

***Darstellung von radioaktiv markiertem  
„Luteinising Hormone Releasing Hormone“ als  
Radiopharmakon für die Radiodiagnostik  
und Tumorthherapie sowie  
Untersuchungen zum Einsatz von Aktivestern  
zur Darstellung von DOTA-Peptid-Konjugaten***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
  
dem Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
  
Matthias Bauerfeind  
  
aus  
  
Biedenkopf

Marburg an der Lahn, 2006

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am .12.2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Jungclas

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Ensinger

Tag der mündlichen Prüfung am 19.12.2006

# Inhaltsverzeichnis

1	Einführung in die Thematik der Arbeit	1
2	Motivation	2
3	Radiopharmaka	3
3.1	Spezifische und unspezifische Radiopharmaka	3
3.2	Konzepte der Markierung	4
3.3	Trapping	6
3.4	Nuklide zur Markierung	6
3.5	Entwicklungsziele	7
4	Die bildgebenden Verfahren PET und SPECT	8
4.1	SPECT	8
4.2	PET	9
4.3	Vergleich PET – SPECT	10
5	Radionuklide in der PET und SPECT	12
5.1	Eigenschaften der Nuklide	12
5.2	Nuklide für die SPECT	13
5.3	Nuklide für die PET	13
6	Indium-111 als Nuklid für Radiodiagnostik und Radiotherapie	14
6.1	Physikalische Eigenschaften des Indium-111	14
6.2	Chemische Eigenschaften des Indium-111	15
7	DOTA und DTPA als Liganden für Radiometalle	17
7.1	DTPA	17
7.1.1	Komplexstabilität	18

---

7.1.2	Struktur	18
7.2	DOTA	18
7.2.1	Komplexstabilität	19
7.2.2	Struktur	20
8	Peptide in der Nuklearmedizin	22
9	Luteinising Hormone Releasing Hormone (LHRH)	24
9.1	LHRH im Normalgewebe und Stoffwechsel	24
9.2	Struktur	26
9.3	LHRH-rezeptorexprimierende Tumore	28
9.4	Rezeptorbindung	29
9.5	Bisherige Anwendungen	30
9.5.1	Hormonbehandlung	30
9.5.2	Konjugation mit Zytostatika	30
9.5.3	Nuklearmedizin	31
10	Konjugation des Liganden an das Peptid	32
10.1	Techniken	32
10.1.1	Konjugation mittels Säureanhydriden	32
10.1.2	Schutzgruppentechnik	33
10.1.3	Konjugation mittels Aktivester	33
11	Linker: die Brücke zwischen Peptid und Ligand	37
11.1	Aufgaben und Funktion des Linkers	37
11.2	Mögliche Strukturen für Linker	38
11.2.1	Alkylische Systeme	38
11.2.2	Aromatische Systeme	39
11.2.3	Aminosäuren	40
11.2.4	Gedankenspiele	40

---

11.3	Linker in der Praxis	41
12	Bisherige Arbeiten	42
13	Planung der Synthese der LHRH-Derivate	44
13.1	LHRH	44
13.2	Linker	45
13.3	Ligand	46
13.4	Zielmoleküle	46
14	Durchführung der Synthese der LHRH-Derivate	48
14.1.1	Kopplung LHRH-Valeriansäure-FMoc	48
14.1.2	Entschützung der FMoc-Valeriansäure	49
14.1.3	Konjugation mit DTPA	50
14.1.4	Konjugation mit DOTA	51
14.2	Zusätzliche Derivate	51
14.2.1	Darstellung von LHRH-DTPA	51
14.2.2	Darstellung von LHRH-DOTA	52
14.3	Probemarkierungen als Funktionstest	53
14.3.1	Probemarkierungen von LHRH-DTPA-Derivaten	54
14.3.2	Probemarkierungen von LHRH-DOTA-Derivaten	54
14.4	Ergebnisse	54
15	Synthese eines DOTA-TFP-Aktivesters	56
15.1.1	Darstellung von Aktivestern	56
15.1.2	Konjugationen mittels DOTA-TFP-Aktivester	61
15.2	Ergebnisse	62
16	Bindungsstudien am Zellmodell	63
16.1	Durchführung	63

---

16.1.1	Vorbereitung der Zellen	63
16.1.2	Vorbereitung der Peptidkonjugate	63
16.1.3	Bindungsstudien	64
16.2	Proteinbestimmungen	66
16.3	Ergebnis	68
17	Zusammenfassung und Ausblick	69
18	Anhang I: Methodik	70
18.1	HPLC	70
18.1.1	Funktion	70
18.1.2	Anwendungsfall Peptide	71
18.1.3	Detektion	72
18.2	Festphasenextraktion	72
18.2.1	Funktion	72
18.2.2	Durchführung	73
19	Anhang II: Experimenteller Teil	74
19.1	Reagenzien	74
19.1.1	Allgemeines	74
19.1.2	Zelllinie EFO-21	74
19.1.3	Zelllinie MDA-MB-231	74
19.2	NMR-Spektroskopie	75
19.3	Massenspektrometrie	76
19.4	Radioaktivitätsmessungen	76
19.5	HPLC-System	76
19.6	Allgemeine Arbeitsvorschriften	78

---

19.6.1	Darstellung von 1-Carboxymethyl-2,3,5,6-tetrafluorophenylester-4,7,10-tetraazacyclododecan-triessigsäure (DOTA-TFP-AE)	78
19.6.2	Kopplung von DOTA-TFP-AE an Peptide	79
19.6.3	Kopplung von DTPA-DA an Peptide	80
19.6.4	Entsalzen mittels SPE	80
19.6.5	HPLC-Verfahren	81
19.6.6	Markierungen	82
19.6.7	Qualitätskontrolle mittels Kartuschen	82
19.6.8	Bindungsstudien	83
19.6.9	Proteinbestimmung	83
19.7	Präparativer Teil	85
19.7.1	Versuchte Darstellung von DOTA-TFP-AE (Phosphat-Puffer)	85
19.7.2	Versuchte Darstellung von DOTA-TFP-AE (NaHCO <sub>3</sub> -Puffer, HPLC-Reinigung)	86
19.7.3	Darstellung von DOTA-TFP-AE (ungepuffert, Niederschlag)	86
19.7.4	Darstellung von Phenylalanin-DOTA mittels DOTA-TFP-AE	87
19.7.5	Darstellung von LHRH-DOTA mittels DOTA-TFP-AE	88
19.7.6	Darstellung von LHRH-DTPA	89
19.7.7	Darstellung von LHRH- Valeriansäure-Fmoc	90
19.7.8	Darstellung von LHRH-Valeriansäure	91
19.7.9	Darstellung von LHRH-Valeriansäure-DTPA	92
19.7.10	Darstellung von LHRH-Valeriansäure-DOTA	93
19.7.11	Markierung LHRH-DTPA	93
19.7.12	Markierung LHRH-Valeriansäure-DTPA	94
19.7.13	Markierung LHRH-DOTA	94
19.7.14	Markierung LHRH-Valeriansäure-DOTA	95
20	Anhang III: Literaturverzeichnis	96
21	Anhang IV: Abbildungsverzeichnis	104

---

22	Anhang V: Tabellenverzeichnis	106
23	Anhang VI: Abkürzungsverzeichnis	107
24	Danksagung	108



# 1 Einführung in die Thematik der Arbeit

Im Gesundheitswesen besteht zunehmend das Interesse an einer Therapie, die auf die Bedürfnisse des individuellen Patienten zugeschnitten ist. Dies bedeutet für den behandelnden Arzt, dass er das spezifische Krankheitsbild frühzeitig erkennen und den jeweiligen Krankheitsverlauf detailliert verfolgen können muss.

In der Individualmedizin wird daher verstärkt die Entwicklung und Verbesserung nicht invasiver bildgebender Diagnoseverfahren gefordert, um die Belastung des Patienten so gering wie möglich zu halten und die Qualität der erhaltenen Diagnose zu verbessern. Hierzu stehen zwei grundsätzlich unterschiedliche Prinzipien zur Verfügung.

Zum Einen lassen sich pathologische Strukturen durch Reflexions- oder Absorptionsmessungen extern erzeugter Strahlung abbilden. Typische Verfahren sind Ultraschall-, Röntgen- oder Kernspin-Untersuchungen. Mit den beiden erstgenannten Verfahren ist ein Einblick in Stoffwechselfvorgänge aber nicht möglich, selbst Kernspin-Untersuchungen erlauben dies nur in begrenztem Umfang, da hier entsprechende gewebespezifische Kontrastmittel nicht im ausreichenden Umfang zur Verfügung stehen.

Der andere Ansatz ist die Verabreichung offener radioaktiver Substanzen, sogenannter Radiopharmaka, deren räumliche Verteilung sich mittels geeigneter Sensoren bestimmen lässt. Diese Radiopharmaka bestehen aus der radioaktiven Quelle, deren Strahlung mit Messsystemen außerhalb des Körpers detektiert werden kann, sowie einem bioaktiven Teil, der eine gewebespezifische Anreicherung erlaubt.

Auf diesem Prinzip basieren die nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren PET (Positron Emission Tomography) und SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), deren Domäne insbesondere in der Darstellung biochemischer Funktionen und pathophysiologischer Prozesse auf molekularer Ebene angesiedelt ist.

## 2 Motivation

Peptidrezeptoren, die auf Tumoren exprimiert oder sogar überexprimiert sind, stellen ein ideales Ziel für radioaktiv markierte Peptide zur Diagnostik und Therapie dar.

Ein bisher nicht ausreichend verfolgter Ansatz ist es, den LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone)-Rezeptor als Ziel für eine Radiodiagnostik und -therapie zu nutzen.

Die betreffenden Tumore, die diese Rezeptoren exprimieren, sind insbesondere Endometrium- und Ovarialkarzinome, für die bei ungünstiger Prognose wie höherem Alter der Patientin oder einem späten Stadium des Tumors kaum Verfahren mit Erfolgsaussichten existieren. Diese Karzinome stellen daher die häufigste Krebstodesursache bei Frauen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen LHRH und LHRH-Analoga mit den Liganden DOTA und DTPA konjugiert werden, um eine flexible Markierung mit Radiometallen wie Indium-111 zur Diagnostik und Therapie oder Yttrium-90 zur Therapie zu ermöglichen.

Diese Substanzen sollen im Zellmodell auf ihre Affinität gegenüber dem LHRH-Rezeptor getestet werden.

Somit sollen diese bioaktiven Moleküle als Werkzeuge für die Diagnose und Therapie der angesprochenen Tumore, die den LHRH-Rezeptor exprimieren, zur Verfügung stehen. Die Radiotherapie dieser Tumore wird als erfolgversprechend angesehen.

Des Weiteren soll ein neues Verfahren zur Konjugation der Peptide mit Liganden erarbeitet werden, das unter milden chemischen Bedingungen arbeitet und eine schonende Reaktionsführung ermöglichen soll.

### 3 Radiopharmaka

Neben apparativen Verbesserungen hängt der Fortschritt in der Nuklearmedizin im entscheidenden Maße von der Entwicklung neuer Radiopharmaka ab, die für die jeweiligen Fragestellungen angepasst sind und somit spezifische Informationen für eine bestimmte Diagnose liefern können. Für die Entwicklung neuer Radiopharmaka sind Informationen über die Stoffwechselsysteme von großer Bedeutung, da nur bei guter Kenntnis der biochemischen Vorgänge und der jeweiligen Mechanismen ein potenzieller Kandidat für ein neues Radiopharmakon sinnvoll entwickelt werden kann.

#### 3.1 Spezifische und unspezifische Radiopharmaka

Es muss unterscheiden werden zwischen Radiopharmaka, die über unspezifische Wege in das Zielorgan gelangen, und Radiopharmaka, bei denen dies nur über definierte Stoffwechselwege geschieht. Im ersten Fall nutzt man die Eigenschaften bestimmter Moleküle wie beispielsweise Nanopartikel. Diese reichern sich aufgrund ihrer Größe aber nicht aufgrund ihrer Oberflächenstruktur quasi spezifisch in bestimmten Zielorganen an. Die genauen Mechanismen zum Transport sind in diesen Fällen oft nicht bekannt. Diese Partikel werden in der MRT (Magnetresonanztomographie) aber bereits eingesetzt.

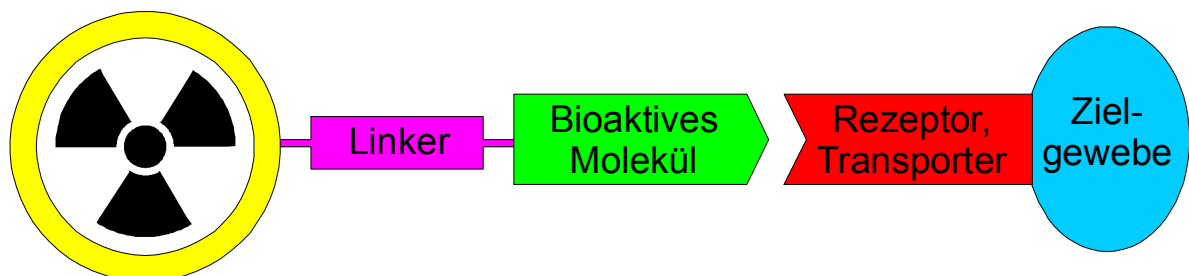


Abbildung 1: Spezifische Radiopharmaka

Die Alternative zu diesen grundsätzlich unspezifischen Systemen besteht darin, dass man bioaktive Moleküle verwendet und modifiziert,

deren Weg durch den Stoffwechsel bekannt ist [LIU 2001]. Ein Beispiel hierfür ist radioaktives Iod, das für die Schilddrüsenszintigraphie mehr als nur historische Bedeutung besitzt. Ein anderes Beispiel ist die in der PET häufig eingesetzte  $^{18}\text{F}$ -FDG (Fluordesoxyglucose), die dem Glucosestoffwechsel folgt. Diesen Molekülen ist gemeinsam, dass sie über vorhandene Transportwege wie dem Natriumiodid-Symporter oder Glucosetransporter im Körper metabolisiert werden.

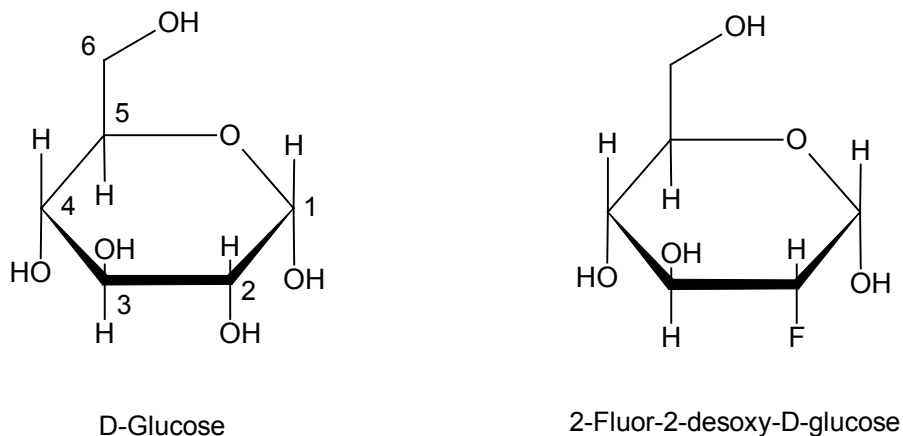


Abbildung 2: Glucose und FDG

In dieser Arbeit wird nur auf Systeme mit spezifischer Anreicherung eingegangen, da auf diesem Weg eine optimierte Anpassung an das jeweilige Problem möglich ist, um eine optimale Diagnose und Therapie zu ermöglichen.

## 3.2 Konzepte der Markierung

Für die Markierung von biologisch aktiven Molekülen ergeben sich zwei Möglichkeiten, wie Abbildung 3 zeigt: zum Einen lässt sich das radioaktive Metallzentrum im **integrated approach** als integraler Bestandteil des Moleküls einbauen, wodurch das Molekül unter Umständen in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften verändert werden kann, was genaue Studien über die biologische Aktivität erforderlich macht. Diese Vorgehensweise lässt sich insbesondere dann einsetzen, wenn Nuklide wie Kohlenstoff oder Fluor verwendet werden sollen. Allerdings kann man

außer beim Einsatz von biologischen Nukliden nur bei ausgewählten großen Molekülen wie Antikörpern mit dieser Technik arbeiten, wobei das gesamte Molekül selbst oder ein modifizierter Teil von ihm als Ligand fungiert.

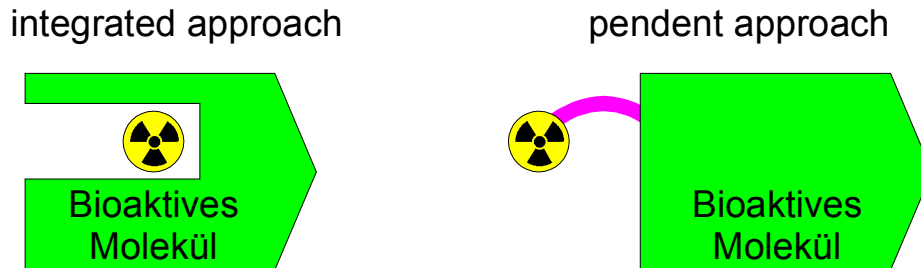


Abbildung 3: Markierungsprinzipien (Approach-Systeme)

Beim **pendent approach** wird einem Radionuklid wie Iod oder einem Radiometallkomplex wie Indium-DOTA eine Position an der Peripherie des biologisch aktiven Moleküls zugewiesen. Wenn der Komplex weit genug von den aktiven Zentren des Moleküls entfernt ist, sollte seine Anwesenheit ohne nachteilige Folgen für die Bioaktivität bleiben. Gerade bei kleineren Molekülen muss dieser Ansatz verfolgt werden, wenn keine Möglichkeit besteht, das Metallzentrum im Inneren des Zielmoleküls zu integrieren. Hierbei muss aber insbesondere bei sehr kleinen Molekülen berücksichtigt werden, dass das Molekül durch den Liganden in seiner Größe zunimmt, wodurch sich Eigenschaften wie Polarität oder Lipophilie der Ausgangsmoleküle stark verändern können [KUNG 1996].

Eine andere Möglichkeit der Charakterisierung der Markierung besteht über die Art der Markierung. Iod beispielsweise lässt sich an der Aminosäure Tyrosin als Substituent am Aromaten einführen. Radiometalle müssen zumeist in eine Ligandstruktur eingebaut werden. Hierbei muss nicht wie beim integrated approach unbedingt das biologisch aktive Molekül selbst die Aufgabe der Komplexierung übernehmen. Dafür stehen Chelatliganden zur Verfügung, die als mono- oder multidentate Liganden die Komplexierung übernehmen. Komplexe dieser Art zeichnen sich dadurch aus, dass sie gerade *in-vivo* stabil gegenüber einem Ligandenaustausch sind. Für Metallionen haben sich DOTA und DTPA als

bewährte Ligandsysteme etablieren können, da sie eine Vielzahl von Metallionen komplexieren können und eine hohe Stabilität aufweisen.

Zu Beachten ist weiterhin, dass sich die Affinitäten der markierten Systeme zum gewünschten Rezeptor verändern können, wenn das Radiometall geändert wird. Die genauen Mechanismen sind noch unklar, es gilt aber als wahrscheinlich, dass unterschiedliche Ladungen oder Größen die Verteilungskoeffizienten beeinflussen [LIU 2003].

### 3.3 Trapping

Von besonderer Bedeutung ist das Anreichern der Radioaktivität im Zielgewebe, das **trapping**. Ohne diese Anreicherung ist es nicht möglich, die nötigen Bildkontraste aufzubauen.

Bei geeigneter Struktur werden die Moleküle nach der Internalisierung in das Zielgewebe (in der Regel Zellen) teilmetabolisiert, so dass die entstehenden Produkte als körperfremde Einheiten nicht unmittelbar weiter abgebaut und wieder ausgeschieden werden. Die Metaboliten verbleiben innerhalb der Zielstruktur. Durch dieses **trapping** wird eine Erhöhung der Aktivität im Ziel erreicht, was das Signal- zu Hintergrundverhältnis und damit die Bildqualität verbessert. Alternativ lassen sich bekannte Abbauewege nutzen und durch gezielte Unterbrechung die oben beschriebene Situation herbeiführen. Dies wird z.B. bei der FDG genutzt.

### 3.4 Nuklide zur Markierung

Grundsätzlich lässt sich jedes radioaktive Nuklid einsetzen, das den in Kapitel 4 vorgestellten Ansprüchen entspricht. Aus dieser großen Bandbreite sind allerdings aus praktischen Erwägungen heraus Vorentscheidungen zu treffen.

Unter den zur Verfügung stehenden Nukliden für Radiopharmaka nimmt bei der SPECT das Indium-111 eine interessante Rolle ein. Es besitzt zwar nicht die Verbreitung des Technetium-99m oder des Iod-131

und ist als in einem Beschleuniger zu generierendes Nuklid aufwändig in der Herstellung, es lässt sich aber sowohl für die Diagnostik als auch über die Erhöhung der eingesetzten Aktivität für eine nachfolgende Therapie einsetzen, ohne das Nuklid wechseln zu müssen. Durch die Möglichkeit, mit inaktiven Substanzen arbeiten zu können, ist die Strukturchemie gut bekannt, so dass effektive Ligandsysteme existieren. Diese Vorteile machen Indium-111 zu einem wichtigen Nuklid in der Nuklearmedizin.

### 3.5 Entwicklungsziele

Die gegenwärtige Radiopharmakaforschung ist geprägt von dem Wunsch, die Präparate immer selektiver zu gestalten, was die Überwachung ausgewählter biochemischer Prozesse ermöglicht. Aus wissenschaftlicher Sicht stellt sich hierbei allerdings das Problem, dass Indium zwar in der Nuklearmedizin aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften ein ideales Nuklid darstellt, es sich aber um ein körperfremdes Element handelt, das selbst von einer Koordinationshülle umgeben körpereigene Substanzen höchstens imitieren kann. Auch die nötige Koordinationshülle selbst stellt in der Regel ein körperfremdes Molekül dar.

Die Herausforderung für die Entwicklung neuer Radiopharmaka besteht nun darin, diese Widersprüche von biologisch aktiv und körperfremd zu überwinden und das aus physikalischer Sicht ideale Nuklid mit einer geeigneten Ligandenhülle zu versehen und an ein physiologisch aktives Biomolekül zu koppeln, so dass dessen Weg im Körper verfolgt werden kann. Hierbei ist insbesondere darauf zu achten, dass das Biomolekül nach der Markierung weiterhin vom Stoffwechselsystem akzeptiert wird. Wenn dies gelingt, kann das markierte Imitat weiterhin seinem ursprünglichen Weg durch den Stoffwechsel folgen.

## 4 Die bildgebenden Verfahren PET und SPECT

Der modernen Medizin stehen zahlreiche nicht invasive Diagnoseverfahren zur Verfügung, die zur Erzeugung hochqualitativer Abbildungen von Strukturen im Innern des Körpers geeignet sind. Die anzuwendende Methode richtet sich nach den gewünschten Informationen. Wenn es bevorzugt um morphologische Strukturen geht, sind Röntgen-, Ultraschall- oder Kernspinuntersuchungen gefragt. Die Stärken der bildgebenden Verfahren PET und SPECT liegen hingegen in der Möglichkeit, auch physiologische Prozesse visualisieren zu können.

### 4.1 SPECT

In der SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) wird die Emission von  $\gamma$ -Quanten mit Hilfe von Szintillationsdetektoren gemessen, um auf diese Art und Weise eine Ortsverteilung im Körper des Patienten bestimmen zu können. Hierzu werden sogenannte Gamma-Kameras verwendet, die mit einem Array aus Szintillatorkristallen und Photomultipliern die von den Radionukliden emittierten Quanten detektieren und rechnergestützt den Ort des Zerfalls rekonstruieren können.

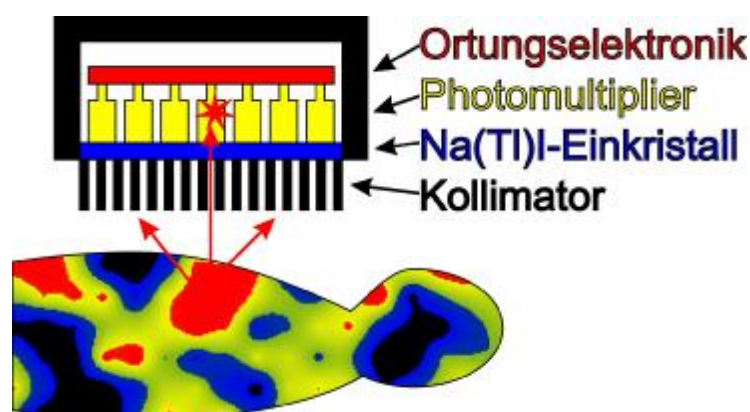


Abbildung 4: SPECT, Prinzip

Abbildung 4 zeigt das grundlegende Prinzip. Die emittierten Gammaquanten treffen durch einen Kollimator senkrecht auf einen



Szintillatorkristall auf. Die entstehenden Lichtblitze werden mittels der Photomultiplier detektiert.

Wie Abbildung 5 zeigt, wird die Darstellung der Aktivitätsverteilung aus den detektierten Gammaquanten in einem Raster ermittelt. Hierbei ist zu beachten, dass das Raster für die Darstellung typischerweise ca. 1 cm beträgt, der Durchmesser der eingesetzten Kristalle und Photomultiplier jedoch weitaus größer ist (typ. 10 cm).

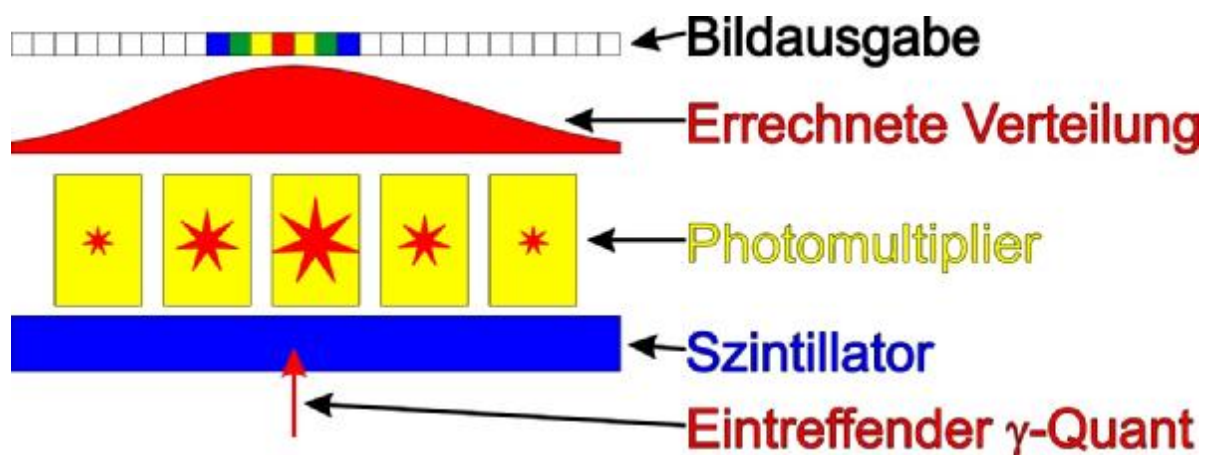


Abbildung 5: Bildrekonstruktion SPECT, 1D-Modell

Diese Umrechnung ist möglich, da beim Eintreffen eines Gammaquants mehrere Photomultiplier ansprechen und über eine Gauß-Verteilung das Zentrum rechnerisch bestimmt werden kann. Auf diese Art und Weise ist die per Software erzielbare Auflösung größer als die physikalische Auflösung der Kamera.

Ein derartiger Aufbau liefert 2D-Bilder. Wenn die Kameraköpfe (typisch: 2 oder 3) zusätzlich um den Patienten bewegt werden, ist durch Überlagerung der einzelnen Bilder eine dreidimensionale Darstellung der Aktivitätsverteilung möglich. In vielen Fällen genügt jedoch bereits eine 2D-Darstellung.

## 4.2 PET

In der PET (Positron Emission Tomographie) kommen als Radionuklide Positronenemitter zum Einsatz. Beim Zerfall eines  $\beta^+$ -aktiven Nuklids wird

das freigesetzte Positron zunächst in der umgebenden Materie abgebremst, bevor es durch die Wechselwirkung mit einem Elektron 2 Quanten mit 511 keV als Vernichtungsstrahlung in einem Raumwinkel von  $180^\circ$  emittiert.

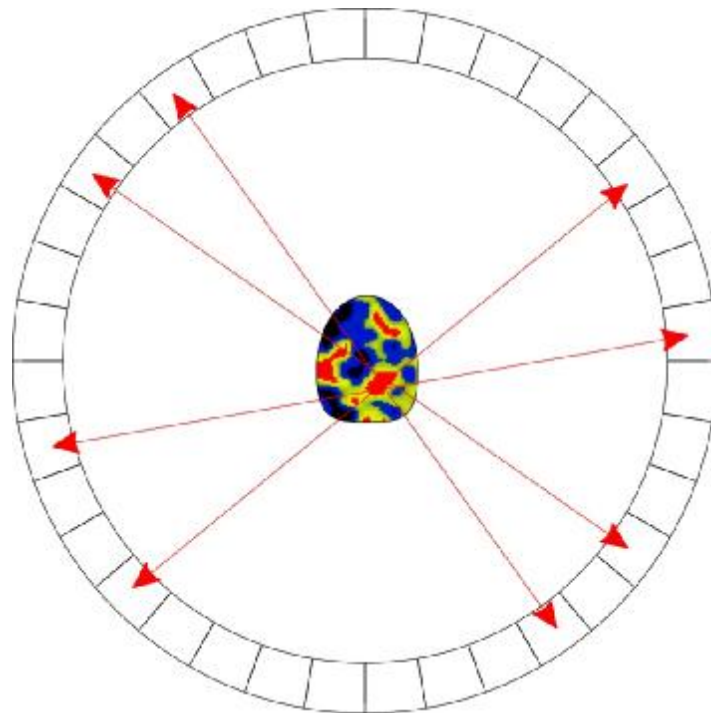


Abbildung 6: PET, Prinzip

Diese Annihilationsstrahlung wird durch ein ringförmiges Detektorsystem detektiert, wobei anschließend rechnergestützt der Ort des Zerfalls bis auf wenige Millimeter genau ermittelt werden kann. Auf diese Art und Weise lässt sich die räumliche Verteilung des Radiopharmakons im Körper mit hoher Auflösung darstellen.

