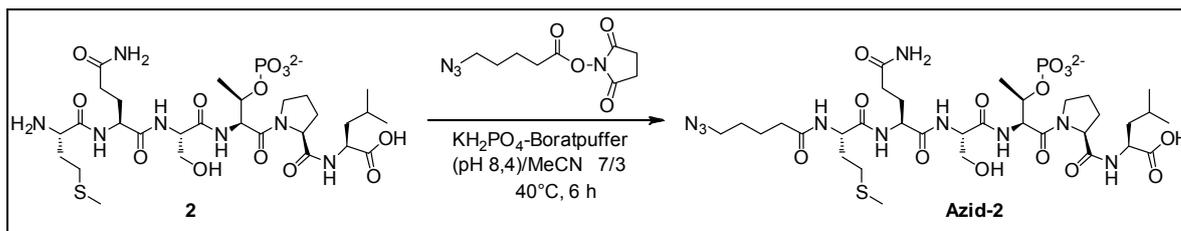


Abb. 21: *N*-terminale Azidierung des Phosphopeptides MQSpTPL **2**

Neben dem 5-Azidopentanoyl-MQSpTPL **Azid-2** wurden weitere azidierte Peptide hergestellt, die in Tabelle 4 zusammengefasst sind. Dazu wurden analoge Reaktionsbedingungen wie zur Azidierung des Phosphopeptides **2** eingesetzt. Das nicht-phosphorylierte Heptapeptid **Azid-Dephospho-1** kann mit 63% in ähnlichen Ausbeuten wie das Phosphopeptid **2**, das Hexapeptid **Dephospho-2** sogar in sehr guten Ausbeuten von 82% azidiert werden. Die *N*-terminale Funktionalisierung des NT(8-13) gelingt zu 42%. Die Ausbeutebestimmung erfolgte durch Detektion der UV-Absorption.

Tabelle 4: *Überblick zu synthetisierten, Azid-funktionalisierten Peptiden*

Peptid	Peptidsequenz	Ausbeute	M _{berechnet} [g/mol]	M _{exp} m/z
Azid-2	5-Azidopentanoyl-MQSpTPL	66%	880,4	903,3 [M+Na] ⁺
Azid-Dephospho-2	5-Azidopentanoyl-MQSTPL	82%	800,4	823,4 [M+Na] ⁺
Azid-Dephospho-1	5-Azidopentanoyl-PMQSTPL	63%	897,4	898,6 [M+H] ⁺
Azid-7	5-Azidopentanoyl-NT(8-13)	42%	941,6	942,7 [M+H] ⁺

Als Alkin-Komponente wird das 5-Hexinoyl-NT(8-13) **Alkin-7** verwendet. Dazu wird NT(8-13) mit Succinimidyl-5-hexinat umgesetzt, wie in Abb. 22 dargestellt. **Alkin-7** lässt sich in Ausbeuten von 69% synthetisieren.

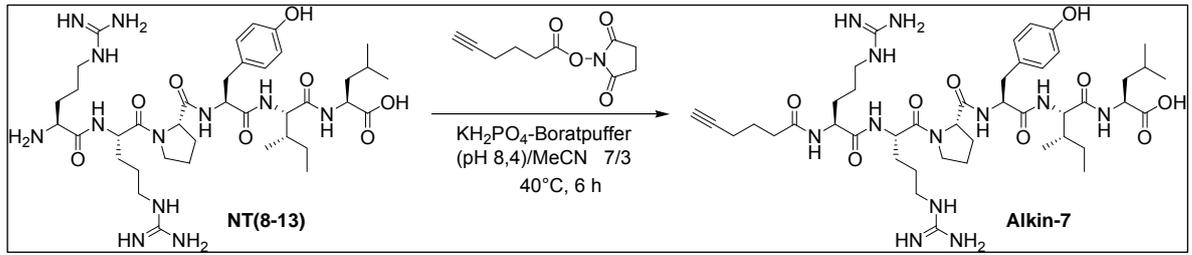


Abb. 22: N-terminale Alkylierung von NT(8-13)

3.2.2 Kupplung der funktionalisierten Peptide

Im nächsten Schritt wurde das Alkin-funktionalisierte NT(8-13) **Alkin-7** mit dem ‚Click‘-kompatiblen Baustein 5-Azidopentanoyl-MQSpTPL **Azid-2** umgesetzt. Dabei werden Reaktionsbedingungen in Anlehnung an Ramenda *et al.* angewandt [147]. Die funktionalisierten Peptide werden in äquimolaren Mengen bei Raumtemperatur in 1 ml Kolthoff-Puffer (pH 8,4) als Reaktionsmedium für 48 h umgesetzt. Unter Zusatz von katalytischen Mengen Kupfer(II)-sulfat und dem Reduktionsmittel Natriumascorbat, das die aktive Katalysatorspezies Kupfer(I) *in situ* generiert, erfolgt die Reaktion zum stabilen 1,2,3-Triazol-Derivat **8**. Abb. 23 zeigt die Click-Reaktion zum Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugat **8**.

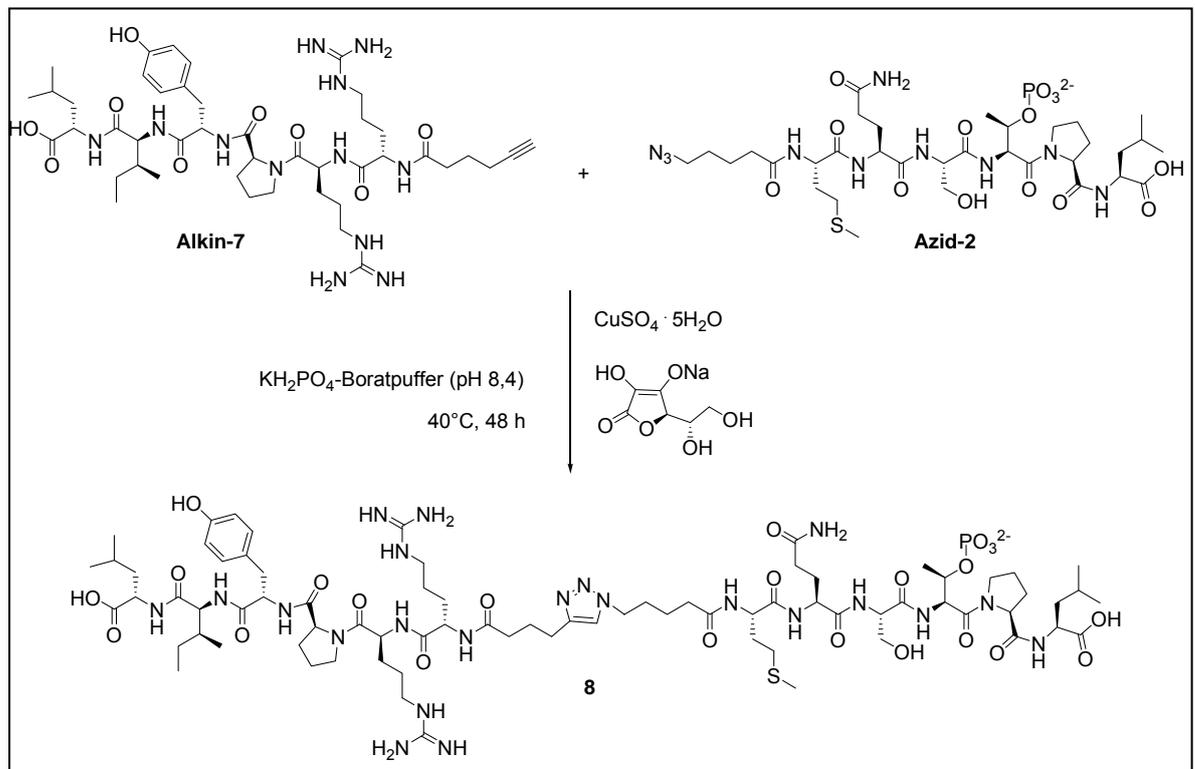


Abb. 23: Clickreaktion zum Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugat **8**

Die Realisierung der Konjugation der *N*-Termini des Phosphopeptides **2** und des rezeptorbindenden Peptides NT(8-13) gelingt erfolgreich mit Hilfe der Click-Chemie unter Einführung der bioorthogonalen funktionellen Gruppen Azid und Alkin in jeweils ein Peptid. Triazol **8** wird in einer Ausbeute von 28% hergestellt und HPLC-analytisch wie auch massenspektrometrisch charakterisiert. Die berechnete Masse wird experimentell wiedergefunden, dabei kompensiert die negative Ladung der Phosphatgruppe eine positive Ladung der beiden Guanidinfunktionalitäten an den Arg-Resten des NT(8-13)-Peptidfragmentes.

Zusätzlich wurden zwei weitere Triazol-Konjugate synthetisiert, die das alkin-funktionalisierte NT(8-13) **Alkin-7** zum einen mit dem *N*-terminal azidierten nicht-phosphorylierten Heptapeptid PMQSTPL **Azid-Dephospho-1** zu Konjugat **10** und des Weiteren mit dem nicht-phosphorylierten Hexapeptid MQSTPL **Azid-Dephospho-2** zu Konjugat **9** verknüpft. Abb. 24 zeigt das Reaktionsgemisch, aus dem Konjugat **9** isoliert wurde.

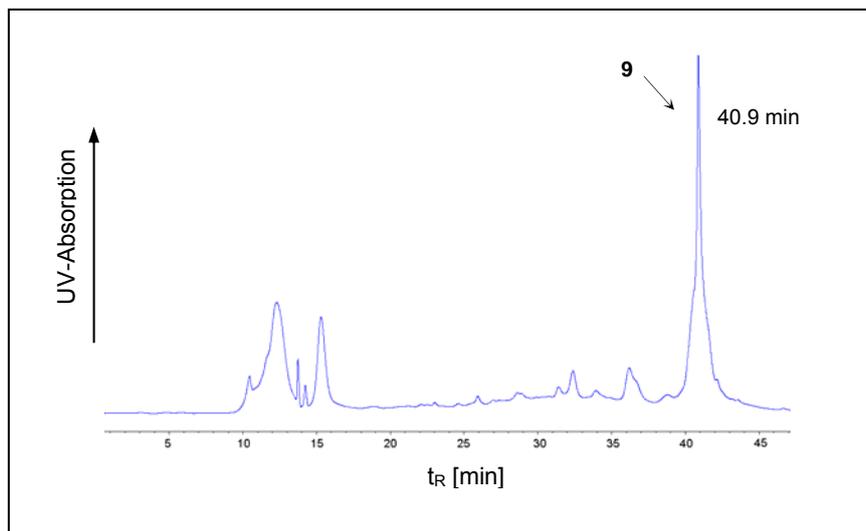


Abb. 24: Typisches HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches am Beispiel des Triazol-Konjugates **9** ($t_R = 40,9$ min)

Das Konjugat **9** kann in ähnlichen Ausbeuten wie das Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugat **8** von 31% dargestellt werden, wohingegen das Konjugat **10** nur mit 13%iger Ausbeute synthetisiert werden kann. Analytik mittels ESI-MS zeigt die charakteristische halbe Masse für die nicht-phosphorylierten Peptid-Konjugate **9** und **10**, da hier keine Kompensation der beiden positiven Ladungen an den Guanidingruppen der Arg-Reste erfolgt. Tabelle 5 gibt einen Überblick zu den *N*-terminal verknüpften Peptid-Konjugaten.

Tabelle 5: Überblick zu synthetisierten Peptid-NT(8-13)-Konjugaten

Konjugat	Azid-Komponente	Alkin-Komponente	Ausbeute	M _{berechnet} [g/mol]	M _{exp} m/z
8	Azid-2	5-Hexinoyl-	28%	1790,9	1792,9 [M+2H] ⁺
9	Azid-Dephospho-2	NT(8-13)	31%	1710,9	856,4 [M+2H] ²⁺
10	Azid-Dephospho-1	Alkin-7	13%	1808,0	905,4 [M+2H] ²⁺

3.2.3 Bindungsstudien der Peptid-Konjugate an den Neurotensin-Rezeptor

Das Phosphopeptid-NT(8-13)-Chimär MQSpTPL-NT(8-13) **8** wurde in einer Bindungsstudie an den Neurotensin-Rezeptor 1 (NTR1) auf Affinität überprüft, um die Transportereigenschaften des Peptides NT(8-13) in Hinblick auf eine potentielle Internalisierung des Hexaphosphopeptides MQSpTPL **2** zu bewerten. Als Zellmodell wird die humane, kolorektale Adenokarzinomzelllinie HT-29 eingesetzt, die nachweislich den NTR1 überexprimiert [153]. Der Bindungsassay basiert auf der Verdrängung des am NTR1 gebundenen, isotop markierten, nativen Liganden des NTR1, dem [³H]Neurotensin, als kompetitiver Radioligand zu der zu testenden Verbindung, die in verschiedenen Konzentrationen vorgelegt wird. Trägt man den Anteil noch gebundenen [³H]NTs in Prozent gegen die logarithmischen Peptid-Konjugat-Konzentrationen auf, wird ein sigmoidaler Kurvenverlauf erhalten, aus dessen Wendepunkt der IC₅₀-Wert (mittlere inhibitorische Konzentration), der Substanzkonzentration, bei der 50% einer Inhibition *in vitro* erreicht wird, bestimmt werden kann. Der IC₅₀-Wert ist ein repräsentatives Maß für die Bindungsaffinität. Für das Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugat **8** wurde ein IC₅₀-Wert von 8,33 µM experimentell ermittelt. Im Vergleich zum nativen NT(8-13) mit einem IC₅₀-Wert von 0,4 nM, besitzt das Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugat **8** eine unzureichende Bindungsaffinität.

In Hinblick auf einen möglichen negativen Einfluss der Phosphatgruppe auf die Bindungsaffinität des Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugates wurden die beiden nicht-phosphorylierten Peptid-NT(8-13)-Konjugate MQSTPL-NT(8-13) **9** und PMQSTPL-NT(8-13) **10** synthetisiert und hinsichtlich ihrer Bindung am NTR1 getestet. Konjugat **9** zeigt einen um eine Größenordnung niedrigeren IC₅₀-Wert von 0,75 µM im Vergleich zu Konjugat **8** und auch Konjugat **10** lässt eine weitaus verbesserte Bindungsaffinität zu, was mit dem IC₅₀-Wert von 0,15 µM bestätigt wird. Zusammenfassend sind in Abb. 25

die Bindungskurven für alle getesteten Peptid-NT(8-13)-Konjugate und die zugehörigen, ermittelten IC_{50} -Werte dargestellt.

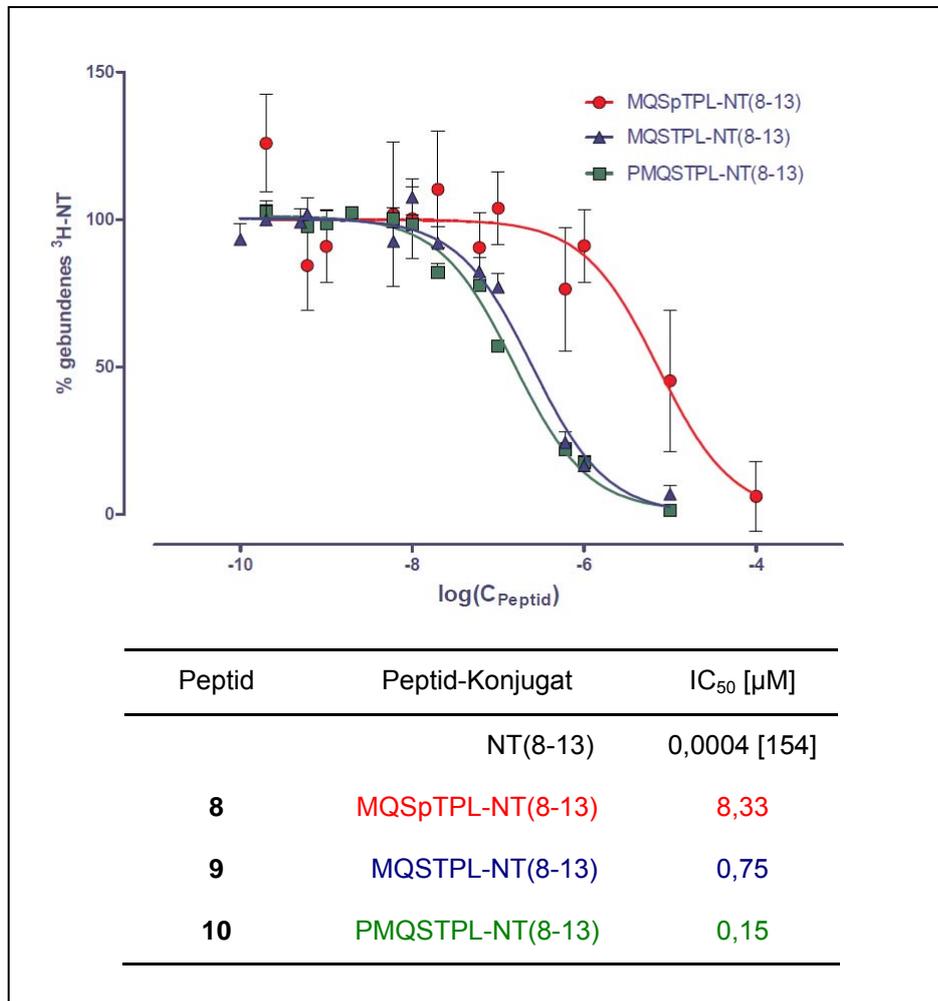


Abb. 25: Sigmoidale Bindungskurven verschiedener Peptid-NT(8-13)-Konjugate 8, 9, 10 und ermittelte IC_{50} -Werte zum NTR1 auf HT-29 Zellen

3.3 Konjugate aus Phosphopeptiden und zellpenetrierenden Peptiden

Im Rahmen der Dissertation wurden drei verschiedene zellpenetrierende Peptide (CPP) ausgewählt. Einmal wurden die bislang in der Fachliteratur beschriebenen kürzesten CPPs, die zellpenetrierenden Pentapeptide (CPP5) betrachtet, die auch als Bax-Inhibitoren bekannt sind.

Des Weiteren fanden in Kooperation mit dem Institut für Biochemie der Universität Leipzig (Dr. Ines Neundorf) Calcitonin- und Cathelicidin-abgeleitete zellpenetrierende Strukturen als molekulare Transporter Anwendung.

3.3.1 Zellpenetrierende Pentapeptide (CPP5)

Gomez *et al.*, identifizierten Bax-Inhibitoren mit zellpenetrierenden Eigenschaften vergleichbar mit etablierten CPPs wie Tat oder Arg-haltigen Peptiden [125]. Anhand von Zellaufnahmeuntersuchungen der *N*-terminal mit GFP (green fluorescent protein) gekuppelten CPP5 VPTLK und KLPVM beschreiben Yoshida *et al.* außerdem Proteintransduktionsaktivität für beide Peptide [126].

3.3.1.1 Synthese und Charakterisierung von zellpenetrierenden Pentapeptiden

Mittels der Fmoc-basierten Festphasenpeptidsynthese wurden das Bax-inhibierende Peptid (BIP) VPTLK **11** aus Mäusen, das humane BIP VPMLK **12**, sowie die Mutante mit der Sequenz KLPVM **13** ausgehend von einem Fmoc-geschützten Lys(Boc)-beladenen Wang-Harz bzw. einem Fmoc-Met-beladenen TentaGel-Harz dargestellt. Mit dem Aktivierungs- und Kupplungsreagenz HBTU/HOBt/DIPEA im Mol-Verhältnis 1:1:2 pro 5 äq. Aminosäure werden die CPP5 nach Abspaltung mit TFA/Wasser/Thioanisol/EDT (87:5:5:3) bzw. TFA/Wasser/*p*-Kresol (95:5:5) für 3 h und HPLC-semipräparativer Reinigung mit der in Tabelle 6 aufgeführten Ausbeuten erhalten. Hinsichtlich einer Radiomarkierung mit [¹⁸F]SFB werden die zugehörigen 4-fluorbenzoylierten CPP5 durch Einsatz der 4-Fluorbenzoesäure als Baustein der Peptidsynthese automatisiert synthetisiert.

Während sich die beiden CPP5 VPTLK **11** und KLPVM **13** in sehr guten Ausbeuten von 71% und 80% herstellen lassen, zeigt das VPMLK **12** nur 28% Ausbeute. Die Elongation um den 4-Fluorbenzoylrest schlägt sich in geringeren Ausbeuten nieder als im Fall der nicht-modifizierten CPP5. Ausnahme bildet das 4FBz-VPMLK **15**, welches eine um 16% höhere Ausbeute im Vergleich zum VPMLK **12** aufweist.

Tabelle 6: Synthetisierte CPP5, deren Ausbeuten und Charakterisierung

Peptid	Peptidsequenz	Masse/Ausbeute	M _{berechnet} [g/mol]	M _{exp} m/z
11	VPTLK	16 mg/ 71%	556,4	557,5 [M+H] ⁺
12	VPMLK	6 mg/ 28%	586,4	587,5 [M+H] ⁺
13	KLPVM	19 mg/ 80%	586,4	587,5 [M+H] ⁺
14	4FBz-VPTLK	9 mg/ 46%	678,4	679,6 [M+H] ⁺
15	4FBz-VPMLK	10 mg/ 44%	708,4	709,5 [M+H] ⁺
16	4FBz-KLPVM	14 mg/ 60%	708,4	709,3 [M+H] ⁺

3.3.1.2 Radiomarkierung mit Fluor-18

CPP5 **11**, **12** und **13** wurden mit dem Markierungsbaustein [¹⁸F]SFB umgesetzt, mit dem Ziel einer *N*-terminalen ¹⁸F-Fluorbenzoylierung. Dazu wurden die für das Phosphopeptid MQSpTPL **2** optimierten Markierungsbedingungen übertragen. In 300 µl Na₂HPO₄-Puffer-Medium (pH 9) werden 0,5 mg **11**, **12** bzw. **13** mit 50 µl einer [¹⁸F]SFB-MeCN-Lösung versetzt. Nach je 30 min Reaktionszeit bei 40°C wird das jeweilige Reaktionsgemisch mittels HPLC analysiert. In Abb. 26 sind die erhaltenen HPLC-Chromatogramme aufgeführt, die über die Zusammensetzung der Reaktionsgemische Aufschluss geben.

Während das Peptid [¹⁸F]FBz-VPTLK [¹⁸F]**14** zu 26% im Reaktionsgemisch wiedergefunden werden, können das Peptid KLPVM **13** zu 17% und das Peptid VPMLK **12** nur noch zu 14% mit [¹⁸F]SFB zu den *N*-terminal ¹⁸F-fluorbenzoylierten Peptiden [¹⁸F]**16** und [¹⁸F]**15** umgesetzt werden. Im Reaktionsmedium von pH 9 ist die in allen synthetisierten CPP5 vorhandene ε-NH₂-Gruppe des Lys-Restes gegenüber einer ¹⁸F-Radiomarkierung mit [¹⁸F]SFB sensitiv. Bei dem Hauptprodukt dieser Reaktion, das in dem jeweiligen Radiochromatogramm erkennbar ist, sollte es sich demzufolge um die an der Lys(ε-NH₂)-Gruppe ¹⁸F-fluorbenzoylierten CPP5 handeln (mit 37% VPTLK([¹⁸F]FBz), 59% VPMLK([¹⁸F]FBz) und 56% K([¹⁸F]FBz)LPVM). Das [¹⁸F]SFB (Abb. 26 im ersten Radiochromatogramm bei 15,8 min; in den beiden unteren Radiochromatogrammen bei 14,8 min) ist vollständig verbraucht.

Für Zellaufnahmeuntersuchungen wurde das Peptid [¹⁸F]FBz-VPTLK [¹⁸F]**14** auf hohem Aktivitätsniveau synthetisiert, mittels semipräparativer HPLC getrennt und am Rotationsverdampfer isoliert. Die Gesamtsynthesedauer ab Verfügbarkeit des [¹⁸F]SFB beträgt 67-99 min, wobei [¹⁸F]**14** in radiochemischen Ausbeuten (RCA) von 14-19% (zerfallskorrigiert) und in radiochemischer Reinheit (RCR) von > 95% synthetisiert werden kann.

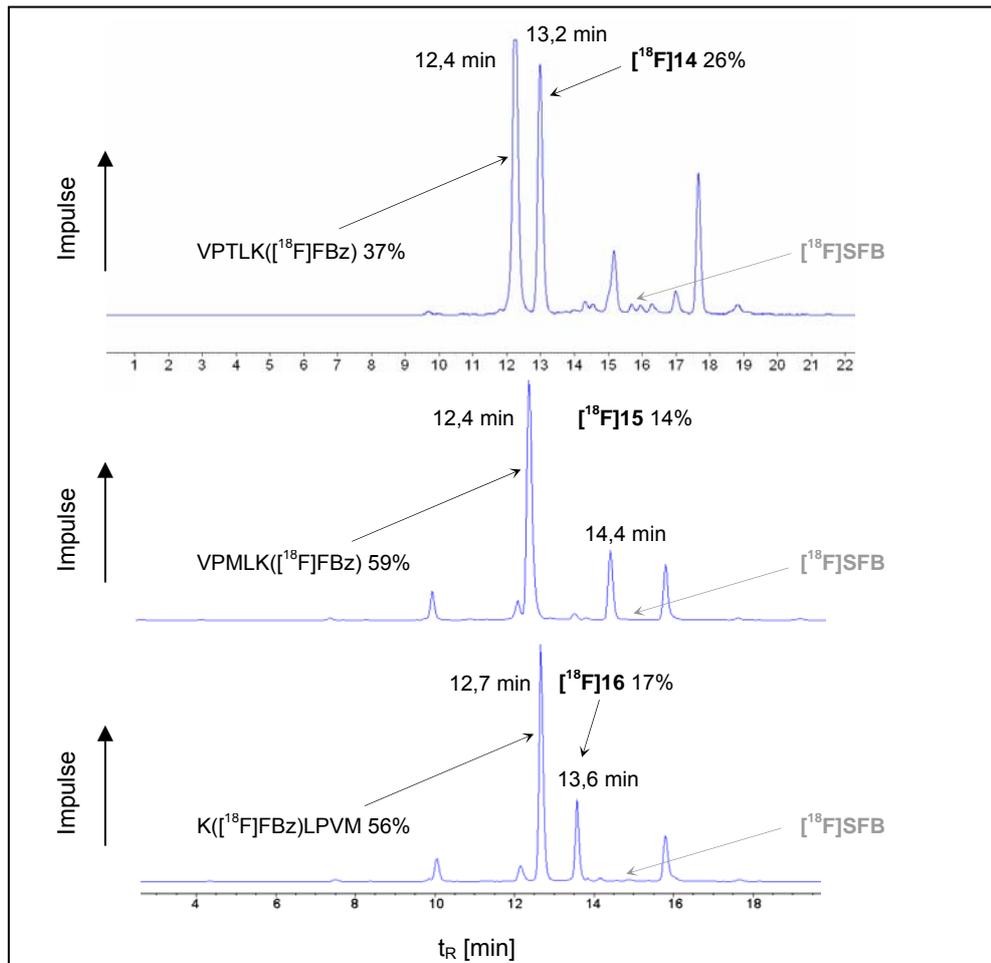


Abb. 26: Analytische HPLC-Radiochromatogramme der Reaktionsgemische zur Umsetzung von CPP5 mit $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ zu $[^{18}\text{F}]\text{FBz-VPTLK}$ $[^{18}\text{F}]\text{14}$, $[^{18}\text{F}]\text{FBz-VPMLK}$ $[^{18}\text{F}]\text{15}$ und $[^{18}\text{F}]\text{FBz-KLPVM}$ $[^{18}\text{F}]\text{16}$

3.3.1.3 *In vitro* Zellaufnahmeuntersuchungen

Die Zellaufnahme des ^{18}F -fluorbenzoylierten CPP5 VPTLK $[^{18}\text{F}]\text{14}$ wurde an zwei humanen Tumorzelllinien überprüft. Die humane Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu, wie auch die humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen HT-29 werden dazu mit dem ^{18}F -markierten Peptid $[^{18}\text{F}]\text{14}$ über 2 h bei 4°C und 37°C inkubiert. Die Ergebnisse repräsentiert Abb. 27.

Die Internalisierung zeigt in HT-29, wie auch in FaDu Zellen vergleichbare Werte. Das zellpenetrierende Pentapeptid VPTLK mit dem N-terminal konjugierten ^{18}F -Fluorbenzoyl-Rest erfährt in HT-29 und FaDu Zellen eine äußerst geringe Zellaufnahme.

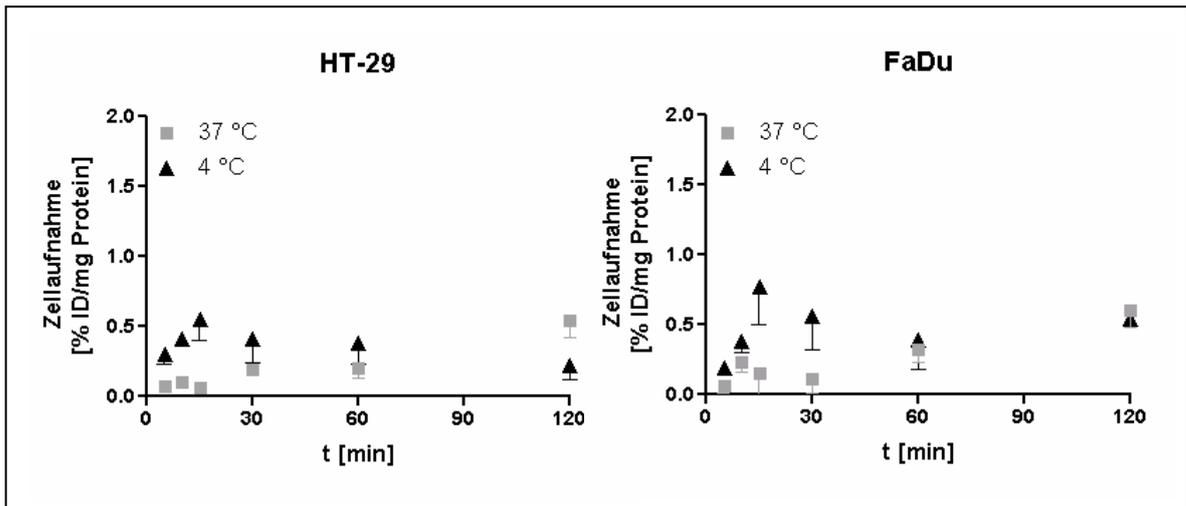


Abb. 27: *In vitro* Zellinternalisierung von [¹⁸F]FBz-VPTLK [¹⁸F]14 in humanen Tumorzellen bei 4°C und 37°C, MW ± SD (n = 4)

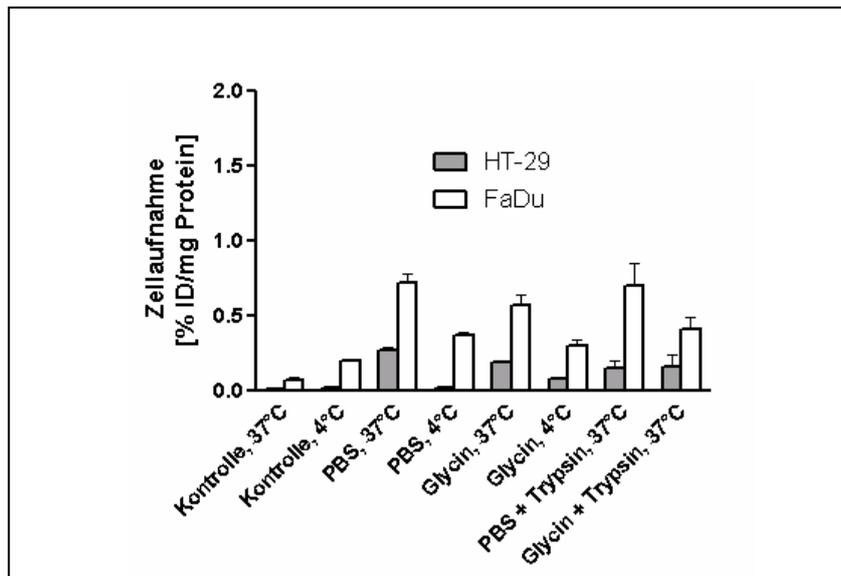


Abb. 28: *In vitro* Zellinternalisierung von [¹⁸F]FBz-VPTLK [¹⁸F]14 in humanen Tumorzellen bei 4°C und 37°C nach zusätzlichen Waschsritten mit PBS, Glycinpuffer und Trypsin, MW ± SD (n = 8 für PBS, Glycinpuffer), (n = 2 für PBS + Trypsin, Glycin + Trypsin)

Auch zusätzliche Waschschrte im Rahmen der Zellaufnahmeuntersuchungen z.B. mit PBS bzw. Glycin, um an Zellmembranen gebundenes ¹⁸F-Peptid [¹⁸F]14 zu entfernen, zeigen keinen Effekt. Beide Waschreagenzien wurden in einem weiteren Versuch in Kombination mit Trypsin eingesetzt, um eine Ablösung der Zellen zu erreichen, so dass Interaktionen mit der Zellmembran bzw. der Umgebung eliminiert werden können. Es

zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, wie Abb. 28 belegt, womit keine effektive *in vitro* Zellaufnahme für das [¹⁸F]FBz-VPTLK [¹⁸F]14 nachgewiesen werden konnte.

Demzufolge wurde von einem Aufbau eines Konjugates des Bax-inhibierenden Peptides mit einem Phosphopeptid und der weiteren Bearbeitung dieser Thematik abgesehen.

3.3.2 Calcitonin- und Cathelicidin-abgeleitete zellpenetrierende Strukturen (hCT- und sC18-CPP)

Das zellpenetrierende, verzweigte Peptid hCT(18-32)-k7, eine aus dem humanen Calcitonin abgeleitete zellpenetrierende Peptideinheit [124], sowie das kürzlich in der Literatur vorgestellte CPP sC18, welches antimikrobieller Herkunft ist und dem Peptid Cathelicidin entstammt [131], stellen potente zellpenetrierende Peptide dar. In diesem Kapitel werden die Synthese eines Phosphopeptid-sC18- und eines Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7-Konjugates und ihre Charakterisierung mittels fluoreszenzmikroskopischer und radiochemischer Methoden betrachtet.

3.3.2.1 Synthese und Charakterisierung einer Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7- und einer Phosphopeptid-sC18-Sequenz

Die Phosphopeptid-CPP-Konjugate werden am Rinkamidharz auf Basis der SPPS Fmoc-Schutzgruppenstrategie aufgebaut, beginnend mit der CPP-Einheit sC18 oder hCT(18-32)-k7 C-terminal, die dann N-terminal um das Phosphopeptid verlängert wird. Als Phosphopeptid dient wiederum das Hexapeptid MQSpTPL **2**.

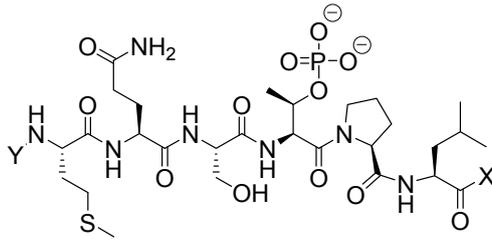
Eine komplett automatisierte Darstellung am Syntheseroboter gelingt nicht. So wurde ein partieller Aufbau der Konjugate angegangen. Die sC18- und hCT(18-32)-k7-Sequenzen werden dazu mit den Kupplungsreagenzien Diisopropylcarbodiimid (DIC)/HOBt in siebenfachem Überschuss und Doppelkupplungszyklen á 40 min an das Rinkamidharz im Syntheseroboter synthetisiert. Um die Verzweigung der k7-Kette an das hCT(18-32) herzustellen, wurde die Dde (1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-ethyl)-Schutzgruppe des N-terminalen Lys der hCT(18-32)-Sequenz mittels 2%iger Hydrazinlösung in DMF hydrolysiert und so an die Lys-reiche k7-Sequenz, die in einer separaten automatisierten SPPS dargestellt wurde, gekuppelt [124, 155].

