

**Design und Synthese von multifunktionalen Cyclamliganden zur  
Entwicklung von stabilen radioaktiven Kupferkomplexen für  
Diagnostik und Therapie**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Chemikerin **Manja Kubeil** geb. Kuhlmann

geboren am **19. Juli 1983** in **Berlin**

eingereicht am 31.01.2014

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2010 bis Januar 2014 am Helmholtz-  
Zentrum Dresden-Rossendorf im Institut für Radiopharmazeutische  
Krebsforschung angefertigt.



Gutachter: Prof. Dr. J. Steinbach  
Prof. Dr. P. Comba

Tag der Verteidigung: 25.04.2014



Für meine Oma Vierow,  
die immer an mich glaubt.



---

## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen und Literaturübersicht</b>	<b>6</b>
2.1	Der Tetraazamakrocyclus Cyclam - ein Komplexbildner	6
2.1.1	Konformere des Cyclams und Protonierungskonstanten	6
2.2	Metall-Cyclam-Komplexe	8
2.2.1	Mechanismus der Komplexbildung	10
2.2.2	Konfigurationen von Metall-Cyclam-Komplexen	11
2.3	Funktionalisierung des Cyclam-Grundgerüsts	12
2.3.1	<i>N</i> -Carboxylfunktionalisierte Cyclam-Derivate	14
2.3.2	Protonierungskonstanten der <i>N</i> -funktionalisierten Cyclam-Carboxyl-Derivate	14
2.3.3	Kupfer(II)-Komplexe von <i>N</i> -funktionalisierten Cyclam-Carboxyl-Derivaten	15
2.3.4	Spektroskopische und elektrochemische Eigenschaften von Cu(II)-Cyclam-Derivaten	17
2.3.5	Radiomarkierung und Bioverteilung ausgewählter Cyclam-Essigsäure-Derivate	21
2.3.6	Kupfermetabolismus	23
2.4	Strategien regioselektiver <i>N</i> -Funktionalisierung zu Cyclam-Propionsäure-Derivaten	27
2.5	Cyclam-Peptid-Konjugate	29
2.5.1	<sup>64</sup> Cu-markierte Somatostatin-Rezeptor bindende Peptide	30
2.5.2	Multimere <sup>64</sup> Cu-markierte Neurotensin-Peptide	33
2.6	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) und Liganden	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>36</b>
3.1	Darstellung von unterschiedlich funktionalisierten Cyclam-Propionsäure-Liganden und deren Kupfer(II)-Komplexe	36
3.1.1	Synthese verschieden substituierter Cyclam-Propionsäuren	36

---

3.1.2	Kupfer(II)-Komplexe der Cyclam-Propionsäure-Liganden.....	45
3.1.3	Röntgenkristallografische Untersuchungen der Verbindungen $\text{Cu}^{\text{II}}[\text{H}_2\mathbf{14b}]^{2+}$ und $\text{Cu}^{\text{II}}[\text{H}_3\mathbf{16}]^+$ .....	47
3.2	Spektroskopische Untersuchungen der Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure Komplexe.....	50
3.2.1	ESR-Spektroskopie .....	50
3.2.2	IR-Spektroskopie.....	53
3.2.3	VIS-Spektroskopie.....	54
3.2.4	$\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexbildung bei verschiedenen pH-Werten am Beispiel von $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-}\mathbf{14b}$ .....	58
3.2.5	Stabilitätstest in Anwesenheit eines 20-fachen Überschusses an Cyclam....	60
3.2.6	Säure-assoziierte Dissoziation .....	62
3.3	Radiochemische Untersuchungen der Cyclam-Propionsäure-Liganden mit Kupfer-64 .....	65
3.3.1	Markierungskinetik der Liganden <b>13</b> , <b>14b</b> , <b>15</b> und <b>16</b> mit Kupfer-64 .....	65
3.3.2	Verteilung von den $^{64}\text{Cu}$ -markierten Liganden <b>13</b> , <b>14b</b> , <b>15</b> , <b>16</b> und <b>6</b> in Octan-1-ol/ $\text{H}_2\text{O}$ .....	73
3.3.3	In-vitro-Stabilitätsuntersuchungen .....	75
3.3.4	Bioverteilungen .....	79
3.4	Funktionalisierung ausgewählter Cyclam-Propionsäure-Derivate mit Vektormolekülen und deren Radiomarkierung .....	83
3.4.1	Synthese, Radiomarkierung und Charakterisierung der Modellsubstanz <b>40</b> ..	83
3.4.2	Synthese, Radiomarkierung und Charakterisierung des mit EGFR- spezifischen Peptiden funktionalisierten Chelators <b>13</b> .....	87
3.5	Rezeptorbindungsnachweis und Rezeptoraffinität.....	91
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>94</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>99</b>
5.1	Chemikalien und Materialien .....	99

Inhalt	III
5.2 Methoden .....	101
5.3 Versuchsdurchführungen .....	103
5.3.1 Spektroskopische Untersuchungen .....	103
5.3.2 Markierungen mit Kupfer-64 .....	104
5.3.3 Verteilungsstudien in Octan-1-ol/H <sub>2</sub> O .....	105
5.3.4 In-vitro-Stabilitätsstudien .....	106
5.3.5 Bindungsstudien.....	108
5.3.6 Bioverteilungsstudie .....	110
5.4 Synthesevorschriften.....	112
<b>6 Literatur</b> .....	<b>129</b>
<b>7 Anhang</b> .....	<b>V</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis und verwendete Symbole.....	V
7.2 Kristallstrukturdaten .....	IX
7.3 IR-Spektroskopie.....	XI
7.4 UV/VIS-Spektroskopie.....	XV
7.5 Radiomarkierung.....	XVI
7.6 Daten der In-vitro-Stabilitätsstudien.....	XVIII
7.7 Daten der In-vivo-Studien.....	XX
7.8 MALDI-TOF-Spektren .....	XXIV
<b>8 Veröffentlichungen und Beiträge zu Fachkonferenzen</b> .....	<b>XXV</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>XXIX</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>XXXI</b>
<b>Versicherung</b> .....	<b>XXXI</b>



## 1 Einleitung und Zielstellung

Die Entwicklung von Chelatoren, die mit nuklearmedizinisch interessanten Metallionen thermodynamisch stabile und kinetisch inerte Komplexe bilden, ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Das ergibt sich insbesondere aus der Möglichkeit, Radiometalle sowohl für diagnostische als auch therapeutische Anwendungen einzusetzen. Das Prinzip der molekularen Diagnostik beruht auf der Detektion von Photonen, die von radioaktiven Nukliden ausgesendet werden. Je nach Strahlungsart des entsprechenden Radiopharmakons können Einzel-Photonen-Emissions-Computer-Tomografie (single photon emission computed tomography, SPECT) oder Positronen-Emissions-Tomografie (PET) als bildgebende Verfahren eingesetzt werden [1]. Zudem ergeben sich medizinische Anwendungen ausgewählter Metallkomplexe in der Magnetresonanztomografie (MRT) als Kontrastmittel und der optischen Bildgebung (Optical Imaging, OI) als Fluoreszenzmarker. Dabei nimmt die multimodale Bildgebung (Molecular Imaging) einen immer größer werdenden Stellenwert ein [2, 3].

Bei der Endoradionuklidtherapie hingegen werden  $\alpha$ ,  $\beta^-$  oder Augerelektronen-Emitter eingesetzt, wobei die aus der radioaktiven Umwandlung entstehende ionisierende Strahlung zur Gewebeerstörung ausgenutzt wird [4].

Aufgrund seiner günstigen kernphysikalischen Eigenschaften (Tabelle 1) nimmt Kupfer-64 einen besonderen Stellenwert ein. Bei der Umwandlung von Kupfer-64 wird neben einem  $\beta^+$  - auch ein  $\beta^-$  - Anteil und  $\gamma$ -Strahlung emittiert [5]. Damit kann es sowohl zur bildgebenden Darstellung mittels PET als möglicherweise auch für therapeutische Prozesse eingesetzt werden. Es ist mit Zyklotronen unter Nutzung entsprechender Targettechnik direkt und mit hoher spezifischer Aktivität verfügbar [6, 7].

Tabelle 1: Kernphysikalische Eigenschaften des Radionuklids Kupfer-64 [5]

Isotop	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [h]	$E_{\beta^+}^{\max}$ [keV]	$E_{\beta^-}^{\max}$ [keV]	Elektronen- einfang [%]	$\gamma$ [keV]
$^{64}\text{Cu}$	12,7	653 (17,6%)	579 (38,5%)	43,8	511 (35,2%) 1346 (0,5%)

Einen großen Stellenwert erlangten die Kupfer(II)-Komplexe der Thiosemicarbazone, vor allem  $^{60,62,64}\text{Cu(II)-PTSM}$  (Pyruvaldehyd-bis(4*N*-methyl-3-thiosemicarbazon)) und  $^{60,62,64}\text{Cu(II)-ATSM}$  (Diacetyl-2,3-bis(4-*N*-methyl-3-thiosemicarbazon)) (Abbildung 1). Diese Radiotracer sind aufgrund ihrer geringen Molmasse, Planarität und Lipophilie permeabel für die Zellmembran und eignen sich daher besonders als Marker für Blutperfusionsstudien. Cu(II)-ATSM ist aufgrund seiner Hypoxie-Selektivität eines der bedeutendsten Radiokupfer-Tracer, um Tumoren zu lokalisieren [8-10]. Die ersten Komplexbildner für Radiokupfernuklide waren aber EDTA (Ethylenamintetraessigsäure) und DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) (Abbildung 1). Trotz der hohen Stabilitätskonstanten mit Kupfer(II)-Ionen ( $\log K_{\text{Cu(II)-EDTA}} = 18,7$  [11],  $\log K_{\text{Cu(II)-DTPA}} = 21,4$  [12]), sind Derivate dieser acyclischen Verbindungen in Gegenwart von Blutserum nicht stabil [13].

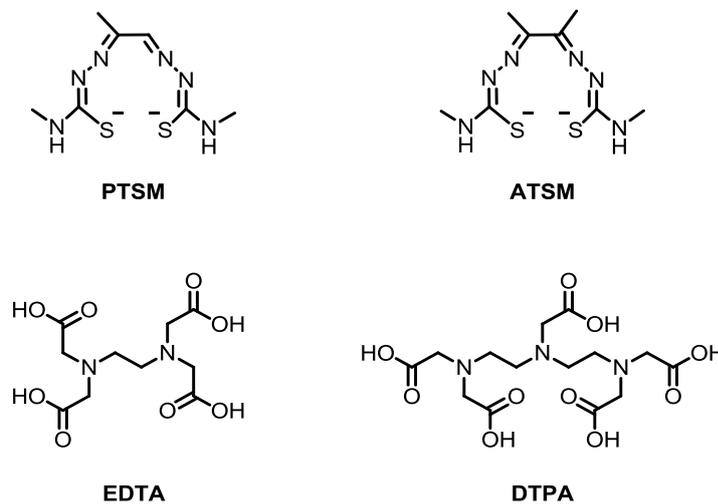


Abbildung 1: Strukturen acyclischer Liganden für Kupfer(II)-Ionen

Bei der Endoradionuklidtherapie werden sehr hohe Anforderungen an die Stabilität der Verbindungen gestellt. In diesem Zusammenhang spielen makrocyclische Liganden eine übergeordnete Rolle, da diese mit vielen Haupt- bzw. Übergangsmetallen aufgrund ihrer geometrischen, chemischen und elektrochemischen Eigenschaften Komplexe hoher Stabilität bilden. Zudem bieten sie die Möglichkeit, über geeignete Molekülmodifizierungen die Bioverteilung der radiomarkierten Pharmaka zielgerichtet zu beeinflussen. Die wichtigsten Vertreter basieren auf Azamakrocyclen, wie TACN **1** (1,4,7-Triazacyclononan), Cyclen **2** (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan) und Cyclam **3** (1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan) (Abbildung 2).

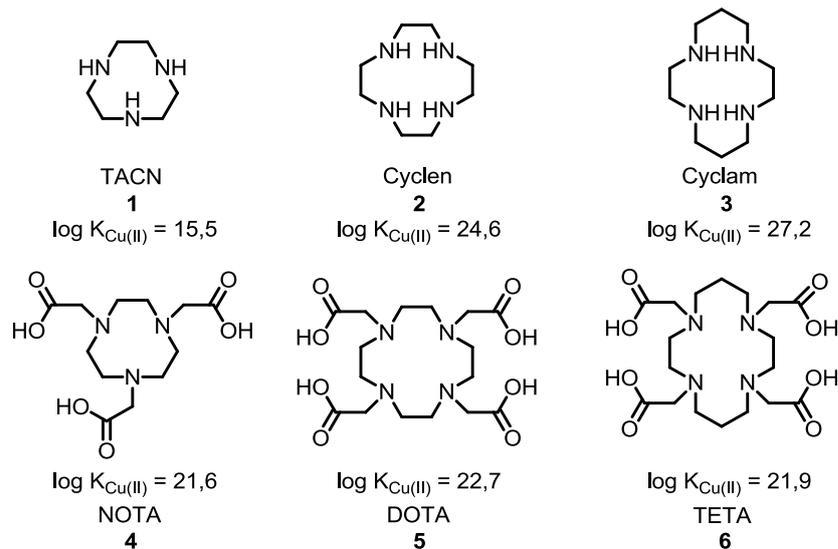


Abbildung 2: Übersicht der wichtigsten Azamacrocyclen (Stabilitätskonstanten mit Cu(II) entnommen aus [14-17])

Diese makrocyclischen Amine besitzen zum einen unterschiedlich große Kavitäten und zum anderen bieten sie vielfältige synthetische Möglichkeiten, um weitere Donorgruppen in das Chelatsystem einführen zu können. Vor allem die *N*-Funktionalisierung des Grundgerüsts von Azamacrocyclen mit Essigsäuregruppen hat großes Interesse geweckt, da die entsprechenden Derivate mit Übergangsmetall- und Lanthanoidionen thermodynamisch und kinetisch sehr stabile Komplexe bilden.

Essigsäure-Derivate der Azamacrocyclen wie NOTA **4** (1,4,7-Tri(carboxymethyl)-1,4,7-triazacyclononan), DOTA **5** (1,4,7,10-Tetra(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan) und TETA **6** (1,4,8,11-Tetra(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan) (Abbildung 2) werden am häufigsten eingesetzt [18]. Allerdings ist nach wie vor das Problem einer hinreichenden *In-vivo*-Stabilität der Chelate nicht gelöst.

Kupfer(II) bildet mit den oben genannten makrocyclischen Aminen Komplexe hoher thermodynamischer Stabilität [14-17]. Eines der größten Herausforderungen stellt aber die kinetische Stabilität *in vivo* dar. In Säugetieren gibt es sowohl extra- (Serumalbumin, Caeruloplasmin, Transcuprein) als auch intrazellulär (Superoxid-Dismutase, Cytochrom-*c*-Oxidase, etc.) kupferbindende Proteine bzw. Enzyme, die unter anderem Kupfer(II) zu Kupfer(I) reduzieren können [19-21]. Insbesondere beim Einsatz von DOTA **5** als makrocyclischen Komplexbildner für Kupfer-64 wurden *in vivo* Transchelatisierungsreaktionen beobachtet [22, 23]. Bisher gibt es allerdings keine in der Literatur beschriebenen Ergebnisse, die eine zuverlässige Bewertung der Stabilität

von Radiokupferkomplexen im Humanserum und in Anwesenheit von Superoxid-Dismutase (SOD) erlauben.

In Hinblick auf eine radiopharmazeutische Anwendung sollen die Chelatoren nicht nur die Fähigkeit besitzen das Radiometall der Wahl stabil zu binden, sondern zudem auch weitere reaktive Gruppen aufweisen. Diese erlauben die kovalente Bindung an pharmakologisch relevante Moleküle wie beispielsweise Peptide, Antikörper, Antikörperfragmente oder andere Proteine. Damit soll eine spezifische Anreicherung an der jeweiligen Zielstruktur ermöglicht werden. In der Radiopharmazie werden sehr kleine Stoffmengen des Radiopharmakons injiziert, um keine pharmakodynamischen Prozesse hervorzurufen. Pharmakokinetische Prozesse hingegen bewirken in biologischen Systemen eine Anreicherung des Radiopharmakons am Target. In den meisten Fällen handelt es sich hier um Enzyme, Rezeptoren oder Antigene. Um eine hohe Affinität bzw. Avidität zum Target und gleichzeitig eine metabolische Stabilisierung der radiopharmakologisch relevanten Moleküle zu erzielen, wird zunehmend der Multivalenzeffekt ausgenutzt [24]. Hierbei werden mehrere identische, zielsuchende Einheiten an einem gemeinsamen Zentralmolekül gebunden.

Die kovalente Verknüpfung (Linker) zwischen Chelator und Vektormolekül soll dabei eine hohe Variabilität aufweisen, um sowohl mehrere gleichartige aber auch unterschiedliche Moleküle wie pharmakologisch relevante Substanzen, Fluoreszenzmarker oder Nanopartikel kuppeln zu können. Ziel dabei ist, unter Erhalt der Spezifität und Affinität des Vektormoleküls, die Bioverteilung und Pharmakokinetik des Radiopharmakons maßzuschneidern.

Zu Beginn der Arbeit lagen erste Ergebnisse zur Anwendung von  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Neurotensin-Konjugaten mit einem Cyclam-Propionsäure-Grundgerüst vor [25]. Die zuvor beschriebenen Ansprüche an ein Radiopharmakon wurden für diese Stoffklasse erstmalig nachgewiesen und begründeten somit neue Forschungsinteressen. Cyclam-Propionsäure-Derivate sind aber bisher synthetisch wenig erschlossen und Radiokupfer-markierte Komplexe zudem bisher gar nicht beschrieben. Daher ist es von besonderem Interesse die kinetische Stabilität Radiokupfer-markierter Cyclam-Propionsäure-Derivate zu untersuchen und mit einer Reihe bekannter Chelatoren zu vergleichen.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der *N*-Funktionalisierung des 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecans (Cyclam) **3** mit einer definierten Anzahl an Propionsäure-Einheiten. Insbesondere soll der Einfluss der Propionsäure-Substituenten am Cyclam-Grundgerüst hinsichtlich der spektroskopischen, chemischen und radiochemischen Eigenschaften der Kupfer(II)-Komplexe und deren kinetische sowie metabolische Stabilität untersucht werden, um das Potential dieser Chelatoren für Kupfer(II)-Ionen in Hinblick auf radiopharmazeutische Anwendungen bewerten zu können.

Die Möglichkeit einer Anreicherung im Zielgewebe soll mit Hilfe von spezifischen Peptiden am Beispiel des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) untersucht werden. Die Entwicklung einer Synthesestrategie, beruhend auf dem Einsatz einer Schutzgruppentechnik, soll dabei eine Mehrfachfunktionalisierung von Cyclam-Propionsäure-Derivaten mit mehreren identischen Peptiden erlauben. Ausgewählte Konjugate sollen im Anschluss mit Kupfer-64 markiert und miteinander verglichen werden, um Aussagen zur radiochemischen und metabolischen Stabilität treffen zu können. Des Weiteren sollen Studien mit Peptid-Konjugaten durchgeführt werden, um den Einfluss der Anzahl von Peptiden am Chelatorsystem auf die Bindungsaffinität zum EGFR bewerten zu können.

## 2 Theoretische Grundlagen und Literaturübersicht

### 2.1 Der Tetraazamakrocyclus Cyclam - ein Komplexbildner

Der Tetraazamakrocyclus Cyclam **3** (1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan) wurde erstmalig 1937 von van Alphen [26] mittels einer Kondensationsreaktion von 1,3-Dibrompropan und *N,N'*-Diethylpropan-1,3-diamin synthetisiert. Mayer und Stetter [27] konnten 24 Jahre später das cyclische Amin ebenfalls auf diesem Wege isolieren und eindeutig charakterisieren. Sie postulierten schon damals aufgrund der physikalischen Eigenschaften des cyclischenamins das Vorhandensein von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und belegten diese Behauptung mittels IR-Spektroskopie. Demnach tritt neben der NH-Bande bei  $3260\text{ cm}^{-1}$  eine zweite NH-Bande bei  $3170\text{ cm}^{-1}$  auf, wobei diese Rotverschiebung auf intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeführt wurde.

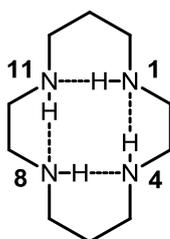


Abbildung 3: Struktur des 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecans (**3**)

#### 2.1.1 Konformere des Cyclams und Protonierungskonstanten

Auf der Basis von Kristallstrukturen des Cyclam **3** in seiner neutralen [28], zweifach protonierten  $[\text{H}_2\text{Cyclam}]^{2+}$  [29] und vierfach protonierten Spezies  $[\text{H}_4\text{Cyclam}]^{4+}$  [28, 30, 31] gelang es, unterschiedliche Konformere des cyclischenamins nachzuweisen (Abbildung 4). Entscheidend ist die Ausrichtung der Stickstoffatome, um die auftretenden Wechselwirkungen (Van-der-Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen) im Ringsystem zu minimieren. So wird sowohl für die neutrale als auch für die diprotonierte Spezies eine *endo*-Konformation der Stickstoffatome mit zwei dreizentrierten Wasserstoffbrückenbindungen beobachtet. Die Protonierung der Cyclam-Spezies erfolgt *trans*-ständig an den Stickstoffatomen *N1* und *N8* ( $[\text{H}_2\text{Cyclam}]^{2+}$ ), wobei die *endo*-Konformation beibehalten wird. Bei der Protonierung der beiden verbleibenden sekundären Aminfunktionen *N4* und *N11* ( $[\text{H}_4\text{Cyclam}]^{4+}$ ) müssen die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden, um eine maximale Ladungsseparation der positiv geladenen Stickstoffatome

zu erzielen und damit die elektrostatischen Wechselwirkungen im cyclischen System zu minimieren. Das hat einen Konformationswechsel mit *exo*-Orientierung der Stickstoffatome zur Folge. Hancock *et al.* [32] generierten anhand von Molekülmechanik-Berechnungen die energetisch günstigsten Konformere der Cyclam-Spezies und leiteten die Erklärung für die experimentell gefundenen Protonierungskonstanten davon ab.

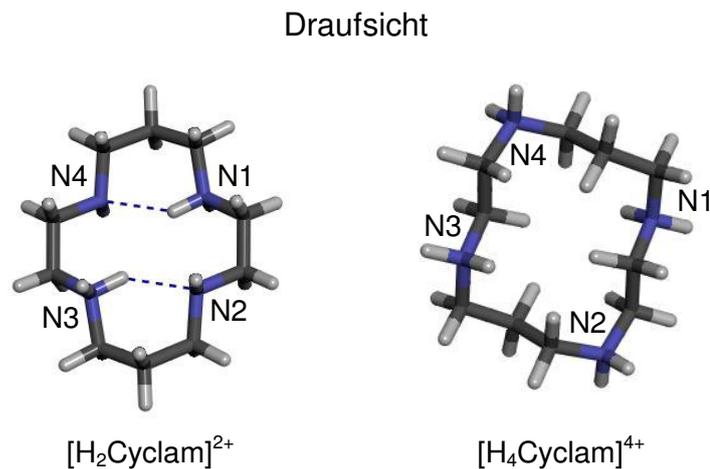


Abbildung 4: Konformere der Cyclam-Spezies  $[H_2Cyclam]^{2+}$  [29] und  $[H_4Cyclam]^{4+}$  [33]

Anders als bei acyclischen Tetraaminen ist ein drastischer Anstieg zwischen  $pK_{s2}$  und  $pK_{s3}$  zu verzeichnen (Tabelle 2). Bei der generierten dreifach-protonierten Spezies  $[H_3Cyclam]^{3+}$  kommt es aufgrund von Van-der-Waals Abstoßungen zwischen den Protonen im Tetraaminring zu sehr hohen Spannungsenergien. Elektrostatische Wechselwirkungen können vernachlässigt werden, da diese Erhöhung der Ringspannung nur bei einer Dielektrizitätskonstante von Wasser beobachtet worden ist. Um eine maximale Ladungsseparation zu gewährleisten, muss auch hier eine Wasserstoffbrückenbindung aufgebrochen werden. Somit könnte hier ein Gemisch aus Konformeren mit *exo*- und *endo*-orientierten Stickstoffatomen entstehen. Mit Addition des vierten Protons existiert nur noch die *exo*-Konformation  $[H_4Cyclam]^{4+}$ . Hancock *et al.* [32] lieferten somit auch eine Erklärung, warum  $pK_{s4}$  größer ist als  $pK_{s3}$ .

Tabelle 2:  $pK_s$ -Werte von Cyclam bei  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1 \text{ M KCl}$  [32]

<b>Cyclam</b>	
$pK_{s1} = -\log K_{s1} = -\log [\text{HL}]^+ / [\text{L}][\text{H}]^+$	11,29(2)
$pK_{s2} = -\log K_{s2} = -\log [\text{H}_2\text{L}]^{2+} / [\text{LH}]^+[\text{H}]^+$	10,19(1)
$pK_{s3} = -\log K_{s3} = -\log [\text{H}_3\text{L}]^{3+} / [\text{LH}_2]^{2+}[\text{H}]^+$	1,61(1)
$pK_{s4} = -\log K_{s4} = -\log [\text{H}_4\text{L}]^{4+} / [\text{LH}_3]^{3+}[\text{H}]^+$	1,91(1)

## 2.2 Metall-Cyclam-Komplexe

Der Tetraazamakrocyclus Cyclam **3** bildet mit einer Reihe von Übergangsmetallen thermodynamisch stabile Komplexe. Ursache hierfür sind eine Reihe von enthalpischen (Bildungsenergie, Basizität der Donoratome, Ladungsneutralisierung) und entropischen (Desolvatationseffekte, Freiheitsgrade, sterische Effekte, Präorganisation des Liganden) Faktoren, die von der Natur des Metallions und des Liganden abhängen [15]. Ein wesentlicher Parameter für die Komplexstabilität ist aber auch das Zusammenspiel aus dem Ionenradius des Metallions und der Größe der Kavität des Liganden.

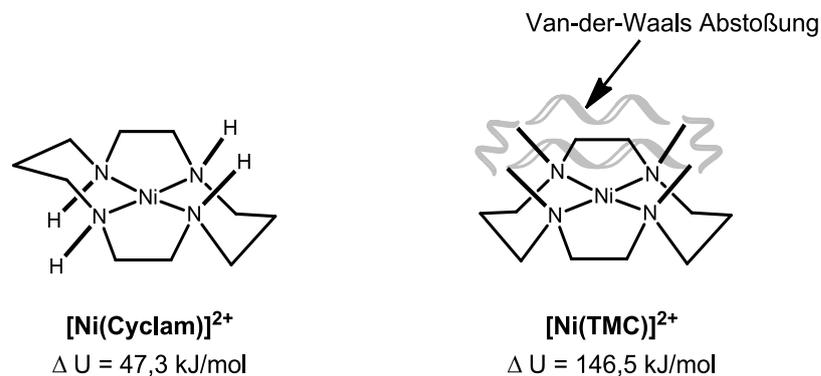
Einen besonderen Stellenwert nehmen die Kupfer(II)-Komplexe ein, deren Stabilitätskonstante im Vergleich zu anderen Metall-Cyclam-Komplexen (Tabelle 3) um einige Größenordnungen größer ist. Das Kupfer(II)-Ion liegt im makrocyclischen Tetraamin mit 14 Ringgliedern innerhalb der Stickstoffebene. Eine Ab- bzw. Zunahme des Ionenradius der anderen Metallionen bewirkt eine verminderte Stabilität, da dann die Passgenauigkeit nicht mehr gegeben ist. Die höchste Komplexstabilität des Kupfer(II)-Ions in makrocyclischen Tetraaminen ergibt sich aber nicht mit 14, sondern mit 13 Ringgliedern. Der Kupfer(II)-[13]aneN<sub>4</sub>-Komplex weist eine um zwei Größenordnungen höhere Stabilitätskonstante auf als Kupfer(II)-Cyclam ( $\log K_{\text{Cu(II)}} = 29,1 \pm 0,2$  [34] vs. 27,2 [15]).

Tabelle 3:  $\log K_M$  von Cyclam- und 1,4,8,11-Tetramethyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (TMC)-Metall-Komplexen bei  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1 \text{ M KCl}$  und verschiedenen Ionenradii [15]

	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+(a)}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$
Ionenradius ( $\text{\AA}$ )	0,65	0,69	0,72	0,74	0,97	1,21
$\log K_M$ (Cyclam)	27,2	22,4	12,7	15,5	11,7	11,3
$\log K_M$ (TMC)	18,3	8,6	7,58	10,4	9,0	7,5

(a) Low-Spin-Komplex

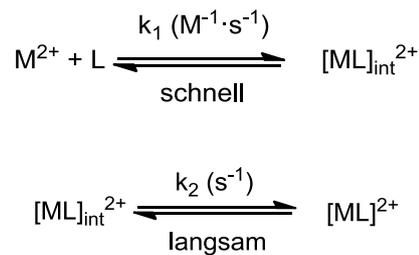
Die Funktionalisierung der *N*-Donoratome des Cyclams verursacht in der Regel eine Abnahme der Komplexstabilität. Hancock *et al.* [32] veranschaulichten dies am Beispiel des Tetramethylcyclams **7** (TMC, 1,4,8,11-Tetramethyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan). Hauptursache sind sterische Effekte. Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Methylgruppen bewirken eine Zunahme der relativen Spannungsenergie im cyclischen System, wobei es zur Abnahme der Stabilität kommt (Abbildung 5).

Abbildung 5: Struktur von  $[\text{Ni}(\text{Cyclam})]^{2+}$  und  $[\text{Ni}(\text{TMC})]^{2+}$  (modifiziert nach [15])

Die sehr hohe Komplexstabilitätskonstante des Cyclams für Kupfer(II)-Ionen weckte unter anderem großes Interesse an der Entwicklung von Radiokupferkomplexen für nuklearmedizinische Anwendungen und trieb die Weiterentwicklung von Derivaten des Cyclams voran, um Derivate für diagnostische und therapeutische Zwecke nutzbar zu machen.

### 2.2.1 Mechanismus der Komplexbildung

Um die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexbildung von Cyclam mit Kupfer(II)-Ionen zu beschreiben, wurden Untersuchungen in aprotischen Lösungsmitteln (Acetonitril, DMF, DMSO) durchgeführt, da im wässrigen Milieu die Beschreibung des Systems durch Solvatations- und Protonierungseinflüsse schwer zu interpretieren ist [35-39]. Die Komplexbildung kann im aprotischen Milieu durch die zwei nachfolgenden Reaktionsgleichungen beschrieben werden [39].



L = Cyclam,  $M^{2+}$  = zweiwertiges Übergangsmetallion,  $[ML]_{\text{int}}^{2+}$  = Zwischenprodukt,  $[ML]^{2+}$  = Produkt

Die Bildung des Zwischenproduktes  $[ML]_{\text{int}}^{2+}$  verläuft formal nach einer Reaktion 2. Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  wird hauptsächlich durch die Anzahl der Substituenten sowie deren Position am Cyclam-Grundgerüst bestimmt. Vermutlich sind sechs Teilreaktionen involviert, um das Zwischenprodukt  $[ML]_{\text{int}}^{2+}$  zu bilden (siehe Abbildung 6). Diese Teilreaktionen beinhalten:

- Gleichgewichtseinstellung zwischen solvatisiertem Metallion und Cyclam,
- Bildung der ersten Cu-N-Bindung mit Jahn-Teller Umkehr, um die Stickstoffatome äquatorial anzuordnen,
- Bildung der zweiten Cu-N-Bindung mit Konformationsänderung des Cyclams (wahrscheinlich geschwindigkeitsbestimmender Schritt),
- dreifache-N-Koordination zum Metall unter Verlust eines Lösungsmittelmoleküls,
- Bildung des Zwischenproduktes  $[ML]_{\text{int}}^{2+}$  mit einer quadratisch planaren Ausrichtung,
- Gleichgewichtseinstellung zwischen den drei vorherrschenden Spezies  $[ML]_{\text{int}}^{2+}$ ,  $[MLS]_{\text{int}}^{2+}$  und  $[MLS_2]_{\text{int}}^{2+}$

Die Bildung des Produktes verläuft dann nach einer Reaktion 1. Ordnung. Hierbei handelt es sich um eine stereochemische Umorientierung mit Konfigurationsänderung, um das thermodynamisch stabilere Produkt zu bilden.

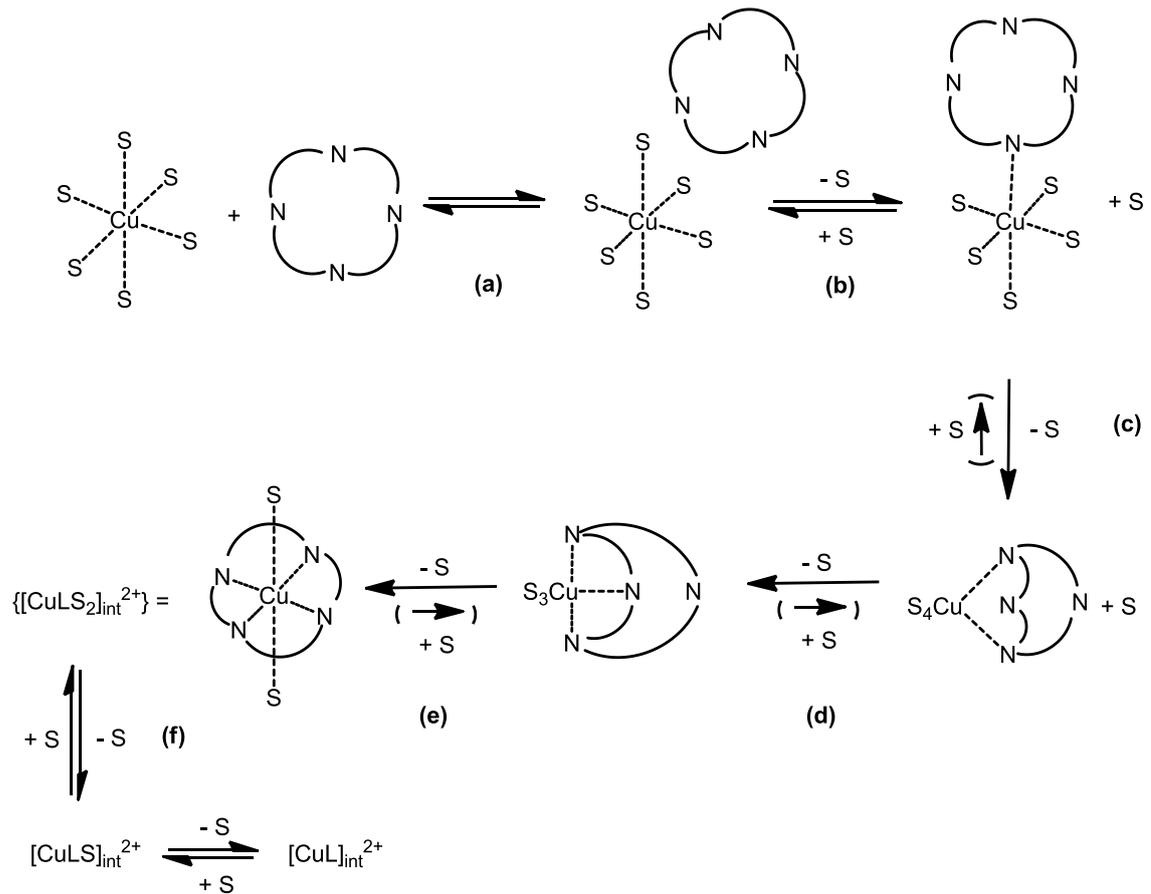


Abbildung 6: Mechanismus der Komplexbildung des Zwischenproduktes  $[\text{CuL}]_{\text{int}}^{2+}$  bestehend aus sechs Teilreaktionen (S = Lösungsmittel) (modifiziert nach [39])

### 2.2.2 Konfigurationen von Metall-Cyclam-Komplexen

Bosnich *et al.* [40] definierten für Cyclam-Metall-Komplexe fünf mögliche *trans*- (*trans*-I bis *trans*-V) und zwei *cis*-Konfigurationen (*cis*-II und *cis*-V) (Abbildung 7). Jedes der vier Stickstoff-Donoratome ist chiral, wobei in Abhängigkeit von der räumlichen Ausrichtung der Substituenten am Stickstoffatom unterschiedliche *cis/trans*-Konfigurationen resultieren können. Entsprechend des Substitutionsmusters dominiert häufig eine  $4N+1$  Koordinationsgeometrie bei *trans*-I-Konfigurationen, wohingegen *trans*-III-Konfigurationen bei  $4N+2$ -Geometrien beobachtet werden. Die *cis*-Konfigurationen sind bisher nur für verbrückte Cyclam-Derivate beschrieben worden.

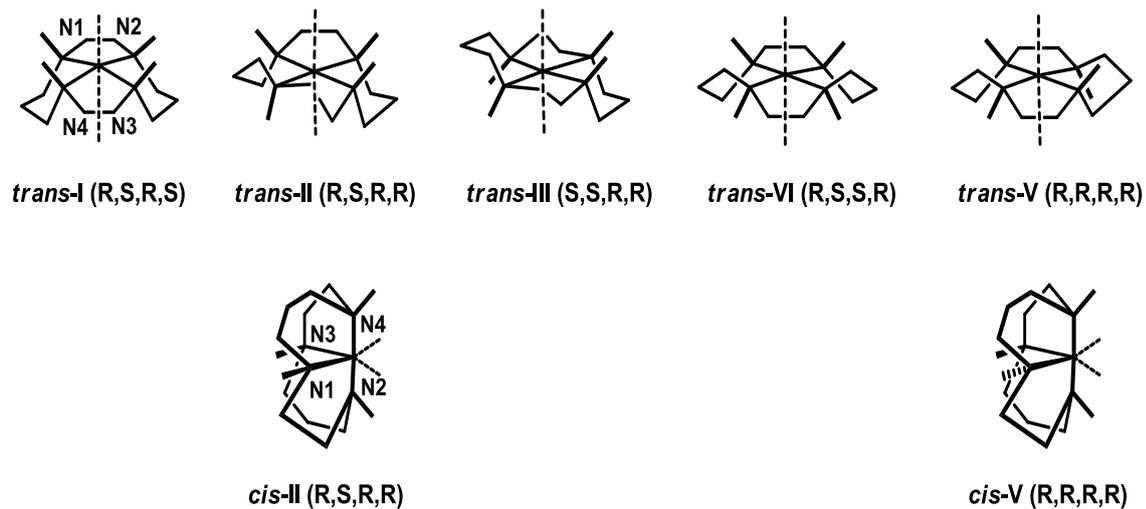


Abbildung 7: Darstellung der möglichen *trans/cis*-Konfigurationen von Metall-Cyclam-Komplexen (modifiziert nach [41])

### 2.3 Funktionalisierung des Cyclam-Grundgerüsts

Das Interesse an nuklearmedizinisch anwendbaren Radiokupfer-markierten Cyclam-Derivaten führte vor allem in den letzten Jahren zu einem Aufschwung in der Entwicklung von bifunktionellen Chelatoren. Diese sollen folgende Anforderungen erfüllen:

- Einfache Synthese des Liganden in hohen Ausbeuten
- Funktionalisierungsmöglichkeiten zur kovalenten Bindung an zielsuchende und löslichkeitsvermittelnde Einheiten
- Einsatz für die multimodale Bildgebung (PET und optische Bildgebung)
- Schnelle Radiomarkierung unter milden Bedingungen
- Hohe kinetische Stabilität der Chelate *in vivo*

Das Potential für eine Applikation in biologischen Systemen hängt dabei im Wesentlichen von diesen Faktoren ab [18].

Da Cyclam *per se* nicht als bifunktioneller Chelator fungiert, müssen Funktionalisierungen vorgenommen werden, um beispielsweise zusätzliche Donoratome oder zielsuchende Einheiten (Peptide, Proteine, etc.) zu koppeln. Die zusätzlichen Donoratome bestimmen maßgeblich die Eigenschaften eines Komplexes wie Geometrie, Ladung, Lipophilie und Redoxverhalten. Allerdings stellt die Modifizierung des Cyclams eine besondere synthetische Herausforderung dar. Auch die Substituenten im makrocyclischen System sind für die auftretenden

Wechselwirkungen entscheidend und bestimmen somit die Stabilität des Komplexes. Daher erfordert das Design neuer bifunktionaler Cyclam-Chelatoren Kenntnisse über den Einfluss der Substituenten auf die Stabilität der gebildeten Kupfer(II)-Komplexe.

Prinzipiell können funktionelle Gruppen sowohl über die Methyleinheiten als auch über die sekundären Aminfunktionen am Cyclam-Grundgerüst eingeführt werden. Es handelt sich dann um eine C- bzw. N-Funktionalisierung.

Die größere Bedeutung erlangten die N-funktionalisierten Derivate des Cyclams. Vor allem die auf Cyclam-basierenden Carboxyl-funktionalisierten Derivate sind in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Der bekannteste Vertreter ist 1,4,8,11-Tetra(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (**6**), TETA. Dieser wird aufgrund seiner sehr guten Komplexbildungseigenschaften mit radioaktivem Kupfer und seiner zusätzlich vorhandenen funktionellen Gruppen zur Konjugation mit zielsuchenden Einheiten häufig eingesetzt. Die hohe thermodynamische Stabilität dieses Kupfer(II)-Komplexes ( $\log K_{\text{Cu(II)}} = 21,9$ ) [17] unterstreicht das Anwendungspotential. Es stellte sich aber heraus, dass die thermodynamische Stabilität keine Aussagen über das Verhalten *in vivo* zulässt. Bioverteilungen und metabolische Studien von [<sup>64</sup>Cu]Cu-TETA-Peptid-Konjugaten sind mehrfach beschrieben worden. Diese weisen auf eine verstärkte Anreicherung in der Leber und den Nieren hin, die auf eine kinetische Labilität des [<sup>64</sup>Cu]Cu-TETA zurückzuführen sind. Es wurden Transchelatisierungsreaktionen beobachtet, wobei insbesondere Serumalbumin, Caeruloplasmin und SOD als maßgeblich involvierte Proteine diskutiert werden [23, 42, 43].

Unter der kinetischen Stabilität wird die Reaktionsgeschwindigkeit des Ligandenaustausches verstanden. Handelt es sich um einen kinetisch stabilen Komplex ist der Zerfall gehemmt. Wohingegen bei kinetisch labilen Komplexen eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet wird.

Die Ursache für die kinetische Labilität *in vivo* ist noch nicht vollständig verstanden. Es werden einige Einfluss nehmende Faktoren (Konfigurationsisomere, Ladung, Redoxpotential, Lipophilie) in den nächsten Abschnitten anhand von ausgewählten Cyclam-Essigsäure-Derivaten in Zusammenhang mit der kinetischen Stabilität diskutiert.

### 2.3.1 *N*-Carboxylfunktionalisierte Cyclam-Derivate

In der Literatur sind Cyclam-Derivate mit einer unterschiedlichen Anzahl an Essigsäuregruppen sowie deren Radiokupfer(II)-Komplexe beschrieben worden [44]. Im Gegensatz dazu gibt es in der Literatur nur eine einzige Beschreibung eines Radiokupfer(II)-Komplexes ( $^{64}\text{Cu}$ -**12**) von Cyclam-Propionsäure-Derivaten [45]. Hierbei handelt es sich um ein ethylenverbrücktes Cyclam-Derivat. Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnissen zur Entwicklung von Cyclam-Propionsäure-Liganden (Verbindung **13** - **16**) wird mit ausgewählten, in Abbildung 8 dargestellten Cyclam-Essigsäure-Derivaten vorgenommen.

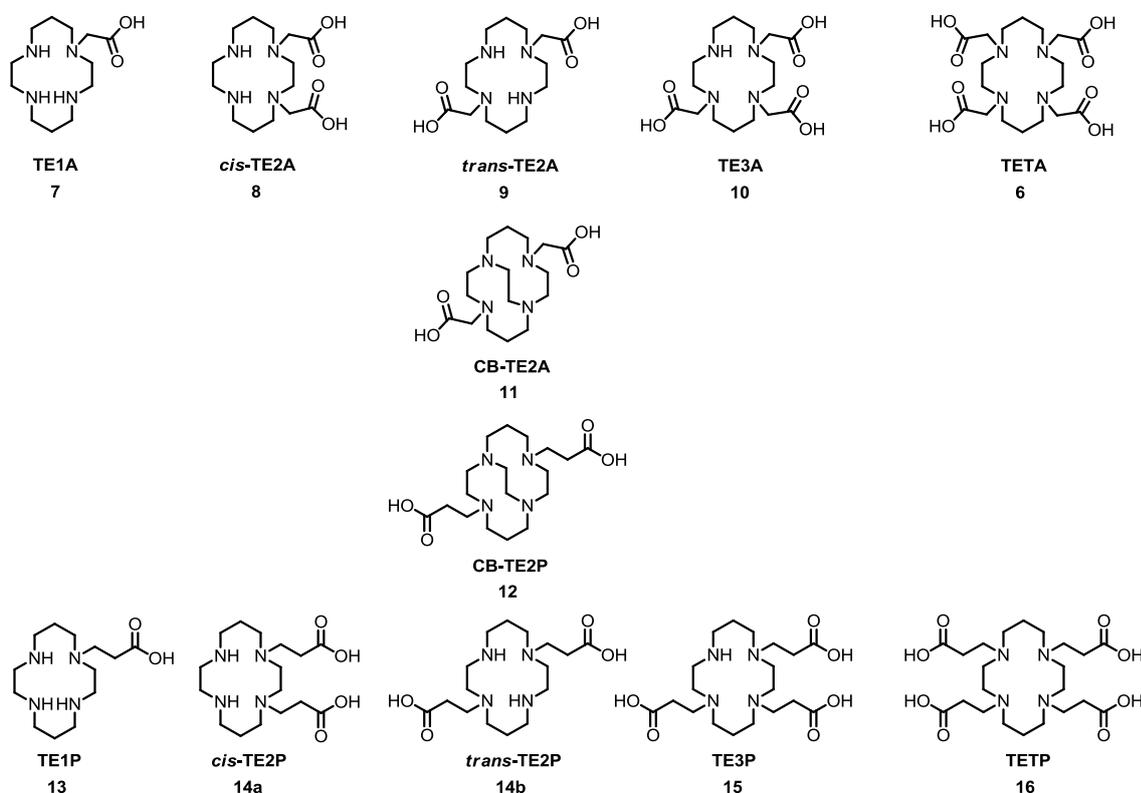


Abbildung 8: Strukturen relevanter Carboxylcyclam-Derivate

### 2.3.2 Protonierungskonstanten der *N*-funktionalisierten Cyclam-Carboxyl-Derivate

In der Tabelle 4 sind die  $pK_s$ -Werte für unterschiedliche Essigsäure- und Propionsäure-Derivate des Cyclams zusammengestellt. Analog zum Cyclam **3** können die ersten beiden  $pK_s$ -Werte den *trans*-ständigen Stickstoffatomen im Cyclam-Ring zu geordnet werden. Wie beim  $[\text{H}_2\text{Cyclam}]^{2+}$  (Kapitel 2.1.1, S.6) erfolgt die Stabilisierung vermutlich auch hier über intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen von protonierten und deprotonierten Stickstoffatomen. Erwartungsgemäß ist die Acidität der beiden Stickstoffatome aufgrund der hohen Abstoßung bei vollständiger Protonierung

hoch ( $pK_s < 2$ ). Die Acidität der Carboxylgruppen wird bestimmt durch die Länge der Kohlenstoffkette und der Anzahl der Substituenten am Cyclam-Grundgerüst. So beobachtet man eine Zunahme der  $pK_s$ -Werte in der Reihe vom monosubstituierten TE1A **7** zum tetrasubstituierten Cyclam-Essigsäure-Derivat TETA **6**. Des Weiteren nimmt die Acidität vom Acetat zum Propionat ab. Ursache sind die abnehmenden elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Ammoniumfunktionen.

Tabelle 4:  $pK_s$  - Werte von TE1A **7**, TE1P **13**, TE3A **10**, TETA **6** und TETP **16**

	$pK_s$						Literatur
	1. N	2. N	1. COO <sup>-</sup>	2. COO <sup>-</sup>	3./4. COO <sup>-</sup>	3./4. N	
<b>7</b> <sup>(a)</sup>	12,18	10,87	3,01	-	-	< 2	[46]
<b>13</b> <sup>(a)</sup>	11,45	10,11	3,66	-	-	< 2	[46]
<b>10</b> <sup>(b)</sup>	11,91	9,23	3,73	2,94	-	1,99	[47]
<b>6</b> <sup>(c)</sup>	11,24	9,87	4,25	3,50	2,17	1,42	[48]
<b>16</b> <sup>(c)</sup>	10,47	10,65	4,33	3,60	3,06	2,28	[48, 49]

(a) I = 0,5 M KNO<sub>3</sub>, T = 25°C (b) I = 0,1 M NMe<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, T = 25°C (c) I = 0,1 M KCl, T = 25°C

### 2.3.3 Kupfer(II)-Komplexe von N-funktionalisierten Cyclam-Carboxyl-Derivaten

In der Literatur sind keine Kristallstrukturen von Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure-Derivaten beschrieben. Demgegenüber liegen für eine Reihe von Cyclam-Essigsäure-Derivaten Kristallstrukturen entsprechender Kupfer(II)-Komplexe vor. Die ermittelten Kristallstrukturen der Cu(II)-Komplexe der Cyclam-Essigsäure-Derivate (**6**, **9**, **11**) geben strukturelle Informationen über die Cu-N bzw. Cu-O-Bindungsabstände und die damit verbundene Jahn-Teller-Verzerrung. Dabei können Rückschlüsse auf die Flexibilität des gebildeten Kupfer(II)-Komplexes gezogen werden. Die Kupfer(II)-Komplexe der Verbindungen **6** und **9** weisen eine oktaedrische 4+2-Geometrie mit *trans*-III-Konfiguration auf (Abbildung 9 bzw. Abbildung 10). Das *N,N'*-ethylenverbrückte Derivat **11** besitzt eine *cis*-V-Konfiguration (Abbildung 10). Silversides *et al.* [50] berichten über zwei strukturanaloge Cu<sup>II</sup>(H<sub>2</sub>TETA) Komplexe (Abbildung 9).

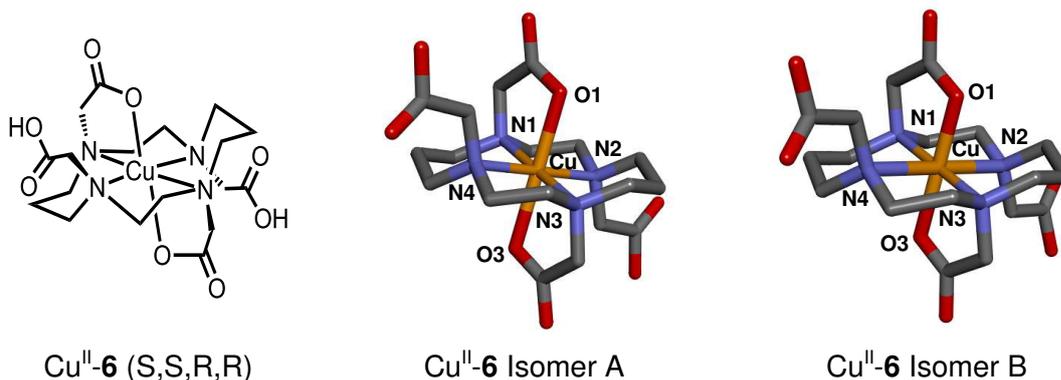


Abbildung 9: Ergebnisse der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-H}_2\text{TETA}$  (Isomer A:  $\text{Cu-N1/N3} = 2,057 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-N2/N4} = 2,164 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-O1/O3} = 2,269 \text{ \AA}$ ; Isomer B:  $\text{Cu-N1/N3} = 2,002 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-N2/N4} = 2,378$ ,  $\text{Cu-O1/O3} = 2,020 \text{ \AA}$ ) [50]

Die strukturgleichen Verbindungen von  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{TETA})$  weisen zwei deprotonierte, koordinierende und zwei nicht koordinierende, protonierte Essigsäuregruppen in axialer Ausrichtung auf. Die für das  $d^9$ -Metall-Zentrum zu erwartende Jahn-Teller-Verzerrung tritt bei Isomer A entlang der axialen O1-Cu-O3-Bindung auf, wohingegen die Streckung bei Isomer B innerhalb der Ringebene des Makrocyclus (N2-Cu-N4-Bindung) verläuft. Ursache sind die unterschiedlichen Bindungslängen. Das Vorhandensein dieser beiden strukturanalogen Komplexe lässt vermuten, dass in Lösung eine erhöhte Dynamik herrscht, in der die Jahn-Teller-Verzerrung wechselt. Möglicherweise beeinflusst diese Flexibilität in Lösung auch die Stabilität, da mehrere Konfigurationsisomere gleichzeitig gebildet werden [50]. Zudem ist die Bildung der Konfigurationsisomere unterschiedlicher Stabilität pH-Wert- und temperaturabhängig. Die Einkristallstrukturanalyse des  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-trans-TE2A}$   $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-9}$  Komplexes zeigt auch hier die zu erwartende, verzerrte oktaedrische Struktur. Ähnlich wie beim  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{TETA})$  Isomer A findet die Jahn-Teller-Verzerrung entlang der Cu-O-Bindungen statt [51]. Die kurzen Cu-N-Bindungslängen hingegen sprechen für eine starke Koordination (Abbildung 10).

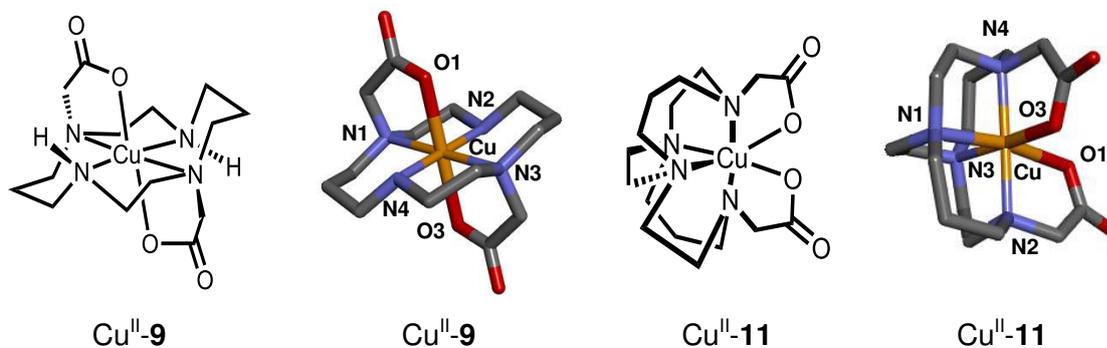


Abbildung 10: Ergebnisse der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-9}$  ( $\text{Cu-N2/N4} = 2,014 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-N1/N3} = 2,095 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-O1/O3} = 2,263 \text{ \AA}$ ) [51] und  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-11}$  ( $\text{Cu-N1} = 2,245 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-N3} = 2,068 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-N2} = 2,043 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-N4} = 2,050 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-O1} = 1,998 \text{ \AA}$ ,  $\text{Cu-O3} = 2,327 \text{ \AA}$ ) [52]

Im Gegensatz dazu bildet der Kupfer(II)-Komplex des *N,N'*-ethylenverbrückten Cyclam-Essigsäures Cu<sup>II</sup>-**11** eine starre Struktur [52]. Die Jahn-Teller-Verzerrung ist hier anders als bei den *trans*-Isomeren entlang der axialen O3-Cu-N1-Bindung anzutreffen. Die zwei äquatorial angeordneten O-Cu-N-Bindungen, die orthogonal zueinander stehen, ergeben 360° und liegen in einer Ebene. Diese rigide, gefaltete Struktur weist wenig Flexibilität auf. Das könnte die erhöhte In-vivo-Stabilität im Vergleich zu den flexibleren *trans*-Konfigurationen erklären [52].

#### 2.3.4 Spektroskopische und elektrochemische Eigenschaften von Cu(II)-Cyclam-Derivaten

Mittels spektroskopischer Methoden, insbesondere auf der Basis von UV/VIS-, IR-, und ESR-Untersuchungen, können wertvolle Informationen zur Koordinierungsgeometrie und dem Protonierungsgrad der gebildeten Kupfer(II)-Komplexe gewonnen werden. Im basischen Milieu sind die koordinierenden und nicht koordinierenden Carboxylgruppen deprotoniert. Wohingegen unter stark sauren Bedingungen (pH < 1) alle auftretenden Carboxylgruppen protoniert vorliegen. Diese Protonierung verursacht eine Blauverschiebung der d-d-Bande von Cu<sup>2+</sup> im sichtbaren Bereich. Mittels Infrarot-Schwingungsspektroskopie ist es ebenfalls möglich, Rückschlüsse auf das Protonierungsverhalten der koordinierenden Carboxylatgruppen zu ziehen. Woodin *et al.* [53] untersuchten Cu<sup>II</sup>(H<sub>2</sub>TETA) Cu<sup>II</sup>-**6** mittels FT-IR in 0,1 M DCI und in 1 M DCI-Lösung. In 0,1 M DCI-Lösung sind sowohl die antisymmetrische Valenzschwingungen der Carbonsäurebanden ( $\nu_{as} = 1688-1724 \text{ cm}^{-1}$ ) als auch die der koordinierenden Carboxylatbanden ( $\nu_{as} = 1598-1620 \text{ cm}^{-1}$ ) zu beobachten. Mit Erhöhung der Deuteronenkonzentration (1 M DCI-Lösung) beobachtet man nur noch Schwingungen im Carbonsäurebereich, die allerdings zwei Banden zeigen. Diese zwei Banden beweisen die Existenz von zwei verschiedenen Carbonsäure-Spezies, die als koordinierende und nicht koordinierende Carbonsäuregruppen zugeordnet werden können [53].

Die Folge der Protonierung ist eine schrittweise Dissoziation des Metallions vom Liganden, wobei wahrscheinlich zuerst die Cu-O- und dann die Cu-N-Bindungen gebrochen werden. Diese sogenannte Säure-assoziierte Dissoziation verläuft in den meisten Fällen nach einer Reaktion pseudo-erster Ordnung. Die daraus ermittelte Halbwertszeit dieser Dissoziation ist ein Maß für die Stabilität des Komplexes. Die Dissoziationsgeschwindigkeit hängt von der Konfiguration und den Substituenten am Cyclam-Grundgerüst ab. Kotek *et al.* [54] untersuchten die

Dissoziationsgeschwindigkeit von penta- (pc) und hexakoordinierenden (hc) Kupfer(II)-1,8-Bis-methylphosphonsäure-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan pc-Cu<sup>II</sup>-**17** und hc-Cu<sup>II</sup>-**17** in Abhängigkeit von der Temperatur und Säurekonzentration (1 - 5 M HClO<sub>4</sub>). Die resultierende Funktion kann für pc-Cu<sup>II</sup>-**17** auf der Basis von Gleichung 1 beschrieben werden, wobei  $k_1$  (s<sup>-1</sup>) und  $k_2$  (M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>) die Geschwindigkeitskonstanten und  $K$  die Säurekonstante darstellen.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 \cdot K \cdot [\text{H}^+] + k_2 \cdot K \cdot [\text{H}^+]^2}{1 + K \cdot [\text{H}^+]} \quad (1)$$

Die aus der Arrhenius- und Eyring-Gleichung berechnete Aktivierungsenergie, sowie Enthalpie und Entropie geben Auskunft über möglicherweise ablaufende Protonierungsprozesse. Anhand dieser berechneten Daten war es möglich, einen Mechanismus für die Säure-assoziierte Dissoziation (Abbildung 11) zu postulieren.

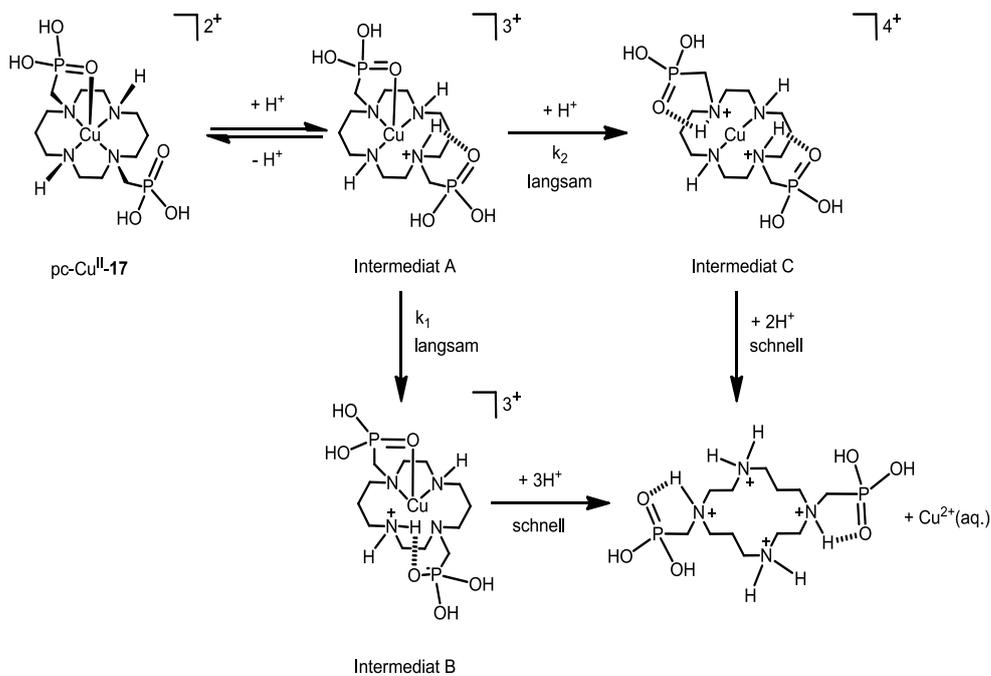


Abbildung 11: Mechanismus der Säure-assoziierten Dissoziation von pc-Cu<sup>II</sup>-**17** (modifiziert nach [54])

Die Protonierungskonstante beschreibt dabei eine Gleichgewichtsreaktion zwischen dem deprotonierten Makrocyclus und dem ersten Protonierungsschritt der tertiären cyclischen Aminfunktion (Intermediat A). Aus der Protonierung geht wahrscheinlich eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem nicht-koordinierenden Sauerstoffatom der Phosphonsäuregruppe hervor. Diese Annahme wird durch den negativen Wert der Entropie (-43 J·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>) und die exotherme Enthalpie (-8,3 kJ/mol) untermauert. Da für das pc-Cu<sup>II</sup>-**17** zwei Spezies ermittelt wurden, sind zwei Prozesse postuliert worden.