Der Nachteil der PET liegt an der inhärenten Unsicherheit der Ortsauflösung. Die Annihilation findet bis zu einigen mm vom Ort des Zerfalls entfernt statt.

### 4.3 Vergleich PET – SPECT

Der Vorteil in der SPECT liegt darin, dass zumeist günstige Nuklide mit längeren Halbwertszeiten eingesetzt werden können. Hier finden beispiels-

weise Generatorknuklide wie Technetium-99m Verwendung. Bei der PET hingegen kommen  $\beta^+$ -Emitter zum Einsatz, die nur in Beschleunigern erzeugt werden können, was höhere Kosten verursacht. Weiterhin haben die in der PET eingesetzten Nuklide, insbesondere die biologischen Nuklide wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff sehr kurze Halbwertzeiten, so dass die Einsatzmöglichkeiten an eine direkte räumliche Nähe zu einem Beschleuniger eingeschränkt sind, da unmittelbar im Anschluss an die Herstellung der Nuklide die Synthese der Radiopharmaka erfolgen muss.

Es lassen sich aber auch Metalle wie Gallium-68 einsetzen, so dass Radiopharmaka mit den in dieser Arbeit verwendeten Ligandsystemen einen einfachen Weg vom SPECT- zum PET-Radiopharmakon gehen können. Hierdurch kann dieser Nachteil der PET zum Teil wieder ausgeglichen werden.

Die Einschränkung der SPECT liegt in ihrer Ortsauflösung und der Empfindlichkeit. Obwohl das Photon, das detektiert wird, direkt vom Ort des Zerfalls stammt, kann aufgrund der heute verwendeten Detektorsysteme die hohe Bildqualität der PET in der Praxis nicht erreicht werden. Mittels geeigneter Kollimatoren ließe sich hier prinzipiell eine wesentlich höhere Auflösung ( $< 1$  mm) erreichen. In Kleintier-SPECT-Systemen konnte gezeigt werden, dass dies prinzipiell technisch machbar ist, eine Anwendung für humanmedizinische Fragestellungen in der Routinediagnostik ist mit diesen Systemen allerdings nicht durchführbar.

## 5 Radionuklide in der PET und SPECT

Eine Voraussetzung für eine nuklearmedizinische Untersuchung ist die Bereitstellung geeigneter Radiopharmaka. Aus pharmakologischer Sicht ist es optimal, wenn diese durch Isotopenaustausch aus Biomolekülen hergestellt werden, damit die Struktur des interessierenden Moleküls und somit seine Eigenschaften nicht verändert werden. Hier kommen zunächst Elemente wie Kohlenstoff, Sauerstoff oder Stickstoff in Frage; aus chemischen, physikalischen oder kommerziellen Erwägungen kommen aber auch zahlreiche weitere Nuklide zum Einsatz.

### 5.1 Eigenschaften der Nuklide

Ein Nuklid, das für PET oder SPECT eingesetzt werden soll, muss für einen Routineeinsatz besondere Eigenschaften aufweisen:

- Die Halbwertszeit des Nuklids muss lang genug sein, um Markierungssynthesen und die anschließende Untersuchung ohne erheblichen Aktivitätsverlust innerhalb einiger Halbwertszeiten durchführen zu können. Zu lange Halbwertszeiten hingegen erhöhen die Strahlenbelastung des Patienten. Ein Optimum ist zwischen wenigen Stunden und mehreren Tagen zu suchen, auch abhängig von der Art der durchzuführenden Untersuchung.
- Für diagnostische Anwendungen sollte weder das Radionuklid noch seine nach Möglichkeit stabilen Zerfallsprodukte Korpuskularstrahlen aussenden, die das Gewebe zerstören können.
- Außer den genutzten monoenergetischen Photonen sollen keine zusätzlichen hochenergetischen Gammaquanten emittiert werden, da dies zusätzliche Probleme beim Strahlenschutz erzeugt und für die Kamerasysteme eine Erhöhung des Untergrunds mit einer einhergehenden Verschlechterung der Bildqualität bedeutet.
- Das Nuklid muss für den Routineeinsatz kostengünstig herzustellen und leicht verfügbar sein.

## 5.2 Nuklide für die SPECT

Für die SPECT muss das Radioisotop  $\gamma$ -Quanten ausstrahlen, deren Energie vom verwendeten Detektor optimal zu erfassen und ausreichend ist, um auch tiefer liegende Organe abbilden zu können. Hier liegt das Optimum zwischen 100 und 300 keV. Beispiele hierfür sind Technetium-99m mit 141 keV oder Indium-111 mit: 245 keV-Gammaquanten.

Bei SPECT-Untersuchungen werden nach Möglichkeit  $\gamma$ -Strahler wie Technetium-99m, Iod-123 oder Indium-111 als Markierungsnuklide verwendet. Diese Nuklide besitzen Halbwertzeiten von mehreren Stunden ( $^{99m}\text{Tc}$ :  $t_{1/2} = 6,02$  h oder  $^{123}\text{I}$ :  $t_{1/2} = 13,2$  h) bis hin zu einigen Tagen ( $^{111}\text{In}$ :  $t_{1/2} = 2,85$  d), wodurch sie einfach in der Handhabung sind und die Strahlenbelastung des Patienten gering halten.

## 5.3 Nuklide für die PET

Für die PET muss das Radioisotop ein  $\beta^+$ -Emitter sein, der im Idealfall keine weiteren Gammaquanten emittiert, um die Strahlenbelastung des Patienten gering zu halten. Hierzu finden überwiegend Kohlenstoff-11, Stickstoff-13, Sauerstoff-15 und Fluor-18 Verwendung. Insbesondere bei den ersten drei Nukliden ist unmittelbar erkennbar, dass durch Isotopenaustausch Biomoleküle perfekt imitiert werden können. Fluor-18 hingegen kann relativ leicht eine Hydroxylgruppe ersetzen, wodurch beispielsweise die heute häufig eingesetzte 2- $^{18}\text{F}$ Fluor-2-desoxy-D-glucose erhalten wird.

Die Probleme der PET liegen in den kurzen Halbwertzeiten der verwendeten gängigen Nuklide, die zwischen  $t_{1/2} = 2,03$  min für Sauerstoff-15 und  $t_{1/2} = 109,7$  min für Fluor-18 liegen, und dem apparativen Aufwand, der durch die Herstellung in einem Zyklotron getrieben werden muss. Hieraus folgt, dass die laufenden Kosten für die PET relativ hoch sind, was dem Verfahren den Einzug in den klinischen Routinebetrieb erschwert.

## 6 Indium-111 als Nuklid für Radiodiagnostik und Radiotherapie

### 6.1 Physikalische Eigenschaften des Indium-111

Indium-111 zerfällt unter Elektroneneinfang und emittiert dabei  $\gamma$ -Strahlung mit Energien von 171 keV und 247 keV (90,2 % und 94,0 % relative Gammaintensität) [HELMER 1998]. Aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von 2,81 d wird Indium-111 in der Szintigraphie häufig verwendet.

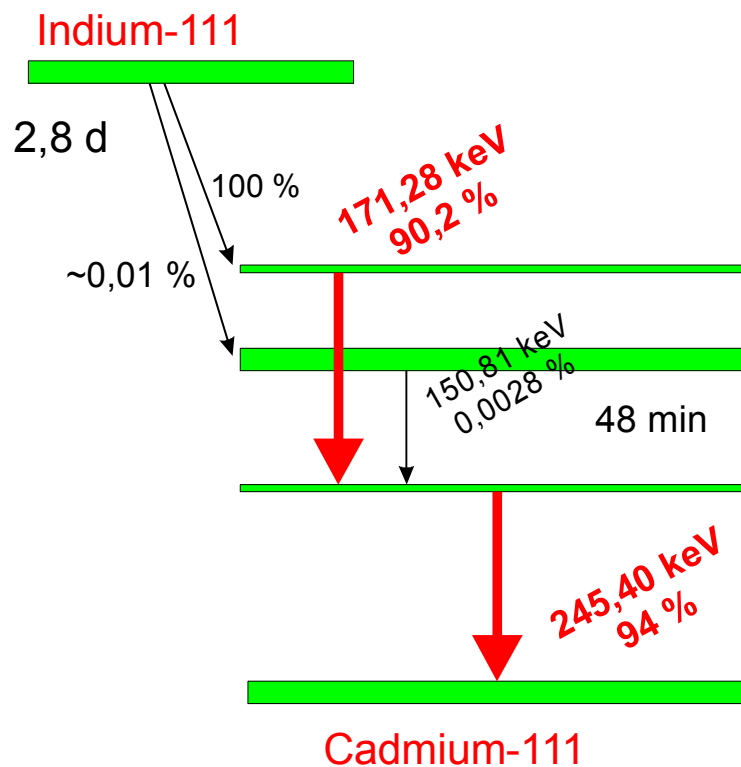


Abbildung 7: Zerfallsschema Indium-111 [vereinfacht nach HELMER 1998]

Hergestellt wird Indium-111 in einem Beschleuniger aus Cadmium-111 mittels einer  $^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$ -Kernreaktion. Zur Abtrennung des Indium-111 werden verschiedene Techniken angewandt, typischerweise SPE (Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion), Flüssig-Flüssig-Extraktion oder in einigen Fällen auch Mitfällung mittels  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  [ANDERSON 1999].

Aufgrund der Halbwertszeit von 2,81 d können Markierung, Applikation und Messung am Patienten bequem durchgeführt werden. Auch sind längere Beobachtungen über eine Woche möglich. Das Nuklid zerfällt jedoch schnell genug, um die Strahlenbelastung beim Patienten gering zu halten, so dass bei therapeutischen Anwendungen bis zu 20 GBq appliziert werden können. Nach der Kernumwandlung liegt Cadmium-111 vor, welches stabil ist und keine weiteren Strahlenbelastungen verursacht. Die Chemotoxizität des Cadmiums kann wie die des Indiums aufgrund der geringen Menge vernachlässigt werden [WANG 1999; CUTLER 2000].

Die Chemie des Indiums ist durch das Vorhandensein inaktiver Nuklide gut bekannt, so dass auf bekannte Konzepte zurückgegriffen werden kann.

Um die beschriebenen Eigenschaften des Indium-111 nutzen zu können, muss es für Anwendungen am Patienten gelingen, das körperfremde Element zu maskieren und mit einem biologisch aktiven Molekül zu koppeln, so dass sich sein Weg im Stoffwechsel durch den Körper verfolgen lässt. Das Hauptproblem hierbei ist, dass das biologische Molekül modifiziert werden muss, was dazu führen kann, dass seine Bioaktivität herabgesetzt oder sogar verändert wird. Daher müssen die potenziellen Radiopharmaka sorgfältig entwickelt werden, wofür eine gute Kenntnis der entscheidenden Stoffwechselmechanismen wie Transporterfunktionen notwendig ist.

## 6.2 Chemische Eigenschaften des Indium-111

Die Oxidationsstufe von Indium in wässriger Lösung unter physiologischen Bedingungen ist +3. Im Einklang mit dem HSAB (Hard Soft Acid Base)-Prinzip nach Pearson wird das harte  $\text{In}^{3+}$ -Ion bevorzugt von Liganden mit ebenso harten Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Donoratomen komplexiert. Bei  $\text{In}^{3+}$ -Komplexen treten abhängig vom Liganden Koordinationszahlen von 3 bis 7 auf, wobei höhere Koordinationszahlen bevorzugt werden. Studien haben gezeigt, dass die Koordinationszahl 6 sowohl aus thermodynamischer Sicht als auch unter in-vivo-Bedingungen die stabilste Konfiguration darstellt [SUN 1996].

Aufgrund der hohen Konzentration des Proteins Transferrin im Plasma und der hohen Stabilität des  $\text{In}^{3+}$ -Transferrin-Komplexes müssen thermodynamisch stabile bzw. für einen Metall-Ionen-Austausch kinetisch inerte Komplexe präpariert werden, um einen in-vivo-Austausch des  $\text{In}^{3+}$  zu verhindern. Chelatliganden mit Carboxyl- und Amino-Gruppen wie EDTA (Ethyldiammintetraacetat)-, DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure)- oder DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N-N'-N''-N'''-tetraessigsäure)-Derivate haben sich hierbei bewährt.

Da die Komplexierung mit mehrzähligen Chelatoren oftmals langsamer abläuft, wird ein derartiger Komplex in der Regel über eine Ligandenaustauschreaktion dargestellt.  $\text{InCl}_3$  wird bei diesem Vorgehen zuerst mit einem schwach bindenden Liganden wie zum Beispiel Acetat komplexiert, um anschließend daraus den stabileren Chelat-Komplex zu bilden.

Bei  $\text{pH} > 3,4$  wird unlösliches Indiumhydroxid gebildet. Dies erfordert ein Arbeiten im neutralen oder schwach sauren Milieu, wodurch mit Essigsäure-Acetatpuffersystemen sowohl der pH-Wert auf optimale Markierungsbedingungen eingestellt werden kann als auch das Vorhandensein von Prä-Chelatoren zur Durchführung des Ligandenaustauschs gewährleistet ist.



## 7 DOTA und DTPA als Liganden für Radiometalle

Das in dieser Arbeit eingesetzte Indium-111 muss fest in einer Ligandenhülle gebunden werden, um beim Einsatz in-vivo einen Ligandenaustausch zu verhindern. Angestrebt werden hierbei kinetisch stabile Komplexe, da ansonsten unter den in-vivo herrschenden Bedingungen das Radiometall der Liganden verlassen kann. Insbesondere die starke Verdünnung führt selbst bei thermodynamisch stabilen Komplexen dazu, dass der Komplex über die Verweildauer im Körper des Patienten, die eine Woche oder mehr betragen kann, dissoziieren kann und somit die Möglichkeit längerfristiger Untersuchungen nimmt.

### 7.1 DTPA

Als Ligand für metallische Radionuklide hat sich DTPA in der Forschung und Anwendung von Radiopharmaka etabliert.

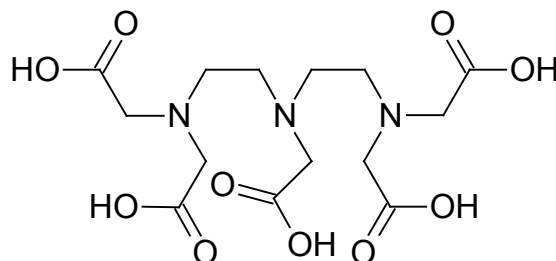


Abbildung 8: DTPA, C<sub>14</sub> H<sub>23</sub> N<sub>3</sub> O<sub>10</sub>, M = 393,35 g/mol

Durch die offene Struktur des DTPA ist es in der Lage, eine Vielzahl von metallischen Radionukliden zu komplexieren. DTPA kann auf mehreren Wegen an das biologisch aktive Molekül gebunden werden. Zum Einen besteht die Möglichkeit, an einer der Ethylenbrücken einen Linker anzusetzen, zum Anderen kann die Konjugation an einer der terminalen freien Carbonsäuren erfolgen. Dies wird ausgehend vom DTPA-DA (Diethylentriaminpentaessigsäure-Dianhydrid) durchgeführt. Die zyklischen Carbonsäureanhydride öffnen sich und lassen einen schnellen Reaktionsverlauf zu [HNATOWICH 1983].

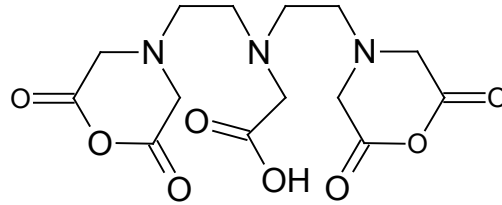


Abbildung 9: DTPA-DA,  $C_{14}H_{19}N_3O_8$ ,  $M = 357,32 \text{ g/mol}$

### 7.1.1 Komplexstabilität

DTPA-Metallkomplexe sind unter in-vivo-Bedingungen ausreichend stabil, um eine Transmetallierung zu verhindern. Bei der Konjugation mittels DTPA-DA zeigt der heptadentate Ligand eine geringere Stabilität, wobei auch die nähere chemische Umgebung, hier das bioaktive Molekül, einen Einfluss hat [MÄCKE 1989; LI 2001].

### 7.1.2 Struktur

DTPA fungiert beim Einsatz von Indium als ocadentater Ligand, bei der Konjugation über eine der terminalen Carbonsäuren als heptadentater Ligand.

Bei einem DTPA-Indium-Komplex koordinieren die 3 Stickstoffatome und die 5 deprotonierten Carboxylgruppen am Metallzentrum, was zu einer verzerrten archimedischen antiprismatischen Struktur führt. Diese Struktur liegt sowohl in Lösung als auch im Kristall vor [MÄCKE 1989].

## 7.2 DOTA

In der Forschung und Routine hat sich auch DOTA etabliert, weil es ermöglicht, eine Vielzahl von Radiometallen stabil zu komplexieren.

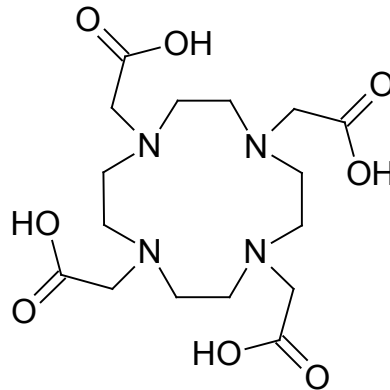


Abbildung 10: DOTA,  $C_{16}H_{28}N_4O_8$ ,  $M = 404,42$  g/mol

DOTA ist ein mehrzähliger Ligand, der sowohl viele Metalle komplexieren kann als auch vielfältig an biologisch aktive Moleküle konjugiert werden kann. Bevorzugt werden dreiwertige Metalle wie  $In^{3+}$  oder  $Gd^{3+}$  gebunden, doch auch zweiwertige Metalle wie  $Cu^{2+}$  können von DOTA komplexiert werden.

Die Konjugation an biologisch aktive Moleküle erfolgt entweder über eine Verknüpfung an einer der Ethylenbrücken unter Verwendung eines zusätzlichen Linkers oder aber an einer der 4 freien Carbonsäuregruppen. Im letzteren Fall ist dabei zu beachten, dass durch die Konjugation eine Wertigkeit des Liganden verloren geht.

Diese Bandbreite an möglichen Metallzentren und die unterschiedlichen Verknüpfungsmöglichkeiten machen DOTA zu einem vielseitigen Werkzeug.

Auf der anderen Seite ist es die Stabilität der DOTA-Metall-Komplexe, welche die Reaktionsführung mitunter schwierig gestaltet, da auch Metallionen wie Calcium, Magnesium oder Natrium von DOTA komplexiert werden können, was eine spätere Radiomarkierung unmöglich macht [MARTELLI 1996].

### 7.2.1 Komplexstabilität

Zur Stabilität von DOTA-Metallkomplexen liegen zahlreiche Untersuchungen vor, was zum Einen auf die Verwendung von DOTA-

Gadolinium als Kontrastmittel in der MRT, zum Anderen aber auf seine universelle Einsetzbarkeit als Ligand für Radiometalle zurückzuführen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass DOTA sowohl in-vitro als auch unter in-vivo-Bedingungen eine große Stabilität aufweist und hier den ebenfalls etablierten Liganden DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) übertrifft [BYEGARD 1999; LI 2001].

Die große kinetische Stabilität der Komplexe wird durch die starre Struktur der Komplexe erklärt, die einen Ligandenaustausch und eine Transmetallierung unterbindet [BURAI 1998].

### 7.2.2 Struktur

Die grundlegenden Strukturen, die ein  $M^{3+}$ -DOTA-Komplex einnehmen kann, sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Neben allgemeinen Überlegungen zur Anordnung der Metallionen in der Ligandenhülle lieferten  $^1H$ -NMR-Studien Informationen über die Bildungsmechanismen der Komplexe [KADEN 2000; BURAI 1998; AIME 1997a]. Untersuchungen an DOTA-Gadolinium-Komplexen mittels  $^{17}O$ -NMR-Untersuchungen gaben Aufschluss über dynamische Prozesse des Komplexes [CORSI 2001]. Hier wurden Interkonversionen zwischen verschiedenen Stereoisomeren beobachtet, die aber ohne Auswirkungen auf die Stabilität des Komplexes bleiben. Kristallstrukturanalysen unterstützen diese Befunde [AIME 1997b]. Rechenmodelle zeigen ebenfalls, dass die Bildung des DOTA-Metallkomplexes schnell und irreversibel abläuft [JANG 1999].

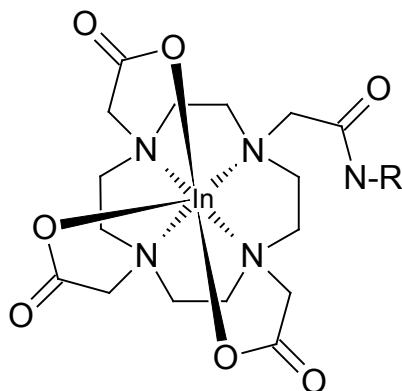


Abbildung 11: DOTA-Indiumkomplex in Lösung [nach LIU 2003]

Wie obige Untersuchungen zeigen, ist DOTA grundsätzlich für die Darstellung einer Vielzahl stabiler  $M^{3+}$ -Komplexe geeignet. Jedoch gibt es zwischen den Metallen zum Teil deutliche Unterschiede, was die Eigenschaften der Komplexe betrifft. So zeigen Indium- und Yttrium-DOTA-Komplexe beispielsweise ein unterschiedliches hydrophiles Verhalten, was auf eine andere Koordinationsstruktur zurückgeführt wird. Es wird angenommen, dass der Yttrium-Komplex aufgrund der Größe des Yttrium-Ions weniger Freiheitsgrade besitzt als der Indium-Komplex, was aber ohne Auswirkung auf die chemische Stabilität bleibt [LIU 2002].

Gerade bei kleinen bioaktiven Molekülen ist dieser Unterschied bei einem Wechsel des Metalls zu berücksichtigen, da hier die Bioverteilung merklich beeinflusst werden kann [LIU 2002].

Weiterführende Arbeiten haben mittels NMR-Untersuchungen der Moleküle in Lösung ergeben, dass die Bindungslängen der Liganden (N bzw. O) zum Metall bei Yttrium- und Indium-DOTA-Komplexen identisch sind, aber durch die unterschiedlichen Ionenradien eine andere Komplexstruktur zeigen [LIU 2003].

Ebenfalls wurde herausgefunden, dass durch diese Fluktuationen die Komplexstrukturen in fester Phase (Kristall) eine andere sein kann als in Lösung, was die alleinigen Untersuchungen von Kristallstrukturen der Indium-DOTA-Komplexe als nicht ausreichend erscheinen lässt. Hier besteht noch Forschungsbedarf, um die Prozesse in Lösung verstehen zu können.

## 8 Peptide in der Nuklearmedizin

Peptidrezeptoren, die an der Oberfläche von Tumoren (über-)exprimiert werden, stellen ein ideales Ziel für die Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen dar. Peptidische Radiopharmaka können mit hoher Affinität an diese Rezeptoren binden.

Peptidrezeptor	Tumortyp
Somastotatinrezeptor	neuroendokrine Tumore kleinzelliges Bronchialkarzinom medulläres Schilddrüsenkarzinom div. Tumore des Nervensystems Lymphome (NHL, M. Hodkin)
VIP-Rezeptor	verschiedene Adenokarzinome (Magen, Darm, Pankreas, Lunge etc) kleinzelliges Bronchialkarzinom neuroendokrine Tumore Lymphome
CCK-B Rezeptor	div. Adenokarzinome (Magen, Darm, Pankreas, Lunge etc) kleinzelliges Bronchialkarzinom neuroendokrine Tumore Lymphome
Substance-P Rezeptor	medulläres Schilddrüsenkarzinom kleinzelliges Lungenkarzinom Mammakarzinom Peri- und Intratumoralgefäße
Bombesin/GRP Rezeptor	kleinzelliges Bronchialkarzinom Darmkrebs
Neurotensin Rezeptor	Pankreaskarzinom Prostatakarzinom kleinzelliges Bronchialkarzinom
LHRH Rezeptor	Mammakarzinom Prostatakarzinom Endometriumkarzinom Ovarialkarzinom

Tabelle 1: Typische Peptidrezeptoren auf Tumoren

Die Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von regulatorischen Peptiden, für die in menschlichen Tumoren Rezeptoren (über-)exprimiert werden [BEHR 1999a; BEHR 1999b].

Somatostatinderivate waren die ersten klinisch angewendeten peptidischen Radiopharmaka. Bis heute ist Indium-111 markiertes DTPA-[D-Phe<sup>1</sup>]octreotid (Pentereotid) das erste und einzige Peptid, das eine Zulassung für die Darstellung von Tumoren über Peptidrezeptoren in Europa und den USA besitzt und auch routinemäßig eingesetzt wird.

## 9 Luteinising Hormone Releasing Hormone (LHRH)

LHRH gehört zur Gruppe der Gonadotropin-freisetzenden Hormone, von denen GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) das am häufigsten vorkommende ist. Der LHRH-Rezeptor stellt ein interessantes System dar, da er von verschiedenen Tumoren wie Mammakarzinom, Endometriumkarzinom, Ovarialkarzinom und Prostatakarzinom exprimiert wird. Da nur wenige Normalgewebe diesen Rezeptor exprimieren, bietet sich dieses System für eine gezielte Untersuchung an.

### 9.1 LHRH im Normalgewebe und Stoffwechsel

GnRH spielt eine Schlüsselrolle beim Reproduktionsprozess. Es wird von hypothalamischen Neurosekretionszellen ausgeschüttet, was nach der Bindung an die Rezeptoren der hypophysären gonadotropen Zellen zur Ausschüttung von LH (Luteinising Hormone) und FSH (Follicle Stimulating Hormone) führt. Dies reguliert die Produktion der gonadalen Steroidsynthese bei beiden Geschlechtern [HARRISON 2004; CHEN 2005]. Bei der Frau werden die Ovarien stimuliert, was zum Eisprung führt und zur Ausschüttung von Östrogenen und Progesteronen führt. Beim Mann wird die Spermienproduktion angeregt und in der Folge Testosteron ausgeschüttet.



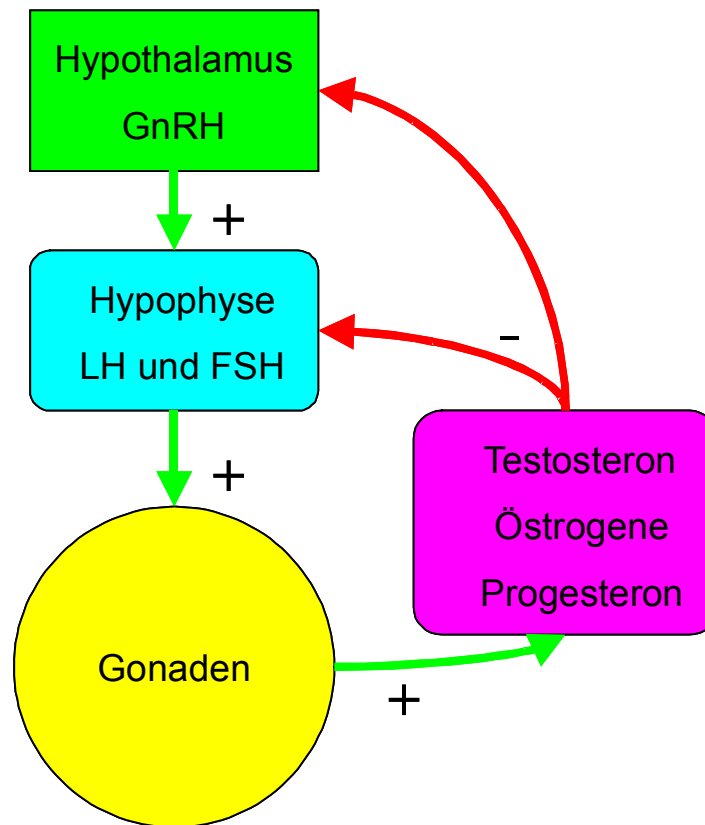


Abbildung 12: Regulationskette GnRH

Während der Großteil der Ovarial- und Endometriumkarzinome den LHRH-Rezeptor exprimieren, besitzen nur wenige Normalgewebe diese Rezeptoren. Sie werden typischerweise in den hypophysären gonadotropen Zellen, in hypothalamischen Neuronen und anderen Teilen des Gehirns exprimiert. Aufgrund der Blut-Hirn-Schranke, die von LHRH nicht überwunden werden kann, werden diese Teile jedoch bei einer möglichen Anwendung nicht tangiert. Es kann eine Wirkung an gonadotropen Hypophysezellen erwartet werden, jedoch ist eine Suppression der gonadotropen Funktionen klinisch wünschenswert, um mitogene Effekte von Gonadotropinen auf gynäkologische Karzinome zu unterbinden.

Neben diesen gut untersuchten Funktionen spielt GnRH auch eine Rolle als autokriner oder parakriner Regulator in extrahypophysären Geweben der reproduktiven Organe wie Endometrium, Myometrium, Ovar, Tube und Zervix. Diese exprimieren ebenfalls den LHRH-Rezeptor. Bei Vorliegen eines Endometrium- oder Ovarialkarzinoms werden diese Organe jedoch in der Regel ganz oder teilweise entfernt.