In der gleichen automatisierten SPPS, in der das sC18 und das hCT(18-32)-k7 aufgebaut wurden, folgte die weitere Ankupplung der C-terminalen Reste bis zum pThr-Rest des Phosphopeptides MQSpTPL **2**. So wurden das Pro-Leu-sC18- und Pro-Leu-hCT(18-32)-k7-Rinkamidharz von Dr. I. Neundorf (Institut für Biochemie, Universität Leipzig) bereitgestellt. Der Aminosäurebaustein

Fmoc-L-Thr(PO(OBzl)OH)-OH wird anschließend manuell mit den effektiven Bedingungen HBTU/HOBt/DIPEA (1:1:3) angekuppelt. Die *N*-terminalen Phosphopeptid-Aminosäuren MQS werden zur Komplettierung des jeweiligen Konjugates wiederum automatisiert gekuppelt. Nach jedem Syntheseschritt wird eine Probeabspaltung einiger Harzkügelchen mit dem modifizierten Reagenz K (TFA/Wasser/Thioanisol/EDT 87:5:5:3) vorgenommen, wobei mittels HPLC ein scharfer Peak beobachtet wurde. Die Ausnahme bildet die Probeabspaltung der Konjugate mit dem *N*-terminalen Met, die einen Doppelpeak, wahrscheinlich aufgrund der oxidierten Form des Met, zeigen. Mit MALDI-MS bzw. ESI-MS lassen sich in der jeweiligen Probeabspaltung die zu erwartenden Massen detektieren.

Durch Vollabspaltung des MQSpTPL-sC18 und des MQSpTPL-hCT(18-32)-k7-Rinkamidharzes mit dem modifizierten Reagenz K, HPLC-Reinigung und Lyophilisation erhält man die für eine anschließende Markierung zur Verfügung stehenden Präkursor-Peptide **2-CPP1** und **2-CPP2**.

Zudem wurden diese Peptid-Konjugate im Weiteren *N*-terminal mit einem 4-Fluorbenzoyl-Rest versehen als Referenz für eine spätere [¹⁸F]SFB-Markierung. Die 4-Fluorbenzoesäure wird analog einer Aminosäure manuell an die Phosphopeptid-CPP-Harze gebunden, unter Einsatz der Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA im Mol-Verhältnis 1:1:2 pro 5 äq. 4-Fluorbenzoesäure. Die Vollabspaltung unter die den Präkursor-Konjugaten analogen Bedingungen und HPLC-Reinigung führt nach Lyophilisation zu den Referenzpeptiden **2-CPP3** und **2-CPP4**. Abb. 29 gibt einen Überblick zu den dargestellten Phosphopeptid-CPP-Konjugaten und ihrer Charakterisierung.



2-CPP1 X = sC18, Y = H

2-CPP2 X = hCT(18-32)-k7, Y = H

2-CPP3 X = sC18, Y = 4-FBz

2-CPP4 X = hCT(18-32)-k7, Y = 4-FBz

Peptid	CPP-Sequenz	Masse/ Ausbeute	M _{berechnet} [g/mol]	M _{exp} m/z
2-CPP1	GLRKRLRKFRNKIKEK-NH ₂	28 mg/ 20%	2805,6	936,3 [M+3H] ³⁺ 702,5 [M+4H] ⁴⁺
2-CPP2	KFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂ KKRKAPKKKRFKA [↓]	32 mg/ 55%	3901,2	1302,1 [M+3H] ³⁺ 976,5 [M+4H] ⁴⁺
2-CPP3	GLRKRLRKFRNKIKEK-NH ₂	3 mg/ 7%	2927,6	977,0 [M+3H] ³⁺ 733,1 [M+4H] ⁴⁺
2-CPP4	KFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂ KKRKAPKKKRFKA [↓]	5 mg/ 8%	4023,2	1347,4 [M+3H] ³⁺ 1010,8 [M+4H] ⁴⁺

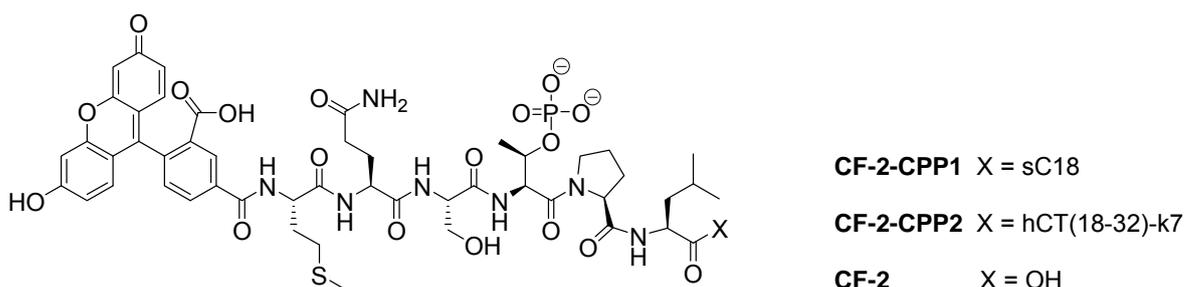
Abb. 29: Synthetisierte Präkursor-Peptide **2-CPP1**, **2-CPP2** und 4-fluorbenzoylierte Referenzpeptide **2-CPP3**, **2-CPP4** bestehend aus Phosphopeptid 2 N-terminal an die CPPs sC18 und hCT(18-32)-k7 konjugiert einschließlich Ausbeuten und Charakterisierung

Die Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7 Konjugate **2-CPP2**, **2-CPP4** lassen sich vergleichend zu den Phosphopeptid-sC18 Konjugaten **2-CPP1**, **2-CPP3** mit besseren Ausbeuten darstellen. Besonders auffällig ist dies bei den Präkursor-Peptiden (55% **2-CPP2** zu 20% **2-CPP1**). Die manuelle Kupplung der 4-Fluorbenzoesäure lässt sich mit weniger guten Ausbeuten von 7% für **2-CPP3** und 8% für **2-CPP4** realisieren. Jedoch können wenige Milligramm der Referenzsubstanzen hergestellt werden, die zu Analysezwecken vollkommen ausreichend sind.

3.3.2.2 Fluoreszenzmarkierung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten

Als Markierungsagensatz kommt das 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) zur Anwendung. Dieses Fluorophor bietet eine einfache und bequeme Variante der Fluoreszenzmarkierung an der Festphase durch Aktivierung von 5(6)-Carboxyfluorescein mit den Kupplungsreagenzien HATU/DIPEA [156].

Die Harz-gebundenen und vollständig geschützten Peptid-Konjugate MQSpTPL-sC18 **2-CPP1** und MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 **2-CPP2** werden dazu über Nacht unter Ausschluss von Licht mit je 1,5 äq. CF behandelt. Die *in situ*-Aktivierung des CF erfolgt mit 1,5 äq. HATU/1,5 äq. DIPEA in DMF. Die 4,5 h Inkubation der CF-markierten Peptidyl-Harze führt zur Spaltung der Peptide vom Harz und der Entschützung der Aminosäureseitenketten-Schutzgruppen, auch die der Benzyl-Schutzgruppe des phosphorylierten Threonins. Präzipitation mit Diethylether ergibt die charakteristisch leuchtend gelbe Fällung der Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2**. Die Isolierung erfolgt nach HPLC-Reinigung und Lyophilisation der Peptide. Eine Zusammenfassung zeigt Abb. 30.



Peptid	Masse/Ausbeute	M _{berechnet} [g/mol]	M _{exp} m/z
CF-2-CPP1	7 mg/ 20%	3163,7	ESI-MS: 1055,8 [M+3H] ³⁺ , 792,1 [M+4H] ⁴⁺
CF-2-CPP2	4 mg/ 8%	4259,2	ESI-MS: 1421,4 [M+3H] ³⁺ , 1066,2 [M+4H] ⁴⁺
CF-2	4 mg/ 18%	1113,3	ESI-MS: 1114,2 [M+H] ⁺

Abb. 30: Synthetisierte 5(6)-Carboxyfluorescein-markierte Phosphopeptid-CPP-Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** und CF-markiertes Kontroll-Phosphopeptid **CF-2** zuzüglich Ausbeuten und Charakterisierung

Das N-terminal CF-markierte Phosphopeptid-sC18-Konjugat **CF-2-CPP1** kann mit 20% Ausbeute synthetisiert werden, wohingegen sich das hCT-basierte Phosphopeptid-Konjugat **CF-2-CPP2** nur zu 8% isolieren lässt. Neben der gesamten und halben

Masse, die sich mit MALDI-MS ermitteln lassen, finden sich ebenso ein Drittel und ein Viertel der Massen mit der sensitiveren ESI-MS wieder. Zusätzlich lässt sich das Phosphopeptid MQSpTPL **2** an der Festphase in einer Ausbeute von 18% mit CF markieren. Damit wird eine Kontrolle für weiterführende Zellexperimente geschaffen.

3.3.2.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die CF-markierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Zellgängigkeit untersucht. Als Zellmodelle wurden drei verschiedene Tumorzelllinien gewählt, die humane Zervixepithelkarzinomzelllinie HeLa, das humane kolorektale Adenokarzinom HT-29 und die humane Brustadenokarzinomzelllinie MCF-7. Dazu werden die Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** in einer Konzentration von 50 μM bei 37°C für 60 min mit HeLa und MCF-7 Zellen inkubiert; für HT-29 Zellen wird eine Konzentration von 25 μM verwendet. Zur Verdeutlichung der Zellanatomie wird 10 min vor Inkubationsende der Farbstoff Hoechst H33342 zugefügt, um den Zellkern sichtbar zu machen. Als Kontrollpeptid wird außerdem das CF-markierte Phosphopeptid CF-MQSpTPL **CF-2** mitgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 31 dargestellt.

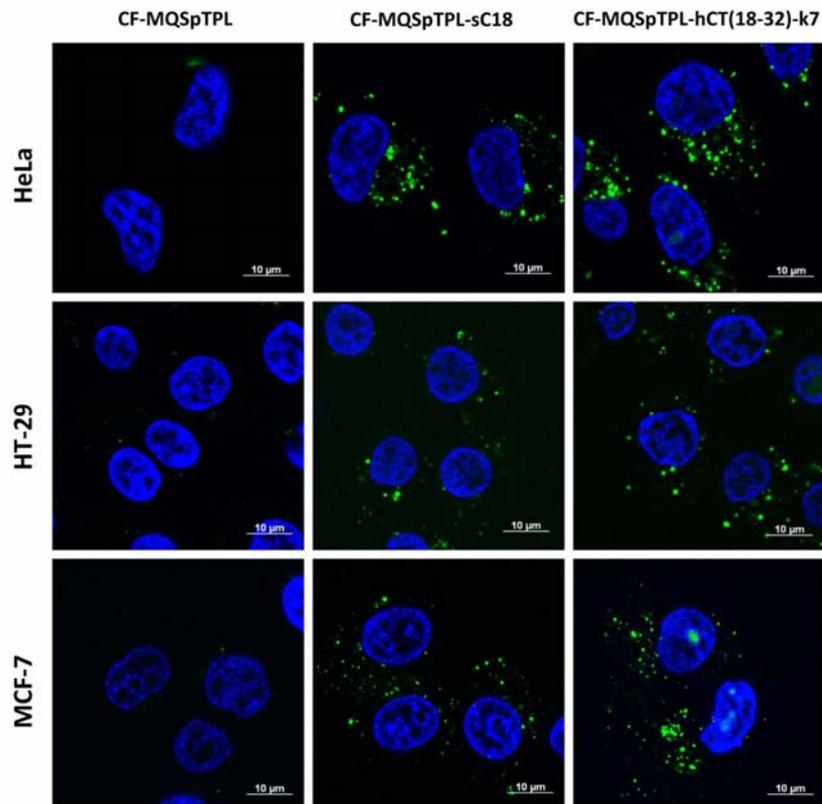


Abb. 31: Zellaufnahme von CF-MQSpTPL **CF-2**, CF-MQpTPL-sC18 **CF-2-CPP1** und CF-MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 **CF-2-CPP2** nach Inkubation der Zellen für 60 min bei 37°C mit 50 µM (HeLa und MCF-7 Zellen) und 25 µM (HT-29 Zellen) der Peptidlösungen (Zellkerne wurden mit H333342 gefärbt)

Augenscheinlich zeigen alle drei verwendeten Zelllinien eine Aufnahme beider Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2**. Das Phosphopeptid **CF-2** als solches wird nicht von den Zellen internalisiert. Geringfügig sichtbare CF-Fluoreszenz stellen bei **CF-2** Artefakte dar. Es zeigte sich im Lauf der Versuche, dass in HeLa Zellen die stärkste Internalisierung stattfindet, die sich in Fluoreszenzarealen am Zellkern äußert. In MCF-7 Zellen lässt sich eine geringere Zellaufnahme im Vergleich zu HeLa Zellen erkennen. Für beide Zelllinien kann man vermuten, dass die beiden CPPs eine Internalisierung des Phosphopeptides mit ähnlicher Effizienz ermöglichen. Genauere Aussagen können dazu mit der Durchflusszytometrie getroffen werden. Zudem zeigt das Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7-Konjugat **CF-2-CPP2** in den MCF-7 Zellen eine Aufnahme im Zellkern.

Auch in HT-29 Zellen ist eine Zellaufnahme beider Konjugate visualisierbar. Die Internalisierung fällt jedoch im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien gering aus.

3.3.2.2.2 Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie

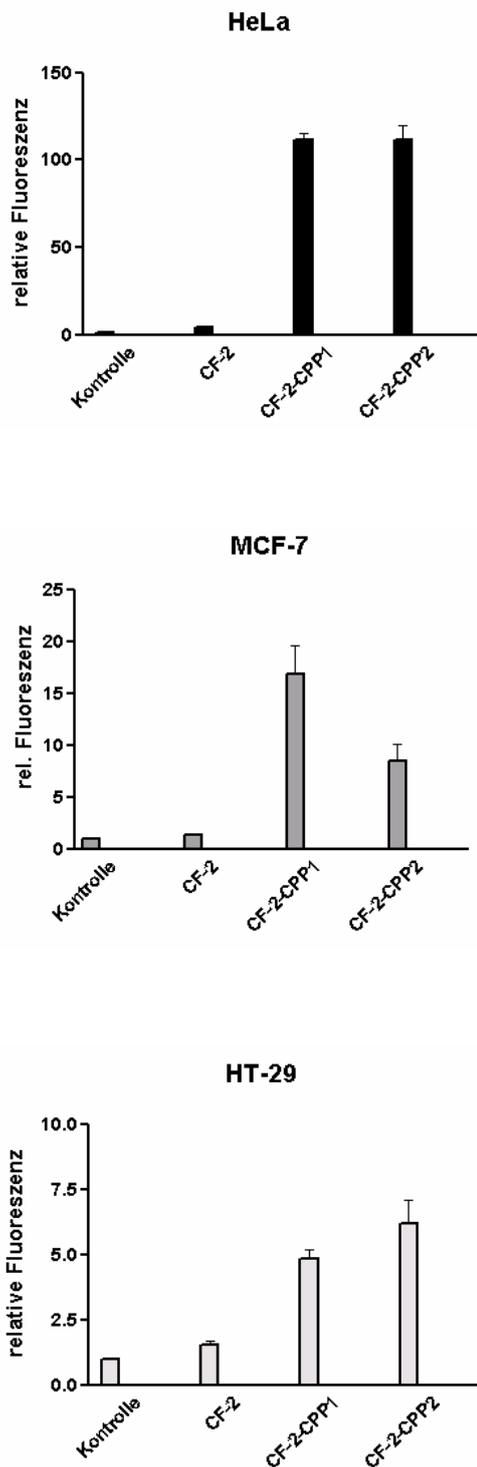


Abb. 32: Internalisierungseffizienz von **CF-2**, **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** nach Inkubation für 60 min bei 37°C, $MW \pm SD$ ($n = 4$)

Die hier im Folgenden beschriebenen Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie dienen zur Quantifizierung der Peptidaufnahme und sollen Aufschluss zur intrazellulären Verfügbarkeit der CF-markierten Phosphopeptid-Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** geben. Dazu werden je Peptid-Konjugat in 25 μM Lösung und das CF-markierte Phosphopeptid **CF-2** mit der FACS-Technik (Fluorescence activated cell sorting) unter Bedingungen analog zu denen der Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Kontrolle werden unbehandelte Zellen mitgeführt. Abb. 32 reflektiert die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Generell ist eine Internalisierung der Konjugate in allen Zelllinien zu beobachten, die in der Reihenfolge HeLa > MCF-7 > HT-29 abnimmt und damit die Resultate der Fluoreszenzmikroskopie widerspiegelt. In HeLa Zellen internalisieren die beiden CPPs mit gleicher Effizienz. MCF-7 Zellen nehmen nur ein Sechstel des jeweiligen Phosphopeptides im Vergleich zu HeLa Zellen auf. Dabei stellt sich das CPP1 (sC18) als effektiver heraus als das Calcitonin-abgeleitete hCT(18-32)-k7. Eine relative Fluoreszenz unter 10 wird in HT-29 festgestellt. Hier zeigt im Gegensatz zu den MCF-7 Zellen das hCT(18-32)-k7 eine bessere Effizienz bei der Internalisierung des

Phosphopeptides MQSpTPL **2**. Die Internalisierung des CF-MQSpTPL **CF-2** als solches, ohne die Konjugation an ein CPP, bewegt sich im Rahmen der Kontrolle (unbehandelte Zellen). Es lässt sich eine relative Fluoreszenz von ca. 2 detektieren.

3.3.2.2.3 Toxizitätsabschätzung auf Basis des Resazurinassays

Für die CPPs sC18 **CPP1** und hCT(18-32)-k7 **CPP2** selbst ist bereits publiziert, dass diese molekularen Transporter in HeLa, MCF-7 und HT-29 Zellen keine Zytotoxizität aufweisen [131]. Wie allerdings wirkt sich nun das Phosphopeptid **CF-2** in Konjugation mit den CPPs **CPP1** und **CPP2** auf die Zellviabilität aus? Dieser Frage wurde in einer Toxizitätsabschätzung auf Basis von MCF-7 Zellen mit dem fluorometrischen Resazurinassay nachgegangen. Abb. 33 veranschaulicht die Ergebnisse dieser Betrachtung, wobei acht verschiedene Konzentrationen von 10 μM bis 100 μM eingesetzt wurden.

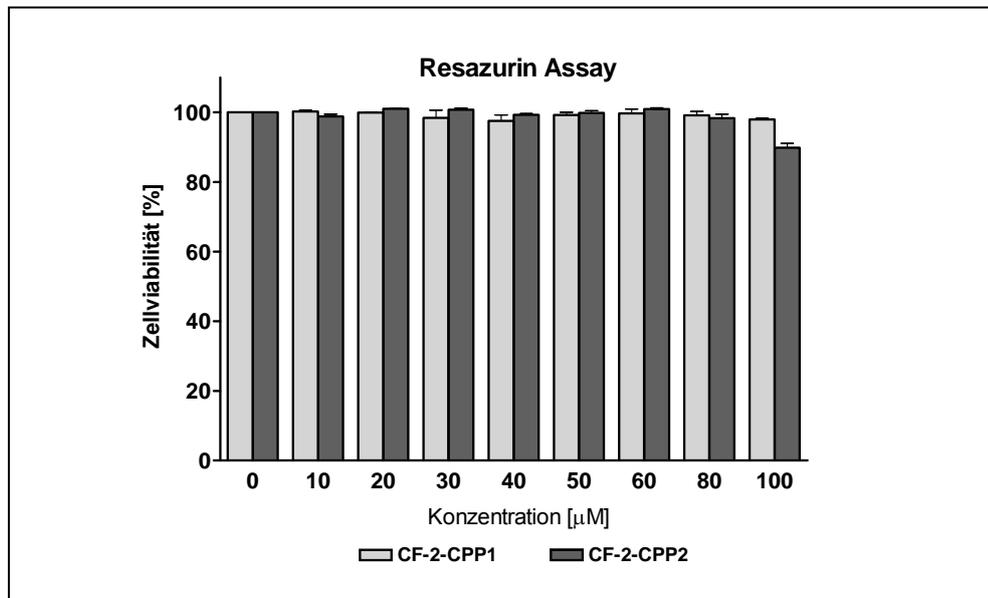


Abb. 33: Zellviabilität in MCF-7 Zellen nach Inkubation mit den Phosphopeptid-CPP-Konjugaten **CF-2-CPP1** (hellgrau) und **CF-2-CPP2** (dunkelgrau) für 24 h, MW \pm SD ($n = 3$)

Die 24 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit bis zu 100 μM **CF2-CPP1** zeigt eine Zellviabilität von $> 97\%$. Das **CF-2**-hCT(18-32)-k7-Konjugat lässt bis 80 μM eine Zellviabilität von $> 98\%$ zu. Bei einer Konzentration von 100 μM ist eine beginnende Einschränkung der Viabilität erkennbar, die jedoch immerhin noch 89,9% beträgt. Somit sind beide Phosphopeptid-Konjugate im getesteten Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch.

3.3.2.3 Radiomarkierung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten mit Fluor-18

Zusätzlich wurden die Phosphopeptid-CPP-Konjugate **2-CPP1** und **2-CPP2** mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Fluor-18 in Form der prosthetischen Gruppe [¹⁸F]SFB markiert. Die [¹⁸F]Fluorbenzoylfunktionalität soll dazu *N*-terminal am Phosphopeptid eingeführt werden. Die Herausforderung liegt hierbei in der Bewerkstelligung einer selektiven Markierung, denn die zellpenetrierenden Peptide weisen weitere für die Markierung zur Verfügung stehende Aminogruppen auf. So besitzt das sC18 fünf potentielle Lys-Reste, mit den zugänglichen ε-NH₂-Gruppen der Seitenkette und das hCT(18-32)-k7 sieben Lys-Reste, an denen eine ¹⁸F-Fluorbenzoylierung möglich ist.

3.3.2.3.1 Synthese mittels klassischer Radiomarkierungstechnik

Bei der klassischen Radiomarkierung von Peptiden wird das im Puffer gelöste Peptid nach Zugabe des Markierungsagens bei milden Temperaturen (RT – 60°C, Ausnahme: hitzestabile Peptide) inkubiert.

Am Beispiel des Phosphopeptid-sC18-Konjugates **2-CPP1** wurde eine Optimierung hinsichtlich der Radiomarkierbarkeit mit [¹⁸F]SFB durchgeführt. Dazu werden 0,5 mg des Peptides pro Markierung eingesetzt und in 300 µl Puffer gelöst. Es wurden verschiedene Puffer getestet. Der für die [¹⁸F]SFB-Markierung des Phosphopeptides MQSpTPL **2** als solches optimierte Na₂HPO₄-Puffer (pH 9), sowie ein Kolthoff KH₂PO₄-Borat-Puffer (pH 7,6) und ein Phosphat-Puffer nach Sörensen mit pH 8,0. Nach Zugabe von 70 µl [¹⁸F]SFB in MeCN wird die Reaktion von **2-CPP1** zu [¹⁸F]**2-CPP3** bei 40°C durchgeführt und in Abhängigkeit der Zeit mittels HPLC erfasst. Eine Zusammenstellung des im Reaktionsgemisch detektierten [¹⁸F]**2-CPP3** zeigt Tabelle 7 pH-abhängig. Die Anwendung verschiedener Puffer und pH-Werte lässt deutliche Unterschiede im Markierungsumsatz zu den gewünschten ¹⁸F-haltigen Peptiden erkennen.

Tabelle 7: Zeit- und pH-abhängige [^{18}F]SFB-Markierung von Phosphopeptid-CPP-Konjugat **2-CPP1** zu [^{18}F]**2-CPP3** bei 40°C, wobei der Anteil von [^{18}F]**2-CPP3** im Reaktionsgemisch in % erfasst ist

Zeit	Na ₂ HPO ₄ -Puffer (pH 9,0) Anteil [^{18}F] 2-CPP3 [%]	Kolthoff-Puffer (pH 7,6) Anteil [^{18}F] 2-CPP3 [%]	Sörensen-Phosphat- Puffer (pH 8,0) Anteil [^{18}F] 2-CPP3 [%]
5 min	20	3	-
15 min	21	14	3
20 min	-	15	2
25 min	23	14	1
35 min	23	15	1

Die Reaktion in reinem Phosphatpuffer nach Sörensen fördert kaum die Bildung des gewünschten N-terminal markierten ^{18}F -fluorbenzoylierten Phosphopeptid-Konjugates [^{18}F]**2-CPP3**. Der Anteil dieses Peptid-Konjugates im Reaktionsgemisch ist mit 3% nach 15 min Reaktionszeit am höchsten. Unter Verwendung des Kolthoff-Puffers bei pH 7,6 entstehen maximal 15% [^{18}F]**2-CPP3**, wobei der Markierungsumsatz ab 15 min Reaktionszeit über die nächsten 20 min nahezu konstant bleibt. Der Na₂HPO₄-Puffer zeigt sich wiederum als optimaler Puffer, mit 21% Markierungsumsatz zu [^{18}F]**2-CPP3** nach 15 min, die mit längerer Reaktionszeit noch auf 23% gesteigert werden kann. Damit lassen sich Reaktionsbedingungen von 25 min bei 40°C in Na₂HPO₄-Puffer als optimal hinsichtlich des gewünschten [^{18}F]**2-CPP3**-Peptidanteils im Reaktionsgemisch selektieren, obwohl mit höherem pH-Wert das Protonierungs-/Deprotonierungsgleichgewicht zu Gunsten der Radiomarkierung der ϵ -NH₂-Gruppen der Lys-Seitenketten im CPP-Teil des Konjugates verschoben ist. Auch die Anwendung eines PBS-Puffers mit niedrigerem pH-Wert von 8,0 zeigte keine Verbesserung, denn die Markierung führte nicht zu dem gewünschten ^{18}F -markierten Peptid-Konjugat [^{18}F]**2-CPP3**. Auch wenn es sich hier um ein größeres Peptid handelt, ist der PBS-Puffer ungeeignet. Das Phosphopeptid-sC18-Konjugat [^{18}F]**2-CPP3** kann durch Übertragung der optimierten Bedingungen auch auf hohem Aktivitätsniveau isoliert werden. Das ^{18}F -markierte Konjugat wird nach 81 min Syntheszeit, die die HPLC-Reinigung und das Entfernen des HPLC-Laufmittels am Rotationsverdampfer beinhaltet, in einer radiochemischen Ausbeute von 2% und in sehr guter radiochemischer Reinheit von >98% erhalten. Abb. 34 zeigt das HPLC-Radiochromatogramm des isolierten Phosphopeptid-sC18-Konjugates [^{18}F]**2-CPP3**.

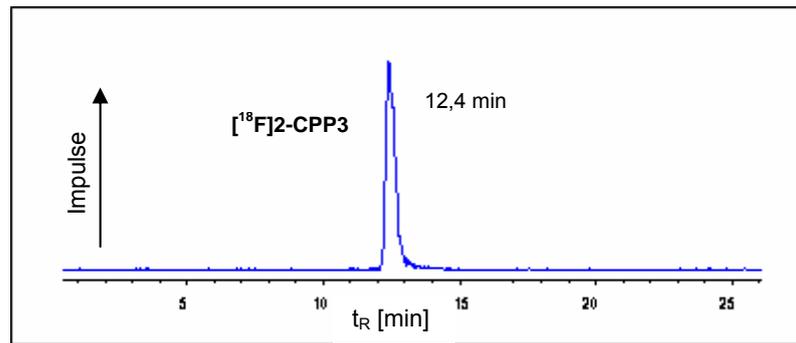


Abb. 34: HPLC-Radiochromatogramm des reinen $[^{18}\text{F}]2\text{-CPP3}$

Auch das zweite Phosphopeptid-CPP-Konjugat MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 **2-CPP2** wurde mit dem Markierungsbaustein $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ markiert. Für diese Reaktion zu $[^{18}\text{F}]2\text{-CPP4}$ wurden veränderte Markierungsbedingungen genutzt. So wurden eine verringerte Peptidmenge von 0,4 mg (statt 0,5 mg) in einem Volumen von 200 μl des 0,05 M Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9) und damit ein vermindertes Gesamtvolumen von 250 μl verwendet. Die Temperatur wurde von 40°C auf 60°C angehoben und die Reaktionszeit auf 10 min reduziert.

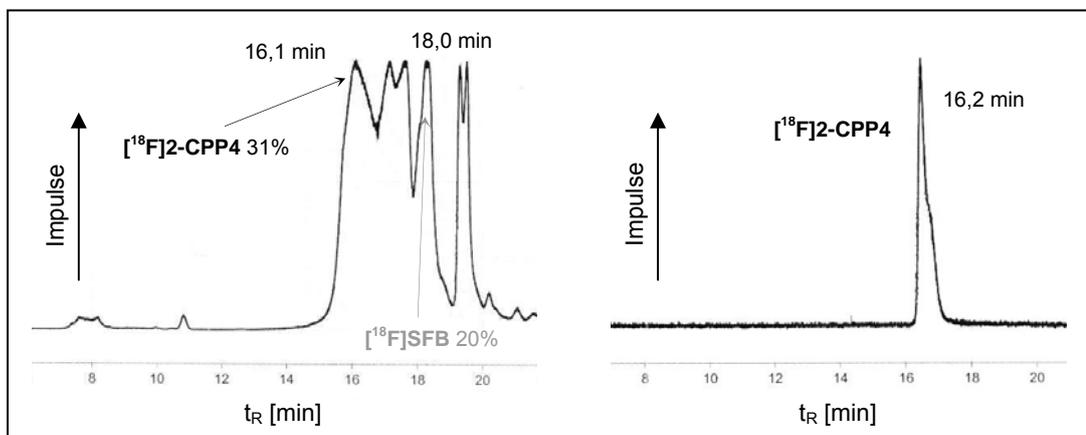


Abb. 35: HPLC-Radiochromatogramm des Reaktionsgemisches der $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ -Markierung des Phosphopeptid-CPP-Konjugates **2-CPP2** zu $[^{18}\text{F}]2\text{-CPP4}$ nach 10 min Reaktionszeit bei 60°C (links), sowie reines $[^{18}\text{F}]2\text{-CPP4}$ (rechts)

Während 31% des N-terminal ^{18}F -fluorbenzoylierten Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7-Konjugates nach 10 min Reaktionszeit im Reaktionsgemisch vorliegen, wie das HPLC-Radiochromatogramm in Abb. 35 zeigt, gelingt auch diese Radiomarkierung nur mit 2-4% radiochemischer Gesamtausbeute.

Wie in Abb. 36 deutlich wird, stellt die Trennung des gewünschten Peptides [¹⁸F]2-CPP3 den limitierenden Faktor dar, denn auch die ε-NH₂-Gruppen des hCT(18-32)-k7-Fragments stehen potentiell zur Markierung mit [¹⁸F]SFB zur Verfügung und erschweren so die Trennung.

3.3.2.3.2 Radiomarkierung mittels Mikrofluidik-Technologie

Einführung in die Mikrofluidik-Technologie

Die Mikrofluidik-Technik wird als Technologie von Systemen definiert, in denen geringe Flüssigkeitsmengen (10⁻⁹-10⁻¹⁸ Liter) in Kanälen und Leitungen von Zehn bis Hunderten Mikrometer gehandhabt werden [157]. Dieses ‚Lab-on-a-Chip‘-Konzept repräsentiert miniaturisierte Prozessführung, die schnelle Synthesezeiten in einem kontrollierten Reaktionsumfeld ermöglicht und nur geringe Markierungsmaterialmengen und Probenvolumina verwendet, mit einem damit einhergehenden geringen Reagenzienverbrauch. Neben diesen Vorteilen führt Audrain auch die positiven Effekte einer vergrößerten spezifischen Oberfläche, die einen effizienteren Masse- und Wärmetransfer und damit eine beschleunigte Reaktion zur Folge haben, sowie höhere Produktselektivitäten auf [158]. Damit stellt die mikrofluide Technologie eine neue und innovative Methodik zur automatisierten Synthese von Radiotracer für die Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar. Jedoch stellt sich die Frage, ob der konventionelle Batch-Ansatz für die routinemäßige Herstellung von Radiopharmaka durch den Einsatz eines kontinuierlichen Flusses äquivalent ersetzt werden kann.

Der Beweis einer erfolgreichen Anwendung dieses Mikrofluidik-Prinzips in Kombination mit der PET-Radiosynthese wurde von Brady *et al.* erbracht und patentiert [159]. Unterdessen wurden weitere Anwendungen publiziert, die ¹⁸F- und ¹¹C-Markierungen vornehmen. Lu *et al.* synthetisierten ¹⁸F- und ¹¹C-markierte Carboxylester durch Reaktion mit [¹¹C]Iodmethan bzw. [¹⁸F]2-Fluorethyltosylat, sowie einen ¹¹C-markierten Liganden für den peripheren Benzodiazepinrezeptor in einem einfachen T-förmigen Mikroreaktor, wobei der auf die Markierungsausbeute positive Einfluss der Verringerung der Infusionsrate (10 µl/min → 1 µl/min) demonstriert wurde [160]. Besonders aber tritt die 2-Desoxy-2-[¹⁸F]fluor-D-glucose [¹⁸F]FDG als etabliertes und radioaktives Arzneimittel in Erscheinung. Diese zweistufige Synthese wurde von Lee *et al.* mit einer radiochemischen Ausbeute von 38% und radiochemischer Reinheit von 97,6% in einem Mikrofluidik-System mit kürzeren Synthesezeiten von 14 min im Vergleich zur konventionellen Markierung (~ 25 min) bewerkstelligt [161]. Neben der Radiosynthese des [¹⁸F]FDG in 2 Mikrofluidik-Reaktoren für die Durchführung dieser

Zweistufenreaktion (40% RCA innerhalb 4s) markierten die Namensgeber der „Mikrofluidik PET“ Gillies *et al.* auch ein Protein - das Annexin V. Innerhalb von 1 min führte die Radioiodierung im Mikroreaktor zu 40% [^{124}I]Annexin V [162, 163]. Weitere Forschung auf dem Gebiet der PET Mikrofluidik-Reaktionen betreiben u.a. Miller *et al.*, die sich mit der Multiphasen- ^{11}C Carbonylierung in einem Mikroröhrenreaktor beschäftigen [164, 165].

Jedoch muss die Mikrofluidik-Technologie auf dem Gebiet der PET-Radiopharmaka noch etabliert und deren Effektivität hinsichtlich eines Routineeinsatzes bewertet werden. Bis zu diesem Zeitpunkt ist kein Ansatz in der Literatur bekannt, der eine mikrofluide Markierung von Peptiden vornimmt.

Im Rahmen der Dissertation wurde die [^{18}F]SFB-Radiomarkierung des Phosphopeptid-sC18 **2-CPP1** und des Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7 **2-CPP2** mit Hilfe des Advion NanoTek Mikrofluidik-Systems untersucht. Das vollautomatisierte und ferngesteuerte Advion-Synthesystem besitzt 3 Spritzenpumpen, die die Lösungen in den Quarz-Mikroreaktor befördern. Abb. 36 zeigt das Advion-Mikrofluidik-System und die Bestückung des Systems für die Peptidradiomarkierung mit [^{18}F]SFB.