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für  $k_1$  resultiert in einer Umlagerung des Protons, wobei eine Wasserstoffbrückenbindung über der ethylenverbrückten Kette des Makrocyclus hervorgeht (Intermediat B) und die Cu-N-Bindung destabilisiert wird. Demgegenüber beschreibt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für  $k_2$  eine zweite *trans*-ständige Protonierung von Intermediat A zu Intermediat C. Diese Protonierung verursacht die Dissoziation der koordinierenden Phosphonsäuregruppe unter Verlust der zweiten Cu-N-Bindung. Die Phosphoryl-Sauerstoffatome bilden zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Ammoniumionen aus. Beide Intermediate B und C führen zur vollständigen Dissoziation des  $\text{Cu}^{\text{II}}$  und zur Protonierung aller Aminfunktionen.

Für den oktaedrischen  $\text{hc-Cu}^{\text{II}}\text{-17}$  Komplex konnte nur eine Spezies beobachtet werden (siehe Abbildung 12), so dass für Gleichung 1  $k_2 = 0$  angenommen werden kann. Dieser Komplex weist eine 1/3600 verlangsamte Dissoziation im sauren Milieu auf. Im Gegensatz zum  $\text{pc-Cu}^{\text{II}}\text{-17}$  *trans*-I Isomer nimmt der Komplex die thermodynamisch stabilere *trans*-III Konfiguration ein. Zunächst findet die Protonierung an einer sekundären Aminfunktion des Makrocyclus statt. Das *trans*-III Intermediat wird in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in ein *trans*-I Intermediat umgewandelt. Diese Konfigurationsänderung erfordert eine Inversion des Stickstoffatoms mit gleichzeitigem Bindungsbruch einer koordinierenden Phosphorylgruppe und wird durch die sehr hohe Aktivierungsenergie von 98 kJ/mol belegt.

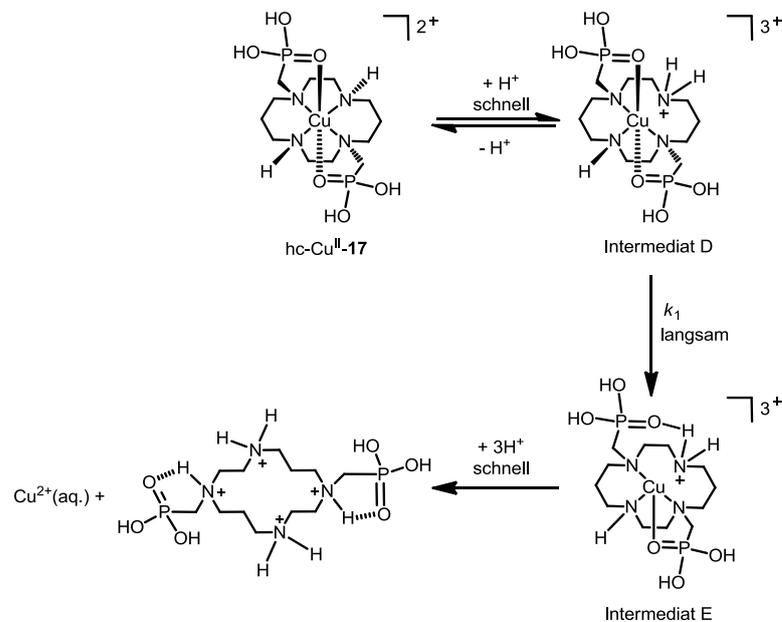


Abbildung 12: Mechanismus der Säure-assoziierten Dissoziation von  $\text{hc-Cu}^{\text{II}}\text{-17}$  [54]

Dass die Konfiguration einen entscheidenden Einfluss auf die kinetische Stabilität hat, zeigen auch die ethylenverbrückten Cyclam-Derivate Cu<sup>II</sup>-**11** und Cu<sup>II</sup>-**12**. Die rigiden *cis*-Komplexe sind im sauren Milieu (pH 0) wesentlich inerte als die *trans*-Konfigurationen. Die kinetische Stabilität nimmt in folgender Reihenfolge ab, da die Protonierung aufgrund der sterischen Hinderung erschwert wird: Cu<sup>II</sup>-**11** (*cis*-V) > Cu<sup>II</sup>-**12** (*cis*-V) >> Cu<sup>II</sup>-**9** (*trans*-III) > Cu<sup>II</sup>-**6** (*trans*-III) > Cu<sup>II</sup>-**3** (*trans*-III). Aber auch die nicht-kordinierenden Substituenten nehmen Einfluss auf die Protonierung und damit auf die auftretenden Wechselwirkungen im Ring-System. Der Kupfer(II)-Komplex des vierfach funktionalisierten Cyclam-Essigsäure-Derivats Cu<sup>II</sup>-**6** dissoziiert unter sauren Bedingungen im Vergleich zu dem difunktionalisierten Cyclam-Essigsäure-Derivat Cu<sup>II</sup>-**9** 10-mal schneller (Tabelle 5).

Tabelle 5: Halbwertszeiten der Komplexstabilitäten ausgewählter Cu<sup>II</sup>-Komplexe (siehe Abbildung 8) der Säure-assoziierten Dissoziation und Standardpotentiale E° [45, 55-57]

Komplex	Halbwertszeit (t <sub>1/2</sub> ) 5 M HCl bei 90°C	Absorptionsmaximum [nm] in H <sub>2</sub> O	E° [V]
Cu <sup>II</sup> - <b>3</b>	< 3 min	510	-0,66 (irrev) <sup>(a)</sup>
Cu <sup>II</sup> - <b>6</b>	4,7 min	640	-0,88 (irrev) <sup>(b)</sup>
Cu <sup>II</sup> - <b>9</b>	46 min	568	-1,10 (irrev) <sup>(b)</sup>
Cu <sup>II</sup> - <b>11</b>	159 h	628	-1,08 (quasi-rev) <sup>(c)</sup>
Cu <sup>II</sup> - <b>12</b>	~100 h	647	-0,68 (quasi-rev) <sup>(c)</sup>

- (a) E° vs. NHE in 0,1 M NaClO<sub>4</sub>, (b) E° vs. Ag/AgCl gemessen in 0,1 M Essigsäure, (pH 7),  
 (c) E° vs. Ag/AgCl in 0,1 M NaOAc-Lösung (pH 7)

Rückschlüsse über die Stabilität der gebildeten Kupfer(II)-Komplexe können auf der Basis von elektrochemischen Untersuchungen gezogen werden. Einen linearen Zusammenhang zwischen dem Standardpotential und der thermodynamischen Stabilitätskonstante liefert die Nernst-Gleichung:

$$E = E_{\text{aq}}^{\circ} - \frac{2,303 \cdot RT}{nF} \log \frac{K_{\text{Cu}^{\text{II}}\text{L}}}{K_{\text{Cu}^{\text{I}}\text{L}}} \quad (2)$$

Interessant ist im Zusammenhang mit den Komplexstabilitäten vor allem, dass die Kupfer(II)-Stabilitäten ausgewählter Komplexe mit Cu<sup>II/I</sup> Redoxpotentialen streng

korreliert sind. Das wurde erstmals von Rorabacher *et al.* [58] beschrieben und basiert auf der Tatsache, dass die Kupfer(I)-Komplexstabilitäten für bestimmte Liganden nahezu identisch sind. Demgegenüber variiert die Komplexstabilität der entsprechenden Kupfer(II)-Komplexe deutlich. In Abbildung 13 ist dieser sogenannte Rorabacher-Plot für 35 Kupfer(II)-Komplexe mit Stickstoff- und Schwefel-haltigen Makrocyclen gezeigt. Damit kann  $\log K_{\text{Cu(II)}}$  auf der Basis des Redoxpotentials  $\text{Cu}^{\text{II/I}}$  abgeschätzt werden. Eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Redoxpotential und  $\log K$  konnte auch für Kupfer(II)-Komplexe mit Bispidin-Liganden gezeigt werden [59]. Je negativer das Standardpotential ist, umso höher ist die Stabilitätskonstante.

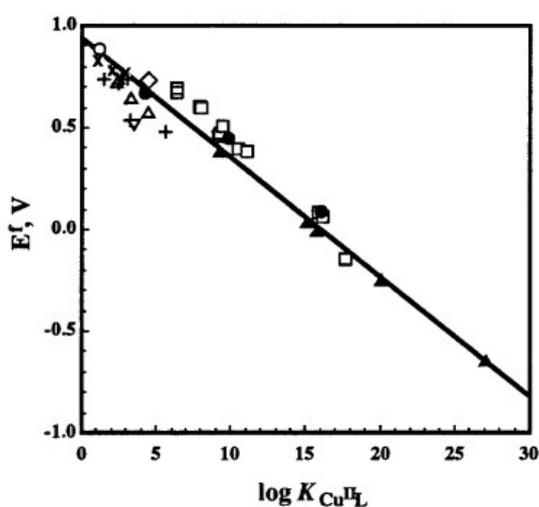


Abbildung 13: Rorabacher-Plot von 35 Kupfer(II)-Komplexen (E vs. SHE) (entnommen aus [58])

### 2.3.5 Radiomarkierung und Bioverteilung ausgewählter Cyclam-Essigsäure-Derivate

#### *Anmerkungen zu Bedingungen der Radiomarkierungen mit Cu-64*

Da die Cyclam-Essigsäure-Derivate mit Kupfer(II)-Ionen thermodynamisch stabile Komplexe bilden, sind diese in den Fokus der radiopharmazeutischen Forschung gerückt. Es zeigt sich aber, dass es nur eingeschränkt möglich ist, auf der Basis der thermodynamischen Stabilitäten, Aussagen zur Stabilität von Radiometallkomplexen in biologischen Systemen zu treffen. Entscheidender vielmehr ist die kinetische Stabilität des Komplexes, wobei eine Reihe von einflussnehmenden Faktoren berücksichtigt werden muss. Einige, der in der Literatur beschriebenen Cyclam-Essigsäure-Derivate (**9**, **6**, **11**, **12**) sind mit Kupfer-64 markiert und hinsichtlich ihrer Stabilität in biologischen Systemen untersucht worden. Um eine vollständige Markierung mit Kupfer-64 zu erzielen, sind bei den hier angegebenen Chelatoren unterschiedliche Markierungsbedingungen notwendig. Für die verbrückten Cyclam-Derivate **11** und **12**

müssen relativ harsche Bedingungen angewendet werden ( $T > 75^{\circ}\text{C}$ ) (Tabelle 6). Das ist insbesondere bei der Markierung von thermisch labilen Proteinen ein Nachteil, weil dann keine sogenannte Post-Labeling-Strategie (Direktmarkierung) angewendet werden kann. Die nicht-verbrückten Cyclam-Essigsäure-Derivate **6** und **9** hingegen zeigen eine sehr schnelle Komplexbildungskinetik bereits unter milden Bedingungen (Tabelle 6). Bemerkenswert sind allerdings die hohen Konzentrationen an Ligand, die eingesetzt worden sind ( $5\text{ mM} \cong \sim 2\text{ mg Ligand/ml}$ ). Damit liegt der Ligand immer in einem sehr großen Überschuss vor und deutlich über dem bei radiopharmazeutischen Anwendungen üblichen pico- bis nanomolaren Konzentrationsbereich [60, 61]. Um das Potential eines Chelators bewerten zu können, müssen solch niedrige Konzentrationen für Markierungsreaktionen eingesetzt werden.

Tabelle 6: Übersicht zu Markierungsbedingungen und radiochemischen Reinheiten (RCR) einiger Cyclam-Essigsäure-Derivate mit  $^{64}\text{Cu}$

Ligand	c [mM]	A [MBq]	Markierungsbedingungen	RCR [%]	Literatur
<b>6</b>	5	k. A.	0,1 M $\text{NH}_4\text{OAc}$ (pH 6,5), $25^{\circ}\text{C}$ , 30 min	100	[23]
<b>9</b>	5	3,7 - 18,5	0,1 M $\text{NH}_4\text{OAc}$ (pH 6,8), $30^{\circ}\text{C}$ , 20 min	100	[55]
<b>11</b>	10	3,7 - 18,5	$\text{EtOH}/\text{CsCO}_3$ , $75^{\circ}\text{C}$ , 4 h	> 95	[42]
<b>12</b>	5	74	$\text{EtOH}/\text{CsCO}_3$ , $95^{\circ}\text{C}$ , 2,5 h	100	[45]

#### *Rolle von Tierversuchen zur Bewertung der $^{64}\text{Cu}$ -Chelate*

Bioverteilungsstudien in Tiermodellen geben Auskunft über die pharmakokinetischen Eigenschaften des Komplexes wie Blut-Clearance und Anreicherung in bestimmten Organen. Die Pharmakokinetik wird deutlich von der Stabilität der Radiokupferkomplexe beeinflusst. Enzyme, Peptide und insbesondere Serumproteine sind in der Lage, *in vivo* eine Transchelatisierung und/oder Dissoziation herbeizuführen und damit den Komplex in den entsprechenden Organen abzubauen. Bei der Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase in Säugetieren spielt die Leber eine zentrale Rolle. Daher können hier erhöhte Anreicherungen gefunden werden, die auf instabile Kupfer(II)-Komplexe zurückzuführen sind. Bioverteilungsstudien ausgewählter Kupfer- $^{64}$ -markierter Cyclam-Carboxyl-Derivate sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Bioverteilungsdaten von verschiedenen  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Liganden nach 24 h (Postinjektion) in Sprague-Dawley Ratten (180 – 200 g) in SUV (standardized uptake values)<sup>1</sup>

$^{64}\text{Cu}$ -Ligand	SUV			Literatur
	Blut	Leber	Niere	
$^{64}\text{Cu}$ - <b>6</b>	0,079 ± 0,011	0,468 ± 0,074	0,300 ± 0,023	[55]
$^{64}\text{Cu}$ - <b>9</b>	0,074 ± 0,019	0,271 ± 0,058	0,142 ± 0,025	[55]
$^{64}\text{Cu}$ - <b>11</b>	0,035 ± 0,007	0,076 ± 0,014	0,173 ± 0,024	[42]

Im Vergleich zu  $^{64}\text{Cu}$ -**6** (TETA) und  $^{64}\text{Cu}$ -**9** (TE2A) zeigen die ethylenverbrückten Cyclam-Carboxyl-Derivate nach 24 h eine geringere Anreicherung in der Leber. Dieses Ergebnis kann auf eine erhöhte *In-vivo*-Stabilität zurückgeführt werden und korreliert mit den bereits diskutierten Daten zur kinetischen Stabilität unter sauren Bedingungen (siehe Kapitel 2.3.4, Seite 17). Interessanterweise veröffentlichten Pandya *et al.* [40] Bioverteilungsstudien in weiblichen Sprague-Dawley-Ratten, in der das zweifach funktionalisierte Cyclam-Essigsäure-Derivat  $^{64}\text{Cu}$ -**9** im Vergleich zum vierfach funktionalisierten  $^{64}\text{Cu}$ -**6** eine erhöhte Stabilität aufwies. Die unterschiedliche Anzahl an Essigsäure-Einheiten am Cyclam-Grundgerüst bestimmt auch hier die Stabilität.

### 2.3.6 Kupfermetabolismus

Um das Bioverteilungsverhalten von Radiokupferkomplexen interpretieren zu können, bedarf es einer detaillierten Kenntnis des Kupfermetabolismus in entsprechenden Tiermodellen. In biologischen Systemen tritt Kupfer hauptsächlich in den zwei Oxidationsstufen (+1/+2) auf. Es ist zudem ein essentielles Spurenelement, welches als struktureller und katalytischer Cofaktor in Metalloenzymen fungiert und u.a. für den Sauerstofftransport, die Eisenaufnahme und die Blutgerinnung verantwortlich ist [19]. Gelangen Kupfer(II)-Verbindungen intravenös in den Organismus, treffen sie im Blutstrom auf Plasmaproteine und Aminosäuren (Albumin, Transcuprein, Histidin). Freie Kupfer-Ionen sind aufgrund ihrer Reaktivität toxisch und werden daher unverzüglich an Proteine gebunden.

<sup>1</sup> Die aufgeführten Bioverteilungsstudien sind in der entsprechenden Literatur entweder in %ID/g oder %ID/Organ angegeben. Um die Werte vergleichen zu können, wurden diese von Dr. Ralf Bergmann (Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung, HZDR) in SUV umgerechnet.

Humanes Albumin ist wegen seiner hohen Konzentration (710  $\mu\text{M}$ ) [62] im Blutplasma neben  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Transcuprein) das wichtigste Transportprotein für Kupfer(II)-Ionen. Die Bindungskonstanten für Kupfer(II)-Ionen liegen zwischen  $\log K = 12 - 17$  [63, 64]. Transcuprein hingegen soll zwar eine höhere Affinität zu Kupfer(II)-Ionen haben, kommt aber nur in sehr geringen Konzentration (1,3  $\mu\text{M}$ ) vor [62]. Im portalen System wird proteingebundenes Kupfer zu dem zentralen Organ für die Kupfer-Homoöstase, der Leber, transportiert. Dort kann extrazelluläres Kupfer(II) membranständige Kupferkanäle (Coppertransporter 1, **Ctr1**) der Hepatocyten erst dann passieren, wenn dieses durch eine noch nicht näher charakterisierte Metalloreduktase (**Fre1/ Fre2**) zu Kupfer(I) reduziert worden ist. Der intrazelluläre Bedarf an Kupfer(I) wird vermutlich durch einen Konzentrationsgradienten gesteuert. Somit übernimmt dieses Transportprotein eine wichtige Rolle bei der Aufnahmeregulierung von Kupfer(I). Im Cytosol der Leberzellen angelangt, gibt es drei verschiedene Transportwege für Kupfer(I), an denen verschieden Chaperone (Transportproteine) beteiligt sind. Mittels **Ccs** (copper chaperone for superoxide dismutase) wird Kupfer(I) für die Bildung des antioxidativen Enzyms Zink-Kupfer-Superoxid-Dismutase 1 (Zn/Cu Sod1) zur Verfügung gestellt, während Cox 17 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 17) für den Kupfertransport zu den Enzymen der mitochondrialen Atmungskette verantwortlich ist. Das Chaperon **Atox1** (Antioxidants 1) sorgt für den intrazellulären Transport von Kupfer(I) über die Kupfertransport-ATPase (**ATP7B**) zum Golgi-Netzwerk. Im Golgi-Netzwerk wird es an Proteine gebunden (Metallothionin, Caeruloplasmin, Hephastein, etc.) und aus den Zellen ins Blut sekretiert. Überschüssiges Kupfer(I) kann aber auch mit Hilfe eines zusätzlichen Transportproteins **COMMD1** (Copper metabolism (murr1) domain containing 1) aus den Hepatocyten geschleust werden, um es dann über die Galle auszuschleiden [19, 65].

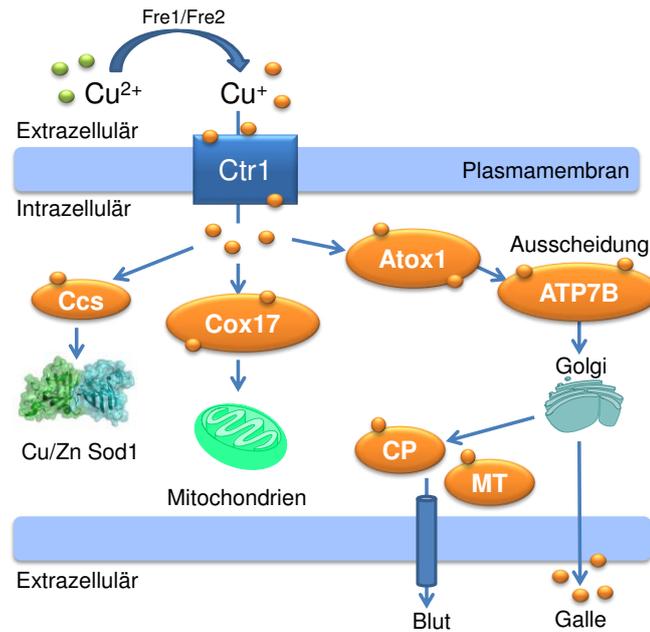
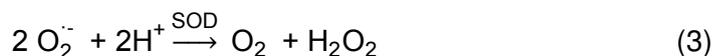
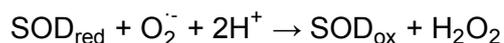
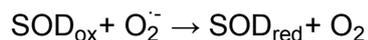


Abbildung 14: Kupferaufnahme, Regulierung und Ausscheidung in den Hepatocyt  
 Abkürzungen: **Ctr1** = membranständiger Kupfer(I)transporter; **Ccs**, **Cox17**, **Atox1**, **ATP7B** = Chaperone; **Sod1** = Zn/Cu Superoxid-Dismutase 1; **CP** = Caeruloplasmin, **MT** = Metallthionin

*In vivo* gibt es sowohl extra- als auch intrazelluläre kupferbindende Enzyme bzw. Proteine, die eine Dissoziation oder Transchelatisierung des Kupfer(II)-Ions vom Chelator hervorrufen können. Untersuchungen zur Stabilität der mit Kupfer-64 markierten Komplexe wurden experimentell in Anwesenheit von SOD und humanen Serum durchgeführt. Bei der Cu/Zn-SOD handelt es sich um ein Enzym mit einer Molmasse von 32 kDa, das im Cytoplasma aller eukaryotischen Zellen vorkommt und vorwiegend in Leber- bzw. Nierenzellen präsent ist. Das Enzym Superoxid-Dismutase katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Radikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Es dient als Radikalfänger und besitzt somit eine antioxidative Wirkung. Bei der Reaktion handelt es sich um eine Disproportionierungsreaktion, in der das Superoxid-Ion Reduktions- und Oxidationsmittel zugleich darstellt (Gleichung 3). Dabei ist das Enzym Überträger für ein Elektron, wobei das aktive Enzym die oxidierte Spezies darstellt. Durch die Übertragung eines Elektrons wird das Metallion im aktiven Zentrum reduziert und muss anschließend wieder durch ein Superoxidion und zwei Protonen regeneriert werden. Das dabei entstehende zelltoxische Wasserstoffperoxid muss über eine andere enzymkatalysierte Reaktion (Glutathionperoxidase) zu Wasser reduziert werden.



In der Literatur sind verschiedene Metabolismusstudien dargelegt worden, um Aussagen über kupferbindende Proteine, die eine Transchelatisierung hervorrufen können, zu erhalten. Hierzu wurden Leber- und Blutextrakte von männlichen Wistar-Ratten *ex vivo* nach bestimmten Zeiten auf verschiedene Metabolite hin untersucht. In den Leberextrakten sind durch Größenausschlusschromatografie zwei Peaks mit jeweils ~34 kDa und ~14 kDa detektiert worden [23]. Der Hauptmetabolit bei ~34 kDa ist der cytosolischen Superoxid-Dismutase 1 zugeordnet worden. Das wurde zudem auch durch eine Immunpräzipitation mittels Western Blot belegt. Der niedermolekulare Peak bei ~14 kDa weist auf ein cysteinreiches, metallbindendes Protein, das Metallothionin hin. Metallothionine befinden sich in der Membran des Golgi-Apparates und sollen überschüssiges Kupfer speichern oder ausschleusen. Die Untersuchungen in den Leberextrakten weisen auch hier auf eine erhöhte metabolische Stabilität des verbrückten Cyclam-Derivates  $^{64}\text{Cu-11}$  gegenüber kupferabhängigen Proteinen hin. Nach 20 h sind etwa  $24 \pm 7\%$  der eingesetzten Cu-64 Aktivität durch kupferabhängige Enzyme gebunden, wohingegen für  $^{64}\text{Cu-6}$  ( $^{64}\text{Cu-TETA}$ ) eine nahezu vollständige Transchelatisierung ( $92 \pm 5\%$ ) beobachtet wurde [23].

Untersuchungen von Blutextrakten mittels Größenausschlusschromatografie zeigen zwei Peaks mit einer molaren Masse von 64 kDa und 84 kDa. Diese sind den Plasmaproteinen Albumin und Holocaeruloplasmin (Apoenzym + Cofaktor = Holoenzym) zugeordnet worden. Caeruloplasmin ist mit einer Molmasse von 132 kDa eine Ferroxidase, welches sechs bis acht Kupferionen pro Molekül enthält. Es wird im Golgi-Apparat der Leberzellen als Apoenzym (inaktives Enzym, da es keinen Cofaktor trägt) synthetisiert und dort mit dem Cofaktor Kupfer beladen und aus den Leberzellen ins Plasma sekretiert. Caeruloplasmin dient als Kupferspeicher und kann damit auch als Hauptmetabolit detektiert werden [66, 67]. Das Protein wird meist nicht bei 132 kDa detektiert, sondern als zwei markante Bruchstücke bei 78 kDa und 84 kDa [23]. Der prozentuale Anteil der an Proteinen gebundenen Azamakrocyclen wurde mittels Integration aller Flächen aus der Größenausschlusschromatografie für die Blutextrakte aus männlichen Lewis-Ratten berechnet. Nach 4 h ist  $^{64}\text{Cu-6}$  ( $^{64}\text{Cu-TETA}$ ) ( $97 \pm 1\%$ ) nahezu vollständig an Plasmaproteine gebunden, wohingegen nur  $55 \pm 6\%$  des verbrückten Derivates  $^{64}\text{Cu-11}$ . Des weiteren zeigen die oben beschriebenen

Bioverteilungsdaten für die untersuchten Kupfer-64 markierten Azamakrocyclen *in vivo* eine nahezu vollständige renale Blut-Clearance nach 24 h [23].

## 2.4 Strategien regioselektiver *N*-Funktionalisierung zu Cyclam-Propionsäure-Derivaten

Im Gegensatz zu den substituierten Cyclam-Essigsäure-Derivaten sind entsprechende Propionsäure-Derivate bisher wenig beschrieben. Die Synthese von *N*-funktionalisierten Cyclam-Derivaten beruht entweder auf einer direkten Umsetzung von Propionsäure-Verbindungen mit Cyclam oder aber auf einer Schutzgruppenstrategie [68]. Je nach Substitutionsmuster und Funktionalisierungsgrad muss abgewogen werden, welche Synthesestrategie die effizienteste ist. Für Mono-*N*- und Tetra-*N,N,N',N''*-funktionalisierte Cyclam-Derivate ist eine direkte Umsetzung oft von Vorteil, da sich die Bildung des gewünschten Produktes über die Stöchiometrie steuern lässt. Für die Di-*N,N'*- und Tri-*N,N',N'*-Funktionalisierung von Cyclam-Derivaten bietet sich eine geeignete Schutzgruppenstrategie an, da die Bildung von Nebenprodukten erheblich reduziert werden kann.

### *Monofunktionalisierung*

Eine einstufige Synthese der Mono-*N*-funktionalisierten Cyclampropionsäure **13** wurde erstmals 1986 von Studer und Kaden [46] beschrieben. Cyclam wurde mit 3-Brompropionsäure in einem Verhältnis von 5:1 umgesetzt. Das Hauptprodukt dieser Reaktion ist stöchiometrisch bedingt das monoalkylierte Cyclam-Carboxyl-Derivat, da ein Überschuss an Cyclam gegenüber dem Alkylierungsmittel eingesetzt worden ist. Diese nucleophile Substitution wurde unter protischen Bedingungen (Ethanol) in Anwesenheit einer starken Base (Lithiumhydroxid) durchgeführt. Die Reinigung des Produktes erfolgte mit Hilfe der Anionenaustauschchromatografie. Das monoalkylierte Produkt konnte als Tetrahydrochlorid in hoher Reinheit synthetisiert werden. In den darauf folgenden Jahren berichteten einige Autoren über Optimierungen hinsichtlich eingesetzter Stöchiometrie, der Alkylierungsmittel in Bezug zum Makrocyclus, der Base und der Lösungsmittel [69-71]. Durch eine Reaktionsführung in Acetonitril lässt sich die Ausbeute erhöhen, was auf Löslichkeitsunterschiede von Edukt und Produkt zurückzuführen ist.

### Tetra-*N,N',N'',N'''*-Funktionalisierung

Die Tetra-*N,N',N'',N'''*-Funktionalisierung des Cyclams mit Propionsäuregruppen konnte anders als bei den Tetra-*N*-funktionalisierten Cyclam-Essigsäure-Derivaten nicht durch eine nucleophile Substitution am Cyclam-Ring generiert, sondern nur durch einen nucleophilen Angriff der sekundären Aminfunktion an Acrylsäure oder Acrylsäuremethylester realisiert werden. Diese einer Michael-Additionsreaktion analogen Synthese wurde erstmalig 1993 von Bulach *et al.* [72] für Cyclam-Tetrapropionsäuren beschrieben und durch andere Arbeitsgruppen später modifiziert [25, 48].

### Di-*N,N*-Funktionalisierung

Als weitaus diffiziler erweist sich die Synthese von Di-*N,N*-funktionalisierten Cyclam-Carboxyl-Derivaten. Ohne den Einsatz geeigneter Schutzgruppen, die eine gleichzeitige Kontrolle der auftretenden *cis*- und *trans*-Regioisomere (Abbildung 15) mit sich führt, ist eine Vielfalt an Nebenprodukten zu erwarten.

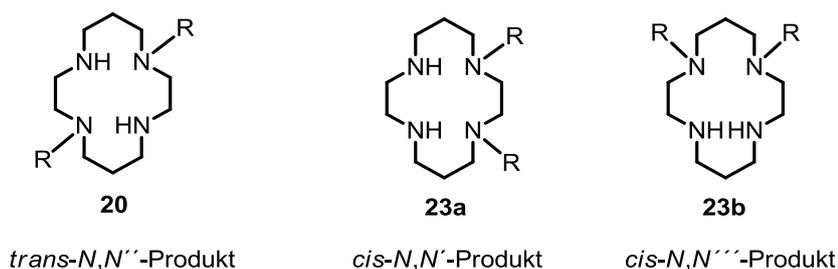


Abbildung 15: Darstellung der Regioisomere von Di-*N,N*-funktionalisierten Cyclam-Derivaten

Die in der Literatur beschriebenen Dialkylierungen von Tosyl-geschütztem Cyclam ergab keine selektive Funktionalisierung [51, 73]. Vielmehr ist hier ein Gemisch der drei Regioisomere vorzufinden. Um dennoch eine selektive Dialkylierung mit einem isomerenreinen Produkt zu gewährleisten, sind zwei geeignete Synthesestrategien von verschiedenen Arbeitsgruppen erarbeitet worden. Ausgehend vom Cyclam ist eine *trans-N,N'*-Funktionalisierung nur durch die Bildung eines Bisaminals möglich (Abbildung 16) [74, 75]. Um die Reaktivität dieses Moleküls zu verstehen, können Oberflächenpotentialberechnungen herangezogen werden. Oberflächenpotentiale können Ladungsdichteverteilungen und Polarisierbarkeit des Moleküls visualisieren. Eine Röntgeneinkristallstrukturanalyse dieses Moleküls zeigt eine *trans*-ständige Position der beiden Methylenbrücken. Daher ist ein nucleophiler Angriff nur an den sich gegenüberliegenden Stickstoffatomen möglich. Diese weisen nicht nur die elektronegativsten Potentiale auf, sondern sind sterisch auch begünstigt [75]. Auf

diesem Weg gelangt man zu *trans-N,N'*-funktionalisierten Produkten. Eine *cis-N,N'*-Funktionalisierung am Cyclam kann mittels Oxalsäurediethylester realisiert werden. Das dabei entstehende Cyclamoxamid **21** besitzt nur noch zwei reaktive, sekundäre Aminfunktionen in *N'',N'''*-Position und dirigiert die Substituenten in *cis*-Position [76] (Abbildung 16).

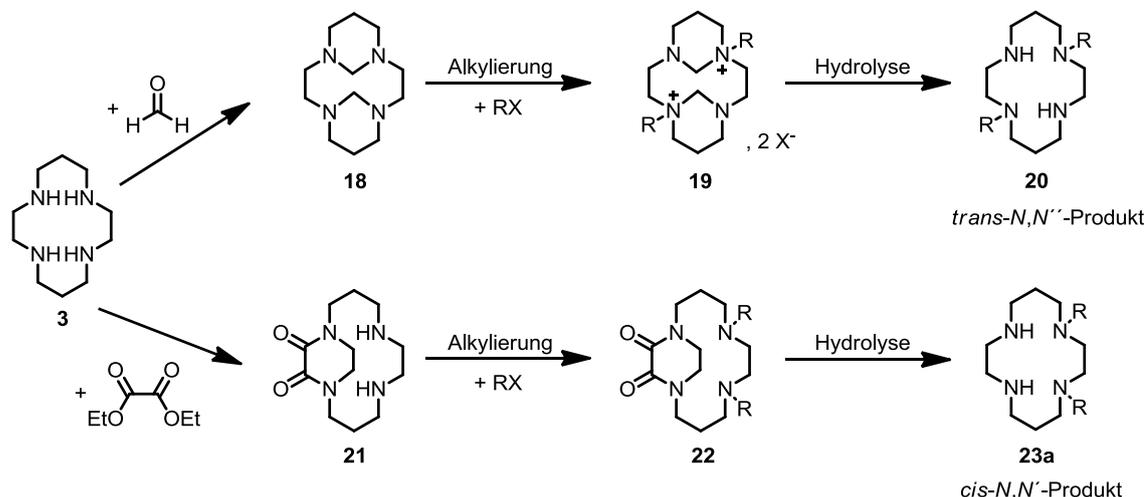


Abbildung 16: Synthesestrategie für eine *trans-N,N'*- [75] bzw. *cis-N,N'*-Funktionalisierung [76]

### *Tri-N,N',N''-Funktionalisierung*

Um das *Tri-N,N',N''*-funktionalisierte Cyclam-Carboxyl-Derivat zu synthetisieren, ist es von Vorteil, auch hier eine geeignete Schutzgruppe einzuführen. In diesem Zusammenhang hat sich die Benzylschutzgruppe bewährt, da sowohl die Einführung als auch Entfernung unter milden Bedingungen quantitativ erfolgen kann. Eine nucleophile Addition von Acrylsäure bzw. Acrylsäuremethylester an Cyclam-Derivaten lieferte auch die gewünschte Verbindung. Allerdings werden hier auch *Mono-N*- und *Di-N,N'*-funktionalisierte Produkte gebildet [77].

## 2.5 Cyclam-Peptid-Konjugate

Rezeptorspezifische Peptide haben sich im Laufe der Zeit zu einer wichtigen Funktionalität von Radiopharmaka entwickelt [78-83]. Viele Tumorzellen überexprimieren auf der Oberfläche eine Reihe von Rezeptoren, die durch bestimmte Peptide mit hoher Affinität adressiert werden können. Neben dem Einsatz von Peptiden spielen auch Proteine (beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente) eine wichtige Rolle. Der große Vorteil von Peptiden ist ihre geringe Immunogenität, chemische Stabilität, niedrige Molmasse und damit schnelle Pharmakokinetik. Dadurch kann das Zielgewebe deutlich schneller erreicht werden als beispielsweise mit

Antikörpern. Allerdings ist die biologische Halbwertszeit der meisten Peptide gering, da körpereigene Peptidasen die Peptide schnell abbauen können. Um die metabolische Stabilität zu erhöhen, gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen ist es möglich, bestimmte Aminosäuren oder -sequenzen des Peptides durch nicht natürliche Aminosäuren auszutauschen oder andere Derivatisierungen vorzunehmen, so dass das Peptid von Peptidasen nicht mehr erkannt oder abgebaut wird. Dennoch sollte eine derartige Modifizierung die Affinität zum Rezeptor nicht verschlechtern. Zudem verspricht die Kupplung von mehreren identischen zielsuchenden Einheiten am selben Molekülgerüst eine durch den multivalenten Effekt hervorgerufene Stabilisierung und erhöhte Affinität zum Rezeptor [24]. Um rezeptorspezifische Peptide für das Aufspüren von Tumoren einsetzen zu können, bietet sich die Funktionalisierung mit  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Chelatoren an. Bisher sind aber nur wenige  $^{64}\text{Cu}$ -markierte Cyclam-Derivate, gekuppelt an rezeptorspezifischen Peptiden, beschrieben worden. Diese beruhen im Wesentlichen auf dem Cyclam- oder Cyclen-Grundgerüst. Einige Zelloberflächenproteine (Somatostatin Rezeptor, Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , Neurotensin, Gastrin Releasing Peptide (GRP), EGFR) erlangten als Zielstruktur einen großen Stellenwert in der Entwicklung von Radiodiagnostika [79]. Im Folgenden werden ausgewählte  $^{64}\text{Cu}$ -markierte Radiopharmaka näher beschrieben.

### 2.5.1 $^{64}\text{Cu}$ -markierte Somatostatin-Rezeptor bindende Peptide

Da Somatostatin auf einer Vielzahl von humanen Tumoren überexprimiert wird, sind Metallradiopharmaka entwickelt worden, die Somatostatin-spezifische Peptide kovalent binden. Unterschiedliche Radiometall-Chelate ( $^{68}\text{Ga}/^{64}\text{Cu}$ -NOTA **4**,  $^{68}\text{Ga}/^{64}\text{Cu}/^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA **5**,  $^{64}\text{Cu}$ -TETA **6**,  $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE2A **11**), die sowohl den Zugang zur Diagnostik mittels PET-Nukliden ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ) als auch den Einsatz von Elektronenstrahlern für die Therapie ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) gewährleisten, erlangten einen großen Stellenwert [2, 79]. Schwerpunkt für dieses Kapitel sind aber die  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Somatostatin-spezifischen Peptide.

Kupfer-64 markiertes TETA-Octreotid (OC) ist ein vielversprechender Tracer für die PET-Bildgebung. Als Chelator-Grundgerüst weist diese Verbindung Cyclam-Tetraessigsäure **6** auf. Das radiopharmakologisch relevante Peptid Octreotid **24** besteht aus acht Aminosäuren und adressiert den Somatostatin-Rezeptor Subtyp 2 (SSTR2), welcher in einigen humanen Tumoren des neuroendokrinen Systems, des Zentralnervensystems (ZNS), der Brust und der Lunge überexprimiert wird [84]. Mit der Modifizierung des SSTR2 Peptides Octreotid **24** zum Tyr<sup>3</sup>-Octreotat **25** gelang es, eine zweite Generation von Somatostatin Analoga zu entwickeln, die im Vergleich zum

[ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-TETA-OC eine höhere Bindungsaffinität zum Rezeptor aufweisen. Dabei wurde die in Position drei stehende Aminosäure Phenylalanin gegen Tyrosin ausgetauscht und der C-terminale Alkohol zur Säure oxidiert. Die Peptide der ersten und zweiten Generation, Octreotid (OC) **24** und Tyr<sup>3</sup>-Octreotat **25** (Y3-TATE), sind Somatostatin-Agonisten. Diese werden durch eine rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert [84].

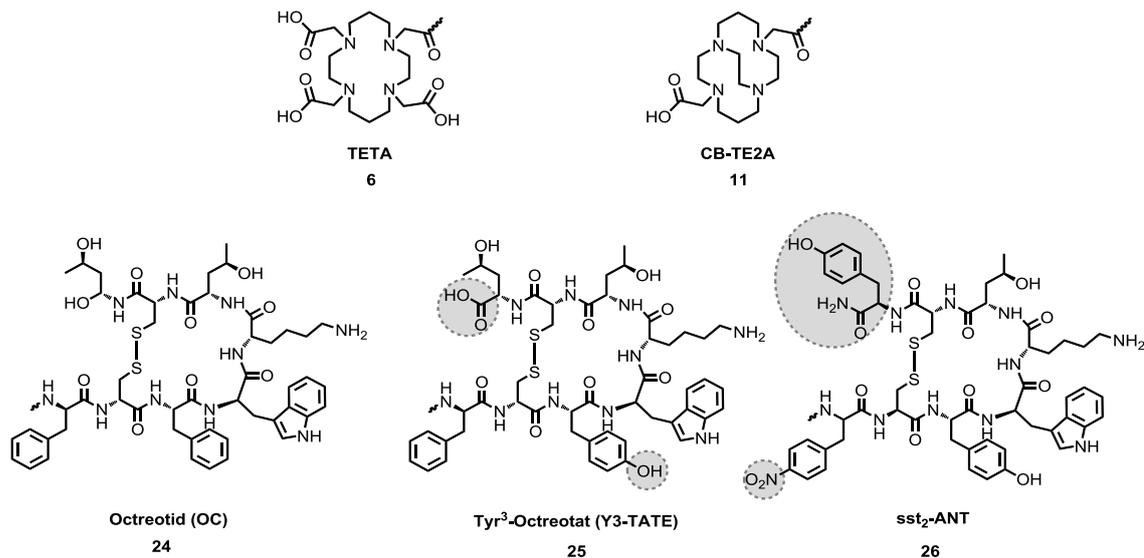


Abbildung 17: Aminosäuresequenzen der Somatostatin Analoga für die Bildung mit den  $^{64}\text{Cu}$ -Chelatoren TETA **6** und CB-TE2A **11**

Bioverteilungs- und Metabolismusstudien des  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Chelators TETA **6** mit sowohl der ersten Generation [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-TETA-OC als auch mit der zweiten [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-TETA-Y3-TATE zeigen eine signifikante Dissoziation des Kupfers *in vivo* [85, 86]. Mit Erkenntnis der deutlich besseren In-vivo-Stabilität von Cu<sup>II</sup>-**11**, im Vergleich zum Cu<sup>II</sup>-**6**, wurde dieses mit Tyr<sup>3</sup>-Octreotat **25** funktionalisiert [87]. Bioverteilungsstudien von männlichen AR42J-tumortragenden Lewis-Ratten zeigten eine erhöhte Aufnahme in Somatostatin-positiven Organen. Ursache hierfür könnte eine schnellere Internalisierung sein, da Untersuchungen an SSTR-exprimierenden AR42J Tumorzellen eine höhere Internalisierungszahl von oberflächengebundenen [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-Y3-TATE im Vergleich zum [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-TETA-Y3-TATE ergaben. Auch die Aufnahme von [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-Y3-TATE im Blut und in der Leber war nach allen untersuchten Zeitpunkten signifikant geringer als bei [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-TETA-Y3-TATE. Mit einem Tumor-zu-Blut-Verhältnis (T/B) von  $156 \pm 55$  für [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-Y3-TATE nach vier Stunden (zum Vergleich: [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-TETA-Y3-TATE besitzt ein T/B-Verhältnis von  $8,2 \pm 1,6$ ) bekräftigen diese Ergebnisse die hohe kinetische Stabilität *in vivo* und die Eignung als bildgebendes Radiopharmakon [87].

Lange Zeit glaubte man, dass Agonisten durch die Internalisierung eine verbesserte Tumoraufnahme zeigen als deren Gegenspieler - die Antagonisten. Ginj *et al.* [88] wiesen nach, dass es SSTR2 Antagonisten gibt, die nicht internalisiert werden und dennoch eine verbesserte Tumoraufnahme zeigen als deren Gegenspieler. Wadas *et al.* [89] evaluierten den Antagonisten [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-sst<sub>2</sub>-ANT und verglichen ihn mit dem Somatostatin Agonisten [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-Y3-TATE (siehe Abbildung 17). Interessanterweise zeigt der SSTR2 Antagonist im Gegensatz zum Agonisten eine 15-mal bessere Bindungskapazität ( $B_{max} = 23.000$  vs.  $1551$  fmol/mg Protein) und eine höhere Affinität zum Rezeptor ( $26 \pm 2,4$  vs.  $1,5$  nM). Dementsprechend ist das Tumor-zu-Blut-Verhältnis und Tumor-zu-Muskel-Verhältnis (T/M) hier nach 24 h in AR42J Tumorzellen bei [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-sst<sub>2</sub>-ANT (T/B 72, T/M 93) wesentlich höher als bei [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-Y3-TATE (T/B 20, T/M 45). Die erhöhte chemische Stabilität des Antagonisten einhergehend mit der erhöhten Hydrophobizität können als mögliche Faktoren für eine längere Wirkungsdauer in der lipidreichen Umgebung des Rezeptors diskutiert werden.

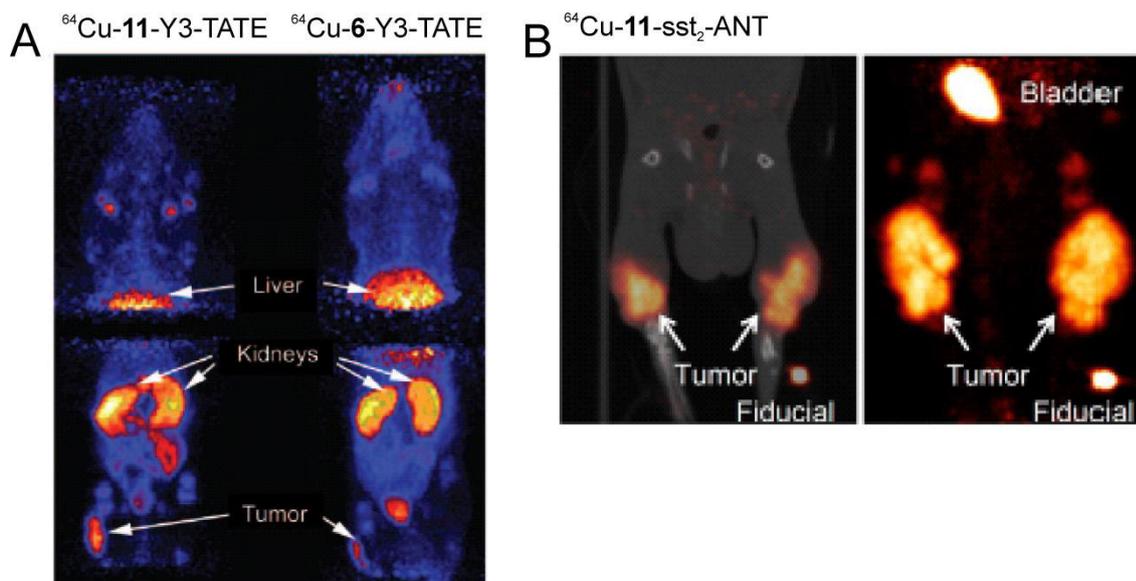
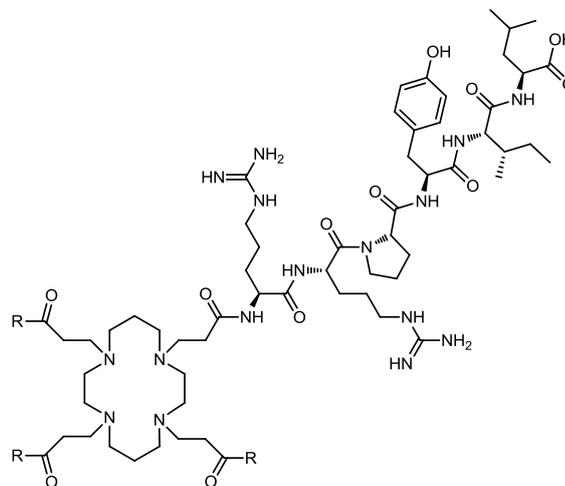


Abbildung 18: Kleintier-PET Aufnahme von AR42J-tumortragenden Lewis-Ratten nach 4 h von (A) [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-Y3-TATE (links; SUV Tumor 1,6) und [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-TETA-Y3-TATE (rechts; SUV Tumor 1,0) [87], (B) Kleintier-PET/CT (links) und Kleintier-PET (rechts) Aufnahme von AR42J-tumortragenden Lewis-Ratten nach 4 h von [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-CB-TE2A-sst<sub>2</sub>-ANT (SUV rechte hintere Gliedmaße 2,8; SUV linke hintere Gliedmaße 2,7) [89]

### 2.5.2 Multimere $^{64}\text{Cu}$ -markierte Neurotensin-Peptide

Das aus 13 Aminosäuren bestehende Neuropeptid Neurotensin mit der Sequenz pyroGlu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu und dessen Analoga sind für die radiopharmazeutische Krebsforschung ebenfalls vielversprechende receptorspezifische Biomarkermoleküle, um vor allem Pankreas, Prostata, aber auch Magen-Darm-Tumore zu detektieren. Dieses Neuropeptid zeigt eine hohe Selektivität und Affinität zum G-Protein-gekoppelten Neurotensinrezeptor NTR1 [90, 91]. Die kleinste biologisch aktive Sequenz des Neuropeptides ist NT(8-13)-OH (Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) mit einem freien C-Terminus [92]. Eine Reihe von Neurotensin-Analoga sind im Laufe der Zeit modifiziert worden, um die biologische Halbwertszeit *in vivo* zu erhöhen [93-95]. Röhrich *et al.* [25, 96] untersuchten  $^{64}\text{Cu}$ -markierte Cyclam-[NT(8-13)-OH]<sub>x</sub> Multimere, um den Einfluss multivalenter Wechselwirkungen auf die metabolische Stabilität und Affinität zu klären. Als Chelatorgrundsystem wurde die Cyclam-tetrapropionsäure eingesetzt. In-vitro-Bindungsstudien von  $^{64}\text{Cu}$ -markierten mono- **27** und tetrafunktionalisierten Cyclam-[NT(8-13)-OH]<sub>4</sub> **28** Derivaten (Abbildung 19) sind in NTR1 überexprimierenden HT29-Zelllinien durchgeführt worden und zeigten dabei einen signifikanten Einfluss auf die IC<sub>50</sub>-Werte.



**27** (Cyclam-[NT(8-13)-OH]): R = H  
**28** (Cyclam-[NT(8-13)-OH]<sub>4</sub>): R = [NT(8-13)-OH]

Abbildung 19: Strukturen des mono- und tetrafunktionalisierten Neurotensin Derivates Cyclam-[NT(8-13)]-OH **27** und des Cyclam-[NT(8-13)]<sub>4</sub>-OH **28**

Die höchste Affinität zum Rezeptor wies das  $^{64}\text{Cu}$ -markierte tetrafunktionalisierte Cyclam-[NT(8-13)-OH]<sub>4</sub> [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**28** Derivat (6,9 nM) auf, wohingegen das  $^{64}\text{Cu}$ -markierte monofunktionalisierte Cyclam-[NT(8-13)-OH] Derivat [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**27** (39 nM) nur noch ein 1/6 der Affinität zum NTR1 besaß. Der IC<sub>50</sub>-Wert des

tritiummarkierten nativen [<sup>3</sup>H]NT(8-13)-OH ist mit 0,4 nM signifikant besser, aber dessen biologische Halbwertszeit beträgt *in vivo* nur 30 s [97]. Metabolische Stabilitätsuntersuchungen des tetrameren Neurotensinkonjugates [<sup>64</sup>Cu]Cu-**28** in tumorfreien Wistar-Ratten verwiesen auf eine biologische Halbwertszeit von 34 min. Damit liegt die metabolische Stabilität dieses Neurotensin-Tetramers in der gleichen Größenordnung wie die bisher besten, der durch Aminosäureaustausch stabilisierten Neurotensin-Derivate [98]. Diese Ergebnisse unterstreichen den Einfluss von mehreren bindungsfähigen Einheiten auf die Affinität und die Stabilität und bestätigen damit die besondere Eignung von Multimeren für radiopharmazeutische Zwecke.

## 2.6 Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) und Liganden

Der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) ist eine der bedeutendsten Zielstrukturen für die Entwicklung von Krebsdiagnostika und -therapeutika sowie in der Strahlentherapie im Zusammenhang mit der Doppelstrangbruchreparatur, da dieser bei einer Vielzahl von Tumorentitäten überexprimiert wird (Kopf, Hals, Brust, Eierstock, Prostata, Pankreas, Blase, Niere, Lunge) [99]. Er gehört zu der Familie der Rezeptortyrosinkinase und ist in den Zellmembranen nahezu aller Stroma- und Epithelzellen vorhanden. Die Rezeptoren der EGFR-Familie werden in vier Subtypen unterteilt: ErbB1 (HER1, auch EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4), wobei der am häufigsten vorkommende Rezeptor ErbB1 (HER1 oder EGFR) ist. Dieser Rezeptor ist ein Glykoprotein bestehend aus 1186 Aminosäuren mit einer molaren Masse von 170 kDa. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung extrazellulärer Liganden an den Rezeptor, wodurch eine Phosphorylierung ausgelöst wird. Dabei werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die dann zelluläre Prozesse, wie Differenzierung, Zellwachstum, Proliferation und Apoptose beeinflussen [100]. Der wichtigste natürlich im Menschen vorkommende EGFR-spezifische Ligand ist EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), ein aus 53 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit drei intramolekularen Disulfidbrücken [101]. Aufgrund der starken mitogenen und angiogenen Aktivität des EGFs suchen Forscher nach neuen Liganden, um diese für pharmazeutische Zwecke nutzbar zu machen.

Die Arbeitsgruppen um Li [102] und Song [103] beschreiben zwei neue EGFR-spezifische Aminosäuresequenzen, die eine hohe Affinität zum Rezeptor und gleichzeitig eine geringe Immunogenität besitzen sollen. Es handelt sich dabei um das Hexapeptid D4 **29** mit der Sequenz Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr und das Dodecapeptid GE11 **30** mit der Sequenz Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile (Abbildung 20).

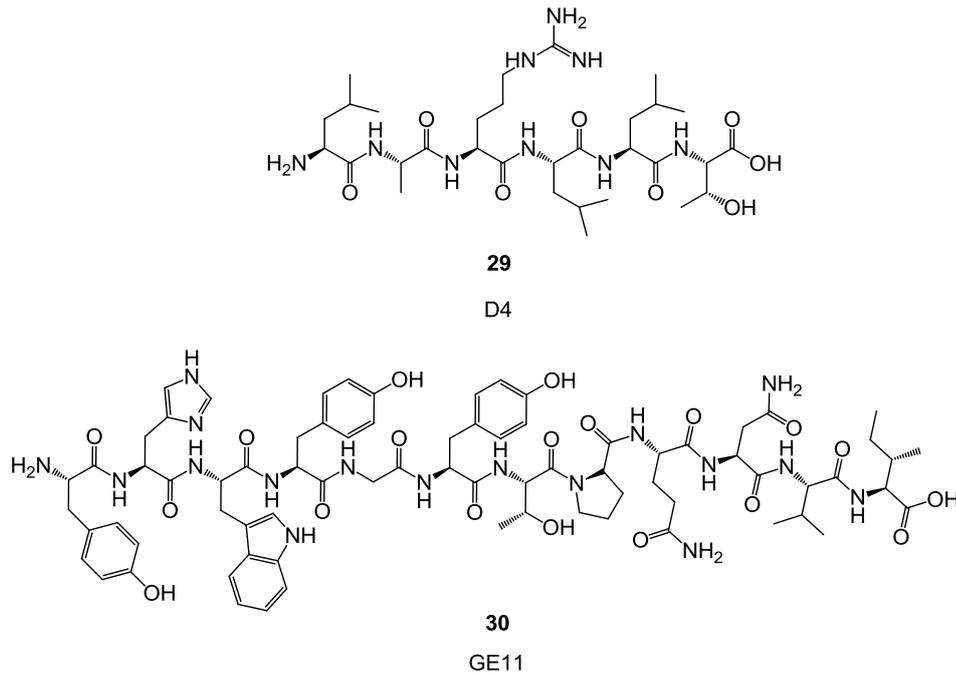


Abbildung 20: Biologisch aktive Aminosäuresequenzen der EGFR-spezifischen Peptide D4 **29** und GE11 **30**

Anhand von Docking Studien wurden für die Peptide D4 **29** und GE11 **30** die Bindungsposition am Rezeptor abgeleitet. Interessanterweise bindet D4 **29** im Gegensatz zu GE11 **30** nicht in der EGF-Bindungstasche des Rezeptors. Vielmehr bilden die Carbonylgruppe der Aminosäure Leu4 und die Hydroxylgruppe von Thr6 Wasserstoffbrückenbindungen aus, die an einer allosterischen Position mit dem Rezeptor interagieren. Wenn das Peptid D4 **29** an den Rezeptor gebunden wird, bildet die Sequenz Arg-Leu-Leu-Thr eine  $\beta$ -Schleife, wobei zwischen der Carbonylfunktion des Arginins und der Aminfunktion des Threonins eine Wasserstoffbrückenbindung entsteht. Bindungsaffinitäten zum EGF-Rezeptor von D4 sind bisher nicht bekannt.

Die Peptid-Rezeptor-Wechselwirkungen von GE11 **30** werden durch Wasserstoffbrückenbindungen der Aminosäure Tyr2 und Ile12 stabilisiert [104]. Bindungsstudien mit  $^{125}\text{I}$ -markierten GE11 **30** in einer humanen Leberkarzinomzelllinie SMMC-772 zeigten gute Affinitäten zum EGF-Rezeptor ( $K_d = 22,3 \pm 0,4 \text{ nM}$ ,  $B_{\text{max}} = 2741 \text{ fmol/ml Protein}$ ) [102].

Im Rahmen dieser Arbeit sind basierend auf diesen Literaturhinweisen sowohl das Modellpeptid Leu-Ala **29a** als auch die Peptide D4 **29** und GE11 **30** für Konjugationsreaktionen mit ausgewählten Cyclam-Propionsäure-Derivaten eingesetzt worden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Charakterisierung von Cyclam-Derivaten, die mit einer unterschiedlichen Anzahl von Propionsäureresten funktionalisiert worden sind. Die daraus abgeleiteten Kupfer(II)-Komplexe wurden spektroskopisch und radiochemisch untersucht und ihre Eigenschaften diskutiert. Um die Eignung dieser neuen Chelator-Klasse für einen potentiellen nuklearmedizinischen Einsatz bewerten zu können, erfolgte ein Vergleich dieser neu entwickelten Radiokupfer-Komplexe mit den bereits etablierten Cyclam-Essigsäure-Derivaten hinsichtlich ihres Markierungsverhaltens und ihrer Stabilität.

#### 3.1 Darstellung von unterschiedlich funktionalisierten Cyclam-Propionsäure-Liganden und deren Kupfer(II)-Komplexe

##### 3.1.1 Synthese verschieden substituierter Cyclam-Propionsäuren

Für die Synthese von Cyclam-Propionsäure-Liganden konnte auf eine Reihe von Literaturvorschriften zurückgegriffen werden (vgl. Kapitel 2.4).

##### *Darstellung von Cyclam-Monopropionsäure 13*

Die Synthese und Reinigung der Cyclam-Monopropionsäure **13** erfolgte nach literaturbekannten Vorschriften [46, 70] mit einer Ausbeute von 58% (Abbildung 21). Durch einen vierfachen Überschuss des Makrocyclus Cyclam **3** gegenüber dem Alkylierungsmittel 3-Brompropionsäure wird stöchiometrisch bedingt bevorzugt nur das monofunktionalisierte Produkt **13** gebildet. Die nucleophile Substitutionsreaktion ist unter wasserfreien Bedingungen in Acetonitril in Anwesenheit von Kaliumcarbonat durchgeführt worden. Die langsame Zugabe (über 1 h) des vorher in wasserfreiem Acetonitril gelösten Alkylierungsmittels 3-Brompropionsäure und die begrenzte Löslichkeit des Eduktes Cyclam **3** im aprotischen Lösungsmittel, verschieben das Gleichgewicht dieser Reaktion zu Gunsten des Produktes. Die Suspension wurde 7 h bei 55 - 60°C unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Der nichtlösliche Überschuss an Cyclam **3** bzw. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde anschließend abfiltriert. Das noch Cyclam **3** enthaltende Produkt **13** konnte mittels eines starken Anionenaustauschers (DOWEX 1×8, 100-200 mesh) mit 0,1 M HCl als Elutionsmittel vom Edukt getrennt werden. Das Produkt **13** lag als Tetrahydrochlorid mit einer Reinheit von >99% vor. Bestätigt werden konnte dies mittels NMR, ESI-MS, Elementaranalyse und HPLC (siehe Kapitel 5.4, S.112). Aus der Gefriertrocknung des

Produktes resultierten unterschiedliche Gehalte an molekular gebundenem Wasser pro Charge.