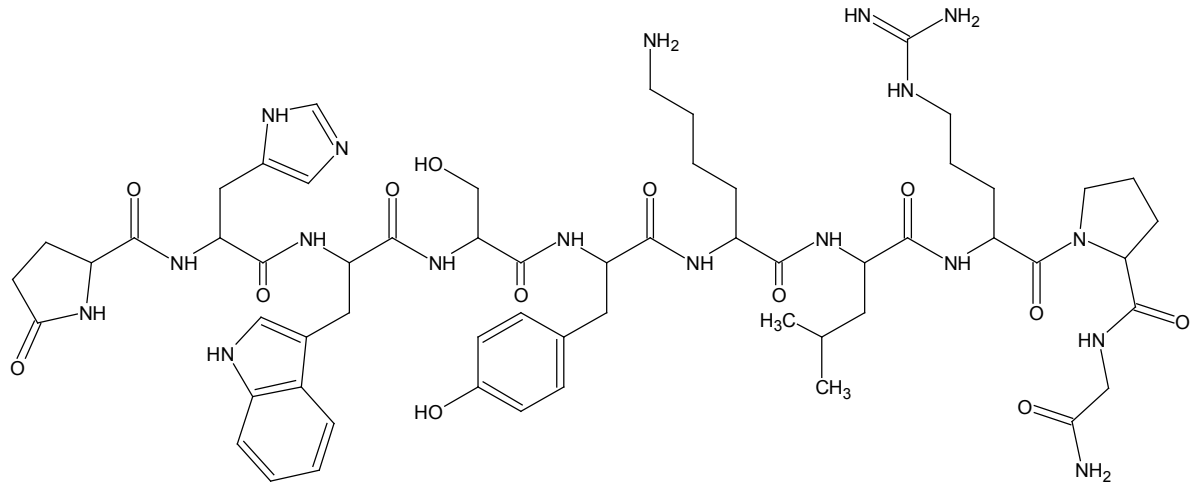
Da auch im blutbildenden und lymphatischen System keine LHRH-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten, sind wenige bis keine Nebenwirkungen einer Therapie zu erwarten, die über diese Rezeptoren vermittelt wird. Der LHRH-Rezeptor stellt somit ein ideales Ziel für die hier vorgestellten Karzinome dar. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass bei Metastasen die LHRH-Rezeptor-Exprimierung erhalten bleibt.

Insbesondere GnRH II scheint bei Nicht-Säugetieren ein umfangreicheres Aufgabengebiet zu besitzen, wie z.B. die Kaliumregulation in bestimmten Zellen wie beispielsweise in Ganglien [CHEN 2005].

Aber auch beim Menschen scheinen GnRH II-Rezeptoren eine zunehmend wichtigere Rolle in der medizinischen Anwendung zu spielen, da diese Systeme vermehrt in Tumoren identifiziert werden, was eine Optimierung der Erkennung auf diese Rezeptoren hin erstrebenswert erscheinen lässt.

## 9.2 Struktur

Durch die Strukturaufklärung des LHRH konnte die Forschung auf diesem Gebiet große Fortschritte machen [SCHALLY 1971a; SCHALLY 1971b]. Seit dieser Zeit sind GnRH und seine Derivate Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die in der Forschung eingesetzten LHRH-Derivate stellen Modifikationen des Human-GnRH I (im Folgenden als GnRH bezeichnet) dar [NEILL 2002]. Bei beiden Molekülen handelt es sich um lineare Decapeptide, die Aminosäuresequenzen werden in Tabelle 2 dargestellt.

Abbildung 13: LHRH, C<sub>59</sub> H<sub>84</sub> N<sub>18</sub> O<sub>13</sub>, M = 1253,41 g/mol

In dieser Arbeit wird ausschließlich mit der [D-Lys<sup>6</sup>]-Modifikation des LHRH gearbeitet, im Folgenden nur noch als LHRH bezeichnet. Das Lysin an Position 6 als Variation gegenüber GnRH ermöglicht es, Modifikationen an der Seitenkette effektiv vornehmen zu können, ohne die Bindungswechselwirkungen zu beeinträchtigen [BYRNE 1998; GALI 2001]. Durch die D-Modifikation des D-Lys<sup>6</sup> wird der Abbau in-vivo gehemmt, was eine längere Verweildauer im Serum ermöglicht, um das Targeting effektiver zu gestalten.

GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	GlyNH <sub>2</sub>
GnRHII	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	GlyNH <sub>2</sub>
LHRHII	pGlu	His	Trp	Ser	His	DLys	Trp	Tyr	Pro	GlyNH <sub>2</sub>
LHRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	DLys	Leu	Arg	Pro	GlyNH <sub>2</sub>
Triptorelin	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	DTrp	Leu	Arg	Pro	GlyNH <sub>2</sub>

Tabelle 2: Aminosäuresequenzen von GnRH und GnRH-Derivaten

GnRH II konnte nicht nur in Säugetieren, sondern auch in Fischen, Hühnern und anderen Tieren nachgewiesen werden [CHEN 2005]. Es wird vermutet, dass die vorliegenden Modifikationen an den Position 5, 7 und 8 es erlauben, durch eine Verstärkung der hydrophoben Eigenschaften an diesen Positionen die Affinität des Peptids zum Rezeptor effektiv zu erhöhen. Hieraus wurde die Struktur des LHRH II analog zum GnRH II abgeleitet. In Forschung und Routine sind zahlreiche von obigen Strukturen abgeleitete Verbindungen im Einsatz. Insgesamt sind mehr als

3000 LHRH-Agonisten und Antagonisten bekannt, doch nur wenige sind im Routineeinsatz wie z.B. [D-Trp<sup>6</sup>]-LHRH, [D-Leu<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-NH<sup>Et</sup>]-LHRH, [D-Ser(**t-Bu**)<sup>6</sup>, Aza-Gly<sup>10</sup>]-LHRH, oder [D-Nal(2)<sup>6</sup>]-LHRH [CONN 1994, EMONS 1994]. Diese zeichnen sich insbesondere dadurch aus, dass sie als LHRH-Agonisten eine bessere Rezeptoraffinität aufweisen.

Das in Tabelle 2 vorgestellte Triptorelin ist ein derartiger GnRH-Agonist und zeichnet sich durch eine höhere Affinität zum GnRH-Rezeptor und eine höhere Plasmastabilität unter in-vivo-Bedingungen aus. Triptorelin wird im Rahmen dieser Arbeit als Blocksubstanz bei Bindungsstudien am Zellmodell eingesetzt.

### 9.3 LHRH-rezeptorexprimierende Tumore

Das Endometriumkarzinom ist eine der häufigsten gynäkologischen Krebserkrankungen. Bei günstigen Prognosen, wie einer Erkennung in einem frühen Stadium, ist ein operativer Eingriff oder eine Strahlentherapie mit guten Heilungschancen möglich. Bei Fällen ungünstiger Prognose wie höheren Alters der Patientin oder eines späten Stadiums des Tumors gibt es zur Zeit keine Therapie mit Aussicht auf Remission des Karzinoms. Auch fehlt eine präoperative Diagnostik dieser Tumoren.

Seltener sind Ovarialkarzinome, die jedoch grundsätzlich eine schlechtere Prognose aufweisen. Diese Karzinome sind ebenfalls in Frühstadien operativ oder chemotherapeutisch mit etablierten Methoden mit guten Aussichten heilbar, für Spätstadien oder Rezidive aber existieren auch hier kaum Verfahren mit Erfolgsaussichten. Dies führt dazu, dass diese Karzinome die häufigste Krebstodesursache bei Frauen darstellen.

Über 80 % der angesprochenen Karzinomtypen exprimieren den LHRH-Rezeptor, was eine Radiodiagnostik und -therapie mittels peptidischer Radiopharmaka auf LHRH-Basis erfolgversprechend erscheinen lässt [WESTPHALEN 2000].

## 9.4 Rezeptorbindung

Beim LHRH findet die Erkennung und Bindung an den Rezeptor über die terminalen Enden statt. Von besonderer Bedeutung ist das N-terminale Ende, an dem keine Modifikationen vorgenommen werden dürfen, um die Bindung zum Rezeptor noch zu ermöglichen [BYRNE 1998; WESTPHALEN 2000; HOFFMANN 2000].

Auch für das C-terminale Ende zeigen Experimente und Modellierungen, dass Modifikationen an diesem Ende des Peptids eine Verringerung der Affinität zum Rezeptor zur Folge haben. Also kommt beiden Enden des Peptids eine zentrale Rolle bei der Bindung an den Rezeptor zu [WESTPHALEN 2000; HOFFMANN 2000].

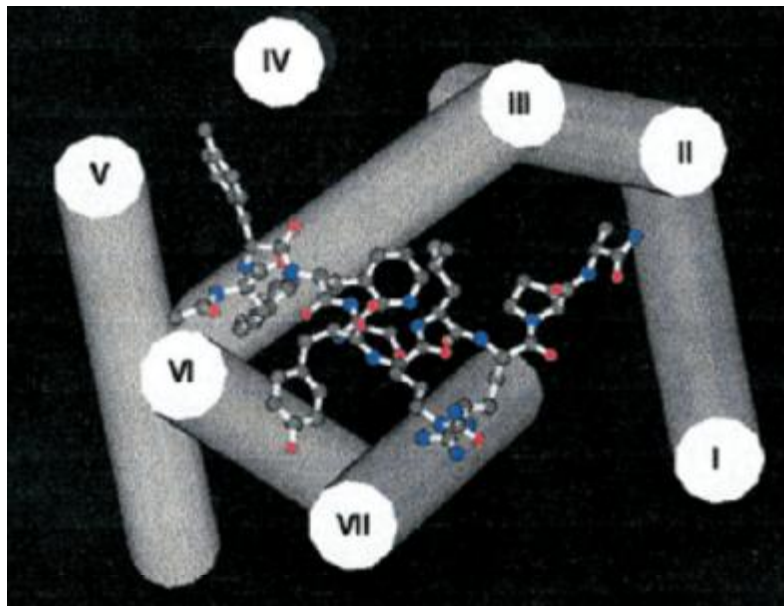


Abbildung 14: GnRH im Rezeptormodell [HOFFMANN 2000]

Dies hat zur Folge, dass Modifikationen des Peptids zur Verknüpfung mit Radiometallen im mittleren Bereich des Peptids zu erfolgen haben. Von besonderer Bedeutung ist hierbei das D-Lys<sup>6</sup> des der in dieser Arbeit eingesetzten LHRH-Derivats, das einen optimalen Anknüpfungspunkt darstellt.

## 9.5 Bisherige Anwendungen

### 9.5.1 Hormonbehandlung

LHRH und LHRH-Agonisten werden zur Therapie von verschiedenen Karzinomen eingesetzt. Das Prinzip der hormonellen Krebstherapie besteht in der Inaktivierung der betroffenen gonadalen Zellen (medikamentöse Kastration).

Seit Ende der 80er Jahre finden LHRH-Analoga, insbesondere LHRH-Agonisten, Verwendung zur Therapie von Brustkrebs unter bestimmten Rahmenbedingungen Auch zur Therapie von Karzinomen der Ovarien finden LHRH-Agonisten Verwendung. Bei Endometriumkarzinomen werden LHRH-Antagonisten eingesetzt [EMONS 1990; EMONS 1994; LABRIE 1996; HARRISON 2004].

Aufgrund der konzeptionell ähnlichen hormonellen Steuerungsprozesse lassen sich LHRH-Systeme auch zur Therapie von Prostatakarzinomen einsetzen [MONGIAT-ARTUS 2005; STEWARD 2005], auch wenn hier noch einige Einschränkungen zu beachten sind [TEILLAC 2005].

### 9.5.2 Konjugation mit Zytostatika

Da zahlreiche Tumore LHRH-Rezeptoren aufweisen, wurden Versuche unternommen, Zytostatika an LHRH zu koppeln, um ein effektives **drug targeting** zu erreichen [EMONS 1994; KAHÁN 2000; KREBS 2000; WESTPHALEN 2000; HARRISON 2004]. Die so gewonnenen Wirkstoffe werden als Hormonotoxine bezeichnet. Hierdurch können auch die Nebenwirkungen der Zytostatika in Nicht-Zielgeweben stark herabgesetzt werden.

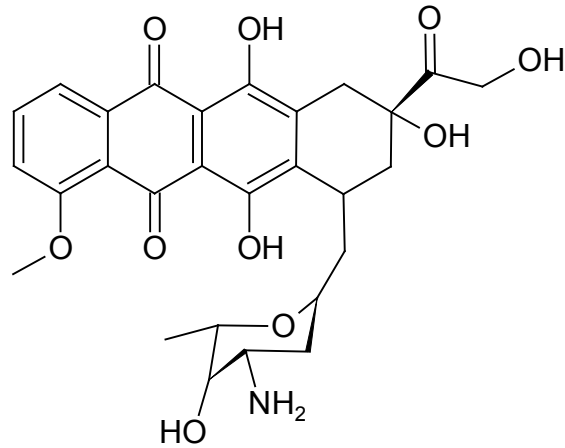


Abbildung 15: Doxorubicin,  $C_{28}H_{31}NO_{10}$ ,  $M = 541,55$  g/mol

Eines der verwendeten Cytotoxika war Doxorubicin bzw. Derivate davon. Gleichzeitig werden die LHRH-rezeptorexprimierenden Normalgewebe vom Hormonotoxin angegriffen und wie bei einer reinen Hormonbehandlung stillgelegt, was zu einem synergistischen Effekt bei der Therapie führt.

### 9.5.3 Nuklearmedizin

Anwendungen von LHRH in der Nuklearmedizin sind nicht bekannt.

## 10 Konjugation des Liganden an das Peptid

Der Konjugation des Liganden an das Peptid kommt bei der Synthese besondere Bedeutung zu. Die Konjugation muss so erfolgen, dass weder die Funktionalität des Liganden noch die Affinität des Peptids zum Rezeptor beeinträchtigt wird. In einigen Fällen ist es zudem nicht ausreichend, den Liganden direkt an das Peptid zu koppeln, da aus sterischen Gründen ein Abstand zwischen Peptid und Ligand erforderlich ist. In der Regel ist dies dann der Fall, wenn die Internalisierung des Peptids durch die direkte Anknüpfung des Liganden erschwert oder verhindert wird. Diese Distanz wird durch einen Linker hergestellt.

### 10.1 Techniken

Bei der Kopplung des Liganden muss beachtet werden, dass Liganden wie DTPA oder DOTA über mehrere gleichwertige funktionelle Gruppen verfügen, von denen jedoch nur eine Gruppe selektiv für die Verknüpfung reagieren darf, um Mehrfachkonjugationen oder Verknüpfungen vom Typ Peptid-Ligand-Peptid zu verhindern.

Zum Erreichen dieses Ziels haben sich für die Konjugation zwei grundsätzliche Methoden etabliert: die eine Methode stellt die Selektivität über die Deaktivierung der nicht benötigten funktionellen Gruppen mittels Schutzgruppen sicher, die zweite Methode erhöht selektiv die Reaktivität einer einzelnen Gruppe.

#### 10.1.1 Konjugation mittels Säureanhydriden

Stand der Technik ist die Verwendung von DTPA-DA. Das Säureanhydrid reagiert unter Einhaltung der Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert glatt mit einem primären Amin des zu konjugierenden Peptids. Meist wird diese Reaktion noch durch die in-situ-Bildung einer aktivierten Zwischenstufe mittels HOBt effektiver gestaltet.



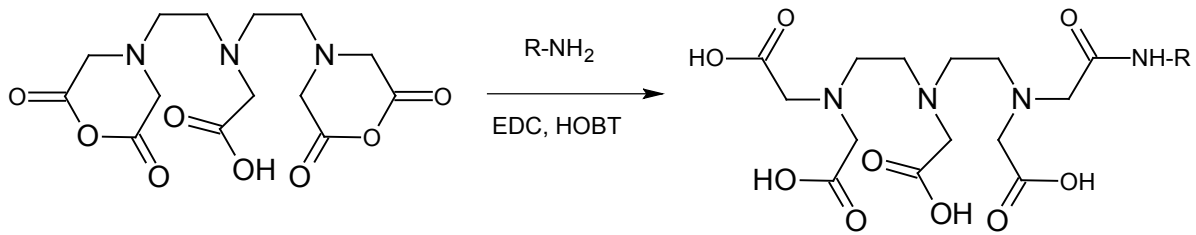


Abbildung 16: DTPA-DA, Konjugation

### 10.1.2 Schutzgruppentechnik

Der Ligand DOTA ermöglicht weitere Ansatzpunkte für die Reaktionsführung. Die freien Carbonsäuregruppen lassen sich mittels Schutzgruppen für den gewünschten Reaktionsverlauf deaktivieren [ANELLI 2001]. Oft werden **tert**-Butylgruppen verwendet, die sich mittels TFA (Trifluoressigsäure) effektiv wieder abspalten lassen.

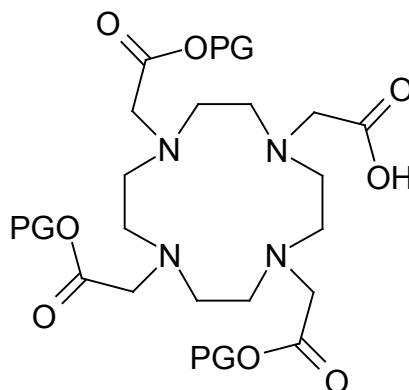


Abbildung 17: DOTA, Schutzgruppen

Diese Arbeitstechnik hat den Vorteil, dass selektiv eine der äquivalenten Carbonsäuregruppen für die Konjugation ausgewählt werden kann, wodurch Nebenreaktionen wie beispielsweise Verknüpfungen vom Typ Peptid-DOTA-Peptid effektiv verhindert werden können [HEPPELER 1999, TSAI 2000].

### 10.1.3 Konjugation mittels Aktivester

Die Schwierigkeit beim Ligand DOTA besteht darin, nur eine der 4 äquivalenten Carboxylgruppen für die Kopplung an ein Peptid selektiv einzusetzen. Es besteht wie oben erwähnt die Möglichkeit, ein partiell

geschütztes DOTA zu nutzen. Tris-**tert**-Butyl-DOTA ist kommerziell erhältlich und wird auch routinemäßig verwendet. Hierbei ist allerdings der Reaktionsschritt, der durch die Entschützung zustande kommt, ein Schritt, der Probleme bereiten kann. Durch die recht drastischen Bedingungen bei der Entschützung mittels TFA kann das Peptid selbst angegriffen werden, was gerade bei empfindlichen Substanzen einen nicht unerheblichen Ausbeuteverlust herbeiführen kann. Auch ist die Löslichkeit des Tris-**tert**-Butyl-DOTA in wässrigen Medien begrenzt, so dass eine Konjugation unter Umständen an einer zu geringen verfügbaren Menge DOTA scheitern kann.

Aus diesen Gründen wurden Aktivester entwickelt, wodurch die Einführung und Wiederabspaltung von Schutzgruppen nicht mehr erforderlich ist [SHEEHAN 1965]. Durch den Aktivester wird selektiv eine der Carbonsäuren reaktiver gestaltet, so dass bei kurzer Reaktionsdauer eine effektive Reaktion unter milden Bedingungen erreicht werden kann. Der Vorteil der Aktivierung mittels Aktivester gegenüber anderen reaktiven Gruppen wie Säurechloriden besteht darin, dass die hier diskutierten Aktivester deutlich mildere Reagenzien darstellen, ohne an Reaktivität einzubüßen.

Wenn nun eine der Carboxylgruppen aktiviert wird, kann es gelingen, eine Kopplung unter milden Bedingungen durchzuführen, ohne dass die anderen, nicht aktivierten Carboxylgruppen eine solche Reaktion eingehen. Typische Reagenzien, die eine Carboxylgruppe aktivieren, sind in Abbildung 18 dargestellt.

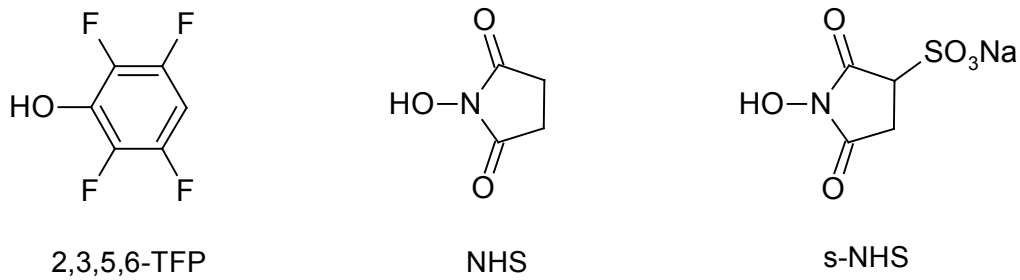


Abbildung 18: Typische Aktivester

Die so erhaltenen Verbindungen werden als Aktivester bezeichnet, da der erhaltene Ester wesentlich reaktiver ist als eine freie Carbonsäure. Der Grund liegt darin, dass der Aktivester als sehr gute Abgangsgruppe fungiert. Bereits vielfältig im Einsatz ist NHS (N-Hydroxysuccinimid) und die besser wasserlösliche Variante s-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) [LEWIS 2001]. Neuer ist dagegen TFP (2,3,5,6-Tetrafluorophenol), das durch optimierte Eigenschaften einen verbesserten Umgang mit dem Aktivester gewährleisten soll.

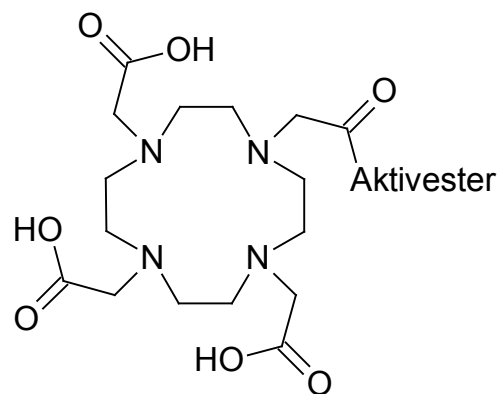


Abbildung 19: DOTA-Aktivester

Das Ziel dieser Arbeit ist es, solche Aktivester wie in Abbildung 19 gezeigt herzustellen, zu isolieren und charakterisieren sowie auf ihre Verwendungsmöglichkeiten beim Markieren von Peptiden zu testen. Besonderes Augenmerk wird auf die Verwendung von TFP gelegt, da dieser neue Aktivester stabiler als vergleichbare NHS-Aktivester sein soll und somit die Einsatzmöglichkeiten stark erweitern kann. Weiterhin ist TFP

sehr gut für NMR-spektroskopische Untersuchungen zugänglich. In der Entwicklungsphase stellt dies einen großen Vorteil dar.

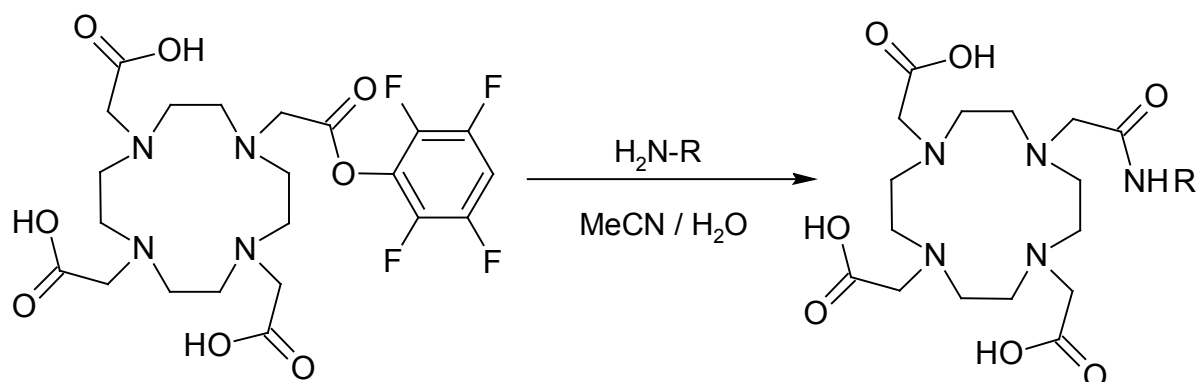


Abbildung 20: Konjugation mittels TFP-Aktivester

Die abschließende Konjugation des Liganden an das Peptid gestaltet sich bei diesem Reaktionsweg eleganter als bei der Schutzgruppenchemie. Die Reaktion verläuft glatt und bei milden Reaktionsbedingungen in wässrigen gepufferten Lösungen ohne den Einsatz von TFA, welches einen schonenderen Weg als der Einsatz von Schutzgruppen wie *tert*-Butyl an den freien Carbonsäuren und deren anschließende Abspaltung darstellt. Gerade bei empfindlichen Substraten kann dieser Weg der einzig gangbare sein.

# 11 Linker: die Brücke zwischen Peptid und Ligand

In ausgewählten Fällen ist eine direkte Kopplung des Liganden an das Peptid nicht möglich, da strukturelle Wechselwirkungen die Affinität des Peptids zum Rezeptor beeinflussen. Hier kann mit Linkern, einer zusätzlichen Verbindung zwischen Peptid und Ligand, Abhilfe geschaffen werden. Zudem können Linker weitere Funktionen übernehmen.

## 11.1 Aufgaben und Funktion des Linkers

Meist kann die Konjugation des Liganden an das Peptid direkt erfolgen. Es gibt jedoch Situationen, in denen diese direkte Verknüpfung Probleme bereitet. Ein typischer Fall sind Rezeptoren, die das Peptid nach der Bindung für den Prozess der Internalisierung umschließen.

In einigen Fällen kann es ein, dass durch die Nähe des Liganden zum Peptid die Affinität des Peptids zum Rezeptor beeinträchtigt wird. Der Ligand kann hier aus sterischen Gründen oder aufgrund seiner Ladung eine ungewollte Wechselwirkung durchführen.

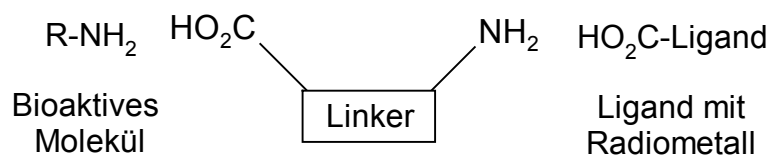


Abbildung 21: Einsatz von Linkern

Linker werden in diesen Fällen eingesetzt, um den Abstand zwischen Peptid und Ligand zu vergrößern, so dass zum Einen die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Peptid nicht beeinträchtigt wird und zum Anderen der Internalisierungsprozess stattfinden kann.

Die eigentliche Konjugation zwischen Peptid und Ligand ist hiervon nicht betroffen, der Linker stellt eine Erweiterung des Peptids dar. Aus diesem Grund wird auch versucht, die Verknüpfungsreaktion mittels

Peptidbindung beizubehalten, um eine einfache Reaktionsführung zu gewährleisten.

Ein Linker kann jedoch mehr sein als eine bloße Verlängerung eines Peptids, um strukturelle Wechselwirkungen bei der Bindung zu optimieren. Er kann über seine Ladung, Struktur oder Lipophilie entscheidend zur Verteilung des Radiopharmakons beitragen, was eine schnellere Aufnahme in das Zielgewebe herbeiführen kann. Durch geeignete Modifikationen lässt sich auch die Ausscheidung von nicht gebundenem Radiopharmakon verbessern, was zu einem besseren Signal- zu Rauschverhältnis und damit zu einer klareren Darstellung führt. Insbesondere Glucosegruppen ermöglichen eine schnelle renale Ausscheidung.

## 11.2 Mögliche Strukturen für Linker

Zunächst werden einige Entwürfe skizziert, die sich insbesondere in Aspekten wie Flexibilität, Ladung und Sterik voneinander unterscheiden. Die Länge ist durch den speziellen Anwendungsfall vorgegeben. Die hier vorgeschlagenen Längen der Linker beziehen sich auf das System LHRH-Linker-Ligand (DOTA oder DTPA).

Alle im Folgenden vorgestellten Verbindungen wurden zunächst ohne Berücksichtigung eines möglichen Synthesewegs ausgewählt, da in erster Linie untersucht werden soll, wie die grundsätzliche Struktur eines optimalen Linkers aussehen kann.

### 11.2.1 Alkylische Systeme

Als einfachster Ansatz stehen alkylische Systeme zur Verfügung, bei denen die Verknüpfung durch eine Reihe von Methylengruppen erfolgt, die bei Bedarf noch substituiert sein können.

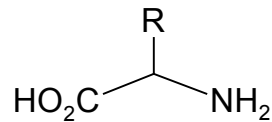


Abbildung 22: Alkylische Systeme I

Als Variation bieten sich Acetylengruppen als Kettenbausteine an, die bereits deutlich veränderte Eigenschaften aufweisen. Eine typische Kettenlänge liegt hier im Bereich von  $n = 8 \dots 12$  mit einer Auswahl an möglichen Substituenten:  $R = -H, -CH_3, -OH, CO_2H, -NH_2$ .

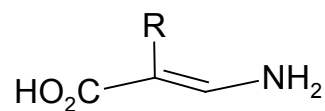


Abbildung 23: Alkylische Systeme II

Hier würden die als optimal zu erwartenden Kettenlängen im Bereich von  $n = 4 \dots 6$  liegen mit den oben angesprochen Substituenten.

### 11.2.2 Aromatische Systeme

Aromatische Systeme bringen eine hohe Lipophilie mit sich, die sich abhängig von den Eigenschaften des Rezeptors positiv oder negativ auswirken kann, je nachdem, welche Aminosäuren oder Aminosäuresequenzen bei der Internalisierung in die räumliche Nähe des Linkers kommen.

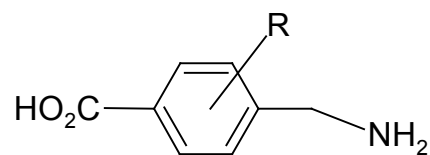


Abbildung 24: Aromatische Linker

Hier ist von einer Kettenlänge im Bereich von  $n = 3 \dots 4$  auszugehen, der Ring kann in verschiedenen Positionen mono-, di-, tri- oder tetrasubstituiert sein, wiederum mit fast beliebigen Substituenten,

wodurch sich die Eigenschaften an die Problemstellung anpassen lassen. Mögliche Reste können sein: R = -OH, -NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -NO<sub>2</sub>, -Cl.

### 11.2.3 Aminosäuren

Neben den bisher erwähnten Linkertypen, die aus körperfremden Strukturen aufgebaut wurden, lassen sich auch Aminosäuren einsetzen.