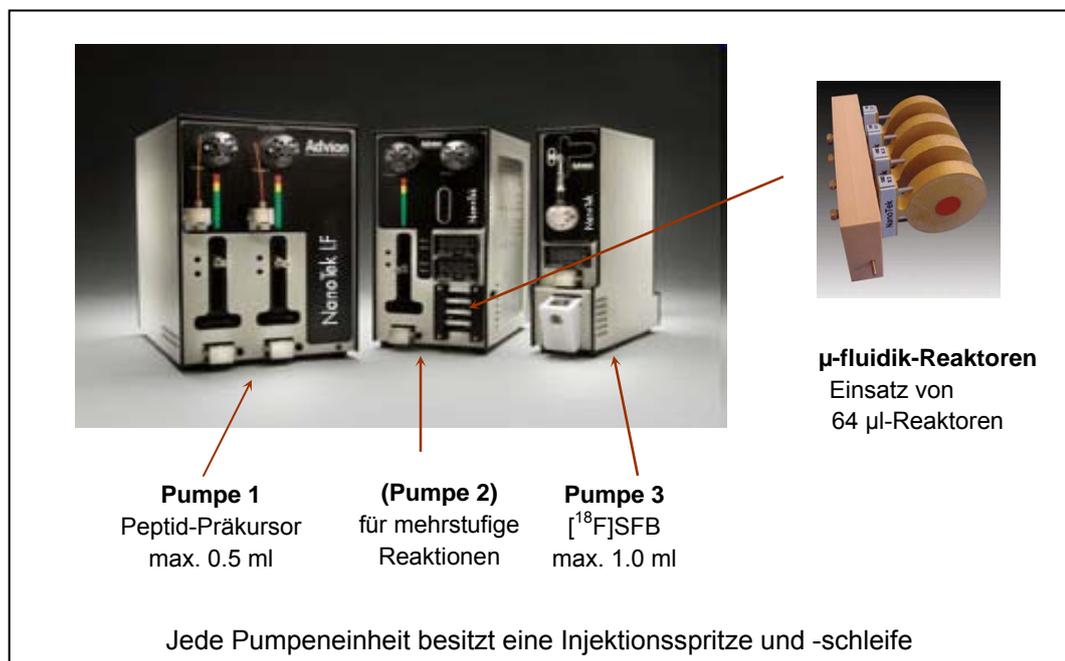


Abb. 36: Das Advion Nano-Tek LF-System und Zuordnung für die [^{18}F]SFB-Peptidmarkierung

Erste Versuche wurden mit dem Phosphopeptid-CPP-Konjugat **2-CPP2** durchgeführt. Dazu wird die Spritze der Pumpe 1 mit einer Lösung aus 0,8 mg **2-CPP2** in 500 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9) befüllt. In Spritzenpumpe 3 werden 100-200 MBq des ¹⁸F-Markierungsagens [¹⁸F]SFB in 500 µl MeCN vorgelegt, welches für alle folgenden Reaktionen im Volumen von je 15 µl eingesetzt wird. Die Lösungen werden dann hydrodynamisch bei einer Flussrate von 4 µl/min bzw. 10 µl/min durch den 64 µl Reaktor gepumpt. Des Weiteren werden der Einfluss der Temperatur und der Peptidkonzentration untersucht. Die Auswertung der Mikrofluidik-Reaktionen wurde mittels HPLC vorgenommen. Tabelle 8 fasst ausgewählte Optimierungsreaktionen und ihre Resultate zusammen.

Wie eindeutig aus Tabelle 8 hervorgeht, sind bei minimaler Flussrate von 4 µl/min, einem Peptid- zu [¹⁸F]SFB-Volumen-Verhältnis von 1 und einer Temperatur von 40°C bzw. 60°C nur 10% bzw. 17% des N-terminal ¹⁸F-fluorbenzoylierten **2-CPP2** im Reaktionsgemisch mittels HPLC bestimmt wurden. Während eine Verdoppelung der Peptidkonzentration bei 40°C und gleicher Flussrate bereits eine enorme Steigerung des Anteils an [¹⁸F]**2-CPP4** auf 54% zur Folge hat, führt eine erhöhte Flussrate von 10 µl/min und damit eine Verringerung der Reaktionszeit um mehr als 5 min zu keiner Änderung des Markierungsergebnisses. Eine Erhöhung der Temperatur auf 60°C bei 4 µl/min Flussrate ergibt den höchsten Anteil des Peptides [¹⁸F]**2-CPP4** von 63% im Reaktionsgemisch.

Tabelle 8: *Reaktionsbedingungen und Ergebnisse der mikrofluidik-gestützten [¹⁸F]SFB-Markierung des Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7-Konjugates **2-CPP2** (0,8 mg in 500 µl 0,05 M Na₂HPO₄, pH 9) - Die angegebene Reaktionszeit involviert die Injektion in den Reaktor, die Synthesezeit, sowie das Entleeren des Reaktionsgemisches aus dem Reaktor und Reinigung des Reaktors (P – Pumpe)*

Reaktion	Volumen P3 ([¹⁸ F]SFB)	Temperatur	P1 : P3 (v/v)	Fluss-rate P3	Zeit	Anteil [¹⁸ F] 2-CPP4 im Reaktionsgemisch
1	15 µl	40°C	1	4 µl/min	14,4 min	10%
2	15 µl	40°C	2	4 µl/min	11,8 min	54%
3	15 µl	40°C	2	10 µl/min	6,4 min	54%
4	15 µl	60°C	1	4 µl/min	14,4 min	17%
5	15 µl	60°C	2	4 µl/min	11,8 min	63%

Die optimierten Reaktionsparameter (Tab. 8, Reaktion 5) werden im Folgenden für die Durchführung eines Ansatzes auf hohem Aktivitätsniveau genutzt, um das Peptid-Konjugat [^{18}F]2-CPP4 für anschließende radiopharmakologische Untersuchungen zu isolieren. Dazu wurden 158 μl [^{18}F]SFB in MeCN (98 MBq) eingesetzt und mit dem doppelten Volumen an 2-CPP2 (0,8 mg/500 μl Na_2HPO_4 -Puffer), was einer Gesamtpeptidmenge von 0,5 mg entspricht, im Reaktor für 47 min zur Reaktion gebracht. In Abb. 37 ist das HPLC-Chromatogramm des Reaktionsgemisches aufgeführt.

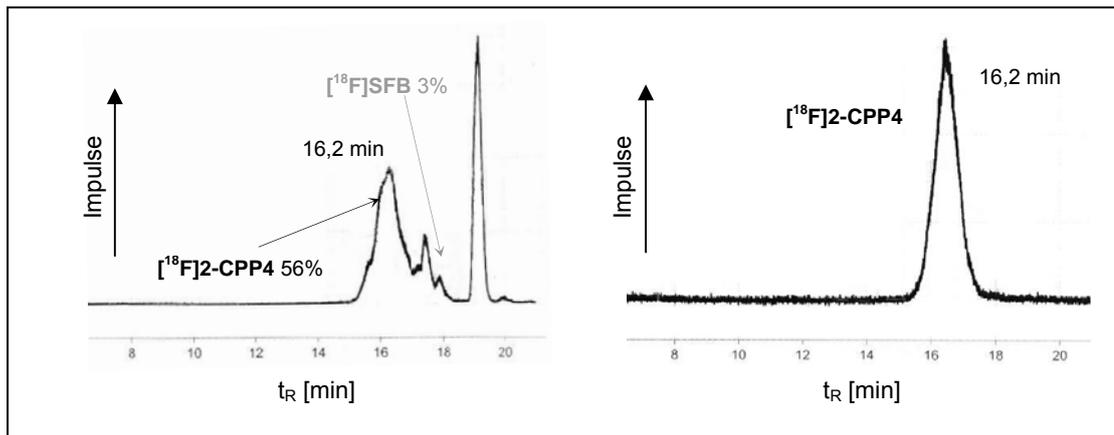


Abb. 37: HPLC-Radiochromatogramm des Reaktionsgemisches einer [^{18}F]SFB-Markierung des Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7-Konjugates 2-CPP2 zu [^{18}F]2-CPP4 im Mikrofluidiksystem bei 60°C und einem Peptid/[^{18}F]SFB-Volumen-Verhältnis von 2 (links), sowie reines [^{18}F]2-CPP4 (rechts)

Die HPLC-Trennung zeigt bei 16,2 min den [^{18}F]2-CPP4-Peak, der im Vergleich zur konventionellen Markierung gut fraktionierbar ist. Der Anteil des radiomarkierten Peptides [^{18}F]2-CPP4 im Reaktionsgemisch liegt bei 56% und damit im Bereich der Umsetzung der analytischen Reaktion. Nach Trennung von 41 MBq des Reaktionsgemisches konnten 12 MBq [^{18}F]2-CPP4 fraktioniert und nach Entfernen des HPLC-Laufmittels am Rotationsverdampfer 9 MBq isoliert werden. Die radiochemische Ausbeute beträgt 26%.

Auch das Phosphopeptid-sC18-Konjugat 2-CPP1 wurde mit Hilfe des Mikrofluidiksystems ^{18}F -fluorbenzoyliert. Dazu wurden analytische Reaktionen in Anlehnung an die optimalen Reaktionsbedingungen für die [^{18}F]SFB-Markierung von 2-CPP2 durchgeführt. Abb. 38 (links) zeigt das HPLC-Radiochromatogramm der Reaktion bei 60°C, 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ Flussrate und einem Peptid- zu [^{18}F]SFB-Volumen-Verhältnis von 2.

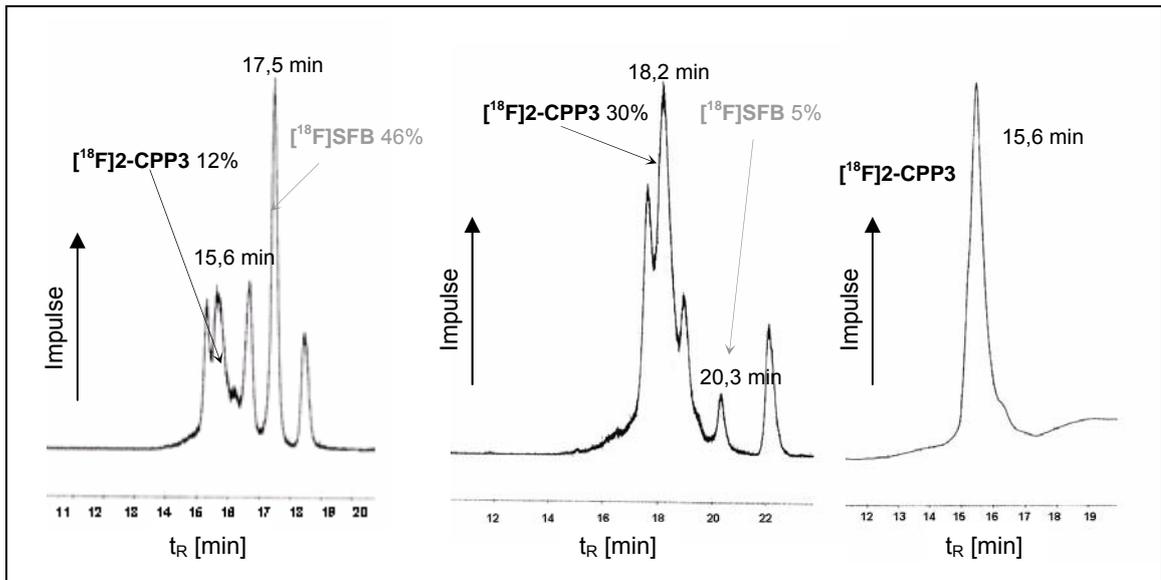


Abb. 38: HPLC-Radiochromatogramm der $[^{18}\text{F}]$ SFB-Markierung des Phosphopeptid-sC18-Konjugates **2-CPP1** zu $[^{18}\text{F}]$ **2-CPP3** im Mikrofluidiksystem bei 60°C und einem Peptid/ $[^{18}\text{F}]$ SFB-Volumen-Verhältnis von 2 (links), sowie nach Optimierung (Mitte) und isoliertes $[^{18}\text{F}]$ **2-CPP3** (rechts)
(Für das HPLC-Chromatogramm in der Mitte wurden hinsichtlich des Gradienten geänderte Bedingungen eingesetzt: R_T ($[^{18}\text{F}]$ **2-CPP3**) = 18,2 min. R_T ($[^{18}\text{F}]$ SFB) = 20,3 min)

Unter den gegebenen Bedingungen entstehen 12% $[^{18}\text{F}]$ **2-CPP3**, das einen Doppelpack mit einem hydrophileren Produkt (6%) bildet. Zudem bleiben 46% $[^{18}\text{F}]$ SFB unverbraucht. Demzufolge ist Geschwindigkeit dieser Reaktion zu gering. Diese Erkenntnis wird nun bei der Ermittlung optimaler Markierungsbedingungen mit einbezogen. So wurde einerseits eine Temperaturverringerung auf 40°C vorgenommen, um zusätzlich den Zersetzungsprozess des $[^{18}\text{F}]$ SFB einzudämmen, denn dieser ist bei einer langsameren Reaktion signifikant. Des Weiteren wurde eine Optimierung hinsichtlich der Reaktionszeit vorgenommen, die durch die Länge des Reaktors beeinflusst werden kann. Es wurde deshalb ein $64\ \mu\text{l}$ Reaktor mit einem $32\ \mu\text{l}$ Reaktor über eine $20\ \mu\text{l}$ -Verbindung gekoppelt (Abb. 38, Mitte). Damit kann eine Steigerung des Anteils an $[^{18}\text{F}]$ **2-CPP3** auf 30% im Reaktionsgemisch erreicht werden, wobei nur noch 5% $[^{18}\text{F}]$ SFB zurück bleiben. Die ferner optimierten HPLC-Bedingungen führen zu einer besseren Fraktionierung des $[^{18}\text{F}]$ **2-CPP3**-Peaks von der hydrophileren Verbindung. Zudem wurde die Peptidkonzentration auf $5,7\ \text{mg}/600\ \mu\text{l}$ Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9) und damit einem Gesamtpeptidverbrauch von $3,2\ \text{mg}$ drastisch

angehoben. So können ausgehend von 340 MBq [^{18}F]SFB in 170 μl MeCN in einer Gesamtzeit von 100 min 35 MBq [^{18}F]2-CPP3 isoliert werden. Die Markierung verläuft demzufolge mit 21% radiochemischer Ausbeute und entsprechender radiochemischer Reinheit >95%, wie Abb. 38 (rechts) veranschaulicht.

3.3.2.4 Radiopharmakologische Untersuchungen

3.3.2.4.1 *In vitro* Zellaufnahme der Phosphopeptid-CPP-Konjugate

Die ^{18}F -fluorbenzoylierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate [^{18}F]2-CPP3 und [^{18}F]2-CPP4 werden bezüglich ihrer Zellaufnahme an drei verschiedenen Tumorzelllinien, HT-29, FaDu und MCF-7, getestet.

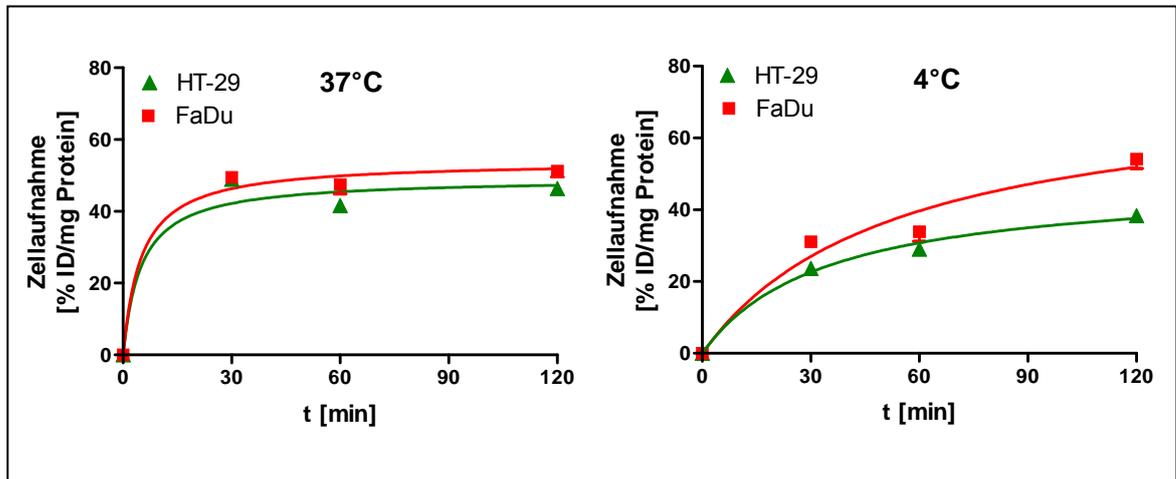


Abb. 39: *In vitro* Zellaufnahme des Phosphopeptid-sC18-Konjugates [^{18}F]2-CPP3 in HT-29 (grün) und FaDu (rot) Zellen bei 37°C (links) und 4°C (rechts), MW \pm SD (n = 8)

Abb. 39 veranschaulicht die Zellinternalisierung des Phosphopeptid-sC18-Konjugates [^{18}F]2-CPP3 in HT-29 und FaDu Zellen über einen Zeitraum von 120 min. Es wird deutlich, dass nach 30 min das Maximum der Zellaufnahme, welches sich um 50% ID/mg Protein bewegt und sich über den untersuchten Zeitraum wie ein Plateau erstreckt, erreicht ist. FaDu Zellen internalisieren dabei geringfügig besser als HT-29 Zellen. Die Zellaufnahme bei 4°C (Abb. 39 rechts) ist geringer als bei 37°C, was für einen energieabhängigen Prozess spricht.

Zudem wurde das Konjugat [^{18}F]2-CPP3 in MCF-7 Zellen getestet und mit der Zellaufnahme des Radiopharmakons [^{18}F]FDG verglichen. Die Untersuchung der [^{18}F]FDG-Internalisierung wurde dabei in Anwesenheit von 5 mM Glucose in

Anlehnung an physiologische Bedingungen vorgenommen. Die Ergebnisse der Studie sind in Abb. 40 dargestellt.

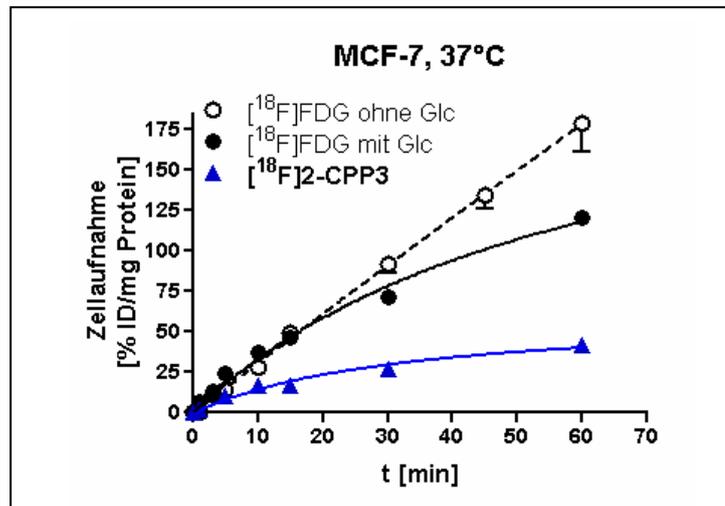


Abb. 40: *In vitro* Zellaufnahme des Phosphopeptid-sC18-Konjugates [¹⁸F]2-CPP3 (blau) im Vergleich zur [¹⁸F]FDG-Zellaufnahme (schwarz) in Abwesenheit von Glucose und unter physiologischen Bedingungen (in Anwesenheit von 5 mM Glucose) in MCF-7 Zellen bei 37°C, MW ± SD (n = 3 für [¹⁸F]2-CPP3), (n = 6 für [¹⁸F]FDG))

Die Internalisierung von [¹⁸F]2-CPP3 in MCF-7 Zellen entspricht der Zellaufnahme in HT-29 und FaDu Zellen. Dabei wurden engere Zeitintervalle am Anfang des Zeitrahmens der Messung gewählt, um eine Beurteilung des initialen Verlaufs der Zellaufnahme zu ermöglichen. Für [¹⁸F]2-CPP3 ist bis zu 60 min eine Zellaufnahme zu verzeichnen, was in einem Maximum von 41% resultiert. Danach erfolgt eine Abnahme der Internalisierung. Die Zellaufnahme des Phosphopeptides durch das Vehikel sC18 liegt im Bereich der [¹⁸F]FDG-Internalisierung in MCF-7 Zellen.

Die Zellaufnahme des Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7-Konjugates [¹⁸F]2-CPP4 in HT-29, FaDu und MCF-7 Zellen bei 37°C und 4°C lässt sich in Abb. 41 verfolgen. Es wird ein deutlicher Anstieg der Zellaufnahme bis hin zu 15 min verzeichnet, der im Weiteren Zeitverlauf wiederum in ein Plateau mündet. Die Internalisierung ist in allen drei Zelllinien vergleichbar. Die größten Unterschiede sind nach 30 min erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt internalisieren MCF-7 mit 55% ID/mg Protein wenig besser als HT-29 mit 42% und FaDu mit 34%.

Die Werte der Zellaufnahme bei 4°C liegen hauptsächlich unterhalb deren bei 37°C. Allerdings zeigen MCF-7 Zellen nach 30 min eine signifikant erhöhte Aufnahme von [¹⁸F]2-CPP4 (60 min: 49% zu 73%, 90 min: 52% zu 77%).

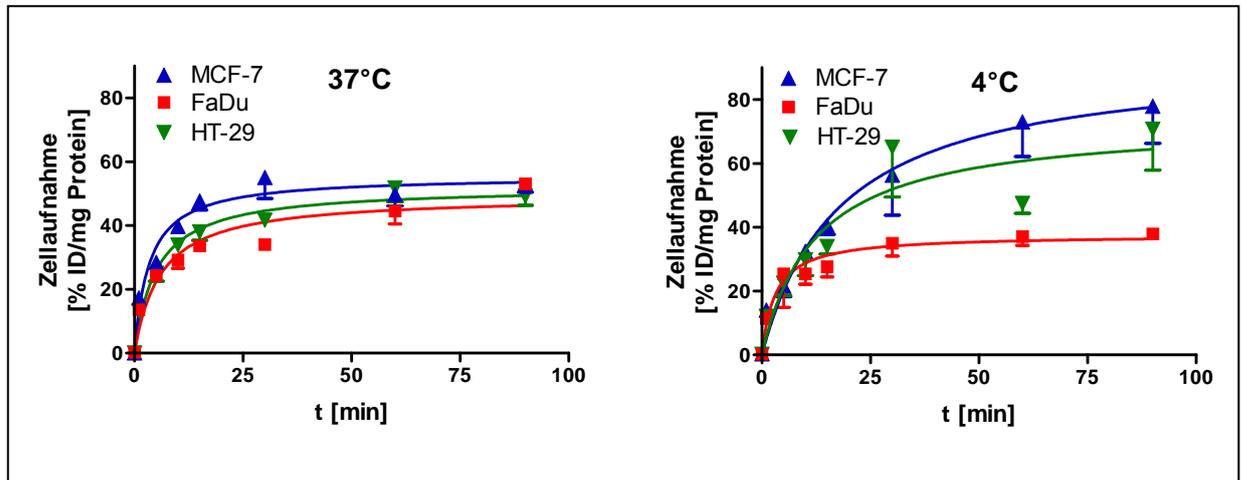


Abb. 41: *In vitro* Zellaufnahme des Phosphopeptid-hCT(18-32)-k7-Konjugates [¹⁸F]2-CPP4 in MCF-7 (blau), HT-29 (grün) und FaDu (rot) Zellen bei 37°C (links) und 4°C (rechts), MW ± SD (n = 4)

3.3.2.4.2 Kleintier-PET-Untersuchung der Phosphopeptid-CPP-Konjugate

Mittels Kleintier-PET-Untersuchung wird die Bioverteilung der ¹⁸F-fluorbenzoylierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate [¹⁸F]2-CPP3 und [¹⁸F]2-CPP4 *in vivo* studiert. Für die Untersuchung der ¹⁸F-markierten Peptide werden Balb/C-Mäuse (Normaltiere) verwendet.

Die typischen Kleintier-PET-Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion des jeweiligen Radiopeptides in Abb. 42 zeigen wiederum die typische *in vivo*-Bioverteilung eines radiomarkierten Peptides bzw. seiner Metaboliten.

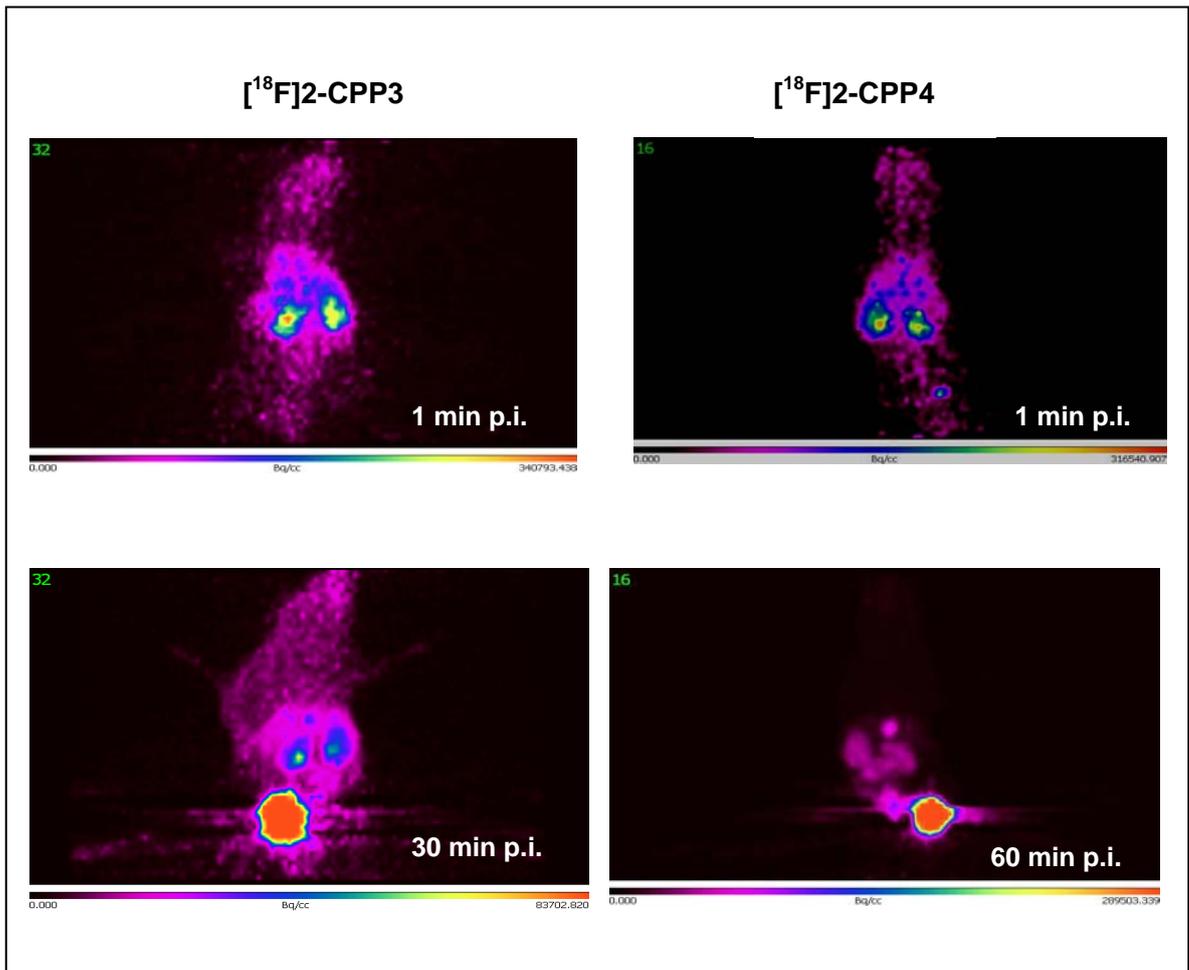


Abb. 42: Typische koronale Kleintier-PET-Aufnahmen einer Balb/C-Maus 1 min und 30 min nach Injektion von [^{18}F]FBz-MQSpTPL-sC18 [^{18}F]2-CPP3 (links) bzw. 1 min und 60 min nach Injektion von [^{18}F]FBz-MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 [^{18}F]2-CPP4 (rechts)

Nach dem Transport über den Blutstrom zeigen sich schon 1 min p.i. deutlich erhöhte Aktivitätskonzentrationen in den Nieren. Die PET-Aufnahmen zum späteren Zeitpunkt lassen eine signifikante Akkumulation der Aktivität in der Blase erkennen. Die Ausscheidung der Peptide erfolgt renal sehr schnell. Es sind keine weiteren Anreicherungen in Geweben detektierbar. Zudem ist kein Transport der CPP-gekoppelten Phosphopeptide [^{18}F]2-CPP3 und [^{18}F]2-CPP4 durch die Blut-Hirn-Schranke ersichtlich.

Die zugehörigen Zeit-Aktivitätskurven in Abb. 43 bestätigen die Aussagen der PET-Aufnahmen. Die Peptide werden extrem schnell aus dem Blut entfernt, gelangen in den ersten Minuten in die Nieren, wo eine langsamere Elimination stattfindet. Die renale Exkretion erfolgt bei Peptid [^{18}F]2-CPP4 langsamer.

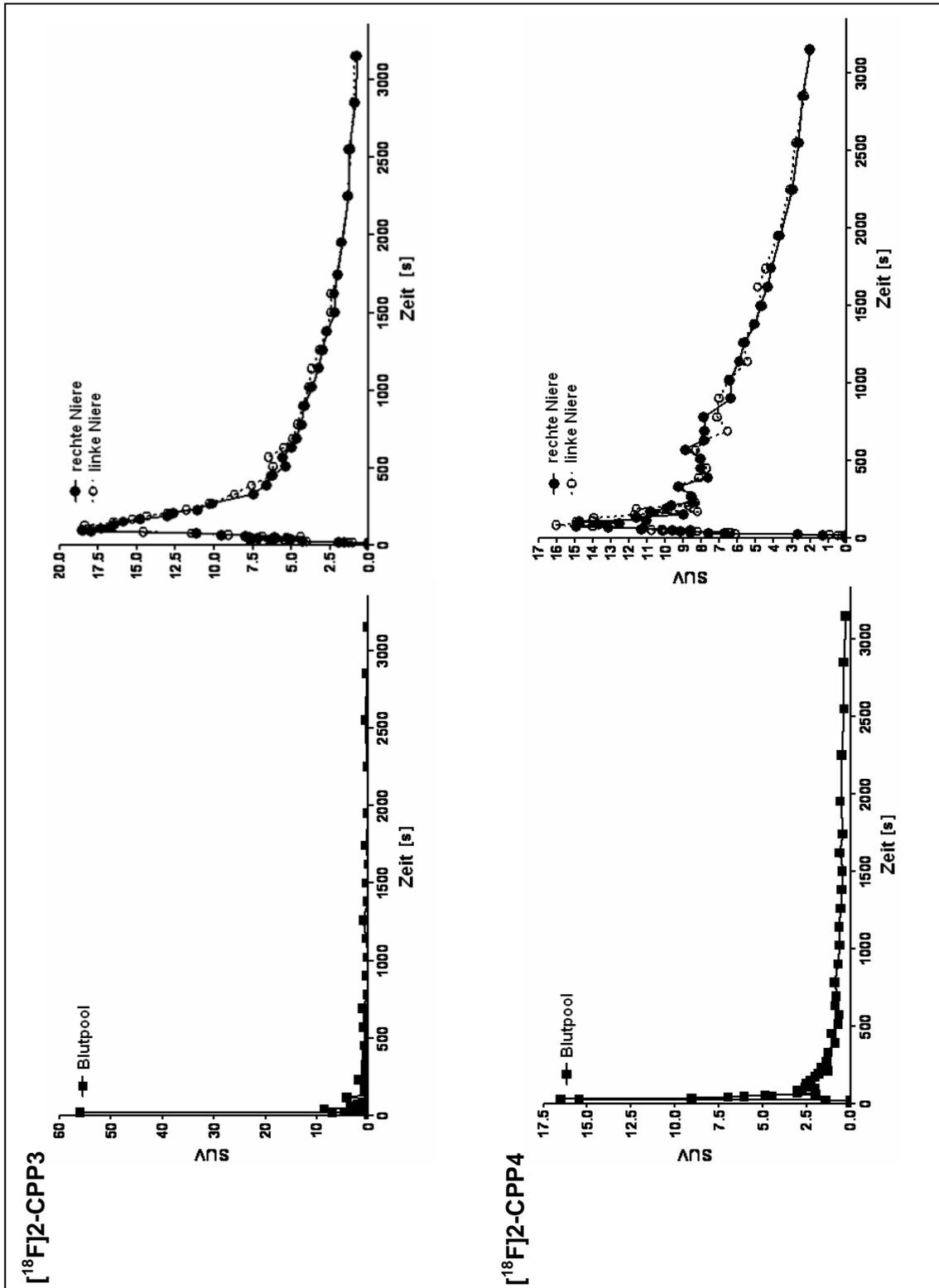


Abb. 43: Zeit-Aktivitätskurven, die die Kinetik der Radiotracer $[^{18}\text{F}]2\text{-CPP3}$ (oben) und $[^{18}\text{F}]2\text{-CPP4}$ (unten) in Blutpool und Nieren wiedergeben. Generation aus dynamischer Kleintier-PET-Studie 60 min p.i. durch Festlegung und Kalkulation von ROIs (region of interest) über das Herz (kardialer Blutpool) und Nieren

4. Diskussion und Schlussfolgerung

Während der letzten zwei Jahrzehnten wurden zahlreiche radiomarkierte Peptide für das Peptidrezeptortargeting im Rahmen der Tumordiagnose und –therapie entwickelt und bewertet [8]. Unter diesen regulatorischen Peptiden mit vorwiegend neuroendokrinem Ursprung sind bisher keine radiomarkierten Phosphopeptide für die Anwendung in der molekularen Bildgebung bekannt.

Das Anliegen dieser Arbeit ist es, die Synthese und Markierung von Phosphopeptiden mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Fluor-18 zu etablieren und diese hinsichtlich ihrer radiopharmakologischen Eigenschaften zu charakterisieren. Phosphopeptidliganden der kürzlich identifizierten Polo-Box-Domäne (PBD) als Phosphopeptid-bindende Proteindomäne der Zellzykluskinase Plk1 wurden für diese Arbeit als Model ausgewählt [89]. Dazu stand ein Repertoire verschiedenster Methoden zur Verfügung, die molekulare Bildgebung mittels Kleintier-PET, wie auch optische Bildgebung und die Radiomarkierung mittels klassischer und Mikrofluidik-Technik beinhalten.