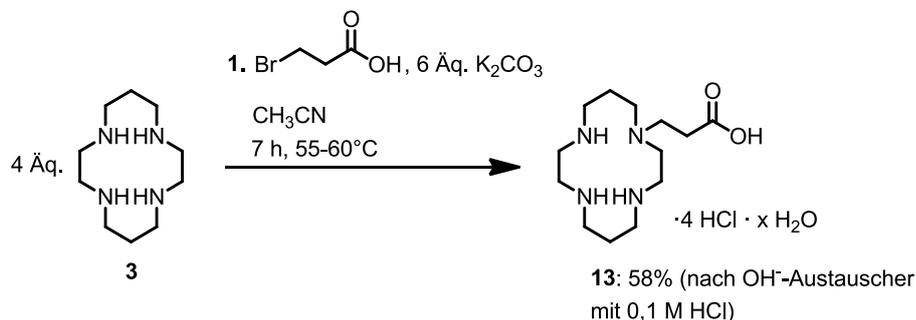


Abbildung 21: Syntheschema zur Darstellung der Cyclam-Monopropionsäure TE1P **13**

#### Darstellung von *trans*-*N,N'*-Cyclam-Dipropionsäure **14b**

Für die Darstellung des *trans*-*N,N'*-funktionalisierten Liganden *trans*-TE2P **14b** lagen keine Informationen in der Literatur vor. Hier musste eine geeignete Schutzgruppenstrategie gewählt werden, um sowohl eine regioselektive Funktionalisierung zu gewährleisten, als auch Gemische aus mono-, tri- und tetraalkyliertem Cyclam zu vermeiden. In Abbildung 22 sind Synthesestrategie zur Darstellung von *trans*-*N,N'*-funktionalisierten Zwischenverbindungen dargestellt:

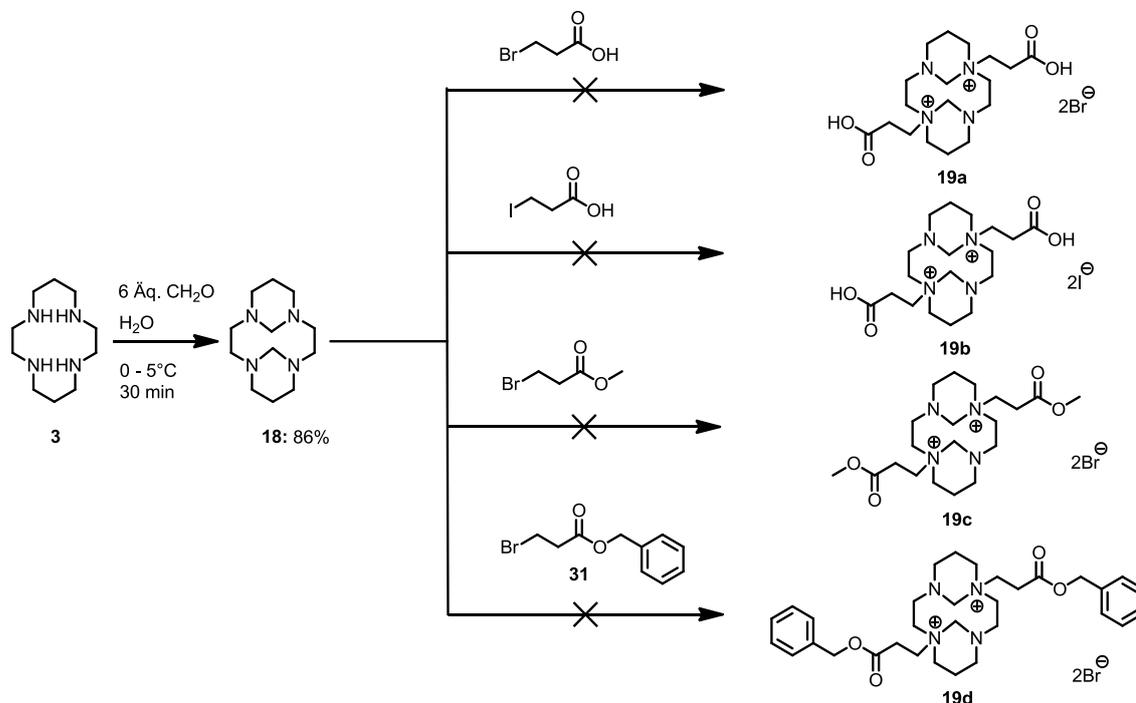


Abbildung 22: Ursprüngliche Synthesestrategie zur Darstellung der *trans*-*N,N'*-funktionalisierten Ammoniumsalze **19a - d**

Der Schlüsselschritt dieser Reaktion ist die Bildung eines methylenverbrücktenamins – das Bisaminal **18**. Die Umsetzung von Cyclam **3** mit sechs Äquivalenten einer wässrigen Formaldehyd-Lösung (37%ig) führte bei 0 - 5°C zu der gewünschten Verbindung **18**. Nach einer Synthesevorschrift von [74, 75] konnte das Zwischenprodukt **18** durch anschließende Filtration in sehr guten Ausbeuten isoliert werden (Abbildung 22).

Die Autoren Pandya und Royal *et al.* [55, 75] beschrieben mehrere Reaktionen des Bisaminals **18** mit unterschiedlichen Reagenzien (Methyliodid, Benzylbromid, Picolylchlorid, *tert*-Butylbromacetat), die die Bildung der gewünschten *trans*-*N,N'*-funktionalisierten Ammoniumsalze **19** gewährleistete.

Die Alkylierung von **18** mittels 3-Brompropionsäure und deren Derivate (vgl. Kapitel 5.4, Verbindung **31**) führte allerdings nicht zu den Verbindungen **19a - d** (Abbildung 22). Trotz Änderung der Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Temperatur (RT, 35°C, 55 - 60°C), des Lösungsmittels (CH<sub>3</sub>CN, CHCl<sub>3</sub>) und des Einsatzes unterschiedlicher Basen (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NEt<sub>3</sub>) war es nicht möglich, die Verbindungen **19a - d** zu isolieren. Mittels NMR und ESI-MS konnte nachgewiesen werden, dass keine Produktbildung stattgefunden hat. Als Konkurrenzreaktion kann neben der gewünschten Substitutionsreaktion auch die Eliminierung auftreten.

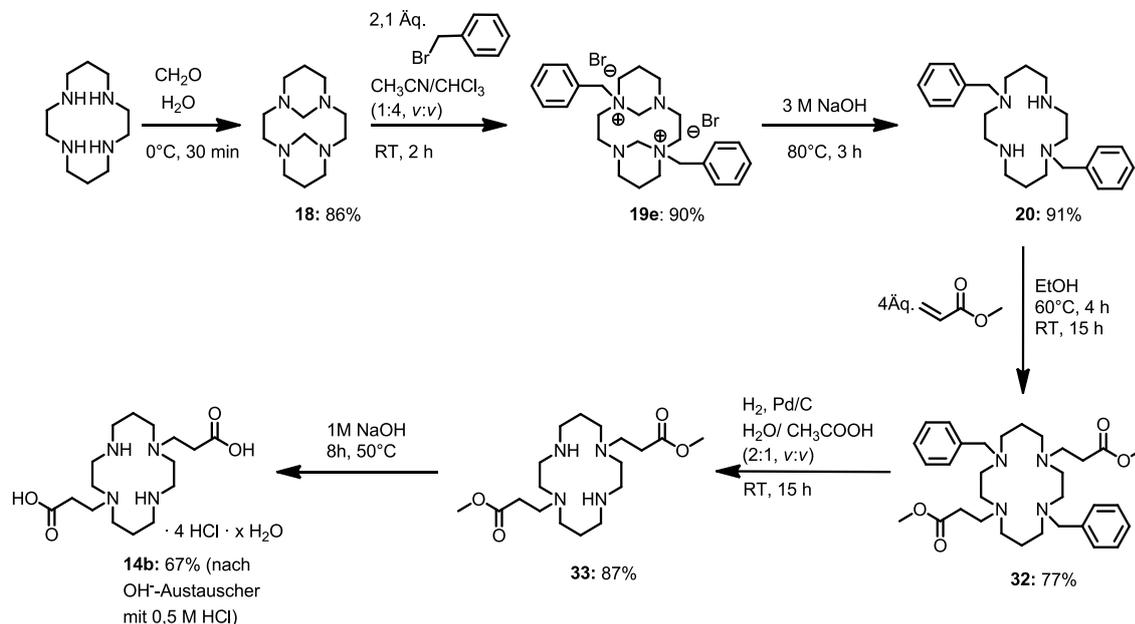


Abbildung 23: Darstellung von *trans*-TE2P **14b**

In Abbildung 23 ist ein alternativer Weg dargestellt, der die Synthese des *trans*-*N,N'*-dibenzylierten Cyclams **20** als Schlüsselschritt für die Herstellung des Endproduktes *trans*-TE2P **14b** beinhaltet. Die Benzylierung von Verbindung **18** wurde bereits 1998 von Royal *et al.* [75] veröffentlicht. Durch Alkylierung von **18** mit zwei Äquivalenten

Benzylbromid in  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  (1:4, v:v) bei RT und anschließender Hydrolyse des Bisaminals in 3 M NaOH bei 80°C konnte Verbindung **20** in hohen Ausbeuten isoliert werden.

Mittlerweile ist die Verbindung **20** auch kommerziell erhältlich.

Die Additionsreaktion von *trans*-*N,N'*-Dibenzylcyclam **20** mit einem  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäureester (Acrylsäuremethylester) lieferte Verbindung **32** in sehr guten Ausbeuten. Durch Umsetzung von vier Äquivalenten Acrylsäuremethylester mit **20** in EtOH bei 60°C und anschließendem Abkühlen auf RT war es möglich, Verbindung **32** durch Filtration von den Edukten zu trennen. Verbindung **32** ist bei RT nicht mehr in Ethanol löslich und fällt als weißer Feststoff aus. Die anschließende Hydrogenolyse ist notwendig, um die Benzylschutzgruppen unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre in Anwesenheit des Katalysators Palladium auf Aktivkohle entfernen zu können. Die hydrogenolytische Abspaltung erfolgte bei 1 bar  $\text{H}_2$ -Atmosphäre und RT über Nacht in 25%iger Essigsäure. Nach Filtration über Kieselgur konnte die Verbindung **33** in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl mit einem Essigsäureanteil von 10% isoliert werden. Durch mehrmaliges Lösen in Toluol/Dioxan (3:1, v:v) und anschließender Gefriertrocknung war es möglich, den Essigsäureanteil zu verringern und einen gelblichen hygroscopischen Feststoff zu erhalten. Die anschließende Esterverseifung wurde in 1 M NaOH bei 80°C durchgeführt. Die Reinigung erfolgte auch hier mit Hilfe der Anionenaustauschchromatografie mit 0,5 M HCl als Elutionsmittel. Die Cyclam-Dipropionsäure **14b** konnte mit einer Reinheit von über 99% als Tetrahydrochlorid in Form eines weißen Pulvers isoliert werden. Nachgewiesen wurde dies mittels NMR (siehe Abbildung 24), ESI-MS und Elementaranalyse (siehe Kapitel 5.4, S.116). Die Gesamtausbeute belief sich dabei auf 32%.

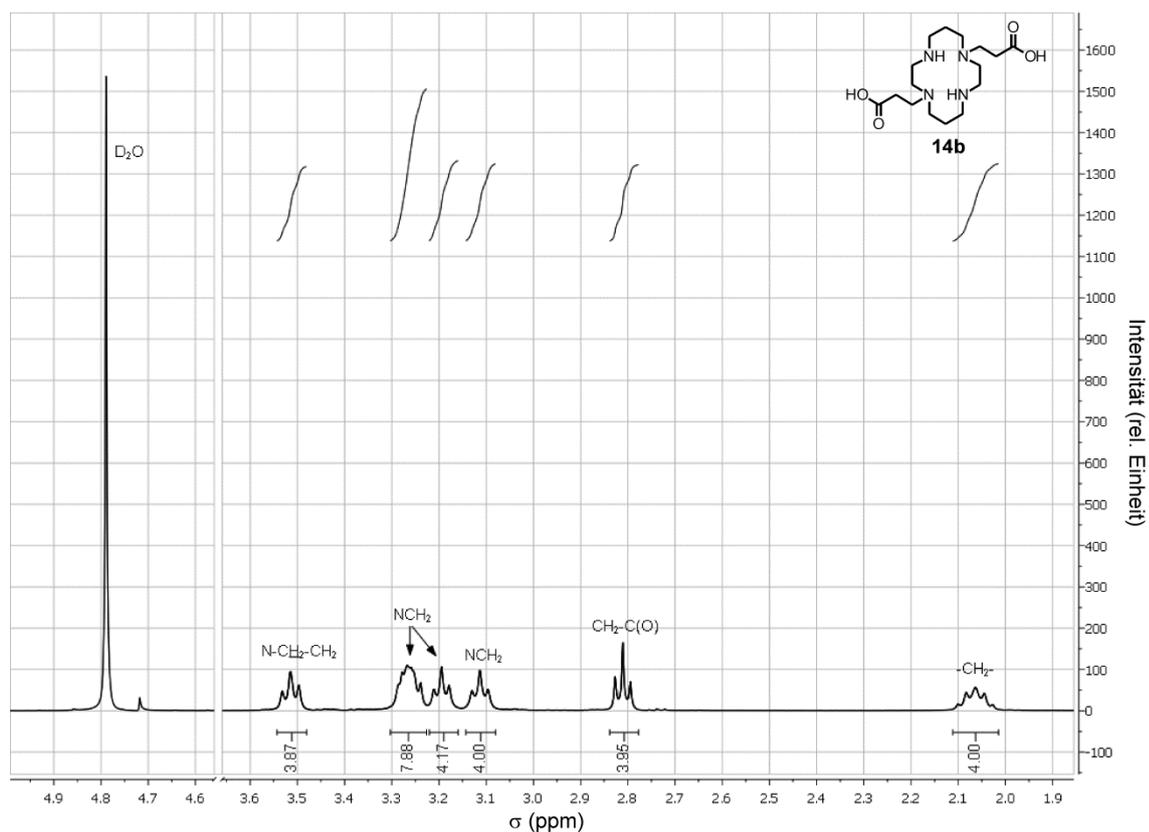
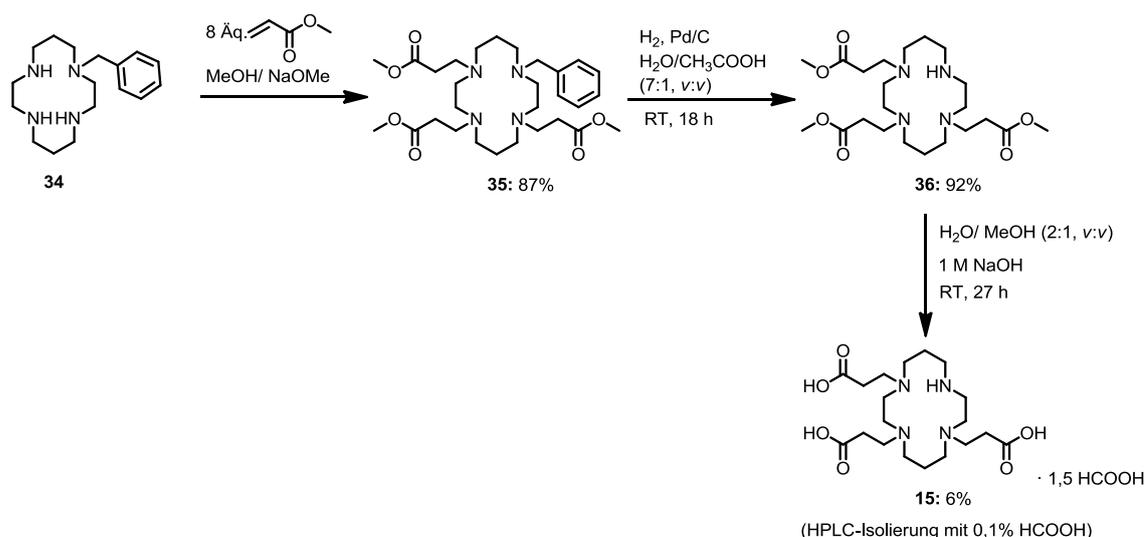


Abbildung 24: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von der Verbindung **14b** (aufgenommen in D<sub>2</sub>O bei RT)

Um die Verseifungsreaktion von **33** zu **14b** zu umgehen (Abbildung 23), ist anstatt des Esters die freie Acrylsäure eingesetzt worden. Hierbei konnte keine erfolgreiche Reinigung des Produktes erzielt werden. Die Methoden zur Trennung derart hydrophiler Substanzen sind stark eingeschränkt. Für die Dünnschichtchromatografie konnte eine Standardmethode zur Auftrennung etabliert werden. Als stationäre Phase wurde neutrales Aluminiumoxid und als mobile Phase CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1, v:v) verwendet. Diese ließ sich aber nicht auf eine säulenchromatografische Trennung übertragen. Die Produkte verblieben immer auf der Säule. Auch beim Einsatz von Umkehrphasen (C18-Phase) war es nicht möglich, eine gute Trennung zu erzielen. Hier musste immer mit einem hohen Ammoniakanteil (10%) eluiert werden, was die Trennleistung einschränkte.

Darstellung von Cyclam-Tripropionsäure **15**Abbildung 25: Syntheschema von TE3P **15**

Die Cyclam-Tripropionsäure **15** wurde in Anlehnung an ein Patent von Cocolios *et al.* [105] hergestellt (Abbildung 25). Allerdings gab es aufgrund der hohen Reinheitsanforderung von >99% erhebliche Trennprobleme. Ausgehend vom *N*-Benzylcyclam **34** ist Verbindung **35** durch eine nucleophile Addition mit Hilfe von acht Äquivalenten Acrylsäuremethylester in wasserfreiem Methanol in Anwesenheit von 2,7 M Natriummethanolat synthetisiert worden. Unter Lichtausschluss wurde die Lösung bei RT eine Woche gerührt. Ein vollständiger Umsatz zu dem Zwischenprodukt **35** war unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Die massenspektrometrische Untersuchung zeigte neben dem Massenpeak der protonierten Substanz **35** ( $m/z = 549,7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) auch den Cyclam-Dipropionsäuremethylester-Peak (BTE2E) ( $m/z = 463,6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ). Letzterer kann dabei nicht durch Fragmentierung erzeugt werden, da eine solche Fragmentierung für die reinen Cyclam-Propionsäure-Derivate in ESI-MS-Messungen nicht nachgewiesen werden konnte. Schlussfolgernd muss das di-substituierte Derivat als Nebenprodukt zur Verbindung **35** enthalten gewesen sein. Mittels NMR-Untersuchungen konnte das Nebenprodukt Cyclam-Dipropionsäuremethylester nicht nachgewiesen werden, was auf eine Reinheit von >95% für die Zwischenverbindung **35** hindeutet.

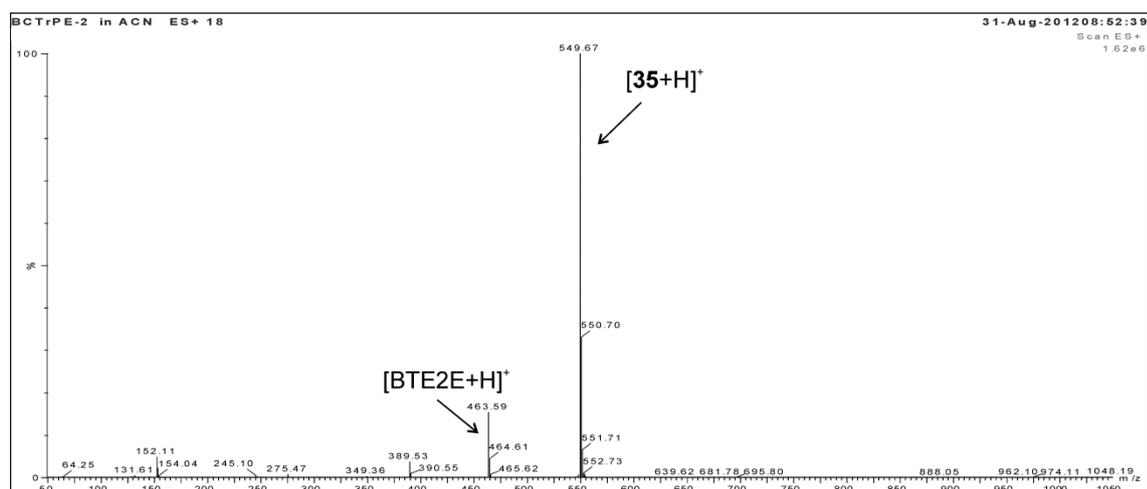


Abbildung 26: ESI-MS Spektrum (positiver Modus) von der Zwischenverbindung **35** und dem Nebenprodukt Cycloam-Dipropionsäuremethylester (LM: CH<sub>3</sub>CN)

In der zweiten Stufe erfolgte die Abspaltung der Benzylschutzgruppe unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre in Anwesenheit des Katalysators Palladium auf Aktivkohle. Die Verbindung **35** wurde in verdünnter Essigsäure (7:1, v:v) gelöst und mit frisch aktivierten 10%igen Pd/C versetzt. Die Lösung wurde bei einem H<sub>2</sub>-Druck von ca. 1,2 bar über Nacht gerührt. Die Reinigung erfolgte dann über Celite<sup>®</sup> und das Produkt wurde anschließend zweimal aus einem Wasser/MeOH Gemisch (1:1, v:v) lyophilisiert. Die Bestimmung des Essigsäureanteils erfolgte mittels NMR. Die Verbindung **36** liegt im Verhältnis 1:1 mit Essigsäure vor.

Ausgehend von dieser Berechnung wurde für die Verseifung der Methoxygruppen ein fünffacher Überschuss an 1 M NaOH zu gegeben und 27 h bei RT gerührt. Zuvor wurde die Verbindung **36** in einem Gemisch aus H<sub>2</sub>O/MeOH (7:3, v:v) gelöst. Die Überprüfung der vollständigen Hydrolyse der Methoxygruppen erfolgte mittels NMR. Da radiochemische Untersuchungen mit der Cycloam-Tripropionsäure **15** durchgeführt werden sollten, wurde eine höchstmögliche Reinheit angestrebt.

Die Trennung der Cycloam-Tripropionsäure **15** von der zweifachfunktionalisierten Verbindung erforderte den Einsatz einer differenzierten RP-HPLC-Methode, da sich die Verbindungen in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften sehr ähneln. Unter Einsatz einer RP-8 Säule (Zorbax SB-C8, 21,2 mm×150 mm, 5 μ, 110 Å) wurde eine Trennung unter semipräparativen Bedingungen mit dem Eluenten H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% HCOOH (Methode 1) erzielt. Die Retentionszeit der Verbindung **15** betrug 10 min. Aufgrund der sehr ähnlichen Retentionszeiten beider Verbindungen kam es zu Ausbeuteverlusten. Die Cycloam-Tripropionsäure **15** konnte mit der erforderlichen Reinheit von >99% separiert werden und lag nach der Gefriertrocknung

als farbloses Pulver vor. Charakterisiert wurde diese Verbindung **15** mittels NMR, ESI-MS (siehe Abbildung 27) und Elementaranalyse (siehe Kapitel 5.4, S.118).

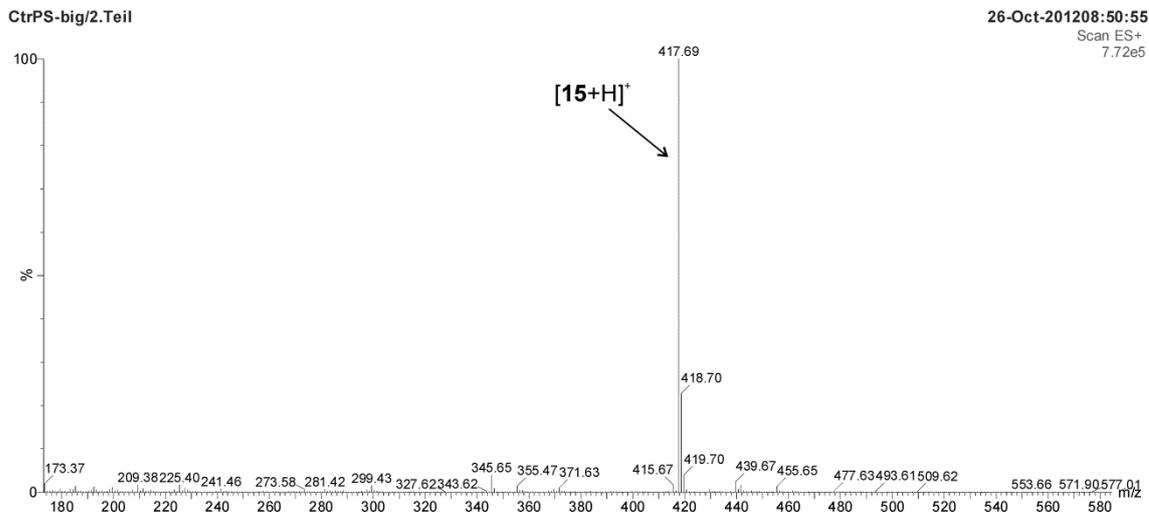


Abbildung 27: ESI-MS Spektrum (positiver Modus) von Cyclam-Tripropionsäure **15** nach der HPLC-Trennung (LM: H<sub>2</sub>O)

Bei Wiederholungen der Arbeiten sollte zukünftig eine HPLC-Trennung bereits nach der ersten Synthesestufe angestrebt werden, um die hydrophoben Wechselwirkungen der Benzyl- und Methoxygruppen auszunutzen.

Um mehrfachsubstituierte Cyclam-Derivate zu generieren, sind Additionsreaktionen den nucleophilen Substitutionen vorzuziehen. Trotz Änderung der Reaktionsbedingungen hinsichtlich des Lösungsmittels, der Temperatur, der eingesetzten Base und insbesondere der Stöchiometrie der Edukte, ist als Hauptprodukt bei Substitutionsreaktionen immer die monoalkylierte Verbindung gefunden worden. Bei einem hohen Überschuss an Alkylierungsreagenz entstehen Gemische aus mono-, di- und trifunktionalisierten Produkten, die schwer zu trennen sind. Die Bildung der tetraalkylierten Verbindung ist unter diesen Bedingungen nicht beobachtet worden.

### Darstellung von Cyclam-Tetrapropionsäure **16**

Die Cyclam-Tetrapropionsäure wurde nach einer Literaturvorschrift [25] hergestellt. Der Syntheseweg ist in Abbildung 28 dargestellt.

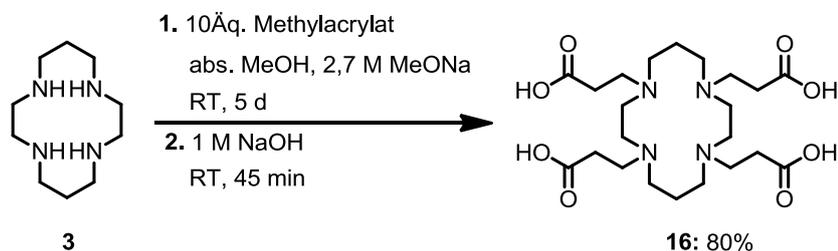


Abbildung 28: Syntheschema zur Darstellung der Cyclam-Tetrapropionsäure TETP **16**

Der Cyclampropionsäure-Tetramethylester ist über einer Michael-Additionsreaktion analogen Synthese von zehn Äquivalenten Acrylsäuremethylester an Cyclam **3** in abs. Methanol synthetisiert worden. Als Base wurden katalytische Mengen einer Natriummethanolatlösung zugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für fünf Tage gerührt. Durch Verseifung mit 1 M NaOH bei Raumtemperatur für 45 min und anschließender Kationenaustauschchromatographie (DOWEX 50W×8) wurde die freie Säure ausgehend vom Cyclam in hoher Ausbeute (80%) und Reinheit isoliert. Die Cyclam-Tetrapropionsäure **16** lag nach der Gefriertrocknung als farbloses Pulver vor und ist mit einer Reinheit > 99% charakterisiert worden. Mittels NMR (siehe Abbildung 29), ESI-MS und Elementaranalyse (siehe Kapitel 5.4, S.118) ist Verbindung **16** analysiert und eindeutig charakterisiert worden.

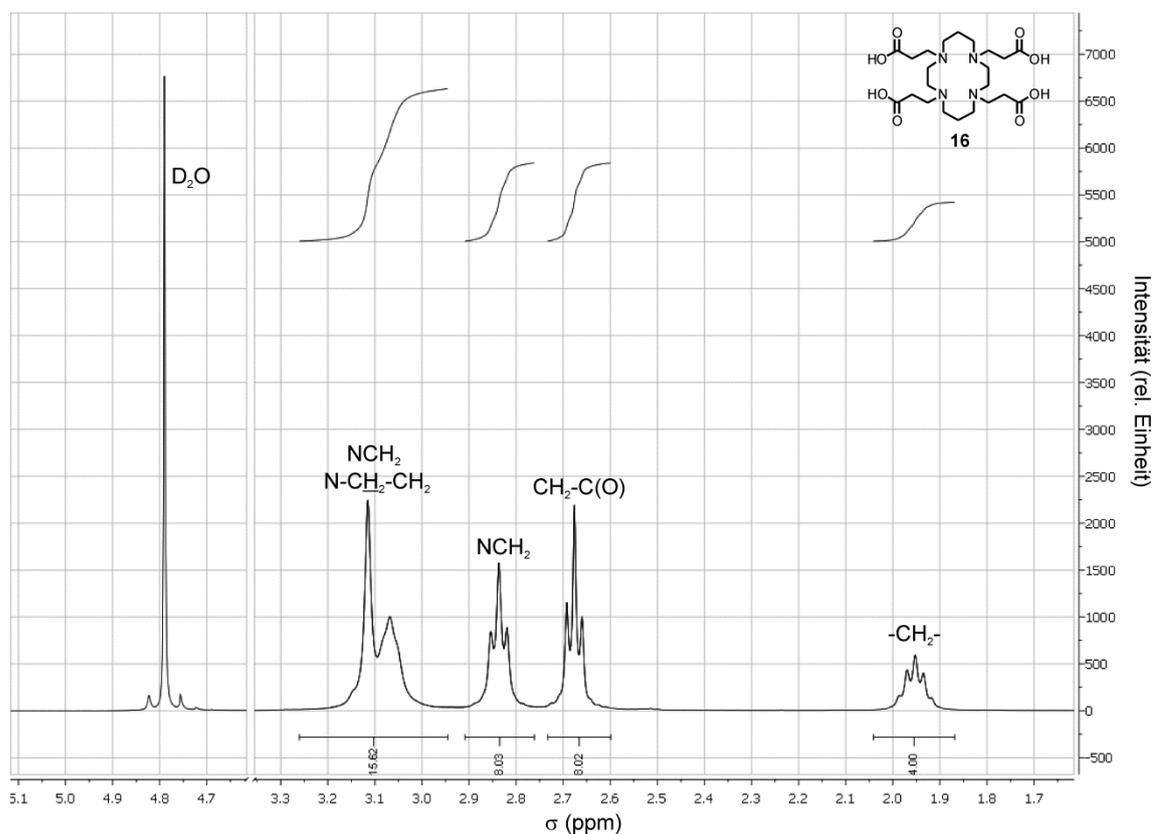


Abbildung 29: <sup>1</sup>H-NMR von Cyclam-Tetrapropionsäure **16** (aufgenommen in D<sub>2</sub>O bei RT)

### 3.1.2 Kupfer(II)-Komplexe der Cyclam-Propionsäure-Liganden

Die Synthesen der Kupfer(II)-Komplexe werden hier kurz skizziert, im experimentellen Teil aber ausführlich beschrieben. Um die koordinierenden Carboxylgruppen für das Cu<sup>II</sup>-Ion verfügbar zu machen, wurden die Verbindungen **13** und **14b** (isoliert als Tetrahydrochlorid) u. a. mit der entsprechenden Menge an NaOH deprotoniert. Dann erfolgte die Zugabe äquimolarer Mengen an Kupfer(II)-salz, wobei verschiedene Kupfer(II)-salze (Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>) getestet worden sind. Nach 1 h Rühren bei 50°C, wurde das Lösungsmittel entfernt und in wenig abs. Methanol überführt. Der Überstand ist mit Hilfe von einem Spritzenvorsatzfilter der Porengröße 0,45 μm abfiltriert und mittels Diffusion über einer Etherbrücke langsam über mehrere Tage zur Kristallisation gebracht worden. Als Gegenlösungsmittel wurden Diethylether, *n*-Hexan und Tetrahydrofuran gewählt, da diese entweder einen höheren oder einen niedrigeren Dampfdruck als Methanol aufwiesen. Eine Kristallisation wurde nur bei der Lösungsmittelkombination Methanol/Diethylether erzielt. Trotz vielfältiger Variationen der Parameter, wie Lösungsmittel, Gegenion, pH-Wert, Temperatur und verschiedenste Kristallisationstechniken [106] wurden in vielen Fällen die gewünschten Komplexe nur als amorphes Pulver erhalten. Auffällig war, dass die Ablagerungen am

Kolbenrand nach der Diffusion meist einen öligen Zustand hatten. Daher sind diese in ention. Wasser überführt und lyophilisiert worden. Für die Cyclam-Monopropionsäure **13** konnten damit nur spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung angewendet werden. Demgegenüber gelang es aus den synthetisierten Verbindungen **14b** und **16** kristalline Kupfer(II)-Komplexe zu isolieren und die Struktur mittels Röntgeneinkristallstrukturanalyse (RKSA) aufzuklären. Der Kupfer(II)-Komplex der Cyclam-Tripopionsäure **15** ist zwar massenspektrometrisch nachgewiesen worden, jedoch war die quantitative Bestimmung der Summenformel mittels Elementaranalyse nicht möglich. Aufgrund der nicht-abtrennbaren Verunreinigung im Cu<sup>II</sup>-**15** konnten keine weitergehenden spektroskopischen Untersuchungen zur Strukturaufklärung erfolgen. Trotzdem können Aussagen zur Struktur von Cu<sup>II</sup>-**15** abgeleitet werden, da die geometrischen und spektroskopischen Eigenschaften dieses Komplexes sich vermutlich in die Reihenfolge der untersuchten Kupfer(II)-Komplexe Cu<sup>II</sup>-**13**, Cu<sup>II</sup>-**14b** und Cu<sup>II</sup>-**16** eingliedert. Abbildung 30 zeigt mögliche Strukturen der Kupfer(II)-Komplexe mit Cyclam-Propionsäure-Liganden in einer *trans*-I-Konfiguration und pentadentater Koordinationsgeometrie. Die mögliche Struktur dieser Kupfer(II)-Komplexe wird durch verschiedene Methoden (RKSA, IR-Spektroskopie) belegt.

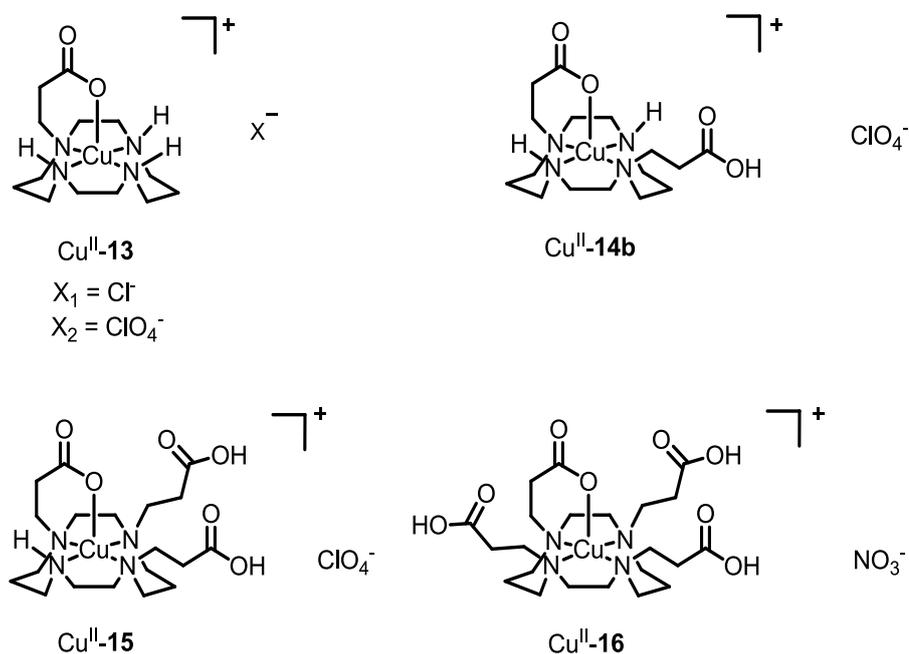


Abbildung 30: Strukturen der *trans*-I Kupfer(II)-Komplexe

### 3.1.3 Röntgenkristallografische Untersuchungen der Verbindungen $\text{Cu}^{\text{II}}[\text{H}_2\mathbf{14b}]^{2+}$ und $\text{Cu}^{\text{II}}[\text{H}_3\mathbf{16}]^+$

Verbindung  $\text{Cu}^{\text{II}}\mathbf{14b}$  wurde in MeOH gelöst und konnte mittels Etherdiffusion zur Kristallisation gebracht werden. Es bildeten sich dunkelblaue, nadelförmige Kristalle.

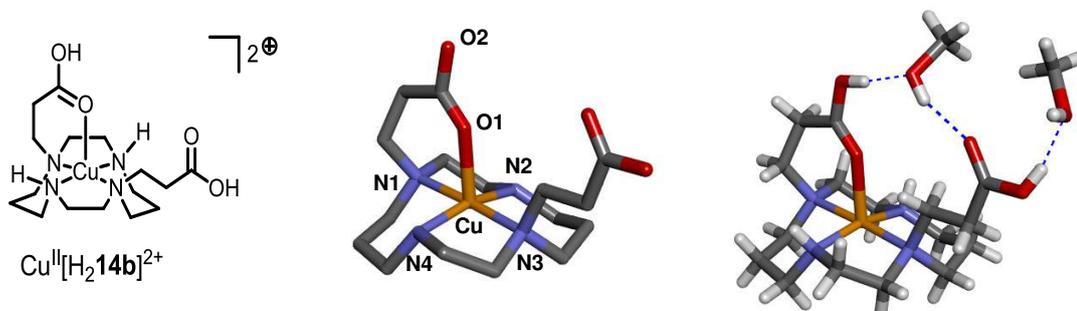


Abbildung 31: Struktur und Röntgeneinkristallstruktur (mitte: ohne Wasserstoffatome, rechts: mit Wasserstoffatomen und LM) von  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$

Dieser zweifach positive geladene Komplex<sup>2</sup>  $[\text{Cu}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$  weist zwei protonierte Propionsäuregruppen auf, wobei der Carbonylsauerstoff einer Propionsäuregruppe zum  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Ion koordiniert (Abbildung 31). Die Zuordnung wird durch die kurze Bindungslänge von 1,215 Å für C=O unterstützt. Demgegenüber weist das Hydroxylsauerstoffatom der koordinierenden Carboxylgruppe, die zu erwartende längere Bindung von 1,325 Å auf. Das Proton der Carbonsäure bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Lösungsmittel Methanol. Dadurch wird der Komplex stabilisiert. Die Koordination eines Carbonylsauerstoffatoms zum Kupfer(II)-Ion ist für Cyclam-Carboxyl-Derivate nicht ungewöhnlich [50, 53, 107, 108]. Zudem ist diese Verbindung aufgrund der Pentakoordination nicht symmetrisch. Daher existieren vielmehr zwei Enantiomere (*R/S*-Enantiomere). Anhand der Röntgeneinkristallstrukturanalyse ist keine Bestimmung der Chiralität von der isolierten Verbindung möglich. Daher kann die absolute Konfiguration dieses Komplexes nicht bestimmt werden. Es handelt sich aber um eine *trans-I* Konfiguration, in der die beiden Propionsäure-Gruppen in axialer Richtung angeordnet sind. Die über das Zentralatom aufgespannten Sechsringe besitzen die Sesselkonformation und die zwei Fünfringe liegen in der Briefumschlag-Konformation vor. Die Geometrie dieses Komplexes ist nahezu quadratisch-pyramidal, was durch den geometrischen Parameter  $\tau = 0,22$  ( $\alpha = 163,8^\circ$ ,  $\beta = 177,2^\circ$ ) untermauert wird.

<sup>2</sup> Die Messung sowie die Auswertung der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von  $[\text{Cu}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$  ist von Dipl.-Ing. Werner Kraus von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung durchgeführt worden.

Der Parameter  $\tau$  wurde von Addison *et al.* [109] definiert, um Aussagen zum Verhältnis von trigonal-bipyramidalen zu quadratisch-pyramidalen Koordinationsgeometrien treffen zu können. Der Parameter wird über folgende Gleichung beschrieben:

$$\tau = (\beta - \alpha) / 60^\circ \quad (5)$$

Handelt es sich um eine perfekte quadratische Pyramide ist  $\alpha$  (N2-Cu-N4) und  $\beta$  (N1-Cu-N3) =  $180^\circ$  und damit  $\tau = 0$ , wohingegen bei einer perfekt trigonal-bipyramidalen Geometrien der Winkel  $\alpha$  (N2-Cu-N4) nur noch  $120^\circ$  beträgt und  $\tau$  den Wert 1 annimmt. Die Pseudorotation von quadratisch pyramidal zu trigonal bipyramidal ist in Abbildung 32 dargestellt. Als Hauptachse ist N1-Cu-N3 definiert, dessen Winkel  $\beta$   $180^\circ$  beträgt.

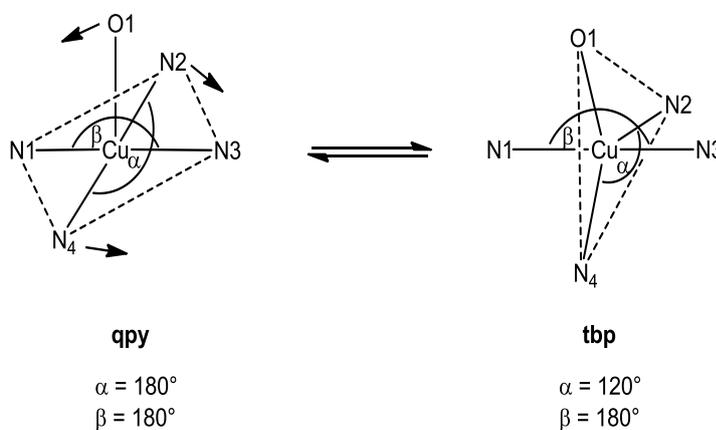


Abbildung 32: Darstellung der Pseudorotation von quadratisch-pyramidal (qpy) zu trigonal-bipyramidal (tbp) [110]

Comba *et al.* [49] verglichen 30 Strukturen von *trans*-I Kupfer(II)-Cyclam-Komplexen welche im Mittel Cu-N-Bindungen von  $2,05 \text{ \AA}$  aufweisen. Für  $[\text{Cu}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$  sind die selben  $\overline{\text{Cu-N}}$ -Bindungen mit  $2,05 \text{ \AA}$  ermittelt worden. Die Cu-O1-Bindung ist mit  $2,273 \text{ \AA}$  typisch für *trans*-I Cu<sup>II</sup>-Cyclam-Carboxyl-Komplexe, da die Jahn-Teller-Verzerrung entlang der z-Achse verläuft [49]. In Tabelle 8 sind ausgewählte Strukturparameter des Komplexes  $[\text{Cu}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$  dargestellt.

Tabelle 8: Ausgewählte Strukturparameter von  $[\text{Cu}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$ 

Bindung	Å	Winkel	°
Cu-N1	2,099(4)	N1-Cu-N3	177,2(2)
Cu-N2	2,020(4)	N2-Cu-N4	163,8(3)
Cu-N3	2,073(4)	N1-Cu-O1	85,7(1)
Cu-N4	1,996(4)	N4-Cu-O1	93,7(2)
Cu-O1	2,273(3)	N2-Cu-O1	102,2(2)

Neben dem difunktionalisierten  $[\text{Cu}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$  Komplex konnte auch der tetrafunktionalisierte Kupfer(II)-Komplex  $[\text{Cu}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$  röntgenkristallografisch analysiert werden. Die in einem EtOH/H<sub>2</sub>O Gemisch (35:1, v:v) gelöste Verbindung  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-16}$  konnte mittels Etherdiffusion zur Kristallisation gebracht werden. Es bildeten sich türkisfarbene, nadelförmige Kristalle.



Abbildung 33: Struktur und Röntgeneinkristallstruktur von  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$  (Wasserstoffatome, Lösungsmittel und das Gegenion sind nicht dargestellt) [49]

Dieser pentakoordinierende  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$  Komplex<sup>3</sup> weist drei protonierte Propionsäuregruppen und eine deprotonierte koordinierende auf und ist demnach einfach positiv geladen (Abbildung 33). Es handelt sich hierbei auch um eine *trans*-I-Konfiguration, in der die über das Zentralatom aufgespannten Sechsringe in der zu erwartenden Sesselkonformation und die zwei Fünfringe in der Briefumschlag-Konformation vorliegen. Auch in diesem Fall kann die absolute Konfiguration nicht bestimmt werden. Die vier Cu-N-Bindungen sind mit  $\overline{\text{Cu-N}}$ : 2,08 Å typisch für  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Cyclam Verbindungen [49]. Das Ligandenfeld innerhalb der Stickstoffebene ist

<sup>3</sup> Die Messung sowie die Auswertung der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$  ist von Dr. Franziska Emmerling von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung durchgeführt worden.

relativ schwach. Im Gegensatz dazu ist die Cu-O1-Bindung mit 2,105 Å für  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$  sehr kurz, wodurch sich ein starkes Ligandenfeld ausbildet. Die Struktur dieses Komplexes liegt zwischen einer quadratisch-pyramidalen und einer trigonal-bipyramidalen Geometrie, da der geometrische Parameter  $\tau = 0,45$  ( $\alpha = 151,3^\circ$ ,  $\beta = 178,4^\circ$ ) ist. In Tabelle 9 sind ausgewählte Strukturparameter von Verbindung  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$  dargestellt. Die kurze Cu-O-Bindung lässt auf eine erhöhte Spannung im Komplex schließen. Eine solche Molekülspannung könnte sich nachteilig auf die kinetische Stabilität auswirken (siehe Kapitel 3.2.6, S. 62 und Kapitel 3.3.3, S. 75). Nichtsdestotrotz müssen diese Ergebnisse mit den Beobachtungen in Lösung verglichen werden, um dazu konkrete Aussagen treffen zu können.

Tabelle 9: Ausgewählte Strukturparameter von  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$

Bindung	Å	Winkel	°
Cu-N1	2,067(5)	N1-Cu-N3	178,4(2)
Cu-N2	2,090(5)	N2-Cu-N4	151,3(2)
Cu-N3	2,111(5)	N1-Cu-O1	90,6(2)
Cu-N4	2,059(4)	N4-Cu-O1	103,5(2)
Cu-O1	2,105(4)	N2-Cu-O1	105,2(2)

## 3.2 Spektroskopische Untersuchungen der Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure Komplexe

### 3.2.1 ESR-Spektroskopie

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR) können Proben, die über ein permanentes magnetisches Moment (ungepaartes Elektron) verfügen, in einem von außen angelegten Magnetfeld mit hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung angeregt werden. Anders als bei diamagnetischen Materialien besitzen die Bahndrehimpulse sowie die Summe der Spins der Elektronen bei paramagnetischen Materialien einen von Null verschiedenen Gesamtdrehimpuls. Die entarteten Energiezustände (Zeeman-Effekt) spalten sich in einem von außen angelegten Magnetfeld auf und es kommt bei Einstrahlung resonanter Mikrowellenstrahlung zur Absorption (Übergänge gleicher Hauptquantenzahl). Der größtmögliche Effekt wird

erzielt, wenn die eingestrahlte Frequenz dem Energieabstand der Niveaus entspricht. Es wird dann von Resonanz gesprochen. Anhand des Absorptionsspektrums können Rückschlüsse auf die elektronische und geometrische Struktur, Lebensdauer und Bindungsverhältnisse gezogen werden.

Da Kupfer(II) aufgrund seiner Elektronenkonfiguration über ein ungepaartes Elektron verfügt, eignet es sich für die ESR-Spektroskopie, um hier Aussagen über die geometrische Struktur von den zu untersuchenden  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Verbindungen zu erhalten. Oft zeigen diese Verbindungen eine charakteristische Hyperfeinaufspaltung. Diese Art Fingerabdruck hängt neben dem gyromagnetischen-Faktor ( $g$ -Faktor, auch Landé-Faktor) auch von der Kopplungskonstante  $A$  ab. Da die Spins der Elektronen mit den Kernspins der beiden Kupferisotope (Kupfer-63 und Kupfer-65) koppeln, ist die Kopplungskonstante zugleich ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung. Der  $g$ -Faktor ist dimensionslos, wohingegen die Kopplungskonstante  $A$  in Gauß angegeben wird. Je nach Koordinationsgeometrie resultieren unterschiedliche Signale. Hochsymmetrische Verbindungen zeigen keine Hyperfeinaufspaltung und werden als isotrop bezeichnet. Kommt es zum Symmetrieverlust, ändert sich das Absorptionsspektrum und man erhält ein axiales Spektrum mit einer Hyperfeinaufspaltung. Diese Spektren deuten meist auf eine quadratisch planare Koordinationsgeometrie hin, wobei auch gemäß der Jahn-Teller-Verzerrung elongierte Oktaeder und quadratische Pyramiden mit eingeschlossen sind. Als  $g$ -Faktoren werden dann  $g_{\perp}$  und  $g_{\parallel}$  angegeben, wobei  $g_{\parallel} > g_{\perp}$  ist. Bei stark verzerrten Koordinationspolyedern können entsprechend drei  $g$ -Faktoren ermittelt ( $g_x$ ,  $g_y$ ,  $g_z$ ) werden, wobei  $g_z \cong g_{\parallel}$  entspricht und  $g_{x,y} \cong g_{\perp}$  [111, 112].

Die ESR-Spektren der Kupfer(II)-Komplexe sind in DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1, v:v) bzw. in MeOH bei 110 K aufgenommen worden (Abbildung 34).

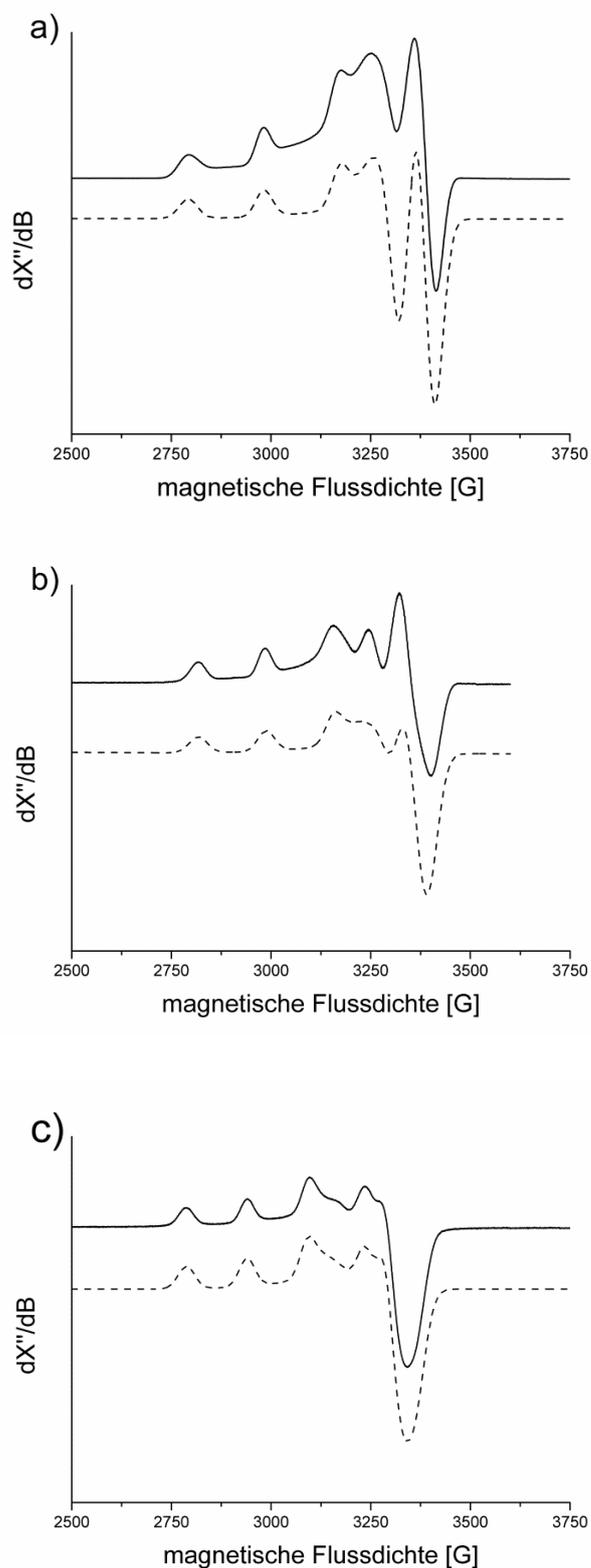


Abbildung 34: X-Band ESR-Spektren (durchgezogene Linie) und simulierte ESR-Spektren (gestrichelte Linie) von a)  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**13**,  $f = 9,424836$  GHz b)  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**14b** in DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1, v:v) bei 110 K,  $f = 9,454019$  GHz und c)  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**16** in MeOH bei 110 K

Alle Spektren zeigen eine stark verzerrte Koordinationsgeometrie, da drei  $g$ -Faktoren und drei Kopplungskonstanten ermittelt wurden (Tabelle 10). Die  $g$ -Faktoren bzw.  $A$ -Konstanten aller Spektren weisen zudem auf einen quadratisch-pyramidalen Koordinationspolyeder mit einem  $d_{x^2-y^2}$  Grundzustand hin, da  $g_{x,y} < g_z$ . Wäre die Geometrie dieser Komplexe rein trigonal-bipyramidal, wäre das  $d_{z^2}$ -Orbital energetisch angehoben und  $g_z$  wäre kleiner als  $g_{x,y}$  sowie  $A_{x,y} \sim A_z$  [113].

Tabelle 10: ESR-Parameter von Cu<sup>II</sup>-**13**, Cu<sup>II</sup>-**14b** (in DMF/H<sub>2</sub>O (2:1, v:v), 110 K) und Cu<sup>II</sup>-**16** (MeOH, 110 K)

Komplex	$g_x$	$g_y$	$g_z$	$A_x$ [G]	$A_y$ [G]	$A_z$ [G]
Cu <sup>II</sup> - <b>13</b>	2,037	2,040	2,187	3,3	22,4	190,9
Cu <sup>II</sup> - <b>14b</b>	2,030	2,060	2,196	12,4	26,3	171
Cu <sup>II</sup> - <b>16</b> <sup>4</sup>	2,040	2,091	2,236	25,0	42,0	156,0

Die  $A_z$ -Werte nehmen von Cu<sup>II</sup>-**13** zum Cu<sup>II</sup>-**16** ab, wohingegen die  $g_z$ -Werte in dieser Reihenfolge zu nehmen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Ligandenfeld innerhalb der Stickstoffebene im Komplex Cu<sup>II</sup>-**13** am stärksten ist und die Jahn-Teller-Verzerrung entlang der Cu-O1-Bindung verläuft. Demgegenüber bildet Cu<sup>II</sup>-**16** ein schwaches Ligandenfeld in der Stickstoffebene aus. Diese Werte korrelieren auch mit den Röntgeneinkristallstrukturanalysen für die Kupfer(II)-Komplexe Cu<sup>II</sup>[H<sub>2</sub>**14b**] und Cu<sup>II</sup>[H<sub>3</sub>**16**]. Die berechneten  $\tau$ -Werte von 0,22 und 0,45 verdeutlichen den Übergang von der quadratisch-pyramidalen zur verzerrt trigonal-bipyramidalen Geometrie.

### 3.2.2 IR-Spektroskopie

Um Aussagen über das Protonierungs- bzw. Deprotonierungsverhalten der Carboxylatgruppen in festem und gelöstem Zustand zu erhalten, sind schwingungsspektroskopische Untersuchungen der Kupfer(II)-Komplexe bei Raumtemperatur durchgeführt worden (Synthese der Kupfer(II)-Komplexe bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben). Bei Messungen gesättigter D<sub>2</sub>O-Lösungen der Kupfer(II)-Komplexe überlagern die OD-Schwingungen ( $\nu = 2477 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta = 1204 \text{ cm}^{-1}$ ) nicht die C=O Schwingungen. Die asymmetrische Valenzschwingung der Carbonylbande tritt für die undissoziierte Carbonsäure um  $1700 \text{ cm}^{-1}$  auf, wohingegen zwischen

<sup>4</sup> Das experimentelle und das simulierte ESR-Spektrum von Cu<sup>II</sup>-**16** wurde von Dr. Michael Morgen (AK Prof. Dr. Comba) von der Universität Heidelberg durchgeführt.

1550 - 1600  $\text{cm}^{-1}$  die Carbonylschwingung des Carboxylations beobachtet wird. Die untersuchten Kupfer(II)-Komplexe besitzen mit Ausnahme der Cyclam-Monopropionsäure ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**13**) sowohl im festen als auch im gelösten Zustand ( $\text{D}_2\text{O}$ ) Carboxylat- und Carbonsäureschwingungen (Tabelle 11). Für den Kupfer(II)-Komplex der Cyclam-Monopropionsäure findet man erwartungsgemäß nur die Carbonylschwingung des Carboxylations. Das Vorhandensein dieser Schwingung beweist, dass die koordinierende Propionsäuregruppe sowohl im festen als auch im gelösten Zustand deprotoniert vorliegt.

Tabelle 11: Übersicht zu den C=O-Valenzschwingungen der  $\text{Cu}^{\text{II}}$  Komplexe in festem und gelösten (gesättigt in  $\text{D}_2\text{O}$ ) Zustand bei RT

Schwingung [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Komplex (Feststoff)			Komplex in $\text{D}_2\text{O}$		
	$\text{Cu}^{\text{II}}$ - <b>13</b>	$\text{Cu}^{\text{II}}$ - <b>14b</b>	$\text{Cu}^{\text{II}}$ - <b>16</b>	$\text{Cu}^{\text{II}}$ - <b>13</b>	$\text{Cu}^{\text{II}}$ - <b>14b</b>	$\text{Cu}^{\text{II}}$ - <b>16</b>
$\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O}; \text{COOH})$	-	1716	1689	-	1694	1692
$\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O}; \text{COO}^-)$	1570	1574	1557	1572	1574	1572

Aus der Röntgeneinkristallstrukturanalyse von  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Cyclam-Dipropionsäure  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-}[\text{H}_2\text{14b}]^{2+}$  wurde dagegen eine protonierte koordinierende Carboxylgruppe abgeleitet. Der Unterschied ist mit der alternative Darstellung des  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexes im Zuge der Deprotonierung mit NaOH zu erklären. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine deprotonierte koordinierende und eine protonierte nicht-koordinierende Carboxylgruppe vorhanden ist. Weitere spektroskopische Untersuchungen sind mit dem deprotonierten Komplex  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**14b** durchgeführt worden.

Für  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**16** werden erwartungsgemäß sowohl im festen Zustand als auch in deuteriertem Wasser beide asymmetrischen Carbonylschwingungen beobachtet.

### 3.2.3 VIS-Spektroskopie

Die Charakterisierung der Kupfer(II)-Komplexe erfolgte mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie. Von besonderem Interesse sind die d-d-Übergänge, da diese für die Farbigkeit eines Komplexes verantwortlich sind. Des Weiteren wurde das Absorptionsverhalten der Komplexe  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**13**,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**14b** und  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**16** nicht nur in wässrigen Lösungen untersucht, sondern auch im festen Zustand. Um die Geometrie im festen und gelösten Zustand beurteilen zu können, wurden die entsprechenden Komplexe  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**13**,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**14b** und  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**16** nicht nur in 2 mM wässrigen Lösungen

untersucht, sondern auch mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Pulver gemischt, fein gemörsert und mit Hilfe eines Feststoff-UV/VIS-Spektrometers bei RT gemessen. Die in Tabelle 12 und Abbildung 35 dargestellten Extinktionsmaxima deuten darauf hin, dass vergleichbare Geometrien in wässrigem und festem Zustand vorherrschen.