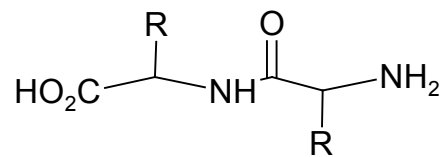


Abbildung 25: Aminosäuren als Linker

Die nötigen Kettenlängen liegen im Bereich von n = 4...6, mit den verwendeten Aminosäuren kann eine optimale Anpassung an die Gegebenheiten durchgeführt werden. Mittels Glycin beispielsweise lassen sich kompakte Linker erzeugen, Lysin oder Glutaminsäure können durch die basischen bzw. sauren Substituenten für eine verbesserte Affinität sorgen.

### 11.2.4 Gedankenspiele

Neben den bisher vorgestellten Modellen lässt sich prinzipiell jedes denkbare Polymer für die Verknüpfung einsetzen. Einige der möglichen Varianten seien hier kurz skizziert.

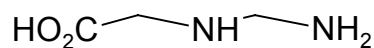


Abbildung 26: Gedankenmodell I

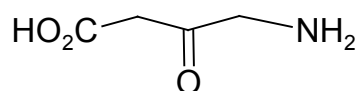


Abbildung 27: Gedankenmodell II



### 11.3 Linker in der Praxis

Neben den rein strukturellen Überlegungen steht auch die Anwendbarkeit im Vordergrund. Exotische Varianten wie hochsubstituierte aromatische Linker sind in der Darstellung und in der Reaktionsführung wesentlich aufwändiger als ein unsubstituiertes alkylisches System. Eine Alkylkette hingegen bringt bei Kettenlängen ab etwa sechs Kohlenstoffeinheiten bereits Löslichkeitsprobleme in wässrigen Medien (inklusive Acetonitril, Methanol, DMF und ähnlichen polaren organischen Lösungsmitteln) mit sich, wodurch die Darstellung erschwert wird. Eine gegenüber der ursprünglichen Erkennungssequenz zu stark veränderte Lipophilie oder Ladung kann zu einer anderen als der gewünschten und bekannten Verteilung führen, so dass eine Anwendung des fertigen Wirkstoffs in der Praxis unter Umständen nicht mehr möglich ist.

Auch muss die optimale Anpassung an die Gegebenheiten unter Umständen hinter einem einfacheren Reaktionsweg zurücktreten. Hier gilt es, einen Kompromiss zu finden, der eine gute Interaktion des konjugierten Peptids mit dem Liganden mit einem vertretbaren Aufwand in der Darstellung kombiniert.

## 12 Bisherige Arbeiten

In der Vergangenheit wurden bereits mehrere Versuche unternommen, LHRH aufgrund seiner Eigenschaften radioaktiv zu markieren und seinen Weg im Stoffwechsel verfolgen zu können. Zwei Ansätze hierzu sind zu unterscheiden: Markierungen für in-vitro-Untersuchungen, die zumeist mit Iod-125 durchgeführt werden. Diese Markierung könnte prinzipiell auch mit Iod-131 durchgeführt werden, um LHRH der SPECT zugänglich zu machen. Aufgrund der Schilddrüsengängigkeit des Iods ist ein therapeutischer Ansatz hier jedoch nicht möglich. Diesen Zugang kann nur eine Radiometallmarkierung bieten.

Aufgrund der Eigenschaften des LHRH wurden in der Vergangenheit einige Markierungen in der Literatur beschrieben. Diese waren jedoch mit spezifischen Nachteilen behaftet. So wurden iodierte GnRH-Derivate dargestellt, die jedoch nicht den Vorteil einer möglichen therapeutischen Anwendung mit sich bringen und somit nur bedingt einsetzbar sind [FLANAGAN 1998; REEVES 1980]. Der große Nachteil einer Iodierung ist darin zu sehen, dass ein **trapping** im Zielgewebe nicht erfolgen kann.

Der zweite Ansatz bestand darin, Radiometalle über Liganden an das Peptid zu binden. Vielversprechende Ansätze wurden durchgeführt, um mittels Technetium-99m die Diagnostik zugänglich zu machen [BARDA 2004]. Das als Generatorknuclid einfach zugängliche Technetium-99m bietet zudem die Option, mit geringen Anpassungen der Ligandstruktur eine Therapie mittels Rhenium-186 bzw. Rhenium-188 durchführen zu können. Dieser Weg ist allerdings durch die diffizile Technetium-Chemie erschwert, bereits der Wechsel vom Technetium zum Rhenium stellt eine große Hürde dar. Eine diagnostische Verwendung des Radiopharmakons ist zwar möglich, doch der konsequente Schritt zur Therapie bleibt hier verwehrt.

Ein anderer Weg zeichnet sich jedoch ab: die Markierung des LHRH, ohne aufwändige Eingriffe an der Struktur selbst, ein Ligand, der an frei wählbarer Stelle am Peptid angeknüpft werden kann [GALI 2001]. Der in

dieser Arbeit beschriebene Weg ist jedoch zu stark an die Technetium- und Rheniumchemie geknüpft. Auch hier ist keine freie Wahl des Radiometalls möglich.

Die bisherigen Arbeiten waren von aufwändiger Synthesechemie geprägt, die einfache Modifikationen der Struktur des Zielmoleküls nicht zulassen. Auch steht bei den aufgebauten Ligandsystemen zu erwarten, dass durch Strukturänderungen die Struktur des Peptids selbst verändert wird, so dass die Bindungseigenschaften nicht mehr kalkulierbar sind.

Einen Ansatz aus einer anderen Richtung liefert der Einsatz von Zytostatika, die ebenfalls an LHRH und LHRH-Derivate gekoppelt worden sind, um ein effektives **drug targeting** zu ermöglichen. Die Untersuchungen auf diesem Gebiet zeigen, dass die Zytostatika in die Zielgewebe eingebracht werden können [HARRISON 2004].

## 13 Planung der Synthese der LHRH-Derivate

Wie zuvor dargelegt, werden an das geforderte Zielmolekül eine Reihe von Anforderungen gestellt. Neben diesen prinzipiellen Voraussetzungen müssen jedoch noch weitere Punkte berücksichtigt werden, die speziell den Syntheseweg des gewünschten Moleküls betreffen. Hierbei gilt es unter anderem zu beachten, dass sich die Synthese mit relativ geringem Aufwand durchführen lässt, was sowohl die verwendeten Chemikalien als auch den apparativen Aufwand betrifft. Dies soll dazu dienen, dass für spätere Studien das Zielmolekül einfach variiert werden kann.

Von daher wurde ausgehend von den vorangehenden Kapiteln beschlossen, die mitunter recht aufwändigen Wege nicht zu verfolgen und statt dessen auf die etablierten Ligandsysteme DTPA und DOTA zu setzen, die einen einfachen Wechsel des Metallions zulassen und eine einfachere Chemie ermöglichen.

Ein neuer Weg, um mit wenigen Schritten ein flexibles Baukastensystem zu entwickeln, das die Erkennungssequenz möglichst unangetastet lässt, wurde gesucht.

Eine Kombination aus der direkten Ankopplung der Zytostatika, verbunden mit einem Linkersystem, das einen flexibel einsetzbaren Liganden trägt, soll neue Wege öffnen.

Aufgrund der terminalen Wechselwirkungen des Peptids mit dem Rezeptor ist es das Ziel dieser Arbeit, die Konjugation des Peptids mit dem Liganden über einen angepassten Linker am D-Lys<sup>6</sup> durchzuführen.

Als vorläufige Zielstruktur wurde daher ein Modell entwickelt, das die oben genannten Anforderungen erfüllt und sich zudem unter den genannten Bedingungen synthetisieren lassen soll.

### 13.1 LHRH

Als Edukt lag [D-Lys<sup>6</sup>]-LHRH vor, an das mittels eines Linkers ein Ligand angekoppelt werden soll. Die Auswahl des passenden Liganden

wurde anhand der Verfügbarkeit und Handhabbarkeit der vorgestellten Kandidaten getroffen.

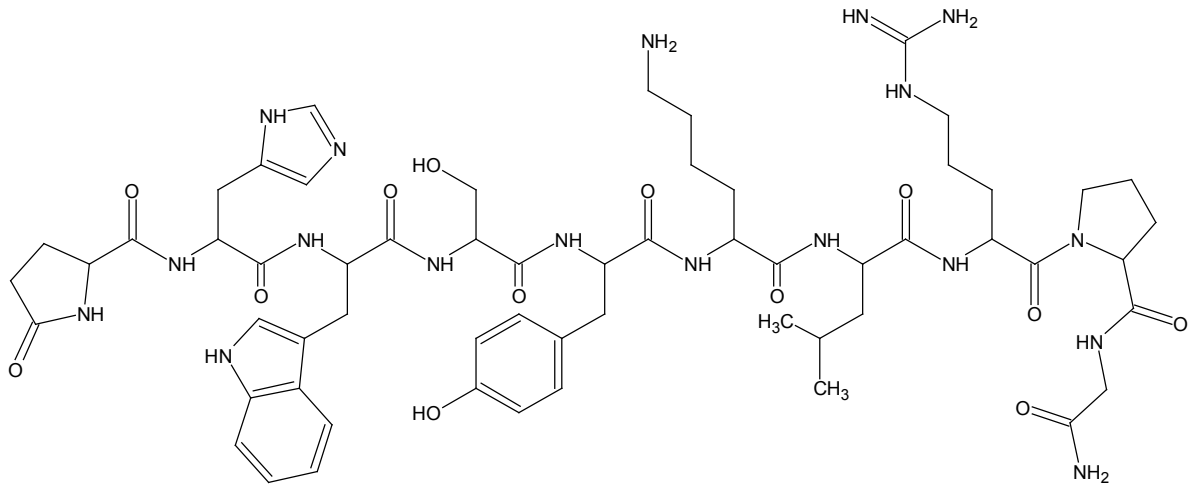


Abbildung 28: [D-Lys<sup>6</sup>]-LHRH, C<sub>59</sub> H<sub>84</sub> N<sub>18</sub> O<sub>13</sub>, M = 1253,41 g/mol

Wie andere Arbeiten gezeigt haben, ist ein Abstand zwischen Peptid und Radiometall wünschenswert [GALI 2001]. In dieser Arbeit wird dies durch einen speziell eingefügten Linker erreicht.

## 13.2 Linker

Als Linker wurde 5-Amino-Valeriansäure gewählt. In Kombination mit der Seitenkette des Lysins und der Carboxylseitenkette des DOTA bzw. DTPA ergibt sich hier eine ausreichende Länge des Linkers.

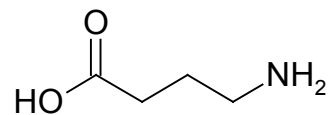


Abbildung 29: 5-Amino-Valeriansäure, C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>, M = 103,12 g/mol

Die Löslichkeit der 5-Amino-Valeriansäure in den in Vorversuchen getesteten Lösungsmitteln ist im Gegensatz zu längerkettigen Carbonsäuren ausreichend, um eine Chemie in Lösung betreiben zu können. Auch ist der sterische Anspruch der 5-Amino-Valeriansäure gering, so dass eine

Wechselwirkung mit dem Rezeptor und eine starke Veränderung der Bioverteilung weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Verwendung fand in dieser Arbeit die 5-Amino-Valeriansäure, deren Aminofunktion mittels FMoc geschützt wurde, so dass unerwünschte Nebenreaktionen unterbunden werden konnten. Der zusätzlich erforderliche Schritt der Entschützung konnte somit in Kauf genommen werden, zumal er unter milden Bedingungen erfolgen kann [KOCIENSKI 1994].

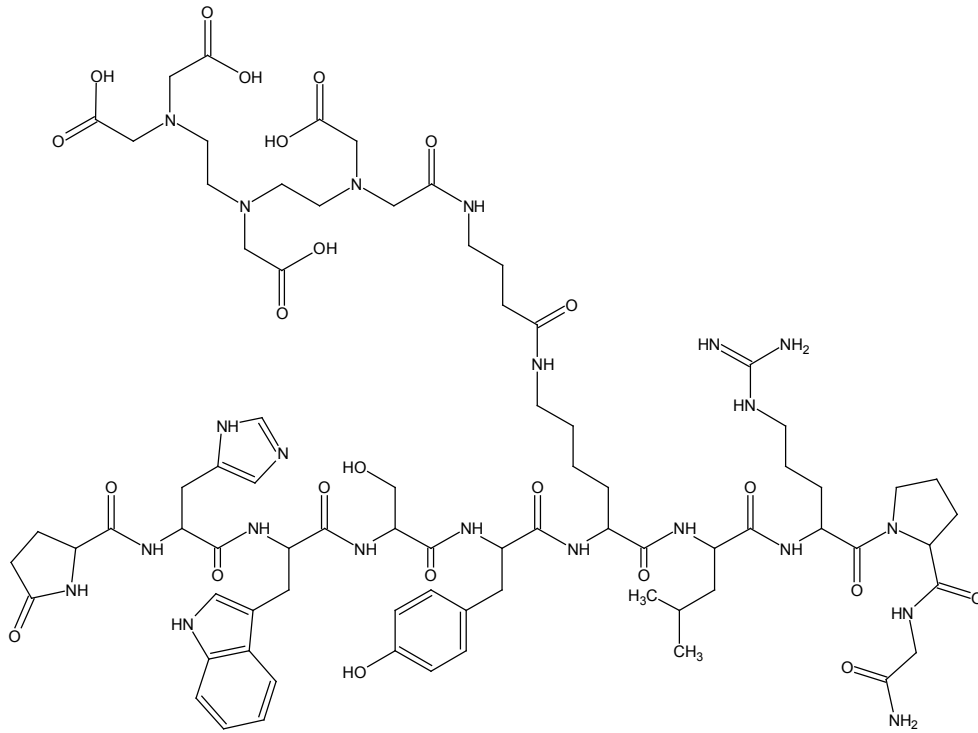
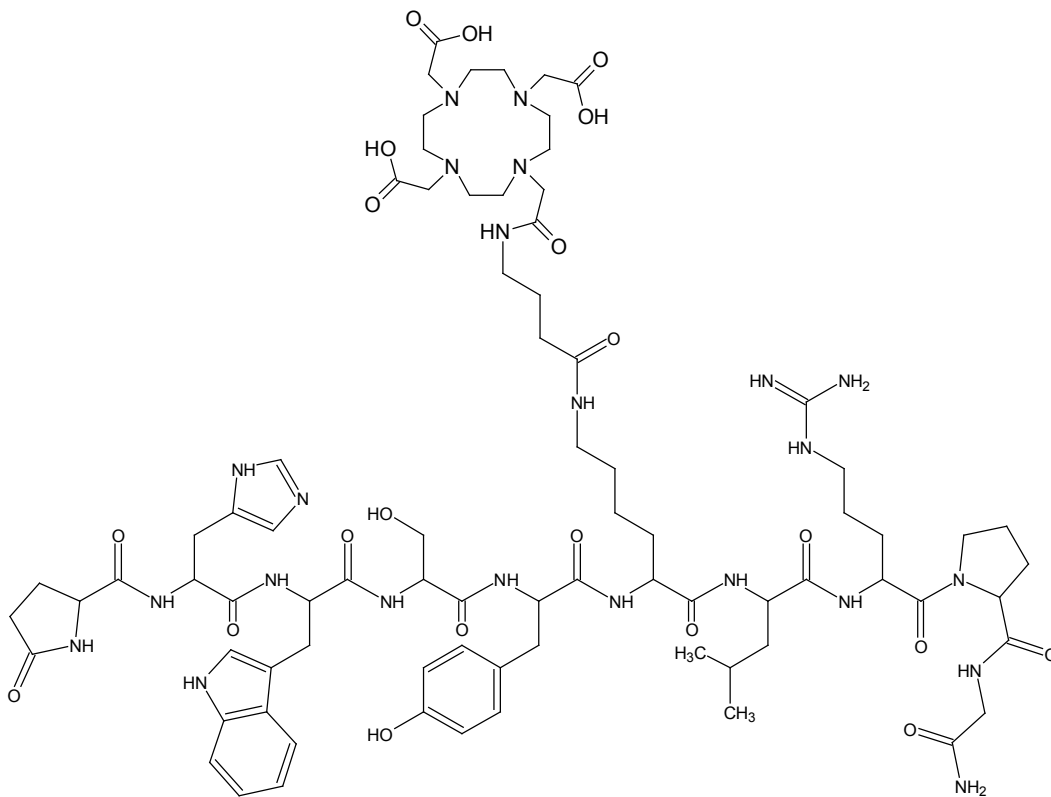
### 13.3 Ligand

Als Ligand fanden DOTA und DTPA Verwendung. Der Vorteil des DOTA, eine sehr inerte Ligandbindung, wird in der Praxis gemindert durch Einschränkungen in der Wahl der Puffersubstanzen während einer Synthese, da Metalle nur sehr eingeschränkt Verwendung finden können. Ebenfalls ist der Kontakt zu metallischen Oberflächen (Spatel, HPLC-Trennsäulen) zu vermeiden. Auch relativiert die erforderliche höhere Markierungstemperatur die Vorteile des DOTA beim Einsatz in der Forschung, so dass hier die Studien mittels DTPA durchgeführt werden.

### 13.4 Zielmoleküle

Aus diesen Überlegungen heraus ergeben sich 2 Zielmoleküle. Zum einen LHRH mit Valeriansäure als Linker und DTPA als Ligand, zum anderen LHRH mit Valeriansäure als Linker und DOTA als Ligand.

Beide Zielmoleküle sollen synthetisiert und charakterisiert werden.

Abbildung 30: LHRH-Valeriansäure-DTPA,  $C_{77}H_{112}N_{22}O_{23}$ ,  $M = 1713,84$  g/molAbbildung 31: LHRH-Valeriansäure-DOTA,  $C_{79}H_{117}N_{23}O_{21}$ ,  $M = 1724,92$  g/mol

## 14 Durchführung der Synthese der LHRH-Derivate

Die Synthese wurde entsprechend der Vorüberlegungen durchgeführt. Im Vordergrund bei der praktischen Durchführung stand die möglichst vollständige Umsetzung des Peptids, welches das teuerste Edukt war. Eine möglichst hohe Ausbeute an peptidhaltigem Produkt wurde daher angestrebt.

### 14.1.1 Kopplung LHRH-Valeriansäure-FMoc

Beim Linker, der mittels einer Peptidbindung an das LHRH gekoppelt werden sollte, musste beachtet werden, dass auch die danach folgende Konjugation mit den Liganden über eine derartige Reaktion erfolgen sollte. Das Schützen der Aminofunktion der 5-Amino-Valeriansäure war daher unbedingt erforderlich.

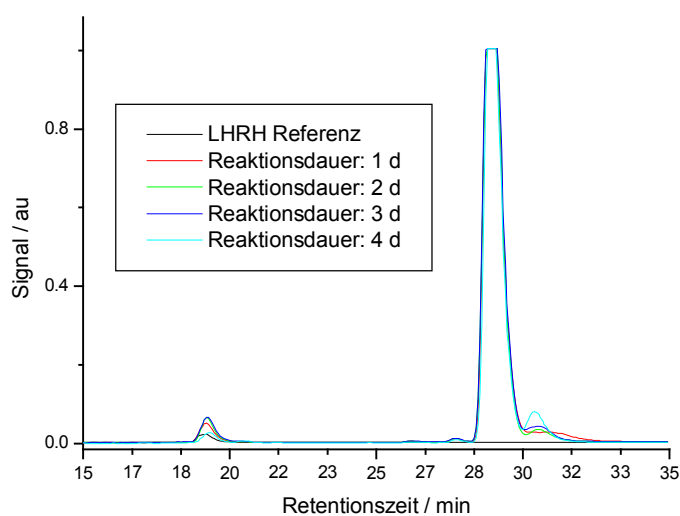


Abbildung 32: Chromatogramm LHRH + FMoc-Valeriansäure

Abbildung 32 zeigt, dass das an Anfang vorhandene LHRH (Retentionszeit: 19 min) innerhalb einer Reaktionsdauer von mehreren Tagen bei Raumtemperatur verschwindet und sich ein Produkt (Retentionszeit: 31 min) bildet. Nach vollständiger Umsetzung, die durch



das Verschwinden des LHRH-Peaks definiert wurde, schloss sich die Aufreinigung an.

Aufgrund der Nähe zur FMoc (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-geschützten Valeriansäure (Retentionszeit: 29 min) erschwerte sich hier eine Aufreinigung mittels HPLC, so dass darauf verzichtet wurde.

Statt dessen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Reaktionsprodukte in 30 % wässriger Acetonitrillösung aufgenommen. Die unter diesen Bedingungen nur schwer lösliche Valeriansäure blieb als Niederschlag zurück, während das Produkt in hoher Ausbeute extrahiert werden konnte. Auf eine weitere Aufreinigung wurde verzichtet, da nach der folgenden Entschützung das Trennproblem nicht mehr existieren würde. Die Reaktionsprodukte werden nach der Entschützung ausreichend große Unterschiede der Retentionszeiten aufweisen.

#### 14.1.2 Entschützung der FMoc-Valeriansäure

Das Rohprodukt aus dem vorherigen Konjugationsschritt, gelöst in 30 % wässriger Acetonitrillösung, wurde mit Ammoniaklösung (konz.) versetzt und über 3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

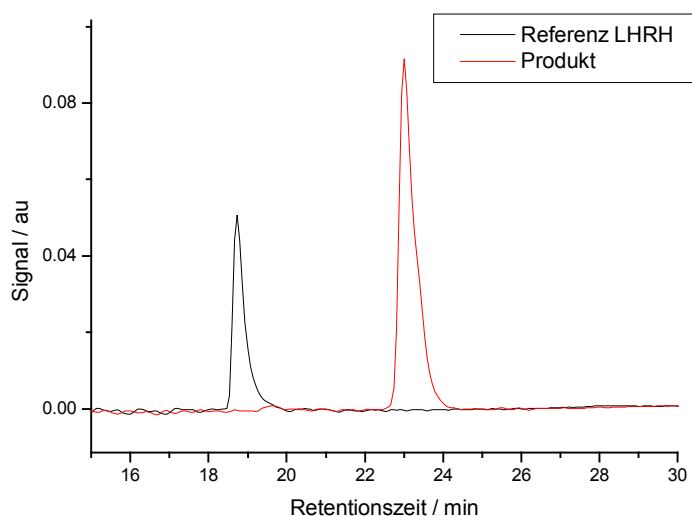


Abbildung 33: Chromatogramm Entschützung FMoc

Die Vollständigkeit der Umsetzung wurde mittels HPLC bestimmt. Nach erfolgter Umsetzung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, die Reaktionsprodukte in 30 % wässriger Acetonitrillösung aufgenommen und mittels Zentrifugation von den unlöslichen Anteilen befreit. Aus der überstehenden Lösung wurde mittels HPLC das Produkt isoliert. Die gewonnenen Fraktionen, die das Produkt beinhalten, wurden vereinigt und im Vakuum getrocknet.

### 14.1.3 Konjugation mit DTPA

Das so enthaltene Produkt wurde nun mit einem Liganden konjugiert, der das Radiometall aufnehmen soll. Auch diese Verknüpfung erfolgte als Peptidbindung, so dass einfache Verfahren zur Anwendung kommen konnten [HNATOWICH 1983].

DTPA wurde als Dianhydrid eingesetzt, die Reaktion wurde nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Kopplung von DTPA-DA an Peptide“ durchgeführt, die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC.

#### 14.1.4 Konjugation mit DOTA

Zur Darstellung des Konjugats LHRH-Valeriansäure-DOTA wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Kopplung von DOTA-TFP-AE an Peptide“ das Peptid mit DOTA-TFP-AE zur Reaktion gebracht.

Das Produkt wurde nach vollständigem Umsatz des Peptids mittels HPLC isoliert, die Fraktionen vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

### 14.2 Zusätzliche Derivate

Ergänzend zu den vorgesehenen Zielmolekülen wurde jeweils noch die direkte Verknüpfung LHRH-Ligand (DOTA bzw. DTPA) durchgeführt, um im späteren Zell- oder Tiermodell den Einfluss des Linkers auf die Internalisierung untersuchen zu können.

#### 14.2.1 Darstellung von LHRH-DTPA

Zur Darstellung des Konjugats LHRH-DTPA wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Kopplung von DTPA-DA an Peptide“ das Peptid mit DTPA-DA in wässriger, mit  $\text{NaHCO}_3$  und Triethylamin auf  $\text{pH} = 8,5$  gepufferter Lösung zur Reaktion gebracht. Nach vollständigem Stoffumsatz des Peptids, der mittels HPLC kontrolliert wurde, wurde das Produkt mittels HPLC abgetrennt und gereinigt.

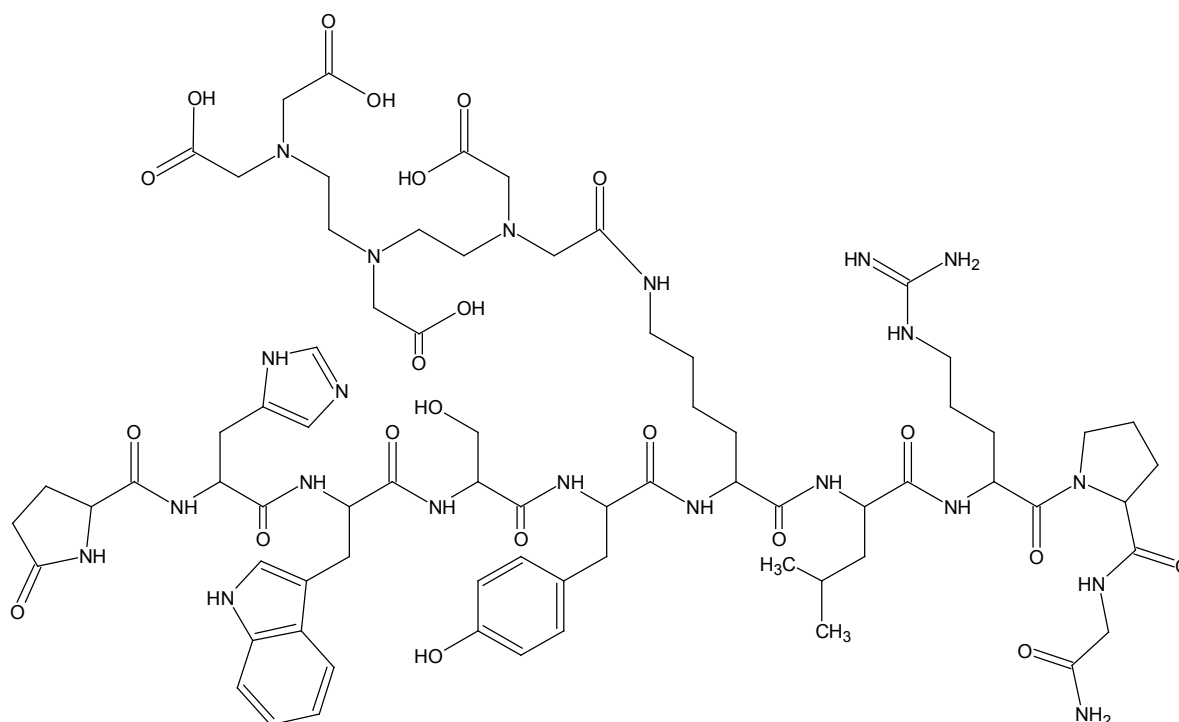


Abbildung 34: LHRH-DTPA,  $C_{73}H_{105}N_{21}O_{22}$ ,  $M = 1628,74 \text{ g/mol}$

Zur weiteren Verwendung wurde das Konjugat in Wasser aufgenommen und die Konzentration der Lösung mittels HPLC im Vergleich zu einer Standardlösung LHRH (1 mg/mL in  $H_2O$ ) auf 1 mg/mL eingestellt.

#### 14.2.2 Darstellung von LHRH-DOTA

Zur Darstellung des Konjugats LHRH-DOTA wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Kopplung von DOTA-TFP-AE an Peptide“ das Peptid mit DOTA-TFP-AE in wässriger, mit  $NH_4CO_3$  und Triethylamin auf  $pH = 8,5$  gepufferter Lösung zur Reaktion gebracht. Bei diesem Ansatz wurde ein 35-facher Überschuss Aktivester eingesetzt. Hier lag nach der Reaktion (Reaktionsdauer: 15 h) kein Aktivester mehr vor.

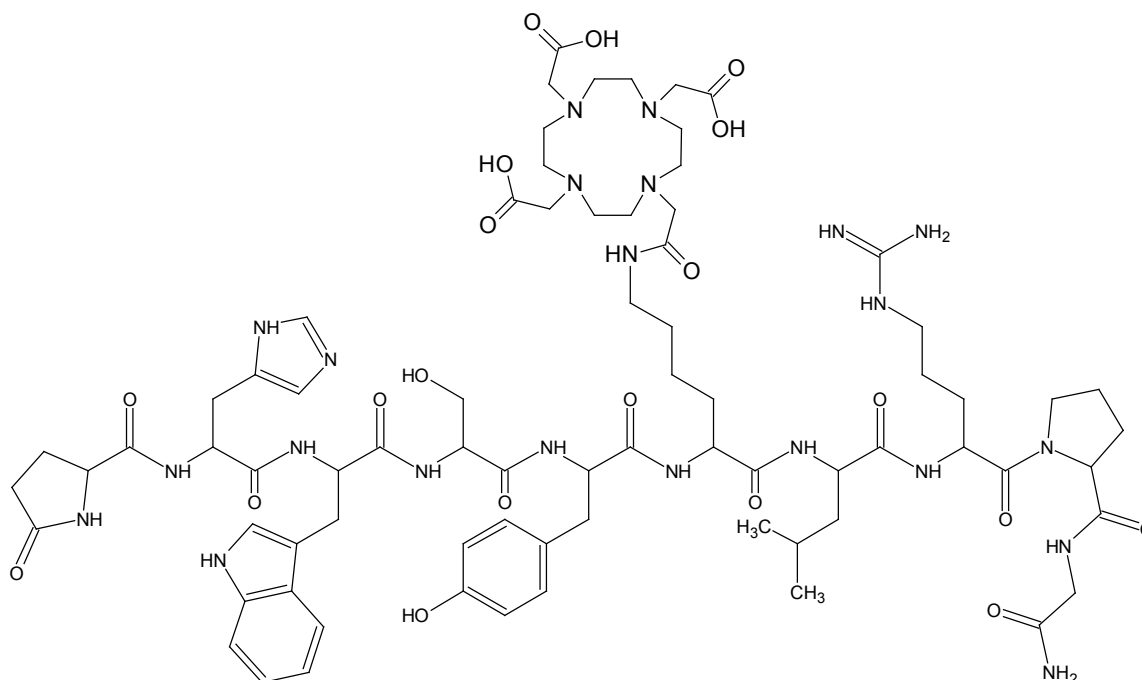


Abbildung 35: LHRH-DOTA,  $C_{75}H_{110}N_{22}O_{20}$ ,  $M = 1639,81$  g/mol

Nach vollständigem Stoffumsatz des Peptids, der mittels HPLC kontrolliert wurde, wurde das Produkt mittels HPLC abgetrennt und gereinigt.