4.1 Synthese, Radiomarkierung und radiopharmakologische Charakterisierung Plk1-PBD-gerichteter Phosphopeptide

Zunächst wurden Plk1-PBD-gerichtete Phosphopeptide auf Basis einer Ser-pThr Kernsequenz mittels der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) in der orthogonalen Fmoc-Schutzgruppenstrategie synthetisiert. Um die Inkorporation des Phosphatrestes zu erreichen, wird mit dem Synthon-basierten Ansatz als Methode der Wahl gearbeitet. Dazu wird das kommerziell erhältliche Fmoc-geschützte monobenzylierte pThr-Derivat als Aminosäure-Baustein verwendet, der vollkompatibel mit den Fmoc-SPPS Synthesebedingungen ist. Alternative dialkylierte bzw. diarylierte Phosphothreonin-Bausteine besitzen den Nachteil einer Empfindlichkeit gegenüber der typischen Piperidineinwirkung für die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe während der Synthese, die zur β -Eliminierung und damit dem Verlust der Phosphatfunktionalität führt, wie in Abb. 44 aufgeführt.

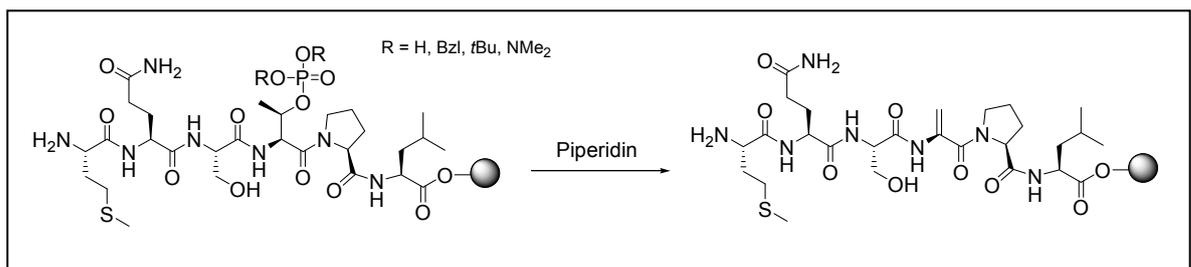


Abb. 44: β -Eliminierung pThr-haltiger Peptide

Die Aktivierung und Kupplung der Aminosäuren zur Generierung der Peptidbindung im Rahmen der SPPS gelingt mit dem uroniumbasierten Reagenz HBTU/HOBt/DIPEA. Zusätzlich führt der Einsatz eines größeren Überschusses an DIPEA bei der Darstellung von Phosphopeptiden, was in einem Mol-Verhältnis von 5 äq. Fmoc-Aminosäure zu 5 äq. HBTU zu 5 äq. HOBt zu 15 äq. DIPEA ausgedrückt wird, im Vergleich zu unmodifizierten Peptiden mit 10 äq. DIPEA, zu einer Kompensation der phosphatbedingten Neutralisation der Base. Durch diese von Perich *et al.* vorgeschlagenen Kupplungsbedingungen, die der Optimierung jener Kupplungsreaktion an monobenzyltem pSer, pThr und pTyr entstammen [64], lässt sich eine erfolgreiche Kupplung des sterisch anspruchsvollen monobenzyl-geschützten Fmoc-pThr realisieren. Demzufolge finden Perichs Ergebnisse hier Bestätigung. Für die saure Abspaltung der Peptide vom Harz und der zugehörigen Entschützung der Aminosäureseitenketten zeigte sich eine modifizierte Form des Reagenz K nach King *et al.* [166] ohne Phenol mit der Zusammensetzung TFA/Wasser/Thioanisol/EDT (87:5:5:3) besonders geeignet, um den Verunreinigungsgrad im Rohpeptid zu verringern und nach 4 h Inkubation ein benzylentschütztes Phosphopeptid zu erhalten. Die Phosphopeptide **1** und **2** können in Ausbeuten von 42% bzw. 86% synthetisiert werden. Vergleichbare Ausbeuten liefern deren nicht-phosphorylierte Analoga **Dephospho-1** und **Dephospho-2** mit 49% bzw. 86%. Auffällig ist der Ausbeuteabfall bei den beiden Heptapeptiden **1** und **Dephospho-1**, dessen Ursache in der N-terminalen Kupplung des anspruchsvollen Pro-Restes zu suchen ist. Mit der Etablierung der 4-Fluorbenzoesäure als Baustein für die Peptidsynthese der Referenzpeptide **3**, **4** und **Dephospho-4** werden ausreichende Ausbeuten von 41-51% erreicht. Damit konnte eine Methode für die einfache und zuverlässige Synthese von Phosphopeptiden gefunden werden.

Das PBD-affine Heptaphosphopeptid PMQSpTPL **1** und besonders das Hexaphosphopeptid MQSpTPL **2** wurden zur Entwicklung einer adäquaten Markierungsstrategie mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Fluor-18 ausgewählt. Die Radiomarkierung wurde mit dem bifunktionellen Markierungsagenz *N*-Succinimidyl-4-¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) am *N*-Terminus der Peptide vorgenommen. Das Acylierungsreagenz [¹⁸F]SFB ist inmitten der Vielzahl an bekannten prosthetischen Gruppen für die ¹⁸F-Radiomarkierung besonders für den Einbau von Fluor-18 unter physiologischen Bedingungen, aufgrund der Erhaltung der funktionellen und strukturellen Gegebenheiten von Peptiden oder Proteinen, geeignet. Zudem steht eine im FZD erarbeitete, zuverlässige und vollautomatisierte Synthese des Bolton-Hunter-Derivates zur Verfügung. Bisher wurden eine Vielzahl von Biomolekülen und vor allem Peptide mit [¹⁸F]SFB markiert [138, 139, 167-169].

Die erfolgreiche ^{18}F -Fluorbenzoylierung des optimalen Phosphopeptides PMQSpTPL **1** mit einer Ausbeute von 16% innerhalb von 20 min unter Standardbedingungen, d.h. in Kolthoff KH_2PO_4 -Borat-Puffer (pH 8,4) bei 40°C , beweist, dass ^{18}F SFB als Markierungsagens primärer Aminogruppen durchaus in der Lage ist, auch an der sekundären Aminofunktion des Prolins zu acylieren. Die ^{18}F SFB-Markierung des Phosphopeptides **2**, wobei der ^{18}F Fluorbenzoylrest das *N*-terminale Pro imitieren kann, sowie seines nicht-phosphorylierten Analogons **Dephospho-2** zeigt eine eindeutige pH-Abhängigkeit. Überraschenderweise ergeben sich in Boratpuffer (pH 7,6 und 8,4), ein Reaktionsmedium, was für ^{18}F SFB-Peptid-Markierungen üblicherweise verwendet wird [138], nur geringe Anteile an ^{18}F FBz-MQSpTPL **[^{18}F]4** bzw. ^{18}F FBz-MQSTPL **[^{18}F]Dephospho-4** von $\leq 12\%$ im Reaktionsgemisch. Die Durchführung der Reaktionen in reinem Phosphatpuffer (0,05 M Na_2HPO_4 -Puffer, pH 9) bei 40°C über 30 min führt hingegen zu besseren Markierungsergebnissen von 15% für **[^{18}F]4** und 19% für **[^{18}F]Dephospho-4**, wobei das Phosphopeptid sich ähnlich gut wie das nicht-phosphorylierte Peptid markieren lässt. Für das Phosphopeptid wird über einen Zeitraum von 120 min bei pH 9,0 keine Zersetzung detektiert; so tritt auch keine Abspaltung der Phosphatgruppe ein.

Die Anwendung dieser optimierten Bedingungen auf hohem Aktivitätsniveau ermöglicht eine reproduzierbare Synthese der Peptide ^{18}F FBz-MQSpTPL **[^{18}F]4** bzw. ^{18}F FBz-MQSTPL **[^{18}F]Dephospho-4** in ausreichenden Ausbeuten von 25-28% bzw. 18-33% bezogen auf das eingesetzte ^{18}F SFB. Der Einsatz höherer ^{18}F -Aktivitätsmengen, die mit einer höheren ^{18}F SFB-Konzentration verbunden sind, aber auch eines reduzierten Volumens von 50 μl bzw. 70 μl ^{18}F SFB in MeCN für die Markierungsreaktion führt sogar zu einer weiteren Steigerung des Anteils des Phosphopeptides **[^{18}F]4** im Reaktionsgemisch auf 35-52%. Die Syntheszeit beträgt 140-170 min nach Beginn der Synthese (begin of synthesis, BOS) inklusive ^{18}F SFB-Produktion, Peptidmarkierung, HPLC-Reinigung und Entfernen des Laufmittels im Vakuum. Die Optimierung involviert ebenso die wünschenswerte Verwendung von geringen Peptidmengen von 0,5 mg **2** bzw. 0,7 mg **Dephospho-2**. Neben der hohen radiochemischen Reinheit von $>97\%$, werden die ^{18}F -markierten Peptide mit einer spezifischen Aktivität von 20-40 GBq/ μmol synthetisiert, was einer Gesamtpeptidmenge von 10-12 μg **2** bzw. **Dephospho-2** entspricht.

Im Folgenden wurde das Hexaphosphopeptid ^{18}F FBz-MQSpTPL **[^{18}F]4** einer radiopharmakologischen Charakterisierung unterzogen. Vergleichend dazu wird sein nicht-phosphoryliertes Analog ^{18}F FBz-MQSTPL **[^{18}F]Dephospho-4** mit einbezogen. Einleitend wurden Studien zur Zellaufnahme der beiden ^{18}F -markierten Peptide

durchgeführt. Beide Radiopeptide weisen eine äußerst geringe Internalisierung in die humane kolorektale Adenomkarzinomzelllinie HT-29 und das humane Plattenepithelkarzinom FaDu bei 37°C und 4°C über den untersuchten Zeitraum von 120 min auf. Dabei zeigt das nicht-phosphorylierte Peptid [¹⁸F]Dephospho-4 eine etwas höhere Aufnahme in beiden Zelllinien im Vergleich zum negativ-geladenen Phosphopeptid [¹⁸F]4, welches zu weniger als 0,6% der injizierten Dosis pro mg Protein aufgenommen wird. Vergleichsweise dazu erfährt [¹⁸F]FDG als ein Radiotracer, der besonders gut internalisiert wird, nach Oswald *et al.* eine Zellaufnahme von ca. 300% ID/mg Protein bzw. ca. 500% ID/mg Protein nach 60 min in HT-29 bzw. FaDu Zellen in Abwesenheit von Glucose [170].

Die Anwendung radiomarkierter Peptide für die molekulare Bildgebung hängt entscheidend von ihrer metabolischen Stabilität ab. Stabilitätsuntersuchungen des ¹⁸F-markierten Phosphopeptides [¹⁸F]4 ergaben vergleichsweise zu seinem Analogon [¹⁸F]Dephospho-4 *in vitro* und *in vivo* eine signifikant höhere metabolische Stabilität für das Phosphopeptid. Die Unterschiede in der metabolischen Stabilität werden besonders *in vivo* deutlich. So lassen sich noch mehr als 50% intaktes Phosphopeptid [¹⁸F]4 im Rattenblut 60 min nach Radiopeptidinjektion HPLC-analytisch detektieren, wohingegen schon 10 min nach Administration des nicht-phosphorylierten Peptides weniger als 10% [¹⁸F]Dephospho-4 intakt sind. Im Vergleich zu bekannten ¹⁸F-markierten, unstabilierten Peptiden, wie Neurotensin [139], besitzt das Phosphopeptid MQSpTPL [¹⁸F]4 außerordentliche Stabilität. Nach bestem Wissen existiert bisher keine Literatur zu *in vivo* Studien von Phosphopeptiden. Jedoch führten Hoffmann *et al.* Studien zur *in vitro* Stabilität verschiedener Phosphopeptide in verdünntem humanem Serum durch [67]. Es wurde gezeigt, dass nicht-phosphorylierte, synthetische Peptidsequenzen des humanen τ -Proteins aus gepaarten helikalen Filamenten der Proteinablagerungen im Alzheimer-erkrankten Gehirn anfälliger gegenüber proteolytischem Abbau sind als ihre entsprechenden mono- und diphosphorylierten Peptide, die erhöhte Serumstabilität aufweisen. Zudem begünstigt die Position der phosphorylierten Aminosäure in der Peptidsequenz, nämlich nahe zum N-terminalen Ende sowie benachbart zu einem Prolinrest, die Stabilität im Serum. Damit steht das ¹⁸F-fluorbenzoylierte Plk1-PBD-Phosphopeptid [¹⁸F]4, sowie die gefundenen Resultate zur Stabilität *in vitro* und *in vivo* in Einklang mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe um Hoffmann. Zum genauen metabolischen Schicksal des Phosphopeptides [¹⁸F]4 können bis jetzt noch keine Aussagen getroffen werden.

Die radiopharmakologische Bewertung zur qualitativen *in vivo* Bioverteilung der beiden Radiopeptide wurde anhand von Kleintier-PET-Studien in gesunden Ratten vorgenommen. Beide Peptide [¹⁸F]4 und [¹⁸F]Dephospho-4 weisen die typische Bioverteilung von radiomarkierten Peptiden auf [139, 171]. Zu Beginn erfolgt ein schneller Transport mit dem Blutstrom; über den gesamten Zeitraum sind keine Gewebeanreicherungen erkennbar. Ebenso ist eine rasche renale Elimination der beiden Radiopeptide als Kennzeichen ihrer Hydrophilie und Größe charakteristisch. Die Zeit-Aktivitätskurven von Blut und Nieren bestätigen diese Erkenntnis. Es zeigt sich ein starker Anstieg der Aktivität im Blut in den ersten Sekunden, der sofort wieder abnimmt, womit die Blutclearance einsetzt, wobei das Phosphopeptid aufgrund seiner negativ geladenen Phosphatspezies schneller aus dem Blut entfernt wird. Bei der Ausscheidung der beiden Radiopeptide über die Nieren werden Unterschiede deutlich. Das Phosphopeptid erfährt nach einer Akkumulation der ¹⁸F-Aktivitätskonzentration eine langsame Eliminierung, was mit der erhöhten metabolischen Stabilität konform geht. Das metabolisch instabile, nicht-phosphorylierte Peptid wird hingegen in den Nieren angereichert. Die quantitative Bioverteilung an Wistar-Unilever-Ratten spiegelt diese Erkenntnisse wider. Es werden hohe Aktivitätskonzentrationen in den Nieren gefunden; ein weiterer Anteil fällt im Gastrointestinaltrakt auf, was auf eine biliäre Elimination schließen lässt. Die Elimination über den Darm im Rahmen der Bioverteilung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Kleintier-PET-Studie. Doch wie aus den standardisierten Aktivitätskonzentrationen abzulesen ist, besteht der Hauptweg der Eliminierung in der renalen Exkretion. Ferner können beide Peptide die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren.

4.2 Möglichkeiten einer Internalisierung von Phosphopeptiden

Die experimentell bestätigte, schlechte Zellaufnahme des Phosphopeptides MQSpTPL 2 bildet die Grundlage für die im nächsten Teil der Dissertation folgenden Strategien zum Erreichen einer verbesserten Internalisierung am Beispiel des Hexaphosphopeptides MQSpTPL 2. Dies stellt eine wesentliche Voraussetzung für ein intrazelluläres Targeting von Phosphopeptiden da.

Rezeptor-vermittelte Zellaufnahme

Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugate

Die Grundidee dieses Kapitels ist der Ansatz zur Internalisierung von Phosphopeptiden unter Verwendung eines charakterisierten Peptidrezeptorsystems. Dabei verkörpert das Neuropeptidhormon Neurotensin, dessen intrazelluläre Aufnahme über den G-Protein-gekoppelten Neurotensin-Rezeptor-1 (NTR1) ausgelöst wird [134], ein

potentielles Model. Unter Anwendung des kleinsten an den NTR bindenden NT-Fragmentes, NT(8-13), als molekularen Transporter wurde ein Konjugat mit dem PIK1-PBD-gerichteten Phosphopeptid **2** aufgebaut. Zudem wurde die Synthese von zwei weiteren Konjugaten mit nicht-phosphorylierten Analoga, dem zugehörigen Hexapeptid MQSTPL **Dephospho-2** bzw. dem Heptapeptid PMQSTPL **Dephospho-1** vorgenommen. Die Darstellung der Peptid-Konjugate wird auf Basis der Kupfer(I)-katalysierten Click-Chemie bewerkstelligt. Aufgrund der hohen Reaktivität und Selektivität dieser Kupfer(I)-vermittelten Azid-Alkin-[3+2]Cycloaddition in wässrigem Medium eignet sich diese milde Reaktion ausgezeichnet für die Herstellung der Peptid-Konjugate. Dabei werden die Peptide durch eine stabile Triazolfunktion verknüpft.

Während das NT(8-13)-Peptidfragment *N*-terminal mit einer Alkinfunktion in Form eines 5-Hexinoylrestes versehen wird, erfahren das Phosphopeptid **2** und seine nicht-phosphorylierten Analoga **Dephospho-1** und **Dephospho-2** eine *N*-terminale Azidierung mit einer 5-Azidopentanoyl-Funktion. Diese Funktionalisierungen finden mittels eines Aktivesters, den jeweiligen Succinimidylestern, unter milden Bedingungen in Kolthoff-Puffer (pH 8,4) bei 40°C statt. Mittels semipräparativer HPLC wird das jeweilige gewünschte *N*-terminal funktionalisierte Peptid fraktioniert und durch Lyophilisation isoliert. Allerdings besteht der Nachteil dieser Funktionalisierungen in Lösung in der geringen Regioselektivität, so dass unter gegebenen Reaktionsbedingungen ebenso die Formierung einer Azid- oder Alkinfunktion an weiteren reaktiven Aminogruppen der Peptide ermöglicht wird. Ein alternativer Ansatz, der eine selektive *N*-terminale Funktionalisierung bewerkstelligt, ist der Einsatz der Festphasenpeptidsynthese durch Reaktion am vollständig geschützten Peptidylharz. So konnte kommerziell erhältliche 5-Hexinsäure mittels der Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA automatisiert mit Hilfe des Syntheseroboters *N*-terminal an das Modellpeptid MQSpTPK angeknüpft werden. Unter Einsatz von 10 mg Harz wurde das gewünschte alkinierte Phosphopeptid in 77% Ausbeute isoliert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Synthese des azidierten Phosphopeptides **Azid-2** gelingt mit 66% Ausbeute und lässt sich damit weniger effizient als sein nicht-phosphoryliertes Hexapeptid **Dephospho-2** (82%) azidieren. Offenbar scheint die Phosphatgruppe im Phosphopeptid den Unterschied in den Ausbeuten zu bewirken. Das Heptapeptid **Dephospho-1** kann aufgrund seiner sekundären *N*-terminalen Aminogruppe des Pro-Restes nur mit 63% Ausbeute dargestellt werden und liegt damit im gleichen Bereich wie das Phosphopeptid. Im Vergleich zur *N*-terminalen Azidierung des NT(8-13) mit Succinimidyl-5-azidovalerat, die mit 80% Ausbeute verläuft [147], lässt sich das Alkinderivat des NT(8-13) mit 69% Ausbeute darstellen.

Im nächsten Schritt wird das alkinhaltige NT(8-13) unter den milden Bedingungen der Click-Chemie mit den azidierten Peptiden gekoppelt [147]. Dabei lassen sich die Triazol-verbrückten Konjugate **8** und **9** aus Phosphopeptid bzw. seines nicht-phosphorylierten Analogons mit NT(8-13) nach 48 h Reaktion von je 1 äq. Peptid in Kolthoff-Puffer (pH 8,4) mit katalytischen Mengen Kupfersulfat und einem fünffachen Überschuss des Reduktionsmittels Natriumascorbat bei 40°C, HPLC-Reinigung und Lyophilisation, in ähnlichen Ausbeuten um 30% gewinnen. Das Cycloadditionsprodukt **10** mit dem Pro-haltigen Heptapeptid **Azid-Dephospho-1** hingegen lässt nur eine Ausbeute von 13% zu. Während Ramenda *et al.* die Kupplung eines azidierten NT(8-13) mit einem fluorbenzoyl-haltigen Alkin unter Zuhilfenahme der Click-Chemie in Ausbeuten mit bis zu 70% beschreiben [147], beweist diese Arbeit, dass die Click-Chemie auch auf die erfolgreiche und zuverlässige Kupplung zweier Peptide übertragen werden kann. Alle Click-basierten Konjugate **8-10** besitzen einen freien C-Terminus am NT(8-13)-Fragment, der für die Bindung an den NTR1 zugänglich sein muss. Die Bewertung der Bindungsaffinität dieser Konjugate an den NTR1 wurde anhand eines kompetitiven *in vitro* Bindungsassays unter Verwendung von HT-29 Zellen vorgenommen. Die Konjugate **8-10** zeigen eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Bindung des ³H-markierten Neurotensins, was durch den typischen sigmoidalen Kurvenverlauf angezeigt wird. Im Vergleich zum IC₅₀-Wert des hochaffinen, natürlichen NTR1-Liganden NT(8-13) von 0,4 nM verweisen die bestimmten IC₅₀-Werte des Phosphopeptid-haltigen Konjugates **8** mit 8,33 µM, seines nicht-phosphorylierten Analogons **9** mit 0,75 µM, sowie des nicht-phosphorylierten Konjugates **10** mit 0,15 µM auf eine signifikant, verminderte Affinität der Konjugate zum NTR1. Die äußerst geringe Affinität des Phosphopeptid-Konjugates **8** könnte durch eine mögliche Strukturvariation der sonst linearen Anordnung des Konjugates aufgrund von starken intramolekularen Wechselwirkungen der positiv-geladenen Guanidinfunktionen der Arg-Reste im Neurotensinfragment mit dem negativ-geladenen Phosphatrest des Phosphopeptides verursacht werden. Die ausgedehnte Linkerfunktion zwischen dem NT(8-13) und dem Phosphopeptid lässt so möglicherweise auf Basis der Guanidin-Phosphat-Wechselwirkung eine Anordnung beider Peptidfragmente zu einer Konformation zu, die durch den NTR1 nicht leicht erkannt wird. Beide nicht-phosphorylierten Konjugate **9** und **10** lassen durch ihre kleineren IC₅₀-Werte die Schlussfolgerung auf eine ausgeprägtere lineare Anordnung zu. Gerade das N-terminale Prolin des Heptapeptides in Konjugat **10** spricht aufgrund seines Fünfringsystems für eine starrere Ausrichtung und damit einer besseren Bindungsaffinität, was der geringere IC₅₀-Wert von 0,15 µM beweist. Diese Ergebnisse führen zu dem Fazit, dass der Ansatz einer Internalisierung von Neurotensin-

Phosphopeptid-Konjugaten über die rezeptor-vermittelte Endozytose in dieser Form nicht realisierbar ist. Eine Lösung zu diesem Problem könnte in der Anwendung einer starreren Linkerfunktion zwischen NT(8-13) und dem Phosphopeptid liegen.

Phosphopeptid-Internalisierung mittels CPPs

Einen alternativen Ansatz für die intrazelluläre Phosphopeptid-Internalisierung stellen zellpenetrierende Peptide als molekulare Transporter dar, der im nächsten Kapitel der Dissertation untersucht wurde.

CPP5

Zellpenetrierende Pentapeptide, auch als Bax-Inhibitoren bekannt [125, 126], stellen die derzeit kleinsten CPPs dar und sind aufgrund ihrer einfachen Synthetisierbarkeit und geringen Toxizität attraktiv für die potentielle Internalisierung von Phosphopeptiden. Im Rahmen der Arbeit wurden drei verschiedene CPP5 inklusive ihrer 4-fluorbenzoylierten Referenzpeptide in Hinblick auf eine ^{18}F -Radiomarkierung mit [^{18}F]SFB mittels Fmoc-basierter SPPS untersucht. Das Bax-inhibierende Peptid aus Mäusen VPTLK **11** und die Mutante KLPVM **13** zeigen hinsichtlich ihrer Synthese sehr gute Ausbeuten zwischen 70% und 80%. Das humane CPP5 VPMLK **12** bestehend aus den analogen Aminosäuren wie die Mutante **13** in einer anderen Sequenzabfolge kann die Ausbeute nicht bestätigen. Der Met-Rest in Position 3 stellt die einzige Variation zu dem gut synthetisierbaren VPTLK **11** dar.

Mit der [^{18}F]SFB-Markierung dieser zellpenetrierenden Peptide wurden erstmals radiomarkierte CPP5 geschaffen. Dazu wurden die für das Phosphopeptid optimierten Bedingungen angewandt. In Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9) als Markierungsmedium wird bevorzugt die ϵ - NH_2 -Gruppe der jeweiligen Lysinreste ^{18}F -fluorbenzoyliert, da unter diesen basischen Bedingungen das Deprotonierungsgleichgewicht hin zu einer reaktiven deprotonierten ϵ - NH_2 -Funktion verschoben ist. Während diese ^{18}F -markierten Peptide zu mehr als 37% im Reaktionsgemisch enthalten sind, werden die *N*-terminal-markierten Peptide [^{18}F]**14**-[^{18}F]**16** nur zu 14-26% gebildet. Da die Untersuchungen zur Zellaufnahme hier im Vordergrund stehen, wurde keine weitere Optimierung der Ausbeute der ^{18}F -Radiomarkierung vorgenommen. Das *N*-terminal ^{18}F -fluorbenzoylierte Maus-CPP5 VPTLK [^{18}F]**14** wurde im Folgenden für die Evaluierung einer *in vitro* Zellaufnahme in den Tumorzelllinien HT-29 und FaDu verwendet. Gerade für dieses Peptid wird Proteintransduktionsaktivität beschrieben, wie durch Internalisierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in HeLa-Zellen qualitativ an fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bewiesen wurde [125]. So sollte

die Einführung des weitaus kleineren [¹⁸F]Fluorbenzoylrestes keinen dramatischen Einfluss auf die Zellinternalisierung haben. Die Ergebnisse zeigen jedoch das Gegenteil. In beiden Zelllinien beträgt die Internalisierung bei 37°C und 4°C über 2 h kleiner 1% der injizierten Dosis/mg Protein. Da bei 4°C eine Zellaufnahme bis zu 60 min detektiert wird, kann man von einem energieunabhängigen Prozess sprechen. Auch mit zusätzlichen Waschschrritten mit PBS, Glycinpuffer und Trypsin, die dem Ablösen von Membran-gebundenem ¹⁸F-markierten Peptid dienen sollen, konnte keine effektive *in vitro*-Zellaufnahme nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung zeigt die Betrachtung der Konzentrationsunterschiede zwischen der fluoreszenzbasierten Methode und dem Einsatz eines Radiotracers. Während die Untersuchung mit radioaktiv markierten Verbindungen eine äußerst sensitive Methode darstellt, bei deren kleinste Stoffmengen im sub- bis nanomolaren Bereich (Radiotracerprinzip) zum Einsatz kommen, werden fluoreszenzmarkierte Moleküle in durchaus größeren Mengen eingesetzt, wobei Konzentrationen von 10-50 µM üblich sind. Yoshida *et al.* verwenden ein Fluoresceinisothiocyanat-markiertes VPTLK und zeigen eine Internalisierung in murine Myeloidzellen 32D anhand Fluoreszenzmikroskopie [126]. Aber gerade die besonders hohe Konzentration von 400 µM sowie die außerordentlich lange Inkubationszeit von 15 h kann diese Zellaufnahme ausgelöst bzw. erzwungen haben. Die Anwendung dieser Konzentration wirft auch die Frage auf, ob unter diesen Bedingungen die Zellmembran überhaupt noch intakt ist. Für das GFP-markierte VPTLK in HeLa-Zellen wurde ebenfalls eine ausgedehnte Inkubationszeit von 12 h angesetzt, die die publizierte Zellaufnahme in ein anderes Licht stellt, auch wenn hier nur eine 1 µM-Lösung der Verbindung getestet wurde [125]. Demzufolge sind weitere Studien mit den Bax-inhibierenden Peptiden mit geringeren Konzentrationen und Inkubationszeiten notwendig, um die zellpenetrierende Aktivität exakt zu bewerten. Dementsprechend wurde von der Synthese und ¹⁸F-Markierung eines Phosphopeptid-CPP5-Konjugates abgesehen.

Phosphopeptid-sC18 und -hCT(18-32)-k7-Konjugate

In einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit wurden zwei potente zellpenetrierende Peptide unterschiedlichen Ursprungs als Vehikel für den intrazellulären Zugang von Phosphopeptiden synthetisiert. Dazu wurden Konjugate aus dem Hexaphosphopeptid MQSpTPL **2** mit dem Cathelicidin-abgeleiteten CPP sC18 antimikrobiellen Ursprungs [131], sowie mit dem verzweigten CPP hCT(18-32)-k7, welches ursprünglich dem Calcitonin entstammt, hergestellt [127]. Während ein kontinuierlicher Aufbau der Peptid-Konjugate mit Hilfe der Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA fehlschlug, konnte durch partielle Synthese des Phosphopeptid-

Fragmentes an die jeweiligen bereits Pro-Leu-gekoppelten CPPs Abhilfe geschaffen werden. Die Darstellung der Phosphopeptid-CPP-Konjugate **2-CPP1** und **2-CPP2** wurde erfolgreich durch Etablierung der Kupplungsreagenzien DIC/HOBt für den Pro-Leu-CPP-Teil, anschließende Elongation mit Phosphothreonin mit den optimalen Kupplungsreagenzien HBTU/HOBt/DIPEA und *N*-terminale kontinuierliche Verlängerung wiederum mit HBTU/HOBt/DIPEA ausgeführt. Die Verlängerung um Met-Gln-Ser kann jedoch ebenso mit dem Kupplungsreagenz Diisopropylcarbodiimid unter Erhalt der Phosphatgruppe erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden zwei Markierungsansätze gewählt, um Zugang zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich einer Zellaufnahme von Phosphopeptiden zu gewähren. Zum einen wurden die Konjugate mit dem Fluorophor 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) an der Festphase fluoreszenzmarkiert und andererseits wurde die Radiomarkierung mit [¹⁸F]SFB am *N*-Terminus der Peptid-Konjugate **2-CPP1** und **2-CPP2** untersucht.

Die CF-markierten Konjugate CF-MQSpTPL-sC18 **CF-2-CPP1** und CF-MQSpTPL-hCT(18-37)-k7 **CF-2-CPP2** wurden in Zellaufnahmestudien an HeLa, MCF-7 und HT-29 Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Alle untersuchten Zelllinien nehmen die Konjugate nach 60 min Inkubation bei 37°C auf. Dabei lässt sich vermuten, dass HeLa Zellen am besten internalisieren, gefolgt von MCF-7 und HT-29. Für die HT-29 Zellen wurde nur eine 25 µM-Peptidlösung eingesetzt, da diese Zellen bei 50 µM mit eingeschränkter Vitalität reagieren. Während die Zellinternalisierung hauptsächlich vesikulär verläuft, zeigt sich für das hCT(18-32)-k7-Konjugat **CF-2-CPP2** in MCF-7 Zellen neben der vesikulären Aufnahme auch eine Kernaufnahme. Zur eindeutigen Quantifizierung wurde die Durchflusszytometrie hinzugezogen, die die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. HeLa Zellen sind hinsichtlich einer Zellaufnahme am potentesten, was auch aufgrund der Natur dieser stark genetisch veränderten Zelllinie zu erwarten war. MCF-7 Zellen internalisieren mit einem Sechstel der Effizienz im Vergleich zu HeLa Zellen, HT-29 Zellen zeigen die geringste Effizienz. Während beide CPPs in HeLa Zellen mit annähernd gleicher Effizienz internalisieren, kann sC18 das Phosphopeptid besser in MCF-7 Zellen internalisieren als das hCT(18-32)-k7-CPP. In HT-29 Zellen wird das umgekehrte Verhalten beobachtet. Demzufolge stellen beide zellpenetrierende Peptide potente molekulare Transporter für das Phosphopeptid MQSpTPL **2** in HeLa, und ganz besonders MCF-7, aber auch HT-29 Zellen dar.

Für das CPP sC18 wird in HeLa, MCF-7 und HT-29 Zellen und für hCT(18-32)-k7 in HeLa Zellen keine Toxizität beschrieben [124, 131]. Wie es sich allerdings mit der

Zytotoxizität der CPPs in Konjugation mit dem Phosphopeptid verhält, die ebenso eine Zellaufnahme bewirkt haben könnte, wird anhand eines Zytotoxizitätsassays auf Basis von Resazurin an MCF-7 Zellen untersucht. Über einen Konzentrationsbereich von 10-100 μM zeigen beide Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** keine zytotoxischen Effekte. Bei 100 μM **CF-2-CPP2** lässt sich nur eine leichte Einschränkung der Vitalität erkennen.

Darüber hinaus wurde eine radioaktive Markierung der Phosphopeptid-CPP-Konjugate **2-CPP1** und **2-CPP2** über die Einführung einer *N*-terminalen ^{18}F -Fluorbenzoylierung untersucht. Dazu stand neben der konventionellen Markierungsstrategie im Reaktionsgefäß auch ein Mikrofluidik-System zur Verfügung. Durch die Einstellung eines niedrigen pH-Wertes von 7,6 bzw. 8,0 unter Verwendung verschiedener Puffer im Rahmen der klassischen ^{18}F SFB-Markierung am Beispiel des Phosphopeptid-sC18-Konjugates **2-CPP1** wurde versucht, auf die Selektivität Einfluss zu nehmen. Dabei sollte das Protonierungs-/Deprotonierungsgleichgewicht vorzugsweise hin zu einem deprotonierten *N*-Terminus verschoben sein, wobei die Deprotonierung der $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppen an den Lys-Resten der CPP-Fragmente zurückgedrängt sein sollte. In reinem Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 8,0) ist die Markierung kaum möglich. Die HPLC-Analytik zeigt weniger als 3% des gewünschten ^{18}F -markierten Peptides im Reaktionsgemisch. Während bei Reaktion in Kolthoff-Puffer (pH 7,6) schon bessere Anteile im Reaktionsgemisch von 15% erreicht werden, kann jedoch bei beiden Puffersystemen keine zu erwartende Selektivität festgestellt werden. Die Reaktion gelingt wiederum am besten in 0,05 M Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9) mit einem ^{18}F **2-CPP3**-Peptidanteil von 20-23% im Reaktionsgemisch, wobei eine Reaktionszeit von 25 min selektiert wird, um eine optimale Markierung zu erreichen. In allen Versuchen wurde mit einer Peptidmenge von 0,5 mg gearbeitet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Beeinflussung dieser Reaktion in Richtung einer *N*-terminalen Acylierung in Anwesenheit weiterer potentieller Aminogruppen über die pH-Abhängigkeit kaum möglich ist. So wird auf die Fraktionierung des gewünschten *N*-terminal, ^{18}F -fluorbenzoylierten Phosphopeptid-CPP-Konjugates mittels HPLC gesetzt. Trotz Optimierung der HPLC-Bedingungen kann keine Grundlinientrennung des jeweiligen Phosphopeptid-CPP-Konjugates ^{18}F **2-CPP3** bzw. ^{18}F **2-CPP4** erzielt werden. Die Reinigung des ^{18}F **2-CPP3** bzw. ^{18}F **2-CPP4** von den Nebenprodukten, möglicherweise Phosphopeptid-CPP-Konjugate mit ^{18}F Fluorbenzoyl-markierten $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppen, stellt eine wissenschaftliche und experimentelle Herausforderung dar. Mit Hilfe der konventionellen Markierungsstrategie können ^{18}F **2-CPP3** bzw. ^{18}F **2-CPP4** in nur 2-4% radiochemischer Ausbeute synthetisiert und isoliert werden.