Zur Bestimmung des Extinktionsmaximums ist eine 6 mM wässrige Stammlösungen der entsprechenden Kupfer(II)-Komplexe und jeweilig eine Konzentrationsreihe (Doppelbestimmung) hergestellt worden. Die Konzentrationsreihe mit fünf Werten (1, 2, 3, 4, 6 mM) lieferte die entsprechende Ausgleichsgerade, aus der der Extinktionskoeffizient ermittelt wurde (Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht der d-d-Übergänge in Lösung ( $c = 2 \text{ mM}$ ) und als Feststoff (gemischt mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Pulver) bei RT

Komplex	d-d-Übergang ( $\text{H}_2\text{O}$ )			d-d-Übergang (Feststoff, $\text{Al}_2\text{O}_3$ )	
	$\lambda_{max}$ [nm]	$\epsilon$ [ $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]	$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{max}$ [nm]	$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>Cu<sup>II</sup>-13</b>	548	126	18248	559	17889
<b>Cu<sup>II</sup>-14b</b>	588	153	17007	585	17094
<b>Cu<sup>II</sup>-16</b>	722	210	13850	724	13812

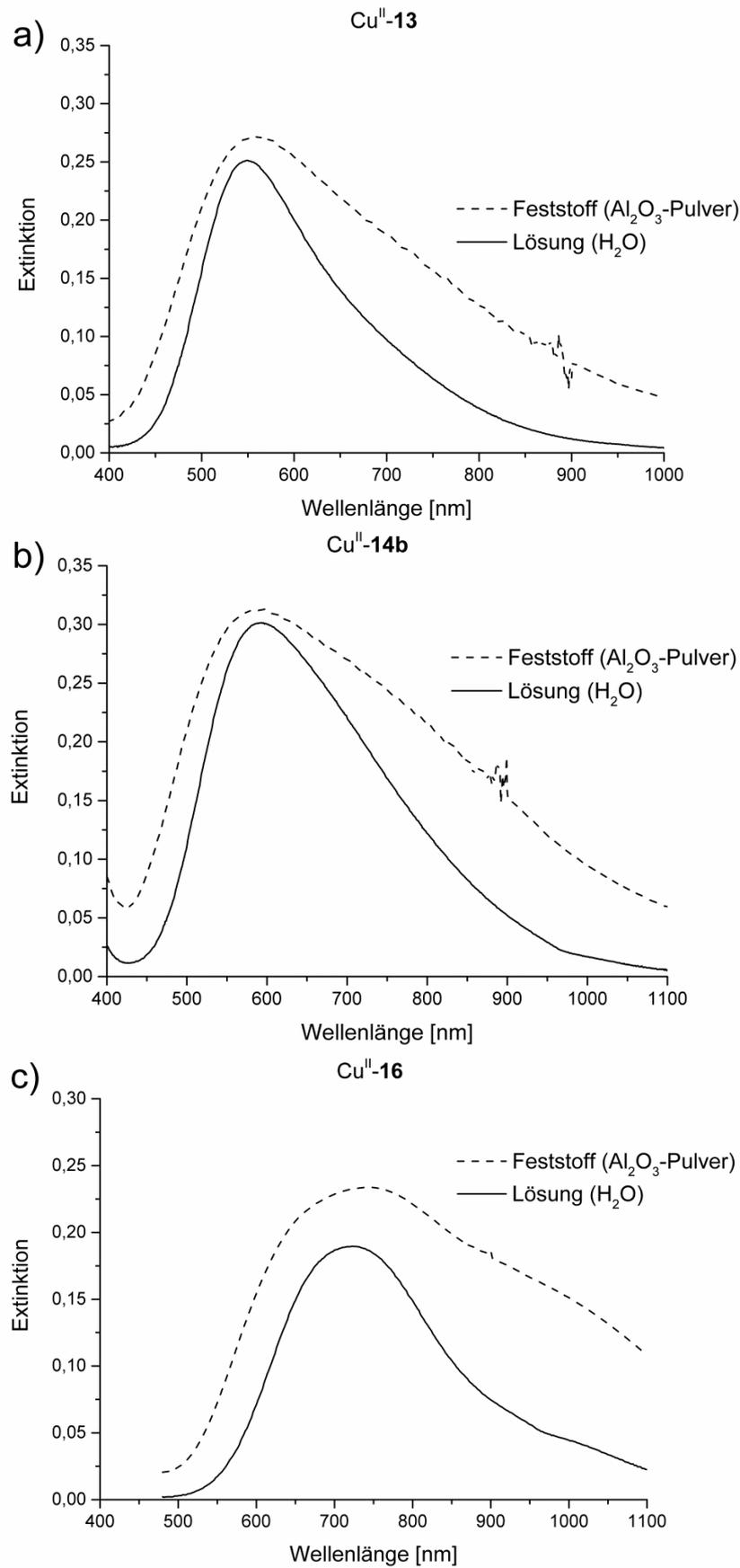


Abbildung 35: VIS-Spektren von a) Cu<sup>II</sup>-13, b) Cu<sup>II</sup>-14b und c) Cu<sup>II</sup>-16 in 2 mM wässriger Lösung (durchgezogene Linie) und als Feststoff in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Pulver (gestrichelte Linie) bei RT

Da das Cu<sup>II</sup>-Ion eine d<sup>9</sup>-Elektronenkonfiguration aufweist, sind alle Orbitale bis auf  $d_{x^2-y^2}$  vollbesetzt. Daher kann eine Anregung nur in dieses Orbital erfolgen (Abbildung 36). Aufgrund des Spinverbots kann zudem nur ein Elektron mit einem  $\beta$ -Spin ( $\downarrow$ ) angeregt werden. Die Anregung eines Elektrons von  $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2}$  benötigt eine so geringe Energie, dass die Absorption nicht im sichtbaren Bereich zu detektieren ist. Vielmehr können nur zwei Absorptionsbanden auftreten. Die Anregung eines Elektrons von  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$  verursacht eine Bande im niederenergetischen Wellenlängenbereich und die Anregung eines Elektrons von  $d_{xy}, d_{yz} \rightarrow d_{x^2-y^2}$  eine Bande im höherenergetischen. Nichtsdestotrotz ist für alle Cu<sup>II</sup>-Komplexe nur eine sehr breite Bande zwischen 550 – 720 nm beobachtet worden. Mittels einer Gauß Analyse<sup>5</sup> vom Feststoff-VIS-Spektrum Cu<sup>II</sup>-**16** konnten drei Anregungsübergänge ( $d_{xz}, d_{yz} \rightarrow d_{x^2-y^2} = 611$  nm,  $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2} = 761$  nm,  $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2} = 1021$  nm) ermittelt werden. Da sich die Anregungsspektren überlagern, sieht man lediglich eine breite Absorptionsbande [49].

Mit Erhöhung des Funktionalisierungsgrades am Cyclam-Ring wurde im wässrigen System und im festen Zustand eine bathochrome Verschiebung von  $\lambda_{max} = \text{Cu}^{\text{II}}\text{-13} < \text{Cu}^{\text{II}}\text{-14b} < \text{Cu}^{\text{II}}\text{-16}$  beobachtet. Mit Substitution weiterer Propionsäure-Liganden am Cyclam-Grundgerüst entsteht eine Verzerrung, die sich zunehmend in einer trigonal-bipyramidalen Geometrie äußert (siehe Kapitel 3.1.3, S. 47 und Kapitel 3.2.1, S. 50). Abbildung 36 verdeutlicht die Ligandenfeldaufspaltung unterschiedlicher Geometrien. Beim Übergang von quadratisch-pyramidal zu verzerrt trigonal-bipyramidal wird das  $d_{x^2-y^2}$ -Orbital energetisch abgesenkt. Die Anregung in dieses Energieniveau erfordert somit eine geringere Energie für den d-d-Übergang.

---

<sup>5</sup> Die Gauss Analyse wurde von dem AK Prof. Dr. Peter Comba von der Universität Heidelberg durchgeführt.

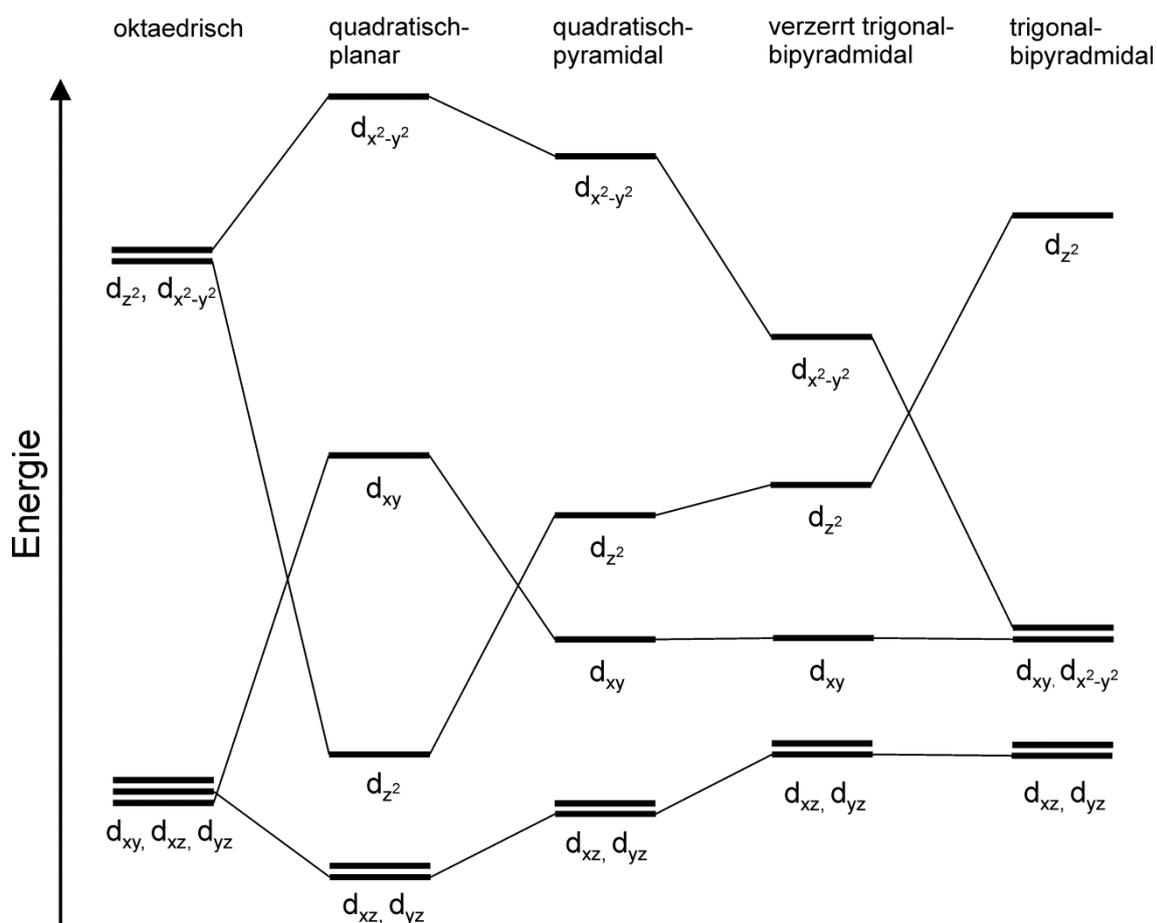


Abbildung 36: Energieniveau-Schema der Molekülorbitale von oktaedrischen, quadratisch-planaren, quadratisch-pyramidalen, verzerrt trigonalen und trigonal-bipyramidalen Komplexen [110]

### 3.2.4 Cu<sup>II</sup>-Komplexbildung bei verschiedenen pH-Werten am Beispiel von Cu<sup>II</sup>-**14b**

Als wichtiger Parameter ist die Komplexbildung der Liganden **13**, **14b** und **16** mit Cu<sup>II</sup> in Abhängigkeit des pH-Wertes spektroskopisch untersucht worden. Hierfür sind 2 mM wässrige Puffer-Lösungen der Liganden mit einer äquimolaren wässrigen Lösung von Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O versetzt worden. Um einen Einfluss des pH-Wertes auf die Komplexbildungsgeschwindigkeit zu analysieren, ist diese bei drei verschiedenen pH-Werten bei Raumtemperatur untersucht worden. Zum einen bei einem pH-Wert von 2,1 in 1 M Glycin/HCl-Puffer, da hier alle koordinierenden und nicht koordinierenden Carboxylgruppen protoniert vorliegen. Zum anderen bei pH-Werten von 5,5 in 0,5 M MES/NaOH-Puffer und 7,4 in 0,5 M HEPES/NaOH-Puffer. Der leicht saure pH-Wert ist gewählt worden, um einerseits einen Vergleich mit den pH-Werten der Radiomarkierung mit [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> zu gestatten und andererseits eine Deprotonierung der koordinierenden Carboxylgruppe hervorzurufen. Unter physiologischen pH-Wert Bedingungen hingegen sollten alle Carboxylgruppen deprotoniert vorliegen. Die

Komplexbildung ist anhand des Absorptionsverhaltens verfolgt worden. Am Beispiel der Cyclam-Dipropionsäure **14b** wird das Komplexbildungsverhalten mit  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  bei unterschiedlichen pH-Werten gezeigt (Abbildung 37). Für die o.g. Cyclam-Propionsäure-Liganden findet man ein analoges Komplexverhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert (siehe Abbildung Anhang 5, S.XV).

Am Beispiel der Cyclam-Dipropionsäure werden die Ergebnisse diskutiert: Wie zu erwarten, verläuft die Komplexbildung mit  $\text{Cu}^{\text{II}}$  unter sauren Bedingungen (pH 2,1) in 1 M Glycin/HCl-Puffer bei Raumtemperatur langsamer als bei pH-Werten von 5,5 und 7,4. Erst nach ca. 6 h ist eine vollständige Komplexierung zu beobachten. Nach dieser Zeit ist die Gleichgewichtseinstellung beendet, was durch die konstante Absorption belegt wird (Abbildung 37). Demgegenüber wurde keine Absorptionsänderung für die Komplexbildung bei pH 5,5 in 0,5 M MES/NaOH-Puffer und pH 7,4 in 0,5 M HEPES/NaOH-Puffer bei Raumtemperatur beobachtet. Die Komplexbildung verläuft so schnell, dass sie unter den gegebenen Messbedingungen nicht verfolgt werden konnte. Somit spielt der pH-Wert eine entscheidende Rolle bei der Komplexbildung der hier diskutierten  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexe. Aufgrund dessen sollte die Markierung mit  $^{64}\text{Cu}$  unter leicht sauren Bedingungen stattfinden, um eine schnelle Komplexbildung zu gewährleisten.

Interessanterweise verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Komplexbildung in Gegenwart des HEPES-Puffers zu niedrigeren Wellenlängen (582  $\rightarrow$  566 nm). Dieses Verhalten spricht für eine Koordination des HEPES-Pufferanions im Gegensatz zum Anion des MES-Puffers.

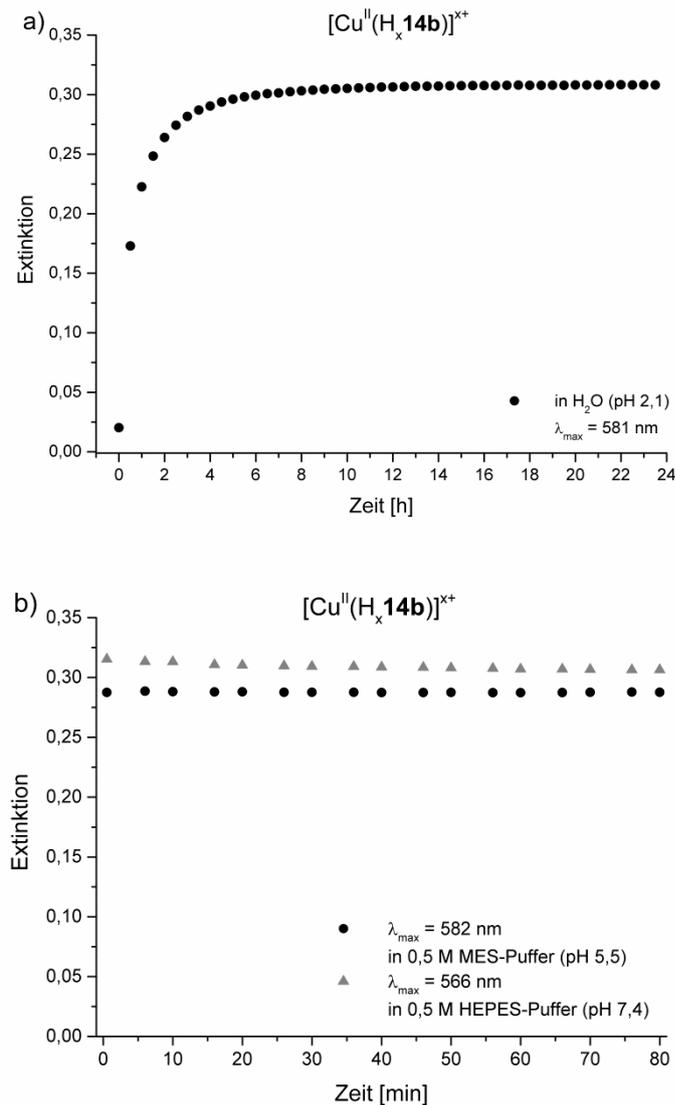


Abbildung 37: Komplexbildung von [Cu<sup>II</sup>(H<sub>x</sub>14b)]<sup>x+</sup> bei unterschiedlichen pH-Werten a) in H<sub>2</sub>O (pH 2,1/ Lösung von Ligand), b) in MES-NaOH-Puffer (pH 5,5) und HEPES-Puffer (pH 7,4) c = 2 mM bei RT

### 3.2.5 Stabilitätstest in Anwesenheit eines 20-fachen Überschusses an Cyclam

Bei der Entwicklung von neuartigen Chelatoren für Kupfer-64 spielt die kinetische Stabilität *in vivo* eine übergeordnete Rolle. Eine mögliche Dissoziation des Cu<sup>2+</sup> vom Komplex kann dabei nicht nur eine erhöhte Strahlenexposition durch unspezifische Bindung bezüglich der eingesetzten Verbindung verursachen, sondern verschlechtert zudem das Signal-Rausch-Verhältnis für die PET. Aus diesem Grund sind Voruntersuchungen mittels UV/VIS-Spektroskopie hinsichtlich der kinetischen Stabilität notwendig.

Durch Zugabe eines hohen Überschusses an einem Konkurrenzliganden kann geprüft werden, ob sich neue Spezies bilden und damit Rückschlüsse auf die kinetische Stabilität gezogen werden. Im Zusammenhang mit der Bewertung der Stabilität von Radiokupferkomplexen werden häufig EDTA, DTPA, TETA **6** und Cyclam **3** als Konkurrenzliganden eingesetzt [114-117]. Von diesen Liganden bildet Cyclam **3** den stabilsten Kupfer(II)-Komplex und kam daher für diese Untersuchungen zum Einsatz.

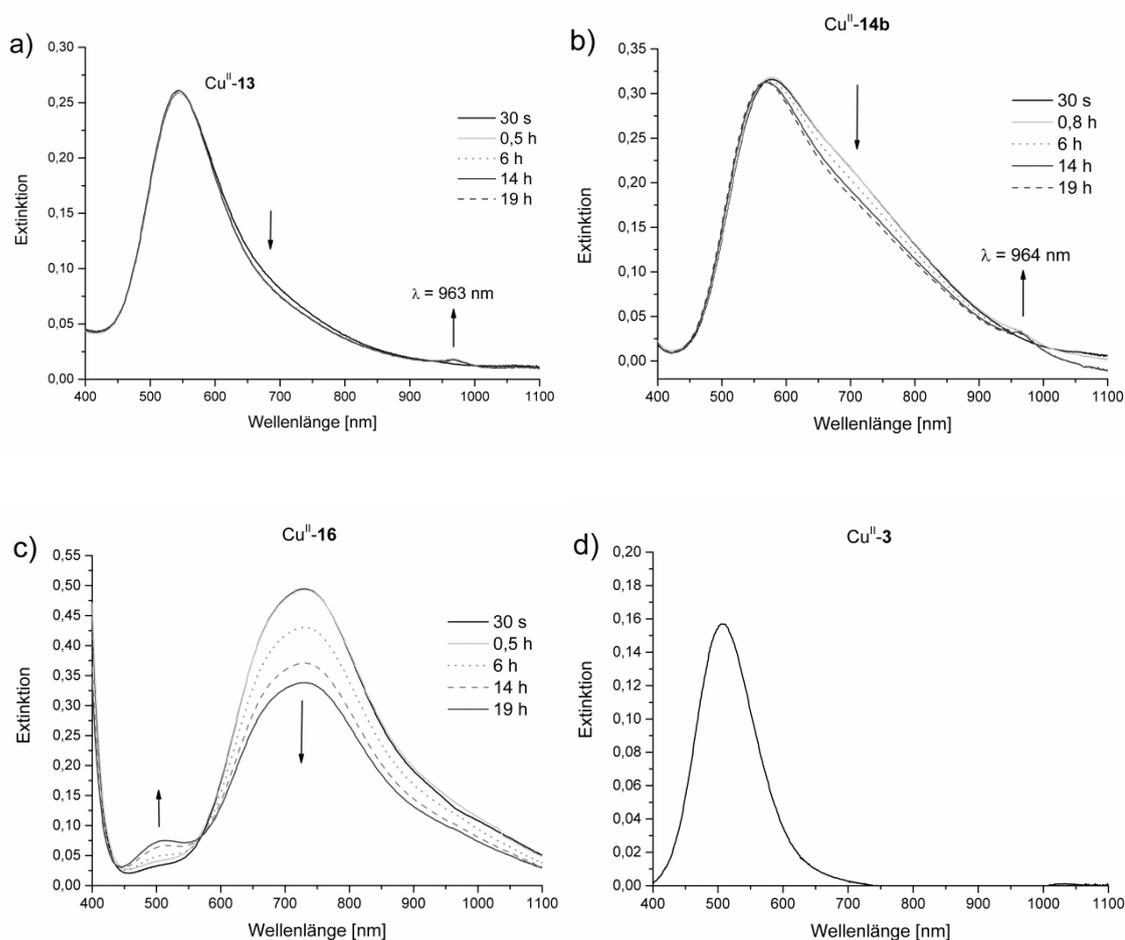


Abbildung 38: Stabilitätstest von 2 mM wässrigen Lösungen an a)  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-13}$ , b)  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-14b}$  und c)  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-16}$  in Anwesenheit eines 20-fachen Überschusses an Cyclam, d) Referenzspektrum  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-3}$  bei RT

Für die Cyclam-Monopropionsäure **13** wurden keine Veränderungen des Absorptionsmaximums des entsprechenden Kupfer(II)-Komplexes beobachtet (Abbildung 38). Demgegenüber ergibt sich eine sehr geringe Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-14b}$  in Anwesenheit von einem 20-fachen Überschuss an Cyclam. Diese geringen Änderungen können aber auch auf Temperaturschwankungen zurückgeführt werden, da keine Temperierung verwendet worden ist. Andererseits absorbiert  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{Cyclam})]^{2+}$  in dem untersuchten

Wellenlängenbereich auch. Eine Überlagerung der Absorptionsbanden ist nicht auszuschließen, womit keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

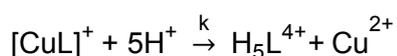
Bei Cu<sup>II</sup>-**16** (Abbildung 38) hingegen ist nicht nur eine Abnahme der Extinktion in Abhängigkeit der Zeit (32% nach 19 h) beobachtet worden, sondern es hat sich eine zweite Bande bei 513 nm gebildet. Bereits nach 30 min nahm die Extinktion um 10% ab, was auf eine Transchelatisierung hindeutete. Diese Bande kann dem [Cu<sup>II</sup>(Cyclam)]<sup>2+</sup> zugeordnet werden.

### 3.2.6 Säure-assoziierte Dissoziation

Eine weitere Möglichkeit, um Aussagen über die kinetische Stabilität zu erhalten, ist die Säure-assoziierte Dissoziation. Dabei wird unter stark sauren Bedingungen die Protonierung des Komplexes erzwungen. Eine Dissoziation kann über die Änderung der Absorption in der charakteristischen d-d-Bande von Cu<sup>II</sup>-Komplexen mittels VIS-Spektroskopie gemessen werden. Da es sich hierbei um eine kinetische Zerfallsreaktion handelt, kann mit Hilfe des entsprechenden Zeitgesetzes die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ermittelt werden. Bei Reaktionen erster Ordnung ergibt sich die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante aus der Auftragung der logarithmischen Extinktion gegen die Zeit gemäß Gleichung 4 [118].

$$\ln E = -k \cdot t + \ln E_0 \quad (4)$$

Daraus wird die resultierende Halbwertszeit der Komplexe bestimmt. Bei vollständiger Protonierung kann der Komplex in die protonierten Liganden und das (hydratisierte) Metallion zerfallen.



Diese Methode wurde bereits bei Stabilitätsuntersuchungen für die Makrocyclen DOTA **5**, TETA **6**, Cyclam **3**, TE2A **9** sowie deren verbrückten Vertreter eingesetzt [45, 53, 55]. Die Ergebnisse wiesen hier auf eine sehr hohe Stabilität der Cu<sup>II</sup>-Komplexe mit CB-TE2A **11** hin.

Lösungen von Cu<sup>II</sup>-**13**, Cu<sup>II</sup>-**14b** und Cu<sup>II</sup>-**16** (2 mM) sind in 1 M HCl bei RT spektroskopisch untersucht worden. Die Zerfallsreaktionen der Cu<sup>II</sup>-Komplexe mit den Cyclam-Propionsäure-Derivaten **13**, **14b** und **16** folgen einer Reaktion erster Ordnung. Für die Komplexe Cu<sup>II</sup>-**14b** und Cu<sup>II</sup>-**16** konnte gemäß Gleichung 4 eine Geschwindigkeitskonstante  $k$  dieser Dissoziationsreaktion ermittelt werden (Abbildung 39).

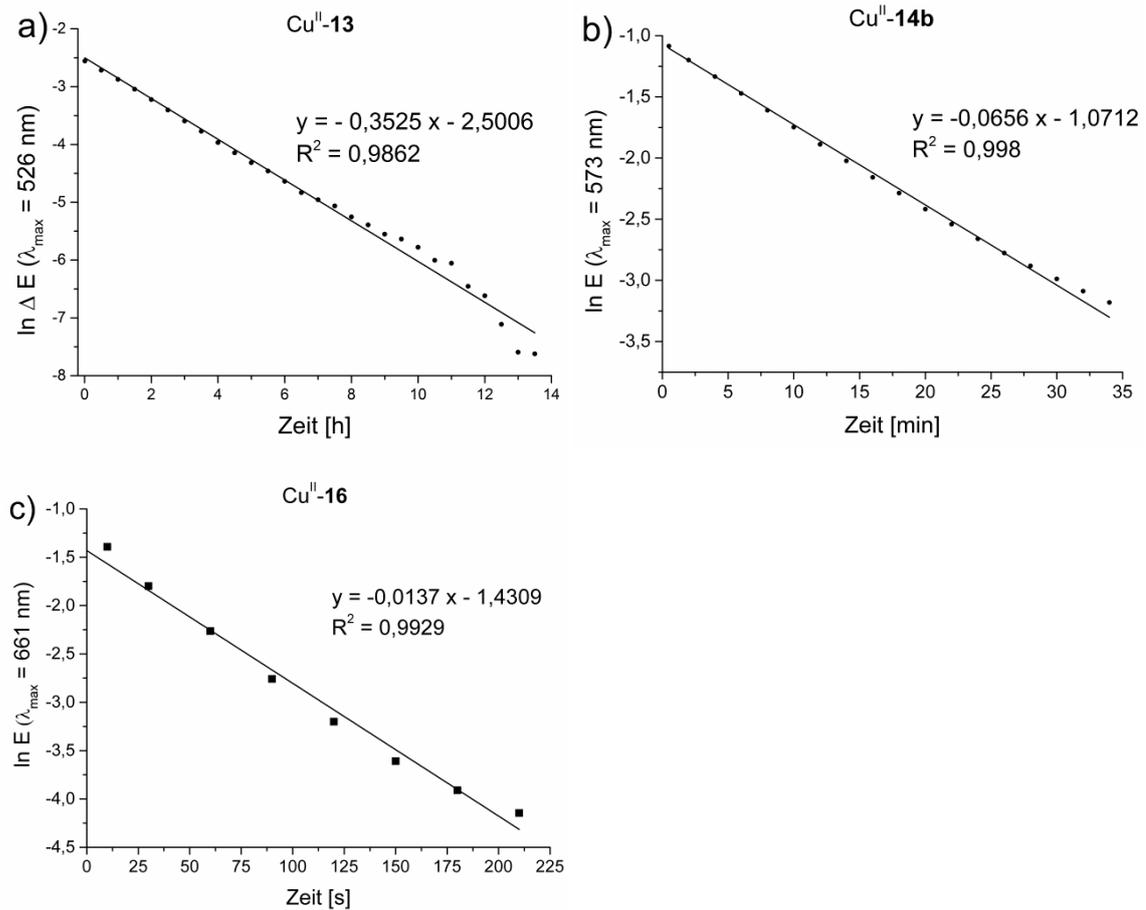


Abbildung 39: Kinetische Untersuchung des Zerfalls mittels UV/VIS-Spektroskopie von a) Cu<sup>II</sup>-13, b) Cu<sup>II</sup>-14b und c) Cu<sup>II</sup>-16 in 1 M HCl bei RT durch Auftragen von  $E$  bzw.  $\ln E$  gegen die Zeit

Für Cu<sup>II</sup>-13 sank die Extinktion nicht auf null, sondern blieb nach einer bestimmten Zeit konstant. Daher wurde die Geschwindigkeits-Zeit-Funktion um diesen Wert  $\tilde{E}_0$  korrigiert. Die entsprechende Abhängigkeit kann wiederum mit einer Geschwindigkeitsgleichung erster Ordnung beschrieben werden:

$$\ln(E_t - \tilde{E}_0) = \ln E_0 - k_1 \cdot t \quad (5)$$

Bei der Säure-assoziierten Dissoziation von Cu<sup>II</sup>-13 ist wahrscheinlich eine neue Spezies gebildet worden, die unter den gegebenen Bedingungen stabil bleibt und zur Extinktion  $\tilde{E}_0$  führt.

Für die Kupfer(II)-Komplexe Cu<sup>II</sup>-13, Cu<sup>II</sup>-14b und Cu<sup>II</sup>-16 konnte eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 118 \text{ min}$ ,  $t_{1/2} = 10,6 \text{ min}$  und  $t_{1/2} = 51 \text{ s}$  bestimmt werden. Demzufolge nimmt die Dissoziationsgeschwindigkeit in 1 M HCl bei RT mit steigender Funktionalisierung

von Cyclam-Propionsäure-Liganden zu. Dasselbe Verhalten wurde auch für die Cyclam-Essigsäure-Derivate beobachtet (Kapitel 2.3.4).

Eine mögliche Ursache für diesen Trend ist mit der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu erklären, ähnlich wie es für die Cyclam-Phosphonsäuren angenommen worden ist [54] (siehe Kapitel 2.3.4, S. 17). Gemäß diesem Mechanismus würden zunächst alle nicht-kordinierenden und dann die koordinierenden Carboxylatgruppen protoniert werden. Die Protonierung der ersten Aminfunktion ginge mit einem Bindungsbruch zum Cu(II) einher und ist durch eine Wasserstoffbrückenbindung energetisch begünstigt. In Abbildung 40 ist eine mögliche Struktur (Protonierungsintermediat) für diese Stabilisierung dargestellt.

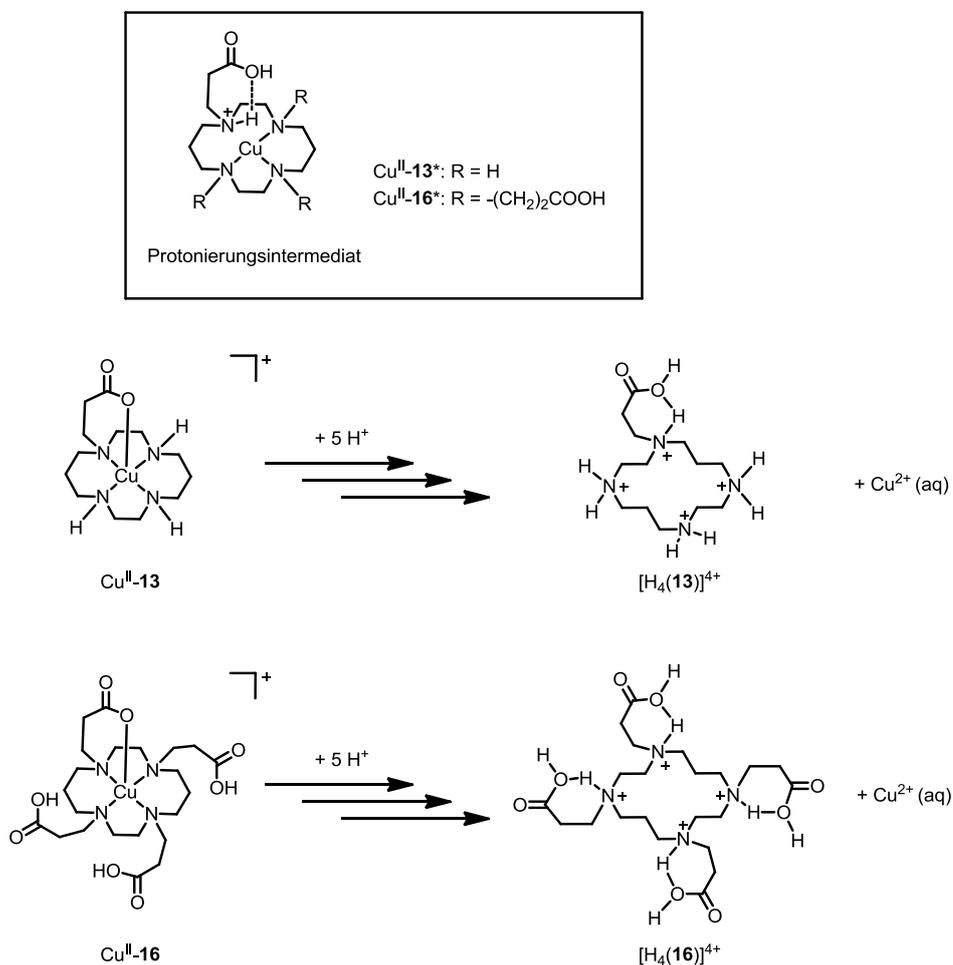


Abbildung 40: Möglicher Mechanismus der Säure-assoziierten Dissoziation am Beispiel von  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-13}$  und  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-16}$

Für das  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-16}$  können die einzelnen Protonierungsintermediate gleichfalls über eine analoge Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert werden. Sie sind damit gegenüber den  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-13}$ -Intermediaten thermodynamisch bevorzugt.

Zudem könnte argumentiert werden, dass der Bruch der Cu-O-Bindung bei der ersten Protonierung (Protonierungsintermediat, siehe Abbildung 40) für das Cu<sup>II</sup>-**13** entlang der z-Achse stattfindet, während bei Cu<sup>II</sup>-**16** die Cu-O-Bindung in x,y-Ebene gebrochen wird. Somit würde das verzerrt trigonal-bipyramidale Ligandenfeld des Cu<sup>II</sup>-**16** stärker destabilisiert werden als das quadratisch-pyramidale vom Cu<sup>II</sup>-**13**. Hierin könnte die schnellere Dissoziation von Cu<sup>II</sup>-**16** begründet werden.

Die aus der Röntgeneinkristallstrukturanalyse abgeleiteten Spannungen für Cu<sup>II</sup>-**16** (siehe Kapitel 3.1.3, S.47) verursachen wie vermutet eine verringerte kinetische Stabilität.

### 3.3 Radiochemische Untersuchungen der Cyclam-Propionsäure-Liganden mit Kupfer-64

#### 3.3.1 Markierungskinetik der Liganden **13**, **14b**, **15** und **16** mit Kupfer-64

Um die neuentwickelten Chelatoren **13**, **14b**, **15** und **16** hinsichtlich ihrer Eignung als Bestandteil von Radiotraceren bewerten zu können, sind Untersuchungen zur Stabilität der gebildeten Kupfer-64-Komplexe durchgeführt worden. Neben der Komplexbildungskinetik (zeit-, temperatur- und konzentrationsabhängige Komplexbildung mit [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub>), soll vor allem die kinetische Stabilität unter physiologischen Bedingungen bewertet werden. Wie bereits im Kapitel 2.3.5 erwähnt, neigen <sup>64</sup>Cu-Chelate zur Dissoziation bzw. Transchelatisierung *in vivo*. In-vitro-Untersuchungen sind geeignete Methoden, um deren Verhalten angelehnt an physiologische Bedingungen abschätzen zu können. So gibt es die Möglichkeit, die Stabilität der <sup>64</sup>Cu-Chelate in Gegenwart geeigneter Konkurrenzliganden zu untersuchen.

Als Konkurrenzliganden werden natürlich vorkommende Chelatoren (Glutathion, Histidin) oder solche mit einer sehr hohen thermodynamischen Stabilität (Cyclam **3**) bevorzugt angewendet. Weiterhin geben Untersuchungen in humanen Vollblut bzw. Serum wichtige Hinweise zur metabolischen Stabilität. Kupferbindende Enzyme bzw. Proteine (SOD, Caeruloplasmin, Humanalbumin, etc.) sind in der Lage Cu(II)-Komplexe zu transchelatisieren. Von besonderem Interesse ist die Stabilität von <sup>64</sup>Cu-Komplexen in Anwesenheit von humanem Serum und SOD.

### *Analytik*

Zunächst ist das Komplexbildungsverhalten der Liganden **13**, **14b**, **15** und **16** mit  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  in Abhängigkeit von der Konzentration, der Temperatur und des pH-Wertes untersucht worden. Es mussten hierfür geeignete Radio-DC und Radio-HPLC Methoden erarbeitet werden, da die in der Literatur beschriebenen Methoden für die Cyclam-Essigsäure-Derivate nicht auf die Cyclam-Propionsäure-Liganden übertragbar waren. Das unterschiedliche Elutionsverhalten kann womöglich mit der Gesamtladung der jeweiligen Komplexe erklärt werden. Im Gegensatz zu den neutral geladenen Kupfer(II)-Cyclam-Essigsäure-Komplexen  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**6** und  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**9**, sind die Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure-Komplexe positiv geladen. Erschwerend kam hinzu, dass die Komplexe aufgrund ihrer Hydrophilie ähnliches Retentionsverhalten zeigten wie freies  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ . Zudem begünstigten stark saure Eluenten die Protonierung der Komplexe und damit die Dissoziation von Kupfer-64. Andererseits ist es notwendig bei einem sauren pH-Wert zu arbeiten, da sonst  $x\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$  ausfällt [110]. Als Prämisse für eine erfolgreiche Markierung galten Reinheiten von über 95%.

### *Radio-HPLC-Methode*

Die in der Literatur häufig angewandte Trennmethode mittels RP-HPLC konnte nicht übertragen werden. Stattdessen eignet sich für die Trennung von Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäuren ein zwitterionisches Säulenmaterial (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC). Durch dessen Einsatz in Kombination mit einer zwitterionischen Säule mit einem ACN/ $\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer-Gemisch als Elutionsmittel sind sehr gute Trennungen erzielt worden (Methode 2). Die Retentionszeit für  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -**13** betrug 14,1 min,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -**14b** 13,8 min,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -**15** 15,9 min und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -**16** 17,1 min (siehe Abbildung Anhang 6, S. XVI). Am Beispiel von  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**13** ist in Abbildung 41 ein solches Radio-HPLC Chromatogramm gezeigt.

### *Radio-DC-Methoden*

Als ein geeignetes Radio-DC System wurde als stationäre Phase ITLC-SA mit dem Eluenten  $\text{H}_2\text{O} + 0,1\text{Vol.}\% \text{HCOOH}$  etabliert. Es handelte sich dabei um ein Glasmikrofaserpapier, welches mit Kieselsäure imprägniert wurde. Die  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Komplexe der Liganden verblieben am Start (Abbildung 41), wohingegen das freie  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  einen  $R_f$ -Wert von 0,4 aufwies. Da das  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**16** unter sehr sauren Bedingungen (pH 0, vgl. Kapitel 3.2.6) rasch dissoziiert, ist eine Kontrollmethode auf einer Umkehrphase mit einem leicht sauren Eluenten (2 M  $\text{NH}_4\text{OAc}/\text{MeOH}$  (1:1, v:v), pH 6,0) durchgeführt worden. Nachteilig an dieser Methode sind aber die langen

Elutionszeiten. Die Auswertungen ergaben, dass die Resultate bei beiden Methoden vergleichbar waren.

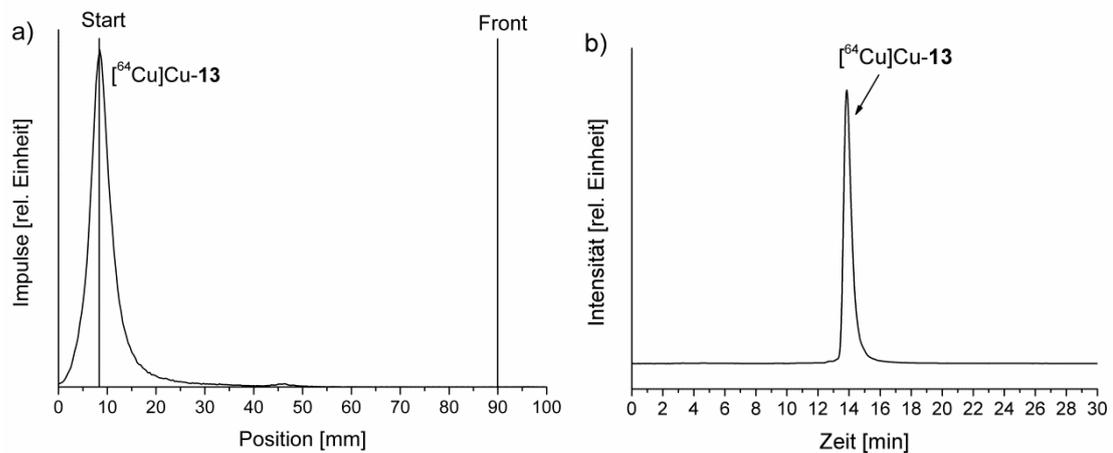


Abbildung 41: a) Radio-DC (ITLC-SA,  $\text{H}_2\text{O} + 0,1 \text{ Vol.-% HCOOH}$ ) und b) Radio-HPLC Chromatogramm (ZIC-HILIC,  $\text{ACN}/\text{NH}_4\text{OAc}$ -Puffer-Gemisch, Methode 2) am Beispiel von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$

Für eine nuklearmedizinische Anwendung ist, neben einer hohen In-vivo-Stabilität, eine effiziente Markierung hinsichtlich Reinheit und Reaktionszeit der Chelatoren mit Kupfer-64 unter milden Bedingungen (physiologischer pH-Wert, niedrige Temperatur) eine wesentliche Voraussetzung.

#### *Komplexbildungskinetik*

Die Komplexbildungskinetik der Liganden **13**, **14b**, **15** und **16** ist mit  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  in Abhängigkeit der Konzentration, der Temperatur und des pH-Wertes untersucht worden. Mit Hilfe der Radio-DC wurde die radiochemische Ausbeute (RCA) bestimmt. Es sind bei allen Untersuchungen Doppelbestimmungen durchgeführt worden. In Abbildung 42 sind die radiochemischen Ausbeuten in Abhängigkeit der Temperatur und Konzentration bei pH 5,5 in 0,1 M MES/NaOH-Puffer grafisch dargestellt. Dabei wurden für die Kupfer-64 Markierung der Liganden **13**, **14b**, **15** und **16** mit Konzentrationen von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Lösung ( $A_s \sim 0,25 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ) bzw. 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Lösung ( $A_s \sim 0,05 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ) und einer Aktivität von  $\sim 5 \text{ MBq}$   $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  bei einem pH-Wert von 5,5 gearbeitet.



gewährleisten, ist die Temperatur auf 80°C erhöht worden. Für  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  ( $A_s = 0,26 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ) wurde eine RCA von über 99% nach 30 min realisiert, wohingegen  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  ( $A_s \sim 0,24 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ) 140 min benötigte (Abbildung 43). Trotz einer Temperaturerhöhung von 50°C auf 80°C ist für  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  keine schnellere Komplexbildung erzielt worden.

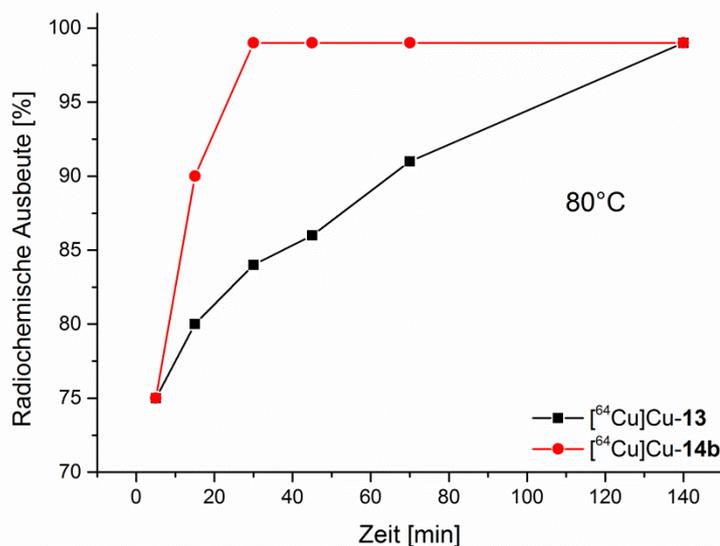


Abbildung 43: Radiochemische Ausbeute für  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  bei 80°C in Abhängigkeit der Zeit (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ligandkonzentration) bei pH 5,5 in 0,1 M MES/NaOH-Puffer ( $A_s(\text{Cu}^{\text{II}}\text{-13}) = 0,24 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$  und  $A_s(\text{Cu}^{\text{II}}\text{-14b}) = 0,26 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ )

Eine Ausnahme bildet das mit Kupfer-64 markierte Cyclam-Tripropionsäure-Derivat **15**. Die Komplexbildung verläuft wesentlich schneller als für **13**, **14b** und **16**. Bereits nach 5 min ist bei 50°C eine RCA von 99% erreicht. Das konnte in mehreren unabhängigen Untersuchungen bestätigt werden. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann auf der Basis der vorliegenden Experimente nicht gegeben werden. In dem untersuchten Konzentrationsbereich ist der Einfluss der Ligandkonzentration auf die Markierungskinetik nahezu unabhängig.

#### *Untersuchung des pH-Wert Einflusses*

Des Weiteren ist auch die Komplexbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert überprüft worden. Die Markierungen mit Kupfer-64 sind in 0,1 M MES-NaOH (pH 5,5) und in 0,1 M HEPES-NaOH-Puffer (pH 7,4) mit jeweils 10  $\mu\text{g}$  Ligand (Stammlösung 1 mg/ml gelöst in der entsprechenden Puffer-Lösung) bei 25°C durchgeführt worden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 am Beispiel von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-15}$  dargestellt. Anhand der RCA bei pH 5,5 und pH 7,4 wird ersichtlich, dass die Komplexbildung unter leicht sauren Bedingungen bevorzugt ist.

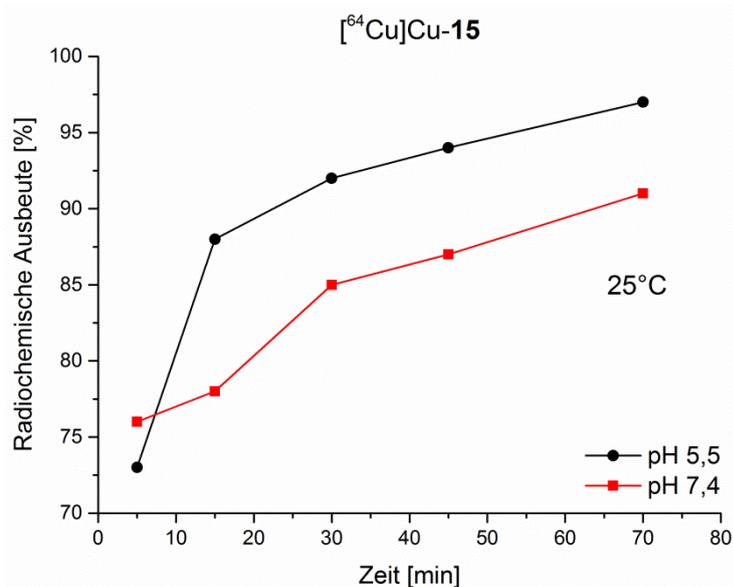


Abbildung 44: Vergleich der radiochemischen Ausbeute von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-15}$  bei  $25^\circ\text{C}$  und unterschiedlichen pH-Werten (MES-Puffer pH 5,5 vs. HEPES-Puffer pH 7,4) in Abhängigkeit der Zeit (Ligandkonzentration:  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )

In weiterführenden Experimenten ist der Einfluss des pH-Wertes untersucht worden. Dafür sind die Liganden **13** und **14b** bei zwei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5,0 und 5,5) und Temperaturen ( $37^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$ ) in  $0,1\ \text{M}$  MES/NaOH-Puffer mit Kupfer-64 markiert worden. In Abbildung 45 sind die RCA von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  in Abhängigkeit der Zeit und Temperatur bei unterschiedlichen pH-Werten dargestellt. Um systematische und zufällige Fehler zu minimieren, sind die Liganden unter denselben Bedingungen mit denselben Kupfer-64 Chargen markiert worden ( $A_s(\text{Cu}^{\text{II}}\text{-13}) = 0,24\ \text{GBq}/\mu\text{mol}$  und  $A_s(\text{Cu}^{\text{II}}\text{-14b}) = 0,26\ \text{GBq}/\mu\text{mol}$ ). Der direkte Vergleich zeigt einen erheblichen Einfluss des pH-Wertes auf die RCA bei  $37^\circ\text{C}$  und  $50^\circ\text{C}$ . Bereits nach 15 min ist eine RCA von  $>95\%$  bei  $50^\circ\text{C}$  und einem pH-Wert von 5,0 für  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  erreicht, wohingegen bei einem pH-Wert von 5,5 bei gleichbleibender Temperatur die RCA bei ca. 73% lag. Für Cyclam-Dipropionsäure **14b** ist der Einfluss des pH-Wertes markanter. Nach 30 min bei pH 5,0 und  $50^\circ\text{C}$  wurde eine nahezu vollständige Komplexbildung mit Kupfer-64 erzielt, wohingegen bei pH 5,5 die RCA lediglich über 60% erreichte.

Ursache könnte das Vorhandensein von unterschiedlich protonierten Spezies des Liganden sein. Morphy *et al.* [119] untersuchten die Komplexbildungsgeschwindigkeit von C-funktionalisierten Tetraazamacrocyclen mit Kupfer(II)-Ionen in Gegenwart von Succinat und fanden sowohl einen Einfluss des Pufferanions in Abhängigkeit der Ionenstärke und des pH-Wertes als auch einen Einfluss der unterschiedlich protonierten Spezies des Makrocyclus. Die unterschiedlichen Spezies des  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -

Pufferions und des protonierten Liganden sind verantwortlich für die Geschwindigkeit der Komplexbildung.

### Temperatureinfluss

Auch der Temperatureinfluss spielt hinsichtlich der Komplexgeschwindigkeit eine entscheidene Rolle. Im Fall von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  ( $A_s = 0,24 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ) ist eine RCA von  $>95\%$  bei  $50^\circ\text{C}$  bereits nach 15 min erreicht, bei  $37^\circ\text{C}$  erst nach 30 min. Das ist bemerkenswert, da die Cyclam-Essigsäure-Derivate innerhalb weniger Minuten bei  $30^\circ\text{C}$  vollständig komplexiert sind [23, 55]. Vermutlich treten bei den Cyclam-Propionsäure-Analoga verschiedene Konfigurationsisomere auf, die die Gleichgewichtseinstellung und Komplexbildungsgeschwindigkeit beeinflussen. Durch Temperaturerhöhung wird nicht nur die freie Beweglichkeit der Moleküle erhöht, sondern das Gleichgewicht vermutlich auch zugunsten eines Konfigurationsisomers verschoben.

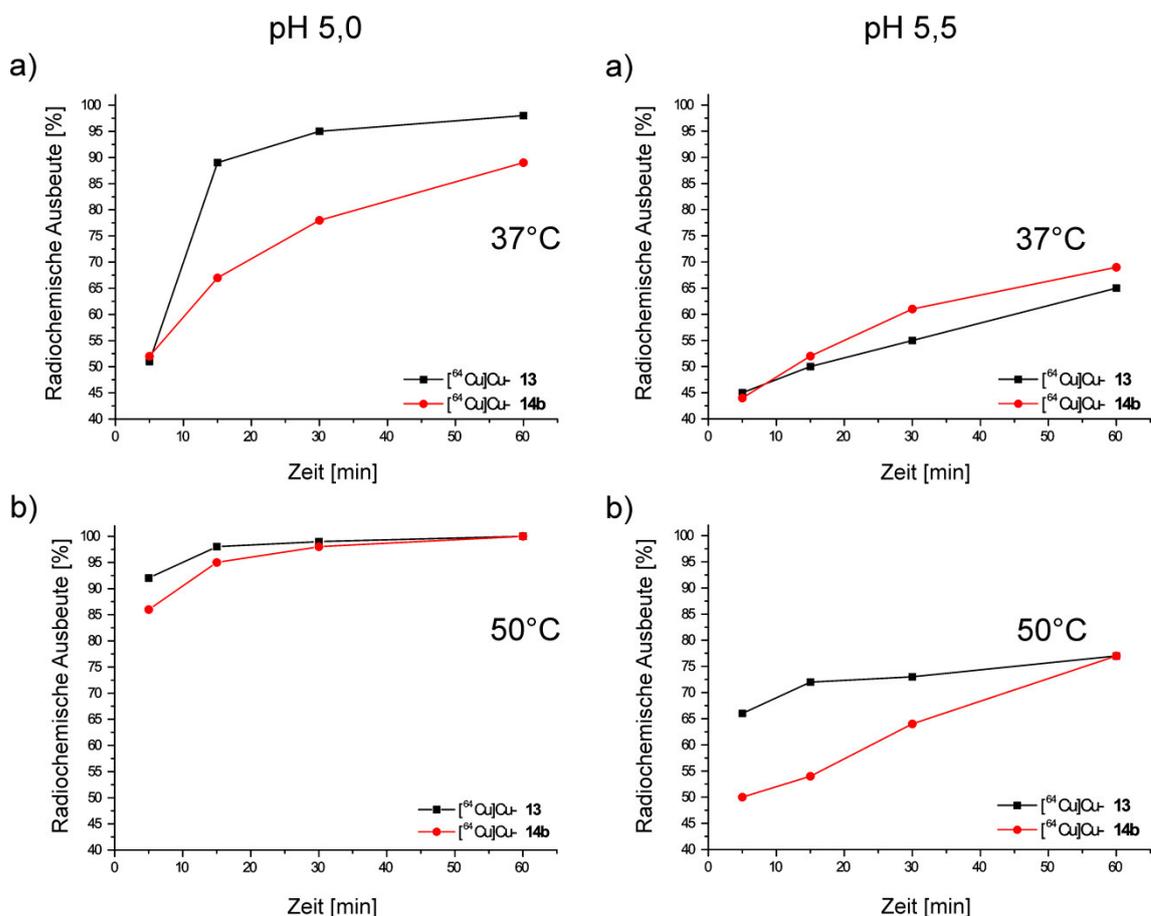


Abbildung 45: Radiochemische Ausbeute von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  ( $A_s = 0,24 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ) und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  ( $A_s = 0,26 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ ) in Abhängigkeit von der Temperatur, der Zeit und des pH-Wertes (5,0 und 5,5) a)  $37^\circ\text{C}$  und b)  $50^\circ\text{C}$  ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  Ligandkonzentration)

Vergleicht man die Ergebnisse der Radiomarkierung mit den spektroskopischen Untersuchungen zur Komplexbildung (vgl. Kapitel 3.2.4), so ergibt sich ein widersprüchliches Bild. Es wurde gezeigt, dass in MES- und HEPES-Puffer die Komplexbildung der Liganden **13**, **14b** und **16** mit äquimolarer Menge an Cu<sup>II</sup> und Ligand bei RT sehr schnell verläuft (Kapitel 3.2.4). Die Komplexbildungsgeschwindigkeit der Radiomarkierungen hingegen ist kinetisch gehemmt. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist das Vorhandensein von anderen Metallionen, die die Komplexbildung mit Kupfer-64 verzögern können. Im Kupfer-64 Eluat sind verschiedene Metallionen enthalten, die in Konkurrenz zum Kupfer-64 treten können. Vor allem ist Nickel-64 produktionsbedingt in einem sehr großen Überschuss (Cu<sup>2+</sup>/Ni<sup>2+</sup>~1:350) vorhanden. Von den Cyclam-Essigsäure-Derivaten ist bekannt, dass die Stabilitätskonstanten für Cu(II) und Ni(II) in der gleichen Größenordnung liegen [47]. Um diese möglichen Konkurrenzreaktion nachweisen zu können, wurde am Beispiel von Ligand **14b** die Komplexbildung mit nickelärmerem und nickelreicherem [<sup>64</sup>Cu]Cu-Eluat unter vergleichbarer Kupfer-64 Aktivität durchgeführt. Das nickelärmere [<sup>64</sup>Cu]Cu-Eluat konnte durch eine nochmalige Reinigung durch Anionenaustauschchromatografie hergestellt werden. Die Nickel-64 und Kupfer-63/65-Konzentrationen wurden mittels ICP-MS ermittelt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Radiochemische Reinheit von [<sup>64</sup>Cu]Cu-**14b** markiert mit nickelreichen [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> und mit nickelarmen [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub>\* bei 50°C in Abhängigkeit der Zeit bei pH 5,5

t [min]	Radiochemische Reinheit [%] in Abhängigkeit von der Zeit [min] bei 50°C in MES-Puffer (pH 5,5)						Nickel-64 Gehalt [µg/l]	Kupfer-63/65 Gehalt [µg/l]
	5	15	30	45	70	140		
[ <sup>64</sup> Cu]Cu- <b>14b</b>	39	90	91	93	97	100	879	2,54
[ <sup>64</sup> Cu]Cu- <b>14b</b> *	37	90	90	97	98	100	< 0,5	2,68

Unter den gewählten Bedingungen wird die Markierungsausbeute nicht vom Ni(II)-Gehalt der Lösung beeinflusst. Somit wurde keine Konkurrenzreaktion mit Nickel(II) bezüglich der Komplexbildungsgeschwindigkeit nachgewiesen.

### 3.3.2 Verteilung von den $^{64}\text{Cu}$ -markierten Liganden **13**, **14b**, **15**, **16** und **6** in Octan-1-ol/ $\text{H}_2\text{O}$

Um die Pharmakokinetik bzw. Bioverteilung von Komplexen in biologischen Systemen abschätzen zu können, sind Aussagen zur Hydrophilie bzw. Lipophilie von besonderem Interesse. Dazu können Aktivitätsverteilungsmessungen in einem Zweiphasensystem Octan-1-ol/HEPES-Puffer der  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Liganden herangezogen werden. Die Aktivitätsverteilung kann zudem in Abhängigkeit des pH-Wertes gemessen (pH 7,2; 7,4 und 7,6) werden. Auf diese Weise sind Aussagen zum Einfluss der Protonierung der Spezies auf die Verteilung möglich.

#### *Vorgehen*

Für die Ermittlung des Verteilungskoeffizienten erfolgte zunächst die Markierung der Liganden **13**, **14**, **15**, **16** und **6** ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ) mit 0,5 – 1 MBq  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer bei pH 7,2; 7,4 und 7,6 und einer  $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$   $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung in 200  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen. Nachdem eine RCA von >99% erzielt worden ist (Überprüfung mittels DC-Methode 3), sind je 20  $\mu\text{l}$  des Markierungsansatzes in 480  $\mu\text{l}$  0,1 M HEPES/NaOH-Puffer (pH 7,2; 7,4 und 7,6) überführt worden. Dann wurden 500  $\mu\text{l}$  Octan-1-ol zum Ansatz beigemischt. Die Phasen werden geschüttelt, separiert und die verbliebene Aktivität in den Phasen mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Das Verteilungsverhältnis  $D$  ist der Quotient der Metallkonzentration in der organischen und wässrigen Phase. Es kann experimentell leicht über die Bestimmung der Aktivität in beiden Phasen ermittelt werden. Der dekadische Logarithmus von  $D$  wird häufig als Kenngröße verwendet.

$$\log D_{o/w} = \log \frac{c_{\text{ML}}(o)}{c_{\text{ML}}(w)} \quad (6)$$

In dem untersuchten pH-Bereich (pH 7,2; 7,4; 7,6) sind die  $\log D$ -Werte aller Cyclam-Carboxyl-Derivate ähnlich. Vermutlich liegen somit gleiche Protonierungszustände der Spezies vor. Die Verteilungsverhältnisse der Cyclam-Propionsäure-Derivate  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$ ,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-15}$  liegen etwa bei  $\log D = -4$  (Tabelle 14). Die Verbindungen sind stark hydrophil und es befinden sich weniger als 0,01% in der organischen Phase. Die Hydrophilie ändert sich aufgrund der Gesamtladung im Molekül nicht und nimmt sogar für die vierfachfunktionalisierten Cyclam-Propionsäure- ( $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-16}$ ) und Cyclam-Essigsäure-Derivate  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-6}$  ( $\log D \sim -3$ ) ab. Vermutlich wird die negative Partialladung der Carboxylatgruppe im Molekül  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-16}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-6}$  durch verstärkt auftretende intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen

abgeschirmt. Die Zunahme der Kettenlänge von Acetat zu Propionat besitzt dabei keinen Einfluss auf die Hydrophilie des Komplexes.

Tabelle 14: Verteilungskoeffizienten  $\log D$  (aus zwei oder drei unabhängigen Versuchen) und Standardabweichungen in Octan-1-ol/Wasser der  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Cyclam-Propionsäure-Derivate **13**, **14b**, **15** und **16** und des  $^{64}\text{Cu}$ -markierten Cyclam-Essigsäure-Derivates **6** im physiologischen pH-Wert Bereich

Komplex	$\log D_{OW}$ bei pH		
	7,2	7,4	7,6
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$	-3,9	-4,0	-4,0
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$	$-4,1 \pm 0,03$	$-4,1 \pm 0,04$	$-3,9 \pm 0,1$
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-15}$	$-4,5 \pm 0,4$	$-4,5 \pm 0,3$	$-4,4 \pm 0,2$
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-16}$	$-3,1 \pm 0,3$	$-3,0 \pm 0,4$	$-3,0 \pm 0,2$
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-6}$	-3,3	-3,2	-3,3

### 3.3.3 In-vitro-Stabilitätsuntersuchungen

#### *SOD-Assay*<sup>6</sup>

Neben den Cyclam-Propionsäure-Chelatoren (**13**, **14b**, **15**, **16**) wurden zu vergleichszwecken auch die kommerziell erwerblichen Chelatoren Cyclam **3**, NOTA **4**, DOTA **5**, TETA **6** und EDTA mit Kupfer-64 markiert und hinsichtlich ihres Transchelatisierungsverhaltens in Gegenwart von SOD und humanem Serum untersucht.