Anschließend wurde zunächst eine Probemarkierung durchgeführt, um zu ermitteln, ob und in welchem Umfang eine Kopplung DOTA-LHRH stattgefunden hat.

Zur weiteren Verwendung wurde das Konjugat in Wasser aufgenommen und die Konzentration der Lösung mittels HPLC im Vergleich zu einer Standardlösung LHRH (1 mg/mL in  $H_2O$ ) auf 1 mg/mL eingestellt.

### 14.3 Probemarkierungen als Funktionstest

Mit den erhaltenen Konjugaten Peptid-Ligand wurden Probemarkierungen gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Markierungen“ durchgeführt. Hierzu wurde typischerweise 1  $\mu$ g Peptid mit 3,7 MBq In-111 versetzt. Eine Markierungsausbeute von mehr als 90 % zeigte eine erfolgreiche Markierung an.

Die erhaltenen Produkte lagen nach Aufarbeitung in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL vor. Von diesen Lösungen wurde jeweils 1  $\mu$ L in NaAc-Pufferlösung vorgelegt und mit Indium-111-Lösung versetzt.

### 14.3.1 Probemarkierungen von LHRH-DTPA-Derivaten

LHRH-DTPA und LHRH-Valeriansäure-DTPA ließen sich problemlos in hohen Ausbeuten markieren. Nach 30 min Inkubationszeit lagen durchweg Markierungsausbeuten über 90 % vor, in vielen Fällen über 95 %.

Diese markierten Substanzen konnten damit für weitere Versuche direkt eingesetzt werden.

### 14.3.2 Probemarkierungen von LHRH-DOTA-Derivaten

Bei den Markierungsversuchen der LHRH-DOTA-Derivate zeigte sich, dass DOTA ein sehr anspruchsvoller Ligand ist, was die Behandlung bei der Synthese und die abschließende Durchführung der Komplexierung betrifft.

Trotz einer Synthese ohne Metallionen und der Wahl entsprechender Markierungsbedingungen konnte die Markierungsausbeute nicht über 30 % gesteigert werden, wodurch eine weitere Verwendung dieser Substanzen nicht möglich war.

## 14.4 Ergebnisse

Die zuvor festgelegten Zielmoleküle konnten erfolgreich synthetisiert werden. Der eingeschlagene Weg ließ nach Optimierung der Arbeitsprozesse einen schnellen Aufbau der Substanzen zu und bewahrte gleichzeitig die erwünschte Flexibilität.

Die DTPA-Derivate ließen sich erwartungsgemäß in hohen Ausbeuten radioaktiv mit Indium-111 markieren.

Die DOTA-Derivate hingegen zeigten nur unzureichende Markierungsausbeuten. Dies wurde auf die hohe Affinität des DOTA zu Metallionen

zurückgeführt. Bereits kleinste Mengen können hier zu einer irreversiblen Blockierung des Liganden führen, so dass eine abschließende Markierung nicht mehr durchgeführt werden kann. Die experimentellen Bedingungen erlaubten es nicht, vollständig metallfrei zu arbeiten. Der letzte Aufreinigungsschritt erfolgte stets an einem HPLC-System, das nicht metallfrei konzipiert war.

## 15 Synthese eines DOTA-TFP-Aktivesters

In mehreren Versuchsreihen wurde unter wechselnden Bedingungen DOTA mit TFP zur Reaktion gebracht, wobei mittels HPLC eine Reaktionskontrolle durchgeführt wurde. Die Versuche fanden in unterschiedlichen Lösungsmitteln statt, wobei auch Reaktionsdauer und pH-Wert variiert wurde [MIER 2001; BUSSOLATI 2001; LEWIS 1994; TSAI 2001].

### 15.1.1 Darstellung von Aktivestern

Es zeigte sich, dass die Reaktion gut in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch (70 : 30) ablief, wobei deutlich geringere Acetonitrilgehalte ein Lösen des TFP verhinderten. In der schlechten Löslichkeit des TFP in wässrigen Systemen liegt ein Nachteil, der sich aber zum Vorteil einer eleganten Reaktionsführung und Aufarbeitung nutzen ließ.

Im Chromatogramm in Abbildung 36 sind DOTA ( $t = 2,0$  min), EDC ( $t = 2,6$  min) und TFP ( $t = 7,9$  min) zu erkennen sowie ein Hauptprodukt ( $t = 3,8$  min) und ein Nebenprodukt ( $t = 5,0$  min).

Auf die Verwendung eines Puffers in der Reaktionslösung wurde verzichtet, da sich herausstellte, dass ein Natriumhydrogencarbonatpuffer (wässrig, 1 mol/L, pH = 8) zwar die Reaktion etwas beschleunigte, aber die anschließende Aufreinigung des Produkts stark erschwerte.



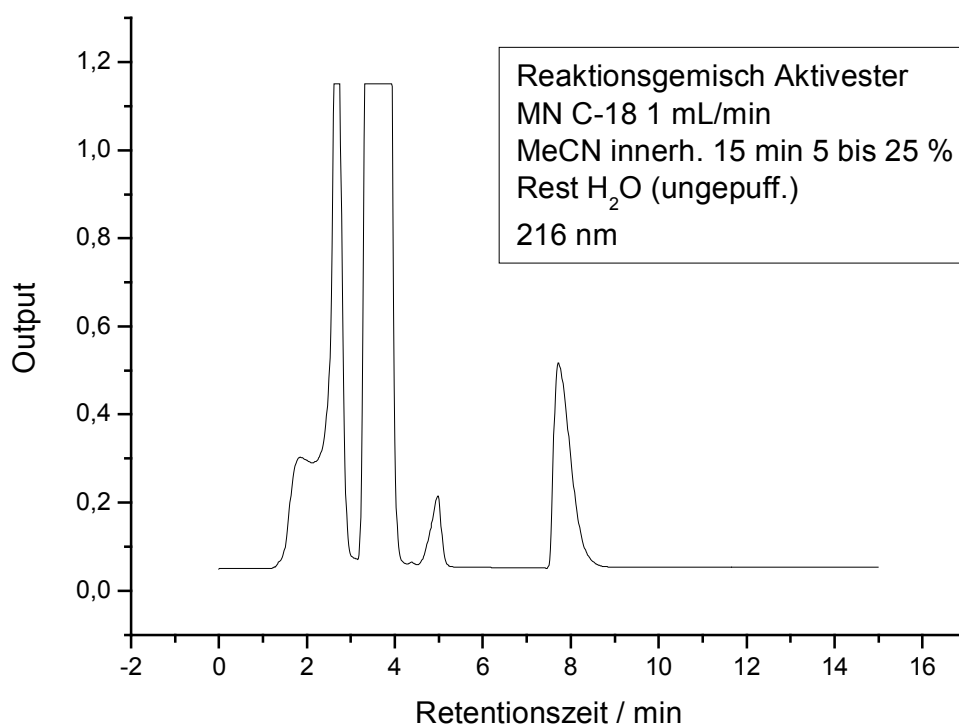


Abbildung 36: Chromatogramm ungepuffertes Reaktionsgemisch

Phosphatpuffer in pH-Bereichen von 5 bis 9 führten zu einer Vielzahl von Produkten, was eine verringerte Selektivität der Reaktion zeigt und eine Aufreinigung der Produkte stark erschwerte. Im Chromatogramm sind DOTA ( $t = 3,8$  min), TFP ( $t = 7,4$  min) sowie einige nicht identifizierte Produkte zu erkennen.

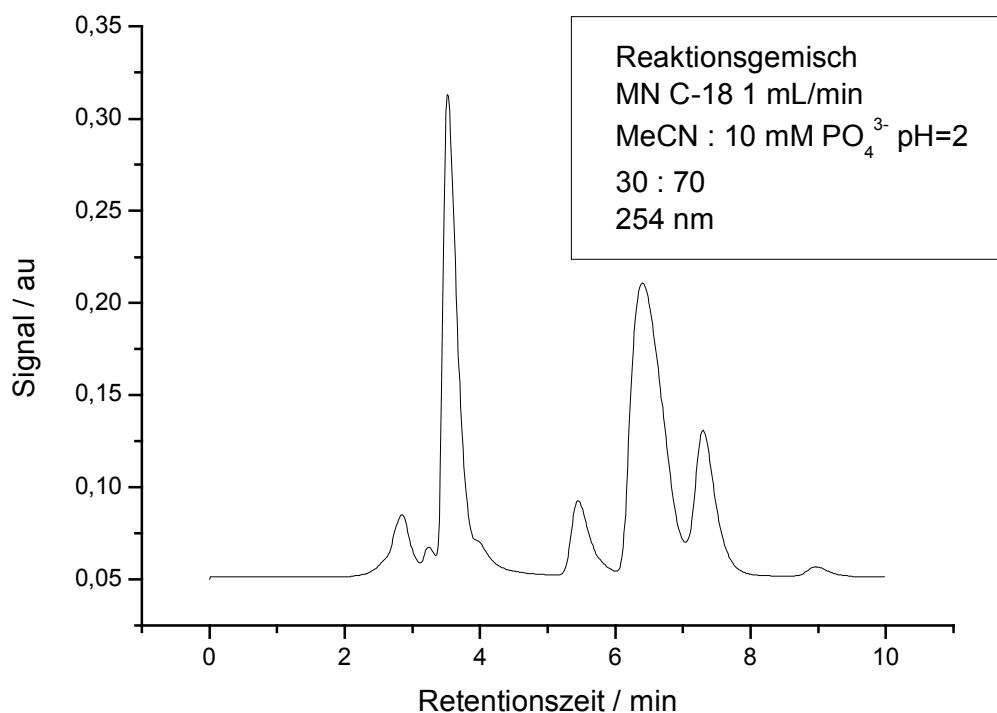


Abbildung 37: Reaktionsgemisch Phosphatpuffer pH = 8

Zunächst wurde die Aufreinigung des Produkts mittels HPLC versucht [MIER 2001], wobei sich herausstellte, dass der Aktivester unter den verwendeten Bedingungen zu instabil war. Dies wurde dadurch deutlich, dass nach der Reinigung nur die Zersetzungsprodukte (DOTA und TFP) wiedergefunden wurden.

Da beim Ansetzen der Reaktion darauf geachtet wurde, die Lösungsmittelmengen gering zu halten, lagen die Reaktanden in hohen Konzentrationen vor. Dies führte bei einem Teil der Ansätze dazu, dass sich nach etwa einer halben Stunde ein Niederschlag in der Form farbloser Kristallnadeln bildete. Diese Kristalle wurden abgetrennt und Untersuchungen ergaben, dass es sich hierbei um den gewünschten Aktivester handelte.

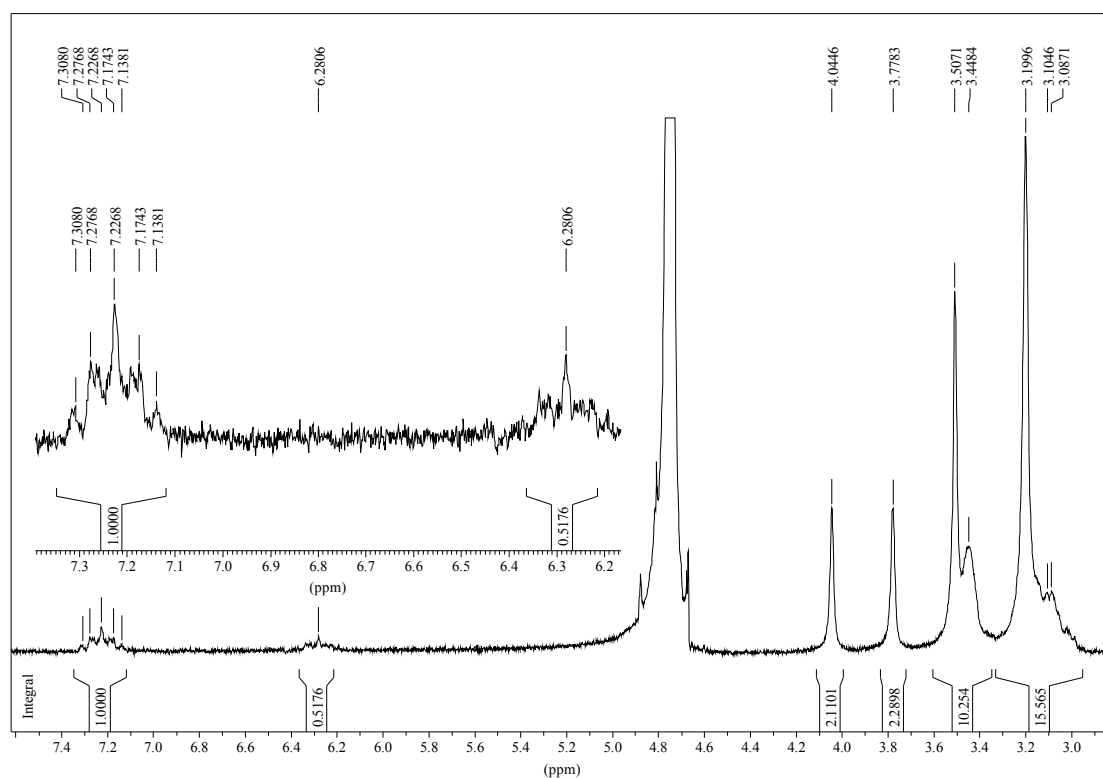


Abbildung 38: NMR-Spektrum des DOTA-TFP-AE

NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Kristalle aus DOTA und TFP bestehen, was auch durch HPLC-Untersuchungen bestätigt wurde. Im NMR-Spektrum ist freies TFP als Multipllett bei  $\delta = 6,28$  ppm zu erkennen, während das Multipllett bei  $\delta = 7,23$  ppm durch die Tieffeldverschiebung darauf hinweist, dass das TFP verestert wurde. Diese Tieffeldverschiebung ist auch in Simulationen bestätigt worden und zeigt somit die Anwesenheit eines Esters an. Bisher nicht eindeutig zugeordnet werden konnten die Signale bei  $\delta = 4,05$  ppm und  $\delta = 3,78$  ppm.

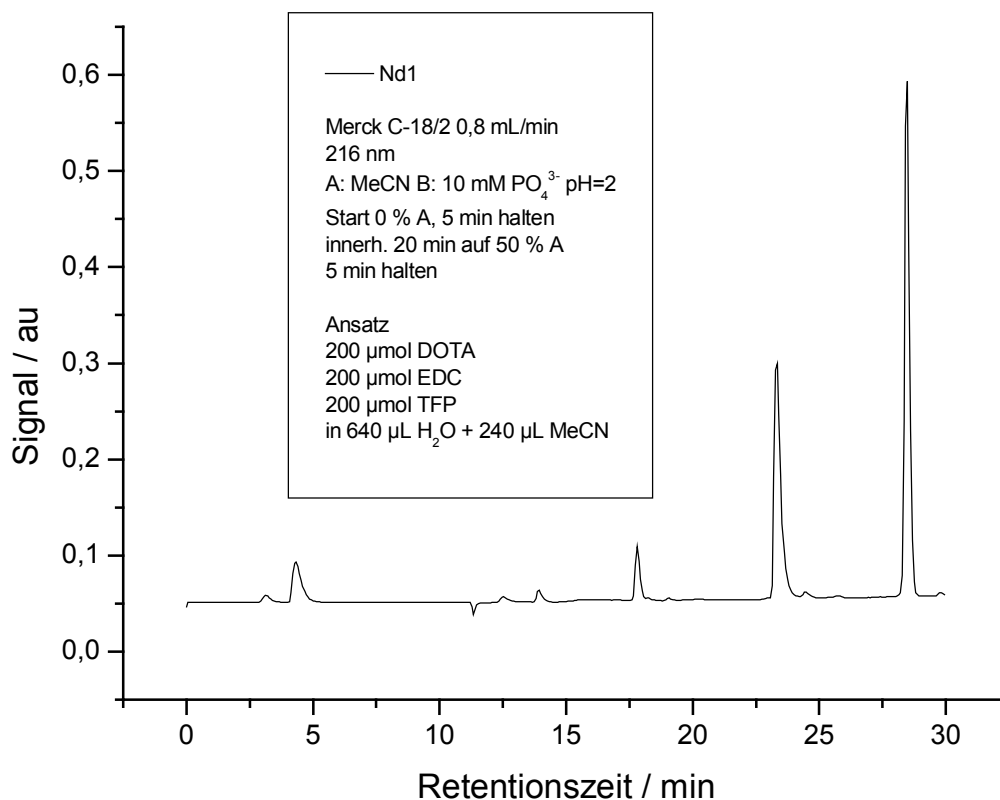


Abbildung 39: Niederschlag aus Reaktionslösung

Im Chromatogramm ist DOTA ( $t = 4,5$  min) und TFP ( $t = 28$  min) zu erkennen. Das Hauptprodukt ist bei  $t = 23$  min zu sehen, wobei sich die Reinheit durch Waschen mit einem Wasser-Acetonitril-Gemisch verbessern lässt. Ein Nebenprodukt bei  $t = 18$  min konnte bisher noch nicht charakterisiert werden.

Die Reaktion wurde soweit optimiert, dass die Ausbeute reproduzierbar 70 % überstieg. Eine weitere Reinigung des erhaltenen Aktivesters war für allgemeine Anwendungen nicht erforderlich, konnte aber durch Waschen mit 70 % wässriger Acetonitrillösung durchgeführt werden. Allerdings waren bei diesem Schritt Ausbeuteverluste nicht zu vermeiden.

Somit steht ein einfacher und sicherer Weg zum DOTA-TFP-Aktivester offen.

### 15.1.2 Konjugationen mittels DOTA-TFP-Aktivester

Mit dem erhaltenen Aktivester wurden erste Versuche zur Kopplung an eine Aminosäure unternommen [BUSSOLATI 2001; LEWIS 1994; TSAI 2001].

Hierzu wurde der Aktivester mit einem Überschuss Phenylalanin ( $t = 14,5$  min) versetzt. Hierbei wurde die Bildung eines Produkts bei  $t = 20$  min beobachtet, welches mittels HPLC abgetrennt und NMR-spektroskopisch untersucht wurde. Diese Untersuchungen führten zum Ergebnis, dass es sich bei diesem gebildeten Produkt um das gewünschte Konjugat handelte.

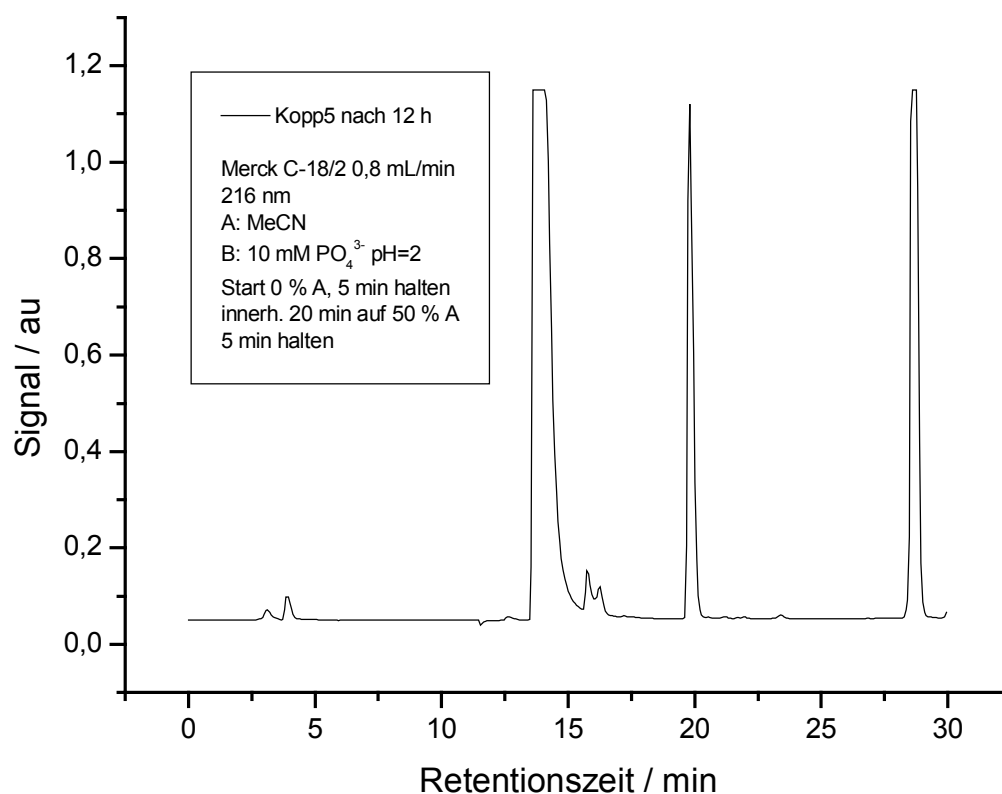


Abbildung 40: Reaktionskontrolle Kopplung an Phenylalanin

Es lässt sich erkennen, dass fast kein freies DOTA ( $t = 3,5$  min) und kein Aktivester ( $t = 25$  min) mehr vorliegt. Dies zeigt, dass die Kupplung vollständig abgelaufen ist.

## 15.2 Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte ein neuer Weg, um DOTA-TFP-Aktivester zu gewinnen, etabliert werden. Das durch Kristallisation aus der Reaktionslösung erhaltene Produkt war rein genug, um ohne weitere Aufreinigung direkt für Konjugationen eingesetzt zu werden. Der Aktivester kann bei  $-18\text{ °C}$  mehrere Monate gelagert werden, so dass bei Bedarf eine Verknüpfung Peptid-DOTA zeitnah erfolgen kann.

Die Konjugationen mittels des DOTA-TFP-Aktivesters erfolgten schnell und unter milden Reaktionsbedingungen. Die entstehenden Nebenprodukte (DOTA und TFP) ließen sich durch Aufreinigung mittels HPLC effektiv abtrennen.

## 16 Bindungsstudien am Zellmodell

Die erhaltenen Peptid-Ligand-Konjugate wurden im Zellmodell getestet, ob sie gemäß den Vorgaben an die GnRH-Rezeptoren binden, was die grundlegende Voraussetzung für weitere Tests darstellt. Dies kann ein Einsatz im Mausmodell sein oder es können oder humanmedizinische Studien durchgeführt werden.

Verwendung fanden 2 Zelllinien: EFO-21 und MDA-MB-231. Bei der Zelllinie EFO-21 handelt es sich um ein Ovarialkarzinomzelle, die über den LHRH-Rezeptor verfügt. MDA-MB-231 ist ein Brustkarzinom, das keine entsprechenden Rezeptoren aufweist.

### 16.1 Durchführung

#### 16.1.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden am Vortag der Studie in 6-Well-Platten ausgesät und am Versuchstag unter dem Mikroskop einer optischen Qualitätskontrolle unterzogen. Hierbei wurde sichergestellt, dass die Zellen adhärent und als Monolayer vorlagen.

Zur Vorbereitung auf die Bindungsstudien wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit 1 mL PBS (Phosphate Buffer Saline)-Lösung gewaschen. Anschließend wurde 1 mL des Reaktionsmediums zugegeben. Dies bestand aus dem jeweiligen Grundmedium, das mit 0,1 % BSA (Bovine Serum Albumin) versetzt worden war.

#### 16.1.2 Vorbereitung der Peptidkonjugate

Die Peptidkonjugate wurden gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Markierungen“ mit Indium-111 radioaktiv markiert und einer Qualitätskontrolle nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Qualitätskontrolle mittels Kartuschen“ unterzogen. Die Markierungsausbeuten betragen 92 % bzw. 98 %, so dass die markierten Konjugate für die Versuche verwendet werden konnten.

Aus diesen Reaktionslösungen wurden 4  $\mu\text{L}$  entnommen und zu 1 mL des jeweiligen Reaktionsmediums gegeben. Die Aktivitätskonzentration dieser Peptidlösung im Medium wurde bestimmt, indem ein Aliquot entnommen und gammaspektroskopisch untersucht wurde. 10  $\mu\text{L}$  der Lösung ergaben eine Zählrate von 115.000 cpm (counts per minute). Für die Bindungsstudien wurde eine Gesamtzählrate von  $1 \cdot 10^6$  cpm angestrebt, so dass für diese Untersuchungen jeweils 80  $\mu\text{L}$  der Peptidlösungen im Medium eingesetzt wurden.

### 16.1.3 Bindungsstudien

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Bindungsstudien“ wurden zu der Hälfte der Zellen auf einer 6-Well-Platte 5  $\mu\text{L}$  einer Triptorelin-Lösung (100  $\mu\text{mol/L}$  in 0,9 % wässriger NaCl-Lösung) als Blocksubstanz gegeben, die anderen drei wurden ungeblickt verwendet.

Durch die Gabe einer Blocksubstanz kann zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung am Rezeptor unterschieden werden.

Danach wurde in alle Wells die vorher bestimmte Menge an markierten Peptid gegeben und die Zellen 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die überstehende Lösung abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS-Lösung gewaschen.

Um die Aktivitäten in den Zellen bestimmen zu können, wurden diese mit Hilfe einer MOPS (3-Morpholino-propansulfonsäure)-Triton-Lösung vom Boden der Platten abgelöst. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C konnten die Zellen in Messgefäße pipettiert werden. Die Vollständigkeit der Überführung wurde sicher gestellt, indem die Restaktivität der Platten kontrolliert wurde. Die Proben wurden gammaspektroskopisch untersucht.



Substanz	Zählraten / cpm		spezifische Bindung / %
	gesamt	unspezifisch	
LHRH-DTPA	4619	4920	
LHRH-DTPA	5101	4673	
LHRH-DTPA	4476	5079	
Mittelwert	4732	4891	-3,2
LHRH-Val-DTPA	9165	9206	
LHRH-Val-DTPA	8392	7911	
LHRH-Val-DTPA	6998	7089	
Mittelwert	8185	8069	1,4

Tabelle 3: Bindungsstudien EFO-21-Zellen

Die gemessenen nach der Bindung ermittelten Zählraten der EFO-21-Zellen lagen weit unter den Zählraten der aufgegebenen Lösungen, was auf eine generell geringe Affinität der Substanzen zu den Zellen hindeutet.

Im Vergleich der spezifischen und der unspezifischen Bindung ist zu erkennen, dass keine bevorzugte spezifische Bindung vorherrscht. Die beobachteten Zählraten sind somit ausschließlich auf unspezifische Anlagerungen zurückzuführen.

Substanz	Zählraten / cpm		spezifische Bindung / %
	gesamt	unspezifisch	
LHRH-DTPA	877	915	
LHRH-DTPA	724	574	
LHRH-DTPA	589	545	
Mittelwert	730	678	7,7
LHRH-Val-DTPA	1023	984	
LHRH-Val-DTPA	921	820	
LHRH-Val-DTPA	911	1084	
Mittelwert	952	963	-1,1

Tabelle 4: Bindungsstudien MDA-MB-231

Wie zu erwarten ist bei den MDA-MB-231-Zellen keine spezifische Bindung der Testsubstanzen zu erkennen. Hier lagen die Zählraten generell noch unter denen der EFO-21-Zellen, was ebenfalls eine geringere unspezifische Bindung anzeigt.

Da für radioaktiv markierte LHRH-Derivate keine erprobten Modelle vorliegen, war es nicht möglich, eine Vergleichsmessung mit einem

vorhandenen Standard durchzuführen, um Fehler bei der Zellbehandlung auszuschließen.

## 16.2 Proteinbestimmungen

Mittels der Proteinbestimmung lässt sich ermitteln, welcher Gehalt an Zellsuspension in der Lösung vorliegt und es lassen sich Rückschlüsse auf die erfolgten Bindungen ziehen.

Hierzu wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Proteinbestimmung“ eine Standardkurve mit BSA als Vergleichsprotein aufgenommen. Aus dieser Funktion wurde der Proteingehalt der Zellsuspensionen ermittelt. Dazu wurden den Suspensionen jeweils 10  $\mu$ L entnommen und diese gemäß der Arbeitsvorschrift weiterbehandelt.

Substanz	Zählraten / cpm	
	ungeblockt	geblockt
LHRH-DTPA	194,8	37,1
LHRH-DTPA	56,0	126,3
LHRH-DTPA	337,1	179,4
LHRH-Val-DTPA	140,0	157,1
LHRH-Val-DTPA	145,1	145,1
LHRH-Val-DTPA	278,8	186,3

Tabelle 5: Proteingehalte der EFO-21 Zellsuspensionen

Hier zeigen sich mitunter starke Schwankungen der Proteingehalte, was eine Auswertung der Daten erschwert. Die Schwankungen sind zurückzuführen auf das unterschiedliche Verhalten der Zellen auf den Platten.

Substanz	Zählraten / cpm	
	ungeblockt	geblockt
LHRH-DTPA	225,7	549,7
LHRH-DTPA	486,3	608,0
LHRH-DTPA	494,9	820,6
LHRH-Val-DTPA	536,0	604,6
LHRH-Val-DTPA	659,4	524,0
LHRH-Val-DTPA	560,0	532,6

Tabelle 6: Proteingehalte der MDA-MB-231 Zellsuspensionen

Aus dem Proteingehalt und den zuvor ermittelten Zählraten lässt sich die spezifische Bindung pro Proteinanteil bestimmen.