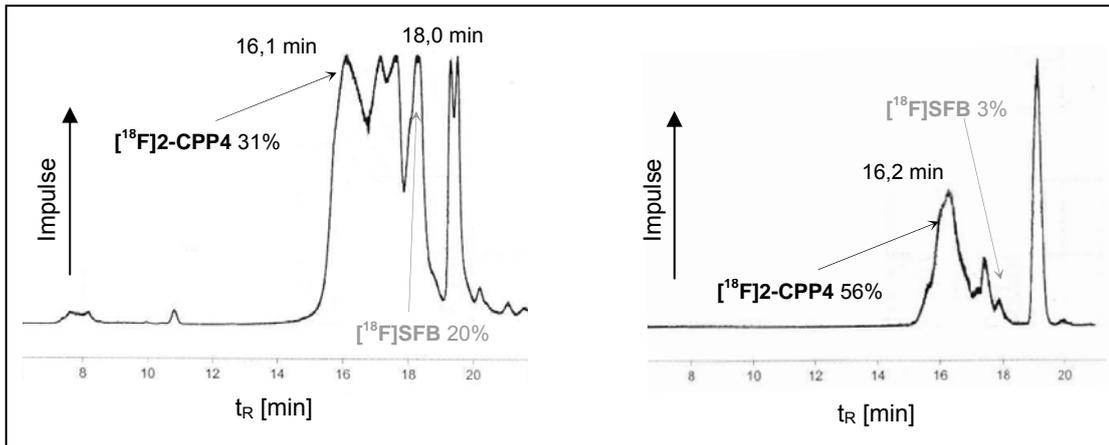


Abb. 45: HPLC-Radiochromatogramme der konventionellen (links) und Mikrofluidik-gestützten [^{18}F]SFB-Markierung (rechts) von **2-CPP2** zu [^{18}F]2-CPP4

In erstmaligen Mikrofluidik-Untersuchungen zur Radiomarkierung von Peptiden konnten im Rahmen dieser Arbeit entscheidende Vorteile dieser Technik gegenüber der konventionellen Peptidmarkierung gezeigt werden. Diese werden in Abb. 45, welche eine Zusammenfassung der Abb. 35 und 37 darstellt, am Beispiel der Markierung von **2-CPP2** zu [^{18}F]2-CPP4 konventionell (links) im Vergleich zu Mikrofluidik (rechts) deutlich. Während die optimierte klassische Markierung in einer anspruchsvollen HPLC-Trennung resultiert, erhält man mit der Mikrofluidik-Markierung eine Selektivität hin zum N-terminal-markierten, gewünschten Konjugat [^{18}F]2-CPP4. Dies geht einher mit einer Steigerung des radiomarkierten [^{18}F]2-CPP4-Peptidanteils im Reaktionsgemisch, die nahezu dem Doppelten der Reaktion mittels der konventionellen Technik entspricht.

Laut Whitesides zeichnet sich die Mikrofluidik-Markierung durch kontrollierte Zufuhr der Reaktionslösungen, die im laminaren Fluss durch den Mikrofluidik-Reaktor geführt werden, aus. Turbulente Strömung wird dabei vermieden [157]. Demzufolge wird eine vergrößerte spezifische Oberfläche erreicht, die einen effizienteren Stoff- und Wärmeaustausch bewirkt und damit zu beschleunigten Reaktionen führt [158]. Auch die höheren Produktselektivitäten und Umsetzungen können auf die Mikrofluidik-Technologie zurückgeführt werden. Mittels Mikrofluidik-gestütztem Ansatz können 26% radiochemische Ausbeute für das hCT-basierte Peptid-Konjugat [^{18}F]2-CPP4 erhalten werden. Für das sC18-basierte [^{18}F]2-CPP3 kann eine ähnliche radiochemische Ausbeute von 21% erreicht werden. Vergleichend dazu können mit Hilfe der klassischen Synthese nur 2-4% radiochemische Ausbeute für beide radiomarkierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate bewerkstelligt werden. Während zur Synthese von [^{18}F]2-CPP4 die gleiche Peptidmenge von 0,5 mg wie für den klassischen Ansatz

Verwendung findet, musste jedoch der Einsatz an Peptidpräkursor **2-CPP1** stark angehoben werden (0,5 mg zu 3,2 mg). Das Phosphopeptid-sC18-Konjugat **2-CPP1** lässt sich im Vergleich zu seinem hCT-basierten Analog **2-CPP2** weniger gut mit [¹⁸F]SFB markieren. Die Reaktion verläuft langsamer und weniger selektiv. Durch Verringerung der Temperatur auf 40°C konnte der Zersetzungsprozess des [¹⁸F]SFB eingedämmt werden und durch die Kopplung zweier Mikroreaktoren zeitlich optimale Bedingungen für eine effektivere Reaktion zu [¹⁸F]**2-CPP3** geschaffen werden.

Die erfolgreiche Darstellung beider ¹⁸F-markierter Phosphopeptid-CPP-Konjugate [¹⁸F]**2-CPP3** und [¹⁸F]**2-CPP4** ermöglichte weitere Untersuchungen zu ihrer Zellaufnahme, sowie einen Einblick in deren *in vivo* Bioverteilungsprofil mittels Kleintier-PET-Untersuchungen. Auch die ¹⁸F-markierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate werden wie ihre CF-fluoreszenz-markierten Analoga **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** in HT-29 und MCF-7 Zellen internalisiert. Eine Zellaufnahme hat ebenso in der Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu stattgefunden. Für beide CPPs sind kaum signifikante Unterschiede bei der Internalisierung des Phosphopeptides MQSpTPL **2** in die unterschiedlichen Zelllinien erkennbar. Die Zellaufnahme steigt bis hin zu 30 min stark an. Zu diesem Zeitpunkt liegt die intrazelluläre Aufnahme der beiden Konjugate [¹⁸F]**2-CPP3** und [¹⁸F]**2-CPP4** um 50% ID/mg Protein in allen Zelllinien. Während die CF-markierten Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** Unterschiede in der Zellaufnahme in HT29 und MCF-7 zeigten, kann dies mit den radiomarkierten Konjugaten nicht beobachtet werden, was durchaus mit den Konzentrationsunterschieden, auf denen die beiden Methoden beruhen, begründet werden kann. Am Beispiel des Peptides [¹⁸F]**2-CPP3** wurde durch eine Zellaufnahme mit [¹⁸F]FDG in Anwesenheit von Glucose in MCF-7 Zellen bewiesen, dass es sich um eine signifikante Internalisierung des ¹⁸F-markierten Phosphopeptid-CPP-Konjugates handelt, die vergleichbar mit einer [¹⁸F]FDG-Internalisierung ist.

Schlussendlich sind beide zellpenetrierenden Peptide sC18 und hCT(18-32)-k7 ausgezeichnet für die intrazelluläre Vermittlung des Phosphopeptidtransportes geeignet.

Die Kleintier-PET-Aufnahmen der Konjugate [¹⁸F]**2-CPP3** und [¹⁸F]**2-CPP4** an Balb/C-Mäusen (Normaltiere) bestätigen das typische Bioverteilungsprofil eines radiomarkierten Peptides und ebenso die PET-Aufnahmen des reinen ¹⁸F-markierten Phosphopeptides in Ratten. Es können keine spezifischen Gewebeakkumulationen detektiert werden. Zudem sind die CPPs sC18 und hCT(18-32)-k7 nicht in der Lage das Phosphopeptid über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn zu transportieren. Die Radiopeptid-Konjugate und dessen Metaboliten werden sehr schnell renal eliminiert, wobei eine langsame Exkretion aus den Nieren stattfindet.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese und radiopharmakologischen Charakterisierung von Phosphopeptiden für die molekulare Bildgebung mittels PET. Dazu wurden kürzlich vorgestellte Plk1-PBD-gerichtete Phosphopeptide mit Ser-pThr-Kernsequenz ausgewählt [89], deren Darstellung mit der Fmoc-gestützten orthogonalen Festphasenpeptidsynthese (SPPS) vollzogen wurde. Dabei erfolgt die Umsetzung nach dem Prinzip des Synthons-basierten Ansatzes, der den Einsatz des monobenzylierten Phosphothreonin-Bausteines involviert. Das Uronium-basierte Kupplungs- und Aktivierungsreagenz HBTU/HOBt/DIPEA, sowie das Abspaltreagenz TFA/Wasser/Thioanisol/EDT als eine modifizierte Variante des Reagenz K garantiert die zuverlässige Synthese von Phosphopeptiden unter Erhalt der Phosphatfunktion. Zur Charakterisierung der Peptide wurden HPLC und Massenspektrometrie als geeignete Methoden herangezogen.

An die erfolgreiche Darstellung von Phosphopeptiden schloss sich im Weiteren die Ausarbeitung einer zuverlässigen Radiomarkierungsstrategie mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Fluor-18 an. Das bifunktionelle, aminogruppenselektive Agens *N*-Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat (^{18}F SFB) ist für eine indirekte und milde Markierung von Peptiden geeignet. Durch Optimierung der *N*-terminalen ^{18}F -Fluorbenzoylierung des Phosphopeptides MQSpTPL **2** hinsichtlich der Verwendung eines 0,05 M Na_2HPO_4 -Puffers (pH 9) als Reaktionsmedium bei geringer Peptidmenge (0,5 mg), sowie 40°C Reaktionstemperatur und 30 min Reaktionszeit kann das ^{18}F -markierte Phosphopeptid ^{18}F FBz-MQSpTPL **[^{18}F]**4** in guten radiochemischen Ausbeuten von 25-28%, entsprechender radiochemischer Reinheit >95% mittels HPLC-Reinigung und hoher spezifischer Aktivität (20-40 GBq/ μmol) synthetisiert werden.**

Der Einsatz von Peptiden ist für die molekulare Bildgebung besonders attraktiv, jedoch oftmals durch ihre Instabilität *in vivo*, ausgelöst durch ubiquitär vorhandene endogene Peptidasen, limitiert. Bergmann *et al.* untersuchten beispielsweise die metabolische Stabilität von *N*-terminal ^{18}F -fluorbenzoyliertem NT(8-13) [139], dessen biologische Halbwertszeit *in vivo* von weniger als 5 min die weitere Anwendung begrenzt. Mit dem neuartigen ^{18}F -markierten Phosphopeptid wurde ein Peptid geschaffen, das *in vitro* und besonders *in vivo* außerordentlich hohe Stabilität von > 50% nach 60 min aufweist und damit wegweisende Eigenschaften für die Entwicklung neuer stabiler Radiopeptide für die molekulare Bildgebung aufzeigt. Des Weiteren stehen ^{18}F -markierte Phosphopeptide für die Untersuchung intrazellulärer Prozesse, die auf Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsprozessen basieren, zur Verfügung.

Da Phosphopeptiden aufgrund ihrer negativgeladenen Phosphatfunktionalität ein intrazellulärer Zugang verwehrt bleibt, wie auch in dieser Arbeit an den Tumorzelllinien HT-29 und FaDu nachgewiesen wurde, steht die Realisierung einer verbesserten intrazellulären Internalisierung von Phosphopeptiden im Blickfeld des zweiten Teils der Promotion. Der Versuch einer gezielten Zellaufnahme über rezeptorinternalisierende Peptide wurde mit dem Neuropeptidhormon NT(8-13), welches über einen G-Proteingekoppelten Mechanismus in die Zelle gelangt [134], beschritten. Jedoch zeigte ein Triazol-verbrücktes Konjugat aus NT(8-13) als molekularer Transporter und dem Phosphopeptid MQSpTPL **2**, welches auf Basis der Azid-Alkin-Click-Chemie synthetisiert wurde, anhand seiner niedrigen Bindungsaffinität kein Potential zu einer erfolgreichen Zellinternalisierung des Phosphopeptides. Vermittler eines rezeptorunabhängigen molekularen Zelltransportes stellen zellpenetrierende Peptide dar, wie die in dieser Arbeit verwendeten, potenten CPPs sC18, abgeleitet aus dem antimikrobiellen Peptid Cathelicidin, sowie hCT(18-32)-k7, einem verzweigten Calcitonin-Derivat. Mit den Phosphopeptid-CPP-konjugierten Verbindungen wurden nicht-toxische Konstrukte geschaffen, die eine definierte Aufnahme in HeLa, MCF-7 und HT-29 Zellen aufweisen, wie mittels optischer Bildgebung nachgewiesen werden konnte.

Die Integration und Anwendung der Mikrofluidik-Technik im Rahmen der Darstellung der *N*-terminal ^{18}F -fluorbenzoylierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate weist im Vergleich zur konventionellen Radiomarkierung entscheidende Vorteile auf. In Anwesenheit der für die ^{18}F SFB-Markierung reaktiven $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppen in den CPP-Fragmenten zeichnet sich im Rahmen der mikrofluiden Markierung entscheidende Selektivität für den *N*-Terminus der Peptide ab, die mit herausragenden Markierungsausbeuten gekoppelt ist. Die fehlende Selektivität bei der Radiomarkierung mit ^{18}F SFB im klassischen Sinne könnte zukünftig durch die Etablierung alternativer Markierungsagenzien, wie beispielsweise dem Thiolgruppen-sensitiven Markierungsagens *N*-[6-(4- ^{18}F Fluorbenzyliden)aminoxyhexyl]-maleimimid (^{18}F FBAM) oder dem Aminoxy-reaktiven ^{18}F Fluorbenzaldehyd (^{18}F FBA) kompensiert werden.

In Zellaufnahmestudien wurde ebenfalls eine Internalisierung der ^{18}F -markierten Konjugate in FaDu, HT-29 und MCF-7 Zellen bestätigt. Wie auch das ^{18}F -markierte Hexaphosphopeptid selbst in Wistar-Unilever-Ratten, zeigten die ^{18}F -markierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate in Kleintier-PET-Untersuchungen in Balb/C-Mäusen (Normaltiere) die für ein radiomarkiertes Peptid typische Bioverteilung. Hierbei ist eine renale Exkretion eingeschlossen.

Zur metabolischen Stabilität der Phosphopeptid-CPP-Konjugate *in vitro* und *in vivo* sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Zudem wäre es zukünftig interessant das intrazelluläre Schicksal des Phosphopeptides zu erfahren. Neben einem Bindungsassay an die Polo-Box-Domäne der Polo-like Kinase-1, aber auch der Untersuchung des Internalisierungsmechanismus, sollten solche Arbeiten ebenso den Einbau einer chemisch oder enzymatisch-spaltbaren Linkerfunktion [121] zwischen dem Phosphopeptid-Fragment und dem CPP einschließen, welche eine Möglichkeit zur intrazellulären Freisetzung des Phosphopeptides bietet. Die im Rahmen der endozytotischen Zellaufnahme gebildeten Endosomen und Lysosomen zeigen einen signifikant geringeren pH-Wert (pH 4,0-6,5) als der Extrazellularraum (pH 7,2-7,4). Auf Basis der pH-abhängigen Redoxstabilität von Disulfiden oder auch der Säurelabilität von Hydrazonen stellen derartige Sequenzen maßgeschneiderte Linker für eine Freisetzung des Peptides dar. Alternativ dazu eignen sich auch intrazelluläre Proteasen, wie Cathepsine, die eine lysosomale Spaltung bewirken. Bedeutsam ist gerade Cathepsin B mit folgenden Erkennungssequenzen: Arg-Arg, Gly-Leu-Phe-Gly, Gly-Phe-Leu-Gly oder Ala-Leu-Ala-Leu [121].

Auch der Ansatz der aktivierbaren CPPs (ACPPs), der von der Arbeitsgruppe um den Nobelpreisträger Roger Y. Tsien vorgestellt wurde [122, 172], könnte zukünftig auf die Phosphopeptide übertragen werden. ACPPs sind kurze polykationische Peptidsequenzen, die über einen Protease-spaltbaren Linker an polyanionische Peptidsequenzen gebunden sind, die durch die Formation einer Haarnadel-Struktur neutralisierend wirken. Die polykationische CPP-Fraktion gebunden an ein entsprechendes Zielmolekül für die molekulare Bildgebung, wird durch extrazelluläre Proteasen wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) freigesetzt und kann intrazellulär aufgenommen werden. ACPPs wurden bereits für die *in vivo* Lokalisation von MMP-2 und MMP-9, die eng mit dem Prozess der Tumordinvasion/Angiogenese und Metastasierung verknüpft sind, eingesetzt [122]. Gerade aktivierbare Sonden für die molekulare Bildgebung repräsentieren vielversprechende Werkzeuge für ein tumorspezifisches Targeting *in vivo* [173].

6. Experimenteller Teil

6.1 Material

Aminosäuren und Aminosäuresequenzen

Folgende Aminosäuren wurden bei der Firma MultiSynTech GmbH (Deutschland) eingekauft: Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Val-OH.

Die phosphorylierte Aminosäure Fmoc-L-Thr(PO(OBzl)-OH)-OH, sowie das Peptid Neurotensin(8-13) (NT(8-13)) stammen von der Firma Bachem, Schweiz.

Harze / Beladung	Firma
PS-PHB-L-Leu Fmoc TentaGel-Harz / 0,65 mmol/g	RAPP Polymere, Deutschland
Fmoc-L-Lys(Boc)-Wang-Harz / 0,66 mmol/g	Novabiochem, Schweiz
PS-PHB-L-Met Fmoc TentaGel-Harz / 0,66 mmol/g	RAPP Polymere, Deutschland
Rinkamid MBHA-Harz mit 1% Divinylbenzol / 0,60 mmol/g	MultiSynTech GmbH, Deutschland
Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien	Firma
Diisopropylcarbodiimid (DIC)	Sigma Aldrich, Deutschland
O-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU)	Fluka, Deutschland
O-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluorophosphat (HBTU)	MultiSynTech GmbH, Deutschland
1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)	MultiSynTech GmbH, Deutschland
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (DIPEA)	Biosolve, Niederlande

Weitere Peptidsynthesereagenzien	Firma
Dichlormethan (CH ₂ Cl ₂)	Biosolve, Deutschland
Diethylether (Et ₂ O)	Biosolve, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Biosolve, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Riedel-de Haën, Deutschland
Methanol (MeOH)	Biosolve, Deutschland
<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Biosolve, Deutschland
Piperidin	Biosolve, Deutschland

Abspaltreagenzien	Firma
<i>p</i> -Kresol	Sigma Aldrich, Deutschland
1,2-Ethandithiol (EDT)	Sigma Aldrich, Deutschland
Thioanisol	Sigma Aldrich, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Aldrich, Deutschland
Triisopropylsilan (TIPS)	Merck-Schuchardt, Deutschland

Weitere Chemikalien	Firma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAA, Deutschland
4-Fluorbenzoesäure	Fluka, Deutschland
5-Hexinsäure	Aldrich, Deutschland
Kupfersulfat-Pentahydrat	Feinchemie Apolda, Deutschland
Natriumascorbat	VWR, Deutschland
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Aldrich, Deutschland
Trypsin	PAA, Deutschland

Material und Methoden

Markierungsagenzien	Firma bzw. Herstellung
5(6)-Carboxyfluorescein (CF)	Fluka, Deutschland
Hoechst-Farbstoff H 33342	Bisbenzimid $C_{27}H_{28}N_6O \cdot 3HCl \cdot 3H_2O$ Invitrogen, Deutschland
[^{18}F]Fluorid	Herstellung mittels der $^{18}O(p,n)^{18}F$ -Kernreaktion über ein mit 97% ^{18}O angereichertem $H_2^{18}O$ -Target am Zyklotron des Forschungszentrums Dresden-Rossendorf

Puffer, Lösungen, Assays	Zusammensetzung	Firma
Kolthoff KH_2PO_4 - Boratpuffer [174] (pH 7,6 und 8,4)	0,1 M KH_2PO_4	Fluka, Deutschland
	0,05 M $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$	Merck, Deutschland
NaOAc-Puffer (pH 4,4)	38 mM NaOAc $\cdot 3 H_2O$	Fluka, Deutschland
	61 mM CH_3COOH (100%)	VWR, Deutschland
	1000 ml dest. H_2O mit HCl auf pH 4,4	Grüssing, Deutschland
Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9,0)	0,05 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Fluka, Deutschland
PBS (pH 7,2)	74 mM KH_2PO_4	Fluka, Deutschland
	150 mM NaCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
	2,7 mM KCl	Fluka, Deutschland
	8,1 mM $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	Fluka, Deutschland
Sörensen Phosphat- Puffer (pH 8,0)	0,07 M KH_2PO_4 -Lösung (5,08 ml)	Fluka, Deutschland
	0,07 M $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ -Lösung (4,92 ml)	Fluka, Deutschland
Tris-Puffer (pH 7,4)	50 mM Tris-HCl	Sigma, Deutschland
	1 mM EDTA	Sigma, Deutschland
	0,1% BSA	Sigma-Aldrich, Deutschland
	0,5 mM o-Phenanthrolin-Monohydrat	Sigma, Deutschland
Albumin	humanes Albumin, 30% Lösung	Sigma, Deutschland
E153-Injektionslösung	1000 ml enthalten: 140 mmol/l Na^+ , 5 mmol/l K^+ , 2,5 mmol/l Ca^{2+} , 1,5 mmol/l Mg^{2+} , 104,5 mmol/l Cl^- , 50 mmol AcO^-	Serumwerk Bernburg, Deutschland

Material und Methoden

Puffer, Lösungen, Assays	Zusammensetzung	Firma
Hank's balanced salt solution (HBSS)	1,3 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Fluka, Deutschland
	49,9 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Serva, Deutschland
	40,6 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Fluka, Deutschland
	5,4 mM KCl	Fluka, Deutschland
	44,1 mM KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Deutschland
	4,2 mM NaHCO ₃	Sigma, Deutschland
	137 mM NaCl	Fluka, Deutschland
	33,7 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	Merck, Deutschland
	5,6 mM D(+)-Glucose	Merck, Deutschland
NaOH-SDS	1% Natriumdodecylsulfat (SDS) in 0,1 M NaOH	Sigma-Aldrich und Roth, Deutschland
Saline	0,9% NaCl-Lösung (physiologisch)	Serumwerk Bernburg, Deutschland
Trypanblau	3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphtyl-3-azo)-[1,1'-biphenyl]	Fluka; Deutschland
Resazurin-basierter <i>in vitro</i> Toxizitätsassay-Kit	-	Sigma, Deutschland
Nährmedien	Zusätze	Firma
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	1% Antibiotikum	Biochrom, Deutschland
McCoy	10% fötales Kälberserum (FKS)	& PAA, Deutschland
RPMI		
OptiMEM	-	PAA, Deutschland

6.2 Methoden

6.2.1 Ablauf der Peptidsynthese von Phosphopeptiden und nicht-phosphorylierten Peptiden

6.2.1.1 Allgemeine Prozedur der chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer

Zur Darstellung der Peptide wird der Peptidsyntheseapparat Syro I der Firma MultiSynTech (Deutschland) eingesetzt, der einen automatisierten Peptidaufbau programmgesteuert beginnend vom Carboxy-Terminus zum Amino-Terminus ermöglicht.

Die Peptidsequenz wird am Harz nach dem Prinzip der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) auf Basis der orthogonalen Fmoc-Schutzgruppenstrategie aufgebaut. Einleitend wird das vorgelegte Harz in 1 ml DMF für 10 min vorgequollen und fünf Waschzyklen zu je 500 µl DMF angeschlossen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der Harz-gebundenen Aminosäure erfolgt durch je 15-minütige Inkubation mit 1000 µl 40%igem und 20%igem Piperidin in DMF. Nach fünfmaligem Waschen mit 500 µl DMF erfolgt der Kupplungszyklus, der die Kupplung der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure (5 äq.) mittels der Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien HBTU (5 äq.), HOBt (5 äq.) in DMF gelöst und der Base DIPEA in NMP (10 äq. bzw. 15 äq.) bei Raumtemperatur realisiert. Dem Waschschrift mit 500 µl DMF in fünf Zyklen folgt wiederum die basische Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der neu gekuppelten Aminosäure mit 1000 µl 40%igem Piperidin in DMF für 15 min, wonach das Harz erneut mit je 500 µl DMF in 5 Zyklen gewaschen wird. Dieser Kupplungszyklus wird solange wiederholt bis die komplette Peptidsequenz am Harz vorliegt. Zum Abschluss wird das Peptidylharz dreimal mit je 500 µl Ethanol in je fünf Zyklen gewaschen.

Die Peptidsynthesen werden in Einfachkupplungen durchgeführt, wobei das phosphorylierte Thr über 2 h reagiert; alle anderen Aminosäuren, sowie 4-Fluorbenzoesäure werden 1 h zur Reaktion gebracht. Dabei wird zur Darstellung der Phosphopeptide ein Kupplungsverhältnis von 1:1:1:3 Fmoc-Aminosäure/HBTU/HOBt/DIPEA angewendet, wohingegen bei nicht-phosphorylierten Peptiden ein Mol-Verhältnis von 1:1:1:2 eingesetzt wird.

6.2.1.2 Entschützung von Peptiden

Die Abspaltung des Peptides vom Harz, sowie die Entschützung der Aminosäureseitenkettenschutzgruppen erfolgt durch saure Behandlung des Peptidylharzes. Dabei kommt für Phosphopeptide und Met-haltige (Phospho)peptide eine modifizierte Form des Reagenz K [166] bestehend aus TFA/Wasser/Thioanisol/EDT (87/5/5/3) zum Einsatz. Für Peptide ohne Met wird ein Reagenz aus TFA/Wasser/*p*-Kresol (95/5/5) verwendet. Phosphopeptide werden mit 1,5 – 2 ml dieses Abspaltreagenz für 5 h bei Raumtemperatur in einer Spritzenfritte inkubiert. Für nicht-phosphorylierte Peptide wird die Inkubationszeit auf 4 h verringert. Anschließend wird die Peptidlösung über die Spritzenfritte vom Harz getrennt, mit wenig Spalllösung gewaschen und die Peptidlösung im Stickstoffstrom eingengt. Die Peptidfällung wird mit 30 ml eiskaltem Diethylether vorgenommen und zur Komplettierung für 30 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wird der Diethylether über eine Spritzenfritte abgetrennt. Das Rohpeptid erhält man nach Trocknung im Exsikkator.

6.2.1.3 Peptidanalytik

Als eine Standardmethode der Peptidanalytik fungiert die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), die auch im Rahmen dieser Arbeit für die Charakterisierung der Peptide Verwendung findet. Es wird mit den hier aufgeführten verschiedenen HPLC-Systemen gearbeitet: Hewlett Packard Serie 1100, Hewlett Packard Serie 1050, VWR Hitachi ELITE LaChrom, sowie Beckman Coulter System Gold. Der Radiodetektor Ramona von der Raytest GmbH, Deutschland wird für die γ -Detektion eingesetzt.

Als HPLC-Säulenmaterial dienen C18-Phasen. Die mobile Phase besteht aus Wasser und Acetonitril (Fisher Scientific, Deutschland) bzw. Methanol (Fisher Scientific, Deutschland) als zweite Komponente. Um eine verbesserte Auflösung der Peaks zu erhalten wird dem Laufmittel das Ionenpaar-Reagenz Trifluoressigsäure (TFA) zugefügt. Die Chromatogramme der Peptide werden UV/Vis-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert.

Zur Identifizierung der Peptide wird weiterhin Massenspektrometrie verwendet. Dazu findet das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer der Serie Quattro-LC der Firma Micromass (Großbritannien) mit dem Verfahren der Elektronensprayionisation (ESI-MS) Anwendung.

6.2.1.4 Kaisertest [175]

Der Kaisertest dient der Überprüfung der Kupplung auf Vollständigkeit. Dazu werden einige wenige trockene Peptidylharzkügelchen in einem Reaktionsgefäß mit je einem

Tropfen der Kaisertest-Lösungen I-III überschichtet und ohne Schütteln 5 min auf 95°C erhitzt.

Eine Blaufärbung der Peptidlösung zeigt das Vorhandensein freier Aminogruppen an und verweist auf eine unvollständige Kupplung. Ist die Lösung gelb gefärbt, ist die Kupplung komplett.

Kaisertest-Lösung	Zusammensetzung	Firma
I	1 g Ninhydrin	Reanal, Ungarn
	20 ml Ethanol	Riedel-de Haën, Deutschland
II	16 g Phenol	Riedel-de Haën, Deutschland
	4 g Ethanol	Riedel-de Haën, Deutschland
III	0,4 ml wässrige KCN-Lösung (1 mM)	Aldrich, Deutschland
	20 ml Pyridin	Aldrich, Deutschland

6.2.1.5 Reinigung von Peptiden

Die Reinigung der Peptide wird analog der Peptidanalytik mittels HPLC (Hewlett Packard Serie 1050, Jasco, Beckman Coulter System Gold) vorgenommen, die im semipräparativen Maßstab eingesetzt wird. Für die Fraktionierung der Peptide wird die HPLC Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus der Firma Macherey-Nagel verwendet und mit den analogen Laufmitteln eluiert. Die Fraktionen, die den mittels massenspektrometrischer Verfahren identifizierten Peptidpeak enthalten, werden manuell abgetrennt. Das HPLC-Laufmittel wird am Rotationsverdampfer bei 40°C und 50 mbar auf ein Minimum reduziert; Acetonitril bzw. Methanol wird während dieses Prozesses entfernt.

6.2.1.6 Gefriertrocknung

Im Rahmen der Lyophilisation werden mit flüssigem Stickstoff gefrorene wässrige Peptidlösungen im Vakuum unter Verwendung des Sublimierungsprozesses getrocknet. Diese Isolierung und Überführung der dargestellten Peptide in eine aufbewahrungsfähige Form wird mittels der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4/2-4 der Firma Christ (Deutschland) erreicht.

Alle Peptide werden nach der Gefriertrocknung bei -20 bis -70°C gelagert.

6.2.2 Peptidsynthese von Plk1-gerichteten Phosphopeptiden und nicht-phosphorylierten Peptidanaloga

PMQSpTPL 1

Das Heptaphosphopeptid **1** wird ausgehend von 30 mg Fmoc-L-Leu-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur chemischen Synthese von Peptiden am Peptidsynthesizer dargestellt. Das reine Peptid **1** wird als weißes Pulver (7 mg, 8,2 μmol , 42%) nach HPLC-Reinigung mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-10 min 10% B, bei 20 min 20% B, bei 40 min 30% B, bei 45 min 50% B erhalten.

HPLC t_R = 25,0 min, Reinheit: >95%

$\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{PS}$; $M_{\text{berechnet}}$ = 852,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 853,8 $[\text{M}+\text{H}]^+$

MQSpTPL 2

Das Hexaphosphopeptid **2** wird anhand der allgemeinen Prozedur der Peptidsynthese am Peptidsynthesizer mit 50 mg Fmoc-L-Leu-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz als Festphase hergestellt. Das reine Peptid **2** wird nach HPLC-Reinigung mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-10 min 10% B, bei 20 min 20% B, bei 40 min 30% B, bei 45 min 50% B als weißes Pulver (19 mg, 15,4 μmol , 78%) erhalten.

HPLC t_R = 21,4 min, Reinheit: > 98%

$\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{PS}$; $M_{\text{berechnet}}$ = 755,3 g/mol, ESI-MS: m/z = 756,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

PMQSTPL Dephospho-1

Das nicht-phosphorylierte Heptapeptidanaloga **Dephospho-1** wird an 50 mg Fmoc-L-Leu-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz am Peptidsynthesizer mittels der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese synthetisiert. Das reine Peptid **Dephospho-1** wird nach HPLC-Reinigung mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-10 min 10% B, bei 20 min 20% B, bei 40 min 30% B, bei 45 min 50% B als weißes Pulver (12 mg, 15,8 μmol , 49%) erhalten.

HPLC t_R = 27,9 min, Reinheit: > 97%

$\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}$; $M_{\text{berechnet}}$ = 772,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 773,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

MQSTPL Dephospho-2

Ausgehend von 50 mg Fmoc-L-Leu-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz wird das nicht-phosphorylierte Hexapeptidanal **Dephospho-2** am Peptidsynthesizer mittels der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese dargestellt. Nach HPLC-Reinigung mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-10 min 10% B, bei 20 min 20% B, bei 40 min 30% B, bei 45 min 50% B wird das reine Peptid **Dephospho-2** als weißes Pulver (19 mg, 28,1 μ mol, 86%) erhalten.

HPLC t_R = 25,2 min, Reinheit: > 98%

$C_{28}H_{49}N_7O_{10}S$; $M_{berechnet}$ = 675,3 g/mol, ESI-MS: m/z = 676,4 [M+H]⁺

6.2.2.1 Darstellung der 4-fluorbenzoylierten Referenzpeptide

4FBz-PMQSpTPL 3

Das Referenzpeptid **3** wird ausgehend von 30 mg Fmoc-L-Leu-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz nach der allgemeinen Prozedur zur Peptidsynthese dargestellt, wobei die 4-Fluorbenzoesäure ebenso automatisiert mittels der Peptidsynthese-Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien *N*-terminal kondensiert wird. Das reine Peptid **3** wird nach HPLC-Reinigung mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-5 min 10% B, bei 10 min 25% B, bei 20 min 30% B, bei 30 min 50% B als weißes Pulver (8 mg, 8,2 μ mol, 42%) erhalten.

HPLC t_R = 27,6 min, Reinheit: > 97%

$C_{40}H_{60}FN_8O_{15}PS$; $M_{berechnet}$ = 974,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 975,6 [M+H]⁺

4FBz-MQSpTPL 4

Das Referenzpeptid **4** wird an 50 mg Fmoc-L-Leu-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz als Festphase synthetisiert. Die Fluorbenzoylierung wird im Rahmen der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Peptidsynthese durch automatisierte Kupplung der 4-Fluorbenzoesäure an den *N*-Terminus erreicht. Nach HPLC-Reinigung mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-5 min 10% B, bei 10 min 25% B, bei 20 min 30% B, bei 30 min 50% B wird das Peptid **4** als weißes Pulver (15 mg, 16,5 μ mol, 51%) isoliert.

HPLC t_R = 29,3 min, Reinheit: > 97%

$C_{35}H_{53}FN_7O_{14}PS$; $M_{berechnet}$ = 877,3 g/mol, ESI-MS: m/z = 876,5 [M-H]⁺

4FBz-MQSTPL Dephospho-4

Ausgehend von 50 mg Fmoc-L-Leu-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz wird das Referenzpeptid **Dephospho-4** unter Etablierung der 4-Fluorbenzoesäure als Peptidsynthesebaustein nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift am Peptidsynthesizer synthetisiert. Mittels HPLC-Reinigung mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-5 min 10% B, bei 10 min 25% B, bei 20 min 30% B, bei 30 min 50% erfolgt die Isolierung von **Dephospho-4** als weißes Pulver (12 mg, 15,0 μ mol, 46%).

HPLC t_R = 29,7 min, Reinheit: > 98%

$C_{35}H_{52}FN_7O_{11}S$; $M_{\text{berechnet}} = 797,3$ g/mol, ESI-MS: $m/z = 798,6$ $[M+H]^+$

6.2.3 Darstellung von Peptid-Konjugaten mit NT(8-13)

6.2.3.1 Darstellung azid- und alkinfunktionalisierter Peptide in Lösung

Azid- und Alkinfunktionalisierte Peptide werden in einer Veresterung unter Verwendung von Alkylsuccinimidyl-Aktivestern dargestellt. Als Azidierungsagens dient Succinimidyl-5-azidovalerat **5**, das nach Seo *et al.*, 2003 [152] und Khoukhi *et al.*, 1987 [176] aus Ethyl- δ -bromvalerat über 5-Azidovaleriansäure synthetisiert wird. Für die Alkinylierung wird Succinimidyl-5-hexinoat **6** verwendet, welche zuvor durch Veresterung der 5-Hexinsäure nach Seo *et al.*, 2003 [152] erhalten wird.