Die für die Untersuchungen eingesetzte - aus humanen Erythrozyten stammende - Sod1 besteht aus zwei dimeren Untereinheiten mit je 153 Aminosäuren und einer Molmasse von je ~16,3 kDa. Jedes Dimer beinhaltet zwei Cu<sup>2+</sup>- und zwei Zn<sup>2+</sup>-Ionen.

Um den SOD-Assay durchzuführen, sind 10 nmol (Stammlösung 1 mg/ml gelöst in ention. H<sub>2</sub>O) des entsprechenden Chelators zuvor mit [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (~10 -14 MBq) in 100 µl MES/NaOH-Puffer (pH 5,5) vollständig komplexiert worden. Die Überprüfung der RCA erfolgte mittels Radio-DC (siehe Tabelle 16, S. 105). Der pH-Wert der Lösung ist mit 50 µl 1 M HEPES/NaOH-Puffer-Lösung (pH 8,0) auf ca. 7,6 eingestellt worden. Anschließend wurde 0,1 nmol (1,5 µl, ~ 100 - 140 kBq) des radiomarkierten Chelators oder freies [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (1,5 µl, ~ 100 - 140 kBq) zu einem dreifachen molaren Überschuss an Sod1, welche in 1 M HEPES/NaOH-Puffer (pH 7,8) vorlag, gegeben und bei 37°C 1 h inkubiert. Danach erfolgte eine Trennung mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Das Prinzip der nativen PAGE beruht auf der Trennung nach Ladung, Größe und Molmasse. Nachdem die Proben elektrophoretisch getrennt worden sind, ist die Aktivität der Proben bestimmt worden. Um eine quantitative Auswertung für den Grad der Transchelatisierung vornehmen zu können, wurde das Prinzip der Radioluminografie angewendet, wobei [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> als Normierungswert festgelegt und nach folgenden Gleichungen (7 - 9) berechnet worden ist.

$$X_{\text{Referenz}} = \frac{\text{Integral}}{\text{Aktivität}} \quad (7)$$

$$Y_{\text{Probe}} = \frac{\text{Integral}}{\text{Aktivität}} \quad (8)$$

$$\text{Transchelatisierung [\% von der Referenz]} = \frac{Y_{\text{Probe}}}{X_{\text{Referenz}}} \cdot 100 \quad (9)$$

<sup>6</sup> Der SOD-Assay wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kristof Zarschler (Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung, HZDR) ausgearbeitet und durchgeführt.

Mit Hilfe der AIDA Software (Raytest) sind die unterschiedlichen Schwärzungsgrade integriert und durch die eingesetzte Aktivität dividiert worden. Die Transchelatisierung ist definiert als das Verhältnis aus  $Y_{\text{Probe}}$  und  $X_{\text{Referenz}}$ .

Um den Proteinnachweis zu erbringen, ist zum Schluss das Gel mittels Coomassie-Brillant-Blau G-250 angefärbt worden.

In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der Transchelatisierungen in SOD dargestellt. Für die mit Kupfer-64 markierten Cyclam-Propionsäure-Derivate wurde mit Erhöhung des Substitutionsmusters eine Zunahme der Transchelatisierung in Gegenwart von einem dreifachen Überschuss an SOD beobachtet. Nach der nativen elektrophoretischen Trennung ist für die Derivate  $^{64}\text{Cu}$ -**13** und  $^{64}\text{Cu}$ -**14b** ein  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-SOD Anteil von  $\sim 3\%$  ermittelt worden. Demgegenüber stieg der  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-SOD Anteil der radiomarkierten Komplexe des tris-*N*-funktionalisierten **15** und tetra-*N*-funktionalisierten **16** Cyclam-Propionsäure-Derivates auf 36 und 44% an. Demnach ist nach 1 h Inkubation in SOD ca. ein Drittel bzw. die Hälfte der Kupfer-64 markierten Verbindungen **15** bzw. **16** transchelatisiert. Die kinetische Stabilität nimmt mit zunehmenden Substitutionsgrad ab. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den bereits ermittelten Daten zur Säure-assoziierten Dissoziation (siehe Kapitel 3.2.6) und unterstreichen, dass zusätzliche Propionsäure-Substituenten am Cyclam-Grundgerüst die kinetische Stabilität verringern. Alle kommerziell erhältlichen  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-Chelate, mit Ausnahme von  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-EDTA, wiesen eine Stunde nach Inkubation eine geringe Transchelatisierung in Gegenwart von SOD auf. Ähnliche Stabilitäten besaßen die Komplexe  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**13** und  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**14b**.

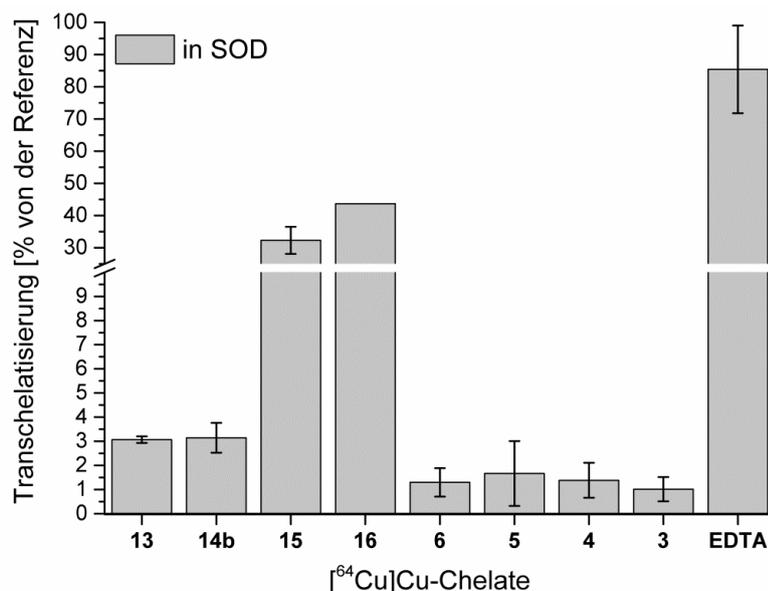


Abbildung 46: Kupfer-64 Transchelatisierung [%] ausgewählter  $^{64}\text{Cu}$ -Chelate in SOD aus den entsprechenden  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-Komplexen (MW  $\pm$  SD, n = 3, Ausnahme  $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**16**: n = 1)

### *Serum-Assay*<sup>7</sup>

Für den Serum-Assay wurde ein humanes Serumaliquot („Off the Clot“, Biochrom AG) verwendet. Die verbleibenden 9 nmol (135  $\mu$ l,  $\sim$  9 MBq) des radiomarkierten Chelators aus dem oben beschriebenen SOD-Ansatz sind in 265  $\mu$ l verdünnten humanem Serum (1 M HEPES/NaOH-Puffer-Lösung, pH 7,4) für 1 h bei 37°C inkubiert worden. Anschließend wurde die gesamte Reaktionslösung (400  $\mu$ l) mit zweimal Laemmli-Probenpuffer gemischt und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) getrennt. Die partielle Denaturierung der Serumproteine durch Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt bei der SDS-PAGE eine schärfere Bandenbildung und verhindert dabei die Aggregation der Proteine. Um eine quantitative Auswertung für den Serum-Assay vornehmen zu können, ist [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> als Normierungswert festgelegt und nach Gleichungen 7 – 9 berechnet worden. Die Gesamtaktivität der einzelnen Proben wurde vor der elektrophoretischen Trennung gemessen. Das Anfärben des Gels erfolgte auch in diesem Versuch mittels Coomassie-Brillant-Blau G-250.

Im Gegensatz zum SOD-Assay ist bei dem Versuch in humanem Serum eine SDS-PAGE zum Einsatz gekommen, um alle auftretenden koordinativen Bindungen zu unterdrücken bzw. aufzubrechen. Die Maskierung mit dem anionischen Detergens SDS verhindert die Agglomeration von Proteinen und bewirkt außerdem eine Trennung nach Molmasse. Es ist eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 66 kDa detektiert worden. Diese Bande wurde dem abundanten Albumin ( $\sim$ 710  $\mu$ M [62]) zugeordnet. Bei der Bindung von Kupfer(II)-Ionen spielen vor allem kinetische Aspekte eine entscheidende Rolle, da Albumin in sehr hoher Konzentration im Blutplasma vorkommt. Es besteht aus ca. 585 Aminosäuren, die über mehrere Disulfidbrückenbindungen untereinander stabilisiert werden. Bradshaw *et al.* [120] zeigten, dass eine Kupfer(II)-Bindung von den ersten drei Aminosäuren (Asp-Ala-His) ausgeht. An dieser Bindung sind wahrscheinlich die  $\alpha$ -Aminogruppe des Aspartatrestes, die zwei Amidfunktionen und die Imidazolylfunktion des Histidylrestes beteiligt. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der Transchelatisierung in humanem Serum dargestellt. Vermutlich handelt es sich hierbei um Transchelatisierungen und nicht um <sup>64</sup>Cu-Chelat-Protein-Wechselwirkungen, da die Funktion von Albumin in erster Linie mit der reversiblen Kupferaufnahme und –abgabe zusammen hängt. Lau *et al.* [63] untersuchten spektroskopisch die Koordination von humanem Albumin in Gegenwart eines Kupfer(II)-Histidin-Komplexes. Unter physiologischen Bedingungen sind drei Spezies ermittelt worden, welche dem

---

<sup>7</sup> Der Serum-Assay wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Kristof Zarschler (Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung, HZDR) ausgearbeitet und durchgeführt.

Kupfer(II)-Histidin-Komplex, dem Kupfer(II)-Albumin-Komplex und einen ternären intermediären Komplex (Albumin-Kupfer(II)-Histidin-Komplex) zugeordnet wurden. Es kommt zur schrittweisen Übertragung des Kupfer(II)-Ions. Das Auftreten der zusätzlichen Bande des Kupfer(II)-Albumin-Komplexes ist ein Beweis für eine Transchelatisierung, andernfalls würde diese Bande gar nicht existieren. Zudem ist eine Vielzahl von Thiolgruppen in humanem Albumin vorhanden, die das Kupfer(II)-Ion zu Kupfer(I) reduzieren bzw.  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-S}$ -Komplexe bilden können.

Die radiomarkierten Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure Komplexe zeigten nach 1 h Inkubation eine hohe Transchelatisierungsrate in Anwesenheit von humanem Serum (Abbildung 47). Eine Ausnahme bildete  $^{64}\text{Cu}$ Cu-**14b** mit  $4 \pm 1\%$ . Selbst für den vielversprechenden Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure Komplex  $^{64}\text{Cu}$ Cu-**13** wurde eine Transchelatisierung von ca. 10% ermittelt. Vergleicht man die Ergebnisse in humanem Serum mit den kommerziell erwerblichen Liganden, ist die Stabilität der radiomarkierten Cyclam-Propionsäure-Liganden deutlich geringer. Das mit  $^{64}\text{Cu}$ -markierte **14b** zeigte die höchste Stabilität der Cyclam-Propionsäure-Derivate und wies ähnliche Werte, wie die  $^{64}\text{Cu}$ Cu-Chelate NOTA **4**, DOTA **5** und TETA **6** auf.

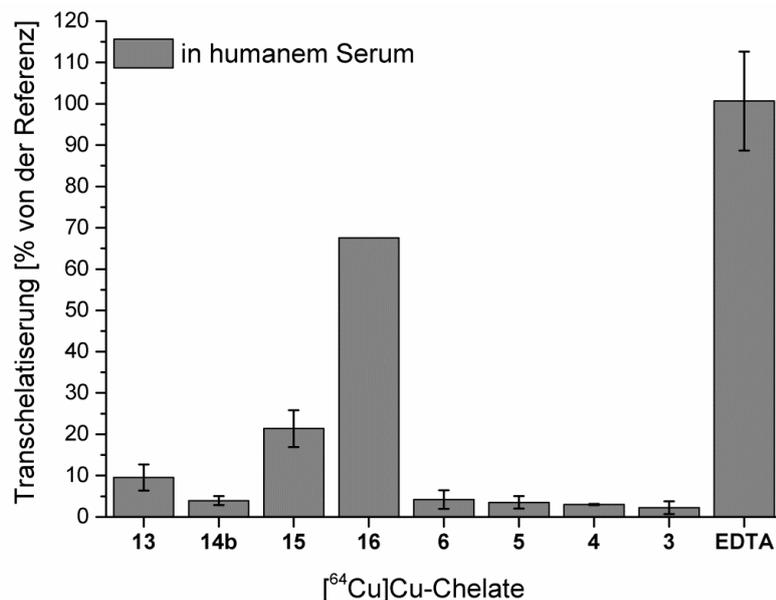


Abbildung 47: Kupfer-64 Transchelatisierung [%] ausgewählter  $^{64}\text{Cu}$ -Chelate in humanem Serum aus den entsprechenden  $^{64}\text{Cu}$ Cu-Komplexen (MW  $\pm$  SD, n = 3, Ausnahme  $^{64}\text{Cu}$ Cu-**16**: n = 1).

### 3.3.4 Bioverteilungen<sup>8</sup>

Transportproteine wie Albumin,  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Caeruloplasmin beeinflussen offensichtlich die Bioverteilung von Radiokupferkomplexen maßgeblich. Damit können Aussagen zur Serumstabilität von Radiotracern zur Vorhersage der Bioverteilung herangezogen werden. Aufgrund der Komplexizität der Prozesse, die die Bioverteilung beeinflussen, sind allerdings eine Reihe weiterer Parameter, wie Hydrophilie, Ladung, Polarisierbarkeit und Proteinbindung der Komplexe, notwendig, um eine Interpretation vornehmen zu können.

Von den Verbindungen [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**14b** und [<sup>64</sup>Cu]Cu-**16** sind Bioverteilungen in 7 - 8 Wochen alten Wistar-Ratten (130 - 170 g) durchgeführt worden. Für Vergleichszwecke wurde auch der kommerziell erwerbliche Chelator TETA **6** mit Kupfer-64 markiert und unter denselben Bedingungen injiziert. Die Bioverteilungsstudien geben Auskunft zur Stabilität *in vivo* und werden zur Bewertung der Eignung von <sup>64</sup>Cu-Chelaten herangezogen.

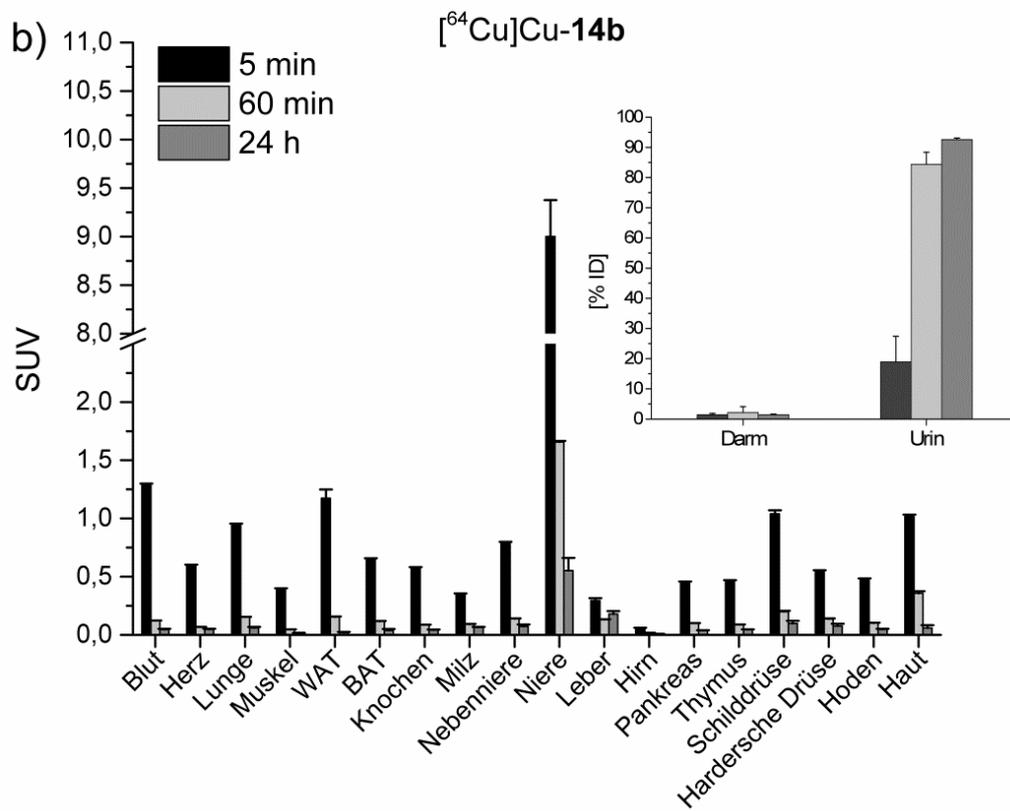
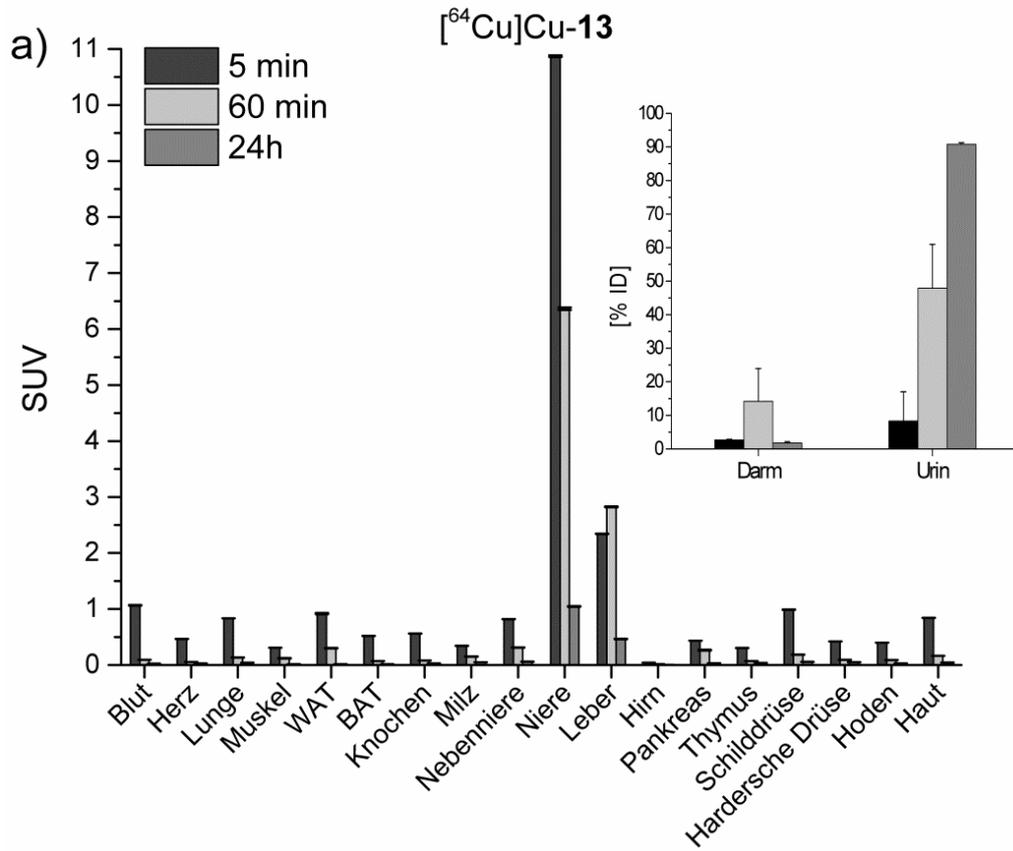
In Abbildung 48 sind die akkumulierten Aktivitäten in den entsprechenden Organen und Geweben als standardisierter Aufnahmewert [SUV<sup>9</sup>] der oben genannten Verbindungen angegeben. Die radiomarkierten Verbindungen (je 1 MBq, RCA >95%) wurden den anästhesierten Tieren intravenös injiziert und nach 5 min, 60 min und 24 h die Organe entnommen und deren Aktivität bestimmt.

Die mit Kupfer-64 markierten Propionsäure Cyclam Komplexe zeigten *in vivo* ein sehr unterschiedliches Verhalten. [<sup>64</sup>Cu]Cu-**14b** wurde schneller über die Niere vom Organismus ausgeschieden als [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13** und [<sup>64</sup>Cu]Cu-**16**. Nach 60 min sind  $84 \pm 4\%$  der injizierten Dosis über den Urin ausgeschieden worden, wohingegen es nur  $48 \pm 13\%$  bei [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13** und  $5 \pm 3\%$  bei [<sup>64</sup>Cu]Cu-TETP waren. Ein signifikanter Anteil der injizierten Aktivität von [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13** und [<sup>64</sup>Cu]Cu-**16** wurde in der Leber, der Ort an dem die Kupferhomöostase gesteuert wird, gemessen. Nach 60 min wurde ein SUV in der Leber von  $2,1 \pm 0,1$  für [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13** ermittelt, für den vierfach funktionalisierten Cyclam-Propionsäure-Komplex [<sup>64</sup>Cu]Cu-**16** hingegen war dieser Wert mehr als doppelt so hoch. Selbst nach 24 h lag dieser Wert noch bei ca. zwei. Diese Daten korrelieren mit den bereits diskutierten Ergebnissen zur kinetischen Stabilität der Kupfer(II)-Komplexe (siehe Kapitel 3.2.6 und Kapitel 3.3.3).

<sup>8</sup> Die Bioverteilungen wurden unter der Leitung von Prof. Dr. J. Pietzsch angefertigt.

<sup>9</sup> 
$$\text{SUV} = \frac{\text{injizierte Aktivität [\%]} \cdot \text{Tiergewicht [g]}}{\text{Probengewicht [g]} \cdot 100 \%}$$

Bei allen untersuchten Methoden wies stets der vierfach funktionalisierte Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure-Komplex die geringste Stabilität auf. Insgesamt ergeben sich für die  $^{64}\text{Cu}$ -markierte Cyclam-Dipropionsäure **14b** eine sehr schnelle renale Ausscheidung und nahezu keine Akkumulation in der Leber. Dieses Verhalten ist vergleichbar mit dem  $^{64}\text{Cu}$ -markierten TETA-Komplex. Die Ergebnisse zur Bioverteilung korrelieren mit der Stabilitätsuntersuchung in Anwesenheit von SOD bzw. Serumproteinen.



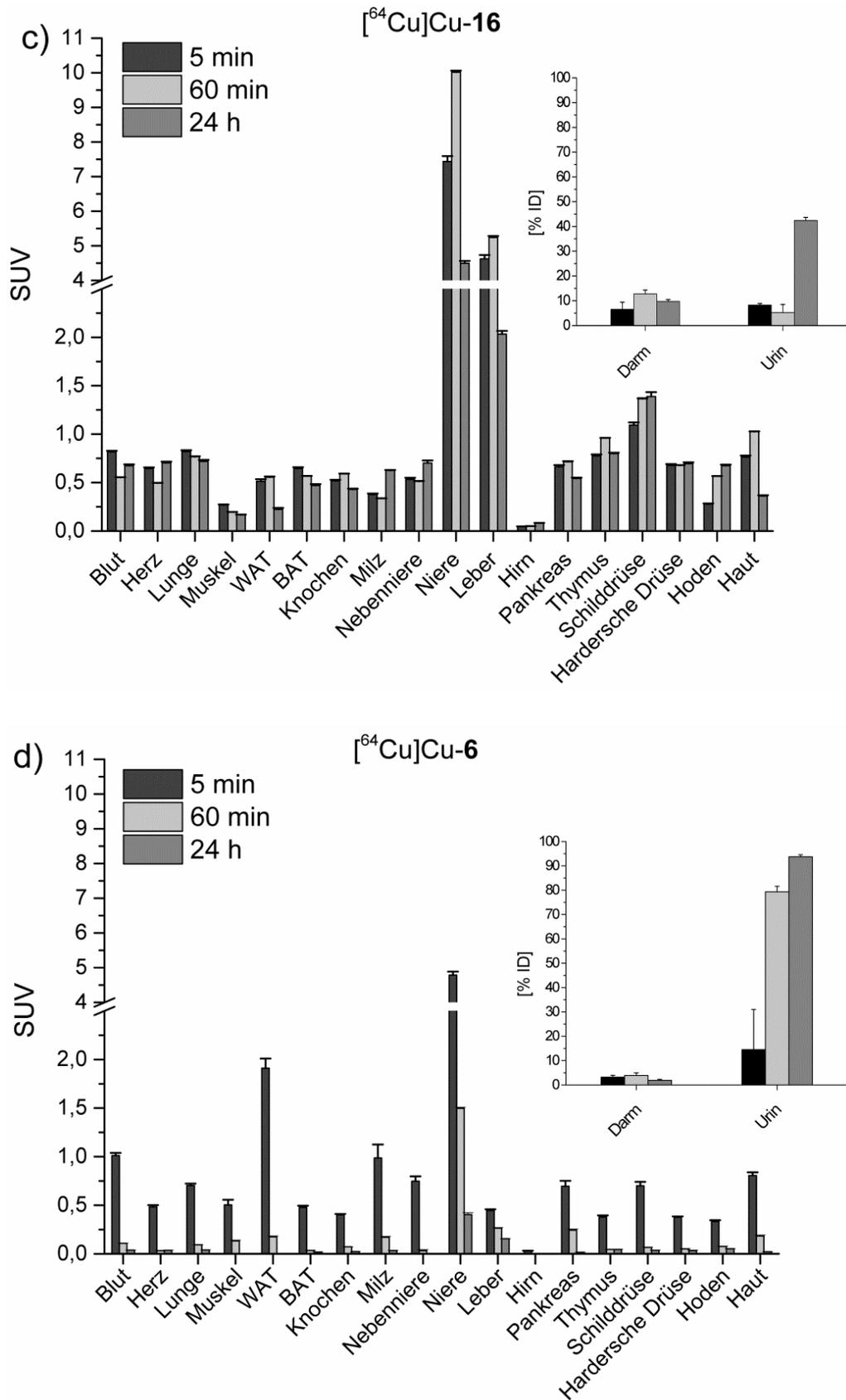


Abbildung 48: Bioverteilungen [SUV] in männlichen Wistar Ratten von a)  $^{64}\text{Cu}$ Cu-13, b)  $^{64}\text{Cu}$ Cu-14b, c)  $^{64}\text{Cu}$ Cu-16 und von d)  $^{64}\text{Cu}$ Cu-6 nach 5 min, 60 min und 24 h

### 3.4 Funktionalisierung ausgewählter Cyclam-Propionsäure-Derivate mit Vektormolekülen und deren Radiomarkierung

Die kovalente Bindung von rezeptorspezifischen Peptiden an ausgewählten Cyclam-Propionsäure-Derivate ermöglicht eine spezifische Anreicherung an der jeweiligen Zielstruktur. Als geeignete Chelatoren sind das mono-*N*- und das *trans*-di-*N,N'*-funktionalisierte Cyclam-Propionsäure-Derivat (**13** und **14b**) ausgewählt worden. Diese bieten nicht nur die Möglichkeit, mehrere zielsuchende Einheiten am selben Moleküllern einzuführen, sondern besitzen zudem auch die höchste kinetische Stabilität (siehe Kapitel 3.2.6, 3.3.3 und 3.3.4). Als zielsuchende Einheiten kamen die als EGFR-spezifisch beschriebenen Peptide D4 **29** und GE11 **30** zum Einsatz. Bei der Ausarbeitung einer geeigneten Synthesestrategie wurde sich zunächst auf ein Modellpeptid konzentriert. Dieses Modellpeptid besteht aus den ersten beiden Aminosäuren des D4 **29** und wird im Folgenden als H-(L)-Leu-(L)-Ala-OH **29a** bezeichnet. Die Funktionalisierung sollte zunächst am Chelator Cyclam-Monopropionsäure **13** erfolgen. In Anlehnung an die Synthesevorschrift nach Röhrich *et al.* [25], ist eine 4-Stufensynthese mit Schutzgruppenstrategie ausgearbeitet worden (Abbildung 49).

#### 3.4.1 Synthese, Radiomarkierung und Charakterisierung der Modellspezies **40**

##### *Synthese*

Es erfolgte im ersten Schritt die Funktionalisierung des Modellpeptides H-Leu-Ala-OH **29a** nach Iwakura *et al.* [121] mit 1,8 Äq. Acrylsäurechlorid in 1 M NaOH bei 0°C. Bei der portionierten Zugabe des Acrylsäurechlorids wurde stets der pH-Wert überprüft. Die Abspaltung der Abgangsgruppe setzt HCl frei, was eine Protonierung der Aminfunktionen zur Folge hatte. Mittels semipräparativer HPLC (Methode 3) ist es gelungen, das Produkt **37** ( $t_R = 15,2$  min) vollständig vom Edukt H-Leu-Ala-OH **29a** ( $t_R = 4,6$  min) zu trennen. Die Ausbeute lag ausgehend von Verbindung **29a** bei 40% (siehe Kapitel 5.4, S.119).

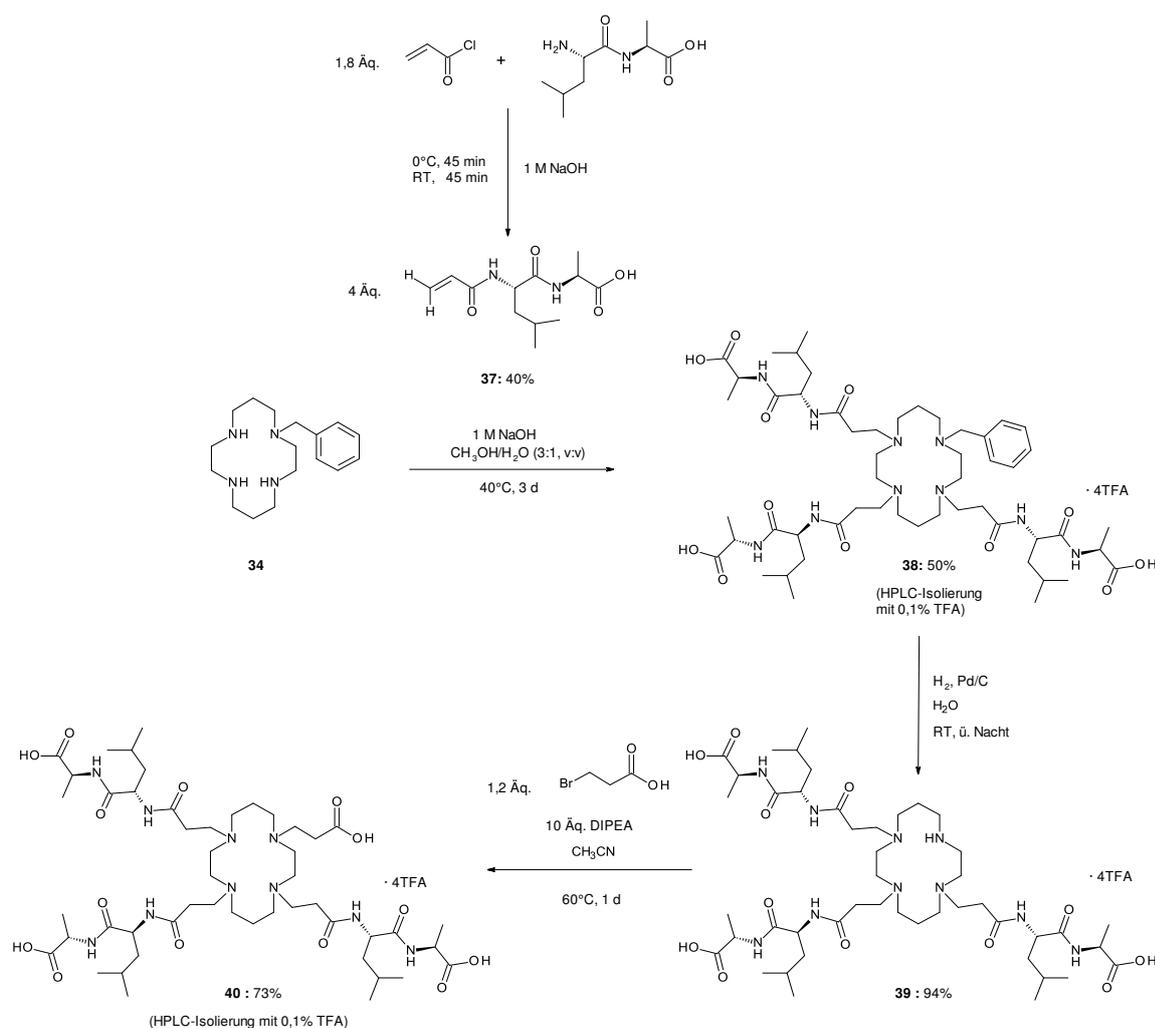


Abbildung 49: Syntheschema zur Darstellung von TE1P(Leu-Ala-OH)<sub>3</sub> **40**

Eine direkte Umsetzung mit **13** unter stark basischen Bedingungen ( $\text{pH} \leq 10$ ) führte zu einer Lactambildung von der freien Carboxylgruppe und einer sekundären Aminfunktion der Verbindung **13**, weswegen die benzylgeschützte Cyclam-Verbindung als Edukt eingesetzt worden ist. In einer nachfolgenden Additionsreaktion wurde unter basischen Bedingungen ein Überschuss an Acryl-(L)-Leu-(L)-Ala-OH **37** mit *N*-Benzylcyclam **34** für drei Tage bei 40°C umgesetzt. Die DC-Methode 7 diente dabei als Umsatzkontrolle. Das Produkt wies einen  $R_f$ -Wert von 0,72 auf. Eine semipräparative HPLC Reinigung lieferte Produkt **38** in 50% Ausbeute. Die Abspaltung der Benzylschutzgruppe unter Wasserstoffatmosphäre lieferte Produkt **39** in nahezu quantitativen Ausbeuten (94%).

In der letzten Synthesestufe wurde **39** mit 1,2 Äq. 3-Brompropionsäure versetzt. Die nucleophile Substitutionsreaktion fand im aprotischen Lösungsmittel (Acetonitril) in Anwesenheit von DIPEA bei 60°C statt. Nach semipräparativer HPLC Reinigung wurde das Produkt TE1P(Leu-Ala-OH)<sub>3</sub> **40** als Tetra(trifluoracetat) isoliert. Alle Produkte sind

massenspektrometrisch (Abbildung 50) untersucht und durch NMR oder Elementaranalyse eindeutig charakterisiert worden (siehe Kapitel 5.4, S.121).

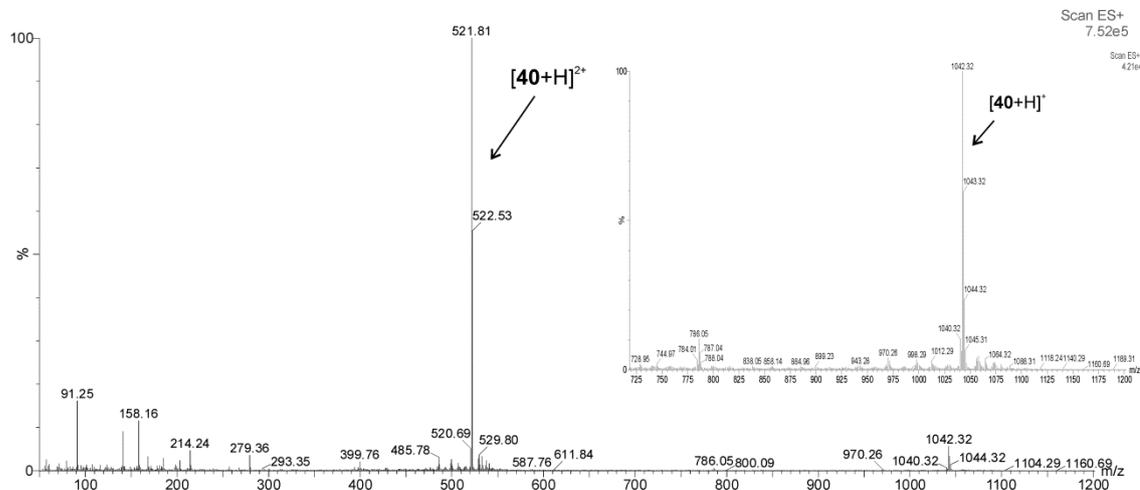


Abbildung 50: ESI-MS Spektrum (positiver Modus) der Modellverbindung **40** (LM: H<sub>2</sub>O)

### Radiomarkierung

Mit dem Konjugat **40** sind erste Markierungsstudien mit Kupfer-64 durchgeführt worden, um einen möglichen Einfluss der zusätzlichen Gruppen am TE1P-Derivat hinsichtlich der radiochemischen und metabolischen Stabilität zu überprüfen. Diese Ergebnisse sind mit denen des nicht-funktionalisierten Chelators **13** verglichen worden. Die Bestimmung der radiochemischen Reinheit und Ausbeute erfolgte mittels Radio-DC und Radio-HPLC. Als geeignete Radio-DC Methode (Methode 6) wurde neutrales Aluminiumoxid mit dem Eluenten 2 M NH<sub>4</sub>OAc/MeOH (1:1, v:v) pH 6,0 verwendet. Das mit Kupfer-64 markierte Konjugat  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-40}$  weist einen Retentionsfaktor von 0,7 auf, wohingegen  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  am Start verbleibt. Bei der verwendeten Radio-HPLC Methode 6 besitzt das  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-40}$  eine Retentionszeit von 16,2 min, wohingegen  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  nach 2,8 min eluiert wird (Abbildung 51). Eine vollständige Komplexierung von 10 µg **40** mit ~ 5 MBq  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  ist nach 75 min bei 50°C in einem Gesamtvolumen von 200 µl 0,1 M MES/NaOH-Puffer (pH 5,5) erzielt worden. Nach 24 h wurde überprüft, ob das Konjugat  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-40}$  sich unter den Reaktionsbedingungen verändert hat. Es sind keine radioaktiv markierten Zerfallsprodukte mit freiem Kupfer-64 beobachtet worden.

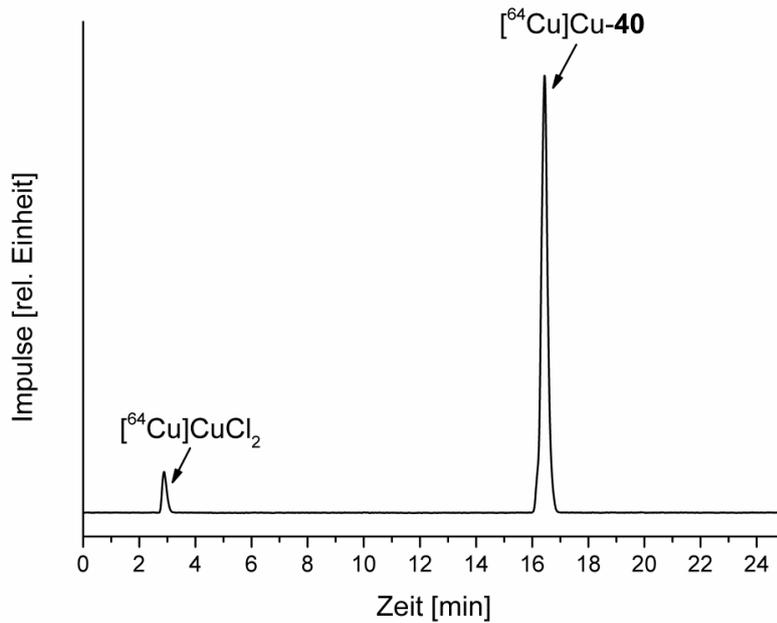


Abbildung 51: Radio-Chromatogramm von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-40}$

### Metabolische Stabilität

Um die metabolische Stabilität *in vitro* zu überprüfen, sind Stabilitätsstudien in humanem Plasma durchgeführt worden. Es wurden zunächst 10  $\mu\text{g}$  des Konjugats **40** (Stammlösung 1 mg/ml gelöst in 0,1 M MES/NaOH-Puffer pH 5,5) mit 20 MBq  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  in 200  $\mu\text{l}$  0,1 M MES/NaOH-Puffer (pH 5,5) vollständig komplexiert. Nach 90 min Schütteln bei 50°C erfolgte die Überprüfung mittels Radio-DC und Radio-HPLC. Das  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-40}$  wies RCA von über 99% auf. Dieser Komplex  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-40}$  wurde in 250  $\mu\text{l}$  1 M Phosphat-Puffer nach Sørensen überführt (pH 7,4) und anschließend 250  $\mu\text{l}$  humanes Plasma dazugegeben. Die Lösung ist bei 37°C inkubiert worden. Nach 1, 2 und 22 h wurden Radio-DC Kontrollen durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Stabilität des Komplexes zu ziehen (Abbildung 52).

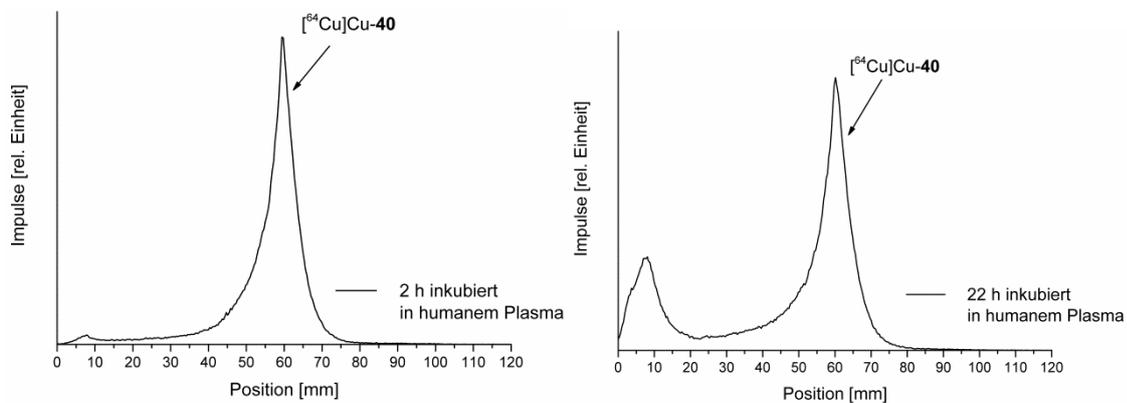


Abbildung 52: Radio-DC von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-40}$  in humanem Plasma nach 2 und 22 h Inkubation bei 37°C

Die Radio-DC-Auswertung (Methode 6) ergab, dass nach 1 und 2 h das Konjugat [<sup>64</sup>Cu]Cu-**40** fast unverändert vorlag, während nach 22 h ein intensiverer Spot ( $R_f = 0$ ) detektiert worden ist (Abbildung 52). Dieser Spot ist vermutlich auf extrazelluläre Proteine im Plasma (Humanalbumin, Caeruloplasmin, etc.) zurückzuführen. Die RCA von [<sup>64</sup>Cu]Cu-**40** betrug nach 22 h ca. 94%. Aus diesen Ergebnissen kann eine hohe Stabilität in humanem Plasma abgeleitet werden.

Vergleicht man das Konjugat [<sup>64</sup>Cu]Cu-**40** mit [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13** sind ähnlich hohe In-vitro-Stabilitäten gefunden worden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Stabilität des <sup>64</sup>Cu-Komplexes mit **13** durch die Peptidbindung nicht beeinflusst wird. Des Weiteren verläuft die Komplexbildung des Peptidkonjugates mit Kupfer-64 unter denselben Bedingungen schneller als bei dem nicht-funktionalisierten Chelator **13**. Das ist interessant, da zwar die gleiche Menge an Konjugat bzw. Chelator eingesetzt worden ist, aber die eingesetzte Stoffmenge an Chelator dreimal höher war als beim Konjugat **40** (20 nmol vs. 6 nmol).

### 3.4.2 Synthese, Radiomarkierung und Charakterisierung des mit EGFR-spezifischen Peptiden funktionalisierten Chelators **13**

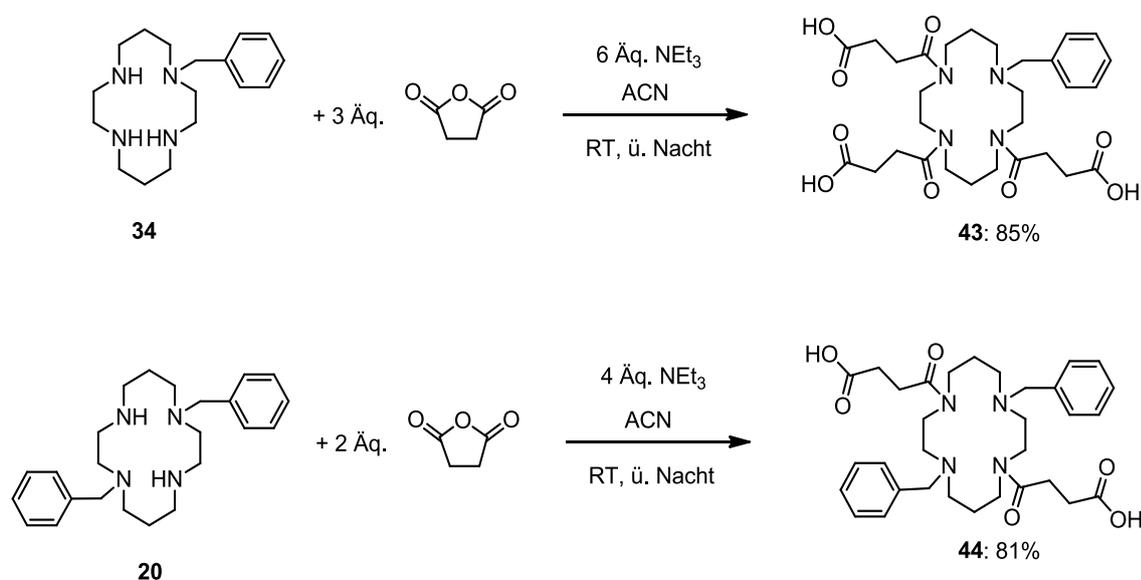
#### *Synthese: Variante A*

Die erarbeitete Synthesestrategie wurde anschließend auf das Peptid D4 **29** angewendet. Auch hier erfolgte zunächst wie oben beschrieben die Umsetzung von D4 **29** mit einem Überschuss an Acrylsäurechlorid. Das Acrylamid-D4-OH **41** wurde nach semipräparativer HPLC Reinigung (Methode 4) mit einer Ausbeute von 27% synthetisiert. Die Additionsreaktion von *N*-Benzylcyclam **34** mit vier Äquivalenten Acrylamid-D4-OH **41** in 1 M NaOH (pH 10) führte nicht zum gewünschten Produkt. Nach zehn Tagen Rühren bei 40°C, wurde das Reaktionsgemisch unter Vakuum eingeeengt und mittels analytischer HPLC und ESI-MS untersucht. Die analytische HPLC ergab, dass ausschließlich das Edukt *N*-Benzylcyclam **34** von der Säule eluiert wurde, wohingegen das Acrylamid-D4-OH **41** ( $t_R = 16,6$  min) nicht mehr nachzuweisen war. Auch die massenspektrometrische Untersuchung zeigte lediglich einen Peak der protonierten Substanz ( $m/z = 291,5$  [M+H]<sup>+</sup>) von *N*-Benzylcyclam **34**. Demzufolge findet unter den Bedingungen eine Hydrolyse des Peptides statt.

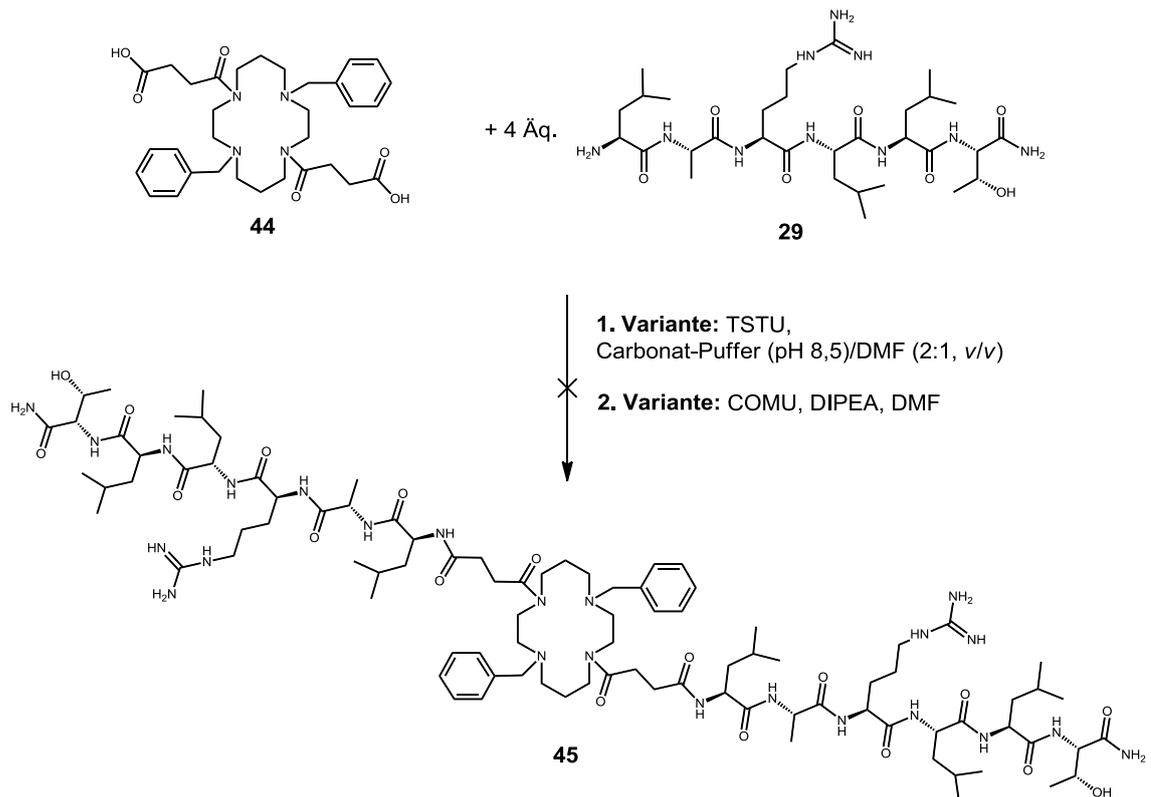
Daher wurde die Synthese in einem Gemisch aus DMF/H<sub>2</sub>O (10:1, v:v) mit einem Überschuss von DIPEA bei 50°C durchgeführt. Die anschließende semipräparative HPLC Reinigung nach zehn Tagen (Methode 4) ergab, dass sehr wenig Produkt ( $\eta \sim 5\%$ ) entstanden ist. Deshalb wurde diese Synthesestrategie nicht weiter verfolgt.

## Variante B

Die direkte Funktionalisierung an den sekundären Aminfunktionen des Makrocyclus ist oft nur unter sehr basischen Bedingungen möglich und erschwert daher die Funktionalisierung mit Peptiden. Aus diesem Grund wurden die sekundären Stickstoffatome mit einem Linker versehen, der wiederum eine Carbonsäure-Funktion trägt. Durch Aktivierung der Carbonsäure mittels Kupplungsreagenzien (COMU, TSTU, HATU) sollte eine Verknüpfung des Peptids **29-NH<sub>2</sub>** gewährleistet werden. Das in ACN gelöste *N*-Benzylcyclclam **34** wurde mit einem Überschuss an Bernsteinsäureanhydrid versetzt. Nach 21 h Rühren bei RT, wurde das Produkt **43** ohne Reinigung quantitativ erhalten (Abbildung 53). Die Synthese des dibenzylgeschützten Cyclambernsteinsäure-Derivats **44** ist analog in sehr guten Ausbeuten hergestellt worden. Die Charakterisierung mittels NMR und ESI-MS bestätigen dies (siehe Kapitel 5.4, S.123 und 124).

Abbildung 53: Darstellung von **43** und **44**

Für die Aktivierung der Carbonsäuren von **44** wurden verschiedene Kupplungsreagenzien ausgewählt. Zum einen wurde das Kupplungsreagenz TSTU und zum anderen COMU verwendet. Trotz Änderungen hinsichtlich der Base, der Lösungsmittel und der Temperatur, war es nicht möglich, das Produkt **45** zu synthetisieren (Abbildung 54).

Abbildung 54: Syntheschema von **45**

Deswegen wurde die Synthese mit dem käuflich erworbenen Peptid GGG-GE11 **30a** durchgeführt. Die biologisch aktive Sequenz dieses Peptides trägt zusätzlich drei Glycyl-Reste am N-Terminus. Um das trifunktionalisierte GE11-TE1P-Konjugat **47** herzustellen, ist auch hier eine Schutzgruppenstrategie gewählt worden (Abbildung 55). Wie in Abbildung 53 bereits beschrieben, sind zuerst die Bernsteinsäure-Linker am *N*-Benzylcyclam **34** eingeführt worden. Die Carbonsäuregruppen von Verbindung **43** sind durch die Zugabe des Kupplungsreagens HATU in wasserfreien DMF aktiviert worden. Nach 10 min Schütteln bei 35°C sind zu dem *in situ* gebildeten Benzotriazolaktivester das in 0,2 ml wasserfreien DMF gelöste Peptid **30a** (drei Äquivalente) und ein Überschuss an DIPEA zugesetzt worden. Nach 16 – 20 h Schütteln bei 35°C wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Eine semipräparative HPLC-Reinigung (Methode 7) lieferte Produkt **46** mit einer Retentionszeit von 16,1 min in moderaten Ausbeuten (43%). Aufgrund des sauren Elutionsmittels ist davon auszugehen, dass das Produkt **46** als Tetra(trifluoracetat) vorlag. Mittels MALDI-TOF-MS wurde das Produkt charakterisiert (siehe Kapitel 5.4, S.125).



15,6 min isoliert worden. Die Charakterisierung fand mittels MALDI-TOF-MS (Abbildung Anhang 9, S. XXIV) statt. Die Ausbeute betrug ausgehend von der letzten Stufe 50% (siehe Kapitel 5.4, S.126).

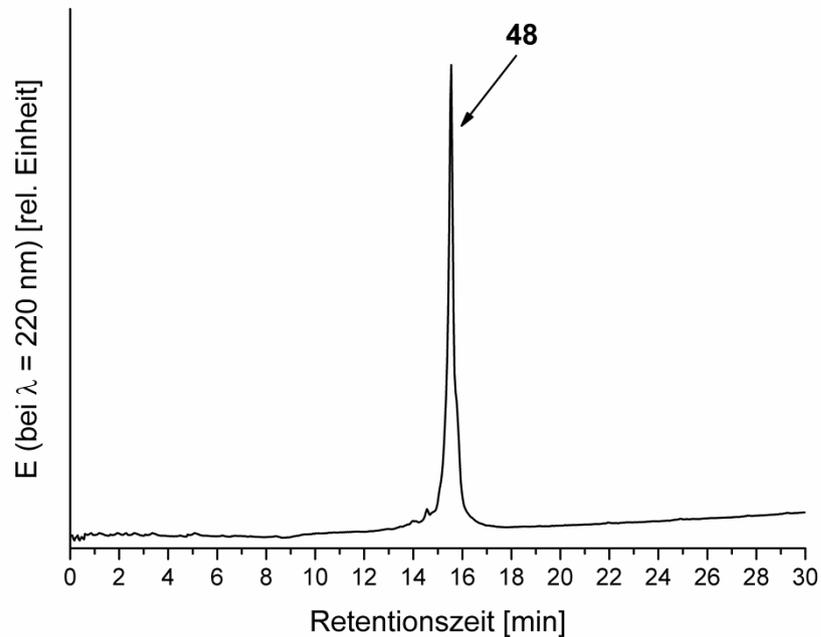


Abbildung 56: HPLC Chromatogramm von TE1P(GGG-GE11-OH)<sub>3</sub> **48**

### 3.5 Rezeptorbindungsnachweis und Rezeptoraffinität<sup>10</sup>

Bindungsstudien des Peptidkonjugates **48** an den EGF-Rezeptor sind mittels Immunpräzipitation in drei Zelllinien (MDA-MB-435S, FaDu, A431) durchgeführt worden. Die Zelllinie MDA-MB-435S ist EGFR-negativ, wohingegen FaDu ca.  $10^5$  EGFR/Zelle und A431 ca.  $10^6$  EGFR/Zelle auf der Oberfläche präsentieren [122, 123]. Zunächst erfolgte die Markierung des Konjugats **48** mit ca. 50 MBq Kupfer-64 bei 50°C über Nacht. Die RCA betrug über 95% (DC-Methode 3).

Der Bindungsansatz wurde mit 1 mg/ml Zelllysat der jeweiligen Zelllinie und 100  $\mu\text{g/ml}$  [<sup>64</sup>Cu]Cu-**48** für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation mit EGFR-Antikörpern, welche an magnetische Beads funktionalisiert sind, bei 4°C für 4 h. Nach der Separation mittels eines Dauermagneten und mehrmaligem Waschen mit PBS-Puffer wurde die Probe mittels SDS-PAGE getrennt. Die Detektion erfolgte durch Radioluminografie.

Um den EGFR nachzuweisen, wurde ein Western-Blot („Semi-Dry“) bei 4°C über Nacht

<sup>10</sup> Der Rezeptorbindungsnachweis und die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden von Dr. Katrin Viehweger (Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung, HZDR) durchgeführt.

durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz. In Abbildung 57 sind die Radioluminografie (A) und der Western-Blot (B) in den jeweiligen Zelllinien dargestellt. Sowohl die Radioluminografie als auch der Western-Blot zeigen in der FaDu und in der A431-Zelllinie eine Bande bei ca 170 kDa, die der Bindung des Konjugats [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**48** an den EGFR entspricht. Erwartungsgemäß wurde in der EGFR-negativen Zelllinie MDA-MB-435S weder in der Radioluminografie noch im Western-Blot ein Signal detektiert.

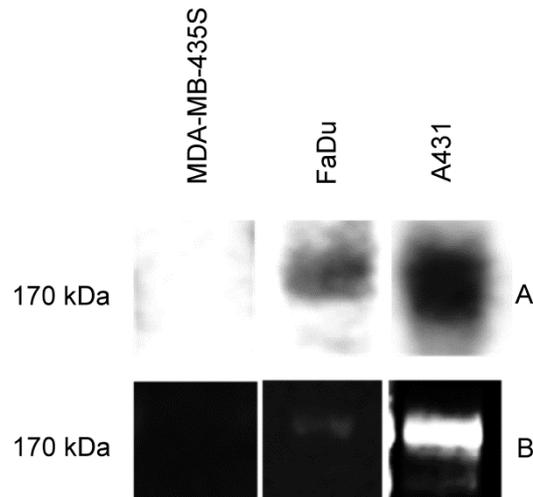


Abbildung 57: Immunpräzipitation von [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**48** an EGFR mit immobilisiertem EGFR Antikörper, A) Radioluminografie des Polyacrylamid-Gels und B) Western Blot, Detektion mittels Chemolumineszenz

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität an EGF-Rezeptoren wurden In-vitro-Studien mit dem Kupfer-64-markierten TE1P(GGG-GE11-OH)<sub>3</sub> Konjugat [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**48** in drei Zelllinien durchgeführt. Zur Bewertung der Rezeptoraffinität wurde die Dissoziationskonstante  $K_d$  bestimmt. Dazu sind unterschiedliche Konzentrationen an radiomarkiertem Peptidkonjugat **48** für 30 min bei 37°C mit Zellpellets der jeweiligen Zelllinie inkubiert worden. Danach wurde ungebundenes Konjugat abgetrennt und die entsprechende Aktivität an den Zellen im  $\gamma$ -Counter bestimmt. Aus der Auftragung mittels Scatchard-Plot wurde ein  $K_d$ -Wert im unteren nanomolaren Bereich mit beiden EGFR-positiven Zelllinien ermittelt (Tabelle 15). Diese ersten Ergebnisse sprechen für eine hohe Affinität zum EGF-Rezeptor. Allerdings sind diese Untersuchungen in serumfreien In-vitro-Experimenten durchgeführt worden und müssen im serumhaltigen Milieu bestätigt werden. Im Serum sind natürlich vorkommende EGFR-Liganden wie z. B. EGF oder TGF- $\alpha$  vorhanden, die in Konkurrenzreaktionen zum Konjugat **48** stehen. Diese Liganden weisen eine hohe Affinität zum Rezeptor ( $K_d^{\text{EGF}} = 0,6 \text{ nM}$  bzw.

---

$K_d^{\text{TGF-}\alpha} = 9,2 \text{ nM}$  [124]) auf. Das könnte eine Blockierung des Rezeptors durch natürlich vorkommende Liganden verursachen, wodurch Bindungsaffinität und -spezifität beeinflusst werden.

Tabelle 15: Dissoziationskonstante  $K_d$  (MW,  $n = 2$ ) des Konjugats [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-48 zum EGF-Rezeptor in drei verschiedenen Zelllinien

---

Zelllinien /	MDA-MB-435S	FaDu	A341
$K_d$ [nM]	n. d	$11 \pm (5)$	$5 \pm (3)$

---

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Interesse an Radiokupfer-Cyclam-Komplexen führte vor allem in den letzten Jahren zu einer Aufschwung in der Entwicklung von bifunktionellen Chelatoren. Der Azamakrocyclus Cyclam **3** bildet mit Kupfer(II)-Ionen Komplexe ( $\log K = 27,2$ ) hoher thermodynamischer Stabilität [15]. Zudem weist dieser Funktionalisierungsmöglichkeiten auf, um pharmakologisch relevante Moleküle wie beispielsweise Peptide oder Proteine (Antikörper oder Antikörperfragmente) kovalent zu binden.