Substanz	Bindung in cpm/Proteingehalt	
	gesamt	unspezifisch
LHRH-DTPA	23,7	132,6
LHRH-DTPA	91,2	37,0
LHRH-DTPA	13,3	28,3
Mittelwert	42,7	66,0
LHRH-Val-DTPA	65,5	58,6
LHRH-Val-DTPA	57,8	54,5
LHRH-Val-DTPA	25,1	38,1
Mittelwert	49,5	50,4

Tabelle 7: Bindung EFO-21

In diesen Daten spiegeln sich erneut die Schwankungen der Ergebnisse der Bestimmungen der Proteingehalte wider.

Substanz	Bindung in cpm/Proteingehalt	
	gesamt	unspezifisch
LHRH-DTPA	3,89	1,66
LHRH-DTPA	1,49	0,94
LHRH-DTPA	1,19	0,66
Mittelwert	2,19	1,09
LHRH-Val-DTPA	1,91	1,63
LHRH-Val-DTPA	1,40	1,56
LHRH-Val-DTPA	1,63	2,04
Mittelwert	1,64	1,74

Tabelle 8: Bindung MDA-MB-231

Im Vergleich der beiden Zelllinien zeigt sich, dass erwartungsgemäß die MDA-MB-231-Zellen eine insgesamt geringere Bindung mit den Substanzen eingehen als die EFO-21-Zellen.

### 16.3 Ergebnis

In den Bindungsstudien konnte keine spezifische Bindung der getesteten Substanzen nachgewiesen werden. Es zeigten sich aber große Unterschiede in der unspezifischen Aufnahme zwischen den Zelllinien.

## 17 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden mehrere radioaktiv markierbare Derivate des Hormons LHRH dargestellt. Unter Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde eine effektive und vielseitige Strategie zum Aufbau dieser Derivate erarbeitet und durchgeführt.

Die Liganden DTPA und DOTA wurden zur Komplexierung von Radiometallen an LHRH gekoppelt. Teilweise erfolgte diese Kopplung direkt, teilweise wurden Linker eingesetzt, um einen Abstand zwischen Peptid und Ligand zu erzielen, was eine Verbesserung der Affinität zum Rezeptor bewirken sollte.

Die DTPA-Derivate konnten in hohen Ausbeuten mit Indium-111 radioaktiv markiert werden und wurden einer Bindungsstudie im Zellmodell unterzogen.

Durch die sensible Chemie des DOTA konnten in diesem Fall keine zufriedenstellenden Ergebnisse, eine Markierung mit Radiometallen betreffend, erzielt werden. Die Zielmoleküle wurden zwar erreicht, konnten aufgrund der schlechten Markierungsausbeuten aber nicht abschließend im Zellmodell eingesetzt werden.

Die neuen DTPA-konjugierten Substanzen wurden im Zellmodell getestet. Hier konnte zwar eine erhöhte unspezifische Anreicherung in Zellen, die den LHRH-Rezeptor trugen, festgestellt werden, eine spezifische Anreicherung wurde nicht beobachtet.

Weitere Studien müssen die Bandbreite der verwendeten Linker erweitern, um hier eine Optimierung der Affinität zu erreichen.

## 18 Anhang I: Methodik

Neben den gängigen Arbeitstechniken der präparativen organischen und biochemischen Synthese wurden Techniken aus der Radioanalytik eingesetzt. Insbesondere das HPLC-System mit UV/Vis- und Radioaktivitätsdetektor fand zur Reaktions- und Qualitätskontrolle Anwendung. Daneben wurden Markierungskontrollen und Entsalzungen der Produkte mittels Festphasenextraktion durchgeführt. Auch wurden Bindungsstudien am Zellmodell durchgeführt.

### 18.1 HPLC

Mittels HPLC werden Stoffgemische durch wiederholte Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile zwischen einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt [GOTTWALD 1993].

#### 18.1.1 Funktion

Bei diesem Verfahren wird als mobile Phase ein flüssiges Elutionsmittel verwendet, dieses wird über eine Pumpe mit hohen Drücken durch eine Trennsäule, gepackt mit feinteiligen Partikeln, befördert.

Das zu trennende Substanzgemisch wird in einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch gelöst, mittels Dosiervorrichtung aufgegeben und mit dem Elutionsmittel durch die Säule mit konstanter Fließgeschwindigkeit gefördert.

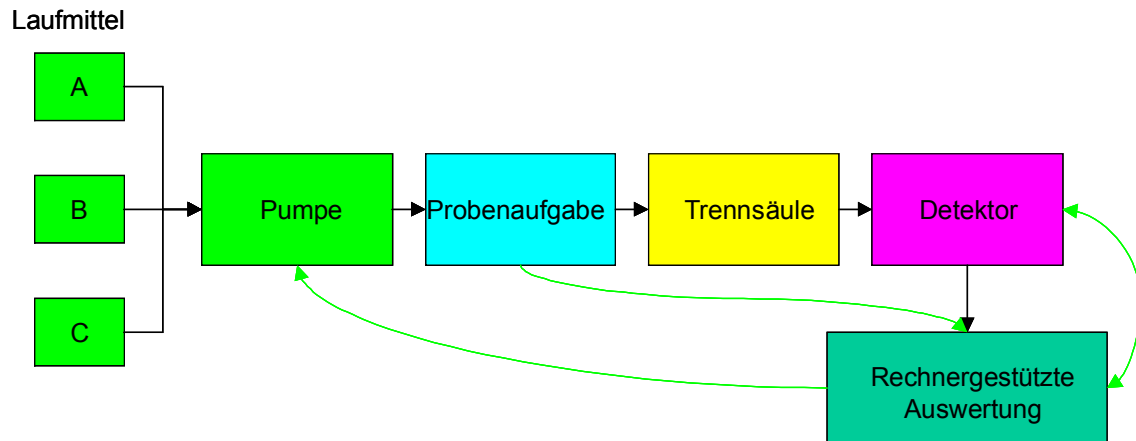


Abbildung 41: HPLC-System, schematisch

In der Trennsäule kommt es zum wiederholten Austausch der zu trennenden Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase. Das Substanzgemisch wird durch die unterschiedlichen Verweildauern der Komponenten aufgetrennt. Diese verlassen das Säulenende in der Reihenfolge zunehmender Verzögerung und werden dort detektiert.

Anhand der Retentionszeit können qualitative Aussagen über die eluierte Substanz getroffen werden. Aus dem erhaltenen Chromatogramm können darüber hinaus auch quantitative Informationen ermittelt werden, da die Fläche unter einem Peak proportional zur eingesetzten Stoffmenge ist.

### 18.1.2 Anwendungsfall Peptide

Für die Reaktionskontrollen, die Aufreinigungen der Reaktionsgemische und die Qualitätskontrollen von Peptidmarkierungen wird ein RP (Reversed-Phase) HPLC-System verwendet; bei diesem ist die stationäre Phase unpolar. Hierfür wird in dieser Arbeit Silicagel verwendet, an dessen Oberfläche Octadecylgruppen (C-18) gebunden sind. In der Trennsäule werden die Substanzen im Gemisch mit zunehmend unpolarem Charakter verzögert [VYDAC 1995].

Um die Elutionsbanden aufgrund von langen Retentionszeiten nicht zu stark zu verbreitern und um die Trennzeit zu verkürzen, wird die

Zusammensetzung der mobilen Phase während der Elution geändert [GENG 1984; RIVIER 1984].

### 18.1.3 Detektion

Das in dieser Arbeit verwendete Detektionssystem besteht aus einem UV/Vis-Spektrometer, gekoppelt mit einem Aktivitätsdetektor. Damit besteht die Möglichkeit einer verbesserten quantitativen Auswertung, da den aufgetrennten Stoffen im UV/Vis-Chromatogramm ihre jeweiligen Aktivitäten über das Aktivitätschromatogramm zugeordnet werden können.

Die Radioaktivitätsdetektion erfolgt mittels eines Festphasenszintillators. Die von den radioaktiven Stoffen emittierte Strahlung erzeugt im Szintillatormaterial Lichtimpulse, die mittels Photomultipliern verstärkt und anschließend elektronisch aufbereitet werden.

## 18.2 Festphasenextraktion

### 18.2.1 Funktion

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) funktioniert nach den gleichen Prinzipien wie die HPLC. Die verwendeten Waters-Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen verhalten sich wie chromatographische Säulen. Sie sind analog zu den verwendeten Reversed-Phase-HPLC-Säulen mit C-18-Material gepackt. Als Pumpsystem wird eine einfache Spritze verwendet. Diese wird auf die Kartusche aufgesetzt, um die mobile Phase durch die Säule zu drücken. Durch Auftragen der Probe auf die Kartusche und selektive Elution der gewünschten Bestandteile mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Elutionsstärke kann die interessierende Fraktion von anderen Bestandteilen der Probenmatrix isoliert werden. Der wesentliche Vorteil gegenüber der HPLC ist die einfachere Handhabung und schnellere Durchführung der Analytik. Meist ist bei diesen Systemen aber nur eine einfache Trennung polar – unpolar möglich, was für die hier betrachteten Anwendungen nicht nur ausreicht, sondern durchaus auch erwünscht ist.



### 18.2.2 Durchführung

Zunächst wird die Säule konditioniert durch Aufgabe eines organischen Lösungsmittels (Methanol oder Acetonitril), gefolgt von einer wässrigen Lösung (Pufferlösung). Auf die konditionierte Säule wird nun das zu trennende Probengemisch aufgetragen. Da es sich um RP-Material handelt, wird beim Eluieren zunächst der polare Anteil (Salze, kleinmolekulare Edukte) mittels einer Pufferlösung eluiert. Diesem Schritt kann zur Entsalzung ein Spülschritt mit Wasser folgen. Das unpolare Produkt (Peptid) lässt sich nun mittels Methanol oder Acetonitril von der Säule herunterwaschen.

Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Durchbruch der Säule beim wässrigen Elutionsschritt nicht zu erwarten ist. Auch kann der unpolare Anteil quantitativ mit kleinen Volumina Lösungsmittel eluiert werden. Aufgrund dieser Eigenschaften des Systems wurden die Reaktionsprodukte mittels SPE von niedermolekularen Nebenprodukten wie DOTA, DTPA oder EDC befreit sowie entsalzt.

## 19 Anhang II: Experimenteller Teil

### 19.1 Reagenzien

#### 19.1.1 Allgemeines

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach den gängigen Methoden getrocknet und absolutiert oder ohne weitere Aufbereitung analysenrein oder in HPLC-Qualität (gradient grade) eingesetzt. Das Wasser wurde mit einem Filtersystem von Millipore (MilliQ) gereinigt.

Alle eingesetzten Reagenzien, die nicht selbst hergestellt wurden, wurden soweit nicht anders angegeben von den üblichen Anbietern bezogen und in handelsüblichen Qualitäten eingesetzt. DOTA wurde von Macrocylics, LHRH von der PSL GmbH bezogen.

Die PBS-Stammlösung (80 g NaCl, 2,0 g KCl, 14,25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 L H<sub>2</sub>O) wurde zum Herstellen der Gebrauchslösung auf 1:10 verdünnt und auf pH = 7,2 eingestellt.

Alle Lösungen wurden frisch angesetzt und nicht länger als eine Woche verwendet.

Die Medien für die Zellen wurden steril gehandhabt und erst kurz vor Gebrauch entnommen.

#### 19.1.2 Zelllinie EFO-21

Die Zelllinie EFO-21 entstammt einem humanen ovarialen Kystadenokarzinom, das 1979 einer 56 Jahre alten kaukasischen Frau entnommen wurde [SIMON 1983; DSMZ 2006]. Das verwendete Grundmedium ist MEM (Minimum Essential Medium)-Earle (Earle-Salz: wässrige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, 2,2 g/L).

#### 19.1.3 Zelllinie MDA-MB-231

Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde dem Ardenokarzinom in der Brust einer 51 Jahre alten kaukasischen Frau entnommen [CAILLEAU 1974, ATCC

2006]. Das verwendete Grundmedium ist RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute).

ATCC Number: **HTB-26**  
Designation: **MDA-MB-231**

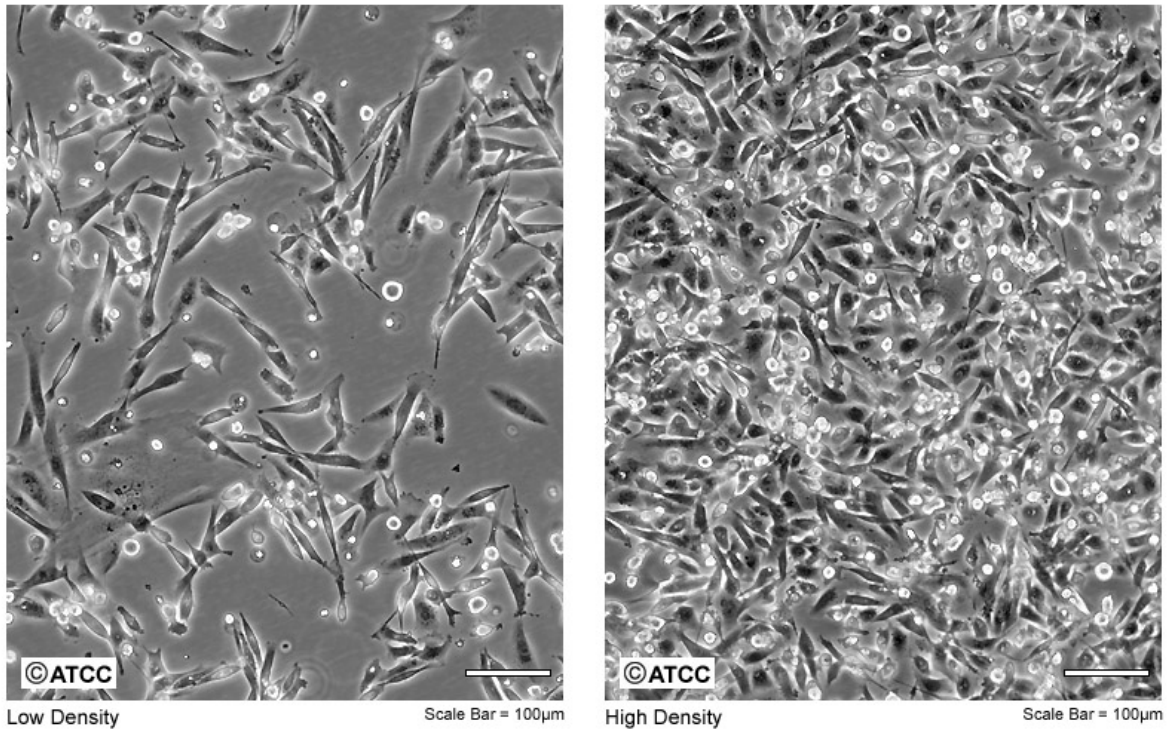


Abbildung 42: MDA-MB-231-Zellen [ATCC]

## 19.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopischen Messungen wurden an folgendem Gerät durchgeführt:

Bruker ARX 200:  $^1\text{H}$ (200 MHz).

Alle Angaben zu chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die  $\delta$ -Skala. Soweit die Signale der Restprotonen des deuterierten Lösungsmittels eindeutig erkennbar waren, wurden diese als interner Standard verwendet und die Spektren auf dieses Signal kalibriert [HESSE 1995]. Die Messtemperatur betrug 298 K.

$^1\text{H}$ -NMR:  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7,24$ )

### 19.3 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an einem Massenspektrometer des Typs Esquire HCT Plus der Firma Bruker durchgeführt. Das Gerät verwendet eine Ionenfalle mit einem Agilent ESI-Sprayer. Die Substanzen wurden als verdünnte Lösungen in Isopropanol/Wasser direkt injiziert.

### 19.4 Radioaktivitätsmessungen

Einzelne Proben wurden mit Messplätzen von Berthold, LB 2040 und LB 6628-1U gemessen.

Reihenmessungen wurden mit einem Packard Cobra II Autogamma durchgeführt.

Bei allen Geräten handelte es sich um NaI-Szintillationsdetektoren.

### 19.5 HPLC-System

Die verwendeten HPLC-Anlagen setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

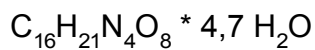
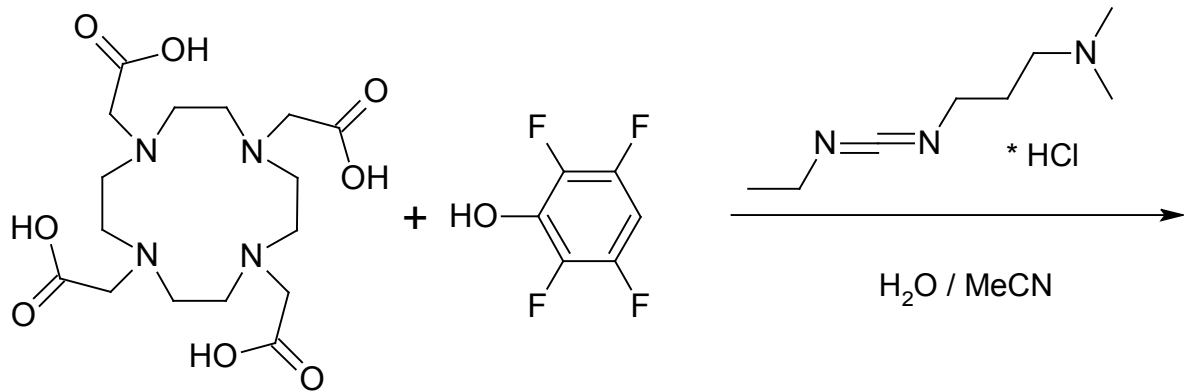
- online-Degaser Degasys DG-1210 von Uniflows
- ternäre Gradientenpumpe von Hewlett-Packard (System 1050), Niederdruckgradient
- HPLC-Pumpen von Waters (Typen 501 und 510), Hochdruckgradient.
- folgende Säulen fanden Verwendung:
  - Nucleosil 100-7 C-18 (7 $\mu$ m) von Machery-Nagel; 250 \* 4 mm (bevorzugte Säule)
  - LiChrospher 100 CH-18/2 (5 $\mu$ m) von Merck; 250 \* 4 mm
  - LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m) von Merck, 250 \* 4 mm
- UV-Vis-Detektoren
  - UV-Vis-Detektor Hewlett-Packard, System 1050

- UV-Vis-Detektor Jasco, UV 970
- UV-Vis-Detektor LDC Analytical, spectroMonitor 5000
- Aktivitätsdetektor Raytest, Ramona 90
- Fraktionssammler Gilson, Modell 203
- AD-Wandler-Modul und Erfassungssoftware Maxima 820 von Millipore.
- Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Origin von Microcal, Version 6 und 7.5.

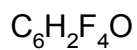
Ein typischer Aufbau besteht aus 2 Waters-510-Pumpen, einer Machery-Nagel-Trennsäule und einem Jasco-UV/Vis-Detektor. Alternativ wird eine radiometrische Detektion mittels Ramona 90 oder ein Fraktionssammler angeschlossen.

## 19.6 Allgemeine Arbeitsvorschriften

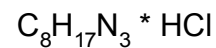
### 19.6.1 Darstellung von 1-Carboxymethyl-2,3,5,6-tetrafluorphenylester-4,7,10-tetraazacyclododecan-triessigsäure (DOTA-TFP-AE)



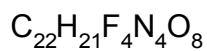
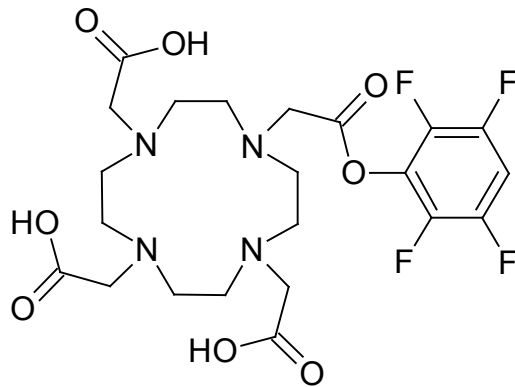
$$M = 481,98$$



$$M = 166,06$$



$$M = 191,70$$



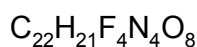
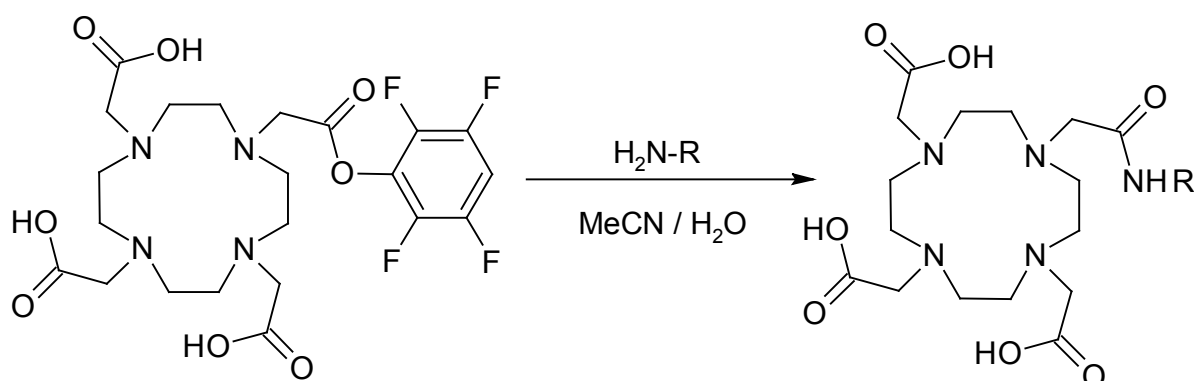
$$M = 545,39$$

Abbildung 43: Darstellung DOTA-TFP-AE

[MIER 2001]

25 mg (50  $\mu\text{mol}$ ) DOTA wurden mit 9 mg (50  $\mu\text{mol}$ ) TFP und 10 mg (50  $\mu\text{mol}$ ) EDC in 200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 80  $\mu\text{L}$  Acetonitril versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Während der Reaktionsdauer wurden Reaktionskontrollen mittels HPLC durchgeführt. Nach 30 min Reaktionsdauer wurde durch heftiges Umrühren ein Kristallisationskeim induziert, wodurch sich innerhalb weniger Minuten ein kristalliner Niederschlag bildete. Dieser wurde abzentrifugiert, mit einem Wasser-Acetonitril-Gemisch (30 : 70) gewaschen und im ÖPV (Ölpumpenvakuum) getrocknet. Nach weiteren 2 h Reaktionsdauer konnten erneut Kristalle gewonnen werden, die analog zum ersten Niederschlag behandelt wurden und eine vergleichbare Zusammensetzung aufwiesen. Die so erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt.

### 19.6.2 Kopplung von DOTA-TFP-AE an Peptide



$$M = 545,39$$

Abbildung 44: Konjugation mittels DOTA-TFP-AE

[BUSSOLATI 2001; LEWIS 1994; TSAI 2001]

25 mg des Aktivesters wurden in 1,5 mL wässriger Triethylammoniumhydrogencarbonatpufferlösung (1 mol/L) gelöst, der pH-Wert wurde mit Triethylamin auf pH = 8,5 eingestellt. 1 mg des Peptids wurde zugegeben und es wurde bei RT gerührt. Bei Löslichkeitsproblemen

des Peptids wurde bis zu 50 % Acetonitril zugegeben. Eine Reaktionskontrolle wurde mittels HPLC durchgeführt. Bei Bedarf wurde jeweils nach 30 min unter Kontrolle des pH-Wertes erneut Aktivester zugegeben.

Nach vollständiger Reaktion (kein Peptidedukt mehr nachweisbar) wurde das entstandene Produkt mittels HPLC isoliert.

### 19.6.3 Kopplung von DTPA-DA an Peptide

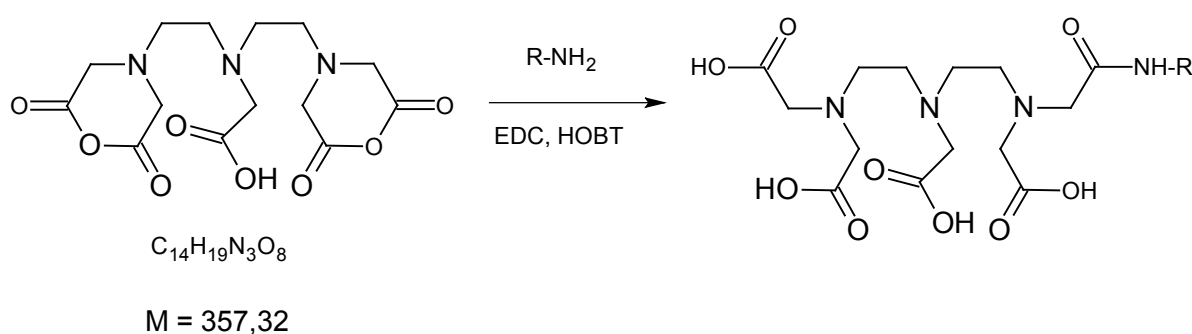


Abbildung 45: Konjugation mittels DTPA-DA

5 mg DTPA-DA wurden in 1 mL  $NaHCO_3$ -Puffer (1 mol/L in  $H_2O$ ) gelöst, mit 5 mg EDC und 1 mg HOBT versetzt. 1 mg des Peptids wurde zugegeben und es wurde bei RT gerührt. Bei Löslichkeitsproblemen des Peptids wurde bis zu 50 % Acetonitril zugegeben. Eine Reaktionskontrolle wurde mittels HPLC durchgeführt. Bei Bedarf wurde jeweils nach 30 min unter Kontrolle des pH-Wertes erneut Aktivester zugegeben.

Nach vollständiger Reaktion (kein Peptidedukt mehr nachweisbar) wurde das entstandene Produkt mittels HPLC isoliert.

### 19.6.4 Entsalzen mittels SPE

Zur Konditionierung der Waters Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen wurden diese mit 2 mL Acetonitril gespült. Die Reste des Lösungsmittels wurden mittels 2 mL Luft ausgeblasen. Dieser Schritt wurde mit Pufferlösung (0,5 mol/L  $NH_4Ac$  in  $H_2O$ , pH = 5,4) wiederholt und die auf der Kartusche verbliebenen Lösungsmittelreste wurden ebenfalls mittels 2 mL Luft ausgeblasen.



Die Elution erfolgte in umgekehrter Reihenfolge. Zunächst wurde der unpolare Anteil mittels 2 mL Pufferlösung eluiert und die Reste des Lösungsmittels mit 2 mL Luft ausgeblasen. Dieser Schritt wurde mit 2 mL Wasser wiederholt. Anschließend wurde das Produkt mit 8 mL organischem Lösungsmittel (Methanol oder Acetonitril) eluiert.

Die erhaltene organische Fraktion wurde im Vakuum getrocknet, um das entsalzte Produkt zu erhalten.

### 19.6.5 HPLC-Verfahren

Trennsäule: Nucleosil 100-7 C18 (7 $\mu$ m) von Machery-Nagel; 250 \* 4 mm

Laufmittel A: 50 mmol/L NH<sub>4</sub>Ac in H<sub>2</sub>O, pH = 5,4

Laufmittel B: Acetonitril

Gradient: Start 5 % B, danach innerhalb von 30 min auf 45 %B, 10 min halten, Regenerationszeit: 10 min

Flussrate: 1 mL/min

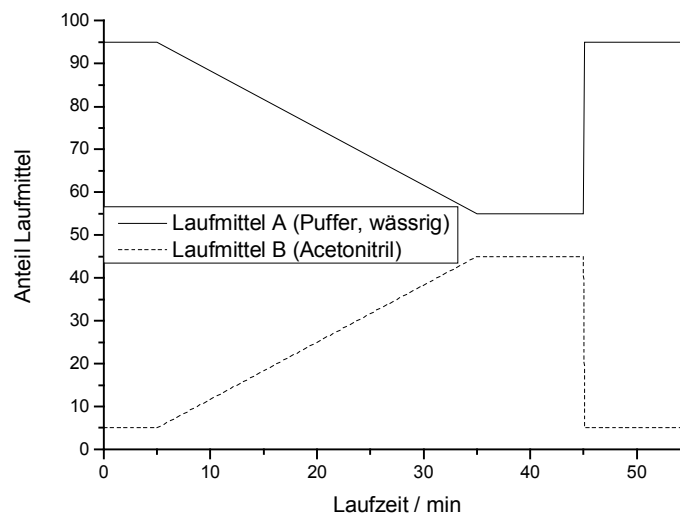


Abbildung 46: Eingesetzter HPLC-Gradient

Dieser Gradient fand sowohl für analytische als auch für präparative Anwendungen im Milligrammmaßstab Verwendung.

### 19.6.6 Markierungen

Für die radioaktiven Markierungen wurde eine entsprechende Menge der das Konjugat enthaltenden Lösung (typisch: 1–5 µL) mit In-111-Lösung (typisch: 3,7 MBq , enthalten in 4-12 µL,) und der gleichen Menge NH<sub>4</sub>Ac-Lösung (500 mM in H<sub>2</sub>O, pH = 5,4) versetzt.

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C (DTPA) oder 95 °C (DOTA) wurde die Markierungsausbeute mittels C-18-Kartuschen oder HPLC mit radio-metrischer Detektion bestimmt.

### 19.6.7 Qualitätskontrolle mittels Kartuschen

Zur Konditionierung der Waters Sep-Pak<sup>®</sup>-Kartuschen wurden diese mit 2 mL Methanol gespült. Die Reste des Lösungsmittels wurden mittels 2 mL Luft ausgeblasen. Dieser Schritt wurde mit Pufferlösung (0,5 mol/L NH<sub>4</sub>Ac in H<sub>2</sub>O, pH = 5,4) wiederholt und die auf der Kartusche verbliebenen Lösungsmittelreste wurden ebenfalls mittels 2 mL Luft ausgeblasen.

Die Probelösung (typ.: 2 µL) wurde aufgegeben.

Die Elution erfolgte in umgekehrter Reihenfolge wie die Konditionierung. Zunächst wurde der unpolare Anteil mittels 2 mL Pufferlösung eluiert und die Reste der Lösung mit 2 mL Luft ausgeblasen. Anschließend wurde mit 2 mL Methanol eluiert und ebenfalls die Reste mit 2 mL Luft ausgeblasen.