Allgemeine Vorschrift nach Ramenda et al., 2007 [147]

6 μ mol des zu azidierenden bzw. alkinylierenden Peptides (MQSpTPL **2**, PMQSTPL **Dephospho-1**, MQSpTPL **Dephospho-2**, Neurotensin (8-13) **7**) werden in 700 μ l Kolthoff KH_2PO_4 -Boratpuffer (pH 8,4) gelöst. 12,5 μ mol des Succinimidyl-5-azidovalerats **5** oder des Succinimidyl-5-hexinoats **6** werden in 300 μ l Acetonitril gelöst und anschließend mit der Peptid-Pufferlösung vereinigt. Nach 6 h Inkubation bei 40°C wird das Reaktionsgemisch mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Mit einer Macherey-Nagel HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus und einem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0 min 20% B, bei 35 min 50% B wird der mit MS identifizierte Produktpeak fraktioniert. Nach Einengen des Laufmittels am Rotationsverdampfer wird das reine azid- bzw. alkinfunktionalisierte Peptid mittels Gefriertrocknung isoliert.

5-Azidopentanoyl-MQSpTPL Azid-2

HPLC t_R = 24,6 min, Reinheit: > 97%

$\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{PS}$; $M_{\text{berechnet}} = 880,4$ g/mol, ESI-MS: $m/z = 903,3$ [M+Na]⁺

Ausbeute: 66%

5-Azidopentanoyl-MQSTPL Azid-Dephospho-2

HPLC t_R = 22,1 min, Reinheit: >97%

$\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{S}$; $M_{\text{berechnet}} = 800,4$ g/mol, ESI-MS: $m/z = 823,4$ [M+Na]⁺

Ausbeute: 82%

5-Azidopentanoyl-PMQSTPL Azid-Dephospho-1

HPLC t_R = 22,4 min, Reinheit: > 97%

$\text{C}_{38}\text{H}_{63}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}$; $M_{\text{berechnet}} = 897,4$ g/mol, ESI-MS: $m/z = 898,6$ [M+H]⁺

Ausbeute: 63%

5-Azidopentanoyl-NT(8-13) Azid-7

HPLC t_R = 19,1 min, Reinheit: > 97%

$C_{43}H_{71}N_{15}O_9$; $M_{berechnet}$ = 941,6 g/mol, ESI-MS: m/z = 942,7 $[M+H]^+$

Ausbeute: 42%

5-Hexinoyl-NT(8-13) Alkin-7

HPLC t_R = 17,9 min, Reinheit: > 97%

$C_{44}H_{70}N_{12}O_9$; $M_{berechnet}$ = 910,5 g/mol, ESI-MS: m/z = 911,6 $[M+H]^+$

Ausbeute: 69%

6.2.3.2 Darstellung von Peptid-NT(8-13)-Konjugaten

Zur Synthese der Peptid-NT(8-13)-Konjugate werden je 1,7 μ mol (1 äq.) 5-Hexinamid-NT(8-13) **Alkin-7** sowie des azidierten Peptides (**Azid-2**, **Azid-Dephospho-2** oder **Azid-Dephospho-1**) in 800 μ l Kolthoff KH_2PO_4 -Boratpuffer (pH 8,4) gelöst. Nach Ramenda *et al.*, 2007 werden 0,5 äq. Kupfer(II)sulfat in 50 μ l Wasser und 5 äq. Natriumascorbat in 150 μ l Wasser zugefügt, um die Click-Reaktion zu starten. Nach Reaktion bei 40°C für 48 h wird das Reaktionsgemisch mittels semipräparativer HPLC gereinigt. Mit einer Macherey-Nagel HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus und einem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0 min 10% B, bei 15-25 min 20% B und bei 40-45 min 60% B werden die Fraktionen, die den mittels MS analysierten Produktpeak enthalten, abgetrennt. Nach Einengen des Laufmittels am Rotationsverdampfer wird das Triazol-verbrückte Konjugat mittels Gefriertrocknung isoliert und als weißes Pulver erhalten.

Cycloadditionsprodukt aus Alkin-7 und Azid-2 8¹

HPLC t_R = 40,1 min, Reinheit: > 97%

$C_{77}H_{127}N_{22}O_{23}PS$; $M_{berechnet}$ = 1790,9 g/mol, ESI-MS: m/z = 1792,9 $[M+2H]^+$

Ausbeute: 28%

Cycloadditionsprodukt aus Alkin-7 und Azid-Dephospho2 9

HPLC t_R = 40,9 min, Reinheit: > 97%

$C_{77}H_{126}N_{22}O_{20}S$; $M_{berechnet}$ = 1710,9 g/mol, ESI-MS: m/z = 856,4 $[M+2H]^{2+}$

Ausbeute: 31%

¹ Das Phosphopeptid MQSpTPL-NT(8-13) **8** wurde freundlicherweise von Frau T. Ramenda zur Verfügung gestellt.

Cycloadditionsprodukt aus Alkin-7 und Azid-Dephospho1 10

HPLC t_R = 40,5 min, Reinheit: > 96%

$C_{82}H_{133}N_{23}O_{21}S$; $M_{\text{berechnet}} = 1808,0$ g/mol, ESI-MS: $m/z = 905,4$ $[M+2H]^{2+}$

Ausbeute: 13%

6.2.3.3 Bindungsassay der Peptid-NT(8-13)-Konjugate ²

Zur Durchführung eines *in vitro*-Bindungsassays wird eine 1 mM Stammlösung des Peptid-Konjugates (**8**, **9** bzw. **10**) in Wasser hergestellt. Aus der Stammlösung wird mit Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1% BSA, 0,5 mM *o*-Phenanthrolin, pH 7,4), der 10% Wasser enthält, auf finale Peptidkonzentrationen von 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 600 nM, 100 nM, 60 nM, 20 nM, 10 nM, 6 nM, 0,6 nM, 0,5 nM und 0,2 nM im Falle des Phosphopeptid-NT(8-13)-Konjugates **8** verdünnt. Für das nicht-phosphorylierte Peptid-NT(8-13)-Konjugat **9** werden folgende Konzentrationen eingesetzt: 10 μ M, 1 μ M, 600 nM, 100 nM, 60 nM, 20 nM, 10 nM, 6 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,2 nM und 0,1 nM. Für das zweite nicht-phosphorylierte Peptid-Konjugat **10** werden die Konzentrationen 10 μ M, 1 μ M, 600 nM, 200 nM, 100 nM, 60 nM, 20 nM, 10 nM, 6 nM, 1 nM, 0,6 nM und 0,2 nM verwendet.

Der Bindungsassay wird an HT-29 Zellen durchgeführt. Konfluente Zellen (ca. $4-7 \times 10^6$ Zellen/ml) werden nach Entfernen des Mediums (McCoy-Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum) dreimal mit Tris-Puffer gewaschen, anschließend vom Boden der Kulturflasche abgeschabt und dann wieder in 8 ml Tris-Puffer resuspendiert und in einem Glashomogenisator homogenisiert. 200 μ l Zellhomogenat werden mit 100 μ l Peptidlösung und 500 μ l Tris-Puffer vermischt, danach 200 μ l [³H]Neurotensin zugegeben und diese Mischung für 30 min bei RT inkubiert. In Gegenwart von 100 nM NT(8-13) erfolgte die Bestimmung der unspezifischen Bindung. Mit Hilfe eines Brandel Cell Harvester (USA) wird eine Filtration über einen Wathman Glasfaserfilter vorgenommen, wodurch die Trennung von gebundenem und freiem Radioliganden [³H]NT erzielt wird. Die Filter werden dreimal mit Tris-Puffer gewaschen, getrocknet und in Szintillationsvials überführt und mit 4 ml Szintillationscocktail (ULTIMA Gold[®], Packard Instruments, USA) versetzt. Mittels Flüssigkeitsszintillationsdetektion (TriCarb[®], Packard Instruments, USA) wird das auf den Filtern zurückgebliebene [³H]NT gemessen.

² Die Bindungsstudien wurden freundlicherweise von Frau S. Lehnert durchgeführt.

6.2.4 Synthese zellpenetrierender Pentapeptide (CPP5) und zugehöriger 4-fluorbenzoylierte Referenzpeptide

Die Darstellung zellpenetrierender Pentapeptide (CPP5) erfolgt analog der allgemeinen Synthesevorschrift automatisiert am Peptidsynthesizer nach Abschnitt 6.2.1.1, sowie deren Entschützung wie in Abschnitt 6.2.1.2 aufgeführt.

Alle zellpenetrierenden Pentapeptide werden mittels HPLC (Macherey-Nagel HPLC-Säule VP250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus) mit einem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0-10 min 10% B, bei 20 min 20% B, bei 40 min 30% B, bei 45 min 50% B analysiert und gereinigt. Für die zugehörigen 4-fluorbenzoylierten Referenzpeptide wird mit einem Gradienten von, 0-5 min 10% B, bei 10 min 25% B, bei 20 min 30% B, bei 30-35 min 50% B und 2 ml/min Flussrate gearbeitet.

VPTLK 11

Ausgehend von 60 mg Fmoc-L-Lys(Boc)-vorgeladenem Wang-Harz wird das CPP5 **11** als weißes Pulver (16 mg, 28,7 μ mol, 71%) erhalten.

HPLC t_R = 17,0 min, Reinheit: > 97%

$C_{26}H_{48}N_6O_7$; $M_{berechnet}$ = 556,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 557,5 [M+H]⁺

VPMLK 12

Mit 50 mg Fmoc-L-Lys(Boc)-vorgeladenem Wang-Harz wird das CPP5 **12** dargestellt und nach Abspaltung und Reinigung als weißes Pulver (6 mg, 10,2 μ mol, 28%) isoliert.

HPLC t_R = 23,5 min, Reinheit: > 97%

$C_{27}H_{50}N_6O_6S$; $M_{berechnet}$ = 586,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 587,5 [M+H]⁺

KLPVM 13

Die Darstellung von Peptid **13** wird an 60 mg Fmoc-L-Met-vorgeladenem PS-PHB-TentaGel-Harz vorgenommen. Nach Abspaltung und Reinigung wird **13** als ein weißes Pulver (19 mg, 32,3 μ mol, 80%) erhalten.

HPLC t_R = 21,9 min, Reinheit: > 97%

$C_{27}H_{50}N_6O_6S$; $M_{berechnet}$ = 586,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 587,5 [M+H]⁺

4FBz-VPTLK 14

Das Referenzpeptid **14** wird ausgehend von 50 mg Fmoc-L-Lys(Boc)-beladenem Wang-Harz nach der allgemeinen Prozedur zur Peptidsynthese dargestellt, wobei die 4-Fluorbenzoesäure ebenso automatisiert mittels der Peptidsynthese-Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien *N*-terminal kondensiert wird. Das reine Peptid **14** wird als weißes Pulver (9 mg, 13,2 μ mol, 46%) isoliert.

HPLC t_R = 26,4 min, Reinheit: > 95%

$C_{33}H_{51}FN_6O_8$; $M_{berechnet}$ = 678,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 679,6 [M+H]⁺

4FBz-VPMLK 15

Ausgehend von 50 mg Fmoc-L-Lys(Boc)-beladenem Wang-Harz wird das Referenzpeptid **15** nach der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese dargestellt, wobei die 4-Fluorbenzoesäure ebenso automatisiert mittels der Peptidsynthese-Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien *N*-terminal kondensiert wird. Peptid **15** ergibt ein weißes Pulver (10 mg, 14,1 μ mol, 44%).

HPLC t_R = 28,0 min, Reinheit: > 97%

$C_{34}H_{53}FN_6O_7S$; $M_{berechnet}$ = 708,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 709,5 [M+H]⁺

4FBz-KLPVM 16

Das Referenzpeptid **16** wird mit 50 mg Fmoc-L-Met-beladenem PS-PHB-TentaGel-Harz als Festphase nach der allgemeinen Prozedur zur Peptidsynthese dargestellt, wobei die 4-Fluorbenzoesäure ebenso automatisiert mittels der Peptidsynthese-Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien *N*-terminal kondensiert wird. Das Peptid **16** wird als weißes Pulver (14 mg, 19,7 μ mol, 60%) erhalten.

HPLC t_R = 29,0 min, Reinheit: > 97%

$C_{34}H_{53}FN_6O_7S$; $M_{berechnet}$ = 708,4 g/mol, ESI-MS: m/z = 709,3 [M+H]⁺

6.2.5 Darstellung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten

Als zellpenetrierende Peptideinheit wurden zum einen das sC18-Peptid, eine von dem kationischen, mikrobiellen Peptid Cathelicidin abgeleitete Sequenz der Abfolge GLRKRLRKFRNKIKEK-NH₂ ausgewählt, sowie die Calcitonin-abgeleitete, verzweigte Peptidsequenz hCT(18-32)-k7, wobei KFHTFPQTAIGVGAP-NH₂ dem hCT(18-32)-

Abschnitt entspricht und k7 mit KKRKAPKKRKFA über den C-terminalen Ala-Rest an die N-terminale ϵ -NH₂-Funktionalität des Lys-Restes der Hauptkette gekuppelt wird.

6.2.5.1 Allgemeine Synthesestrategie zum partiellen Aufbau von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten

*Synthese der zellpenetrierenden Peptideinheiten*³

Die zellpenetrierenden Peptide werden vom C-terminalen Ende an am Rinkamid-Harz mittels eines Peptidsynthesizers aufgebaut. Das Cathelicidin-abgeleitete sC18 wird nach Neundorf *et al.*, 2009 [131] unter Verwendung der Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in 7-fachem Überschuss für 40 min pro Kupplungszyklus dargestellt. Jede Aminosäure wird dabei doppelt gekuppelt. Auch das hCT(18-32)-k7 wird unter gleichen Bedingungen synthetisiert. Zusätzlich wird die Verzweigung durch Hydrazinolyse der Dde- (1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl) Schutzgruppe an der Seitenkette des Lys¹⁸ erreicht, wobei das Lys-reiche k7-Fragment in einer weiteren automatisierten SPPS eingeführt wird [124].

Während der automatisierten Peptidsynthese der zellpenetrierenden Peptide sC18 und hCT(18-32)-k7 werden die C-terminalen Aminosäuren Lys und Pro des Phosphopeptides MQSpTPL **2** mittels Inkubation für 1 h mit 10 äq. DIC und 10 äq. HOBt auf 5 äq. Aminosäure eingebaut.

Manuelle Kupplung von Fmoc-monobenzylisiertem Phosphothreonin

Die manuelle Kupplung des pThr-Bausteines Fmoc-L-Thr(PO(OBzl)-OH)-OH wird mit dem Quellen des PL-sC18- bzw. PL-hCT(18-32)-k7-Rinkamidharzes für 15 min in 1 ml DMF eingeleitet. Unterdessen wird eine 0,5 M Aminosäurelösung vorbereitet, die mit den Aktivierungs- und Kupplungsreagenzien versetzt wird. Dazu werden 5 äq. pThr, 5 äq. HBTU und 5 äq. HOBt in 150 μ l DMF gelöst. Das gequollene Peptidylharz wird mit der Kupplungslösung versetzt, anschließend werden 15 äq. DIPEA direkt zum Kupplungsansatz gegeben und bei Raumtemperatur für 2 h geschüttelt. Die Kupplung wird ein weiteres Mal wiederholt, bevor mit je fünfmal 2 ml DMF, CH₂Cl₂, MeOH und Et₂O gewaschen wird.

³ Die zellpenetrierenden Peptideinheiten PL-sC18 und PL-hCT(18-32)-k7 wurden freundlicherweise von Frau Dr. I. Neundorf (Institut für Biochemie, Universität Leipzig) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Kupplung der Sequenz Met-Gln-Ser an die phosphorylierten Peptidylharze

Die N-terminalen Aminosäuren Ser, Gln und Met des Phosphopeptides werden wiederum automatisiert nach der allgemeinen Darstellungsvorschrift in Kapitel 6.2.1.1 gekuppelt. Aber auch mit Verwendung von DIC/HOBt 10 äq./10 äq. pro 5 äq. Aminosäure und einer Reaktionszeit für 1 h bei RT in Doppelkupplungen kann eine erfolgreiche Sequenzverlängerung erreicht werden. Die Abspaltung der Peptide vom Harz und Entschützung der Aminosäureseitenketten erfolgt analog der in Kapitel 6.2.1.2 enthaltenen Vorschrift. Die Analyse und Reinigung der damit erhaltenen Phosphopeptid-CPP-Konjugate wird mit folgenden HPLC-Bedingungen vorgenommen: Macherey-Nagel HPLC-Säule VP250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus mit einem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0 min 20% B, bei 20 min 60% B.

MQSpTPL-sC18 2-CPP1

Unter Verwendung von 30 mg Rinkamid-Harz wird **2-CPP1** als weißes Pulver (28 mg, 10,0 µmol, 67%) erhalten.

HPLC t_R = 9,3 min, Reinheit: > 95%

$C_{120}H_{217}N_{42}O_{31}PS$; $M_{\text{berechnet}} = 2805,6$ g/mol,

ESI-MS: $m/z = 936,3 [M+3H]^{3+}$, $702,5 [M+4H]^{4+}$

MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 2-CPP2

Ausgehend von 30 mg Rinkamid-Harz wird **2-CPP2** als weißes Pulver (32 mg, 8,2 µmol, 55%) isoliert.

HPLC t_R = 9,3 min, Reinheit: > 95%

$C_{176}H_{294}N_{53}O_{43}PS$; $M_{\text{berechnet}} = 3901,2$ g/mol,

ESI-MS: $m/z = 1302,1 [M+3H]^{3+}$, $976,5 [M+4H]^{4+}$

Manuelle Kupplung von 4-Fluorbenzoesäure

Die N-terminale manuelle Synthese der 4-Fluorbenzoesäure an die Phosphopeptid-CPP-Harze wird in Analogie zur Kupplung des pThr durchgeführt. Für die Aktivierung und Kupplung werden jedoch 5 äq. HBTU, 5 äq. HOBt und 10 äq. DIPEA eingesetzt. Nach der im Kapitel 6.2.1.2 aufgeführten Prozedur werden die Phosphopeptid-CPP-Konjugate vom Harz gespalten und die Aminosäureseitenketten entschützt.

Die 4-Fluorbenzoyl-derivatisierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate werden mittels HPLC (Macherey-Nagel HPLC-Säule VP250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus) und

einem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0 min 10% B, bei 20 min 50% B, bei 25-30 min 60% B analysiert und gereinigt.

4-FBz-MQSpTPL-sC18 2-CPP3

Mit 15 mg Rinkamid-Harz wird **2-CPP3** als weißes Pulver (3 mg, 1,0 μ mol, 7%) erhalten.

HPLC t_R = 19,5 min, Reinheit: > 95%

$C_{127}H_{220}FN_{42}O_{32}PS$; $M_{\text{berechnet}} = 2927,6$ g/mol,

ESI-MS: $m/z = 977,0 [M+3H]^{3+}$, $733,1 [M+4H]^{4+}$

4-FBz-MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 2-CPP4

Ausgehend von 15 mg Rinkamid-Harz wird **2-CPP4** als weißes Pulver (5 mg, 1,2 μ mol, 8%) isoliert.

HPLC t_R = 19,0 min, Reinheit: > 95%

$C_{183}H_{297}FN_{53}O_{44}PS$; $M_{\text{berechnet}} = 4023,2$ g/mol,

ESI-MS: $m/z = 1347,4 [M+3H]^{3+}$, $1010,8 [M+4H]^{4+}$

6.2.5.2 Probeabspaltung

Nach jeder Synthesestufe werden wenige Peptidylharzkügelchen in einem Eppendorf Vial mit 100 μ l Abspaltcocktail (TFA/Wasser/Thioanisol/EDT 87:5:5:3) versetzt, kurz zentrifugiert (4°C, 8000 g) und für 4h bei RT zur Reaktion gebracht. Die Peptidfällung des Peptids wird durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Diethylether erreicht; zur Vollständigkeit der Fällung wird 30 min auf Eis gestellt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (2 min, 4°C, 8000 g) und der Überstand verworfen. Das Spaltreagenz wird durch 5-8 maliges Waschen mit je 1 ml eiskaltem Diethylether und abzentrifugieren (2 min, 4°C, 8000 g) vom Peptid entfernt. Das Präzipitat wird in 100 μ l Wasser/*t*BuOH 3:1 gelöst und mittels HPLC analysiert. Dabei kommen die HPLC-Bedingungen zum Einsatz, die für die jeweiligen Phosphopeptid-CPP-Konjugate **2-CPP1-4** bereits beschrieben wurden.

6.2.6 Fluoreszenzmarkierung von Phosphopeptiden und Phosphopeptid-CPP-Konjugaten

Die Fluoreszenzmarkierung wird mit dem Fluorophor 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) am Harz vorgenommen, wie von Weber *et al.*, 1998 vorgestellt [156]. Die Markierung wird durch Quellen des vollständig Seitenketten-geschützten Peptidylharzes in 1 ml DMF für 15 min vorbereitet. Es werden 1,5 äq. CF mittels der Kupplungsagenzien HATU (1,5 äq.) und DIPEA (1,5 äq.) in DMF als Lösungsmittel für 3 h zur Reaktion gebracht. Dabei wird bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Licht gearbeitet. Die Kupplung wird wiederholt und anschließend mit je fünfmal 2 ml DMF, CH₂Cl₂, MeOH und Diethylether gewaschen.

Die Entschützung und Isolierung der Peptide wird analog der allgemeinen Vorschrift in den Kapiteln 6.2.1.2 – 6.2.1.5 durchgeführt. Die Reinigung mittels HPLC gelingt mit dem Gradienten bestehend aus Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B): 2 ml/min, 0 min 20% B, bei 30 min 90% B. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende CF-markierte Peptide dargestellt:

CF-MQSpTPL-sC18 CF-2-CPP1

CF-2-CPP1 wird als gelbes Pulver zu 7 mg (2,2 µmol, 20%) isoliert.

HPLC: $t_R = 16,0$ min, Reinheit: > 97%

$C_{141}H_{227}N_{42}O_{37}PS$; $M_{berechnet} = 3163,7$ g/mol,

ESI-MS: $m/z = 1055,8 [M+3H]^{3+}$, $792,1 [M+4H]^{4+}$

CF-MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 CF-2-CPP2

Es werden 4 mg (0,9 µmol, 8%) **CF-2-CPP2** als gelbes Pulver synthetisiert.

HPLC: $t_R = 16,6$ min, Reinheit: > 97%

$C_{197}H_{304}N_{53}O_{49}PS$; $M_{berechnet} = 4259,2$ g/mol,

ESI-MS: $m/z = 1421,4 [M+3H]^{3+}$, $1066,2 [M+4H]^{4+}$

CF-MQSpTPL CF-2

Es werden 4 mg (3,6 µmol, 18%) **CF-2** als gelbes Pulver isoliert.

HPLC: $t_R = 19,7$ min, Reinheit: > 97%

$C_{49}H_{60}N_7O_{19}PS$; $M_{berechnet} = 1113,3$ g/mol, ESI-MS: $m/z = 1114,2 [M+H]^+$

6.2.7 Biologische Untersuchungen der fluoreszenzmarkierten Phosphopeptid-CPP-Konjugate ⁴

6.2.7.1 Zellkultur

Für die biologischen Untersuchungen der CF-markierten Phosphopeptide werden HeLa Zellen (humane Zervixepithelkarzinomzelllinie), MCF-7 (humane Adenobrustkarzinomzelllinie) und HT-29 (humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie) Zellen bei 37°C und in 5% CO₂-Atmosphäre bei 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Nährmedium fungiert für HeLa Zellen RPMI 1640 mit L-Glutamin und 10%igem hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS), Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium/Ham's F12 (ohne L-Glutamin) und mit Zusatz von 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum und 1% L-Glutamin für MCF-7 Zellen, sowie Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 10%igem hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum für HT-29.

Zur Durchführung mikroskopischer Studien werden die Zellen in 8-Well-Platten mit Glasboden der Firma ibidi GmbH (Deutschland) gesät. Die weitere Kultivierung der Zellen für Durchflusszytometrie-Untersuchungen erfolgt in 96-Well-Mikrotiterplatten. Die Ablösung der Zellen wird zuvor mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS) erreicht.

6.2.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Subkonfluente Zellen werden mit 50 µM CF-markiertem Phosphopeptid **CF-2-CPP1**, **CF-2-CPP2** und **CF-2** bei Verwendung von HeLa und MCF-7 Zellen bzw. 25 µM **CF-2-CPP1**, **CF-2-CPP2** und **CF-2** für HT-29 Zellen in OptiMEM für 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne wird 10 min vor Beendigung der Peptidinkubation das Bisbenzimid H 33342 zugefügt. Dann werden die Peptidlösungen entfernt und die Zellen zum Quenchen der externen CF-Fluoreszenz für 1 min mit Trypanblau (6,5 mM in Natriumacetat-Puffer, pH 4,5) behandelt. Es wird zweimal mit je 300 µl OptiMEM gewaschen und abschließend je 100 µl HBSS Nährlösung (Hank's balanced salt solution) zugefügt, bevor die mikroskopische Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200 mit ApoTome durchgeführt werden.

6.2.7.3 Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der Peptidinternalisierung wird mit dem Durchflusszytometer CyFlow ML der Firma Partec (Deutschland) angefertigt. Die Internalisierung von **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** wird wiederum in HeLa, MCF-7 und HT-29 Zellen

⁴ Die biologischen Untersuchungen mit den CF-markierten Phosphopeptiden wurden freundlicherweise von Frau K. Löbner (Institut für Biochemie, Universität Leipzig) durchgeführt.

untersucht. Dazu werden 25 μM Peptidlösungen in OptiMEM hergestellt und mit den Zellen bei 37°C für 60 min inkubiert. Nach Abnahme der Peptidlösungen wird die externe Fluoreszenz durch 1-minütige Behandlung mit Trypanblau (0,13 mM in Natriumacetat-Puffer, pH 4,4) gequenchet, im Anschluss werden die Zellen mit je 300 μl OptiMEM gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS) abgelöst. Die Resuspension der Zellen erfolgt in kaltem Zellmedium, dann wird mit kaltem HBSS verdünnt. Die Messungen werden als Duplikat mit einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 488 nm bzw. 510 ± 10 nm durchgeführt, wobei wenigstens 10000 Zellen gezählt werden.

6.2.7.4 Resazurin-Zytotoxizitätsassay [177]

Die Phosphopeptid-CPP-Konjugate **CF-2-CPP1** und **CF-2-CPP2** werden auf ihre Zytotoxizität gegenüber der untersuchten Zelllinie MCF-7 auf der Grundlage eines Resazurin-basierten *in vitro* Toxizitätsassay-Kits (Sigma-Aldrich, Deutschland) getestet. Nachdem die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten bis zur Subkonfluenz gewachsen sind, wird für 24 h unter Standardwachstumsbedingungen mit Peptidlösungen von 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 μM in Zellkulturmedium inkubiert. Als Negativkontrolle werden unbehandelte Zellen eingesetzt; die Positivkontrolle wird durch Zellen repräsentiert, die 10 min mit 70% EtOH behandelt wurden. Vor Anschluss der Inkubation mit einer 10% Resazurin-Lösung in Zellkulturmedium ohne fötales Kälberserum für 2 h bei 37°C werden die Zellen einem Waschschrift mit Zellkulturmedium ohne FKS unterzogen. Mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers Spectrafluor plus multiwell reader (Tecan, Deutschland) wird nachfolgend die Umwandlung von Resazurin zu reduziertem Resorufin bei 595 nm (Anregungswellenlänge: 550 nm) gemessen.

6.2.8 Radiomarkierung mit *N*-Succinimidyl-4-¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB)

6.2.8.1 Darstellung von *N*-Succinimidyl-4-¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB)

Das bifunktionelle Markierungsagens *N*-Succinimidyl-4-¹⁸F]fluorbenzoat ([¹⁸F]SFB) wird in einer dreistufigen Reaktion nach Mäding *et al.*, 2005 synthetisiert [132], wobei das Produkt in 3 ml MeCN-Lösung vorliegt. Dabei werden radiochemische Ausbeuten im Rahmen von 25-30% (zerfallskorrigiert) erreicht; die spezifische Aktivität beträgt 20-40 GBq/μmol. Für alle im Anschluss aufgeführten Peptidmarkierungen wird das Lösungsmittel bis auf ein Volumen von 50 - 100 μl im Stickstoffstrom bei 75°C eingeeengt.

6.2.8.2 Radiomarkierung von Phosphopeptiden mit [¹⁸F]SFB

6.2.8.2.1 Zeit- und pH-Abhängigkeit der ¹⁸F-Fluorbenzoylierung (niedriges Aktivitätsniveau)

Die *N*-terminale Einführung eines [¹⁸F]Fluorbenzoylrestes wird am Heptaphosphopeptid **1** vorgenommen und unter Verwendung des Phosphopeptides **2** in Abhängigkeit vom pH-Wert an zwei verschiedenen Phosphatpuffer-Systemen getestet. Dazu werden 0,5 mg des Phosphopeptides **1** (0,6 μmol) in je 300 μl Kolthoff KH₂PO₄-Boratpuffer (pH 8,4) gelöst, mit 100 μl [¹⁸F]SFB (36 MBq) versetzt und bei RT für 30 min bzw. bei 40°C für 20 min zur Reaktion gebracht. Aliquote der Reaktionsgemische werden mittels HPLC mit der Zorbax 300 SB-C18 Säule (250 x 9,4 mm, 5 μm) und den Laufmitteln Wasser/0,05% TFA (A) und MeCN/0,04% TFA (B) analysiert, wobei ein Gradient von 0 min 10% B, bei 5 min 25% B, bei 15 min 30% B und bei 25-35 min 50% B bei 2 ml/min eingesetzt wird.

[¹⁸F]FBz-PMQSpTPL [¹⁸F]3 HPLC *t_R* = 20,3 min

Für das Hexapeptid **2** werden 0,5 mg (0,6 μmol) in 300 μl Kolthoff KH₂PO₄-Boratpuffer (pH 7,6 oder 8,4) bzw. 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) gelöst und mit [¹⁸F]SFB (42-65 MBq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei 40°C inkubiert. Es werden Aliquote nach 5, 35, 60, 90 min (Reaktion in Kolthoff-Puffer pH 7,6), nach 5, 15, 30 min (Reaktion in Kolthoff-Puffer pH 8,4) und nach 5, 32, 60 min (Reaktion in Na₂HPO₄-Puffer pH 9,0) entnommen. Die Proben der Reaktionsgemische werden mittels HPLC unter Verwendung der Zorbax 300 SB-C18 Säule (250 x 9,4 mm, 5 μm) mit den Laufmitteln Wasser/0,05% TFA (A) und MeCN/0,04% TFA (B) analysiert, wobei bei 2 ml/min Flussgeschwindigkeit ein Gradient von 0 min 10% B, bei 5 min 25% B, bei 15 min 30% B, bei 25-35 min 35% B und bei 40 min 50%B zum Einsatz kommt.

[¹⁸F]FBz-MQSpTPL [¹⁸F]4 HPLC $t_R = 16,7$ min

6.2.8.2.2 ¹⁸F-Fluorbenzoylierung auf hohem Aktivitätsniveau

In einem Eppendorf-Protein-LoBind-Tube werden 0,5 mg (0,6 µmol) MQSpTPL **2** in 300 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) gelöst und 1000-2000 MBq [¹⁸F]SFB in 50 µl Acetonitril zugegeben. Nach Reaktion bei 40°C für 30 min wird eine semipräparative Trennung mittels der Macherey-Nagel HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus unter Verwendung von Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B) bei einer Flussrate von 2 ml/min und dem Gradienten 0 min 20% B, bei 10 min 25% B, bei 30-35 min 35% B und bei 40 min 50% B angeschlossen. Die Fraktionen, die das gewünschte radiomarkierte Peptid [¹⁸F]4 enthalten, werden gesammelt und bei 40°C am Rotationsverdampfer im Vakuum eingengt. Zur radiopharmakologischen Charakterisierung wird [¹⁸F]4 wieder in Saline gelöst.

[¹⁸F]FBz-MQSpTPL [¹⁸F]4

HPLC	$t_R = 33,3$ min
Synthesezeit ab Verfügbarkeit des [¹⁸ F]SFB:	95-109 min
Radiochemische Ausbeute (RCA):	25-28% (zerfallskorrigiert)
Radiochemische Reinheit (RCR):	> 97%

6.2.8.3 Radiomarkierung von nicht-phosphorylierten Peptidanaloga mit [¹⁸F]SFB

6.2.8.3.1 pH-Abhängigkeit der ¹⁸F-Fluorbenzoylierung (niedriges Aktivitätsniveau)

Das nicht-phosphorylierte Peptid MQSTPL **Dephospho-2** wird in Abhängigkeit des pH-Wertes in zwei unterschiedlichen Phosphatpuffersystemen ¹⁸F-fluorbenzoyliert. Es wird eine Lösung aus 0,5 mg (0,7 µmol) **Dephospho-2** in 300 µl Kolthoff KH₂PO₄-Boratpuffer (pH 7,6 oder 8,4) bzw. 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) hergestellt und sogleich 30-100 MBq [¹⁸F]SFB in 100 µl Acetonitril zugefügt. Nach Reaktion bei 40°C über 30 min werden der Reaktionsmischung Aliquote entnommen und mittels HPLC untersucht. Dazu werden folgende Parameter verwendet: Macherey-Nagel HPLC-Säule EC 250/4,6, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus, Laufmittel: Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B), Flussrate: 1 ml/min, Gradient: 0 min 20% B, 15 min 50% B, 35 min 55% B, 40 min 60% B.

[¹⁸F]FBz-MQSTPL [¹⁸F]Dephospho-4 HPLC $t_R = 11,9$ min

6.2.8.3.2 ¹⁸F-Fluorbenzoylierung auf hohem Aktivitätsniveau

Zu 0,7 mg (1,0 µmol) MQSTPL **Dephospho-2**, welches in ein Eppendorf Protein-LoBind-Tube eingewogen und in 300 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) gelöst ist, werden 1000-2000 MBq [¹⁸F]SFB in 75 µl Acetonitril zugefügt. Die Reaktion wird bei 40°C und 30 min durchgeführt und anschließend mittels der Macherey-Nagel HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus unter Verwendung der Laufmittel Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B) semipräparativ getrennt. Es wird bei einer Flussrate von 2 ml/min und dem Gradienten 0-5 min 30% B, bei 15 min 35% B, bei 35 min 55% B und bei 40 min 60% B gearbeitet. Die Fraktionen, die das gewünschte radiomarkierte Peptid [¹⁸F]Dephospho-4 enthalten, werden gesammelt und bei 40°C am Rotationsverdampfer im Vakuum eingengt. Zur radiopharmakologischen Charakterisierung wird [¹⁸F]Dephospho-4 wieder in Saline gelöst.

[¹⁸F]FBz-MQSTPL [¹⁸F]Dephospho-4

HPLC	t _R = 20,2 min
Synthesezeit ab Verfügbarkeit des [¹⁸ F]SFB:	75-83 min
Radiochemische Ausbeute (RCA):	18-33% (zerfallskorrigiert)
Radiochemische Reinheit (RCR):	> 97%

6.2.8.4 Radiomarkierung von zellpenetrierenden Pentapeptiden

In einem Eppendorf-Protein-LoBind-Tube werden 0,5 mg (0,9 µmol) VPTLK **11**, VPMLK **12**, bzw. KLPVM **13** in 300 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) gelöst und 30-100 MBq (analytisch) bzw. 250-1000 MBq (präparativ) [¹⁸F]SFB in 50 µl Acetonitril zugegeben. Nach Reaktion bei 40°C für 30 min wird ein Aliquot des Reaktionsgemisches mittels HPLC analytisch ausgewertet. Dazu wird die Macherey-Nagel HPLC-Säule EC 250/4,6, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus und das Laufmittel Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B) bei einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt. Für das ¹⁸F-fluorbenzoylierte Peptid VPTLK [¹⁸F]**14** wird ein Gradient von 0 min 10% B, 15 min 50% B, 35 min 55% B, 40 min 60% B verwendet und die Peptide [¹⁸F]FBz-VPMLK [¹⁸F]**15** und [¹⁸F]FBz-KLPVM [¹⁸F]**16** werden mit dem Gradienten 0 min 10% B, 15 min 50% B, 20 min 51,2% B, 25 min 60% B eluiert.