Trotz intensiver Forschungsarbeit ist das Problem einer hinreichenden In-vivo-Stabilität nicht gelöst. Die Ursache für die kinetische Labilität *in vivo* ist noch nicht vollständig verstanden und ist bisher nur an Cyclam-Essigsäure-Derivaten - insbesondere am 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure (TETA) - diskutiert worden. Demgegenüber sind Cyclam-Propionsäure-Derivate synthetisch wenig erschlossen. Bisher gibt es zu diesen Verbindungen keine in der Literatur beschriebenen Ergebnisse von (Radio)kupfer(II)-Komplexen.

Im Rahmen der Arbeit wurden vier *N*-funktionalisierte Cyclam-Derivate **13**, **14b**, **15** und **16** (Abbildung 58), die eine unterschiedliche Anzahl an Propionsäuregruppen tragen, erfolgreich synthetisiert und in sehr hoher Reinheit (>99%) isoliert. Besonders hervorzuheben ist die erstmalige Synthese des *trans-N,N'*-funktionalisierten Cyclam-Propionsäure-Derivates **14b** in hoher Ausbeute ( $\eta_{\text{gesamt}} = 32\%$ ). Schlüsselschritt dieser Synthese war die Addition von Acrylsäuremethylester an einem *trans-N,N'*-benzylgeschützten Cyclam-Derivat **20**.

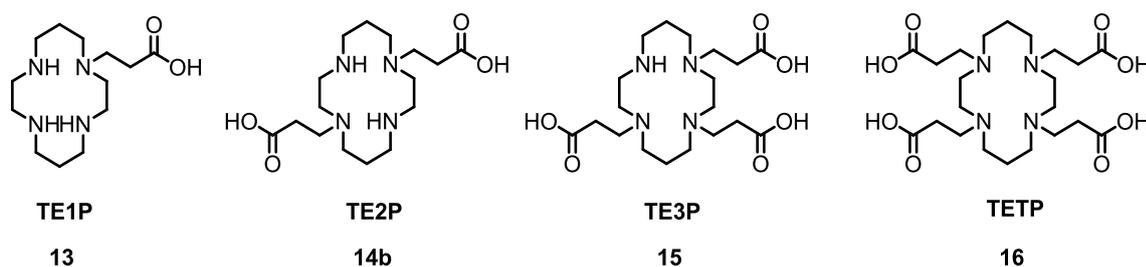


Abbildung 58: Darstellung der synthetisierten Cyclam-Propionsäure-Derivate

Von den Verbindungen **13**, **14b**, **15** und **16** sind entsprechende Kupfer(II)-Komplexe hergestellt worden.

Zur Aufklärung relevanter Fragestellungen bezüglich der chemischen und geometrischen Eigenschaften sind verschiedene spektroskopische Methoden (RKSA, IR, UV/VIS, ESR) anhand von den isolierten Kupfer(II)-Komplexen  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**13**,  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -**14b**

und Cu<sup>II</sup>-**16** herangezogen worden.

Die röntgenkristallografische Strukturaufklärung von den Kupfer(II)-Komplexen [Cu<sup>II</sup>(H<sub>2</sub>**14b**)]<sup>2+</sup> und [Cu<sup>II</sup>(H<sub>3</sub>**16**)]<sup>+</sup> wurde erstmalig beschrieben. Diese pentakoordinierenden Kupfer(II)-Komplexe weisen eine *trans*-I-Konfiguration auf, in der alle Substituenten in axialer Richtung angeordnet sind. Die Geometrie des [Cu<sup>II</sup>(H<sub>2</sub>**14b**)]<sup>2+</sup> ist nahezu quadratisch-pyramidal. Beim [Cu<sup>II</sup>(H<sub>3</sub>**16**)]<sup>+</sup> hingegen lag die Struktur zwischen einer quadratisch-pyramidalen und einer trigonal-bipyramidalen Geometrie.

Für die Kupfer(II)-Komplexe konnte mittels UV/VIS-Spektroskopie mit Zunahme der Anzahl der Propionsäuregruppen am Cyclam-Grundgerüst sowohl im wässrigen Milieu als auch im festen Zustand eine bathochrome Verschiebung ( $\lambda_{max} = \text{Cu}^{\text{II}}\text{-13} < \text{Cu}^{\text{II}}\text{-14b} < \text{Cu}^{\text{II}}\text{-16}$ ) gemessen werden. Nachweislich verursachen die zusätzlichen funktionellen Gruppen eine kleinere Ligandenfeldaufspaltung.

Weiterhin nahm die kinetische Stabilität unter stark sauren Bedingungen mit steigendem Substitutionsgrad ab. Offenbar können die positiven Ladungen an den protonierten Stickstoffatomen durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carboxylgruppen stabilisiert werden. Der Vergleich mit den oktaedrischen Kupfer(II)-Cyclam-Essigsäure-Komplexen zeigt, dass die quadratisch-pyramidalen Kupfer(II)-Cyclam-Propionsäure-Derivate unter stark sauren Bedingungen schneller dissoziieren. Als Ursache können die unterschiedlichen Konfigurationen diskutiert werden, da bei 4N+2-Geometrien die thermodynamisch bevorzugte *trans*-III-Konfigurationen gebildet wird. Die Dissoziation bzw. die Protonierung des *trans*-III-Komplexes verursacht einen Bindungsbruch mit gleichzeitiger Inversion des Stickstoffatoms. Diese Konfigurationsänderung ist durch eine hohe Aktivierungsenergie gekennzeichnet. Der Mechanismus der Reaktion kann mittels der Arrhenius- und Eyring-Gleichung berechnet werden und sollte in weiterführenden Untersuchungen durch temperatur- und säurekonzentrationsabhängige UV/VIS-Messungen bestätigt werden.

Radiochemische Untersuchungen zur Komplexbildungsgeschwindigkeit der Liganden **13**, **14b**, **15** und **16** sind mit Kupfer-64 durchgeführt worden. Die Komplexbildungsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit der Konzentration (50 µg/ml und 250 µg/ml), der Temperatur (25°C, 37°C und 50°C) und des pH-Wertes (pH 5,0; 5,5 und 7,4) untersucht. Das schnellste Komplexbildungsverhalten zeigten alle Liganden bei 50°C in MES/NaOH-Puffer bei einem pH-Wert von 5,0. Das ist bemerkenswert, da die Cyclam-Essigsäure-Derivate bereits bei niedrigeren Temperaturen (30°C) vergleichbar schnell komplexieren. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Komplexbildung ist eine

stereochemische Umorientierung mit Konfigurationsänderungen, die mit unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten einhergehen.

In-vitro-Stabilitätsstudien wurden in Gegenwart des kupferbindenden Enzyms Superoxid-Dismutase (SOD) bzw. humanem Serum durchgeführt. Nach einer Stunde Inkubation in SOD war die höchste Stabilität beim  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  zu verzeichnen, wohingegen die drei- und vierfachfunktionalisierten Cyclam-Propionsäure-Derivate,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-15}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-16}$ , deutlich labiler waren. In humanem Serum hingegen wies nur der *trans-N,N'*-funktionalisierte Cyclam-Propionsäure-Komplex  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  eine vergleichbar hohe Stabilität wie die etablierten  $^{64}\text{Cu}$ -Chelate ( $^{64}\text{Cu-3}$ ,  $^{64}\text{Cu-4}$ ,  $^{64}\text{Cu-5}$  und  $^{64}\text{Cu-6}$ ) auf. Eine Stunde nach Inkubation waren ca. 4% der Verbindung transchelatisiert.

Die Ergebnisse der Bioverteilungen *in vivo* korrelieren mit den In-vitro-Studien in humanem Serum. Der Komplex  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  zeigte sowohl eine schnelle renale Blut-Clearance als auch eine sehr geringe Anreicherung in der Leber und stellt damit eine Alternative zu den kommerziell erwerblichen Liganden dar. Demgegenüber waren bei dem *N*-funktionalisierten  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$  und dem tetra-*N,N',N'',N'''*-funktionalisierten Cyclam-Propionsäure-Komplex  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-16}$  signifikante Akkumulationen in der Leber zu beobachten.

In der nachfolgenden Abbildung 59 sind alle Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

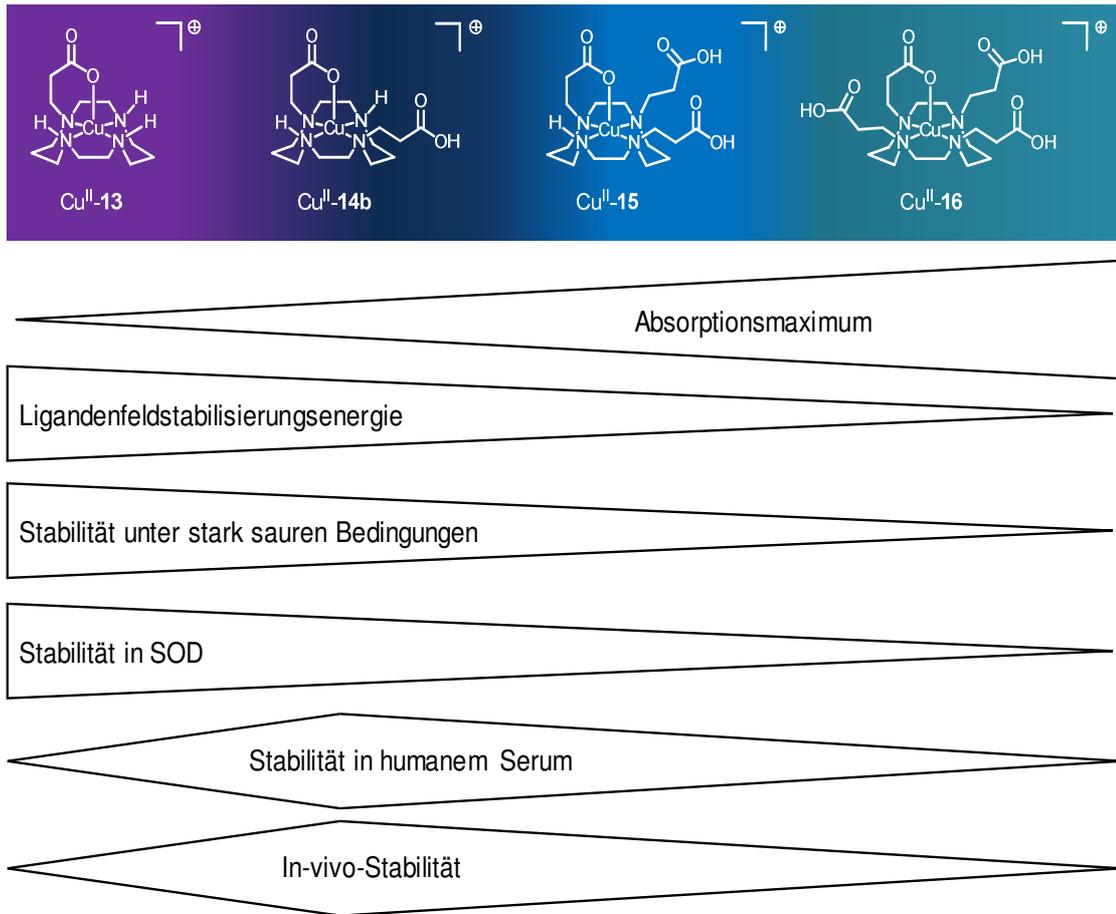


Abbildung 59: Zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse

Als geeignete Chelatoren bieten Cyclam-Monopropionsäure **13** und Cyclam-Dipropionsäure **14b** die Möglichkeit, Kupferdionuklide stabil zu binden und erlauben die mehrfache Einführung von EGFR-spezifischen Peptiden an das Grundgerüst. Dazu wurden die EGFR-affinen Peptide D4 **29** und GGG-GE11 **30a** genutzt. Neben einer dreifach-substituierten Modellsubstanz **40** mit Dipeptiden wurde das dreifach funktionalisierte TE1P-(GGG-GE11-OH)<sub>3</sub>-Konjugat **48** unter Einsatz der Schutzgruppenstrategie in einer vierstufen Synthese hergestellt. Für die Reinigung der Substanzen sind entsprechende HPLC-Methoden entwickelt worden. Die Markierung mit Kupfer-64 verlief bei erhöhter Temperatur (50°C) über Nacht quantitativ. Erste Bindungsstudien in den Zelllinien MDA-MB-435S, FaDu und A431 wurden mittels Immunpräzipitation durchgeführt. Es ist eine hohe Affinität zum EGF-Rezeptor in der FaDu- und A431-Zelllinie nachgewiesen worden. Weitere In-vitro-Experimente sollten durchgeführt werden, um die Affinität auch an intakten Zellen bestätigen zu können.

Mit dieser Arbeit wurde ein wesentlicher Beitrag zur Entwicklung von <sup>64</sup>Cu-Chelaten auf Basis von Cyclam-Propionsäure-Liganden geleistet. Besonders hervorzuheben ist,

dass die Untersuchungen zur kinetischen Stabilität zum besseren Verständnis der einflussnehmenden Faktoren von (Radio)kupfer(II)-Cyclam-Propionsäuren beigetragen haben. Über besonderem Maße hinaus ist ein In-vitro-Stabilitätstest für radiomarkierte Verbindungen entwickelt worden, der zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zudem wurde ein  $^{64}\text{Cu}$ -markiertes Cyclam-Propionsäure-Konjugat synthetisiert, welches drei identische EGFR-spezifische Peptide trägt. Durch die Multifunktionalisierung sollen höhere Affinitäten zum Rezeptor und verbesserte metabolische Stabilitäten hervorgerufen werden. Für diese Verbindung liegen erste vielversprechende Ergebnisse von In-vitro-Studien vor.

In weiterführenden Experimenten sollte die Eignung des EGFR-spezifischen Peptides als pharmakologisch relevantes Molekül geklärt werden. Von besonderem Interesse wären Untersuchungen des Konjugats [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-**48** zur metabolischen Stabilität sowie zur Tumoraufnahme *in vivo*. In diesem Zusammenhang besteht nicht nur großes Interesse, das einfach-funktionalisierte TE1P(GGG-GE11-OH)<sub>1</sub>-Konjugat zu synthetisieren, sondern dessen Bindungsstärke zum Rezeptor und dessen metabolische Halbwertszeit *in vivo* zu vergleichen.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Chemikalien und Materialien

Für synthetische und analytische Arbeiten wurden Lösungsmittel der Firma Fisher Scientific, Fluka, Merck und VWR mit der Spezifikation „zur Analyse“, wasserfrei und „HPLC-Grade“ verwendet. Deuterierte Lösungsmittel sind von Deutero GmbH bezogen worden. Folgende Chemikalien kamen während der Anfertigung dieser Arbeit zum Einsatz.

Chemikalie	Hersteller	Reinheit [%]
Acrylsäurechlorid	Sigma-Aldrich	96
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%)	Sigma-Aldrich	≥98,5
Ameisensäure (95-97%)	Sigma-Aldrich	≥94,5
Ammoniaklösung (min. 25%)	VWR	k. A.
Ammoniumacetat	Fluka	≥99
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	
Bernsteinsäureanhydrid	Sigma-Aldrich	≥99
3-Brompropionsäure	Merck	z. Syn.
Celite®	Acros	k. A.
Cyclam	Sigma-Aldrich	98
n-Dodecyl-β-D-maltosid	AppliChem	>99
GGG-D4-OH	GL Biochem	≥95
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich	99
Eisessig	Fisher Scientific	99,83
Formaldehyd-Lösung (37%ig)	Sigma-Aldrich	10-15
GGG-GE11-OH	GL Biochem	≥95
HATU	ChemPep	99,95
2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Fluka	>99
Humanes Normalserum (Off the Clot)	Biochrom AG	k. A.
Kaliumcarbonat (wasserfrei)	Fluka	≥99
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	Merck	>84
Kupfer(II)-chlorid Dihydrat	Riedel-de Haën	rein
Kupfer(II)-nitrat Hemipentahydrat	Sigma-Aldrich	99,99
Kupfer(II)-perchlorat Hexahydrat	Riedel-de Haën	rein
Kupfer(II)-tetrafluorborat Hexahydrat	ABCR	k. A.

2xLaemmli-Probenpuffer	Bio-Rad Laboratories GmbH	k. A.
(L)-Leucyl-(L)-alanin	Bachem AG	k. A.
20X LumiGlo® and 20X Peroxide	Cell Signaling Technology	k. A.
Magnesiumsulfat Hydrat (getrocknet)	Riedel-de Haën	k. A.
Methylacrylat	Janssen Chimica	95
N-Benzyl-Cyclam	CheMatech	k. A.
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	AppliChem	>99
Native Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH	>98,5
Natrium-Deoxycholat	AppliChem	≥98,5
Natriumdocdecylsulfat	Sigma-Aldrich	≥99,5
Natriumchlorid	Fluka	
Natronlauge	Riedel-de Haën	rein
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	VEB Berlin-Chemie	k. A.
Ninhydrin	Reanal Budapest	k. A.
PageBlue Protein Staining Solution	Thermo Scientific	k. A.
PageRuler™ Protein Ladder	Thermo Scientific	p. a.
Pd/C	Sigma-Aldrich	k. A.
Salzsäure	Merck	k. A.
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich	k. A.
p-Toluolsulfonsäure	Sigma-Aldrich	≥99
Triethylamin	Sigma-Aldrich	≥99,9
Trifluoressigsäure	Carl Roth GmbH & Co	≥99,9
TSTU	ChemPep	k. A.

z. Syn. ≙ zur Synthese, p.a. ≙ per analysis, k. A. ≙ keine Angaben

[<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> wurde am Standort des HZDR im Zyklotron „Cyclone 18/9“ in einer <sup>64</sup>Ni(p,n)-Reaktion hergestellt. Die Reinigung des Kupfer-64 erfolgt über Anionenaustauschchromatografie und liegt als [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in 0,01 M HCl-Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 150-250 GBq/μmol vor [6, 125].

## 5.2 Methoden

Für die Dünnschichtchromatografie wurden je nach Zusammensetzung des Analyten verschiedene stationäre und mobile Phasen verwendet. Im Folgenden ist eine Übersicht über die zum Einsatz kommenden Bedingungen dargestellt. Die Detektion erfolgte chemisch durch Anfärben mit einer 0,1 Ma.-% ethanolischen Kupfer(II)nitrat-Lösung oder Ninhydrin-Lösung, durch Absorption von UV-Licht bei 254 nm oder mit Hilfe ionisierende Strahlung im Linearanalyser (RITA) der Firma Raytest.

Methode 1: Aluminiumoxid, Polygram<sup>®</sup> Alox N/UV<sub>254</sub> (Marchery-Nagel), CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1, v:v)

Methode 2: Kieselgel, Polygram<sup>®</sup> SILG/UV<sub>254</sub> (Marchery-Nagel), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (4:1, v:v)

Methode 3: ITLC-SA (Merck), H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% HCOOH

Methode 4: ITLC-SA (Merck), 0,1 M EDTA-Lösung

Methode 5: RP-18-Platten (Merck), 2 M NH<sub>4</sub>OAc (pH 6)/ MeOH (1:1, v:v)

Methode 6: Alox n (Merck), 2 M NH<sub>4</sub>OAc (pH 6)/ MeOH (1:1, v:v)

Methode 7: RP-18-Platten (Merck), ACN/H<sub>2</sub>O/NEt<sub>3</sub> (1:2, v:v) + 0,5 Vol.-% NEt<sub>3</sub>

Methode 8: ITLC-SG, 0,9 Ma.-% NaCl-Lösung

Für die Ionenaustauschchromatografie wurde ein stark basischer Anionenaustauscher (DOWEX<sup>®</sup>1x8) mit einer Korngröße von 100 - 200 mesh und einer Anionen-Austauscher-Kapazität (AAK) von 1,2 mÄq./ml von der Firma Serva (Heidelberg/ New York) verwendet.

Radio-HPLC Trennungen wurden an einer Anlage von Knauer (Wellchrom K100, Pumpe 1000, Manager 5000, UV-Detektor K-2501, Radioaktivitätsdetektor Ramona Star, Software Chromgate 2.8) und HPLC Trennungen an einer GE Healthcare Anlage (Äkta basic, Detektor UV-900, Software Unicorn 5.0) durchgeführt.

Methode 1: Zorbax SB-C8 Agilent, 21,2 mm × 150 mm, 5 μ, 110 Å, Fluss: 10 ml/min, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% HCOOH, B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1 Vol.-% HCOOH, 20 min 100% A, 100% A → 50% A in 15 min

Methode 2: ZIC-HILIC dichrom, 4,6 mm × 250 mm, 5 μ, 110 Å, Fluss: 1 ml/min, Eluent: A: CH<sub>3</sub>CN, B: 0,1 M NH<sub>4</sub>OAc (pH 5,6), 5 min 20% B, 20% → 90% B in 5 min, 20 min 90% B

Methode 3: Eurospher 100 C18 Knauer, 8 mm × 250 mm, 5 μ, 110 Å, Fluss: 4 ml/min, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% TFA, B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1 Vol.-% TFA, 2 min 10% B, 10% B → 28% B in 18 min

Methode 4: Eurospher 100 C18 Knauer, 8 mm × 250 mm, 5 μ, 110 Å, Fluss: 4 ml/min, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% TFA, B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1 Vol.-% TFA, 2 min 20% B, 20% B → 50% B in 30 min

Methode 5: Eurospher 100 C18 Knauer, 8 mm × 250 mm, 5 μ, 110 Å, Fluss: 4 ml/min, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% TFA, B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1 Vol.-% TFA, 2 min 10% B, 10% B → 50% B in 20 min

Methode 6: Eurospher 100 C18 Knauer, 4 mm × 250 mm, 5 μ, 110 Å, Fluss: 1 ml/min, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% TFA, B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1 Vol.-% TFA, 2 min 10% B, 10% B → 90% B in 20 min

Methode 7: Eurospher 100 C18 Knauer, 8 mm × 250 mm, 5 μ, 110 Å, Fluss: 4 ml/min, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0,1 Vol.-% TFA, B: CH<sub>3</sub>CN + 0,1 Vol.-% TFA, 2 min 30% B, 30% B → 50% B in 30 min

NMR spektroskopische Untersuchungen wurden an einem Inova-400 Gerät der Firma Varian durchgeführt. <sup>1</sup>H-NMR sind mit einer Frequenz von 400 MHz und <sup>13</sup>C-NMR mit einer Frequenz von 101 MHz aufgenommen worden. Die chemischen Verschiebungen (δ, ppm) beziehen sich auf den internen Standard Tetramethylsilan (TMS). Als Signalmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Duplett, dd = Doppelduplett, t = Triplett, m = Multipllett.

X-Band ESR Spektroskopie wurden mit einem Bruker Biospin ELEXSYS E500 durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Methanol oder DMF/H<sub>2</sub>O (2:1, v:v) bei 110 K mit einem Eurotherm Temperatur Controller in Kombination mit einem Flüssigstickstoffstrom. Spin Hamilton Parameter wurden mit Hilfe der Software XSophe-Sophe-XeprView anhand der experimentellen Spektren simuliert.

Für massenspektrometrische Analysen kamen zwei verschiedenen Verfahren zum Einsatz. Elektrospray-Ionisations (ESI) Analysen wurden mit einem Quattro LC der Firma Micromass durchgeführt. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations Messungen mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF) wurden mit einem Autoflex TOF/TOF der Firma Bruker Daltonics (Deutschland) durchgeführt. Als Matrix diente Sinapinsäure.

Elementaranalysen wurden mit dem Elemental Analyzer CHNS-932 der Firma Leco (USA) durchgeführt. In Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung wurden verschiedene externe Standards eingesetzt (Cystein, Caffein, Acetanilid).

Feststoffabsorptionsspektren wurden am Jasco V-570 UV/Vis-NIR Spektrometer gemessen. Für die diffuse Reflektion des Spektrums wurden die Proben mit Alox ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) fein gemörsert. Die Flüssigabsorptionsspektren wurden am Specord<sup>®</sup> S50 der Firma Analytik Jena (Deutschland) gemessen. Die Software ist WinASPECT. Es wurde ein Mikroküvettenhalter verwendet, da Küvetten ( $d = 1 \text{ cm}$ ) mit einem Volumen zwischen  $400 - 500 \mu\text{l}$  verwendet wurden. Die jeweiligen Messungen sind mit folgenden Parametern durchgeführt worden: Wellenlängenbereich:  $190 - 1100 \text{ nm}$ , Geschwindigkeit:  $0,5 \text{ s/nm}$ , Schrittweite:  $1 \text{ nm/s}$ .

Die Infrarotspektren wurden mit einem FT-IR Spektrometer Nicolet iS5 der Firma Thermo Scientific aufgenommen. Die Proben wurden mit Hilfe eines ATR-Kristalls untersucht.

### 5.3 Versuchsdurchführungen

#### 5.3.1 Spektroskopische Untersuchungen

##### *UV/VIS-Spektroskopie*

Um die Extinktionskoeffizienten aller  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexen zu bestimmen, sind  $6 \text{ mM}$  wässrige Stammlösungen hergestellt worden. Diese sind dann mit den entsprechenden Volumina an ention.  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt worden, um Konzentrationen von  $1, 2$  und  $4 \text{ mM}$   $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplex zu erhalten. Für die Säure-assoziierte Dekomplexierung sind  $4 \text{ mM}$  Lösungen der  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplexe mit  $2 \text{ M HCl}$  in einem Volumenverhältnis von  $1:1$  gemischt worden. Für die Cyclam-Challenge Versuche sind ebenfalls  $4 \text{ mM}$   $\text{Cu}^{\text{II}}$ -Komplex Lösungen in einem Volumenverhältnis von  $1:1$  mit einer  $80 \text{ mM}$  wässrigen Cyclam-Lösung vermischt worden. Es sind zeitabhängige Messung über  $24 \text{ h}$  durchgeführt worden, wobei alle  $30 \text{ min}$  ein Spektrum aufgenommen worden ist. Die Komplexbildung erfolgte bei drei unterschiedlichen pH-Werten. Dazu sind  $4 \text{ mM}$  Lösungen an Ligand in  $1 \text{ M MES/NaOH}$  ( $\text{pH } 5,5$ ) und in  $1 \text{ M HEPES/NaOH}$ -Puffer ( $\text{pH } 7,4$ ) gelöst worden. Zusätzlich sind die Liganden **15** und **16** in  $1 \text{ M Glycin/HCl}$ -Puffer ( $\text{pH } 2,1$ ) überführt worden. Bei den Liganden **13** und **14b** war es nicht nötig, da sie als Hydrochlorid vorliegen und in wässrigen Lösungen einen pH-Wert von  $2,1$  aufweisen. Die  $4 \text{ mM}$  Ligand-Lösungen sind in einem Volumenverhältnis von  $1:1$  mit einer  $4 \text{ mM}$  wässrigen  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  Lösung gemischt und spektroskopisch im Bereich von  $350 - 1100 \text{ nm}$  untersucht worden. Es sind zeitabhängige Messungen durchgeführt worden, wobei alle  $30 \text{ s}$  ein Spektrum über einen Zeitraum von  $80 \text{ min}$  für die Komplexbildung in MES- und HEPES-Puffer gewählt worden sind. Die

zeitabhängige Messung im sauren pH-Bereich erstreckte sich über 24 h, wobei alle 60 min ein Spektrum aufgezeichnet wurde. Die ermittelten Werte stammten aus zwei unabhängigen Versuchen.

### *IR-Spektroskopie*

Für die Spektren in deuterierten Wasser wurden nahezu gesättigte Lösungen (~ 2 mg/10 µl) der Kupfer(II)-Komplexe hergestellt.

### 5.3.2 Markierungen mit Kupfer-64

Von den jeweiligen Liganden sind zunächst wässrige Stammlösungen (1 mg/ml) hergestellt worden. Die entsprechenden Puffer-Lösungen an 0,1 M MES/NaOH-Puffer (pH 5,0 und pH 5,5) oder 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer (pH 7,4) wurden in ein definiertes Volumen in Eppendorf-Gefäßen (low-bind tubes, 1,5 ml) vorgelegt, Aliquote der entsprechenden Liganden (10 µl und 50 µl) und [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (5 - 6 MBq) zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 200 µl ergibt. Der pH-Wert ist stets mit Tritest-Indikatorpapier (Merck) überprüft worden. In Abhängigkeit der Temperatur (25, 37 und 50°C) ist die radiochemische Ausbeute nach bestimmten Zeiten mittels Radio-DC bestimmt worden. Die DC-Bedingungen variierten je nach [<sup>64</sup>Cu]Cu-Komplex und können in Tabelle 16 nachgelesen werden. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Linearanalyser RITA (Raytest). Die ermittelten Werte stammten aus drei unabhängigen Versuchen.

Tabelle 16: Radio-DC Methoden der jeweiligen [<sup>64</sup>Cu]Cu-Komplexe

[ <sup>64</sup> Cu]Cu-Komplex	DC-Methode	R <sub>f</sub> (Komplex)	R <sub>f</sub> (freies <sup>64</sup> Cu)
<sup>64</sup> Cu-13	ITLC-SA, H <sub>2</sub> O+0,1 Vol.-% HCOOH	0	0,4
<sup>64</sup> Cu-14b	ITLC-SA, H <sub>2</sub> O+0,1 Vol.-% HCOOH	0	0,4
<sup>64</sup> Cu-15	ITLC-SA, H <sub>2</sub> O+0,1 Vol.-% HCOOH	0	0,4
<sup>64</sup> Cu-16	ITLC-SA, H <sub>2</sub> O+0,1 Vol.-% HCOOH	0	0,4
<sup>64</sup> Cu-40	Alox n, 2 M NH <sub>4</sub> OAc/MeOH (1:1, v/v) (pH 6)	0,7	0
<sup>64</sup> Cu-4	ITLC-SG, 0,9 Ma.-% NaCl	1	0
<sup>64</sup> Cu-6	ITLC-SG, 0,9 Ma.-% NaCl	0,9	0
<sup>64</sup> Cu-5	ITLC-SG, 0,9 Ma.-% NaCl	1	0
<sup>64</sup> Cu-3	ITLC-SA, H <sub>2</sub> O+0,1 Vol.-% HCOOH	0	0,4
<sup>64</sup> Cu-EDTA	ITLC-SG, 0,9 Ma.-% NaCl	0,9	0

### 5.3.3 Verteilungsstudien in Octan-1-ol/H<sub>2</sub>O

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten  $\log D$  erfolgte in einem Zweiphasensystem aus Octan-1-ol und 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer bei drei unterschiedlichen pH-Werten (7,2; 7,4 und 7,6) in einem Volumenverhältnis von 1:1. Zunächst erfolgte aber die Markierung der Liganden ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  M) mit 0,5 – 1 MBq [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer bei pH 7,2; 7,4 und 7,6 und einer  $1 \cdot 10^{-5}$  M Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Lösung in 200 µl Gesamtvolumen. Nachdem eine RCA von >99% erzielt worden ist (Überprüfung mittels DC-Methode 3), sind je 20 µl des Markierungsansatzes in 480 µl 0,1 M HEPES/NaOH-Puffer (pH 7,2; 7,4 und 7,6) überführt worden. Dann wurden 500 µl Octan-1-ol zum Ansatz beigemischt. Das Zweiphasen-Gemisch wurde für 30 min in einem Überkopfschüttler geschüttelt und anschließend die Phasen durch Zentrifugation separiert. Von jeder Phase wurden 2 x 100 µl abgenommen, in einem Flüssigszintillationsanalysator die vorhandene Aktivität gemessen und ein Mittelwert berechnet. Der Verteilungskoeffizient ist das Verhältnis der Aktivitätsmenge aller auftretenden Spezies in der organischen und wässrigen Phase (Kapitel 3.3.2). Die angegebenen Werte stammen aus Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen.

### 5.3.4 In-vitro-Stabilitätsstudien

#### SOD-Assay

10 nmol (1 mg/ml Stammlösung in ention. H<sub>2</sub>O) des entsprechenden Chelators wurden mit 10 – 14 MBq [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in 100 µl 0,1 M MES/NaOH-Puffer (pH 5,5) versetzt und bis zur vollständigen Komplexierung bei 25°C ([<sup>64</sup>Cu]Cu-**3**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**4**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**5**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**6**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-EDTA) oder 50°C [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**14b**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**15** und [<sup>64</sup>Cu]Cu-**16**) im Thermoschüttler inkubiert. Als Referenz wurde etwa dieselbe Menge freies [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (10 - 14 MBq) eingesetzt und in 100 µl 0,1 M MES/NaOH-Puffer (pH 5,5) überführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Radio-DC unter Verwendung verschiedener stationärer und mobiler Phasen (Methode 3, 4 und 8, siehe Kapitel 5.3.2). Die radiochemische Ausbeute sollte ≥99% betragen, andernfalls werden die radiomarkierten Komplexe verworfen. Nach der vollständigen Komplexierung ist der pH-Wert mit 50 µl 1 M HEPES/NaOH-Puffer (pH 8,0) auf ca. 7,6 eingestellt worden. Anschließend wurde 0,1 nmol (1,5 µl, ~ 100 - 140 kBq) des radiomarkierten Chelators bzw. freies [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (1,5 µl, ~ 100 - 140 kBq) mit 10 µl (0,3 nmol) Sod1 (Aliquot aus einer 1 µg/µl H<sub>2</sub>O Proteinlösung) gemischt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Danach ist die gesamte Reaktion mit dem gleichen Volumen an nativem Probenpuffer (Bio-Rad Laboratories GmbH) gemischt und mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt worden. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist der nachfolgenden Tabelle 17 zu entnehmen. Aufgrund der Molmasse von 32 kDa ist für die Gelelektrophorese eine Polyacrylamidkonzentration von 15% im Trenngel gewählt worden. Das Sammelgel besaß eine Polyacrylamidkonzentration von 5%. Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol beschichtet, um die Ausbildung einer scharfen Trenngelgrenze zu gewährleisten. Es wurden 20 µl der jeweiligen Probe in jede zweite Geltasche pipettiert. Der Trennvorgang erfolgte bei RT und konstanten 80 V bis die Lauffront die Sammelgel-Trenngel-Grenze erreicht hatte. Anschließend wurde die Spannung auf 140 – 160 V erhöht und die Elektrophorese fortgesetzt, bis die Lauffront aus dem Gel herauslief. Im Anschluss an die Elektrophorese ist das Gel für mind. 5 min in ention. H<sub>2</sub>O gewaschen und für 30 min auf einer Radioluminografie-Platte (Fujifilm) belichtet worden. Die qualitative und quantitative Auswertung der Gele wurde mit dem Radioluminografie-Scanner BAS-1800II (Raytest) und der Software Advanced Image Data Analysis (AIDA) der Firma Raytest durchgeführt. Danach wurde das Gel mit Coomassie-Brillant-Blau G-250 (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers angefärbt und mittels Gel-Imager dokumentiert. Die Werte wurden aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt und auf 100% freies [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> normalisiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für SOD-Assay

Chemikalien	Zusammensetzung der Gele [ml]	
	15%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
H <sub>2</sub> O (milipore)	1,10	3,40
30 Vol.-% Acrylamidlösung	2,50	0,83
1,5 M TRIS/HCl-Puffer (pH 8,8)	1,30	-
1 M TRIS/HCl-Puffer (pH 6,8)	-	0,63
10 Ma.-% Ammoniumpersulfat	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,002

### *Serum-Assay*

10 nmol (1 mg/ml Stammlösung in ention. H<sub>2</sub>O) des entsprechenden Chelators wurden mit 10 – 14 MBq [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in 100 µl 0,1 M MES/NaOH-Puffer (pH 5,5) versetzt und bis zur vollständigen Komplexierung bei 25°C ([<sup>64</sup>Cu]Cu-**3**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**4**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**5**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**6**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-EDTA) oder 50°C [<sup>64</sup>Cu]Cu-**13**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**14b**, [<sup>64</sup>Cu]Cu-**15** und [<sup>64</sup>Cu]Cu-**16**) im Thermoschüttler geschüttelt. Als Referenz wurde etwa dieselbe Menge freies [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> (10 - 14 MBq) eingesetzt und in 100 µl 0,1 M MES/NaOH-Puffer (pH 5,5) überführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Radio-DC unter Verwendung verschiedener stationärer und mobiler Phasen (Methode 3, 4 und 8, siehe Kapitel 5.3.2). Die radiochemische Ausbeute sollte ≥99% betragen, andernfalls werden die radiomarkierten Komplexe verworfen. Nach der vollständigen Komplexierung ist der pH-Wert mit 50 µl 1 M HEPES/NaOH-Puffer (pH 8,0) auf ca. 7,6 eingestellt worden. Anschließend wurde 9 nmol (135 µl, ~ 9 MBq) des radiomarkierten Chelators in 265 µl verdünntem humanem Serum für 1 h bei 37°C inkubiert. Das humane Serum ist als „Off the clot“ von der Firma Biochem AG bezogen worden und setzte sich aus 220 µl filtriertem Serum (Porengröße Filter 0,45 µm) und 45 µl 1 M HEPES/NaOH-Puffer (pH 7,4) zusammen. Anschließend wurde die gesamte Reaktionslösung (400 µl) mit 2× Laemmli-Probenpuffer (Bio-Rad Laboratories GmbH) gemischt und 2 µl von dem Probenansatz in jede zweite Geltasche pipettiert. Der Laemmli-Puffer ist kommerziell von der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH bezogen worden und besaß folgende Zusammensetzung: 65,8 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 6,8), 2,1% SDS, 26,3% Glycerol und 0,01% Bromphenolblau. Wichtig ist, dass kein reduzierendes Agens dazugegeben und die Proben nicht gekocht werden. Die Trennung erfolgte mittels denaturierender, nicht-reduzierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). Die

Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist der nachfolgenden Tabelle 18 zu entnehmen. Aufgrund der hohen Molmasse von 132 kDa (Caeruloplasmin) oder von 66 kDa (Humanalbumin) ist für die Gelelektrophorese eine Polyacrylamidkonzentration von 10% im Trenngel gewählt worden. Das Sammelgel besaß eine Polyacrylamidkonzentration von 5%. Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol beschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden. Der Trennvorgang erfolgte bei RT und konstanten 80 V bis die Lauffront die Sammelgel-Trenngel-Grenze erreicht hatte und dann bei konstanten 140 – 160 V bis die Lauffront aus dem Gel herauslief. Im Anschluss an die Elektrophorese ist das Gel für mind. 5 min in ention. H<sub>2</sub>O gewaschen und für 30 min auf einer Radioluminografie-Platte (Fujifilm) belichtet worden. Die qualitative und quantitative Auswertung der Gele wurde mit dem Radioluminografie-Scanner BAS-1800II (Raytest) und der Software Advanced Image Data Analysis (AIDA) der Firma Raytest durchgeführt. Danach wurde das Gel mit Coomassie-Brillant-Blau G-250 (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers angefärbt und mittels Gel-Imager dokumentiert. Die ermittelten Werte stammten aus drei unabhängigen Versuchen und wurden normalisiert auf 100% freies [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub>.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für Serum-Assay

Chemikalien	Zusammensetzung der Gele [ml]	
	10%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
H <sub>2</sub> O (milipore)	1,90	3,40
30 Vol.-% Acrylamidlösung	1,70	0,83
1,5 M TRIS/HCl-Puffer (pH 8,8)	1,30	-
1 M TRIS/HCl-Puffer (pH 6,8)	-	0,63
10 Ma.-% Ammoniumpersulfat	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,002
10 % SDS	0,05	0,05

### 5.3.5 Bindungsstudien

Das mit <sup>64</sup>Cu-markierte Konjugat **48** (100 µg/ml) wurde mit dem Zelllysate (1 mg/ml Protein) der jeweiligen EGFR-positiven und –negativen Zelllinie für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit EGFR-Antikörpern (D38B1) beschichteten magnetischen Beads von der Firma Cell Signaling Technology.

Anschließend ist eine Separation mit Hilfe eines Dauermagneten durchgeführt worden. Die Probe wurde dann 4× mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, in 0,1% SDS-Polyacrylamidgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 18) aufgenommen und mit Gelelektrophorese getrennt. Der Trennvorgang erfolgte bei RT und konstanten 80 V bis die Lauffront die Sammelgel-Trenngel-Grenze erreicht hatte und dann bei konstanten 140 – 160 V bis die Lauffront aus dem Gel herauslief. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für mind. 15 min in ention. H<sub>2</sub>O gewaschen und für die Radioluminographie verwendet. Anschließend erfolgte der Western-Blot bei 4°C über Nacht. Die Blotmembran bestand aus Nitrocellulose. Die Zusammensetzung des Anoden- und Kathodenpuffers ist der nachfolgenden Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Anoden- und Kathodenpuffers

Chemikalien	Zusammensetzung	
	Anodenpuffer	Kathodenpuffer
TRIS (pH 10,4)	25 mM	25 mM
Methanol	20 Vol.-%	20 Vol.-%
Aminocaprinsäure	-	40 mM
SDS	-	0,01 Vol.-%

Der für den Western-Blot verwendete primäre Antikörper (EGF Receptor (D38B1) XP<sup>®</sup> Rabbit mAb) von der Firma Cell Signaling Technology wurde 1:10.000 in TBST + 5 Vol.-% BSA verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurde 3 × je 5 min mit TBST gewaschen. Als sekundärer Antikörper ist ein Anti-Rabbit IgG, welcher mit Meerrettich-Peroxidase funktionsiert ist, von der Firma Cell Signaling Technology verwendet worden. Dieser wurde 1:10.000 in TBST + 5 Vol.-% Trockenmilchpulver verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Es wurde 3 × je 5 min mit TBST gewaschen. Die Chemolumineszenzreaktion erfolgte durch Zugabe des Reagens 20× LumiGlo<sup>®</sup> and 20× Peroxide (Cell Signaling Technology) zum Konjugat im Verhältnis 1:1 (v:v). Nach 1 min konnte die Lumineszenz mittels CCD-Kamera (System Stella 2000, Raytest) detektiert werden. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer-Lösungen ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen

Zusammensetzung				
4×nativer Probenpuffer (pH 6,8)	10×Elektrophorese-laufpuffer (pH 8,3)	PBS-Puffer	TBS-Puffer (pH 7,5)	TBST-Puffer
0,2 M Tris-HCl	250 mM Tris	137 mM NaCl	50 mM Tris	1×TBS
40 Vol.-% Glycerin	2,5 M Glycin	2,7 mM KCl	150 mM NaCl	0,05 Vol.-% TWEEN 20
0,08 Vol.-% Bromphenolblau	1 Vol.-% SDS	2,7 mM KCl		
		10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O		
		2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität wurden Zellpellets der jeweiligen Zelllinie (jeweils 5 µg/ml EGFR-Protein außer MDA-MB-435S) mit steigenden Konzentrationen an [<sup>64</sup>Cu]Cu-**48** (0 / 0,09 / 0,9 / 4,4 / 6,6 / 8,8 / 13,3 / 22,1 / 35,4 / 44,2 nM) in PBS-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Dafür wurden zuvor die Zellpellets der jeweiligen Zelllinie in PBS-Puffer resuspendiert, 0,05 Vol.-% Natrium-Deoxycholat und Dodecylmaltosid zugegeben und 1 h auf Eis gerührt. Anschließend erfolgte die Trennung des ungebundenen Liganden von gebundenen durch Filtration (Glasfaserfilter GF/C). Die Bestimmung der jeweiligen Ligandkonzentrationen erfolgte im γ-Counter mittels interner Kalibrierung. Um den  $K_d$ -Wert berechnen zu können, wurden die Filterbindung und die unspezifischen Bindungen abgezogen. Die unspezifische Bindung wurde bestimmt, indem zu einer 0,09 nM [<sup>64</sup>Cu]Cu-**48** PBS-Lösung ein 500facher Überschuss an Cu<sup>II</sup>-**48** zugegeben wurde. Die Auswertung erfolgte im γ-Counter. Diese lag bei ca. 25%. Für die Bestimmung der Filterbindung wurden 10 nM [<sup>64</sup>Cu]Cu-**48** gelöst in PBS-Puffer durch einen Glasfaserfilter gesaugt und die Aktivität auf dem Filter gemessen. Die Filterbindung lag bei ca. 15%.

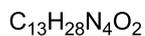
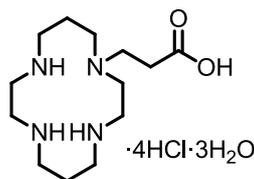
### 5.3.6 Bioverteilungsstudie

Die Bioverteilungsstudien der <sup>64</sup>Cu-Komplexe fanden in männlichen Kyoto-Wistar-Ratten (Alter: 7 - 8 Wochen, Gewicht: 130 - 170 g) statt. Die radiomarkierten Verbindungen (1 MBq,  $A_s$  (Cu<sup>II</sup>-16) = 10 MBq/µg, RCA >95%) wurden in einer Elektrolyt-Lösungen E-153 (Serumwerk Bernburg, Deutschland) auf ein Volumen von

---

0,5 ml verdünnt und acht anästhesierten Tieren über die Schwanzvene injiziert. Nach 5 min, 60 min und 24 h sind den narkotisierten Tieren durch Herzpunktion Blut entnommen worden. Danach wurden sie eingeschläfert, um die Organe nach der entsprechenden Zeit zu isolieren, abzutrocknen, zu wiegen und die Aktivität in einem Bohrloch-Szintillationsmessgerät Wallac WIZARD (Gamma Counter, PerkinElmer) zu messen und zu kalibrieren (ISOMED 2000, MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH). Die Aktivitäten von  $^{64}\text{Cu}$  in den Gewebe- und Organproben sind zerfallskorrigiert und kalibriert angegeben. Die Kalibrierung erfolgt durch Vergleich der Messwerte von Aliquoten der Injektionslösungen und der Gewebeprobe. Die aufgenommene Aktivität ausgewählter Organe und Gewebe wurde als Prozent der injizierten Aktivität [%ID] oder als standardisierter Aufnahmewert [SUV] angegeben.

## 5.4 Synthesevorschriften

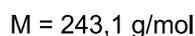
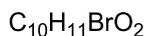
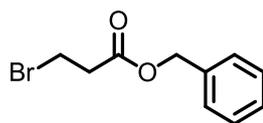


$$M_{\text{TE1P}} = 272,4 \text{ g/mol}$$

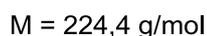
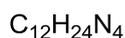
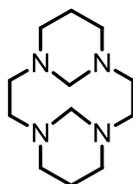
$$M_{\text{TE1P}\cdot 4\text{HCl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}} = 472,3 \text{ g/mol}$$

### 1-(2-(carboxy)ethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-trihydrat-tetrahydrochlorid

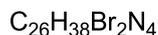
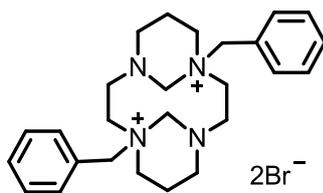
**(13).** In einem Dreihalskolben werden 1 g (5 mmol) Cyclam und 1,04 g (7,5 mmol) wasserfreies  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 120 ml wasserfreiem  $\text{CH}_3\text{CN}$  zusammen gegeben und unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre auf 55 - 60°C erhitzt. Anschließend werden 191 mg (1,25 mmol) 3-Brompropionsäure in 30 ml wasserfreiem  $\text{CH}_3\text{CN}$  gelöst und langsam in einer Zeitspanne von einer Stunde zur Reaktionsmischung hinzuge tropft. Die Reaktion ist nach 7 h rühren bei 55 - 60°C beendet und wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Überschuss an Cyclam bzw.  $\text{K}_2\text{CO}_3$  wird abfiltriert, mit  $\text{CH}_3\text{CN}$  gewaschen und das Filtrat bei 30°C im Vakuum eingeeengt. Das noch mit Cyclam verunreinigte Produkt **13** wird in wenig  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und über ein Anionenaustauscherharz (DOWEX 1x8, 100 - 200 mesh, AAK = 1,2 mÄq/ml) gegeben. Zunächst wird mit  $\text{H}_2\text{O}$  (8-faches Bettvolumen) gespült und anschließend das Produkt mit 0,1 M HCl (8-faches Bettvolumen) eluiert. Die saure Lösung wird eingeeengt und lyophilisiert. Das Produkt liegt als farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 58% (274 mg) vor.  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz):  $\delta = 3,72\text{-}3,57$  (m, 8H,  $4\times\text{NCH}_2$ );  $3,55\text{-}3,37$  (m, 10H,  $4\times\text{NCH}_2$ ,  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ );  $2,93$  (t, 2H,  $^3\text{J} = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{C(O)}$ );  $2,25\text{-}2,12$  (m, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 101 MHz):  $\delta = 174,3$  (C=O);  $50,9$  ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$ );  $48,6$ ;  $45,6$ ;  $41,9$ ;  $41,4$ ;  $41,3$ ;  $38,1$ ;  $37,9$ ;  $37,8$  ( $8\times\text{N-CH}_2$ );  $29,3$  ( $\text{CH}_2\text{C(O)-}$ );  $19,0$ ;  $18,6$  ( $2\times\text{-CH}_2-$ ) ppm. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 137,5$   $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$ ,  $273,6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Elementaranalyse: ber. für  $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2\times 4\text{HCl}\times 3\text{H}_2\text{O}$ : C: 33,06 H: 8,11, N: 11,86; gef. C: 33,22, H: 7,93, N: 11,80. Die experimentellen Daten stimmen mit den bereits publizierten Daten überein [46].



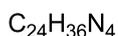
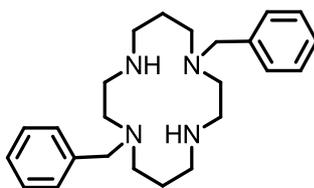
**Benzyl-3-bromopropionat (30).** In einem Rundkolben mit aufgesetzten Wasserabscheider werden 2 g (13 mmol) 3-Brompropionsäure, 1,45 ml (14 mmol) Benzylalkohol und 24 mg p-TsOH in 50 ml Toluol gelöst. Die Reaktion wird solange unter Rückfluss erhitzt bis sich 234  $\mu\text{l}$  (1,1 mmol)  $\text{H}_2\text{O}$  abgeschieden haben. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit wässriger  $\text{K}_2\text{CO}_3$  extrahiert. Die organische Phase wird erneut eingeeengt und der Rückstand bei 110°C und 0,2 mbar destilliert. Man erhält ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 66% (3,16 g). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 244,6$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 7,40\text{-}7,33$  (m, 5H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 5,18 (s, 2H,  $\text{OCH}_2$ ); 3,60 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H,  $\text{BrCH}_2$ ); 2,97 (t, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ) ppm. <sup>13</sup>C-NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz):  $\delta = 170,4$  (C=O); 135,6; 128,7; 128,5; 128,4 ( $4 \times \text{C}_{\text{Ar}}$ ); 66,9 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ); 37,8 ( $\text{BrCH}_2$ ); 25,9 ( $\text{CH}_2$ ) ppm.



**1,4,8,11-Tetraazatricyclo[9.9.1.1<sup>4,8</sup>]hexadecan (18).** In einem Kolben werden 100 mg (0,5 mmol) Cyclam in 6 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und auf 0 - 5°C gekühlt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 90  $\mu\text{l}$  einer 37%igen Formaldehyd-Lösung (mmol). Die Reaktion ist nach 0,5 h rühren bei 0 - 5°C beendet, wird sofort filtriert und mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Das Produkt liegt als farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 86% (96 mg) vor. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 225,4$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 5,44$  (dt, <sup>3</sup>J = 10,9, <sup>4</sup>J = 2,2 Hz, 2H, N- $\text{CH}_2$ -N); 3,17-3,12 (m, 4H,  $2 \times \text{NCH}_2$ ); 2,90 (d, <sup>3</sup>J = 10,9 Hz, 2H, N- $\text{CH}_2$ -N); 2,87-2,79 (m, 4H,  $2 \times \text{NCH}_2$ ); 2,62 (dt, <sup>3</sup>J = 12,3, <sup>4</sup>J = 3,2 Hz, 4H,  $2 \times \text{NCH}_2$ ); 2,41-2,35 (m, 4H,  $2 \times \text{NCH}_2$ ); 1,97 (br. s, 1H, NH); 1,21-1,13 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ) ppm. <sup>13</sup>C-NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz):  $\delta = 69,2$  ( $2 \times \text{N-CH}_2\text{-N}$ ); 54,0; 49,7 ( $8 \times \text{NCH}_2$ ); 20,5 ( $2 \times \text{-CH}_2-$ ) ppm. Die experimentellen Daten stimmen mit den bereits veröffentlichten Daten überein [75].

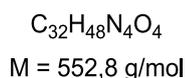
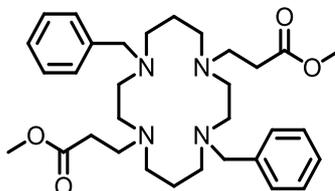


**1,8-Dibenzyl-diazoniatricyclo[9.9.1.1<sup>4,8</sup>]hexadecan dibromid (19).** In einem Kolben werden 200 mg (0,89 mmol) **18** in 10 ml CH<sub>3</sub>CN/CHCl<sub>3</sub> (4:1, v:v) gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 249 µl (1,88 mmol) Benzylbromid. Nach 2 h rühren bei RT wird der Rückstand abfiltriert, mit CHCl<sub>3</sub> gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es liegt ein farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 90% (456 mg) vor. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 91,3 [Bn]<sup>+</sup>; 315,6 [M-Bn]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): δ = 7,65-7,53 (m, 10H, H<sub>Ar</sub>); 5,54 (d, <sup>3</sup>*J* = 9,6 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N); 4,58 (d, <sup>2</sup>*J* = 13,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph); 4,53-4,39 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 3,72-3,59 (m, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>); 3,50-3,32 (m, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>); 3,24-3,16 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>); 3,01-2,92 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>); 2,60 (td, <sup>3</sup>*J* = 12, <sup>4</sup>*J* = 3,5 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>-N); 2,51-2,35 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); 1,95-1,85 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 101 MHz): δ = 133,0; 131,0; 129,7, 129,4; 126,0 (10×C<sub>Ar</sub>); 105,2 (N-CH<sub>2</sub>-N); 82,0 (N-CH<sub>2</sub>-N); 76,8 (2×CH<sub>2</sub>Ph); 63,1; 59,7; 51,4; 47,8 (8×NCH<sub>2</sub>); 22,2; 19,6 (2×-CH<sub>2</sub>-) ppm. Elementaranalyse: ber. für C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>×2CHCl<sub>3</sub>: C: 41,77; H: 5,01; N: 6,96; gef. C: 42,01; H: 5,02; N: 6,98. Die experimentellen Daten stimmen mit den bereits veröffentlichten überein [75].



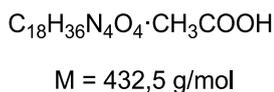
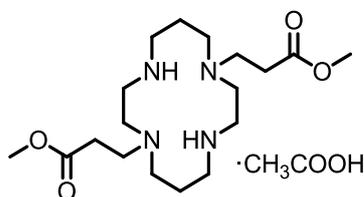
**1,8-Dibenzyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (20).** 456 mg (0,81 mmol) **19** werden 3 h unter Rückfluss in 60 ml einer 3 M NaOH-Lösung erhitzt. Die Lösung wird mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert (4×20 ml), die vereinten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel eingengt. Nach der Gefriertrocknung wird ein farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 91% (280 mg) erhalten. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 91,3 [Bn]<sup>+</sup>; 291,5 [M-Bn]<sup>+</sup>; 381,7 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 7,30-7,16 (m, 10H, H<sub>Ar</sub>); 3,68 (s, 4H, CH<sub>2</sub>Ph); 2,81-2,64 (m, 10H, 4×NCH<sub>2</sub>, 2×NH); 2,58-2,53 (m, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>);

2,49 (t,  $^3J = 6,0$  Hz, 4H,  $2 \times \text{NCH}_2$ ); 1,84-1,76 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz):  $\delta = 137,5$ ; 129,8; 128,3; 127,2 ( $5 \times \text{C}_{\text{Ar}}$ ); 58,0 ( $\text{CH}_2\text{Ph}$ ); 54,3, 51,8; 50,4; 47,9 ( $8 \times \text{NCH}_2$ ); 26,2 ( $-\text{CH}_2-$ ) ppm. Die experimentellen Daten stimmen mit den bereits veröffentlichten überein [75].



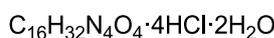
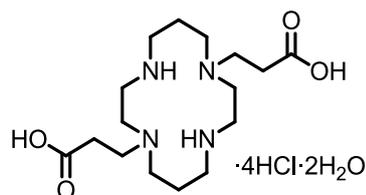
### 1,8-Dibenzyl-4,11-di(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (32).

500 mg (1,31 mmol) von Verbindung **20** werden in 8 ml abs. EtOH gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 322  $\mu\text{l}$  (5,25 mmol) Methylacrylat. Die Lösung wird 4 h bei  $60^\circ\text{C}$  im Dunkeln gerührt und dann über Nacht bei RT. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit EtOH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält einen farblosen, kristallinen Feststoff mit einer Ausbeute von 76% (550 mg). MS (ESI $^+$ ):  $m/z = 91,3$  [ $\text{Bn}$ ] $^+$ ; 277,7 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^{2+}$ ; 463,8 [ $\text{M}-\text{Bn}$ ] $^+$ ; 553,9 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 7,33$ -7,15 (m, 10H,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ); 3,57 (s, 6H,  $2 \times \text{OCH}_3$ ); 3,49 (s, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2,64 (t,  $^3J = 8,0$  Hz, 4H,  $2 \times \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ); 2,53 (s, 8H,  $4 \times \text{NCH}_2$ ); 2,44 (t,  $^3J = 6,0$  Hz, 8H,  $4 \times \text{NCH}_2$ ); 2,33 (t,  $^3J = 8,0$  Hz, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ); 1,65-1,55 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz):  $\delta = 173,3$  ( $2 \times \text{C}=\text{O}$ ); 140,0; 129,0; 128,2; 128,2; 126,8 ( $10 \times \text{C}_{\text{Ar}}$ ), 59,7 ( $2 \times \text{CH}_2\text{Ph}$ ); 51,5; 51,4; 51,2; 50,9 ( $8 \times \text{NCH}_2$ ); 50,5 ( $2 \times \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ); 32,6 ( $2 \times \text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ ); 23,9 ( $2 \times -\text{CH}_2-$ ) ppm. Elementaranalyse: ber. C: 69,33, H: 10,14, N: 8,75; gef. C: 69,29, H: 10,10, N: 8,76.



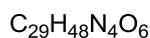
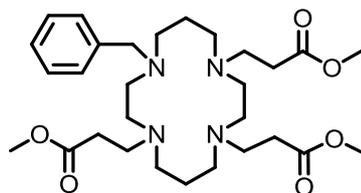
**1,8-Di(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (33).** 550 mg (0,995 mmol) **32** werden in 18 ml einer Mischung aus  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$  (2:1, v:v) gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 110 mg Palladium auf Aktivkohle. Der Reaktionsansatz wird in einer  $\text{H}_2$ -Atmosphäre über Nacht bei RT gerührt. Die

Reaktionslösung wird über Celite filtriert, mit wenig H<sub>2</sub>O gewaschen, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und aus einem Toluol/Dioxan-Gemisch lyophilisiert. Das Produkt liegt als gelber, hygroskopischer Feststoff mit einer Ausbeute von 87% (372,5 mg) vor. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 187,4 [M+H]^{2+}; 373,6 [M+H]^+$ . <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta = 3,64$  (s, 6H, 2×OCH<sub>3</sub>); 3,08-3,21 (m, 8H, 4×NCH<sub>2</sub>); 2,92 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 4H, 2×N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2,69-2,78 (m, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>); 2,61-2,67 (m, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>); 2,37 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>C(O)); 1,82-1,91 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-) ppm.



$$M = 526,3 \text{ g/mol}$$

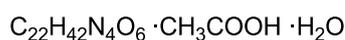
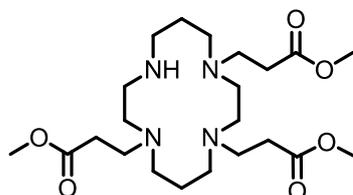
**1,8-Di(2-carboxyethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan tetrahydrochlorid dihydrat (14b).** 372,5 mg (0,86 mmol) **32** werden in 3 ml einer 1 M NaOH-Lösung 8 h bei 50°C gerührt. Das Rohprodukt wird anschließend über ein Anionenaustauscherharz (DOWEX1x8) gegeben, mit H<sub>2</sub>O (8-faches Säulenvolumen) gewaschen und mit 0,5 M HCl eluiert (8-faches Säulenvolumen). Das Produkt liegt als Hydrochlorid vor und ist nach dem lyophilisieren ein farbloses Pulver (303 mg, 67%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 173,4 [M+H]^{2+}; 345,6 [M+H]^+$ . <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta = 3,51$  (t, <sup>3</sup>J = 6,5 MHz, 4H, 2×N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 3,31-3,23 (m, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>); 3,19 (t, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>); 3,11 (t, <sup>3</sup>J = 6,5 MHz, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>); 2,81 (t, <sup>3</sup>J = 6,4 MHz, 4H, 2×CH<sub>2</sub>C(O)); 2,11-2,01 (m, 4H, 2×-CH<sub>2</sub>-) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, 101 MHz):  $\delta = 176,4$  (2×C=O); 49,5 (2×N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 48,1; 46,1; 43,4; 40,8 (8×NCH<sub>2</sub>); 29,4 (2×CH<sub>2</sub>C(O)); 21,0 (2×-CH<sub>2</sub>-) ppm. Elementaranalyse: ber. für C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>·4HCl·2H<sub>2</sub>O: C: 36,51, H: 7,66, N: 10,65; gef. C: 36,42, H: 7,73, N: 10,38.



$$M = 548,7 \text{ g/mol}$$

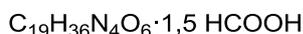
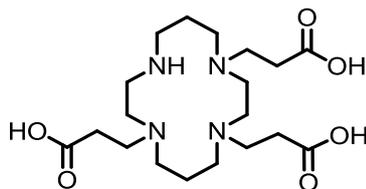
**1-Benzyl-4,8,11-tri(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (35).** 290 mg (1 mmol) **34** werden in 3 ml wasserfreiem Methanol gelöst und eine

Spatelspitze Molsieb zugegeben. Unter Rühren wird langsam eine Lösung aus 1,16 ml (8 mmol) Methylacrylat und 4 Tropfen einer 2,7 M Natriummethanolatlösung in 4 ml Methanol zugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Die Reaktion wird mittels ESI-MS verfolgt. Nach einer Woche wird der Ansatz mit weiteren 0,8 ml einer 2,7 M Natriummethanolatlösung in 1 ml wasserfreiem Methanol versetzt und im Dunkeln 7 d gerührt. Anschließend wird filtriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (456 mg, 83%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 549,7$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta = 7,39$ - $7,20$  (m, 5H, H<sub>Ar</sub>);  $3,72$ - $3,61$  (m, 9H, 3×OCH<sub>3</sub>);  $3,56$  (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph);  $2,81$ - $2,65$  (m, 6H, 3×N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>);  $2,63$ - $2,38$  (m, 22H, 8×NCH<sub>2</sub>, 3×CH<sub>2</sub>C(O));  $1,74$ - $1,58$  (m, 4H, 2×-CH<sub>2</sub>-) ppm.