Sowohl die Puffer- als auch die Methanolfraktion wurde aufgefangen und die Zählraten an einem NaI-Bohrlochdetektor bestimmt. Zusätzlich wurde der Filter gemessen.

Aus diesen Zählraten wurde die Markierungsausbeute bestimmt:

$$\text{Ausbeute} = \frac{\text{Zählrate Methanolfraktion} + \text{Zählrate Filter}}{\text{Summe der Zählraten Puffer, Methanol, Filter}} * 100$$

### 19.6.8 Bindungsstudien

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht im jeweiligen Nährmedium belassen. Zur Durchführung der Studien wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1 mL PBS-Lösung gewaschen.

Anschließend wurde 1 mL des jeweiligen Reaktionsmedium zugegeben. Dieses bestand aus dem jeweiligen Grundmedium, das mit 0,1 % BSA versetzt worden war. Die Hälfte der Zellen auf einer Platte wurde mit der Blocksubstanz Triptorelin (100  $\mu\text{mol/L}$ , in wässriger, physiologischer NaCl-Lösung) versetzt.

Zu allen Zellen wurde eine Menge radioaktiv markiertes Peptid gegeben, dessen Aktivität auf eine Zählrate von 1.000.000 Ereignissen pro Minute am verwendeten Gammamessplatz eingestellt wurde. Die Zellen wurden 60 min bei 37 °C inkubiert.

Nach beendeter Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS-Lösung gewaschen.

Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 1 mL einer MOPS-Triton-Lösung (20 mmol/L MOPS, pH = 7,4 versetzt mit 0,1 % Triton) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden in Kunststoffröhrchen überführt, um die Aktivität an einem NaI-Gammadetektor zu messen.

### 19.6.9 Proteinbestimmung

Aus der Zellsuspension, die nach dem Ablösen der Zellen nach erfolgten Bindungsstudien erhalten wurden, wurden identische Aliquote von X  $\mu\text{L}$  entnommen und in 940  $\mu\text{L}$  – X  $\mu\text{L}$  physiologischer NaCl-Lösung gegeben. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  der BioRad®-Färbelösung wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion der Lösung an einem UV/Vis-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

Eine Standardkurve wurde erstellt, indem ein Proteinstandard bekannten Gehalts in unterschiedlichen Konzentration nach gemessen wurde. Dazu wurden jeweils 940  $\mu\text{L}$  physiologischer NaCl-Lösung vorgelegt und mit

10  $\mu\text{L}$  der Proteinlösungen sowie 50  $\mu\text{L}$  Färbereagenz versetzt. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion der Lösung an einem UV/Vis-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

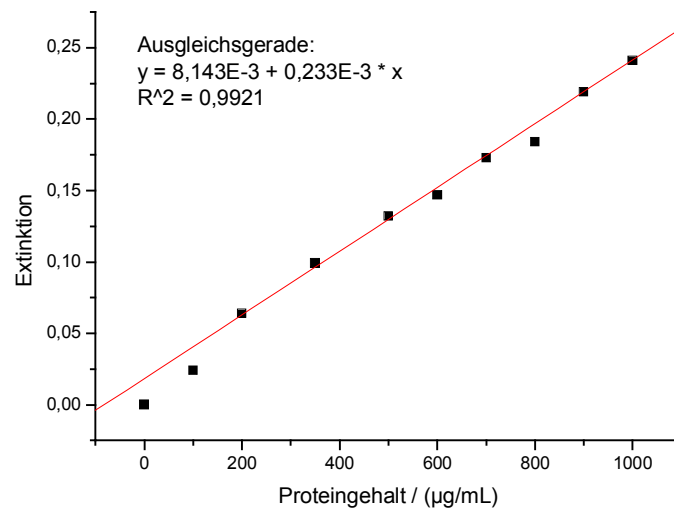
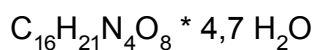
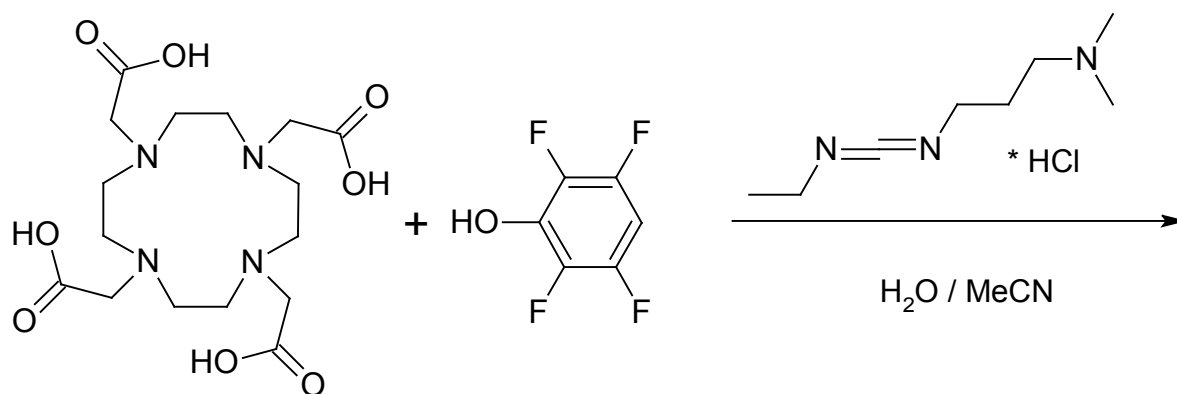


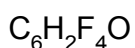
Abbildung 47: Proteinstandard, Referenzmessung

## 19.7 Präparativer Teil

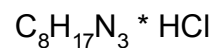
## 19.7.1 Versuchte Darstellung von DOTA-TFP-AE (Phosphat-Puffer)



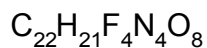
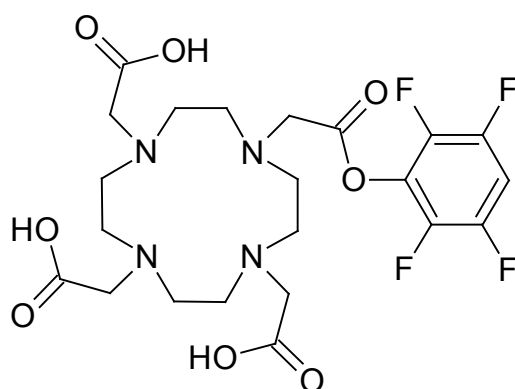
$$M = 481,98$$



$$M = 166,06$$



$$M = 191,70$$



$$M = 545,39$$

Abbildung 48: Versuchte Darstellung DOTA-AE (Phosphat)

25 mg (50  $\mu\text{mol}$ ) DOTA wurden mit 9 mg (50  $\mu\text{mol}$ ) TFP und 10 mg (50  $\mu\text{mol}$ ) EDC in 200  $\mu\text{L}$  Phosphatpuffer (0,2 mol/L in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH = 8,0) und 80  $\mu\text{L}$  Acetonitril versetzt und bei RT gerührt. Während der Reaktionsdauer wurden Reaktionskontrollen mittels HPLC durchgeführt.

Die Reaktionskontrollen zeigten auch nach 2 d keine vollständige Umsetzung der Edukte an. Weiterhin wurde die Entstehung einer Vielzahl von Produkten beobachtet, was eine effektive Aufarbeitung als unmöglich erschienen ließ.

### 19.7.2 Versuchte Darstellung von DOTA-TFP-AE (NaHCO<sub>3</sub>-Puffer, HPLC-Reinigung)

25 mg (50 µmol) DOTA wurden mit 9 mg (50 µmol) TFP und 10 mg (50 µmol) EDC in 200 µL NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (1 mol/L in H<sub>2</sub>O) und 80 µL Acetonitril versetzt und bei RT gerührt. Während der Reaktionsdauer wurden Reaktionskontrollen mittels HPLC durchgeführt.

Nach 2 h konnte kein freies TFP mehr nachgewiesen werden, die Reaktion wurde als vollständig abgelaufen angesehen. Die Reaktionslösung wurde mittels HPLC aufgearbeitet, wobei verschiedene Säulen und Randbedingungen zur Anwendung kamen. Hierbei konnten nach dem Einengen der Fraktionen im Vakuum nur noch die Edukte nachgewiesen werden.

### 19.7.3 Darstellung von DOTA-TFP-AE (ungepuffert, Niederschlag)

25 mg (50 µmol) DOTA wurden mit 9 mg (50 µmol) TFP und 10 mg (50 µmol) EDC in Mischungen von Wasser und Acetonitril in verschiedenen Verhältnissen (reines Wasser bis zu reinem Acetonitril) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Während der Reaktionsdauer wurden Reaktionskontrollen mittels HPLC durchgeführt.

Nach 30 min Reaktionsdauer wurde durch heftiges Umrühren ein Kristallisationskeim induziert, wodurch sich innerhalb weniger Minuten ein kristalliner Niederschlag bildete. Dieser wurde abzentrifugiert, mit einem Wasser-Acetonitril-Gemisch (30 : 70) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach weiteren 2 h Reaktionsdauer konnten erneut Kristalle gewonnen werden, die analog zum ersten Niederschlag behandelt wurden und eine vergleichbare Zusammensetzung aufwiesen. Spätere Niederschläge enthalten zunehmend freies DOTA.

Ausbeute: 5 mg (18 %) farblose Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 200 MHz): 3,20 (s, 16H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ ), 2,51 (s, 8H, N- $\text{CH}_2\text{-CO}_2$ ), 3,78 (s, 1H), 4,04 (s, 2H), 4,76 (s, br,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 7,23 (m, 1H, ArH).

Die Reaktion ließ sich in weiteren Versuchen problemlos auf 200  $\mu\text{mol}$  (Faktor 4) erweitern. Aus diesen Vorversuchen wurde die allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von 1-Carboxymethyl-2,3,5,6-tetrafluorophenylester-4,7,10-tetraazacyclododecan-triessigsäure (DOTA-TFP-AE) entwickelt.

#### 19.7.4 Darstellung von Phenylalanin-DOTA mittels DOTA-TFP-AE

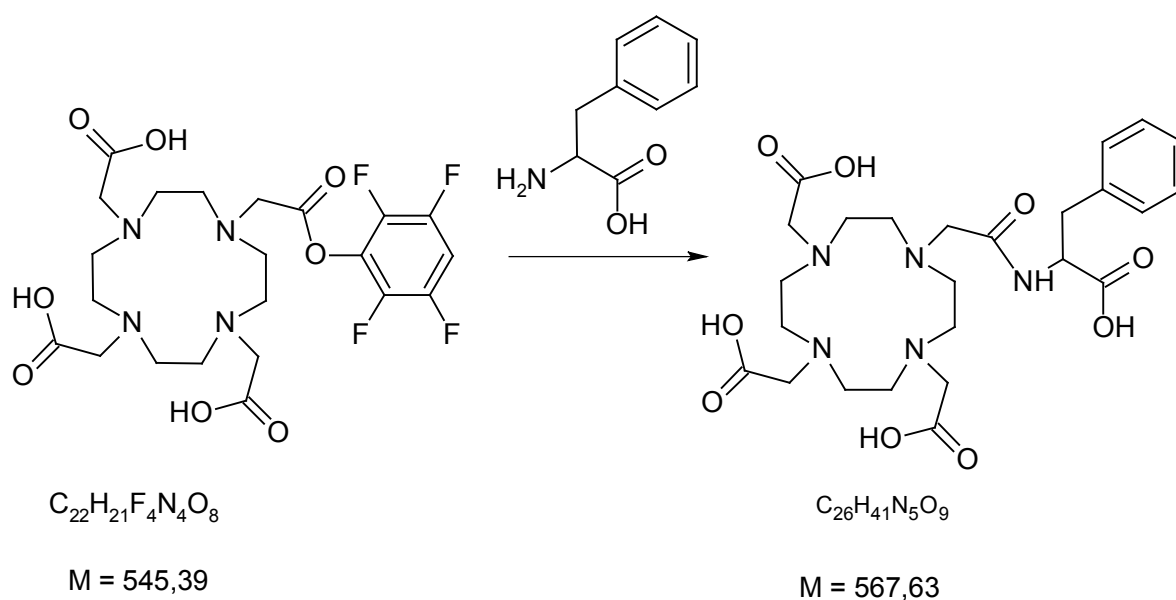


Abbildung 49: Darstellung Phenylalanin-DOTA

Gemäß der AAV wurden 5 mg Aktivester in 500  $\mu\text{L}$  Wasser-Acetonitril-Gemisch (70 : 30) gelöst und mit 15 mg Phenylalanin versetzt. In Abwandlung der AAV wurde jedoch ein Überschuss an Phenylalanin eingesetzt. Die Reaktionslösung wurde bei RT gerührt.

Nach 4 Stunden konnte kein Aktivester mehr nachgewiesen werden. Das entstandene Produkt wurde mittels HPLC isoliert.

## 19.7.5 Darstellung von LHRH-DOTA mittels DOTA-TFP-AE

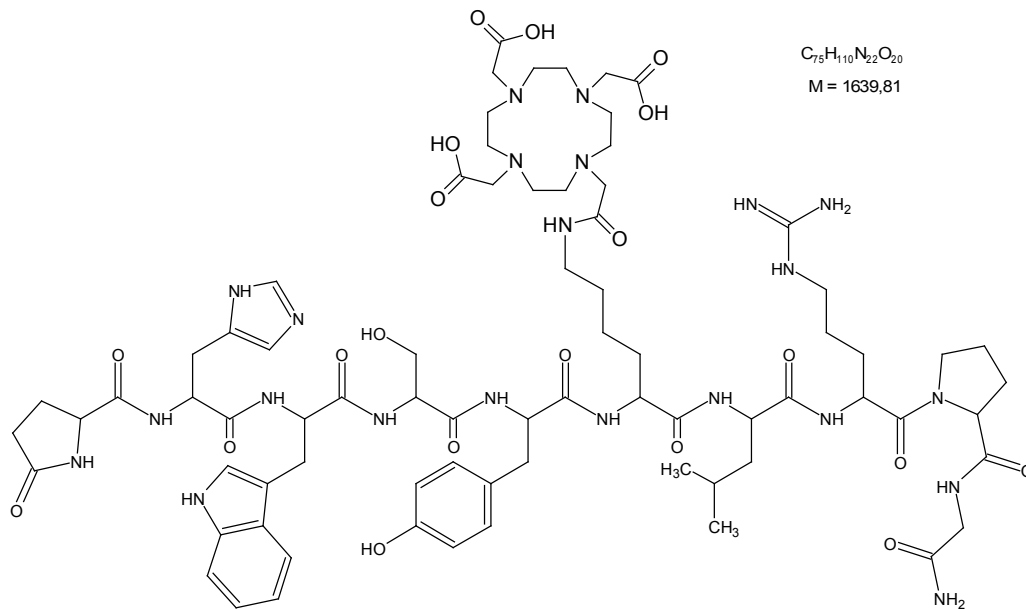


Abbildung 50: LHRH-DOTA

Gemäß AAV wurden 100  $\mu\text{g}$  (79,8  $\mu\text{mol}$ ) LHRH in 50  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$ -Puffer (1 M in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH = 8,5) gelöst und mit 1,5 mg (2,75 mmol) Aktivester (35 eq.) gelöst in 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 12 h war kein freies Peptid mehr nachweisbar und die entstandenen Produkte wurden mittels HPLC abgetrennt und gereinigt.

Zur weiteren Verwendung wurde das Produkt in Wasser aufgenommen und die Konzentration der Lösung auf 1 mg/mL eingestellt.



## 19.7.6 Darstellung von LHRH-DTPA

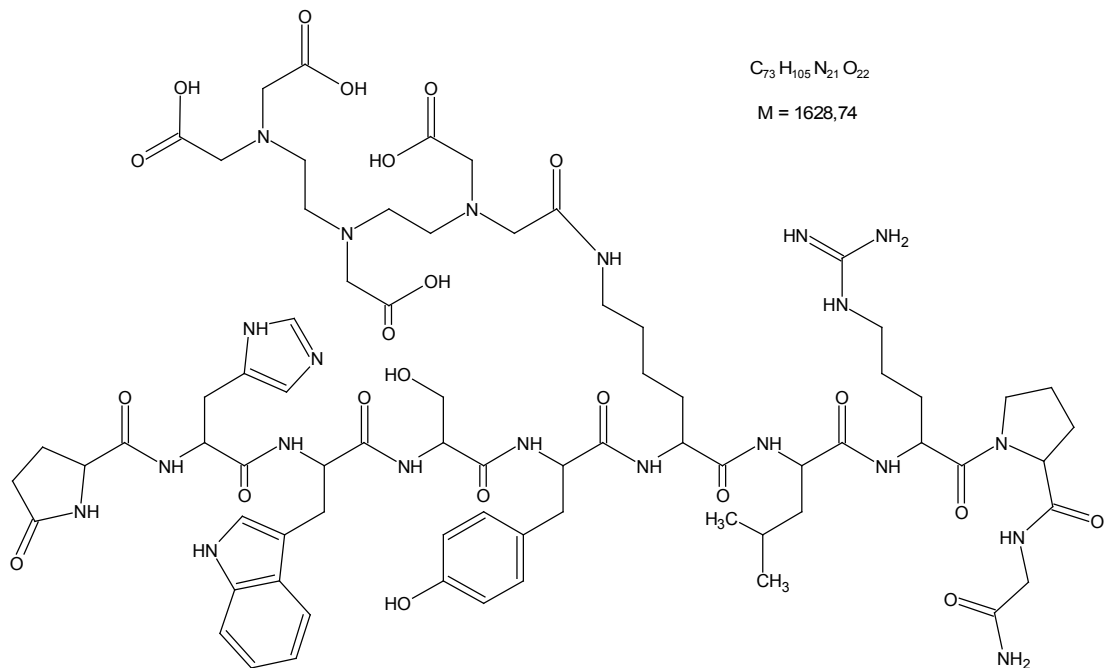
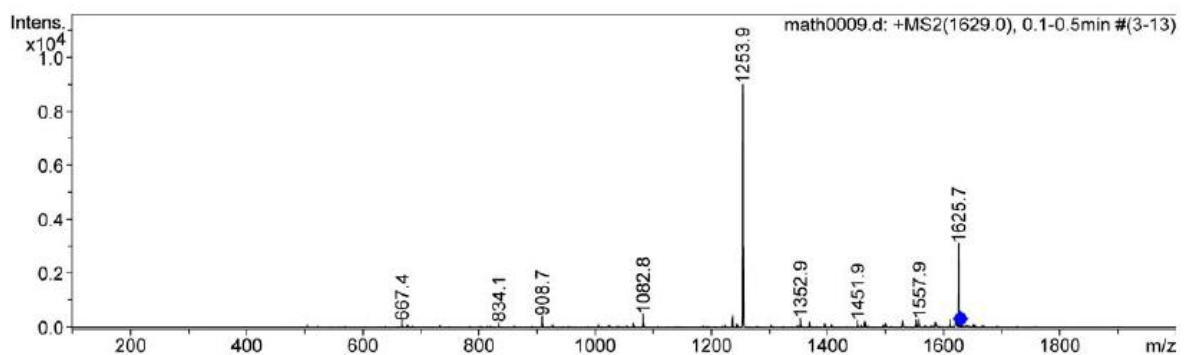


Abbildung 51: LHRH-DTPA

Analog zur AAV wurde 1 mg (798  $\mu$ mol) LHRH in 1 mL NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (1 M in H<sub>2</sub>O) gelöst und mit 15 mg (27,5 mmol) DTPA-DA (35 eq.) versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 4 h wurden die entstandenen Produkte mittels HPLC abgetrennt und gereinigt.

Zur weiteren Verwendung wurde das Produkt in Wasser aufgenommen und die Konzentration der Lösung auf 1 mg/mL eingestellt.



## 19.7.7 Darstellung von LHRH- Valeriansäure-Fmoc

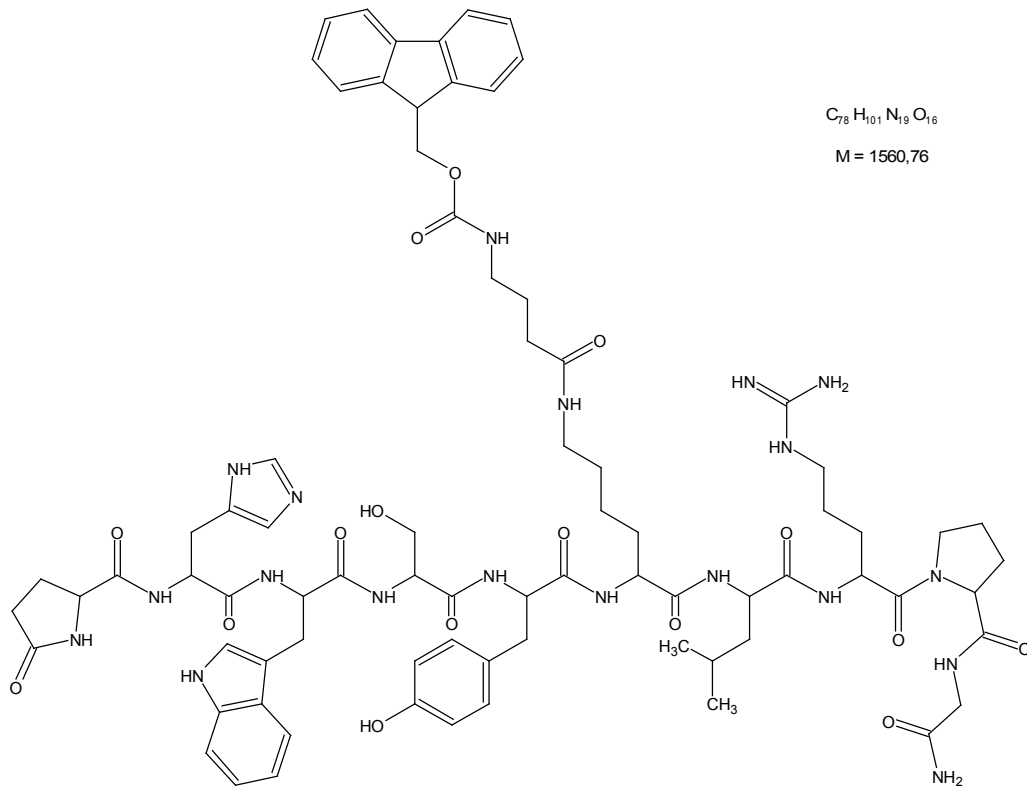


Abbildung 52: LHRH-Valeriansäure-Fmoc

LHRH (5 mg) wurde mit 5-Fmoc-Valeriansäure (20 mg) versetzt und in 500  $\mu$ L DMF, das mit 50  $\mu$ L H<sub>2</sub>O versetzt wurde, gelöst. 30 mg EDC wurden sukzessive zugegeben. Nach 2 Tagen Inkubation bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die Reaktionsprodukte in 500  $\mu$ L 30 % wässriger Acetonitrillösung aufgenommen. Der unlösliche Niederschlag wurde verworfen.

Eine Ausbeutebestimmung wurde nicht vorgenommen, das Produkt wurde direkt weiter eingesetzt.

## 19.7.8 Darstellung von LHRH-Valeriansäure

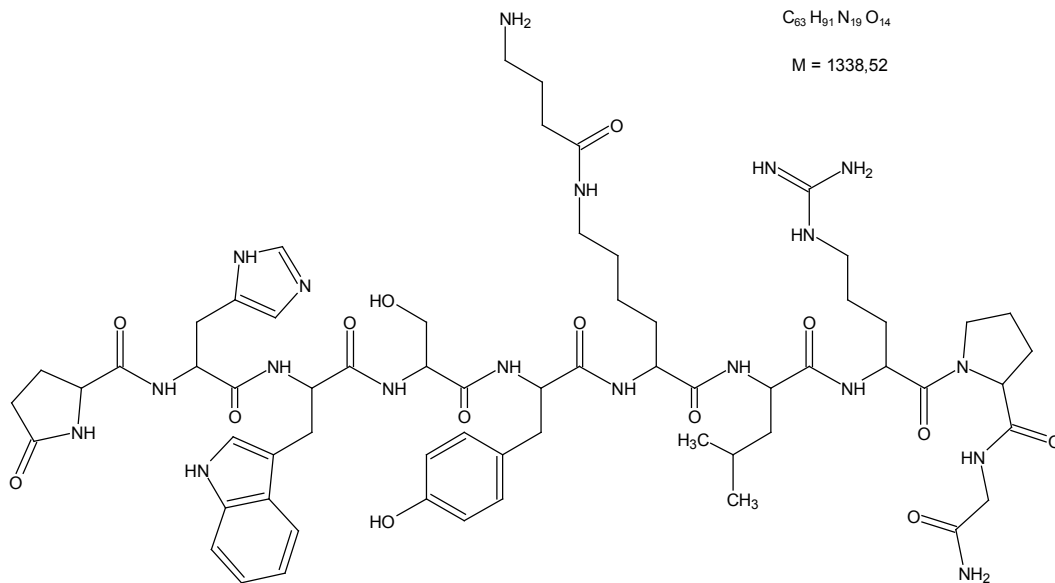
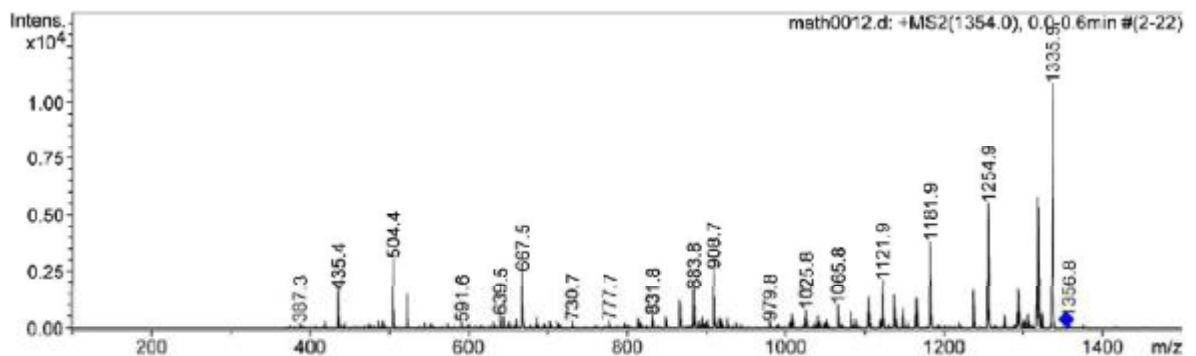


Abbildung 53: LHRH-Valeriansäure

[KOCIENSKI 1994]

Das erhaltene Konjugat LHRH-Valeriansäure-Fmoc wurde in 500  $\mu$ L Acetonitrillösung (30 % in H<sub>2</sub>O) aufgenommen und mit 200  $\mu$ L Ammoniaklösung (konz.) versetzt. Nach 5 Tagen Inkubation bei RT wurde das Produkt mittels HPLC isoliert. Die Fraktionen wurden im Vakuum getrocknet. Eine Ausbeutebestimmung wurde nicht vorgenommen, das Produkt wurde direkt weiter umgesetzt.



## 19.7.9 Darstellung von LHRH-Valeriansäure-DTPA

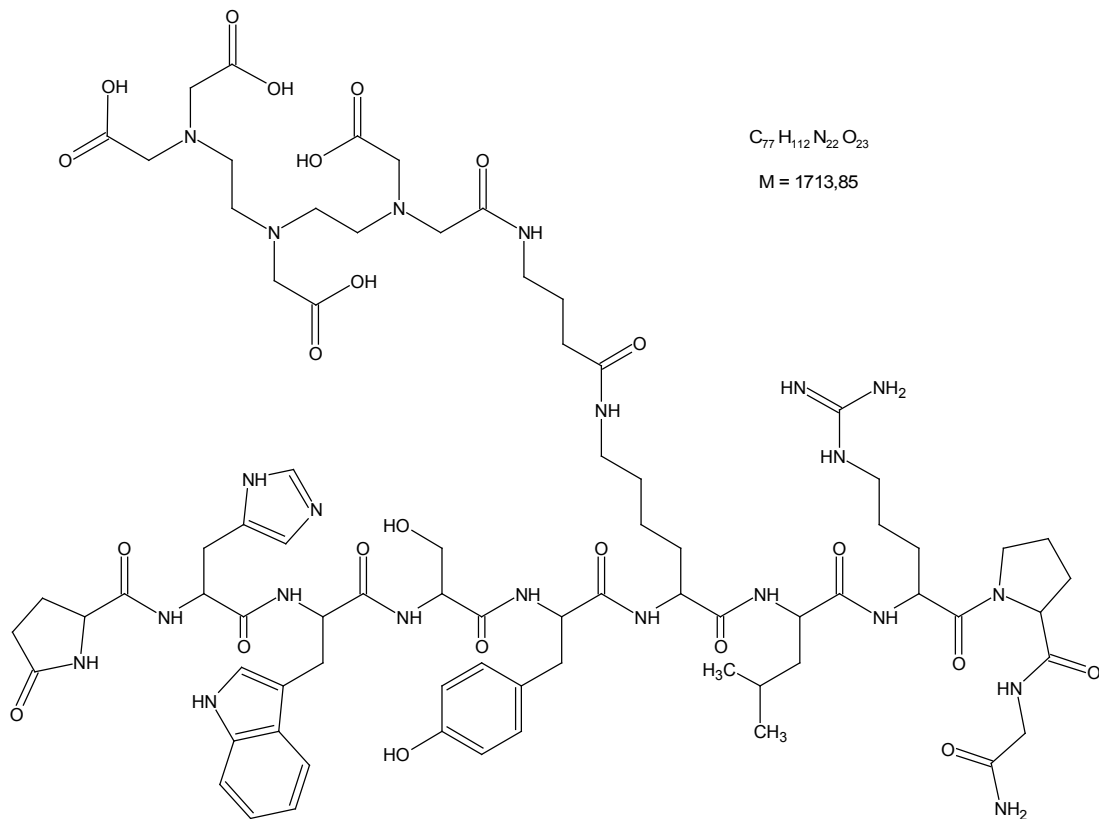
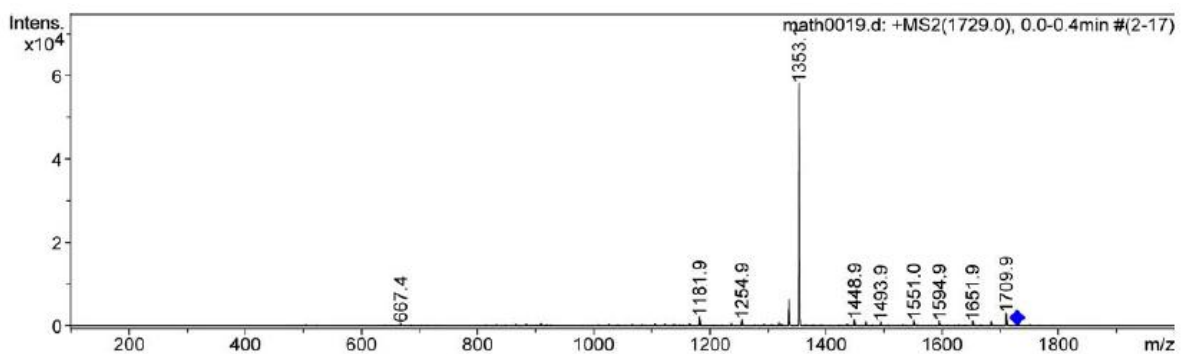


Abbildung 54: LHRH-Valeriansäure-DTPA

LHRH-Valeriansäure wurde in 500  $\mu$ L  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (1 M in  $\text{H}_2\text{O}$ ) aufgenommen und mehrfach mit 5 mg DTPA-DA versetzt. Nach 4 Tagen Inkubation bei RT wurde das Produkt mittels HPLC isoliert. Die Fraktionen wurden im Vakuum getrocknet.