[¹⁸ F]FBz-VPTLK [¹⁸ F] 14	HPLC t _R = 13,2 min
[¹⁸ F]FBz-VPMLK [¹⁸ F] 15	HPLC t _R = 14,3 min
[¹⁸ F]FBz-KLPVM [¹⁸ F] 16	HPLC t _R = 13,6 min

Das CPP5 VPTLK **11** wird für anschließende Zellaufnahmeuntersuchungen mit einer Macherey-Nagel HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus unter Verwendung von Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B) als Laufmittel bei einer Flussrate von 2 ml/min und dem Gradienten 0-5 min 30% B, bei 15 min 35% B, bei 35 min 55% B und bei 40 min 60% B semipräparativ getrennt. Die Fraktionen, die das gewünschte radiomarkierte Peptid [¹⁸F]**14** enthalten, werden gesammelt und bei 40°C am Rotationsverdampfer im Vakuum eingengt.

[¹⁸F]FBz-VPTLK [¹⁸F]**14**

HPLC	t _R = 15,1 min
Synthesezeit ab Verfügbarkeit des [¹⁸ F]SFB:	67-99 min
Radiochemische Ausbeute (RCA):	14-19% (zerfallskorrigiert)
Radiochemische Reinheit (RCR):	> 95%

6.2.8.5 Radiomarkierung von Phosphopeptid-CPP-Konjugaten

6.2.8.5.1 ¹⁸F-Fluorbenzoylierung nach klassischer Methodik (niedriges Aktivitätsniveau)

Die N-terminale Einführung eines [¹⁸F]Fluorbenzoylrestes wird am Phosphopeptid-Konjugat MQSpTPL-sC18 **2-CPP1** in Abhängigkeit vom pH-Wert an drei verschiedenen Phosphatpuffer-Systemen zu verschiedenen Zeitpunkten getestet. Dazu werden 0,5 mg des Konjugates **2-CPP1** (0,2 µmol) in je 300 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9), 300 µl Sörensen-Phosphatpuffer (pH 8,0) bzw. 300 µl Kolthoff-KH₂PO₄-Boratpuffer (pH 7,6) gelöst, mit 70 µl [¹⁸F]SFB (30-200 MBq) versetzt und bei 40°C zur Reaktion gebracht. Aliquote der Reaktionsgemische werden mittels HPLC mit der Macherey-Nagel-HPLC Säule EC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 PPN und den Laufmitteln Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B) analysiert, wobei ein Gradient von 0 min 20% B, bei 15 min 50% B, bei 20 min: 51,2% B und bei 25 min: 60% B bei 1 ml/min eingesetzt wird.

[¹⁸F]FBz-MQSpTPL-sC18 [¹⁸F]**2-CPP3** HPLC t_R = 8,4 min

6.2.8.5.2 ¹⁸F-Fluorbenzoylierung nach klassischer Methodik (hohes Aktivitätsniveau-1)

In einem Eppendorf-Protein-LoBind-Tube werden 0,5 mg (0,2 µmol) MQSpTPL-sC18 **2-CPP1** in 300 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) gelöst und 1000-2000 MBq [¹⁸F]SFB in 70 µl Acetonitril zugegeben. Nach Reaktion bei 40°C für 25 min wird eine semipräparative Trennung mittels der Macherey-Nagel-HPLC-Säule VP 250/10,

Nucleosil 100-5 C18, Nautilus unter Verwendung von Wasser/0,1% TFA (A) und MeCN/0,1% TFA (B) bei einer Flussrate von 2 ml/min und dem Gradienten 0 min 10% B, bei 10 min 25% B, bei 30-35 min 35% B und bei 40 min 50% B angeschlossen. Die Fraktionen, die das gewünschte radiomarkierte Peptid [¹⁸F]2-CPP3 enthalten, werden gesammelt und bei 40°C am Rotationsverdampfer der Firma Büchi (Deutschland) im Vakuum eingengt. Zur radiopharmakologischen Charakterisierung wird [¹⁸F]2-CPP3 in Saline gelöst. Für analytische Zwecke wird ein Gradient mit 3 ml/min, 0-5 min bei 5% B, 15-20 min bei 95% B, 25-30 min 5% B verwendet.

[¹⁸F]FBz-MQSpTPL-sC18 [¹⁸F]2-CPP3

HPLC	t _R = 27,6 min (semipräparativ)
	t _R = 12,4 min (analytisch)
Synthesezeit ab Verfügbarkeit des [¹⁸ F]SFB:	81 min
Radiochemische Ausbeute (RCA):	2% (zerfallskorrigiert)
Radiochemische Reinheit (RCR):	> 98%

6.2.8.5.3 ¹⁸F-Fluorbenzoylierung nach klassischer Methodik (hohes Aktivitätsniveau-2)

In einem Eppendorf-Protein-LoBind-Tube werden 0,4 mg (0,1 µmol) MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 2-CPP2 in 200 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9,0) gelöst. Nach Zugabe von 1000-2000 MBq [¹⁸F]SFB in 50 µl Acetonitril erfolgt eine Reaktion bei 60°C für 10 min. Das Reaktionsgemisch wird anschließend semipräparativ mittels der Macherey-Nagel-HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus unter Verwendung von Wasser/0,2% TFA (A) und MeOH (B) bei einer Flussrate von 2 ml/min und dem Gradienten 0 min 15% B, bei 8 min 60% B, bei 9-22 min: 80% B getrennt. Die Fraktionen, die das gewünschte radiomarkierte Peptid [¹⁸F]2-CPP4 enthalten, werden gesammelt und bei 50°C am Rotationsverdampfer der Firma Büchi (Deutschland) im Vakuum eingengt. Zur radiopharmakologischen Charakterisierung wird [¹⁸F]2-CPP4 in Saline gelöst.

[¹⁸F]FBz-MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 [¹⁸F]2-CPP4

HPLC	t _R = 16,1 min (semipräparativ)
	t _R = 16,2 min (analytisch)
Synthesezeit ab Verfügbarkeit des [¹⁸ F]SFB:	49-58 min
Radiochemische Ausbeute (RCA):	2-4% (zerfallskorrigiert)
Radiochemische Reinheit (RCR):	> 91%

6.2.8.5.4 ¹⁸F-Fluorbenzoylierung mittels Mikrofluidik-Technik (niedriges Aktivitätsniveau)

Für die Mikrofluidik-Markierung der Phosphopeptid-CPP-Konjugate **2-CPP1**⁵ und **2-CPP2** wird das Mikrofluidik-System von Advion NanoTek (USA) verwendet und ein Mikroreaktor mit folgenden Dimensionen: 100 µm Durchmesser, 8 m Länge, 64 µl Gesamtvolumen.

In einem typischen Experiment wird Spritzenpumpe 1 mit einem Gesamtvolumen von 1 ml mit einer Lösung 0,8 mg (0,2 µmol) MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 **2-CPP2** in 500 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9) gefüllt. In Spritzenpumpe 3, die ein Fassungsvermögen von 0,5 ml aufweist, wird 100-200 MBq [¹⁸F]SFB in 500 µl MeCN vorgelegt. Für eine Reaktion werden 15 µl der [¹⁸F]SFB-Lösung aus Spritzenpumpe 3 im Volumen-Verhältnis 1:1, 1:2 oder 1:3 zur Peptidlösung aus Spritzenpumpe 1 gleichzeitig mit Flussraten von 4 µl/min oder 10 µl/min bei verschiedenen Temperaturen in den Mikroreaktor gepumpt. Für das Peptid-Konjugat MQSpTPL-sC18 **2-CPP1** werden 1,7 mg (0,6 µmol)/500 µl 0,05 M Na₂HPO₄-Puffer (pH 9) verwendet und bei einer Flussrate von 5 µl/min mit dem [¹⁸F]SFB aus Spritzenpumpe 3 im Volumen-Verhältnis 2:1 im Mikroreaktor bei 40°C und 60°C zusammengeführt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktionslösung aus dem Reaktor gepumpt und der Reaktor anschließend gereinigt.

Das Reaktionsgemisch wird mittels der Beckman-Coulter-HPLC-Anlage analysiert. Dazu findet die Macherey-Nagel-HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus unter Verwendung von Wasser/0,2% TFA (A) und MeOH (B) bei einer Flussrate von 2 ml/min und dem Gradienten (1) 0 min 15% B, bei 8 min 60% B, bei 9-22 min 80% B Anwendung. Zudem wird ein alternativer Gradient (2) für die Überprüfung der Radiomarkierung des Peptides **2-CPP1** eingesetzt mit 2 ml/min Flussrate, bei 0 min 15% B, 12 min 60% B, 15-18 min 70% B, 19-25 min 80% B.

6.2.8.5.5 ¹⁸F-Fluorbenzoylierung mittels Mikrofluidik-Technik (hohes Aktivitätsniveau)

Das Advion NanoTek Mikrofluidik-System (USA) steht für die präparative Mikrofluidik-Radiomarkierung mittels [¹⁸F]SFB zur Verfügung. Es kommt ein Mikroreaktor mit folgenden Dimensionen: 100 µm Durchmesser, 8 m Länge, 64 µl Gesamtvolumen zum Einsatz, sowie für die optimierte Radiomarkierung von **2-CPP1** ein zusätzlicher 32 µl-Reaktor.

⁵ Alle Arbeiten zur Radiomarkierung des Phosphopeptid-Konjugates **2-CPP1** im Mikrofluidik-System wurden freundlicherweise von Herrn Dr. V. Bouvet durchgeführt.

Für einen präparativen Ansatz werden Spritzenpumpe 1 mit einer Lösung aus 0,8 mg MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 **2-CPP2** (0,3 μmol) bzw. 100 μl einer Stammlösung (28,4 mg/500 μl Wasser) von MQSpTPL-sC18 **2-CPP1** in 500 μl 0,05 M Na_2HPO_4 -Puffer (pH 9) und Spritzenpumpe 3 mit 100-300 MBq [^{18}F]SFB in 500 μl MeCN befüllt. Während für den präparativen Ansatz des Konjugates **2-CPP2** 316 μl Gesamtvolumen, was einer Gesamtpeptidmenge von 0,5 mg entspricht, eingesetzt werden, finden 340 μl des Konjugates **2-CPP1** mit einer Gesamtpeptidmenge von 3,2 mg Verwendung. Die Reaktionstemperatur beträgt 40°C bzw. 60°C. Das Reaktionsgemisch wird mittels der Beckman-Coulter HPLC-Anlage analysiert und semipräparativ getrennt. Dazu wird die Macherey-Nagel HPLC-Säule VP 250/10, Nucleosil 100-5 C18, Nautilus unter Verwendung von Wasser/0,2% TFA (A) und MeOH (B) bei einer Flussrate von 2 ml/min und dem Gradienten (1) 0 min 15% B, bei 8 min 60% B, bei 9-22 min 80% B zur Reinigung des Reaktionsgemisches der Radiomarkierung von **2-CPP2** eingesetzt. [^{18}F]**2-CPP3** wird mit dem Gradienten (2) gereinigt: 2 ml/min Flussrate, bei 0 min 15% B, 12 min 60% B, 15-18 min 70% B, 19-25 min 80% B.

[^{18}F]FBz-MQSpTPL-sC18 [^{18}F]2-CPP3

HPLC (Gradient (1) bzw. (2))	$t_R = 15,6$ min bzw. 18,2 min (semipräparativ)
	$t_R = 15,6$ min bzw. 18,2 min (analytisch)
Synthesezeit ab Verfügbarkeit des [^{18}F]SFB:	100 min
Radiochemische Ausbeute (RCA):	21% (zerfallskorrigiert)
Radiochemische Reinheit (RCR):	> 98%

[^{18}F]FBz-MQSpTPL-hCT(18-32)-k7 [^{18}F]2-CPP4

HPLC	$t_R = 16,2$ min (semipräparativ)
	$t_R = 16,2$ min (analytisch)
Synthesezeit ab Verfügbarkeit des [^{18}F]SFB:	156 min
Radiochemische Ausbeute (RCA):	26% (zerfallskorrigiert)
Radiochemische Reinheit (RCR):	> 98%

6.2.9 Radiopharmakologische Untersuchungen ⁶

Alle radiopharmakologischen Studien werden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Dresden durchgeführt.

6.2.9.1 Zellkultur

¹⁸F-markierte Peptide werden an FaDu (humane Plattenepithelkarzinomzelllinie), MCF-7 (humane Adenobrustkarzinomzelllinie) und HT-29 (humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie) Zellen radiopharmakologisch untersucht.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt in einem Brutschrank bei 37°C und in 5% CO₂-Atmosphäre bei 95% Luftfeuchtigkeit. Es werden je nach Zelllinie folgende Nährmedien verwendet: HeLa Zellen in RPMI-Medium mit 10%igem hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum, Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 10% hitze-inaktiviertem, fötalem Kälberserum für MCF-7 Zellen, sowie McCoy-Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum für HT-29.

6.2.9.2 *In vitro* Zellaufnahmestudien

Für Zellaufnahmeuntersuchungen werden FaDu (humane Plattenepithelkarzinomzelllinie), HT-29 (humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie) und MCF-7 (humane Brustkrebszelllinie) Zellen verwendet.

Dazu werden Peptidlösungen bestehend aus dem ¹⁸F-fluorbenzoylierten Peptid (1,0 - 12,5 MBq) in 27 ml McCoy-Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum für HT-29 Zellen, in 27 ml RPMI-Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum für FaDu, sowie in 27 ml DMEM mit 10%igem fötalem Kälberserum und ohne Glucose für MCF-7 Zellen hergestellt. Es werden 500 µl dieser Inkubationslösungen pro well einer 24 well-Platte aufgetragen und bei 4°C und 37°C für 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min inkubiert. Anschließend wird die Zellaufnahme mit 1 ml eiskaltem PBS (pH 7,2) gestoppt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in je 500 µl 0,1 M NaOH Lösung, die mit 1% Natriumdodecylsulfat versetzt ist, verdünnt. Die Radioaktivität der Zellextrakte wird mit dem Cobra™ II Auto-Gamma-Counter der Firma Canberra-Packard (USA) gemessen. Die Proteinbestimmung der totalen Proteinkonzentration in den Proben wird mittels der Pierce BCA (Bicinchoninic Acid)-Methode unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Proteinstandard bestimmt. Die Werte der

⁶ Die radiopharmakologischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Frau M. Barth und Frau M. Lehnert (Zellaufnahmen), sowie Herrn B. Trayner (Zellaufnahmen am CCI, Edmonton, Kanada), Frau A. Suhr (Stabilitätsuntersuchungen), Frau R. Herrlich (Bioverteilung), Herrn Dr. R. Bergmann (Kleintier-PET) und Frau Dr. M. Wüst (Kleintier-PET am CCI, Edmonton, Kanada) durchgeführt.

Zellaufnahme werden in Prozent der injizierten Dosis pro μg Protein ($\%ID/\mu\text{g}$ Protein) ausgedrückt.

6.2.9.3 Untersuchungen zur metabolischen Stabilität *in vitro*

Die *in-vitro*-Stabilität ^{18}F -fluorbenzoylierter Peptide wird in Vollblut und Plasma von Wistar-Unilever Ratten bestimmt. Dazu werden 400 μl Blut oder Plasma mit 50 μl (1 MBq) des radioaktiven Peptides für 5, 30 und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Blutproben werden umgehend für 3 min bei 13000 g zentrifugiert und die Plasmaproteine durch Behandlung mit MeCN/Wasser/0,1% TFA (50/45/5) (1,5:1,0 Volumenanteil Plasma) gefällt. Nach Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff für 1 min, wird aufgetaut und nochmals zentrifugiert (13000 g, 3 min). Die Überstände werden mittels HPLC auf einer Zorbax 300SB-C18 (250 x 9,4 mm; 5 μm)-Säule und den Eluenten Wasser/0,05% TFA (A) und MeCN/0,04% TFA (B) analysiert. Es wird bei einem Fluss von 2 ml/min und mit folgenden Gradienten gearbeitet: 0 min 20% B, bei 15 min 50% B, bei 16-20 min 90% B.

6.2.9.4 Untersuchungen zur metabolischen Stabilität *in vivo*

Zur Ermittlung der metabolischen Stabilität *in vivo* werden in einer Wistar-Unilever Ratte, die mit 1,5% Isofluran-Sauerstoff narkotisiert wurde, 70-75 MBq ^{18}F -markiertes Peptid in 1 ml einer 30% Albumin/E 153-Lösung intravenös appliziert. Aus der rechten Arteria femoralis werden 3, 5, 10, 20, 30 und 60 min nach Injektion Blutproben (0,4 ml) gewonnen und aufgearbeitet. Dazu wird das Plasma durch Zentrifugation (3 min, 13000 g) abgetrennt, die Plasmaproteine mit eiskaltem Methanol (1,5:1,0 Volumenanteil Blut) gefällt und wiederum für 3 min bei 13000 g abzentrifugiert. Die Überstände werden mittels HPLC auf einer Zorbax 300SB-C18 (250 x 9,4 mm; 5 μm)-Säule und den Eluenten Wasser/0,05% TFA (A) und MeCN/0,04% TFA (B) analysiert. Es wird bei einem Fluss von 2 ml/min und mit folgenden Gradienten gearbeitet: 0 min 20% B, bei 15 min 50% B, bei 16-20 min 90% B.

6.2.9.5 Untersuchungen zur Bioverteilung

Die Ermittlung der Bioverteilung wird an 8 männlichen Wistar-Unilever Ratten untersucht. Nach Ethernarkose werden 2 MBq des jeweiligen ^{18}F -fluorbenzoylierten Peptides in die Schwanzvene der Ratten injiziert und 5 min und 60 min nach Injektion je 4 Versuchstiere durch Herzpunktion getötet. Es werden Hirn, Herz, Lunge, Milz, Leber, Nieren und Nebennieren, Pankreas, Schilddrüsen, Hardersche Drüsen, Femur, braunes Fettgewebe, sowie eine Probe der Haut und des Fells, Oberschenkelmuskulatur und Bauchfett entnommen. Alle Organe und Gewebe werden

ausgewogen und die ^{18}F -Aktivität mit dem 1480 Wallac WIZARD™ 3“ Automatic Gamma Counter der Firma Perkin Elmer (USA) ermittelt.

6.2.9.6 Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie

Mit der Kleintier-PET-Kamera microPET® P4 der Firma Siemens Medical Imaging (USA) werden dynamische PET-Aufnahmen angefertigt. Vor der eigentlichen Messung wird eine Transmissionsmessung mit einer ^{137}Cs -Quelle durchgeführt. Die Anästhesie der Wistar-Unilever Ratten wird mit 3% Isofluran in Sauerstoff hergestellt und mit 1,5% dieses Anästhetikums aufrechterhalten. Zudem werden auch NMRI nu/nu und Balb/C-Mäuse untersucht. Das zu untersuchende Tier wird in Bauchlage auf dem Kleintier-PET fixiert und anschließend intravenös über die Schwanzvene 15 MBq des ^{18}F -markierten Peptides in 0,5 ml 30% Albumin/E-153-Lösung appliziert.

Die Datenerfassung erfolgt im 3D-Listenmodus, dabei werden kontinuierlich über 60 min nach Injektion des Radiotracers Emissionsdaten aufgenommen. Es werden Bildfelder nach folgendem Schema arrangiert: 12 x 10 s, 6 x 30 s, 5 x 300 s, 9 x 600 s. Die Bildrekonstruktion erfolgt unter Berücksichtigung der Schwächungskorrektur. Die Bildaufnahmen werden mittels Festlegung von 3-dimensionalen ROIs (regions of interest) über die Herzregion, die auch den kardialen Blutpool erfasst, und die Nieren mit Hilfe der Software ROIFinder analysiert. Daraus werden Zeit-Aktivitätskurven generiert, die die gesamte ^{18}F -Radioaktivität in einem definierten Volumen repräsentieren.

Literaturverzeichnis

- [1] Phelps, M. E. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med* **41** (2000) 661-81.
- [2] Paans, A. M.; Vaalburg, W. Positron emission tomography in drug development and drug evaluation. *Curr Pharm Des* **6** (2000) 1583-91.
- [3] Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* **17** (2003) 545-80.
- [4] Rudin, M.; Weissleder, R. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **2** (2003) 123-31.
- [5] Wester, H. J. Nuclear imaging probes: from bench to bedside. *Clin Cancer Res* **13** (2007) 3470-81.
- [6] Stahl, A.; Wieder, H.; Piert, M.; Wester, H. J.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Schwaiger, M. Positron emission tomography as a tool for translational research in oncology. *Mol Imaging Biol* **6** (2004) 214-24.
- [7] Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* **1** (2002) 727-30.
- [8] Schottelius, M.; Wester, H. J. Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods* **48** (2009) 161-77.
- [9] Aloj, L.; Morelli, G. Design, synthesis and preclinical evaluation of radiolabeled peptides for diagnosis and therapy. *Curr Pharm Des* **10** (2004) 3009-31.
- [10] Eberle, A. N.; Mild, G. Receptor-mediated tumor targeting with radiopeptides. Part 1. General principles and methods. *J Recept Signal Transduct Res* **29** (2009) 1-37.
- [11] Reubi, J. C.; Maecke, H. R. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med* **49** (2008) 1735-8.
- [12] Weiner, R. E.; Thakur, M. L. Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment. *BioDrugs* **19** (2005) 145-63.
- [13] Heppeler, A.; Froidevaux, S.; Eberle, A. N.; Maecke, H. R. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr Med Chem* **7** (2000) 971-94.
- [14] Okarvi, S. M. Recent progress in fluorine-18 labelled peptide radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med* **28** (2001) 929-38.
- [15] Tweedle, M. F. Peptide-targeted diagnostics and radiotherapeutics. *Acc Chem Res* **42** (2009) 958-68.
- [16] Reubi, J. C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* **24** (2003) 389-427.
- [17] Tulipano, G.; Schulz, S. Novel insights in somatostatin receptor physiology. *Eur J Endocrinol* **156 Suppl 1** (2007) S3-11.

- [18] Mariani, G.; Erba, P. A.; Signore, A. Receptor-mediated tumor targeting with radiolabeled peptides: there is more to it than somatostatin analogs. *J Nucl Med* **47** (2006) 1904-7.
- [19] Dijkgraaf, I.; Schottelius, M.; Wester, H.-J. F-18 labeling of peptides and proteins. *Rec Adv Bioconj Chem Mol Imaging* (2008) 71-93.
- [20] Schirmmayer, R.; Wängler, C.; Schirmmayer, E. Recent Developments and Trends in ¹⁸F-Radiochemistry: Syntheses and Applications. *Mini-Rev Org Chem* **4** (2007) 317-329.
- [21] Haubner, R.; Wester, H. J. Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies. *Curr Pharm Des* **10** (2004) 1439-55.
- [22] Merrifield, R. B. The synthesis of a tetrapeptide. *JACS* **85** (1963) 2149-2154.
- [23] Merrifield, R. B.; Stewart, J. M. Automated peptide synthesis. *Nature* **207** (1965) 522-3.
- [24] Sabatino, G.; Papini, A. M. Advances in automatic, manual and microwave-assisted solid-phase peptide synthesis. *Curr Opin Drug Discov Devel* **11** (2008) 762-70.
- [25] CEM Corp (Collins, J. M.), *Microwave enhanced n-Fmoc deprotection in peptide synthesis*, EP-01818339 (2007).
- [26] Altmann, K.-H.; Mutter, M. Die chemische Synthese von Peptiden und Proteinen. *Chemie in unserer Zeit* **6** (1993) 274-286.
- [27] Chan, W.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York 2000.
- [28] Albericio, F. Orthogonal protecting groups for N(alpha)-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers* **55** (2000) 123-39.
- [29] Merrifield, B. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol* **289** (1997) 3-13.
- [30] Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res* **35** (1990) 161-214.
- [31] Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, E. M. E.; Wenschuh, H.; Albericio, F. The 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl Group (Pbf) as Arginine Side Chain Protectant. *THL* **34** (1993) 7829-7832.
- [32] Albericio, F. Developments in peptide and amide synthesis. *Curr Opin Chem Biol* **8** (2004) 211-21.
- [33] Fields, C. G.; Lloyd, D. H.; Macdonald, R. L.; Otteson, K. M.; Noble, R. L. HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Pept Res* **4** (1991) 95-101.

- [34] Dick, F. Acid cleavage/deprotection in Fmoc/tBu solid-phase peptide synthesis. *Methods Mol Biol* **35** (1994) 63-72.
- [35] Fischer, E. H.; Krebs, E. G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* **216** (1955) 121-32.
- [36] Krebs, E. G. The enzymology of control by phosphorylation in: *The Enzymes*, Vol. 17 (Eds., Boyer, P. D.; Krebs, E. G.) Academic Press, Orlando (1986) 3-20.
- [37] Cohen, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* **268** (2001) 5001-10.
- [38] Sridhar, R.; Hanson-Painton, O.; Cooper, D. R. Protein kinases as therapeutic targets. *Pharm Res* **17** (2000) 1345-53.
- [39] Eisele, F.; Owen, D. J.; Waldmann, H. Peptide conjugates as tools for the study of biological signal transduction. *Bioorg Med Chem* **7** (1999) 193-224.
- [40] Knight, Z. A.; Schilling, B.; Row, R. H.; Kenski, D. M.; Gibson, B. W.; Shokat, K. M. Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol* **21** (2003) 1047-54.
- [41] Roque, A. C.; Lowe, C. R. Lessons from nature: On the molecular recognition elements of the phosphoprotein binding-domains. *Biotechnol Bioeng* **91** (2005) 546-55.
- [42] Pawson, A. J. *Protein Modules in Signal Transduction*, Springer Verlag, Berlin, New York 1998.
- [43] Marks, F. *Protein Phosphorylation*, VCH, Weinheim, New York 1996.
- [44] Weller, M. *Protein Phosphorylation: the Nature, Function, and Metabolism of Proteins Which Contain Covalently Bound Phosphorus*, Pion, London 1979.
- [45] Mann, M.; Jensen, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21** (2003) 255-261.
- [46] Woodford, T. A.; Taylor, S. J.; Corbin, J. D. The Biological Functions of Protein Phosphorylation-Dephosphorylation in: *Principles of Medical Biology Cell Chemistry and Physiology: Part II: Cell Chemistry and Physiology Vol 4*, Vol. (Ed., Bittar, E.) JAI Press Greenwich (1996) 123-177.
- [47] Sakaguchi, K.; Roller, P. P.; Appella, E. Chemical synthesis and applications of phosphopeptides. *Genet Eng (N Y)* **18** (1996) 249-78.
- [48] Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298** (2002) 1912-34.
- [49] Kurosawa, M. Phosphorylation and dephosphorylation of protein in regulating cellular function. *J Pharmacol Toxicol Methods* **31** (1994) 135-39.
- [50] Denu, J. M.; Stuckey, J. A.; Saper, M. A.; Dixon, J. E. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87** (1996) 361-64.

- [51] Virshup, D. M.; Shenolikar, S. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* **33** (2009) 537-45.
- [52] Tarrant, M. K.; Cole, P. A. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu Rev Biochem* **78** (2009) 797-825.
- [53] Sawyer, T. K.; Shakespeare, W. C.; Wang, Y.; Sundaramoorthi, R.; Huang, W. S.; Metcalf, C. A., 3rd; Thomas, M.; Lawrence, B. M.; Rozamus, L.; Noehre, J.; Zhu, X.; Narula, S.; Bohacek, R. S.; Weigele, M.; Dalgarno, D. C. Protein phosphorylation and signal transduction modulation: chemistry perspectives for small-molecule drug discovery. *Med Chem* **1** (2005) 293-319.
- [54] Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A. L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-Hagen, J.; Chan, C. C.; Ramachandran, C.; Gresser, M. J.; Tremblay, M. L.; Kennedy, B. P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283** (1999) 1544-8.
- [55] Noble, M. E.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* **303** (2004) 1800-5.
- [56] Tóth, G. K.; Kele, Z.; Varadi, G. Phosphopeptides - Chemical Synthesis, Analysis, Outlook and Limitations. *Curr Org Chem* **11** (2007) 409-426.
- [57] Sanderson, S. D.; Perini, F. The synthesis and compositional analysis of phosphopeptides. *Mol Biotechnol* **4** (1995) 139-49.
- [58] McMurray, J. S.; Coleman, D. R. t.; Wang, W.; Campbell, M. L. The synthesis of phosphopeptides. *Biopolymers* **60** (2001) 3-31.
- [59] Attard, T. J.; Reynolds, E. C.; Perich, J. W. The synthesis of phosphopeptides via the Bpoc-based approach. *Org Biomol Chem* **5** (2007) 664-70.
- [60] Perich, J. W. Synthesis of phosphopeptides using modern chemical approaches. *Methods Enzymol* **289** (1997) 245-66.
- [61] Wakamiya, T.; Nishida, T.; Togashi, R.; Saruta, K.; Yasuoka, J.; Kusumoto, S. Preparation of N^α-Fmoc-O-[(Benzyloxy)hydroxyphosphinyl]β-Hydroxy α-Amino Acid Derivatives. *Bull Chem Soc Jpn* **69** (1996) 465-468.
- [62] Vorherr, T.; Bannwarth, W. Phosphoserine and phosphothreonine building blocks for the synthesis of phosphorylated peptides by the Fmoc solid phase strategy. *Bioorg Med Chem Lett* **5** (1995) 2661-2664.
- [63] Wakamiya, T.; Saruta, K.; Yasuoka, J.; Kusumoto, S. An Efficient Procedure for Solid-Phase Synthesis of Phosphopeptides by the Fmoc Strategy. *Chem Lett* (1994) 1099-1102.
- [64] Perich, J. W.; Ede, N. J.; Eagle, S.; Bray, A. M. Synthesis of phosphopeptides by the Multipin method: Evaluation of coupling methods for the incorporation of Fmoc-Tyr(PO₃Bzl,H)-OH, Fmoc-Ser(PO₃Bzl,H)-OH and Fmoc-Thr(PO₃Bzl,H)-OH. *Lett Pept Sci* **6** (1999) 91-97.
- [65] Otvos, L., Jr.; Cappelletto, B.; Varga, I.; Wade, J. D.; Xiang, Z. Q.; Kaiser, K.; Stephens, L. J.; Ertl, H. C. The effects of post-translational side-chain modifications on the stimulatory activity, serum stability and conformation of

- synthetic peptides carrying T helper cell epitopes. *Biochim Biophys Acta* **1313** (1996) 11-9.
- [66] Wade, J. D.; Perich, J. W.; Tregear, G. W.; Szendrei, G. I.; Otvos Jr., L. An O-Tyrosine-containing analogue of human Angiotensin II exhibits increased serum stability. *Prot Pept Lett* **4** (1997) 87-90.
- [67] Hoffmann, R.; Vasko, M.; Otvos Jr., L. Serum stability of phosphopeptides. *Anal Chim Acta* **352** (1997) 319-325.
- [68] Kaspari, A.; Diefenthal, T.; Grosche, G.; Schierhorn, A.; Demuth, H. U. Substrates containing phosphorylated residues adjacent to proline decrease the cleavage by proline-specific peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1293** (1996) 147-53.
- [69] Dunican, D. J.; Doherty, P. Designing cell-permeant phosphopeptides to modulate intracellular signaling pathways. *Biopolymers* **60** (2001) 45-60.
- [70] Hong, A.; Zhou, Y.; Diwu, Z. Phosphopeptides and their biological applications. *Chemistry Today* (2003) 57-60.
- [71] Cohen, P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **1** (2002) 309-15.
- [72] Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373** (1995) 573-80.
- [73] Rodriguez, M.; Yu, X.; Chen, J.; Songyang, Z. Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem* **278** (2003) 52914-8.
- [74] Caldecott, K. W. Cell signaling. The BRCT domain: signaling with friends? *Science* **302** (2003) 579-80.
- [75] Yaffe, M. B.; Smerdon, S. J. PhosphoSerine/threonine binding domains: you can't pSERious? *Structure* **9** (2001) R33-8.
- [76] Yaffe, M. B.; Smerdon, S. J. The use of in vitro peptide-library screens in the analysis of phosphoserine/threonine-binding domain structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33** (2004) 225-44.
- [77] Yaffe, M. B.; Cantley, L. C. Signal transduction. Grabbing phosphoproteins. *Nature* **402** (1999) 30-1.
- [78] Elia, A. E.; Cantley, L. C.; Yaffe, M. B. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* **299** (2003) 1228-31.
- [79] Barr, F. A.; Sillje, H. H.; Nigg, E. A. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5** (2004) 429-40.
- [80] Glover, D. M.; Hagan, I. M.; Tavares, A. A. Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev* **12** (1998) 3777-87.
- [81] Nigg, E. A. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* **10** (1998) 776-83.

- [82] Dai, W. Polo-like kinases, an introduction. *Oncogene* **24** (2005) 214-6.
- [83] van Vugt, M. A.; Medema, R. H. Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene* **24** (2005) 2844-59.
- [84] Winkles, J. A.; Alberts, G. F. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene* **24** (2005) 260-6.
- [85] van de Weerd, B. C.; Medema, R. H. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* **5** (2006) 853-64.
- [86] Takai, N.; Hamanaka, R.; Yoshimatsu, J.; Miyakawa, I. Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene* **24** (2005) 287-91.
- [87] Eckerdt, F.; Yuan, J.; Strebhardt, K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* **24** (2005) 267-76.
- [88] Strebhardt, K.; Ullrich, A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6** (2006) 321-30.
- [89] Elia, A. E.; Rellos, P.; Haire, L. F.; Chao, J. W.; Ivins, F. J.; Hoepker, K.; Mohammad, D.; Cantley, L. C.; Smerdon, S. J.; Yaffe, M. B. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115** (2003) 83-95.
- [90] de Carcer, G.; Perez de Castro, I.; Malumbres, M. Targeting cell cycle kinases for cancer therapy. *Curr Med Chem* **14** (2007) 969-85.
- [91] Stevenson, C. S.; Capper, E. A.; Roshak, A. K.; Marquez, B.; Eichman, C.; Jackson, J. R.; Mattern, M.; Gerwick, W. H.; Jacobs, R. S.; Marshall, L. A. The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *J Pharmacol Exp Ther* **303** (2002) 858-66.
- [92] Liu, Y.; Shreder, K. R.; Gai, W.; Corral, S.; Ferris, D. K.; Rosenblum, J. S. Wortmannin, a Widely Used Phosphoinositide3-Kinase Inhibitor, also Potently Inhibits Mammalian Polo-like Kinase. *Chem Biol* **12** (2005) 99-107.
- [93] Hofheinz, R.; Hochhaus, A.; Al-Batran, S.; Nanci, A.; Reichardt, V.; Trommshauser, D.; Hoffmann, M.; Steegmaier, M.; Munzert, G.; Jäger, E. A phase I repeated dose escalation study of the Polo-like kinase 1 inhibitor BI 2536 in patients with advanced solid tumours. *J Clin Oncol ASCO Annual Meeting Proceedings* **24** (2006) 18S.
- [94] McInnes, C.; Mazumdar, A.; Mezna, M.; Meades, C.; Midgley, C.; Scaerou, F.; Carpenter, L.; Mackenzie, M.; Taylor, P.; Walkinshaw, M.; Fischer, P. M.; Glover, D. Inhibitors of Polo-like kinase reveal roles in spindle-pole maintenance. *Nat Chem Biol* **2** (2006) 608-17.
- [95] Lansing, T. J.; McConnell, R. T.; Duckett, D. R.; Spehar, G. M.; Knick, V. B.; Hassler, D. F.; Noro, N.; Furuta, M.; Emmitte, K. A.; Gilmer, T. M.; Mook, R. A., Jr.; Cheung, M. *In vitro* biological activity of a novel small-molecule inhibitor of polo-like kinase 1. *Mol Cancer Ther* **6** (2007) 450-9.