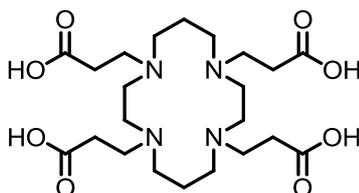
$$M = 536,7 \text{ g/mol}$$

**1,4,8-tri(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (36).** 215 mg (0,39 mmol) **35** werden in 6,5 ml einer CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O-Mischung (1:7, v:v) gelöst, mit 68 mg frisch aktivierter Pd/C versetzt und 18 Stunden bei Raumtemperatur bei einem H<sub>2</sub>-Druck von ca. 1,4 bar gerührt. Der Ansatz wird zentrifugiert, die überstehende Lösung vorsichtig abgetrennt und eingengt. Danach wird die Lösung über Celite gereinigt, mit H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH (1:1, v:v) gewaschen und lyophilisiert. Das Produkt liegt als gelblicher hygroskopischer Feststoff mit einer Ausbeute von 92% (188 mg) vor. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 459,3$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta = 3,72$ - $3,68$  (m, 15H, 3×OCH<sub>3</sub>, 3×N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>);  $2,67$ - $2,46$  (m, 22H, 8×NCH<sub>2</sub>, 3×CH<sub>2</sub>C(O));  $1,77$ - $1,68$  (m, 4H, 2×-CH<sub>2</sub>-) ppm. Elementaranalyse: ber. für C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>×2CH<sub>3</sub>COOH×1,5H<sub>2</sub>O: C: 51,56, H: 8,821, N: 9,25; gef. C: 51,19, H: 8,92, N: 9,44.



$$M = 485,5 \text{ g/mol}$$

**1,4,8-tri(2-carboxyethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (15).** 188 mg **36** werden in 1,65 ml Methanol und 3,5 ml Wasser gelöst. Dann werden 1,71 ml (1,65 mmol) einer 1 M Natronlauge zugetropft. Der Ansatz wird 27 h bei RT gerührt und danach das Lösungsmittel vollständig entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels semipräparativer HPLC (HPLC Methode 1:  $t_R = 16\text{-}26$  min). Das Produkt liegt als ein farbloses Pulver (10,6 mg, 6%) nach dem Lyophilisieren vor. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 417,7$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta = 3,58\text{-}3,26$  (m, 6H, 3×N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 3,12-2,43 (m, 22H, 8×NCH<sub>2</sub>, 3×CH<sub>2</sub>C(O)); 1,99-1,85 (m, 4H, 2×-CH<sub>2</sub>-) ppm. Elementaranalyse: ber. für C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>×1,5HCOOH: C: 50,13, H: 8,61, N: 11,33; gef. C: 50,22, H: 8,23, N: 11,34.

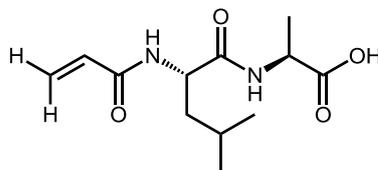


$$M = 488,6 \text{ g/mol}$$

$$M_{16 \cdot \text{H}_2\text{O}} = 506,6 \text{ g/mol}$$

**1,4,8,11-tetra(2-carboxyethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (16).** 328 mg (0,6 mmol) Cyclam-Tetrapropionsäuremethylester (Synthsevorschrift siehe [96]) werden in 2,4 ml einer 1M NaOH suspendiert, wobei das Produkt durch Rühren bei Raumtemperatur innerhalb von 45 min in Lösung geht. Der Ansatz wird filtriert, mit wenig Wasser nachgespült und über einen Kationenaustauscher (Dowex 50W×8, 100-200 mesh) gegeben. Das Produkt wird mit ca. 60 ml Wasser eluiert (pH 4) und das Lösungsmittel eingeeengt. Nach dem Lyophilisieren liegt das Produkt als ein farbloses Pulver (236 mg, 80%) vor. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 489,4$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta = 3,25\text{-}2,95$  (m, 16H, 4×N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, 4×NCH<sub>2</sub>); 2,84 (t, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, 8H, 4×NCH<sub>2</sub>), 2,68 (t, <sup>3</sup>J = 6,5 Hz, 8H, 4×CH<sub>2</sub>C(O)); 2,04-1,87 (m, 4H, 2×-CH<sub>2</sub>-) ppm. Elementaranalyse: ber. für C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>×H<sub>2</sub>O: C: 52,16, H: 8,36, N: 11,06; gef. C: 52,45,

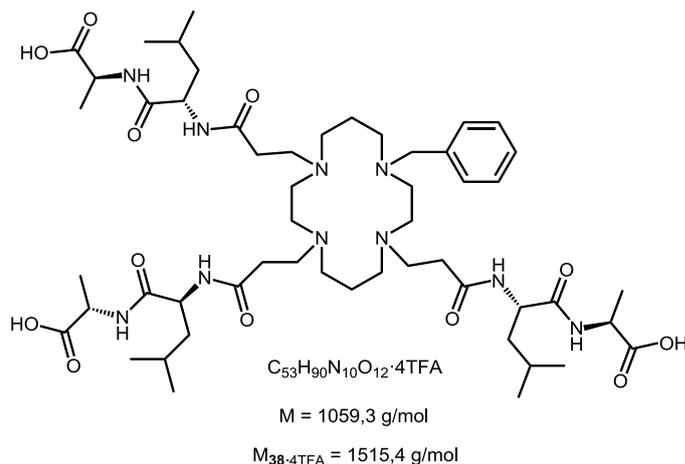
H: 8,17, N: 11,09. Die experimentellen Daten stimmen mit den bereits veröffentlichten überein [25].



$$M = 256,3 \text{ g/mol}$$

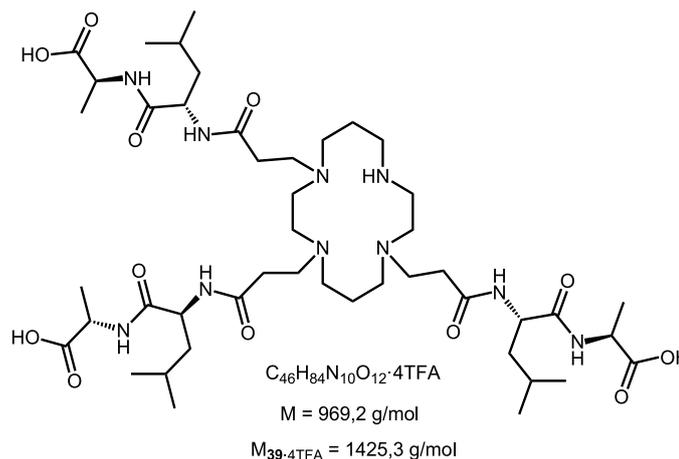
$$M_{\text{Hemimonohydrat}} = 265,3 \text{ g/mol}$$

**Acrylamidyl-(L)-leucyl-(L)-alanin-hemimonohydrat (37).** H-(L)-Leu-(L)-Ala-OH (200 mg, 0,99 mmol) wird in 2 ml einer 1 M NaOH-Lösung gelöst und mit 20  $\mu\text{l}$  Phenolphthalein versetzt. Die rot-violette Lösung wird auf 0 - 4°C im Eisbad gekühlt und schrittweise (2 x 72  $\mu\text{l}$ ) mit Acrylsäurechlorid (1,38 mmol, 144  $\mu\text{l}$ ) versetzt. Entfärbt sich die Lösung nach der ersten Zugabe von Acrylsäurechlorid, wird portionsweise eine 1 M wässrige NaOH zur Lösung hinzugegeben bis der pH-Wert (>8) wieder steigt und die Lösung sich rot-violett färbt. Anschließend erfolgt die zweite Zugabe von Acrylsäurechlorid (72  $\mu\text{l}$ ). Es wird 45 min bei 0 - 4°C und danach nochmal 45 min bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels semi-präparativer HPLC (Methode 3:  $t_R = 15,2 \text{ min}$ ) gereinigt. Nach dem Lyophilisieren liegt ein farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 40% (105 mg) vor. MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 257,2$  [M+H]<sup>+</sup>; 513,4 [2M+H]<sup>+</sup>, 535,4 [2M+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta = 8,30$  (d, <sup>3</sup>J = 7,1 Hz, 1H, NH); 8,20 (d, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, 1H, NH); 6,32 (dd, <sup>3</sup>J = 10,3 Hz, <sup>3</sup>J = 17,2 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>); 6,08 (d, <sup>3</sup>J = 17,2 Hz, 1H, H<sub>trans</sub>); 5,58 (d, <sup>3</sup>J = 10,3 Hz, 1H, H<sub>cis</sub>); 4,45 (q, <sup>3</sup>J = 6,4 Hz, 1H, N-CH-C(O)); 4,23-4,13 (m, 1H, N-CH-C(O)); 1,65-1,56 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,51-1,41 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,27 (d, <sup>3</sup>J = 7,3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>); 0,87 (dd, <sup>3</sup>J = 14,4 Hz, <sup>3</sup>J = 6,4 Hz, 6H, 2xCH<sub>3</sub>) ppm. Elementaranalyse: ber. für C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·0,5H<sub>2</sub>O: C: 54,33, H: 7,98, N: 10,56; gef. C: 54,34, H: 7,54, N: 10,42.



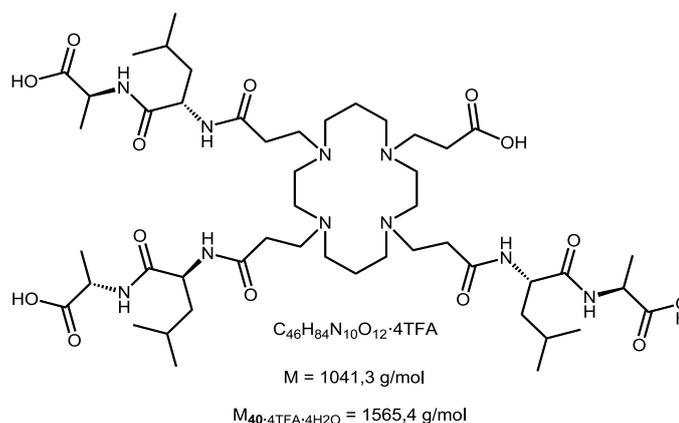
**1-Benzyl-4,8,11-tri(3((L)-alanin-(L)-leucyl)amino-3oxopropyl)-1,4,8,11-**

**tetraazacyclotetradecan Tetra(trifluoracetat) (38).** 38 mg (0,151 mmol) **37** werden in 1,5 ml ention.  $H_2O$  gelöst und mit 1 M NaOH (220  $\mu$ l, 0,22 mmol) versetzt. 11 mg (0,038 mmol) **34** werden in 163  $\mu$ l einer Lösung aus MeOH/ $H_2O$  (3:1, v:v) gelöst und zum Reaktionsansatz dazugegeben. Der Ansatz wird für 3 Tage bei 40°C gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in 5 ml einer Mischung aus  $H_2O$ /ACN/TFA (9:1:0,1, v:v) aufgenommen und mittels semipräparativer HPLC (Methode 4:  $t_R = 19,1$  min.) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung liegt ein farbloser Feststoff vor (29 mg, 50%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 1060,5 [M+H]^+$ . <sup>1</sup>H-NMR ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta = 7,56$ -7,48 (m, 5H,  $H_{Ar}$ ); 4,42 (s, 2H,  $CH_2Ph$ ); 4,16-4,22 (m, 6H, 6×N-CH-C(O)); 3,61-2,56 (m, 28H, 3×NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 3×CH<sub>2</sub>C(O), 8×NCH<sub>2</sub>); 2,12-1,94 (m, 4H, 2×-CH<sub>2</sub>-); 1,71-1,52 (m, 9H, 3×CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3×CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,41-1,29 (m, 9H, 3×CH<sub>3</sub>); 0,93-0,78 (m, 18H, 6×CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.



**1,4,8-tri(3((L)-alanin-(L)-leucyl)amino-3oxopropyl)-1,4,8,11-**

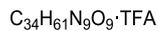
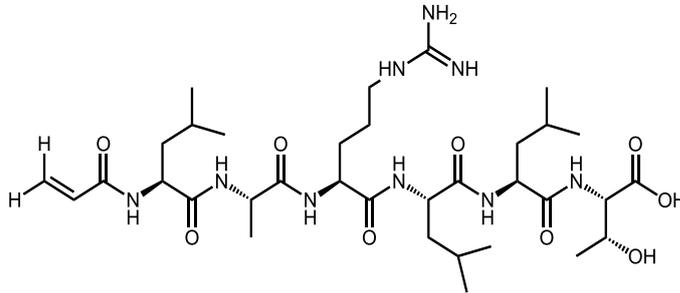
**tetraazacyclotetradecan Tetra(trifluoracetat) (39).** 9 mg (5,94  $\mu\text{mol}$ ) **38** werden in 1,5 ml  $H_2O$  gelöst und 0,9 mg des Katalysators, Palladium auf Aktivkohle, in einen Autoklaven gegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei RT unter  $H_2$ -Atmosphäre bei einem Druck von ca. 1,4 bar hydriert. Das Produkt wird über Kieselgur filtriert und als farbloses Pulver nach der Gefriertrocknung isoliert (8 mg, 94%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 970,3$   $[M+H]^+$ . <sup>1</sup>H-NMR ( $D_2O$ , 400 MHz):  $\delta = 4,30\text{-}4,08$  (m, 6H, 6 $\times$ N-CH-C(O)); 3,49-2,26 (m, 28H, 3 $\times$ NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 3 $\times$ CH<sub>2</sub>C(O), 8 $\times$ NCH<sub>2</sub>); 1,80-1,61 (m, 4H, 2 $\times$ -CH<sub>2</sub>-); 1,59-1,36 (m, 9H, 3 $\times$ CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3 $\times$ CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,49-1,36 (m, 9H, 3 $\times$ CH<sub>3</sub>); 1,00-0,82 (m, 18H, 6 $\times$ CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.



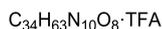
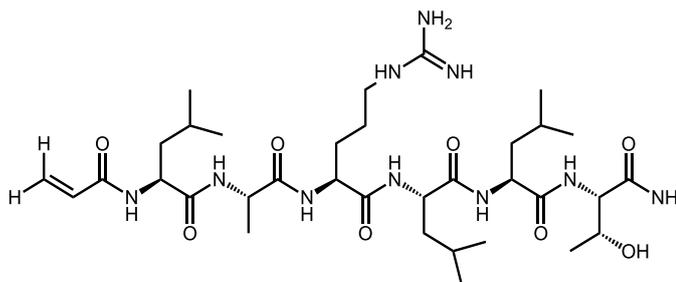
**1,4,8-tri(3((L)-alanin-(L)-leucyl)amino-3oxopropyl)-1,4,8,11-**

**tetraazacyclotetradecan Tetra(trifluoracetat) tetrahydrat (40).** 8 mg (5,61  $\mu\text{mol}$ ) **39** werden in  $CH_3CN$  gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von 9,52  $\mu\text{l}$  DIPEA (0,056 mmol). Nach einem Tag rühren bei 60°C, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels semipräparativer HPLC (Methode 5:  $t_R = 16,6$  min), wobei das Rohprodukt in den Lösungsmitteln der HPLC-Startbedingungen gelöst wird. Nach dem Lyophilisieren liegt das Konjugat als

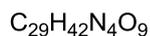
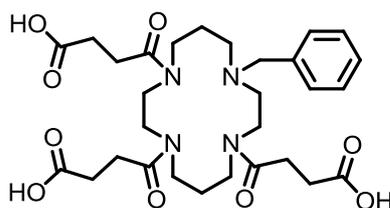
Tetra(trifluoracetat) in Form eines farblosen Pulvers vor (6,4 mg, 73%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 521,8 [M+H]^{2+}$ ,  $1042,4 [M+H]^+$ . Elementaranalyse: ber. für  $C_{46}H_{84}N_{10}O_{12} \times 4TFA \times 4H_2O$ : C: 43,62, H: 6,42, N: 8,92; gef. C: 43,39, H: 6,15, N: 9,29.



**Acrylamidyl-(L)-leucyl-(L)-alanyl-(L)-arginyl-(L)-leucyl-(L)-leucyl-(L)-threonin-trifluoracetat (41).** 5 mg (7,3  $\mu\text{mol}$ ) **29** werden in 181  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH gelöst. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und 1  $\mu\text{l}$  Phenolphthalein als Indikator zugesetzt. Dann werden 1,3  $\mu\text{l}$  (0,016 mmol) Acrylsäurechlorid zugegeben. Entfärbt sich die Lösung, muss portionsweise solange 1 M NaOH dazugegeben werden bis die Lösung rot-violett erscheint. Die Lösung wird 1 h bei 0°C und anschließend 2 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wird das Rohprodukt über eine semipräparative HPLC-Säule (Methode 4:  $t_R = 22,6 \text{ min}$ ) gereinigt. Nach dem Gefriertrocknen lag ein farbloses Pulver vor (1,7 mg, 27%). HPLC MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 740,5 [M+H]^+$ ,  $741,5 [M+2H]^+$ ,  $762,6 [M+Na]^+$ ,  $763,5 [M+H+Na]^+$ . <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta = 6,40\text{-}6,18$  (m, 2H,  $H_{\text{trans}}$ ,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ );  $5,87\text{-}5,77$  (m, 1H,  $H_{\text{cis}}$ );  $4,52\text{-}4,24$  (m, 7H,  $6 \times \text{N-CH-C(O)}$ ,  $\text{CH(OH)}$ );  $3,25\text{-}3,17$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ );  $1,91\text{-}1,49$  (m, 13H,  $3 \times \text{CH}_2\text{CH(CH}_3)_2$ ,  $3 \times \text{CH(CH}_3)_2$ ,  $2 \times \text{-CH}_2\text{-}$ );  $1,44\text{-}1,32$  (m, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $1,24\text{-}1,11$  (m, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $1,00\text{-}0,82$  (m, 18H,  $3 \times \text{CH(CH}_3)_2$ ) ppm.

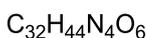
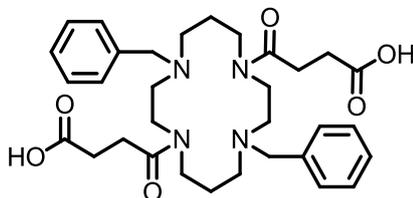


**Acrylamidyl-(L)-leucyl-(L)-alanyl-(L)-arginyl-(L)-leucyl-(L)-leucyl-(L)-threoninamid-trifluoracetat (42).** 9,4 mg (13,7  $\mu\text{mol}$ ) H-D4-NH<sub>2</sub> wurden in 89  $\mu\text{l}$  1 M NaOH gelöst und 200  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O zugesetzt. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und 1  $\mu\text{l}$  Phenolphthalein als Indikator zugegeben. Dann werden 2,55  $\mu\text{l}$  (31,6  $\mu\text{mol}$ ) Acrylsäurechlorid zugegeben. Entfärbt sich die Lösung, muss portionsweise solange 1 M NaOH dazugegeben werden bis die Lösung rot-violett erscheint. Die Lösung wird 2 h bei 0°C und anschließend 2 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wird das Rohprodukt über eine semipräparative HPLC-Säule (Methode 4:  $t_R = 23,2 \text{ min.}$ ) gereinigt. Nach dem Gefriertrocknen wurde ein farbloses Pulver erhalten (4,8 mg, 41%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 741,0$  [M+H]<sup>+</sup>, 742,0 [M+2H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta = 6,40\text{-}6,18$  (m, 2H, H<sub>trans</sub>, CH=CH<sub>2</sub>); 5,87-5,77 (m, 1H, H<sub>cis</sub>); 4,52-4,24 (m, 7H, 6×N-CH-C(O), CH(OH)); 3,25-3,17 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH); 1,91-1,49 (m, 13H, 3×CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3×CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2×-CH<sub>2</sub>-); 1,44-1,32 (m, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,24-1,11 (m, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,00-0,82 (m, 18H, 3×CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.



**11-Benzyl-1,4,8-tri(1-oxo-3-carboxypropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (43).** 21 mg (0,072 mmol) **34** werden in 1 ml CH<sub>3</sub>CN gelöst und mit 59,9  $\mu\text{l}$  (0,432 mmol) NEt<sub>3</sub> versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 21,9 mg (0,217 mmol) Bernsteinsäureanhydrid gelöst in 1 ml CH<sub>3</sub>CN. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt. Anschließend wird das Rohprodukt in Wasser aufgenommen und mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert (3 × 2 ml). Die

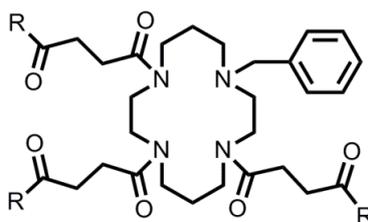
wässrige Phase wird lyophilisiert und es resultiert ein farbloses Pulver (36 mg, 85%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 591,6$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz):  $\delta = 7,65-7,51$  (m, 5H, H<sub>Ar</sub>); 4,51 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph); 3,78-3,27 (m, 16H, 8×NCH<sub>2</sub>); 2,77-2,49 (m, 12H, 3×C(O)CH<sub>2</sub>, 3×CH<sub>2</sub>C(O)); 2,11-1,85 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-) ppm.



M = 580,7 g/mol

**4,11-Dibenzyl-1,8-di(1-oxo-3-carboxypropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan (44).**

10 mg (0,026 mmol) **20** werden in 1 ml CH<sub>3</sub>CN gelöst und mit 14,7  $\mu$ l (0,106 mmol) NEt<sub>3</sub> versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 5,3 mg (0,053 mmol) Bernsteinsäureanhydrid gelöst in 0,1 ml CH<sub>3</sub>CN. Die Reaktion wird über Nacht bei RT gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wird das Rohprodukt in Wasser aufgenommen und mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert (3 × 2 ml). Die wässrige Phase wird lyophilisiert und es resultiert ein farbloses Pulver (12,2 mg, 81%). MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z = 581,7$  [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta = 7,30-7,11$  (m, 10H, H<sub>Ar</sub>); 3,55-3,25 (m, 12H, 2×CH<sub>2</sub>Ph, 4×NCH<sub>2</sub>); 2,64-2,23 (m, 16H, 4×NCH<sub>2</sub>, 2×C(O)CH<sub>2</sub>, 2×CH<sub>2</sub>C(O)); 1,81-1,57 (m, 4H, 2×-CH<sub>2</sub>-) ppm.



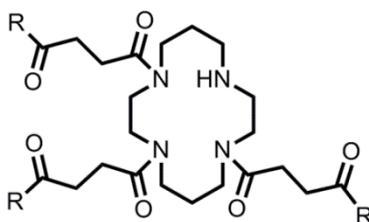
R = Gly-Gly-Gly-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-OH

$C_{272}H_{354}N_{64}O_{72}$

M = 5672,1 g/mol

$M_{4TFA} = 6128,2$  g/mol

**1-Benzyl-4,8,11-tri(3((L)-isoleucin-(L)-valyl-(L)-asparaginy-(L)-glutaminyl-(L)-prolyl-(L)-theronyl-(L)-tyrosyl-(L)-glycyl-(L)-tyrosyl-(L)-tryptophyl-(L)-histidyl-(L)-tyrosyl-(L)-glycyl-(L)-glycyl-(L)-glycyl)amino-3-oxopropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan Tetra(trifluoracetat) (46).** 2 mg (3,39  $\mu$ mol) **43** werden in 1 ml wasserfreiem DMF gelöst und 1,77  $\mu$ l (0,01 mmol) DIPEA und 3,87 mg (0,01 mmol) HATU zugesetzt. Nach 10 min schütteln bei 35°C werden 18 mg (0,011 mmol) des Peptids **30a** zugegeben. Die Reaktion schüttelt über Nacht bei 35°C im Thermoschüttler. Nach Beendigung der Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und mittels semipräparativer HPLC (Methode 7:  $t_R = 16,0$  min.) gereinigt. Das Produkt liegt als Tetra(trifluoracetat) in Form eines farblosen Pulvers (9 mg, 43%) vor. MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure):  $m/z = 5678$ .



R = Gly-Gly-Gly-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Val-Ile-OH

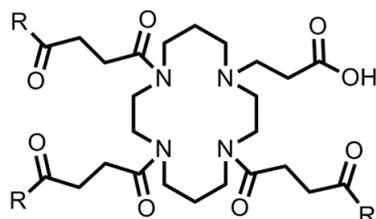
$C_{265}H_{353}N_{64}O_{72}$

M = 5587 g/mol

$M_{4TFA} = 6043$  g/mol

**1,4,8-tri(3((L)-isoleucin-(L)-valyl-(L)-asparaginy-(L)-glutaminyl-(L)-prolyl-(L)-theronyl-(L)-tyrosyl-(L)-glycyl-(L)-tyrosyl-(L)-tryptophyl-(L)-histidyl-(L)-tyrosyl-(L)-glycyl-(L)-glycyl-(L)-glycyl)amino-3-oxopropyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan Tetra(trifluoracetat) (47).** 9 mg (1,47  $\mu$ mol) **46** werden in 1 ml einer Mischung aus

H<sub>2</sub>O/ACN (7:3, v:v) gelöst und 1 mg Pd/C zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre (1,4 bar) hydriert. Die Reinigung erfolgt mittels Zentrifugation, wobei der Rückstand dreimal in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (7:3, v:v) aufgenommen wird. Die Feinfiltration erfolgt über einen Filter (Porengröße = 0,45 µm). Nach der Gefriertrocknung liegt das Produkt als farbloses Pulver vor (9 mg, 98%). MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure):  $m/z = 5614$ .



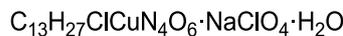
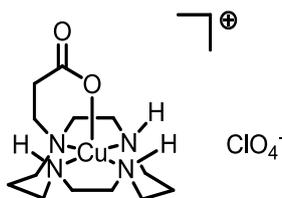
R = Gly-Gly-Gly-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-OH

$C_{268}H_{357}N_{64}O_{74}$

M = 5656 g/mol

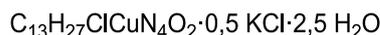
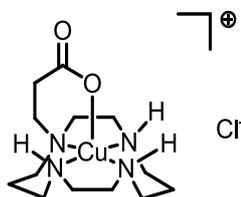
$M_{4TFA} = 6112$  g/mol

**1,4,8-tri(3((L)-isoleucin-(L)-valyl-(L)-asparaginy-(L)-glutaminyl-(L)-prolyl-(L)-theronyl-(L)-tyrosyl-(L)-glycyl-(L)-tyrosyl-(L)-tryptophyl-(L)-histidyl-(L)-tyrosyl-(L)-glycyl-(L)-glycyl-(L)-glycyl)amino-3-oxopropyl)-11-(2-carboxyethyl)-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan Tetra(trifluoracetat) (48).** 9 mg (1,49 µmol) **47** werden in 1 ml einer Mischung aus DMF/H<sub>2</sub>O (10:1, v:v) gelöst und 18 µl 1 M NaOH (14,9 µmol) zugegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe von 0,5 µl Methylacrylat (5,96 µmol). Der Ansatz wird in einem Thermoschüttler bei 50°C über Nacht geschüttelt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt mittel semi-präparativer HPLC (Methode 7:  $t_R = 15,6$  min) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung liegt das Produkt als farbloses Pulver vor (4 mg, 50%). MALDI-TOF-MS (Sinapinsäure) vor HPLC-Reinigung:  $m/z = 5678 [M+Na]^+$ .



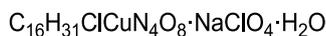
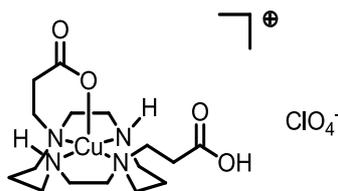
$$M = 574,8 \text{ g/mol}$$

**[Cu<sup>II</sup>-13(CuO<sub>4</sub>)](NaClO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>O).** In einem Kolben werden 50 mg (0,106 mmol) **13** (TE1P·4HCl·3H<sub>2</sub>O) in einer 0,5 M NaOH (0,53 mmol, 1,059 ml) gelöst. Anschließend werden 39 mg (0,106 mmol) Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in 4 ml CH<sub>3</sub>OH gelöst und vereinigt. Die Mischung rührt 2 h bei 50°C und wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Überstand wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und nochmals in 1,5 ml CH<sub>3</sub>OH gelöst. Der Überstand wird über einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße = 0,45 μm) vom unlöslichen Rückstand erneut getrennt. Nach dem Lyophilisieren resultiert ein violettes Pulver [Cu<sup>II</sup>-13(CuO<sub>4</sub>)] mit einer Ausbeute von 80% (49 mg). UV/VIS (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> = 548 nm (126 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 167,6 [M+H]<sup>2+</sup>, 334,2 [M]<sup>+</sup>. Elementaranalyse: ber. für C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>ClCuN<sub>4</sub>O<sub>6</sub>×NaClO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O C: 27,16, H: 5,09, N: 9,75; gef. C: 26,70, H: 4,80, N: 9,20.



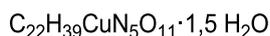
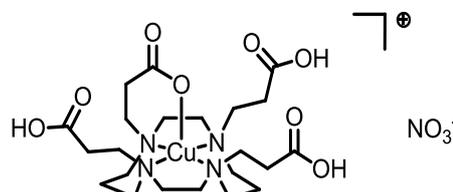
$$M = 452,7 \text{ g/mol}$$

**[Cu<sup>II</sup>-13(Cl)](KCl)<sub>0,5</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2,5</sub>.** In einem Kolben werden 150 mg (0,318 mmol) **13** (TE1P·4HCl·3H<sub>2</sub>O) in einer 1 M wässrigen KOH-Lösung (0,53 mmol, 1,059 ml) gelöst. Anschließend werden 54 mg (0,318 mmol) CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O in 4 ml H<sub>2</sub>O gelöst und vereinigt. Die Mischung rührt über Nacht bei RT. Nach dem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt ist, wird der Rückstand in 3 ml CH<sub>3</sub>OH aufgenommen und für 2 Tage bei 6 °C gekühlt gestellt. Der Überstand wird abfiltriert und lyophilisiert. Es resultiert ein dunkelblaues Pulver Cu<sup>II</sup>-13\_Cl mit einer Ausbeute von 89% (128 mg). UV/VIS (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> = 548 nm (126 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>). IR (D<sub>2</sub>O): 1572 cm<sup>-1</sup>, (fest, ATR): 1570 cm<sup>-1</sup>. MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 334 [M]<sup>+</sup>. Elementaranalyse: ber. für C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>ClCuN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>×0,5KCl×2,5H<sub>2</sub>O C: 34,49, H: 7,12, N: 12,38; gef. C: 34,44, H: 6,88, N: 12,07.



$$M = 646,9 \text{ g/mol}$$

**[Cu<sup>II</sup>-14b(ClO<sub>4</sub>)](NaClO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>O).** In einem Kolben werden 25 mg (0,046 mmol) **14b** in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst und 1,059 ml (0,53 mmol) 1 M NaOH-Lösung dazugegeben. Anschließend werden 54 mg (0,318 mmol) Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in 4 ml H<sub>2</sub>O gelöst und zugegeben. Die Mischung rührt 2 h bei 50°C und wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Überstand wird abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und in 1,5 ml CH<sub>3</sub>OH gelöst. Der Überstand wird über einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße = 0,45 µm) vom unlöslichen Rückstand getrennt. Dieses Vorgehen wird zweimal wiederholt. Nach dem Lyophilisieren resultiert ein dunkelblaues Pulver mit einer Ausbeute von 30% (90 mg). IR (D<sub>2</sub>O, ATR): 1694, 1574 cm<sup>-1</sup>. IR (fest, ATR): 1716, 1557 cm<sup>-1</sup>. UV/VIS (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> = 590 nm (153 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 406 [M]<sup>+</sup>. Elementaranalyse: ber. für C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>ClCuN<sub>4</sub>O<sub>8</sub>·xNaClO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O C: 27,16, H: 5,09, N: 9,75; gef. C: 26,70, H: 4,80, N: 9,21.



$$M = 640,1 \text{ g/mol}$$

**[Cu<sup>II</sup>-16(NO<sub>3</sub>)](H<sub>2</sub>O)<sub>1,5</sub>.** 77 mg (0,16 mmol) **16** werden in 1,5 ml einer 50°C heißen CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O-Lösung (1:1, v/v) gelöst und tropfenweise das in 1,5 ml H<sub>2</sub>O gelöste Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2,5H<sub>2</sub>O (35 mg, 0,16 mmol) hinzugegeben. Der Komplex rührt für 2,5 h bei RT. Nach dem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden ist, wird der Rückstand in 3,6 ml EtOH/H<sub>2</sub>O (35:1, v/v) aufgenommen und durch langsame Diffusion mit Et<sub>2</sub>O zur Kristallisation gebracht. Die türkisen Kristalle werden abfiltriert, mit Et<sub>2</sub>O zweimal gewaschen und getrocknet. Diese waren für eine röntgenkristallografische Strukturaufklärung geeignet. Die Ausbeute lag bei 52% (50 mg). IR (D<sub>2</sub>O, ATR): 1574, 1694 cm<sup>-1</sup>. IR (fest, ATR): 1557, 1689 cm<sup>-1</sup>. UV/VIS (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> = 722 nm (210 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>). MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* = 552,5 [M]<sup>+</sup>. Elementaranalyse: ber. für C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>CuN<sub>5</sub>O<sub>11</sub>·x1,5H<sub>2</sub>O C: 41,28, H: 10,94, N: 6,61; gef. C: 41,34, H: 10,83, N: 6,55.

## 6 Literatur

- [1] Herzog, H.; Rösch, F. PET- und SPECT-Technik. *Pharm. Unserer Zeit* **34** (2005) 468-473.
- [2] Weissleder, R.; Ross, B. D.; Rehemtulla, A.; Gambhir, S. S. "Molecular Imaging. Principles and Practice". People's Medical Publishing House-USA, Shelton, Connecticut, 2010.
- [3] Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452** (2008) 580-589.
- [4] Volkert, W. A.; Hoffman, T. J. Therapeutic Radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **99** (1999) 2269-2292.
- [5] Singh, B. Nuclear data sheets for A = 64. *Nucl. Data Sheets* **108** (2007) 197-364.
- [6] Thieme, S.; Walther, M.; Pietzsch, H.-J.; Henniger, J.; Preusche, S.; Mäding, P.; Steinbach, J. Module-assisted preparation of <sup>64</sup>Cu with high specific activity. *Appl. Radiat. Isot.* **70** (2012) 602-608.
- [7] Apelgot, S.; Coppey, J.; Gaudemer, A.; Grisvard, J.; Guille, E.; Sasaki, I.; Sissoeff, I. Similar lethal effect in mammalian-cells for 2 radioisotopes of copper with different decay schemes, Cu-64 and Cu-67. *Int. J. Radiat. Biol.* **55** (1989) 365-384.
- [8] Okazawa, H.; Yonekura, Y.; Fujibayashi, Y.; Nishizawa, S.; Magata, Y.; Ishizu, K.; Tanaka, F.; Tsuchida, T.; Tamaki, N.; Konishi, J. Clinical application and quantitative evaluation of generator-produced copper-62-PTSM as a brain perfusion tracer for PET. *J. Nucl. Med.* **35** (1994) 1910-1915.
- [9] Fujibayashi, Y.; Taniuchi, H.; Yonekura, Y.; Ohtani, H.; Konishi, J.; Yokoyama, A. Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. *J. Nucl. Med.* **38** (1997) 1155-1160.
- [10] Vavere, A. L.; Lewis, J. S. Cu-ATSM: a radiopharmaceutical for the PET imaging of hypoxia. *Dalton Trans.* (2007) 4893-4902.
- [11] Smith, R. M.; Martell, A. E. Critical Stability Constants, Vol. 1 Plenum Press, New York, (1974) 204-208.
- [12] Parker, D. Tumour Targeting with Radiolabelled Macrocyclic-Antibody Conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **19** (1990) 271-291.
- [13] Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J. Copper Radionuclides and Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine. *Nucl. Med. Biol.* **23** (1996) 957-980.
- [14] Yang, R.; Zompa, L. J. Metal Complexes of Cyclic Triamines. 1. Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane ([9]aneN<sub>3</sub>) with Nickel(II), Copper(II), and Zinc(II). *Inorg. Chem.* **15** (1976) 1499-1502.
- [15] Martell, A. E.; Hancock, R. D.; Motekaitis, R. J. Factors affecting stabilities of chelate, macrocyclic and macrobicyclic complexes in solution. *Coord. Chem. Rev.* **133** (1994) 39-65.
- [16] Bevilacqua, A.; Gelb, R. I.; Hebard, W. B.; Zompa, L. J. Equilibrium and Thermodynamic Study of the Aqueous Complexation of 1,4,7-Triazacyclononane-N,N',N''-triacetic Acid with Protons, Alkaline-Earth-Metal Cations, and Copper(II). *Inorg. Chem.* **26** (1986) 2699-2706.
- [17] Clarke, E. T.; Martell, A. E. Stabilities of the alkaline earth and divalent transition metal complexes of the tetraazamacrocyclic tetraacetic acid ligands. *Inorg. Chim. Acta* **190** (1991) 27-36.
- [18] Fani, M.; Good, S.; Maecke, H. R. *Handbook of Nuclear Chemistry. "Radiometals (non-Tc, non-Re) and Bifunctional Labeling Chemistry"* (Eds., Klencsár, Z.; Lovas, R. G.; Nagy, S.; Rösch, F.; Vértes, A.) Springer Science+Business Media B. V., (2011) Springer US, Dordrecht (Niederlande) 2011.

- [19] Kim, B.-E.; Nevitt, T.; Thiele, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat. Chem. Biol.* **4** (2008) 176-185.
- [20] Rae, T. D.; Schmidt, P. J.; Pufahl, R. A.; Culotta, V. C.; O'Halloran, T. V. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **284** (1999) 805-808.
- [21] Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S. Perspectives in inorganic structural genomics: A trafficking route for copper. *Eur. J. Inorg. Chem.* **8** (2004) 1583-1593.
- [22] Maheshwari, V.; Dearling, J. L. J.; Treves, S. T.; Packard, A. B. Measurement of the rate of copper(II) exchange for  $^{64}\text{Cu}$  complexes of bifunctional chelators. *Inorg. Chim. Acta* **393** (2012) 318-323.
- [23] Boswell, C. A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Rheingold, A. L.; Anderson, C. J. Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *J. Med. Chem.* **47** (2004) 1465-1474.
- [24] Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45** (2006) 2348 – 2368.
- [25] Röhrich, A.; Bergmann, R.; Kretschmann, A.; Noll, S.; Steinbach, J.; Pietzsch, J.; Stephan, H. A novel tetrabrached neurotensin(8-13) cyclam derivative: Synthesis,  $^{64}\text{Cu}$ -labeling and biological evaluation. *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 821-832.
- [26] Alphen, J. v. On aliphatic polyamines IV. *Rec. Trav. Chim.* **56** (1937) 343-350.
- [27] Stetter, H.; Mayer, K.-H. Herstellung und Eigenschaften makrocyclischer Tetramine. *Chem. Ber.* **94** (1961) 1410-1416.
- [28] Robinson, G. H.; Sangokoya, S. A.; Pennington, W. T.; Self, M. F.; Rogers, R. D. Unexpected conformation of the hydrogen chloride salt of [14]aneN<sub>4</sub>: An X-Ray structural examination of [H<sub>2</sub>[14]aneN<sub>4</sub>H<sub>2</sub>]Cl<sub>4</sub> and its role in organoaluminum host-guest chemistry. *J. Coord. Chem.* **19** (1989) 287-294.
- [29] Nave, C.; Truter, M. R. Crystal Structure of the Dihydroperchlorate of 1,4,8,11-Tetra-azacyclotetradecane (Cyclam). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1974) 2351-2354.
- [30] Subramanian, S.; Zaworotko, M. J. Self-assembly of [H<sub>4</sub>(cyclam)]Cl<sub>4</sub> (cyclam = 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) into a 3-D Polymeric Network with Microchannels that sustain a Symmetrical 1-D Polymer of Water Molecules. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1993) 952-954.
- [31] Subramanian, S.; Zaworotko, M. J. Manifestations of noncovalent interactions in the solid state. X-ray crystal structures of [H<sub>4</sub>(cyclam)][FeCl<sub>5</sub>(OH<sub>2</sub>)](Cl<sub>2</sub>) and [H<sub>4</sub>(cyclam)][CF<sub>3</sub>COO]<sub>4</sub>, two network hydrogen bonded solids. *Can. J. Chem.* **71** (1993) 433-440.
- [32] Hancock, R. D.; Motekaitis, R. J.; Mashishi, J.; Cukrowski, L.; Reibenspies, J. H.; Martell, A. E. The unusual protonation constants of cyclam. A potentiometric, crystallographic and molecular mechanics study. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1996) 1925-1929.
- [33] Subramanian, S.; Zaworotko, M. J. Manifestations of noncovalent bonding in the solid state. [H<sub>4</sub>(cyclam)]<sup>4+</sup> (cyclam = 1,4,8,11 tetraazacyclotetradecane) as a template for crystal engineering of network hydrogenbonded solids. *Can. J. Chem.* **73** (1995) 414-24.
- [34] Kodama, M.; Kimura, E. Thermodynamic and Kinetic Effects of 13-Membered Macrocycles. Polarographic Studies of 1,4,7,10-Tetra-azacyclotridecanecopper(II). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1976) 1720-1724.
- [35] Hertli, L.; Kaden, T. A. The Complexation Kinetics of Open Chain and Cyclic Tetraazaligands with Ni<sup>2+</sup> in DMSO and DMF. *Helv. Chim. Acta* **64** (1981) 33-37.

- [36] Hay, R. W.; Norman, P. R. Rates of Incorporation of Nickel(II) into Linear and Macrocyclic Tetraamines in Acetonitrile Solvent, and Comments on the Macrocyclic Effect. *Inorg. Chim. Acta* **45** (1980) L139-L141.
- [37] McLaren, F.; Moore, P.; Wynn, A. M. Rates and Mechanism of Co-ordination of Labile Transition Metal Ions with Tri- and Tetra-azamacrocycles Functionalised with a Single Pendent Co-ordinating 2,2'-Bipyridyl-6-yl-methyl Arm: Evidence for Two-Stage Reactions with Initial Co-ordination of the Pendent Bipyridyl Group. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1989) 798-800.
- [38] Drumhiller, J. A.; Montavon, F.; Lehn, J.-M.; Taylor, R. W. Complexation Kinetics of Highly Substituted Acyclic, Monocyclic, and Bicyclic Tetraamines with Copper(II) in Basic Aqueous Media. *Inorg. Chem.* **25** (1986) 3751-3757.
- [39] Röper, J. R.; Elias, H. Kinetics and Mechanism of Complex Formation with Different N-Methylated 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecanes. *Inorg. Chem.* **31** (1992) 1202-1210.
- [40] Bosnich, B.; Poon, C. K.; Tobe, M. L. Complexes of Cobalt(III) with a Cyclic Tetradentate Secondary Amine. *Inorg. Chem.* **4** (1965) 1102-1108.
- [41] Hunter, T. M.; McNae, I. W.; Liang, X.; Bella, J.; Parsons, S.; Walkinshaw, M. D. Protein recognition of macrocycles: Binding of anti-HIV metalocyclams to lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 2288-2292.
- [42] Sun, X.; Wuest, M.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Reed, D. P.; Boswell, C. A.; Motekaitis, R.; Martell, A. E.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. Radiolabeling and in vivo behavior of copper-64-labeled cross-bridged cyclam ligands. *J. Med. Chem.* **45** (2002) 469-477.
- [43] Jones-Wilson, T. M.; Deal, K. A.; Anderson, C. J.; McCarthy, D. W.; Kovacs, Z.; Motekaitis, R. J.; Sherry, A. D.; Martell, A. E.; Welch, M. J. The in vivo behavior of copper-64-labeled azamacrocyclic complexes. *Nucl. Med. Biol.* **25** (1998) 523-530.
- [44] Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem. Rev.* **110** (2010) 2858-2902.
- [45] Heroux, K. J.; Woodin, K. S.; Tranchemontagne, D. J.; Widger, P. C. B.; Southwick, E.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Tomellini, S. A.; Wadas, T. J.; Anderson, C. J.; Kassel, S.; Golen, J. A.; Rheingold, A. L. The long and short of it: the influence of N-carboxyethyl versus N-carboxymethyl pendant arms on *in vitro* and *in vivo* behavior of copper complexes of cross-bridged tetraamine macrocycles. *Dalton Trans.* (2007) 2150-2162.
- [46] Studer, M.; Kaden, T. A. One-step of mono-N-substituted azamacrocycles with a carboxylic group in the side-chain and their complexes with  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ . *Helv. Chim. Acta* **69** (1986) 2081-2086.
- [47] Lima, L. M. P.; Delgado, R.; Drew, M. G. B.; Brandao, P.; Félix, V. Cyclam derivatives containing three acetate pendant arms: synthesis, acid-base, metal complexation and structural studies. *Dalton Trans.* (2008) 6593-6608.
- [48] Lecomte, C.; Dahaoui-Gindrey, V.; Chollet, H.; Gros, C.; Mishra, A. K.; Barbette, F.; Pullumbi, P.; Guillard, R. Prediction of the Coordination Scheme of Lanthanide N-Tetrasubstituted Tetraazamacrocycles: An X-ray Crystallography and Molecular Modeling Study. *Inorg. Chem.* **36** (1997) 3827-3838.
- [49] Comba, P.; Emmerling, F.; Jakob, M.; Kraus, W.; Kubeil, M.; Morgen, M.; Pietzsch, J.; Stephan, H. Copper(II) chemistry of functionalized macrocycle cyclam tetrapropionic acid. *Dalton Trans.* **42** (2013) 6142-6148.
- [50] Silversides, J. D.; Allan, C. C.; Archibald, S. J. Copper(II) cyclam-based complexes for radiopharmaceutical applications: Synthesis and structural analysis. *Dalton Trans.* (2007) 971-978.
- [51] Helps, I. M.; Parker, D.; Chapman, J.; Ferguson, G. Selective N,N-functionalization of cyclam: Crystal structure of  $\text{Cu}^{2+}$  complex of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,8-diacetic acid and the tricyclic lactam 15,18-dioxo-

- 1,5,8,12-tetra-azatricyclo[10.2.2.2<sup>5,8</sup>]tetradecane. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1988) 1094-1095.
- [52] Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Hill, D. C.; Reed, D. P.; Rogers, M. E.; Condon, J. S.; Fagan, M. A.; Calabrese, J. C.; Lam, K.-C.; Guzei, I. A.; Rheingold, A. L. Synthesis and characterization of cross-bridged cyclams and pendant-armed derivatives and structural studies of their copper(II) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 10561-10572.
- [53] Woodin, K. S.; Heroux, K. J.; Boswell, C. A.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Niu, W.; Tomellini, S. A.; Anderson, C. J.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. Kinetic inertness and electrochemical behavior of copper(II) tetraazamacrocyclic complexes: Possible implications for *in vivo* stability. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2005) 4829-4833.
- [54] Kotek, J.; Lubal, P.; Hermann, P.; Císarová, I.; Lukes, I.; Godula, T.; Svobodova, I.; Táborský, P.; Havel, J. High Thermodynamic Stability and Extraordinary Kinetic Inertness of Copper(II)Complexes with 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane-1,8-bis(methylphosphonic acid): Example of a Rare Isomerism between Kinetically Inert Penta- and Hexacoordinated Copper(II)Complexes. *Chem. Eur. J.* **9** (2003) 233-248.
- [55] Pandya, D. N.; Kim, J. Y.; Park, J. C.; Lee, H.; Phapale, P. B.; Kwak, W.; Choi, T. H.; Cheon, G. J.; Yoon, Y.-R.; Yoo, J. Revival of TE2A; a better chelate of Cu(II) ions than TETA? *Chem. Commun.* **46** (2010) 3517-3519.
- [56] Bernardo, M. M.; Heeg, M. J.; Schroeder, R. R.; Ochrymowycz, L. A.; Rorabacher, D. B. Comparison of the Influence of Saturated Nitrogen and Sulfur Donor Atoms on the Properties of Copper(II/I)-Macrocyclic Polyamino Polythiaether Ligand Complexes: Redox Potentials and Protonation and Stability Constants of Cu<sup>I</sup>L Species and New Structural Data. *Inorg. Chem.* **31** (1992) 191-198.
- [57] Miyoshi, K.; Tanaka, H.; Kimura, E.; Tsuboyama, S.; Murata, S.; Shimizu, H.; Ishizu, K. Electrochemical and Spectroscopic Studies on Copper(II) Complexes of Macrocyclic Ligands as Models for Square-Pyramidal Metal Active Sites of Copper(II) Complexes of Bleomycin and Glutathione. *Inorg. Chim. Acta* **78** (1983) 23-30.
- [58] Ambundo, E. A.; Deydier, M.-V.; Grall, A. J.; Aguera-Vega, N.; Dressel, L. T.; Cooper, T. H.; Heeg, M. J.; Ochrymowycs, L. A.; Rorabacher, D. B. Influence of Coordination Geometry upon Copper(II/I) Redox Potentials. Physical Parameters for Twelve Copper Tripodal Ligand Complexes. *Inorg. Chem.* **38** (1999) 4233-4242.
- [59] Born, K.; Comba, P.; Ferrari, R.; Lawrance, G. A.; Wadepohl, H. Stability constants: A new twist in transition metal bispidine chemistry. *Inorg. Chem.* **46** (2007) 458-464.
- [60] Wadas, T. J.; Anderson, C. J. Radiolabeling of TETA- and CB-TE2A-conjugated peptides with copper-64. *Nat. Protoc.* **1** (2006) 3062-3068.
- [61] Machulla, H.-J. PET-Diagnostika in der Onkologie. *Pharm. Unserer Zeit* **34** (2005) 490-497.
- [62] Moriya, M.; Ho, Y.-H.; Grana, A.; Nguyen, L.; Alvarez, A.; Jamil, R.; Ackland, M. L.; Michalczyk, A.; Hamer, P.; Ramos, D.; Kim, S.; Mercer, J. F. B.; Linder, M. C. Copper is taken up efficiently from albumin and  $\alpha$ 2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295** (2008) C708-C721.
- [63] Lau, S.-J.; Sarkar, B. Ternary Coordination Complex between Human Serum Albumin, Copper (II), and L-Histidine. *J. Biol. Chem.* **246** (1971) 5938-5943.
- [64] Masuoka, J.; Hegenauer, J.; Dyke, B. R. V.; Saltman, P. Intrinsic Stoichiometric Equilibrium Constants of the Binding of Zinc(II) and Copper(II) to the High Affinity Site of Serum Albumin. *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 21533-21587.

- [65] Herzog, D. Die Bedeutung von Kupfer im menschlichen Körper: eine kurze Übersicht. *Schweiz. Z. Ernährungsmed.* **8** (2010) 30-34.
- [66] Sato, M.; Gitlin, J. D. Mechanisms of Copper Incorporation During the Biosynthesis of Human Ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 5128-5134.
- [67] Linder, M. C.; Lomeli, N. A.; Donley, S.; Mehrbod, F.; Cerveza, P.; Cotton, S.; Wotten, L. "Copper Transport and its disorders: Molecular and Cellular Aspects" in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, Vol. 448 (Eds., A. Leone; Mercer, J. F. B.) Kluwer Academic / Plenum Publ., New York, 1999, 1-16.
- [68] Denat, F.; Brandès, S.; Guillard, R. Strategies for the Regioselective N-Functionalization of Tetraazacycloalkanes. From Cyclam and Cyclen Towards More Sophisticated Molecules. *Synlett* (2000) 561-574.
- [69] Meunier, I.; Mishra, A. K.; Hanquet, B.; Cocolios, P.; Guillard, R. Synthesis and characterization of various unsubstituted and mono-N-substituted tetraazamacrocycles. *Can. J. Chem.* **73** (1995) 685-695.
- [70] Siegfried, L.; McMahon, C. N.; Kaden, T. A.; Palivanb, C.; Gescheidt, G. Tren centered tris-macrocycles as polytopic ligands for Cu(II) and Ni(II). *Dalton Trans.* (2004) 2115-2124.
- [71] Li, C.; Wong, W.-T. A convenient method for the preparation of mono N-alkylated cyclams and cyclens in high yields. *Tetrahedron Letters* **43** (2002) 3217-3220.
- [72] Bulach, V.; Mandon, D.; Fischer, J.; Weiss, R. The high yield synthesis of N-tetrapropionic methyl ester, acid and carboxylate derivatives of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, and molecular structure of the tetramethylpropionate ester dication. *Inorg. Chim. Acta* **210** (1993) 7-9.
- [73] Helps, I. M.; Parker, D.; Morphy, J. R.; Chapman, J. General routes for the synthesis of Mono, Di and Tri-N-substituted derivatives of cyclam. *Tetrahedron* **45** (1989) 219-226.
- [74] Alder, R. W.; Heilbronner, E.; Honegger, E.; McEwen, A. B.; Moss, R. E.; Olefirowicz, E.; Petillo, P. A.; Sessions, R. B.; Weisman, G. R.; White, J. M.; Yang, Z.-Z. The out, out to out, in transition for 1,(n+2)-diazabicyclo[n.3.1]alkanes. *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 6580-6591.
- [75] Royal, G.; Dahaoui-Gindrey, V.; Dahaoui, S.; Tabard, A.; Guillard, R.; Pullumbi, P.; Lecomte, C. New synthesis of *trans*-disubstituted cyclam macrocycles-Elucidation of the disubstitution mechanism on the basis of X-ray data and molecular modeling. *Eur. J. Org. Chem.* (1998) 1971-1975.
- [76] Bellouard, F.; Chuburu, F.; Kervarec, N.; Toupet, L.; Triki, S.; Mest, Y. L.; Handel, H. *cis*-Diprotected cyclams and cyclens: A new route to symmetrically or asymmetrically 1,4-disubstituted tetraazamacrocycles and to asymmetrically tetrasubstituted derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1999) 3499-3505.
- [77] Cocolios, P.; Guillard, R.; Gros, C., **Patent: WO 96/11189** (1996).
- [78] Fani, M.; Mäcke, H. R. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **39** (2012) S11-S30.
- [79] Fani, M.; Mäcke, H. R.; Orkavi, S. M. Radiolabelled Peptides: Valuable Tools for the Detection and Treatment of Cancer. *Theranostics* **2** (2012) 481-501.
- [80] Tweedle, M. F. Peptide-Targeted Diagnostics and Radiotherapeutics. *Acc. Chem. Res.* **42** (2009) 958-968.
- [81] Ambrosini, V.; Fani, M.; Fanti, S.; Forrer, F.; Mäcke, H. R. Radiopeptide imaging and therapy in Europe. *J. Nucl. Med.* **52** (2011) 42S-52S.
- [82] Laverman, P.; Sosabowski, J. K.; Boerman, O. C.; Oyen, W. J. G. Radiolabelled peptides for oncological diagnosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **39** (2012) 78-92.
- [83] Vavere, A. L.; Rossin, R. Molecular imaging of cancer with radiolabeled peptides and PET. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **12** (2012) 4672-475.

- [84] Anderson, C. J.; Ferdani, R. Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Cancer: Advances in Preclinical and Clinical Research. *Cancer Biother. Radiopharm.* **24** (2009) 379-393.
- [85] Lewis, J. S.; Lewis, M. R.; Srinivasan, A.; Schmidt, M. A.; Wang, J.; Anderson, C. J. Comparison of Four <sup>64</sup>Cu-Labeled Somatostatin Analogues in Vitro and in a Tumor-Bearing Rat Model: Evaluation of New Derivatives for Positron Emission Tomography Imaging and Targeted Radiotherapy. *J. Med. Chem.* **42** (1999) 1341-1347.
- [86] Bass, L. A.; Wang, M.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver. *Bioconjugate Chem.* **11** (2000) 527-532.
- [87] Sprague, J. E.; Peng, Y.; Sun, X.; Weisman, G. R.; Wong, E. H.; Achilefu, S.; Anderson, C. J. Preparation and biological evaluation of copper-64-labeled Tyr3-octreotate using a cross-bridged macrocyclic chelator. *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 8674-8682.
- [88] Ginj, M.; Zhang, H.; Waser, B.; Cescato, R.; Wild, D.; Wang, X.; Erchegyi, J.; Rivier, J.; Mäcke, H. R.; Reubi, J. C. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (2006) 16436-16441.
- [89] Wadas, T. J.; Eiblmaier, M.; Zheleznyak, A.; Sherman, C. D.; Ferdani, R.; Liang, K.; Achilefu, S.; Anderson, C. J. Preparation and biological evaluation of <sup>64</sup>Cu-CB-TE2A-sst<sub>2</sub>-ANT, a somatostatin antagonist for PET imaging of somatostatin receptor-positive tumors. *J. Nucl. Med.* **49** (2008) 1819-1887.
- [90] García-Garayoa, E.; Allemann-Tannahill, L.; Bläuenstein, P.; Willmann, M.; Carrel-Rémy, N.; Tourwé, D.; Iterbeke, K.; Conrath, P.; Schubiger, P. A. In vitro and in vivo evaluation of new radiolabeled neurotensin(8-13) analogues with high affinity for NT1 receptors. *Nucl. Med. Biol.* **28** (2001) 75-84.
- [91] Carraway, R.; Leeman, S. Isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* **248** (1973) 6854-6861.
- [92] Granier, C.; Vanrietschoten, J.; Kitabgi, P.; Poustis, C.; Freychet, P. Synthesis and characterization of neurotensin analogs for structure activity relationship studies - acetylneurotensin-(8-13) is the shortest analog with full binding and pharmacological activities. *Eur. J. Biochem.* **124** (1982) 117-124.
- [93] Bracci, L.; Falciani, C.; Lelli, B.; Lozzi, L.; Runci, Y.; Pini, A.; Montis, M. D.; Tagliamonte, A.; Neri, P. Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 46590-46595.
- [94] García-Garayoa, E.; Bläuenstein, P.; Blanc, A.; Maes, V.; Tourwé, D.; Schubiger, P. A. Stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol.* **36** (2009) 37-47.
- [95] Maes, V.; Garcia-Garayoa, E.; Bläuenstein, P.; Tourwé, D. Novel Tc-99m-labeled neurotensin analogues with optimized biodistribution properties. *J. Med. Chem.* **49** (2006) 1833-1836.
- [96] Röhrich, A. Dissertation, "Synthese und Charakterisierung Cyclam-basierter Multimere als Basis für Radiopharmaka", angefertigt im Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, TU Dresden, 2009.
- [97] Aronin, N.; Carraway, R.; Ferris, C.; Hammer, R.; Leeman, S. The stability and metabolism of intravenously administered neurotensin in the rat. *Peptides* **3** (1982) 637-642.
- [98] Bläuenstein, P.; Garayoa, E. G.; Rüegg, D.; Blanc, A.; Tourwé, D.; Beck-Sickingler, A.; Schubiger, P. A. Improving the Tumor Uptake of <sup>99m</sup>Tc-Labeled Neuropeptides Using Stabilized Peptide Analogues. *Cancer Biother. Radio.* **19** (2004) 181-188.
- [99] Gschwind, A.; Fischer, O. M.; Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4** (2004) 361-370.