Zur weiteren Verwendung wurde das Produkt in Wasser aufgenommen und die Konzentration der Lösung auf 1 mg/mL eingestellt.



## 19.7.10 Darstellung von LHRH-Valeriansäure-DOTA

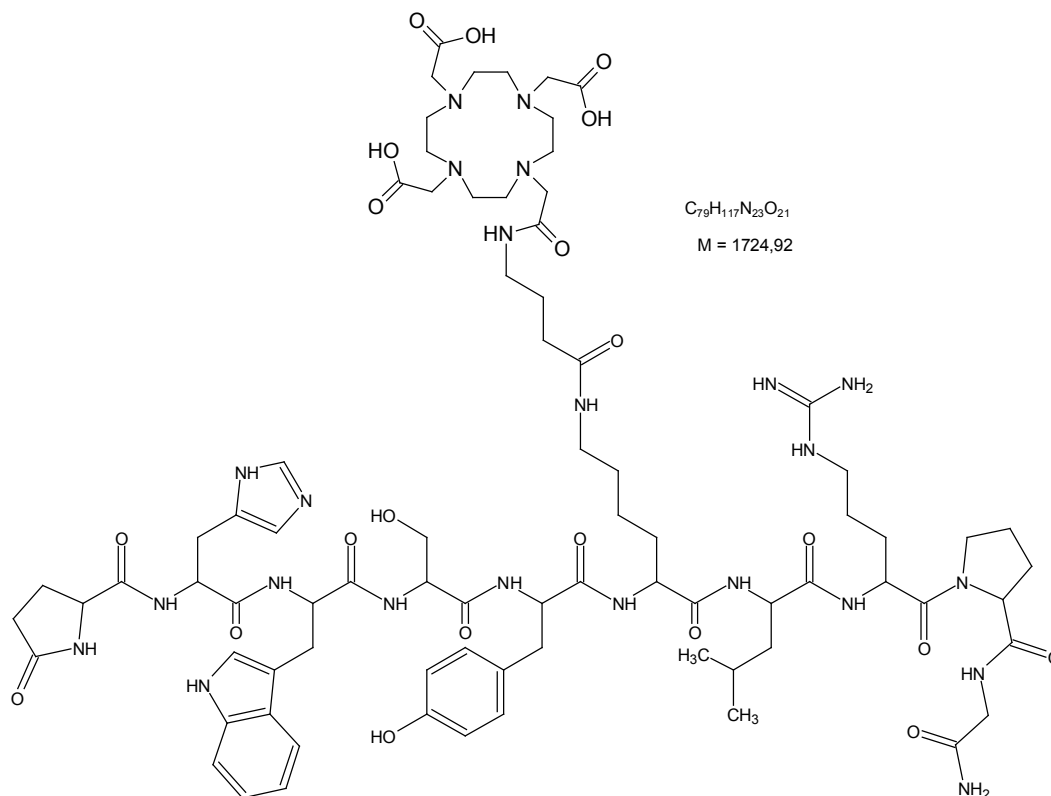


Abbildung 55: LHRH-Valeriansäure-DOTA

LHRH-Valeriansäure wurde mit DOTA-TPF-AE in 500  $\mu$ L  $NH_4CO_3$ -Lösung (1 mol/L, in  $H_2O$ ), deren pH-Wert mittels Triethylamin auf pH = 8,5 eingestellt wurde, 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde ein 30-facher Überschuss Aktivester eingesetzt.

Nach vollständig abgelaufener Reaktion (Reaktionskontrolle mittels HPLC) erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und im Vakuum getrocknet.

Zur weiteren Verwendung wurde das Produkt in Wasser aufgenommen und die Konzentration der Lösung auf 1 mg/mL eingestellt.

## 19.7.11 Markierung LHRH-DTPA

Die Markierung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Markierungen“ durchgeführt.

Hierzu wurden 5  $\mu\text{L}$  der Pufferlösung ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Lösung, 500 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 5,4$ ) mit 2  $\mu\text{L}$  der Peptidlösung (1 mg/mL) versetzt und 5 mL In-111-Lösung (3,7 MBq) wurden zugegeben.

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Markierungsausbeute gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Qualitätskontrolle mittels Kartuschen“ bestimmt. Hierzu wurden 2  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung entnommen und wie in der Vorschrift beschrieben verfahren. Die Markierungsausbeute betrug 92 %.

#### 19.7.12 Markierung LHRH-Valeriansäure-DTPA

Die Markierung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Markierungen“ durchgeführt.

Hierzu wurden 5  $\mu\text{L}$  der Pufferlösung ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Lösung, 500 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 5,4$ ) mit 2  $\mu\text{L}$  der Peptidlösung (1 mg/mL) versetzt und 5 mL In-111-Lösung (3,7 MBq) wurden zugegeben.

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Markierungsausbeute gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Qualitätskontrolle mittels Kartuschen“ bestimmt. Hierzu wurden 2  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung entnommen und wie in der Vorschrift beschrieben verfahren. Die Markierungsausbeute betrug 96 %.

#### 19.7.13 Markierung LHRH-DOTA

Die Markierung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Markierungen“ durchgeführt.

Hierzu wurden 5  $\mu\text{L}$  der Pufferlösung ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Lösung, 500 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 5,4$ ) mit 2  $\mu\text{L}$  der Peptidlösung (1 mg/mL) versetzt und 5 mL In-111-Lösung (3,7 MBq) wurden zugegeben.

Nach 30 min Inkubation bei 95 °C wurde die Markierungsausbeute mittels C-18-Kartuschen gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Qualitätskontrolle mittels Kartuschen“ bestimmt. Hierzu wurden 2  $\mu\text{L}$  der

Reaktionslösung entnommen und wie in der Vorschrift beschrieben verfahren. Die Markierungsausbeute betrug 10 %.

Es wurden weitere 2  $\mu\text{L}$  Peptidlösung zugegeben und noch einmal 30 min inkubiert. Die Markierungsausbeute stieg auf 27 %.

#### 19.7.14 Markierung LHRH-Valeriansäure-DOTA

Die Markierung wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Markierungen“ durchgeführt.

Hierzu wurden 5  $\mu\text{L}$  der Pufferlösung ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Lösung, 500 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH = 5,4) mit 2  $\mu\text{L}$  der Peptidlösung (1 mg/mL) versetzt und 5 mL In-111-Lösung (3,7 MBq) wurden zugegeben.

Nach 30 min Inkubation bei 95 °C wurde die Markierungsausbeute mittels C-18-Kartuschen gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift „Qualitätskontrolle mittels Kartuschen“ bestimmt. Hierzu wurden 2  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung entnommen und wie in der Vorschrift beschrieben verfahren. Die Markierungsausbeute betrug 10 %.

Es wurden weitere 2  $\mu\text{L}$  Peptidlösung zugegeben und wiederum 30 min inkubiert. Die Markierungsausbeute stieg auf 23 %.

## 20 Anhang III: Literaturverzeichnis

- Aime S, Barge A, Benetollo F, Bombieri G, Botta M, Uggeri F, ***Inorganic Chemistry*** 1997a, A Novel Compound in the Lanthanide(III) DOTA Series. X-ray Crystal and Molecular Structure of the Complex  $\text{Na}[\text{La}8\text{DOTA}]\text{La}(\text{HDOTA})\cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ , **36**, 4287-4289.
- Aime S, Botta M, Fasano M, Marques MPM, Geraldès CFGC, Pubanz D, Merbach AE, ***Inorganic Chemistry*** 1997b, Conformational and coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy, **36**, 2059-2068.
- Anderson CJ, Welch MJ, ***Chemical Reviews*** 1999, Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging, **99(9)**, 2219-2234.
- Anelli P, Lattuada L, Gabellini M, Recanati P, ***Bioconjugate Chemistry*** 2001, DOTA Tris(phenylmethyl) Ester: A New Useful Synthon for the Synthesis of DOTA Monoamides Containing Acid-labile Bonds, **12**, 1081-1084.
- ATCC: LGC-Promochem, Datenblatt zur Zelllinie MDA-MB 231, ATCC® Nummer: HTB-26™.
- Barda Y, Cohen N, Lev V, Ben-Aroya N, Koch Y, Mishani E, Fridkin M, Gilon C, ***Nuclear Medicine and Biology*** 2004, Backbone metal cyclization: novel  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  labeled GnRH analog as potential SPECT molecular imaging agent in cancer, **31(4)**, 921-933.
- Behr TM, Béhé M, Becker W, ***Quarterly Journal of Nuclear Medicine*** 1999a, Diagnostic applications of radiolabeled peptides in nuclear endocrinology, **43**, 268-280.
- Behr TM, Jenner N, Béhé M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W, ***Journal of Nuclear Medicine*** 1999b, Radiolabeled Peptides für Targeting Cholecystokinin-B/Gastrin Receptor-Expressing Tumors, **40**, 1029-1044.



- Burai L, Fábíán I, Király R, Szilágyi E, Brücher E, **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions** 1998, Equilibrium and kinetic studies on the formation of the lanthanide(III)-complexes, [Ce(dota)]<sup>-</sup> and [Yb(dota)]<sup>-</sup> (H<sub>4</sub>dota = 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetracetic acid), 243-248.
- Bussolati G, Chinol M, Chini B, Nacca A, Cassoni P, Paganelli G, **Cancer Research** 2001, <sup>111</sup>In-labeled 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetracetic Acid-Lys<sup>8</sup>-Vasotocin: A New Powerful Radioligand für Oxytocin Receptor-expressing Tumors, **61**, 4393-4397.
- Byegard J, Skarnemark G, Skalberg M, **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry** 1999, The Stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies, **241**, 281-290.
- Byrne B, Klahn S, Taylor PL, Eidne KA, **Molecular and Cellular Endocrinology** 1998, Functional analysis of GnRH receptor ligand binding using biotinylated GnRH derivatives, **144(1)**, 11-19.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ Jr, **Journal of the National Cancer Institute** 1974, Breast tumor cell lines from pleural effusions, **53(3)**, 661-674.
- Chen CK, Leung PCK, **Endocrine Reviews** 2005, Molecular Biology of Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and Their Receptors in Humans, **26(2)**, 283-306.
- Conn PM, Crowley WF, **Annual Review of Medicine** 1994, Gonadotropin-Releasing Hormone and its Analogs, **45(2)**, 391-405.
- Corsi DM, Elst LV, Muller RN, van Bekkum H, Peters JA, **Chemistry- A European Journal** 2001, Relaxivity and Water Exchange Studies of a Cationic Macrocyclic Gadolinium(III) Complex, **7**, 1383-1389.
- Cutler CS, Smith CJ, Ehrhardt GJ, Tyler TT, Jurisson SS, Deutsch E, **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals** 2000, Current and Potential Therapeutic Uses of Lanthanide Radioisotopes, **15(6)**, 531-545.

- DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Datenblatt zur Zelllinie EFO-21, [http://www.dsmz.de/human\\_and\\_animal\\_cell\\_lines/info.php?dsmz\\_nr=235&term=efo-21](http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=235&term=efo-21) (9.11.2006).
- Emons G, Pahawa GS, Ortman O, Knuppen R, Oberheuser F, Schulz KD, ***Journal of Steroid biochemistry and Molecular Biology*** 1990, LHRH-Receptors and LHRH-agonist therapy in ovarian cancer: an overview, **37(6)**, 1003-1006.
- Emons G, Schally AV, ***Human Reproduction Update*** 1994, The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers, **9(7)**, 1364-1379.
- Flanagan CA, Fromme BJ, Davidson JS, Millar RP, ***Endocrinology*** 1998, A high affinity gonadotropin-releasing hormone (GnRH) tracer, radioiodinated at position 6, facilitates analysis of mutant GnRH receptors, **139(10)**, 4115-4119.
- Gali H, Hoffman TJ, Sieckman GL, Owen NK, Katti KV, Wynn AV, ***Bioconjugate Chemistry*** 2001, Synthesis, Characterization, and Labeling with  $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$  of Peptide Conjugates Containing a Dithia-bisphosphine Chelating Agent, **12(3)**, 354-363.
- Geng X, Regnier RS, ***Journal of Chromatography*** 1984, Retention Model for Proteins in Reversed-Phase Liquid Chromatography, **296**, 15-30.
- Gottwald W, ***RP-HPLC für Anwender***, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1993.
- Harrison GS, Wiermann ME, Nett TM, Glode LM, ***Endocrine-Related Cancer*** 2004, Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells, **11**, 725-748.
- Helmer RG (Hrsg.), ***Gamma-Ray Spectrum Catalogue***, Idaho National Engineering & Environmental Laboratory, 4. Auflage, Idaho, 1998.

- Heppeler A, Froidevaux S, Mäcke HR, Jermann E, Béhé M, Powell P, Hennig M, ***Chemistry – A European Journal*** 1999, Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatsed Somatostatin Analogue with superb Tumour-Targeting Properties and Potential für Receptor-Mediated Internal Radiotherapy, **5(7)**, 1974-1981.
- Hesse M, Meier H, Zeeh B, ***Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie***, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
- Hnatowich DJ, Childs RL, Lanteigne D, Najafi A, ***Journal of Immunological Methods*** 1983, The Preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabelled with metallic radionuclides: an improved Method, **65**, 147-157.
- Hoffmann SH, ter Laak T, Kühne R, Reiländer H, Beckers T, ***Molecular Endocrinology*** 2000, Residues within Transmembrane Helices 2 and 5 of the Human Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Contribute to Agonist and Antagonist Binding, **14 (7)**, 1099-1115.
- Jang YH, Blanco M, Dasgupta S, Keire DA, Shively JE, Goddard III WA, ***Journal of the American Chemical Society*** 1999, Mechanism and Energetics für Complexation of  $^{90}\text{Y}$  with 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetracetic Acid (DOTA), a Model for Cancer Radioimmunotherapy, **121**, 6142-6151.
- Kaden TA, ***Chimia*** 2000, Reactivity and Function of Macrocyclic Metal Complexes, **54**, 574-578.
- Kahán Z, Nagy A, Schally AV, Halmos G, Arencibia JM, Groot K, ***Breast Cancer Research and Treatment*** 2000, Administration of a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing-hormone inhibits growth of estrogen-independent MDA-MB-231 human breast cancers in nude mice, **59**, 255-262.
- Kocienski PJ, ***Protective Groups in Organic Chemistry***, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994.

- Krebs LJ, Wang X, Pudavar HE, Bergey EJ, Schally AV, Nagy A, Prasad PN, Liebow C, **Cancer Research** 2000, Regulation of Targeted Chemotherapy with Cytotoxic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue by Epidermal Growth Factor, **60**, 4194-4199.
- Kung HF, **The Development of Radiopharmaceuticals for Imaging CNS Receptors in Current Directions in Radiopharmaceutical Research and Development**, Kluwer Academic Publishers, 1996.
- Labrie F, Belanger A, Cusan L, Labrie C, Simard J, Luu-The V, Diamond P, Gomez JL, Candas B, **Endocrine-Related Cancer** 1996, History of LHRH agonist and combination therapy in prostate cancer, **3(3)**, 243-278.
- Lewis MR, Kao JY, Anderson AL, Shively JE, Raubitschek AA, **Bioconjugate Chemistry** 2001, An Improved Method for Conjugating Monoclonal Antibodies with *N*-Hydroxysulfosuccinimidyl DOTA, **12**, 320-324.
- Lewis MR, Raubitschek AA, Shively JE, **Bioconjugate Chemistry** 1994, A Facile, Water-Soluble Method for Modification of Proteins with DOTA. Use of Elevated Temperature and optimised pH To Achieve High Specific Activity and High Chelate Stability in Radiolabeled Immunoconjugates, **5**, 565-576.
- Li WP, Ma DS, Higginbotham C, Hoffman T, Ketring AR, Cutler CS, Jurisson SS, **Nuclear Medicine and Biology** 2001, Development of an in-vitro model for assessing the in-vivo stability of lanthanide chelates, **28**, 145-154.
- Liu S, Edwards DS, **Bioconjugate Chemistry** 2001, Bifunctional Chelators for Therapeutic Lanthanide Radiopharmaceuticals, **12**, 7-34.

- Liu S, He Z, Hsieh WY, Fanwick PE, ***Inorganic Chemistry*** 2003, Synthesis, Characterization, and X-ray Crystal Structure of In(DOTA-AA) (AA = *p*-Aminoanilide): A Model für <sup>111</sup>In-Labeled DOTA-Biomolecule Conjugates, **42**, 8831-8837. Liu S, Pietryka J, Ellars CE, Edwards DS, ***Bioconjugate Chemistry*** 2002, Comparison of Yttrium and Indium Complexes of DOTA-BA and DOTA-MBA: Models for <sup>90</sup>Y- and <sup>111</sup>In-Labeled DOTA-Biomolecule Conjugates, **13**, 902-913.
- Mäcke HR, Riesen A, Ritter W, ***Journal of Nuclear Medicine*** 1989, The molecular Structure of Indium-DTPA, **30(7)**, 1235-1239.
- Martelli AE, Motekaitis RJ, Clarke ET, Delgado R, Sun Y, Ma R, ***Supramolecular Chemistry*** 1996, Stability constants of metal complexes of macrocyclic ligands with pendant donor groups, **6**, 353-363.
- Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M, ***Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*** 2001, Synthesis and Isolation of Active Esters of DOTA, **44 (Supl. 1)**, 8814-8816.
- Mongiat-Artus P, Teillac P, ***European Urology Supplements*** 2005, Role of Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) Agonists and Hormonal Treatment in the Management of Prostate Cancer, **4**, 4-13.
- Neill JD, ***Endocrinology*** 2002, Minireview: GnRH and GnRH Receptor Genes in the Human Genome, **143(3)**, 737-743.
- Reeves JJ, Séguin C, Lefebvre FA, Kelly PA Labrie F, ***Proceedings in the National Academy of Sciences of the United States of America*** 1980, Similar luteinizing hormone-releasing hormone binding sites in rat anterior pituitary and ovary, **77(9)**, 5567-5571.
- Rivier J, McClintoc R, Galyean R, Anderson H, ***Journal of Chromatography*** 1984, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography: Preparative Purification of Synthetic Peptides, **288**, 303-328.

- Schally AV, Arimura S, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RMG, Debeljuk L, White WF, **Science** 1971a, The gonadotropin releasing Hormone: one polypeptide regulates the secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones, **173**, 1036-1038.
- Schally AV, Kastin AJ, **Drug Therapy** 1971b, Stimulation and inhibition of fertility through hypothalamic agents, **1**, 29-32.
- Sheehan JC, Preston J, Cruickshank PA, **Journal of the American Chemical Society** 1965, A Rapid Synthesis of Oligopeptide Derivatives without Isolation of Intermediates, **87**, 2492-2493.
- Simon WE, Albrecht M, Hansel M, Dietel M, Holzel F, **Journal of the National Cancer Institute** 1983, Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones, **70(5)**, 839-845.
- Stewart AB, Lwaleed BA, Douglas DA, Birch BR, **Current Medicinal Chemistry** 2005, Current Drug Therapy for Prostate Cancer: An Overview, **5**, 603-612.
- Sun Y, Anderson CJ, Pajeau TS, Reichert DE, Hanock RD, Motekaitis RJ, Martell AE, Welch MJ, **Journal of Medicinal Chemistry** 1996, Indium(III) and Gallium(III) Complexes of Bis(aminoethanethiol) Ligands with Different Denticities: Stabilities, Molecular Modeling, and *in-vivo* Behavior, **39(2)**, 458-470.
- Teillac P, Bono AV, Irani J, Wirth M, Zlotta AR, **Clinical Therapeutics** 2005, The Role of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Therapy in Locally Advanced Prostate Cancer and Biochemical Failure: Consideration for Optimal Use, **27(3)**, 273-285.
- Tsai SW, Sun YY, Williams LE, Raubitschek AA, Wu AM, Shively JE, **Bioconjugate Chemistry** 2000, Biodistribution and Radioimmunotherapy of Human Breast Cancer Xenografts with Radiometal-Labeled DOTA Conjugated Anti-HER2/neu Antibody 4D5, **11**, 327-334.

- Tsai SW, Li L, Williams LE, Anderson AL, Raubitschek AA, Shively JE, ***Bioconjugate Chemistry*** 2001, Metabolism and Renal Clearance of  $^{111}\text{In}$ -Labeled DOTA-Conjugated Antibody Fragments, **12**, 264-270.
- Vydac (Hrsg.), ***The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC***, 2. Auflage, 1995.
- Wang K, Li R, Cheng Y, Zhu B, ***Coordination Chemistry Reviews*** 1999, Lanthanides – the future drug?, **190**, 297-308.
- Westphalen S, Kotulla G, Kaiser F, Krauss W, Werning G, Elsasser HP, Nagy A, Schulz KD, Grundker C, Schally AV, Emons G, ***International Journal of Oncology*** 2000, Receptor mediated antiproliferative effects of the cytotoxic LHRH agonist AN-152 in human ovarian and endometrial cancer cell lines, **17**, 1063-1069.

## 21 Anhang IV: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spezifische Radiopharmaka .....	3
Abbildung 2: Glucose und FDG.....	4
Abbildung 3: Markierungsprinzipien (Approach-Systeme).....	5
Abbildung 4: SPECT, Prinzip .....	8
Abbildung 5: Bildrekonstruktion SPECT, 1D-Modell.....	9
Abbildung 6: PET, Prinzip .....	10
Abbildung 7: Zerfallsschema Indium-111 [vereinfacht nach HELMER 1998] .....	14
Abbildung 8: DTPA, C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> , M = 393,35 g/mol.....	17
Abbildung 9: DTPA-DA, C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> , M = 357,32 g/mol.....	18
Abbildung 10: DOTA, C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> , M = 404,42 g/mol .....	19
Abbildung 11: DOTA-Indiumkomplex in Lösung [nach LIU 2003].....	21
Abbildung 12: Regulationskette GnRH.....	25
Abbildung 13: LHRH, C <sub>59</sub> H <sub>84</sub> N <sub>18</sub> O <sub>13</sub> , M = 1253,41 g/mol.....	27
Abbildung 14: GnRH im Rezeptormodell [HOFFMANN 2000] .....	29
Abbildung 15: Doxorubicin, C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub> , M = 541,55 g/mol .....	31
Abbildung 16: DTPA-DA, Konjugation.....	33
Abbildung 17: DOTA, Schutzgruppen .....	33
Abbildung 18: Typische Aktivester .....	35
Abbildung 19: DOTA-Aktivester .....	35
Abbildung 20: Konjugation mittels TFP-Aktivester.....	36
Abbildung 21: Einsatz von Linkern .....	37
Abbildung 22: Alkylische Systeme I.....	39
Abbildung 23: Alkylische Systeme II.....	39
Abbildung 24: Aromatische Linker .....	39
Abbildung 25: Aminosäuren als Linker .....	40
Abbildung 26: Gedankenmodell I .....	40
Abbildung 27: Gedankenmodell II .....	40
Abbildung 28: [D-Lys <sup>6</sup> ]-LHRH, C <sub>59</sub> H <sub>84</sub> N <sub>18</sub> O <sub>13</sub> , M = 1253,41 g/mol .....	45
Abbildung 29: 5-Amino-Valeriansäure, C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> , M = 103,12 g/mol.....	45
Abbildung 30: LHRH-Valeriansäure-DTPA, C <sub>77</sub> H <sub>112</sub> N <sub>22</sub> O <sub>23</sub> , M = 1713,84 g/mol .....	47
Abbildung 31: LHRH-Valeriansäure-DOTA, C <sub>79</sub> H <sub>117</sub> N <sub>23</sub> O <sub>21</sub> , M = 1724,92 g/mol.....	47
Abbildung 32: Chromatogramm LHRH + FMoc-Valeriansäure .....	48
Abbildung 33: Chromatogramm Entschützung FMoc.....	50
Abbildung 34: LHRH-DTPA, C <sub>73</sub> H <sub>105</sub> N <sub>21</sub> O <sub>22</sub> , M = 1628,74 g/mol .....	52
Abbildung 35: LHRH-DOTA, C <sub>75</sub> H <sub>110</sub> N <sub>22</sub> O <sub>20</sub> , M = 1639,81 g/mol.....	53
Abbildung 36: Chromatogramm ungepuffertes Reaktionsgemisch .....	57
Abbildung 37: Reaktionsgemisch Phosphatpuffer pH = 8.....	58
Abbildung 38: NMR-Spektrum des DOTA-TFP-AE .....	59
Abbildung 39: Niederschlag aus Reaktionslösung.....	60
Abbildung 40: Reaktionskontrolle Kopplung an Phenylalanin.....	61
Abbildung 41: HPLC-System, schematisch.....	71
Abbildung 42: Darstellung DOTA-TFP-AE.....	78
Abbildung 43: Konjugation mittels DOTA-TFP-AE.....	79
Abbildung 44: Konjugation mittels DTPA-DA .....	80
Abbildung 45: Eingesetzter HPLC-Gradient.....	81
Abbildung 46: Proteinstandard, Referenzmessung.....	84
Abbildung 47: Versuchte Darstellung DOTA-AE (Phosphat).....	85



---

Abbildung 48: Darstellung Phenylalanin-DOTA .....	87
Abbildung 49: LHRH-DOTA.....	88
Abbildung 50: LHRH-DTPA .....	89
Abbildung 51: LHRH-Valeriansäure-Fmoc .....	90
Abbildung 52: LHRH-Valeriansäure .....	91
Abbildung 53: LHRH-Valeriansäure-DTPA .....	92
Abbildung 54: LHRH-Valeriansäure-DOTA.....	93

## 22 Anhang V: Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Typische Peptidrezeptoren auf Tumoren .....	22
Tabelle 2: Aminosäuresequenzen von GnRH und GnRH-Derivaten .....	27
Tabelle 3: Bindungsstudien EFO-21-Zellen.....	65
Tabelle 4: Bindungsstudien MDA-MB-231 .....	65
Tabelle 5: Proteingehalte der EFO-21 Zellsuspensionen.....	66
Tabelle 6: Proteingehalte der MDA-MB-231 Zellsuspensionen .....	67
Tabelle 7: Bindung EFO-21 .....	67
Tabelle 8: Bindung MDA-MB-231 .....	68

## 23 Anhang VI: Abkürzungsverzeichnis

AE	Aktivester
br	breit
cpm	Counts per minute
BSA	Bovine Serum Albumin
DMF	Dimethylformamid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N-N'-N''-N'''-tetraessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTPA-DA	Diethylentriaminpentaessigsäure-Dianhydrid
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylamino)propyl]carbodiimid
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSAB	Hard Soft Acid Base - Prinzip nach Pearson
konz.	Konzentriert
LH	Luteinizing hormone
LHRH	Luteinizing hormone-releasing hormone
m	Multipllett
MeCN	Acetonitril
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
MRT	Magnetic Resonance Tomography
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	Phosphate Buffer Saline
PET	Positron Emission Tomography
PG	Protecting Group
R	Organylrest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
SPE	Solid Phase Extraction
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TFA	Trifluoressigsäure
TFP	2,3,5,6-Tetrafluorophenol

## 24 Danksagung

Meinen Eltern spreche ich an dieser Stelle meinen Dank aus, denn ihre Unterstützung und Zuversicht haben mich durch mein Studium begleitet.

Leider konnte meine Großmutter das Ende dieser Arbeit nicht mehr miterleben, doch ihr möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich danken.

Ganz besonderen Dank möchte ich Carolin aussprechen, die Leben in mein Leben gebracht hat und stetiger Quell für Inspiration war.

Meinem Doktorvater, Hartmut Jungclas, danke ich für die gewährte Unterstützung und die persönliche Betreuung dieser Arbeit.

Auch meinen Prüfern sei mein Dank ausgesprochen für die Zeit, die sie in das Lesen und in die Korrektur der Arbeit investiert haben.

Für die fachliche Unterstützung insbesondere in radiopharmazeutischen Aspekten danke ich Martin Béhé aus der Nuklearmedizin.

Den Laboralltag in der Nuklearmedizin erleichtert haben mir die drei Damen aus dem Labor, Ursula Cramer, Birgit Herbst und Gudrun Höhn. Gudrun danke ich für die Pflege der Zellen und Birgit für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Allen ehemaligen und jetzigen Kollegen in der Marburger Kernchemie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, und insbesondere Elke Vaupel für die Durchführung so mancher verwaltungstechnischen Meisterleistung.