- [96] Lee, K. S.; Idle, J. R. Pinning down the polo-box domain. *Chem Biol* **15** (2008) 415-6.
- [97] Allentoff, A. J.; Mandiyan, S.; Liang, H.; Yuryev, A.; Vlattas, I.; Duelfer, T.; Sytwu, H.; Wennogle, L. P. Understanding the cellular uptake of phosphopeptides. *Cell Biochem Biophys* **31** (1999) 129-40.
- [98] Hall, H.; Williams, E. J.; Moore, S. E.; Walsh, F. S.; Prochiantz, A.; Doherty, P. Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neurite outgrowth by a cell-membrane permeable phosphopeptide. *Curr Biol* **6** (1996) 580-7.
- [99] Dunican, D. J.; Williams, E. J.; Howell, F. V.; Doherty, P. Selective inhibition of fibroblast growth factor (FGF)-stimulated mitogenesis by a FGF receptor-1-derived phosphopeptide. *Cell Growth Differ* **12** (2001) 255-64.
- [100] Lopes, L. B.; Furnish, E.; Komalavilas, P.; Seal, B. L.; Panitch, A.; Bentley, M. V.; Brophy, C. M. Enhanced skin penetration of P20 phosphopeptide using protein transduction domains. *Eur J Pharm Biopharm* **68** (2008) 441-5.
- [101] Hudecz, F.; Banoczi, Z.; Csik, G. Medium-sized peptides as built in carriers for biologically active compounds. *Med Res Rev* **25** (2005) 679-736.
- [102] Ye, G.; Nam, N. H.; Kumar, A.; Saleh, A.; Shenoy, D. B.; Amiji, M. M.; Lin, X.; Sun, G.; Parang, K. Synthesis and evaluation of tripodal peptide analogues for cellular delivery of phosphopeptides. *J Med Chem* **50** (2007) 3604-17.
- [103] Lundberg, P.; Langel, U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* **16** (2003) 227-33.
- [104] Lindgren, M.; Hallbrink, M.; Prochiantz, A.; Langel, U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* **21** (2000) 99-103.
- [105] Stefanidakis, M.; Koivunen, E. Peptide-mediated delivery of therapeutic and imaging agents into mammalian cells. *Curr Pharm Des* **10** (2004) 3033-44.
- [106] Fischer, R.; Fotin-Mleczek, M.; Hufnagel, H.; Brock, R. Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *Chembiochem* **6** (2005) 2126-42.
- [107] Stewart, K. M.; Horton, K. L.; Kelley, S. O. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* **6** (2008) 2242-55.
- [108] Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* **157** (2009) 195-206.
- [109] Joliot, A.; Prochiantz, A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* **6** (2004) 189-96.
- [110] Rousselle, C.; Clair, P.; Lefauconnier, J.-M.; Kaczorek, M.; Scherrmann, J.-M.; Temsamani, J. New Advances in the Transport of Doxorubicin through the Blood-Brain Barrier by a Peptide Vector-Mediated Strategy *Mol Pharmacol* **57** (2000) 679-686.

- [111] Dietz, G. P.; Bahr, M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* **27** (2004) 85-131.
- [112] Frankel, A. D.; Bredt, D. S.; Pabo, C. O. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* **240** (1988) 70-3.
- [113] Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (1991) 1864-8.
- [114] Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* **269** (1994) 10444-50.
- [115] Langel, Ü. *Handbook of Cell-Penetrating Peptides*, Boca Raton, Taylor & Francis Group, London, New York 2007.
- [116] Wagstaff, K. M.; Jans, D. A. Protein transduction: cell penetrating peptides and their therapeutic applications. *Curr Med Chem* **13** (2006) 1371-87.
- [117] Jones, S. W.; Christison, R.; Bundell, K.; Voyce, C. J.; Brockbank, S. M.; Newham, P.; Lindsay, M. A. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br J Pharmacol* **145** (2005) 1093-102.
- [118] Zorko, M.; Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57** (2005) 529-45.
- [119] Patel, L. N.; Zaro, J. L.; Shen, W. C. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm Res* **24** (2007) 1977-92.
- [120] West, K. R.; Otto, S. Reversible covalent chemistry in drug delivery. *Curr Drug Discov Technol* **2** (2005) 123-60.
- [121] Kratz, F.; Müller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem* **3** (2008) 20-53.
- [122] Jiang, T.; Olson, E. S.; Nguyen, Q. T.; Roy, M.; Jennings, P. A.; Tsien, R. Y. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2004) 17867-72.
- [123] Sarko, D.; Garcia, R.; Knapp, E.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Mier, W. In 15. Arbeitstreffen der AG Radiochemie/Radiopharmazie, Morschach, Schweiz (2007).
- [124] Rennert, R.; Neundorf, I.; Jahnke, H. G.; Suchowerskyj, P.; Dournaud, P.; Robitzki, A.; Beck-Sickinger, A. G. Generation of carrier peptides for the delivery of nucleic acid drugs in primary cells. *ChemMedChem* **3** (2008) 241-53.
- [125] Gomez, J. A.; Gama, V.; Yoshida, T.; Sun, W.; Hayes, P.; Leskov, K.; Boothman, D.; Matsuyama, S. Bax-inhibiting peptides derived from Ku70 and cell-penetrating pentapeptides. *Biochem Soc Trans* **35** (2007) 797-801.
- [126] Yoshida, T.; Tomioka, I.; Nagahara, T.; Holyst, T.; Sawada, M.; Hayes, P.; Gama, V.; Okuno, M.; Chen, Y.; Abe, Y.; Kanouchi, T.; Sasada, H.; Wang, D.; Yokota, T.; Sato, E.; Matsuyama, S. Bax-inhibiting peptide derived from mouse and rat Ku70. *Biochem Biophys Res Commun* **321** (2004) 961-6.

- [127] Rennert, R.; Neundorf, I.; Beck-Sickinger, A. G. Calcitonin-derived peptide carriers: mechanisms and application. *Adv Drug Deliv Rev* **60** (2008) 485-98.
- [128] Walther, C.; Meyer, K.; Rennert, R.; Neundorf, I. Quantum dot-carrier peptide conjugates suitable for imaging and delivery applications. *Bioconjug Chem* **19** (2008) 2346-56.
- [129] Walther, C.; Ott, I.; Gust, R.; Neundorf, I. Specific labeling with potent radiolabels alters the uptake of cell-penetrating peptides. *Biopolymers* **92** (2009) 445-51.
- [130] Henriques, S. T.; Melo, M. N.; Castanho, M. A. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem J* **399** (2006) 1-7.
- [131] Neundorf, I.; Rennert, R.; Hoyer, J.; Schramm, F.; Löbner, K.; Klitanovic, I.; Wölfl, S. Fusion of a Short HA2-Derived Peptide Sequence to Cell-Penetrating Peptides Improves Cytosolic Uptake, but Enhances Cytotoxic Activity. *Pharmaceuticals* **2** (2009) 49-65.
- [132] Mäding, P.; Füchtner, F.; Wüst, F. Module-assisted synthesis of the bifunctional labelling agent *N*-succinimidyl 4-[(18)F]fluorobenzoate ([18)F]SFB). *Appl Radiat Isot* **63** (2005) 329-32.
- [133] Zasadny, K. R.; Wahl, R. L. Standardized uptake values of normal tissues at PET with 2-[fluorine-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose: variations with bodyweight and a method for correction. *Radiology* **189** (1993) 847-850.
- [134] Mazella, J.; Vincent, J. P. Internalization and recycling properties of neurotensin receptors. *Peptides* **27** (2006) 2488-92.
- [135] Tyler-McMahon, B. M.; Boules, M.; Richelson, E. Neurotensin: peptide for the next millennium. *Regul Pept* **93** (2000) 125-36.
- [136] Dobner, P. R.; Carraway, R. E. Neurotensin in: Handbook of biologically active peptides (Ed., Kastin, A. J.) Academic Press, Amsterdam Boston (2006) 737-743.
- [137] Myers, R. M.; Shearman, J. W.; Kitching, M. O.; Ramos-Montoya, A.; Neal, D. E.; Ley, S. V. Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS Chem Biol* **4** (2009) 503-25.
- [138] Hultsch, C.; Berndt, M.; Bergmann, R.; Wuest, F. Radiolabeling of multimeric neurotensin(8-13) analogs with the short-lived positron emitter fluorine-18. *Appl Radiat Isot* **65** (2007) 818-26.
- [139] Bergmann, R.; Scheunemann, M.; Heichert, C.; Mading, P.; Wittrisch, H.; Kretzschmar, M.; Rodig, H.; Tourwe, D.; Iterbeke, K.; Chavatte, K.; Zips, D.; Reubi, J. C.; Johannsen, B. Biodistribution and catabolism of ¹⁸F-labeled neurotensin(8-13) analogs. *Nucl Med Biol* **29** (2002) 61-72.
- [140] Bruehlmeier, M.; Garayoa, E. G.; Blanc, A.; Holzer, B.; Gergely, S.; Tourwe, D.; Schubiger, P. A.; Blauenstein, P. Stabilization of neurotensin analogues: effect on peptide catabolism, biodistribution and tumor binding. *Nucl Med Biol* **29** (2002) 321-7.

- [141] Falciani, C.; Fabbrini, M.; Pini, A.; Lozzi, L.; Lelli, B.; Pileri, S.; Brunetti, J.; Bindi, S.; Scali, S.; Bracci, L. Synthesis and biological activity of stable branched neurotensin peptides for tumor targeting. *Mol Cancer Ther* **6** (2007) 2441-8.
- [142] Garcia-Garayoa, E.; Blauenstein, P.; Blanc, A.; Maes, V.; Tourwe, D.; Schubiger, P. A. A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36** (2009) 37-47.
- [143] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **40** (2001) 2004-2021.
- [144] Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* **8** (2003) 1128-37.
- [145] Moorhouse, A. D.; Moses, J. E. Click chemistry and medicinal chemistry: a case of "cyclo-addiction". *ChemMedChem* **3** (2008) 715-23.
- [146] Marik, J.; Hausner, S. H.; Fix, L. A.; Gagnon, M. K.; Sutcliffe, J. L. Solid-phase synthesis of 2-[¹⁸F]fluoropropionyl peptides. *Bioconjug Chem* **17** (2006) 1017-21.
- [147] Ramenda, T.; Bergmann, R.; Wuest, F. Synthesis of ¹⁸F-labeled Neurotensin(8-13) via Copper-Mediated 1,3-Dipolar [3+2]Cycloaddition Reaction. *Lett Drug Design Discovery* **4** (2007) 279-285.
- [148] Mamat, C.; Ramenda, T.; Wuest, F. R. Recent Applications of Click Chemistry for the Synthesis of Radiotracers for Molecular Imaging. *Mini-Rev Org Chem* **6** (2009) 21-34.
- [149] Ramenda, T.; Kniess, T.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Wuest, F. Radiolabelling of proteins with fluorine-18 via click chemistry. *Chem Commun (Camb)* (2009) 7521-3.
- [150] Glaser, M.; Solbakken, M.; Turton, D. R.; Pettitt, R.; Barnett, J.; Arukwe, J.; Karlsen, H.; Cuthbertson, A.; Luthra, S. K.; Arstad, E. Methods for ¹⁸F-labeling of RGD peptides: comparison of aminoxy [¹⁸F]fluorobenzaldehyde condensation with 'click labeling' using 2-[¹⁸F]fluoroethylazide, and S-alkylation with [¹⁸F]fluoropropanethiol. *Amino Acids* **37** (2009) 717-24.
- [151] Maschauer, S.; Prante, O. A series of 2-O-trifluoromethylsulfonyl-D-mannopyranosides as precursors for concomitant ¹⁸F-labeling and glycosylation by click chemistry. *Carbohydr Res* **344** (2009) 753-61.
- [152] Seo, T. S.; Li, Z.; Ruparel, H.; Ju, J. Click chemistry to construct fluorescent oligonucleotides for DNA sequencing. *J Org Chem* **68** (2003) 609-12.
- [153] Haase, C.; Bergmann, R.; Oswald, J.; Zips, D.; Pietzsch, J. Neurotensin receptors in adeno- and squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* **26** (2006) 3527-33.
- [154] Hultsch, C.; Pawelke, B.; Bergmann, R.; Wuest, F. Synthesis and evaluation of novel multimeric neurotensin(8-13) analogs. *Bioorg Med Chem* **14** (2006) 5913-20.

- [155] Rist, B.; Entzeroth, M.; Beck-Sickinger, A. G. From micromolar to nanomolar affinity: a systematic approach to identify the binding site of CGRP at the human calcitonin gene-related peptide 1 receptor. *J Med Chem* **41** (1998) 117-23.
- [156] Weber, P. J.; Bader, J. E.; Folkers, G.; Beck-Sickinger, A. G. A fast and inexpensive method for N-terminal fluorescein-labeling of peptides. *Bioorg Med Chem Lett* **8** (1998) 597-600.
- [157] Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442** (2006) 368-73.
- [158] Audrain, H. Positron emission tomography (PET) and microfluidic devices: a breakthrough on the microscale? *Angew Chem Int Ed Engl* **46** (2007) 1772-5.
- [159] Brady, F.; Luthra, S. K.; Gillies, J. M.; Geffery, N. T. *Use of Microfabricated Devices*, PCT, WO 03/078358 A2. (2003).
- [160] Lu, S. Y.; Watts, P.; Chin, F. T.; Hong, J.; Musachio, J. L.; Briard, E.; Pike, V. W. Syntheses of ^{11}C - and ^{18}F -labeled carboxylic esters within a hydrodynamically-driven micro-reactor. *Lab Chip* **4** (2004) 523-5.
- [161] Lee, C. C.; Sui, G.; Elizarov, A.; Shu, C. J.; Shin, Y. S.; Dooley, A. N.; Huang, J.; Daridon, A.; Wyatt, P.; Stout, D.; Kolb, H. C.; Witte, O. N.; Satyamurthy, N.; Heath, J. R.; Phelps, M. E.; Quake, S. R.; Tseng, H. R. Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics. *Science* **310** (2005) 1793-6.
- [162] Gillies, J. M.; Prenant, C.; Chimon, G. N.; Smethurst, G. J.; Perrie, W.; Hamblett, I.; Dekker, B.; Zweit, J. Microfluidic reactor for the radiosynthesis of PET radiotracers. *Appl Radiat Isot* **64** (2006) 325-32.
- [163] Gillies, J. M.; Prenant, C.; Chimon, G. N.; Smethurst, G. J.; Dekker, B. A.; Zweit, J. Microfluidic technology for PET radiochemistry. *Appl Radiat Isot* **64** (2006) 333-6.
- [164] Miller, P. W.; Long, N. J.; de Mello, A. J.; Vilar, R.; Audrain, H.; Bender, D.; Passchier, J.; Gee, A. Rapid multiphase carbonylation reactions by using a microtube reactor: applications in positron emission tomography ^{11}C -radiolabeling. *Angew Chem Int Ed Engl* **46** (2007) 2875-8.
- [165] Miller, P. W. Radiolabelling with short-lived PET (positron emission tomography) isotopes using microfluidic reactors. *J Chem Technol Biotechnol* **84** (2009) 309-315.
- [166] King, D. S.; Fields, C. G.; Fields, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res* **36** (1990) 255-66.
- [167] Hultsch, C.; Bergmann, R.; Pawelke, B.; Pietzsch, J.; Wuest, F.; Johannsen, B.; Henle, T. Biodistribution and catabolism of ^{18}F -labelled isopeptide *N*(epsilon)-(gamma-glutamyl)-L-lysine. *Amino Acids* **29** (2005) 405-13.
- [168] Pietzsch, J.; Bergmann, R.; Wuest, F.; Pawelke, B.; Hultsch, C.; van den Hoff, J. Catabolism of native and oxidized low density lipoproteins: in vivo insights

- from small animal positron emission tomography studies. *Amino Acids* **29** (2005) 389-404.
- [169] Tang, G.; Zeng, W.; Yu, M.; Kabalka, G. Facile synthesis of *N*-succinimidyl-4-¹⁸F-fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB) for protein labeling. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **51** (2008) 68-71.
- [170] Oswald, J.; Treite, F.; Haase, C.; Kampfrath, T.; Mäding, P.; Schwenzer, B.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Experimental hypoxia is a potent stimulus for radiotracer uptake in vitro: comparison of different tumor cells and primary endothelial cells. *Cancer Lett* **254** (2007) 102-10.
- [171] Neundorff, I.; Rennert, R.; Franke, J.; Közle, I.; Bergmann, R. Detailed analysis concerning the biodistribution and metabolism of human calcitonin-derived cell-penetrating peptides. *Bioconj Chem* **19** (2008) 1596-603.
- [172] Olson, E. S.; Jiang, T.; Aguilera, T. A.; Nguyen, Q. T.; Ellies, L. G.; Scadeng, M.; Tsien, R. Y. Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for *in vivo* fluorescence and MR imaging of proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (2010) 4311-6.
- [173] Elias, D. R.; Thorek, D. L.; Chen, A. K.; Czupryna, J.; Tsourkas, A. *In vivo* imaging of cancer biomarkers using activatable molecular probes. *Cancer Biomark* **4** (2008) 287-305.
- [174] Kolthoff, I. M. A New Set Of Buffer Mixtures That Can Be Prepared Without The Use Of Standardized Acid Or Base. *J Bio Chem* **63** (1925) 135-141.
- [175] Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* **34** (1970) 595-8.
- [176] Khoukhi, N.; Vaultier, M.; Carrié, R. Synthesis and Reactivity of Methyl γ -Azido Butyrates and Etyl δ -Azido Valerates and of the corresponding Acid Chlorides as useful reagents for the Aminoalkylation. *THL* **43** (1987) 1811-1822.
- [177] O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267** (2000) 5421-6.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Cys, C	Cystein
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
Met, M	Methionin
Phe, F	Phenylalanin
Pro, P	Prolin
pSer, pS	Phosphoserin
pThr,pT	Phosphothreonin
pTyr, pY	Phosphotyrosin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin

Sonstige Abkürzungen

ABL	Abelson
ACPP	aktivierbares zellpenetrierendes Peptid
APC/C	anaphase-promoting complex/cyclosome
ATP	Adenosintriphosphat
Balb/C	<u>Albinoma</u> stamm, der von Halsey <u>Bagg</u> entdeckt wurde
BIP	Bax-inhibierendes Peptid
BN	Bombesin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorphosphat
BOS	begin of synthesis, Synthesebeginn
BRCT	BRCA (breast cancer susceptibility gene 1) C-terminale Region
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
[⁶⁰ Cu]ATSM	[⁶⁰ Cu]Diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazon)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAP18	cathelicidin antimicrobial peptide, antimikrobielles Peptid Cathelicidin
CCK-B	Cholecystokinin-B
Cdk	cyclin-dependent kinase, Cyclin-abhängige Kinase
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CPP5	zellpenetrierende Pentapeptide
CPP	zellpenetrierende Peptide
CT	Computertomographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
Dde	(1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-ethyl

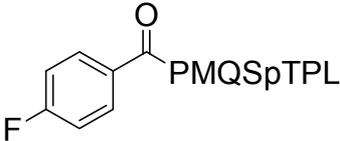
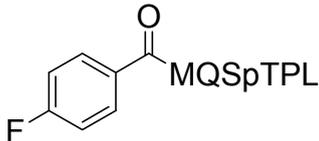
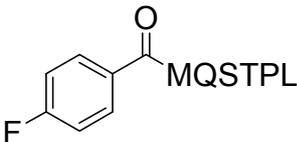
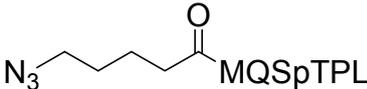
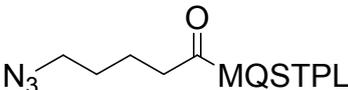
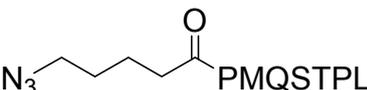
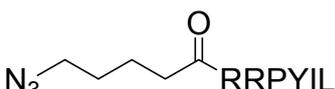
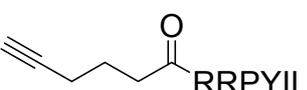
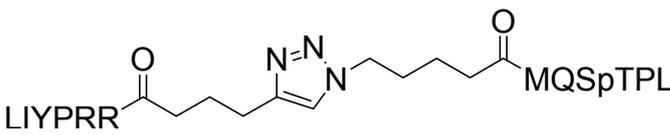
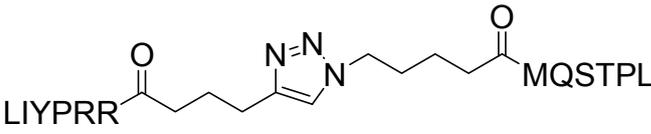
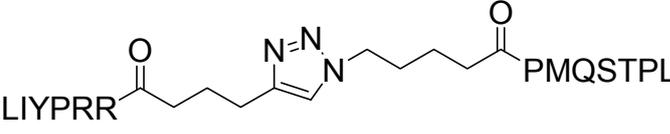
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EC ₅₀	effektive Dosis; Konzentration, die notwendig ist, für einen 50%igen Effekt <i>in vivo</i>
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
[¹⁸ F]FAZA	[¹⁸ F]Fluorazomycinarabinofuranosid
[¹⁸ F]FB	[¹⁸ F]Fluorbenzoesäure
[¹⁸ F]FBA	[¹⁸ F]Fluorbenzaldehyd
[¹⁸ F]FBAM	<i>N</i> -[6-(4-[¹⁸ F]Fluorbenzyliden)aminooxyhexyl]maleinimid
[¹⁸ F]FDG	2-[¹⁸ F]Fluor-2-desoxy-D-glucose
[¹⁸ F]FET	[¹⁸ F]Fluorethyltyrosin
[¹⁸ F]FLT	3'-[¹⁸ F]Fluor-3'-desoxythymidin
[¹⁸ F]FMISO	[¹⁸ F]Fluormisonidazol
[¹⁸ F]SFB	<i>N</i> -Succinimidyl-4-[¹⁸ F]fluorbenzoat
FACS	fluorescence activated cell sorting, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FaDu	humanes Plattenepithelkarzinom
FDA	US Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor
FKS	fötale Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FHA	Forkhead-associated
FZD	Forschungszentrum Dresden-Rossendorf e.V.

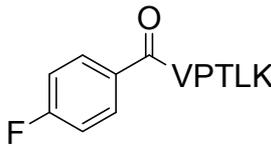
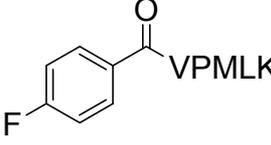
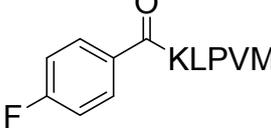
GBq	Giga-Bequerel
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GH	growth hormone, Wachstumshormon
Glc	Glucose
HA	Hemagglutinin
HATU	O-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBSS	Hank's balanced salt solution
HBTU	O-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> tetramethyluronium-hexafluorphosphat
hCT	humanes Calcitonin
hCT(18-32)-k7	Aminosäurefragment 18-32 des humanen Calcitonin verzweigt mit einer Lys-reichen k7-Sequenz
HDTMABr	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HeLa	humane Zervixepithelkarzinomzelllinie
HIV-1-Tat	humaner Immundefizienzvirus-1-Transkriptionsaktivator
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HSA	humanes Serumalbumin
HT-29	humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie
IC ₅₀	Konzentration, bei der 50% der inhibition erreicht wird
ID	injected dose, injizierte Dosis
K _d	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LPA	lineare Peptidanaloga
MAP	amphipathisches Modell-Peptid
MBHA	<i>para</i> -Methylbenzhydrylamin
MBq	Mega-Bequerel
MCF-7	humane Brustadenokarzinomzelllinie
MCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure

MMP	Matrix-Metalloproteinase
α -MSH	α -Melanozyt-stimulierendes Hormon
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NLS	nuclear localisation sequence, Sequenz für die Kernlokalisation
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NT	Neurotensin
NTR	Neurotensin-Rezeptor
PB	Polo-Box
PBD	Polo-Box-Domäne
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pin1	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
Plk1	Polo-like Kinase-1
PNA	Peptidnukleinsäure
PS-PHB	Polystyrol- <i>para</i> -Hydroxybenzen
PTB	Phosphotyrosin-bindende Proteindomäne
PTD	Proteintransduktionsdomäne
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl-oxy)-tripyrrolidino-phosphonium-hexafluorphosphat
RCA	radiochemische Ausbeute
RCR	radiochemische Reinheit
RGD	Arg-Gly-Asp
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
RT	Raumtemperatur

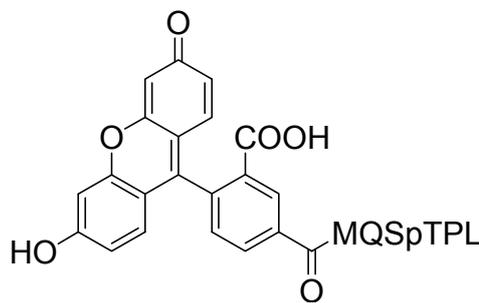
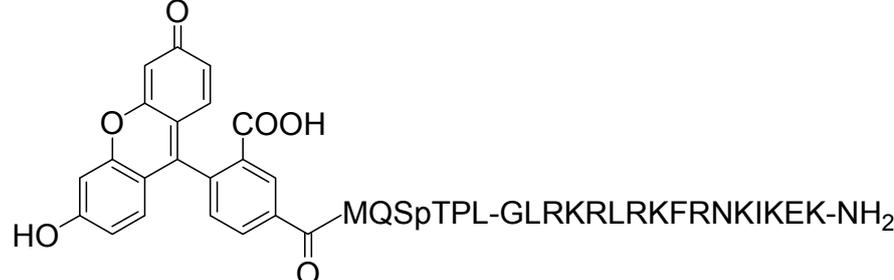
sC18	C-terminales Fragment des antimikrobiellen Peptides Cathelicidin
SD	standard deviation, Standardabweichung
SH2	Src Homology-2
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Tomographie
SPPS	solid phase peptide synthesis, Festphasenpeptidsynthese
Src	Sarc für Sarcoma
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
SUV	standard uptake value, standardisierte Radioaktivitätskonzentration
t_R	Retentionszeit
TBACl	Tetrabutylammoniumchlorid
TBT	Tributylzinn
TFA	Trifluoressigsäure
Trityl	Triphenylmethyl
UV	Ultraviolett
VIP	Vasoaktiv-Intestinal-Peptid
WD-40	Trp-Asp-40
[⁸⁶ Y]Y-DOTATOC	[⁸⁶ Y]Y-DOTA-D-Phe(1)-Tyr(3)-Octreotid

Verzeichnis der synthetisierten Peptide

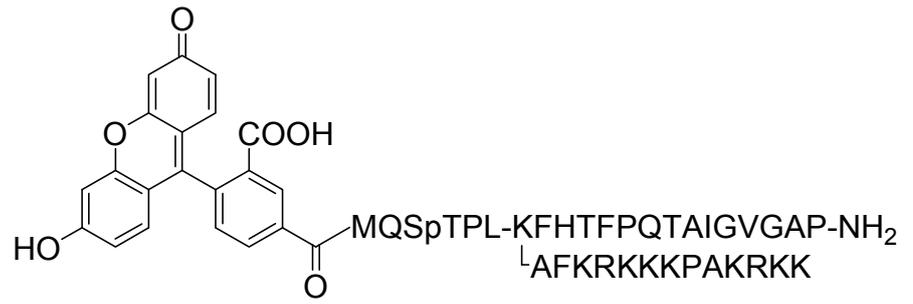
Peptid	Peptidsequenz	Peptid	Peptidsequenz
1	PMQSpTPL	3	
2	MQSpTPL	4	
Dephospho-1	PMQSTPL	Dephospho-4	
Dephospho-2	MQSTPL		
Peptid	Peptidsequenz		
Azid-2			
Azid-Dephospho-2			
Azid-Dephospho-1			
Azid-7			
Alkin-7			
8			
9			
10			

Peptid	Peptidsequenz	Peptid	Peptidsequenz
11	VPTLK	14	 4-fluorobenzoyl-VPTLK
12	VPMLK	15	 4-fluorobenzoyl-VPMLK
13	KLPVM	16	 4-fluorobenzoyl-KLPVM

Peptid	Peptidsequenz
2-CPP1	MQSpTPL-GLRKRLRKFRNKIKEK-NH ₂
2-CPP2	MQSpTPL-KFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂ KKRKAPKKRKFA [↓]
2-CPP3	 4-fluorobenzoyl-MQSpTPL-GLRKRLRKFRNKIKEK-NH ₂
2-CPP4	 4-fluorobenzoyl-MQSpTPL-KFHTFPQTAIGVGAP-NH ₂ [↓] AFKRKKKPAKRKK

Peptid	Peptidsequenz
CF-2	
CF-2-CPP1	

CF-2-CPP2



Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt allen, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben und mich auf diesem Weg begleitet und maßgeblich unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Jörg Steinbach für die Möglichkeit diese Dissertation in seinem Institut anzufertigen, die Überlassung des Themas und für die stetige, große Unterstützung während dieser Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Frank Wüst für die exzellente Betreuung meiner Arbeit und für die stetige Förderung in Hinblick auf meine fachliche und persönliche Weiterentwicklung, sowie für die Möglichkeit des spannenden Aufenthaltes am Cross Cancer Institute der University of Alberta. An dieser Stelle sei auch dem DAAD gedankt, der durch seine Finanzierung diesen Aufenthalt erst ermöglicht hat.

Allen Kollegen am Institut für Radiopharmazie und besonders der Arbeitsgruppe PET-Tracer bin ich sehr für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre verbunden. Ganz herzlich danke ich Frau Peggy Wecke für die große Unterstützung auch über den Laboralltag hinaus. Meinem Bürokollegen Herrn Dr. Constantin Mamat sei für viele gute Ratschläge und Gespräche gedankt, sowie Herrn Dr. Torsten Knieß für wichtige Hinweise im Labor. Frau Theres Ramenda danke ich für die Zusammenarbeit hinsichtlich der Click-Chemie. Bei Herrn Dr. Reik Löser möchte ich mich für die kritische Durchsicht der Arbeit bedanken. Der Arbeitsgruppe Radiopharmakologische Biologie, ganz besonders Herrn Dr. Jens Pietzsch und Herrn Dr. Ralf Bergmann, sowie Frau Andrea Suhr, Frau Regina Herrlich, Frau Mareike Barth und Frau Franziska Graf danke ich für die gute Zusammenarbeit und Anfertigung der radiopharmakologischen Untersuchungen, besonders auch Frau Uta Lenkeit für viele [¹⁸F]SFB-Synthesen.

Ich danke auch den Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Universität Leipzig, die während meines dortigen Aufenthaltes ihre Erfahrungen auf dem Gebiet der Peptidsynthese und optischen Bildgebung mit mir geteilt haben. Ganz besonders danke ich Frau Dr. Ines Neundorf für die Bereitstellung der zellpenetrierenden Peptide

und viele wertvolle Hilfestellungen und Ratschläge, aber auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie Frau Kristin Löbner für die Anfertigung der zellbiologischen Untersuchungen.

Den Mitarbeitern des Department of Oncology des Cross Cancer Institutes bin ich sehr verbunden für die freundliche Aufnahme. Besonders auch Herrn Dr. Vincent Bouvet und Frau Dr. Melinda Wüst danke ich herzlich für viele wertvolle Ratschläge und intensive Gespräche, sowie für weitere Mikrofluidik-Untersuchungen und PET-Aufnahmen. Herrn Brendan Trayner sei für die Anfertigung der Zellaufnahmen gedankt.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Marc, meinen Freunden und meiner Familie, die mich liebevoll unterstützten, mich aufbauten, Kraft gaben und für Abwechslung sorgten.

Publikationen

Richter, S.; Ramenda, T.; Bergmann, R.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Wuest, F. Synthesis of neurotensin(8-13)-phosphopeptide heterodimers via click chemistry. *Bioorg Med Chem Lett* **20** (2010) 3306-3309.

Richter, S.; Bergmann, R.; Pietzsch, J.; Ramenda, T.; Steinbach, J.; Wuest, F. Fluorine-18 labeling of phosphopeptides: A potential approach for the evaluation of phosphopeptide metabolism *in vivo*. *Biopolymers* **92** (2009) 479-488.

Hoppmann, S.; Haase, C.; Richter, S.; Strobel, K.; Steinbach, J.; Pietzsch, J. Fluorine-18 radiolabeling of S100 proteins/calgranulins: Potential probes for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) *in vivo*. *Rec Adv Bioconj Chem Mol Imaging* (Ed., Chen, X.) (2009) 329-351.

Hoppmann, S.; Haase, C.; Richter, S.; Pietzsch, J. Expression, purification and fluorine-18 radiolabeling of recombinant S100 proteins - potential probes for molecular imaging of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) *in vivo*. *Prot Expr Purif* **57** (2008) 143-152.

Publikationen in Vorbereitung

Richter, S.; Bouvet, V.R.; Wuest, M.; Trayner, B.; Neundorf, I.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Wuest, F. ¹⁸F-Labeling of phosphopeptide-cell penetrating peptide dimers via the μ -fluidic approach.

Richter, S.; Neundorf, I.; Loebner, K.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Wuest, F. Synthesis and evaluation of carboxyfluorescein-labeled phosphopeptide-cell-penetrating peptide dimers.

Posterbeiträge

Richter, S.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Wuest, F. Fluorine-18 labeling of phosphopeptides: A convenient approach for the evaluation of phosphopeptide metabolism *in vivo*. *Posterpräsentation: 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences 2009, 12.07. - 17.07.2009, Edmonton, Kanada*

Richter, S.; Bergmann, R.; Neundorf, I.; Beck-Sickinger, A.G.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Wuest, F. Cell uptake studies of fluorescent-labeled phosphopeptide-cell-penetrating peptide dimers. *Posterpräsentation: 2009 World Molecular Imaging Congress, 23.09. - 26.09.2009, Montreal, Kanada*

Bouvet, V.R.; Richter, S.; Neundorf, I.; Trayner, B.; Wuest, M.; Wuest, F. ^{18}F -Labeling and radiopharmaceutical evaluation of phosphopeptide-cell-penetrating peptide dimers. *Posterpräsentation: 2010 World Molecular Imaging Congress, 08.09. - 11.09.2009, Kyoto, Japan*

Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2007 bis März 2010 am Institut für Radiopharmazie des Forschungszentrums Dresden-Rossendorf e.V. (FZD) unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Jörg Steinbach angefertigt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der Fassung vom 16. April 2003 gemäß der Änderungssatzung vom 17. Juli 2008 an.

Bisherige erfolglose Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Dresden, den 16. November 2010

Susan Richter

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 16. November 2010

Susan Richter