- [100] Herbst, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol.* **59** (2004) S21-S26.
- [101] Carpenter, G.; Cohen, S. Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 7709-7712.
- [102] Li, Z.; Zhao, R.; Wu, X.; Sun, Y.; Yao, M.; Li, J.; Xu, Y.; Gu, J. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *Faseb J.* **19** (2005) 1978-185.
- [103] Song, S.; Liu, D.; Peng, J.; Deng, H.; Guo, Y.; Xu, L. X.; Miller, A. D.; Xu, Y. Novel peptide ligand directs liposomes toward EGF-R high-expressing cancer cells in vitro and in vivo. *Faseb J.* **23** (2009) 1396-1404.
- [104] Ongarora, B. G.; Fontenot, K. R.; Hu, X.; Sehgal, I.; Satyanarayana-Jois, S. D.; Vicente, M. G. H. Phthalocyanine-Peptide Conjugates for Epidermal Growth Factor Receptor Targeting. *J. Med. Chem.* **55** (2012) 3725-3738.
- [105] Rascalou, F.; Denat, F.; Guillard, R.; Babouhot, J.-L.; Chollet, H.; Meyer, M., **Patent: WO/2008/099114** (2008).
- [106] Spingler, B.; Schnidrig, S.; Todorova, T.; Wild, F. Some thoughts about the single crystal growth of small molecules. *CrystEngComm* **14** (2012) 751-757.
- [107] Chapman, J.; Ferguson, G.; Gallagher, J. F.; Jennings, M. C.; Parker, D. Copper and Nickel Complexes of 1,8-Disubstituted Derivatives of 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecane. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1992) 345-353.
- [108] Tonei, D. M.; Ware, D. C.; Brothers, P. J.; Plieger, P. G.; Clarka, G. R. Coordination chemistry of 1,4-bis-carboxymethylcyclam, H<sub>2</sub>(1,4-bcc). *Dalton Trans.* (2006) 152-158.
- [109] Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; Rijn, J. v.; Verschoor, G. C. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Copper(II) Compounds containing Nitrogen-Sulphur Donor Ligands; the Crystal and Molecular Structure of Aqua[1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane] copper(II) Perchlorate. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1984) 1349-1356.
- [110] Hollemann, A. F.; Wiberg, N. "Lehrbuch der anorganischen Chemie", Vol. 102 de Gruyter, New York/ Berlin, 2007.
- [111] Pinkert, I. Dissertation "Kupfer(II)-Koordinationspolymere mit Amididen" Universität zu Köln (2011).
- [112] Haaf, C. M. Dissertation, "Bispidinliganden - Die 2. Generation" Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2009.
- [113] Barbucci, R.; Campbell, M. J. M. EPR Spectra of Trigonal Bipyramidal Copper(II) Species Cu(R<sub>6</sub>tren)X<sup>+</sup>. *Inorg. Chim. Acta* **15** (1975) L15-L16.
- [114] Glaus, C.; Rossin, R.; Welch, M. J.; Bao, G. In Vivo Evaluation of Cu-64-Labeled Magnetic Nanoparticles as a Dual-Modality PET/MR Imaging Agent. *Bioconjugate Chem.* **21** (2010) 715-722.
- [115] Shokeen, M.; Fettig, N. M.; Rossin, R. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of radiolabeled nanoparticles. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **52** (2008) 267-277.
- [116] Ma, D.; Lu, F.; Overstreet, T.; Milenic, D. E.; Brechbiel, M. W. Novel chelating agents for potential clinical applications of copper. *Nucl. Med. Biol.* **29** (2002) 91-105.
- [117] Gasser, G.; Tjoe, L.; Graham, B.; Belousoff, M. J.; Juran, S.; Walther, M.; Künstler, J.-U.; Bergmann, R.; Stephan, H.; Spiccia, L. Synthesis, Copper(II) Complexation, <sup>64</sup>Cu-Labeling, and Bioconjugation of a New Bis(2-pyridylmethyl) Derivative of 1,4,7-Triazacyclononane. *Bioconjugate Chem.* **19** (2008) 719-730.
- [118] Wedler, G. "Lehrbuch der Physikalischen Chemie" Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.
- [119] Morphy, J. R.; Parker, D.; Katakya, R.; Eaton, M. A. W.; Millican, A. T.; Alexander, R.; Harrison, A.; Walker, C. Towards Tumour Targeting with Copper-radiolabelled Macrocyclic Antibody Conjugates: Synthesis, Antibody Linkage, and Complexation Behaviour. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1990) 573-585.

- 
- [120] Bradshaw, R. A.; Peters, T. The Amino Acid Sequence of Peptide (1-24) of Rat and Human Serum Albumins. *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 5582-5589.
- [121] Iwakura, Y.; Toda, F.; Suzuki, H. Synthesis of N-[1-(1-Substituted 2-oxopropyl)]acrylamides and -methacrylamides. Isolation and Some Reactions of Intermediates of the Dakin-West Reaction. *J. Org. Chem.* **32** (1967).
- [122] King, I.; Sartorelli, A. C. Epidermal growth factor receptor gene expression, protein kinase activity. *Cancer Res.* **49** (1989) 5677-5681.
- [123] Novy, Z.; Barta, P.; Mandikova, J.; Laznicek, M.; Trejtnar, F. A comparison of in vitro methods for determining the membrane receptor expression in cell lines. *Nucl. Med. Biol.* **39** (2012) 893-896.
- [124] Sanders, J. M.; Wampole, M. E.; Thakur, M. L.; Wickstrom, E. Molecular Determinants of Epidermal Growth Factor Binding: A Molecular Dynamics Study. *PLoS One* **8** (2013) 1-12.
- [125] Thieme, S. Dissertation, "Untersuchungen zu Herstellungsverfahren für die Radiometallnuklide Cu-61, Cu-64, Cu-67 und Ga-68 angefertigt im Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, TU Dresden, 2013.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis und verwendete Symbole

A	Aktivität (Einheit: MBq)
$A_s$	spezifische Aktivität (Einheit: GBq/ $\mu$ mol) Aktivität pro eingesetzter Stoffmenge an zu markierender Verbindung
A-Konstante	Kopplungskonstante (Einheit: G)
as	antisymmetrisch
Atox1	Antioxidants 1
ATP	Adenosintriphosphat
ATSM	Diacetyl-2,3-bis(4- <i>N</i> -methyl-3-thiosemicarbazon)
Äq.	Äquivalente
$\beta^+$	Positronenstrahlung
$\beta^-$	Elektronenstrahlung
$B_{max}$	maximale Anzahl der Bindungsstellen
BSA	Bovines Serumalbumin ( <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)
$\gamma$	Gammastrahlung
$c$	Konzentration
CB-TE2A	Cross-bridged 4,11-Bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecan
Ccs	<u>C</u> opper <u>c</u> haperone for <u>s</u> uperoxide dismutase
COMMD1	<u>C</u> opper <u>m</u> etabolism ( <u>m</u> urr1) <u>d</u> omain containing 1
CP	Caeruloplasmin
Ctr1	<u>C</u> opper <u>t</u> ransporter 1
CV	Cyclovoltammetrie
Cyclam	1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan
Cyclen	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan
d	Duplett
dd	Doppelduplett
$D$	Verteilungskoeffizient
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-Tetra(carboxymethyl)-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan
DTPA	2-[Bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]amino]essigsäure (Diethylentriaminpentaessigsäure)

---

$E$	Extinktion (dimensionslos)
$E_{1/2}$	Standardpotential (Einheit: V)
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient (Einheit: $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
EDTA	2-[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl-(carboxymethyl)amino]essigsäure (Ethylen-diamin-tetraacetat)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (engl. E_pidermal G_rowth F_actor R_eceptor)
ESI-MS	Elektrospray Massenspektrometrie
ESR	Elektronenspinresonanz
EtOH	Ethanol
$f$	Frequenz
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
$g$ -Faktor	gyromagnetischer Faktor (dimensionslos)
GRP	Gastrin Releasing Peptide
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
$IC_{50}$	Inhibitorkonzentration, um 50% eines Liganden vom Rezeptor zu verdrängen
Ile	Isoleucin
IR	Infrarot
$k$	Geschwindigkeitskonstante
$K_{ML}$	Stabilitätskonstante
$K_d$	Dissoziationskonstante
$\lambda$	Wellenlänge (Einheit: nm)
Leu	Leucin
m	Multiplett
Ma.-%	Massenprozent
MALDI-TOF-MS	matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometrie (engl. <u>m</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser- <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onization <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometry with <u>t</u> ime- <u>o</u> f- <u>f</u> light)
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MT	Metallthionin
MRT	Magnetresonanztomographie
$\nu$	Wellenzahl (Einheit: $cm^{-1}$ )
NHE	Normal-Wasserstoffelektrode
NMR	Kernspinresonanz (engl. <u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance)

---

NOTA	1,4,7-Tri(carboxymethyl)-1,4,7-triazacyclononan
NTR1	Neurotensin Rezeptor 1
OC	Octreotid
$pK_s$	negativer dekadischer Logarithmus von der Säurenkonstante
ppm	parts per million
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PTSM	Pyruvaldehyd-bis(4 <i>N</i> -methyl-3-thiosemicarbazon)
$R_f$	Retentionsfaktor
Radio-DC	Dünnschichtchromatographie für radioaktive Substanzen
Radio-HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie für radioaktive Substanzen
RCA	radiochemische Ausbeute
RCR	radiochemische Reinheit
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdoceylsulfat (engl. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SHE	Standard-Wasserstoffelektrode
SOD	Superoxid-Dismutase
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl. <u>S</u> ingle- <u>p</u> hoton <u>e</u> mission <u>c</u> omputed <u>t</u> omography)
sst <sub>2</sub> -ANT	Somatostatin Antagonist
SSTR2	Somatostatin Rezeptor Subtyp 2 (Agonist)
SUV	standardized uptake value → quantifizierter Vergleichsparameter, um eine normierte zeit- und gewichtsunabhängige Radioaktivitätsverteilung zu erhalten (berücksichtigt Zerfall, verabreichte Dosis und Gewicht)
$\tau$	Trigonalität
t	Triplet
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_R$	Retentionszeit
TACN	1,4,7-Triazacyclononan
TBS	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
TBST	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline with <u>T</u> ween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TETA	1,4,8,11-Tetra(carboxymethyl)-1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan
T/B	Tumor-zu-Blut Verhältnis
TFA	Trifluoressigsäure
T/M	Tumor-zu-Muskel Verhältnis
TMC	<i>N,N,N',N''</i> -Tetramethylcyclam
Thr	Threonin

---

TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TSTU	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -( <i>N</i> -succinimidyl)uronium tetrafluoroborat
Tyr	Tyrosin
U	innere Energie (Einheit: kJ/mol)
UV/VIS	<u>U</u> ltraviolett/sichtbarer Spektralbereich (engl. <u>v</u> isible)
Vol.-%	Volumenprozent
Y3-TATE	Tyrosine <sup>3</sup> -Octreotat
ZNS	Zentralnervensystem

## 7.2 Kristallstrukturdaten

Tabelle Anhang 1: Kristallstrukturdaten von  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_2\mathbf{14b})]^{2+}$

Identifikationsnummer	Ro36
Summenformel	$\text{C}_{19}\text{H}_{44}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_{15}$
Molmasse [g/mol]	703,02
Temperatur [K]	216(2)
Wellenlänge [Å]	0,71073
Kristallsystem, Raumgruppe	monoklin, P2(1)/n
Dimension der Elementarzelle [Å, °]	$a = 9,4292(14)$ , $b = 23,552(4)$ , $c = 14,420(2)$ $\alpha = 90$ , $\beta = 98,329(10)$ , $\gamma = 90$
Volumen [Å <sup>3</sup> ]	3168,6(8)
Z	4
berechnete Dichte [g/cm <sup>-3</sup> ]	1,474
Absorptionskoeffizient [mm <sup>-1</sup> ]	0,928
$\theta$ - Bereich [°]	1,67 – 28,34
	$-12 \leq h \leq 12$
Indexbereich	$-31 \leq k \leq 28$
	$-18 \leq l \leq 19$
Reflektion gemessen/ unabhängig	37365/ 7768 [R(int) = 0,11400]
Verfeinerte Methode	Methode der kleinsten Quadrate (F <sup>2</sup> )
Daten/ Einschränkungen/ Parameter	7768/ 3/ 391
F <sup>2</sup> -Anpassungstest	0,949
R-Indizes [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0,0799, wR2 = 0,1963
R-Indizes (aller Daten)	R1 = 0,1531, wR2 = 0,2274
Rasterelektronendichte [e/ Å <sup>3</sup> ]	1,060 und -0,535

Tabelle Anhang 2: Kristallstrukturdaten von  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_3\mathbf{16})]^+$ 

Identifikationsnummer	Ro11
Summenformel	$\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{CuN}_5\text{O}_{12}$
Molmasse [g/mol]	631,14
Temperatur [K]	273(2)
Wellenlänge [Å]	0,71073
Kristallsystem, Raumgruppe	orthorhombisch, Pbca (Nr.61)
Dimension der Elementarzelle [Å, °]	$a = 17,319(13)$ , $b = 15,007(13)$ , $c = 21,514(7)$ $\alpha = 90$ , $\beta = 90$ , $\gamma = 90$
Volumen [Å <sup>3</sup> ]	5529(8)
Z	8
berechnete Dichte [g/cm <sup>-3</sup> ]	1,499
Absorptionskoeffizient [mm <sup>-1</sup> ]	0,851
$\theta$ - Bereich [°]	1,89 – 27,50
Indexbereich	$-21 \leq h \leq 17$ $-19 \leq k \leq 12$ $-25 \leq l \leq 27$
Reflektion gemessen/ unabhängig	17384/ 6209 [R(int) = 0,2572]
Verfeinerte Methode	Methode der kleinsten Quadrate ( $F^2$ )
Daten/ Einschränkungen/ Parameter	6209/ 3/ 370
$F^2$ -Anpassungstest	0,935
R-Indizes [ $ I  > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0,0587, wR2 = 0,0708
R-Indizes (aller Daten)	R1 = 0,2966, wR2 = 0,0950
Rasterelektronendichte [e/ Å <sup>3</sup> ]	0,475 und -0,403

### 7.3 IR-Spektroskopie

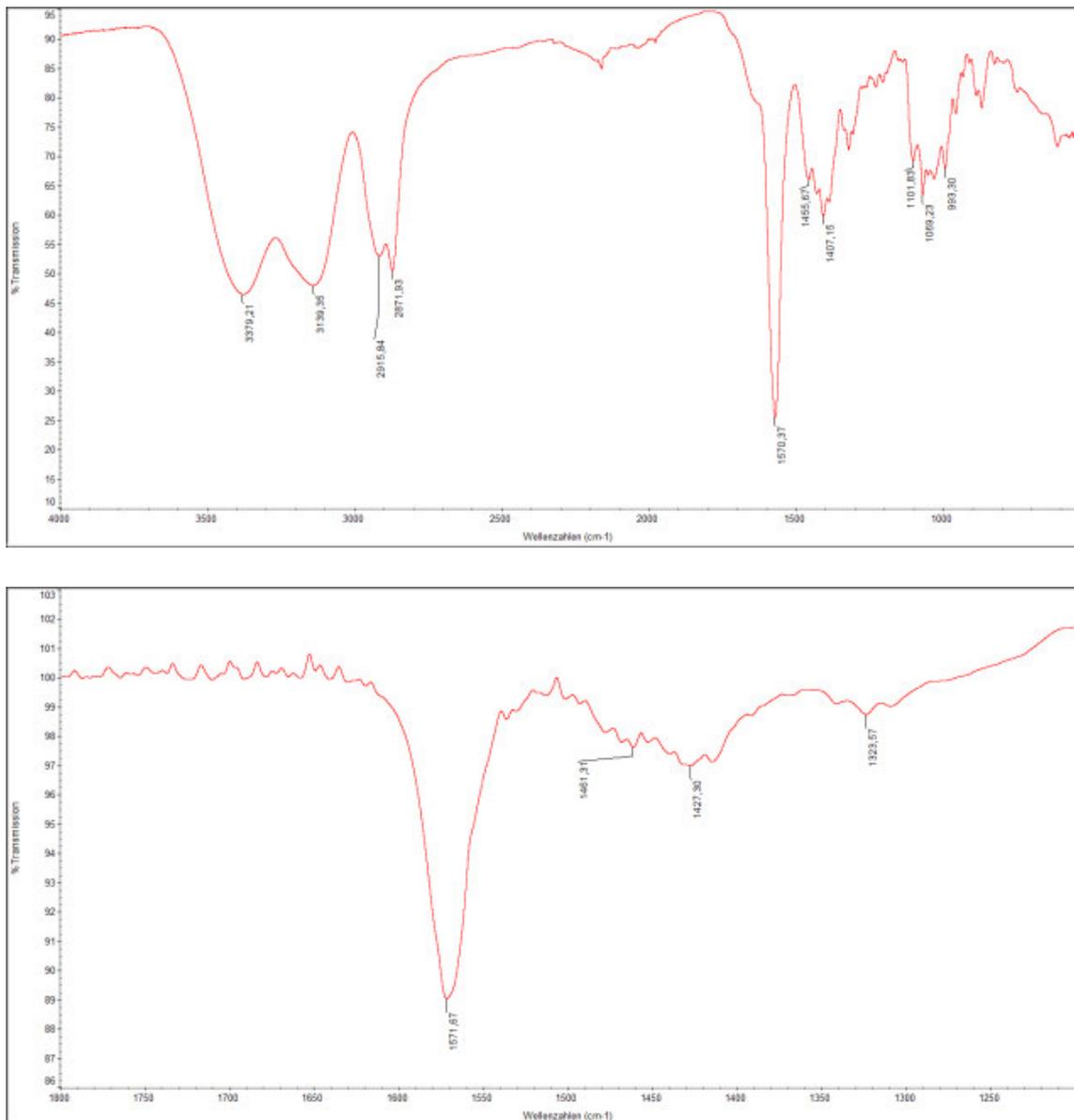


Abbildung Anhang 1: IR-Spektren von  $[\text{Cu}(\mathbf{13})\text{Cl}] \cdot 0,5\text{KCl} \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$  (oben: fest, unten:  $\text{D}_2\text{O}$ )

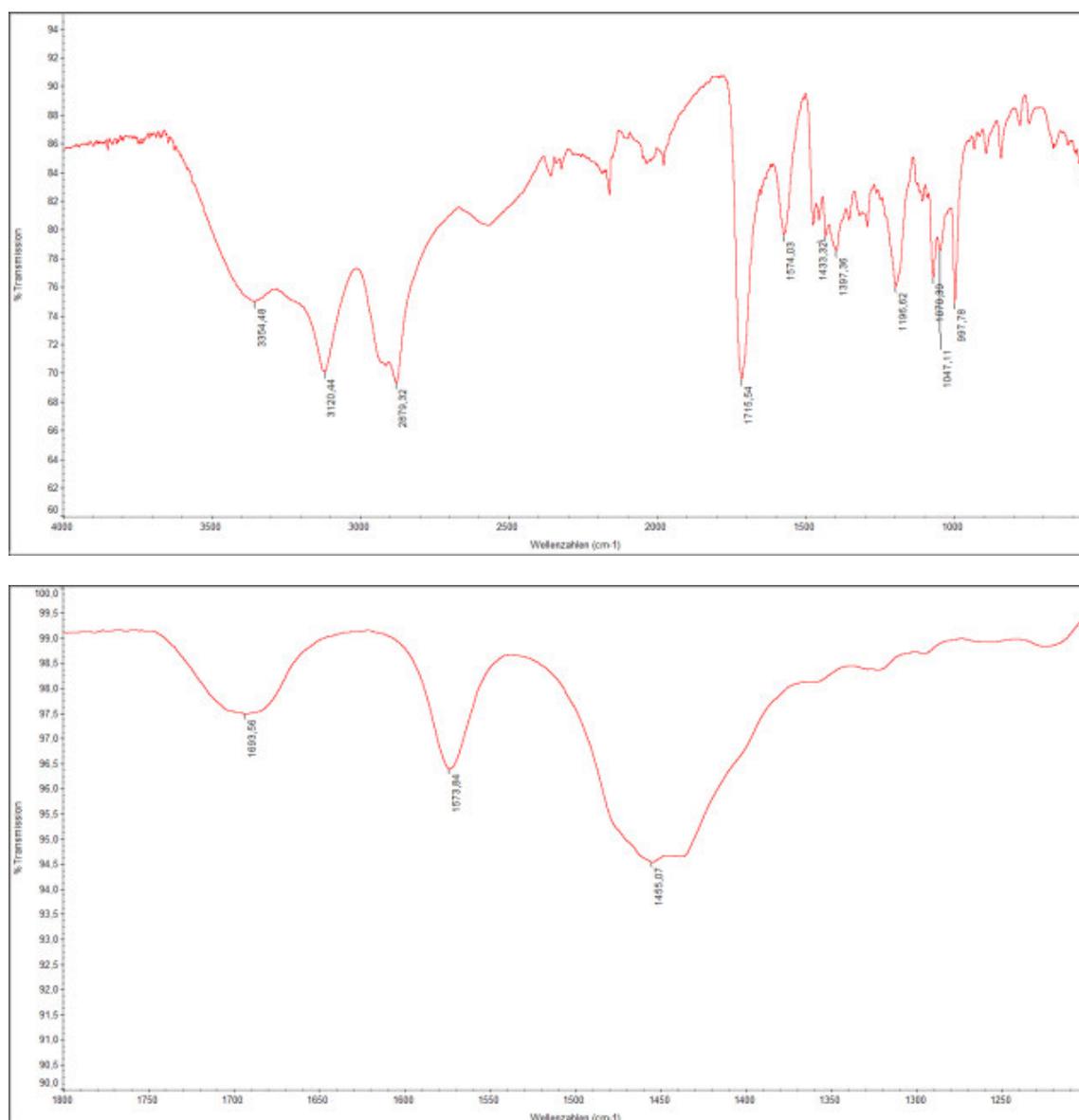
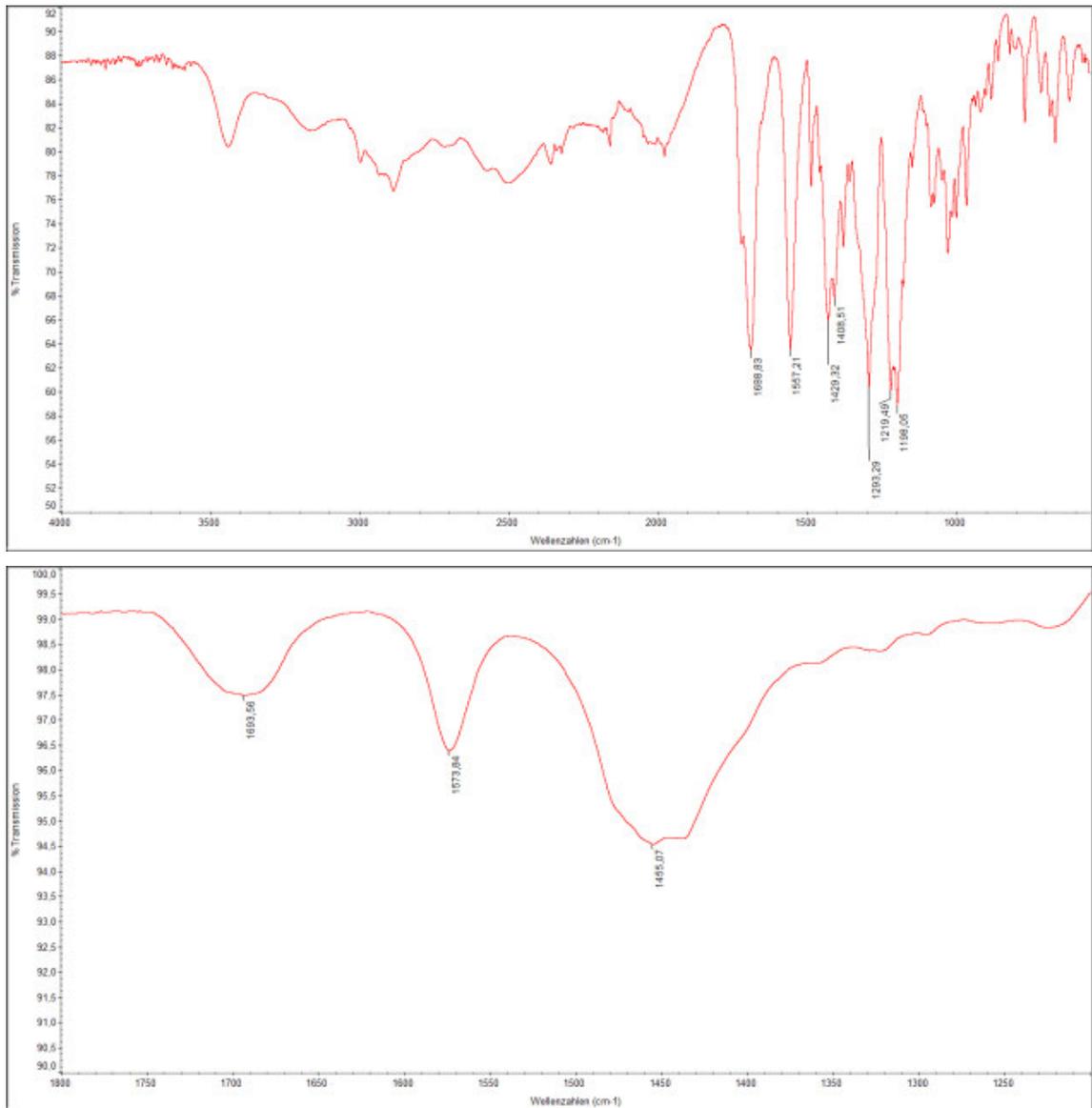


Abbildung Anhang 2: IR-Spektren von  $[\text{Cu}(\text{H14b})\text{ClO}_4] \cdot \text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (oben: fest, unten:  $\text{D}_2\text{O}$ )

Abbildung Anhang 3: IR-Spektren von  $[\text{Cu}(\text{H}_3\mathbf{16})\text{NO}_3] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$  (oben: fest, unten:  $\text{D}_2\text{O}$ )

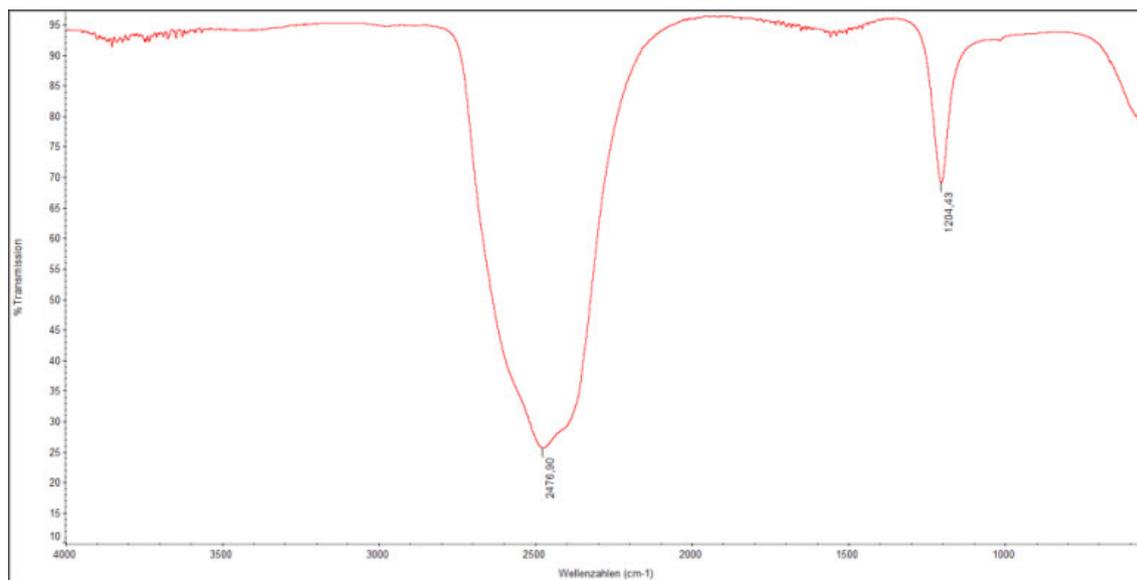


Abbildung Anhang 4: IR-Spektrum von D<sub>2</sub>O (Referenzspektrum von den in D<sub>2</sub>O gemessenen Cu<sup>II</sup>-Verbindungen)

## 7.4 UV/VIS-Spektroskopie

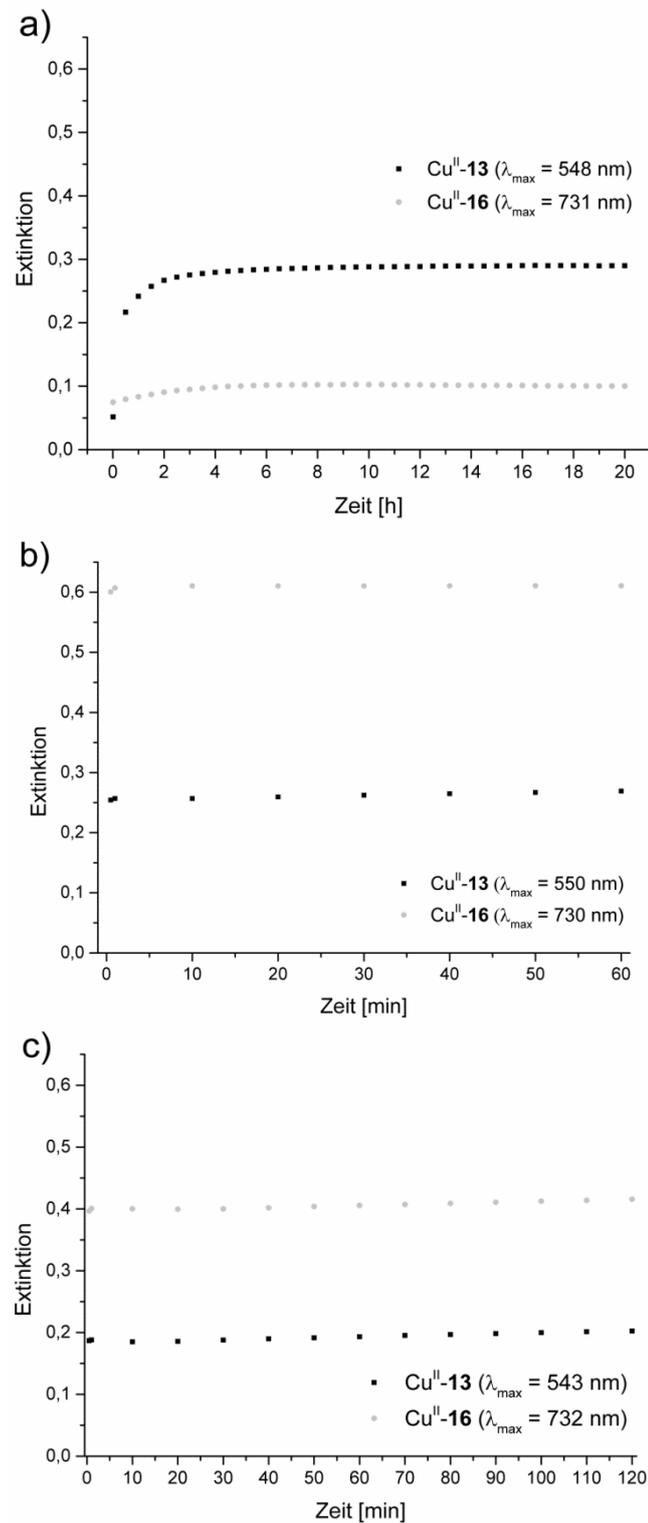


Abbildung Anhang 5: Komplexbildung von  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_x\mathbf{13})]^{x+}$  und  $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_x\mathbf{16})]^{x+}$  bei unterschiedlichen pH-Werten a) pH 2,1 (Cu<sup>II</sup>-13 in H<sub>2</sub>O, Cu<sup>II</sup>-16 in 1 M Glycin/HCl-Puffer) b) pH 5,5 (MES-Puffer) und c) pH 7,4 (HEPES-Puffer)

## 7.5 Radiomarkierung

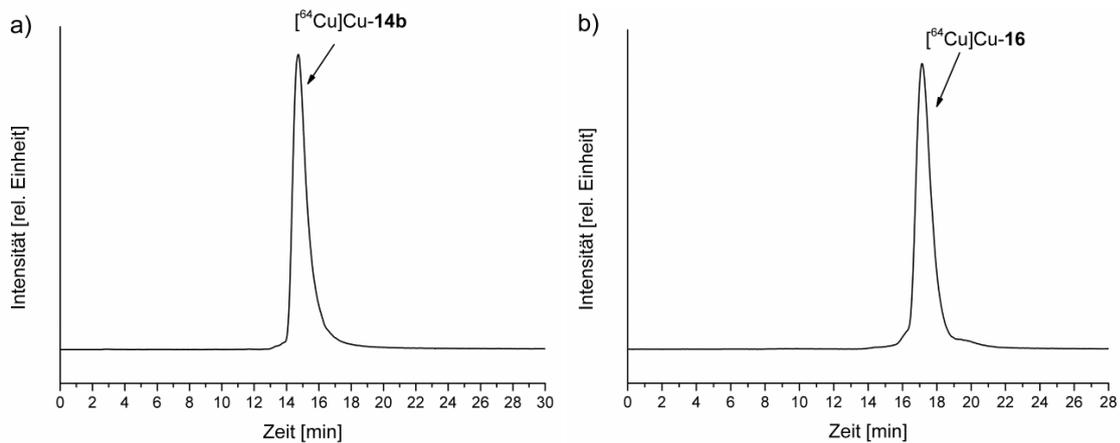


Abbildung Anhang 6: Radio-HPLC Chromatogramme von a)  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$  und b)  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-16}$  (Methode 2)

Tabelle Anhang 3: Radiochemische Ausbeuten (RCA) von **13**-markiert mit 5 MBq  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  in Abhängigkeit der Zeit, Temperatur und Ligandkonzentration (in 0,1 M MES-NaOH-Puffer, pH 5,5) (Werte stammen aus 2 unabhängigen Versuchen)

Zeit [h]	RCA [%] 50 $\mu\text{g/ml}$ ( $A_s = 0,24 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ )			RCA [%] 250 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ( $A_s = 0,04 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ )		
	25°C	37°C	50°C	25°C	37°C	50°C
0,08	56	79	74	54	52	64
0,5	69	88	88	62	55	83
1,17	72	90	93	65	66	90
2,33	76	92	96	76	68	93
4	85	93	99	81	72	98
6	87	95	99	94	95	98
24	94	95	100	94	98	100

Tabelle Anhang 4: Radiochemische Ausbeute (RCA) von **14b** markiert mit 5 MBq [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in Abhängigkeit der Zeit, Temperatur und Ligandkonzentration (in 0,1 M MES-NaOH-Puffer, pH 5,5) (Werte stammen aus 2-3 unabhängigen Versuchen)

Zeit [h]	RCA [%] 50 µg/ml (A <sub>s</sub> = 0,26 GBq/µmol)			RCA [%] 250 µg/µl (A <sub>s</sub> = 0,05 GBq/µmol)		
	25°C	37°C	50°C	25°C	37°C	50°C
	0,08	17	44	46	15	29
0,5	25	61	80	23	37	36
1,17	28	71	88	30	57	81
2,33	32	83	94	33	67	94
4	41	95	99	42	83	97
6	51	100	100	51	90	99
24	91	100	100	82	99	100

Tabelle Anhang 5: Radiochemische Ausbeute (RCA) von **15** markiert mit 5 MBq [<sup>64</sup>Cu]CuCl<sub>2</sub> in Abhängigkeit der Zeit, Temperatur und Ligandkonzentration (in 0,1 M MES-NaOH-Puffer, pH 5,5) (Werte stammen aus 2-3 unabhängigen Versuchen)

Zeit [h]	RCA [%] 50 µg/ml (A <sub>s</sub> = 0,24 GBq/µmol)			RCA [%] 250 µg/µl (A <sub>s</sub> = 0,05 GBq/µmol)		
	25°C	37°C	50°C	25°C	37°C	50°C
	5	73	88	99	62	86
15	88	88	99	69	91	100
30	92	90	100	80	91	100
45	94	92	100	91	94	100
70	97	93	100	95	95	100
24	99	95	100	100	100	100

Tabelle Anhang 6: Radiochemische Ausbeute (RCA) von **16** markiert mit 5 MBq  $^{64}\text{Cu}$  CuCl<sub>2</sub> in Abhängigkeit der Zeit, Temperatur und Ligandkonzentration (in 0,1 M MES-NaOH-Puffer, pH 5,5) (Werte stammen aus 2-3 unabhängigen Versuchen)

Zeit [h]	RCA [%] 50 µg/ml (A <sub>s</sub> = 0,25 GBq/µmol)			RCA [%] 250 µg/µl (A <sub>s</sub> = 0,05 GBq/µmol)		
	25°C	37°C	50°C	25°C	37°C	50°C
	0,08	47	78	70	57	79
0,5	49	84	76	76	80	71
0,75	52	87	77	81	80	73
1	64	89	77	84	94	77
1,5	88	91	84	81	94	79
3,5	88	95	92	87	100	94
6	92	98	92	92	100	95
24	68	90	90	80	95	95

## 7.6 Daten der In-vitro-Stabilitätsstudien

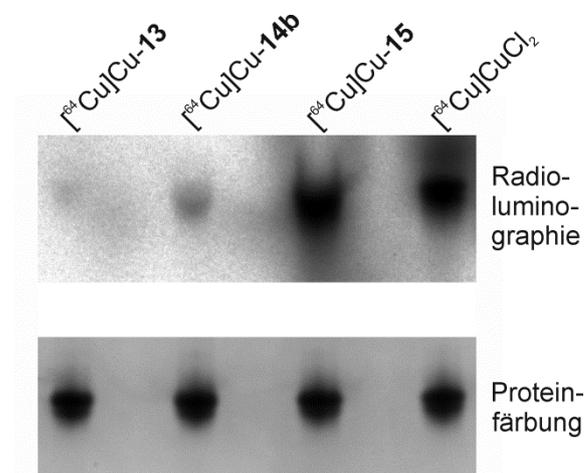


Abbildung Anhang 7: (oben) Natives Polyacrylamidgel Radioluminographie von  $^{64}\text{Cu}$  Cu-**13**,  $^{64}\text{Cu}$  Cu-**14b**,  $^{64}\text{Cu}$  Cu-**15** und  $^{64}\text{Cu}$  CuCl<sub>2</sub> in Gegenwart von SOD, (unten) Nachweis der SOD durch Proteinfärbung

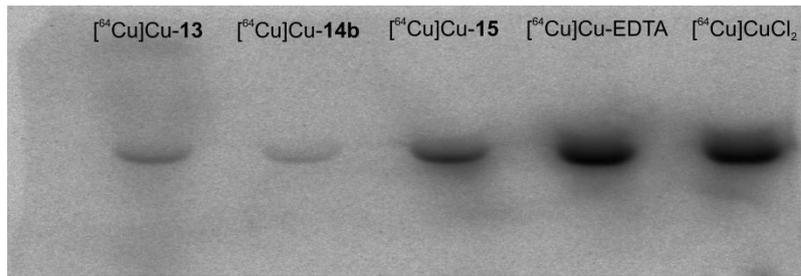


Abbildung Anhang 8: Radioluminographie eines SDS-Polyacrylamidgels von  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$ ,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$ ,  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-15}$  und  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-EDTA}$  sowie die Referenz  $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$  in humanem Serum

Tabelle Anhang 7: Kupfer-64 Transchelatisierung [%] in SOD und humanem Serum nach 1 h Inkubation bei 37°C von ausgewählten  $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}$ -Liganden (MW  $\pm$  SD, n = 3)

Komplex	Kupfer-64 Transchelatisierung [%] in	
	SOD	humanem Serum
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-13}$	3 $\pm$ 0,1	10 $\pm$ 3
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-14b}$	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-15}$	32 $\pm$ 4	21 $\pm$ 5
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-16}^{(a)}$	44	68
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-6}$	1 $\pm$ 0,6	4 $\pm$ 2
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-5}$	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1,5
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-4}$	1 $\pm$ 0,7	3 $\pm$ 0,1
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-3}$	1 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 1,6
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-EDTA}$	85 $\pm$ 14	101 $\pm$ 12

(a) n = 1

## 7.7 Daten der In-vivo-Studien

Tabelle Anhang 8: Bioverteilungsdaten von [<sup>64</sup>Cu]Cu-13 in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als SUV (MW ± SD, n = 4)

[ <sup>64</sup> Cu]Cu-13	SUV		
	5 min	60 min	24 h
Blut	1,067 ± 0,004	0,094 ± 0,001	0,025 ± 0,000
Herz	0,465 ± 0,001	0,054 ± 0,000	0,028 ± 0,000
Lunge	0,834 ± 0,001	0,133 ± 0,001	0,042 ± 0,000
Muskeln	0,309 ± 0,001	0,120 ± 0,006	0,015 ± 0,000
Weißes Fettgewebe	0,918 ± 0,011	0,301 ± 0,005	0,017 ± 0,000
Braunes Fettgewebe	0,519 ± 0,001	0,071 ± 0,000	0,017 ± 0,000
Knochen	0,562 ± 0,001	0,080 ± 0,000	0,028 ± 0,000
Milz	0,343 ± 0,001	0,151 ± 0,003	0,049 ± 0,000
Nebenniere	0,819 ± 0,001	0,313 ± 0,003	0,060 ± 0,001
Niere	10,874 ± 0,014	6,365 ± 0,023	1,045 ± 0,007
Leber	2,343 ± 0,003	2,823 ± 0,007	0,465 ± 0,004
Gehirn	0,041 ± 0,000	0,017 ± 0,000	0,004 ± 0,000
Bauchspeicheldrüse	0,435 ± 0,001	0,264 ± 0,008	0,033 ± 0,000
Thymus	0,303 ± 0,002	0,071 ± 0,000	0,039 ± 0,000
Schilddrüse	0,988 ± 0,002	0,185 ± 0,002	0,056 ± 0,001
Hardersche Drüse	0,421 ± 0,001	0,092 ± 0,000	0,050 ± 0,000
Hoden	0,398 ± 0,001	0,089 ± 0,002	0,030 ± 0,000
Haut	0,841 ± 0,001	0,164 ± 0,001	0,043 ± 0,000

Tabelle Anhang 9: Bioverteilungsdaten von [<sup>64</sup>Cu]Cu-13 in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als %ID (MW ± SD, n = 4)

[ <sup>64</sup> Cu]Cu-13	%ID		
	5 min	60 min	24 h
Darm	2,70 ± 0,13	14,19 ± 9,75	1,75 ± 0,37
Urin	8,31 ± 8,69	47,89 ± 13,08	90,77 ± 0,48

Tabelle Anhang 10: Bioverteilungsdaten von [<sup>64</sup>Cu]Cu-**14b** in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als SUV (MW ± SD, n = 4)

[ <sup>64</sup> Cu]Cu- <b>14b</b>	SUV		
	5 min	60 min	24 h
Blut	1,282 ± 0,017	0,121 ± 0,002	0,046 ± 0,007
Herz	0,590 ± 0,013	0,067 ± 0,001	0,048 ± 0,004
Lunge	0,942 ± 0,013	0,154 ± 0,001	0,060 ± 0,008
Muskeln	0,393 ± 0,008	0,046 ± 0,001	0,016 ± 0,002
Weißes Fettgewebe	1,175 ± 0,074	0,153 ± 0,004	0,020 ± 0,006
Braunes Fettgewebe	0,644 ± 0,014	0,116 ± 0,003	0,039 ± 0,011
Knochen	0,575 ± 0,008	0,087 ± 0,000	0,042 ± 0,005
Milz	0,351 ± 0,004	0,091 ± 0,002	0,065 ± 0,004
Nebenniere	0,783 ± 0,016	0,138 ± 0,003	0,073 ± 0,017
Niere	9,003 ± 0,375	1,656 ± 0,009	0,553 ± 0,108
Leber	0,295 ± 0,021	0,131 ± 0,003	0,178 ± 0,025
Gehirn	0,060 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,007 ± 0,002
Bauchspeicheldrüse	0,454 ± 0,005	0,101 ± 0,001	0,037 ± 0,003
Thymus	0,458 ± 0,012	0,088 ± 0,001	0,046 ± 0,002
Schilddrüse	1,040 ± 0,030	0,200 ± 0,007	0,098 ± 0,023
Hardersche Drüse	0,542 ± 0,014	0,137 ± 0,005	0,076 ± 0,019
Hoden	0,476 ± 0,009	0,101 ± 0,003	0,047 ± 0,005
Haut	1,016 ± 0,017	0,356 ± 0,019	0,060 ± 0,024

Tabelle Anhang 11: Bioverteilungsdaten von [<sup>64</sup>Cu]Cu-**14b** in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als %ID (MW ± SD, n = 4)

[ <sup>64</sup> Cu]Cu- <b>14b</b>	%ID		
	5 min	60 min	24 h
Darm	1,44 ± 0,44	2,16 ± 1,94	1,40 ± 0,22
Urin	18,88 ± 8,55	84,37 ± 3,99	92,58 ± 053

Tabelle Anhang 12: Bioverteilungsdaten von [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-16 in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als SUV (MW  $\pm$  SD, n = 4)

[ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-16	SUV		
	5 min	60 min	24 h
Blut	0,817 $\pm$ 0,010	0,553 $\pm$ 0,002	0,675 $\pm$ 0,013
Herz	0,645 $\pm$ 0,011	0,494 $\pm$ 0,003	0,702 $\pm$ 0,013
Lunge	0,820 $\pm$ 0,013	0,767 $\pm$ 0,004	0,719 $\pm$ 0,015
Muskeln	0,268 $\pm$ 0,007	0,196 $\pm$ 0,000	0,166 $\pm$ 0,003
Weißes Fettgewebe	0,514 $\pm$ 0,020	0,555 $\pm$ 0,007	0,223 $\pm$ 0,015
Braunes Fettgewebe	0,645 $\pm$ 0,013	0,567 $\pm$ 0,002	0,470 $\pm$ 0,014
Knochen	0,518 $\pm$ 0,010	0,591 $\pm$ 0,002	0,430 $\pm$ 0,008
Milz	0,377 $\pm$ 0,010	0,338 $\pm$ 0,000	0,625 $\pm$ 0,004
Nebenniere	0,532 $\pm$ 0,016	0,511 $\pm$ 0,006	0,700 $\pm$ 0,027
Niere	7,439 $\pm$ 0,151	10,018 $\pm$ 0,047	4,495 $\pm$ 0,069
Leber	4,626 $\pm$ 0,107	5,241 $\pm$ 0,043	2,033 $\pm$ 0,034
Gehirn	0,047 $\pm$ 0,001	0,050 $\pm$ 0,000	0,082 $\pm$ 0,002
Bauchspeicheldrüse	0,662 $\pm$ 0,018	0,715 $\pm$ 0,005	0,541 $\pm$ 0,010
Thymus	0,775 $\pm$ 0,015	0,959 $\pm$ 0,003	0,799 $\pm$ 0,010
Schilddrüse	1,094 $\pm$ 0,027	1,364 $\pm$ 0,006	1,388 $\pm$ 0,045
Hardersche Drüse	0,676 $\pm$ 0,014	0,677 $\pm$ 0,003	0,695 $\pm$ 0,014
Hoden	0,278 $\pm$ 0,006	0,566 $\pm$ 0,001	0,675 $\pm$ 0,010
Haut	0,764 $\pm$ 0,015	1,025 $\pm$ 0,003	0,362 $\pm$ 0,007

Tabelle Anhang 13: Bioverteilungsdaten von [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-16 in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als %ID (MW  $\pm$  SD, n = 4)

[ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-16	%ID		
	5 min	60 min	24 h
Darm	6,50 $\pm$ 2,96	12,76 $\pm$ 1,58	9,73 $\pm$ 0,74
Urin	8,28 $\pm$ 0,61	5,19 $\pm$ 3,31	42,43 $\pm$ 1,21

Tabelle Anhang 14: Bioverteilungsdaten von [<sup>64</sup>Cu]Cu-6 in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als SUV (MW ± SD, n = 4)

[ <sup>64</sup> Cu]Cu-6	SUV		
	5 min	60 min	24 h
Blut	1,012 ± 0,026	0,108 ± 0,001	0,039 ± 0,001
Herz	0,483 ± 0,018	0,033 ± 0,000	0,037 ± 0,001
Lunge	0,704 ± 0,019	0,093 ± 0,001	0,040 ± 0,001
Muskeln	0,504 ± 0,052	0,133 ± 0,008	0,005 ± 0,000
Weißes Fettgewebe	1,912 ± 0,099	0,175 ± 0,010	0 ± 0,002
Braunes Fettgewebe	0,479 ± 0,016	0,036 ± 0,001	0,019 ± 0,001
Knochen	0,401 ± 0,010	0,072 ± 0,001	0,023 ± 0,001
Milz	0,986 ± 0,140	0,171 ± 0,008	0,034 ± 0,001
Nebenniere	0,748 ± 0,049	0,033 ± 0,010	0 ± 0,002
Niere	4,788 ± 0,098	1,498 ± 0,010	0,404 ± 0,020
Leber	0,446 ± 0,013	0,266 ± 0,006	0,156 ± 0,001
Gehirn	0,032 ± 0,001	0,004 ± 0,000	0,002 ± 0,000
Bauchspeicheldrüse	0,696 ± 0,055	0,245 ± 0,011	0,017 ± 0,000
Thymus	0,379 ± 0,017	0,046 ± 0,000	0,047 ± 0,000
Schilddrüse	0,701 ± 0,040	0,067 ± 0,001	0,037 ± 0,002
Hardersche Drüse	0,378 ± 0,008	0,051 ± 0,001	0,034 ± 0,005
Hoden	0,333 ± 0,013	0,078 ± 0,002	0,053 ± 0,001
Haut	0,807 ± 0,032	0,185 ± 0,009	0,022 ± 0,001

Tabelle Anhang 15: Bioverteilungsdaten von [<sup>64</sup>Cu]Cu-6 in männlichen Wistar-Ratten, Angaben als %ID (MW ± SD, n = 4)

[ <sup>64</sup> Cu]Cu-6	%ID		
	5 min	60 min	24 h
Darm	3,174 ± 0,771	3,882 ± 1,113	1,891 ± 0,378
Urin	14,506 ± 16,486	79,357 ± 2,269	93,744 ± 0,84

## 7.8 MALDI-TOF-Spektren

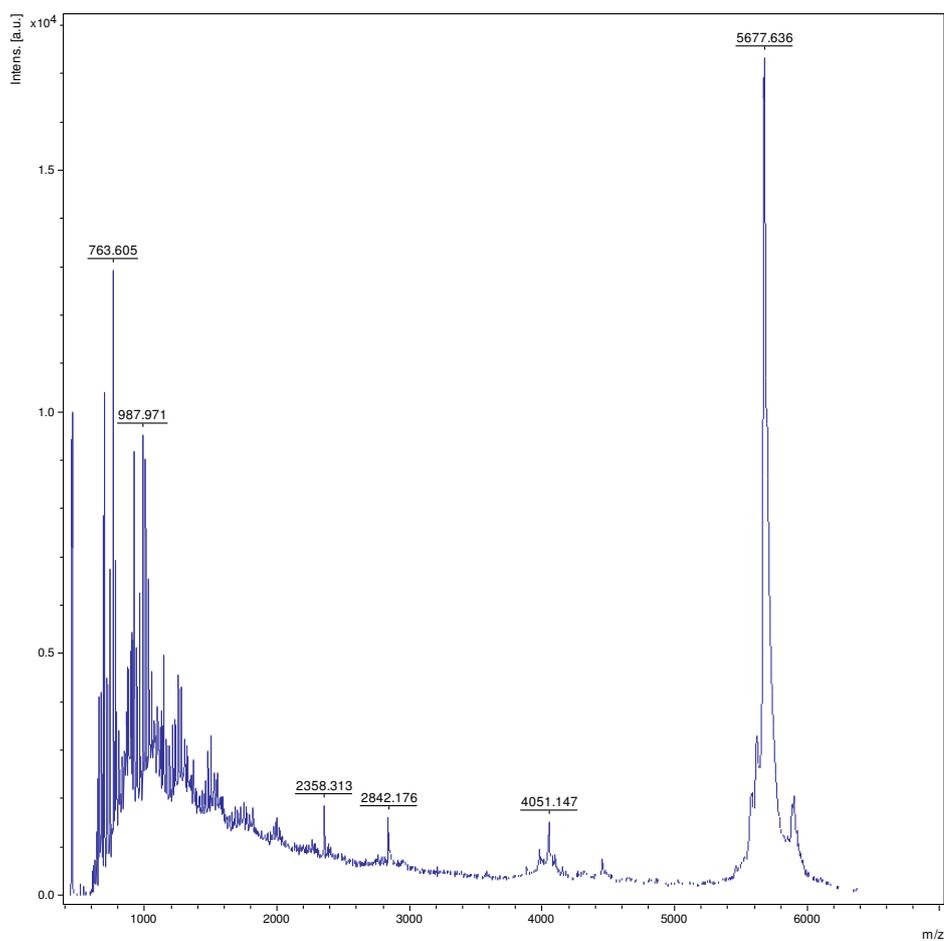


Abbildung Anhang 9: MALDI-TOF-MS Spektrum der Verbindung **48**  $m/z = 5678 [M+Na]^+$  vor der HPLC-Trennung (Matrix: Sinapinsäure)

## 8 Veröffentlichungen und Beiträge zu Fachkonferenzen

### *Artikel und Buchkapitel*

Zarschler, K., Kubeil, M., Stephan, H.: Establishment of two complementary *in vitro* assays for radiocopper complexes achieving reliable and comparable evaluation of *in vivo* stability. *RCS Advances* **4** (2014) 10157-10164.

Pillai, Z. S., Ceroni, P., Kubeil, M., Heldt, J.-M. , Stephan, H., Bergamini, G.: Dendrimers as Nb<sup>3+</sup> ligands: effect of generation on the efficiency of the sensitized lanthanide emission. *Chem. Asian J.* **8** (2013) 771-777.

Comba, P., Emmerling, F., Jakob, M., Kraus, W., Kubeil, M., Morgen, M., Pietzsch, J., Stephan, H.: Copper(II) chemistry of the functionalized macrocycle cyclam tetrapropionic acid. *Dalton Trans.* **42** (2013) 6142-6148.

Stephan, H., Kubeil, M., Gloe, K., Gloe, K.: Extraction Methods: Analytical Methods in Supramolecular Chemistry. Vol. 2 (Ed.: C. A. Schalley), Wiley-VCH, Weinheim, 2012, 105-125.

Kubeil, M., Stephan, H., Pietzsch, H.-J., Geipel, G., Appelhans, D., Voit, B., Hoffmann, J., Brutschy, B., Mironov, Y. V., Brylev, K. A., Fedorov, V. E.: Sugar-decorated dendritic nanocarriers: Encapsulation and release of the octahedral rhenium cluster complex [Re<sub>6</sub>S<sub>8</sub>(OH)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>. *Chem. Asian J.* **5** (2010) 2507-2514. (ausgewählt als **HOT ARTICLE**)

Kuhlmann, M., Stephan, H., Steinbach, J., Röhrich, A.: Multimeric cyclam derivatives with tunable surface modification for radiopharmaceutical applications. Vol. 8 (Ed.: U. Mazzi) *SGEditoriali*, Padova, Italy, 2010, 77-80.

### *Reviews*

Stephan, H., Kubeil, M., Emmerling, F., Müller, Ch. E.: Polyoxometalates as versatile enzyme inhibitors. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2013) 1585-1594.

Barreto, J. A., O'Malley, W., Kubeil, M., Graham, B., Stephan, H., Spiccia, L.: Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. *Adv. Mater.* **23** (2011) H18-H40.

*Vorträge*

M. Kubeil, K. Zarschler, H. Stephan: Establishment of two complementary *in vitro* assays for radiocopper complexes. 2<sup>nd</sup> annual meeting Helmholtz Virtual Institute, **06.-08.10.2013**, Heidelberg, Deutschland.

M. Kubeil: Cyclampropionic acid derivatives- a versatile chelating system for multifunctionalization. 1<sup>st</sup> annual meeting Helmholtz Virtual Institute, **14.-16.10.2012**, Dublin, Irland.

M. Kubeil, L. Peschel, H. Stephan, J. Steinbach: Cyclammonopropionic acid- a promising chelating system for radiocopper isotopes. 4th EuCheMS Chemistry Congress, **26.-30.08.2012**, Prag, Tschechische Republik.

M. Kubeil: The Emerging Opportunities of New Multimeric Cyclam Based Copper Chelators in Multimodal Imaging. 8th Supraphone Meeting, **07.-10.09.2011**, Funchal, Portugal.

M. Kubeil, T. Lehmann, H. Stephan, J. Steinbach: Cyclampropionsäure-Derivate: Neue Chelatsysteme für nuklearmedizinische Anwendungen? GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2011, **04.-07.09.2011**, Bremen, Deutschland.

M. Kubeil: Octahedral rhenium cluster/glycodendrimer associates: A new tailor-made drug delivery system? IWTMC-II International Workshop on Transition Metal Clusters-II, **30.09.-02.10.2010**, Rostock, Deutschland.

M. Kuhlmann: Encapsulation of Fluorescent Cluster Complexes into Dendritic Nanocontainer. 7th Supraphone Meeting, **28.04.-01.05.2010**, Maria Laach, Deutschland.

*Poster*

M. Kubeil, K. Viehweger, J. Steinbach, H. Stephan: <sup>64</sup>Cu-Markierung eines Cyclampropionsäure-Peptid Konjugats zum EGFR-Targeting. GDCh-Wissenschaftsforum Chemie 2013, **01.09.-04.09.2013**, Darmstadt, Deutschland.

M. Kuhlmann, H. Stephan, J. Steinbach, A. Röhrich: Multimeric cyclam derivatives with tunable surface modification for radiopharmaceutical applications. International Symposium on Technetium and other Radiometals in Chemistry and Medicine, **08.-11.09.2010**, Bressanone, Italy

M. Kuhlmann, H. Stephan, G. Geipel, D. Appelhans: Dendrimer-encapsulated rhenium cluster complexes. 3rd EuCheMS Chemistry Congress, **29.08.-02.09.2010**, Nürnberg, Deutschland.



## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. J. Steinbach für die zahlreichen Fachtagungen, in denen ich mein wissenschaftliches Profil ausbauen und an den Informationsaustausch aktiv teilnehmen konnte. Bedanken möchte ich mich auch für seine konstruktive Kritik.

An dieser Stelle gilt mein größter Dank aber meinem Betreuer Dr. Holger Stephan. Seine langjährige Unterstützung, sein großes Vertrauen in meinen wissenschaftlichen Fähigkeiten und seine immerwährende Förderung haben mich zu dem Wissenschaftler gemacht, der ich heute bin. Er ermöglichte mir eine Vielzahl von großartigen Möglichkeiten, mein Können unter Beweis zu stellen. Darunter zählen vor allem Tagungen, Meetings und Co-Autorschaft in angesehenen Fachzeitschriften. Er war mein Mentor und Förderer - dafür bin ich zutiefst dankbar.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Peter Comba und seiner Arbeitsgruppe (Universität Heidelberg) für die wissenschaftliche Unterstützung und das sehr familiäre Arbeitsklima, während meines kurzen wissenschaftlichen Aufenthaltes dort. Insbesondere danke ich Michael Morgen und Henning Rudolf für die Durchführung und Auswertung einiger Experimente und die schöne Zusammenarbeit.

Für die Auswertung der Röntgeneinkristallstrukturanalyse danke ich Frau Dr. Franziska Emmerling und Herrn Werner Kraus von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Viele Kollegen am Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung haben mich während meiner Zeit dort unterstützt und mich mit neuem Wissen gefüttert. Vor allem Dr. Jan-Martin Heldt, Dr. Constantin Mamat und Dr. Reik Löser möchte ich für Ihre Fachkompetenz danken. Sie eröffneten neue Wege und diskutierten mit mir über fachspezifische Fragestellungen. Trotz anderer Abteilungszugehörigkeit wuchsen wir zusammen und wurden sogar Freunde.

Besonderem Dank gilt an dieser Stelle unseren Technikern Frau Brigitte Große, Frau Bianca Kreisl und Frau Ulrike Gesche. Ihr hättet einen Orden für Organisation, Zeitmanagement und Hilfsbereitschaft verdient, denn ohne Euch würde es keinen reibungslosen Ablauf der Arbeiten geben. Zudem ist Eure langjährige Laborerfahrung unentbehrlich. Gerade der Nachwuchs kann und sollte viele Handkniffe von Euch lernen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Karin Landrock für das schöne Zusammenarbeiten sowie für die Durchführung einiger Elementaranalysen und die

Bestimmung von den Verteilungskoeffizienten. Besonders positiv hervorzuheben ist Deine akribische Gründlichkeit.

**Natürlich** wäre der biologische Teil dieser Arbeit nur begrenzt möglich gewesen, wenn nicht fachkompetente Kollegen die erforderlichen Untersuchungen (Bioverteilungen, Bestimmungen der Dissoziationskonstanten) durchgeführt hätten.

**Besonders** hervorzuheben ist aber die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kristof Zarschler. Sein tiefgreifendes biologisches Wissen, seine immer neuen Ideen und sein unendlicher Tatendrang führten zu einer standardisierten Etablierung der In-vitro-Assays, die in dieser Arbeit erstmalig eingesetzt worden sind. Zudem ist unsere neugewonnene Symbiose nicht nur auf die wissenschaftliche Zusammenarbeit beschränkt, sondern gilt darüber hinaus auch auf energie- und konzentrationsbringende Zusatzstoffe. Mein neuer Zimmerkollege versorgte mich während meiner letzten, alles entscheidenden Phase mit Kaffee - ich ihn mit „Keksis“.

**Zudem** gilt ein großer Dank meinen ehemaligen Bachelor- (Laura Peschel & Maria Weißpflog) und Master-Studenten (Tina Lehmann & Christian Völkner), die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

**Des Weiteren** bedanke ich mich natürlich auch bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Instituts für Radiopharmazeutische Krebsforschung, insbesondere für die Bereitstellung von Kupfer-64 und unzählig aufgenommenen Masseproben.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Die vorliegende Arbeit ist am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf im Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung von Januar 2010 bis Januar 2014 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Steinbach angefertigt worden. Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der Fassung vom 23.02.2011 gemäß dem Änderungssatz vom 15.06.2011 an.

Bisherige erfolglose Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Dresden, den

## **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