
Synthese und Anwendung makrocyclischer Chelatoren für metallbasierte Diagnostik

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie, Institut für Pharmazie
Der Universität Hamburg

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

vorgelegt von

Malte Holzapfel

Hamburg 2020

Die vorliegende Arbeit wurde von 2015 bis 2020 im Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Hamburg unter Betreuung von Prof. Wolfgang Maison angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maison

Zweitgutachter: Prof. Dr. Udo Schumacher

Tag der Disputation: 30.10.2020

Für meine Familie

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das interessante Forschungsthema. Du hast nicht zuletzt durch deine *open door policy* ein Forschungsumfeld zu geschaffen, in dem ein respektvolles, freundlich-familiäres Arbeitsklima herrscht, welches in der akademischen Welt selten zu finden ist. Vielen Dank für die prägenden Jahre in Deiner Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich mich bei Personen bedanken, ohne die Teile dieser Arbeit nicht entstanden wären. Vielen Dank an Thomas Hackl für das offene Ohr der bei NMR bezogenen Fragen. Danke an Dr. Maria Riedner, die bei Problemen mit *unserer Masse* mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Vielen Dank auch an Dr. Michael Kaul für die Expertise bezüglich MRT-Anwendungen. Danke an Indranath Chakraborty und Qi Bing aus dem AK Parak und Torben Segelke aus dem AK Fischer für Messungen an der ICP-MS. Außerdem möchte ich mich bei meinen internationalen Kooperationspartnern Kelly Henry, Jason S. Lewis, und insbesondere John Frangioni bedanken. Ein großer Dank gebührt außerdem meinen MasterstudentInnen Silke und Turbo, meinen Bachelorstudentinnen Inga und Ramona sowie allen PraktikantInnen, die bei mir tolle Arbeit geleistet haben und hoffentlich auch das eine oder andere gelernt haben. Vielen Dank auch den fleißigen HelferInnen: Marina, Sharah, Matze, Moritz und Serge, die mich auf den letzten Metern durch emsiges Korrekturlesen massiv unterstützt haben. Des Weiteren bedanke ich mich beim wissenschaftlichen Service der Universität Hamburg, deren Nerven ich manchmal durch spezielle Anfragen etwas strapaziert habe. Außerdem möchte ich der Haustechnik danken, die abseits der Wissenschaft den Laden am Laufen halten. Danke Anette, Kathleen und Rainer, ohne Euch wäre ich öfters aufgeschmissen gewesen. Außerdem muss ich mich beim Personal des Studienbüros, insbesondere Franca Fuchs sowie meiner Tutorin Dr. Kathrin Hoppe bedanken, die mir während des Studiums sehr geholfen haben.

Danke an meinen Labbuddy Serge für die Zeit in 510 und meinen Schreibraumbuddy Moritz (und auch kurz Maik) für die vielen fachlichen und absolut nicht-fachlichen Diskussionen. Vielen Dank an alle aktuellen und ehemaligen KollegInnen des AK Maisons. Ihr habt die Zeit wirklich zu etwas Besonderen gemacht. Danke, dass ich von Euch lernen und mit und Euch forschen durfte. Ich möchte die Zeit mit euch allen nicht missen. Besonderer Dank gilt Ella, die mich in Ihrer speziellen Arbeitsweise sehr geprägt hat und Dorith, die mich nach dem ISP direkt

in den Arbeitskreis gelotst hat. Danke an Franzi „Fränzel Washington“ Klitschko, die uns allen als AK Muddi im Gedächtnis bleiben wird und danke an Sharah, die das Amt übernommen hat. Danke Natas, Sharah, und Flo, mit denen ich das stressigste Projekt dieser Arbeit irgendwie über die Bühne gebracht habe. Vielen Dank auch an die befreundeten Arbeitskreise Lemcke Schützenmeister und Wicha, sowie Claudia, Melanie und Grillmeister Uli.

Vielen Dank allen meinen Freunden und Mannschaftskameraden, die mir in dieser stressigen Zeit immer einen Ausgleich gegeben haben, den ich bitter nötig hatte. Danke Basti, Denyo, Fritz, Johann, Matze, Paulo, Phici, Tom und Yanni.

Danke Marina, dass Du mir während der ganzen Zeit meine emotionale Stütze, mein gutes Gewissen und meine Struktur im Alltag warst. Danke für Deine Geduld, Deine Ratschläge und Dein Reisefieber. Du hast mir innerhalb und außerhalb der wissenschaftlichen Welt unvergessliche Erinnerungen bereitet, für die ich Dir aus ganzem Herzen dankbar bin.

Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, die über die letzten fünf Jahre viele Höhen und Tiefen erlebt hat und mich trotzdem immer verständnisvoll unterstützt und bestätigt hat. Danke für Euer Vertrauen. Ich bin mir bewusst, dass ich dieses ganze Projekt Studium ohne euren Rückhalt nicht geschafft hätte. Ich bin froh, dass ich Euch habe.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Bildgebende Verfahren.....	3
1.2 Tumor-Targeting	10
1.2.1 Target und Targeting-Vektor	12
1.2.2 Linker-Einheit	15
1.2.3 Effektor	17
1.3 Anwendung und Eigenschaften des Chelators DOTA	17
2. Aufgabenstellung	22
3. Ergebnisse und Diskussion	24
3.1 Komplexeigenschaften verschiedener Ln-DOTxAZA-Derivate.....	24
3.1.1 Synthese DOTA-basierter Metallkomplexe.....	26
3.1.2 Komplexgeometrie von Eu-DOTA-Derivaten.....	32
3.1.3 Relaxivitäten von Gd-DOTxAZA.....	36
3.1.4 Zusammenfassung Komplexeigenschaften.....	41
3.2 Komplexierungsstudien verschiedener Zr-DOTA-Derivate	42
3.2.1 Stabilität DOTA-basierter Zr-Komplexe	43
3.2.2 Synthese neuartiger DOTAZA-basierte Zr-Komplexe.....	46
3.2.3 Zusammenfassung Komplexierungsstudien	52
3.3 Exkurs Oberflächenbeschichtung	53
3.3.1 Synthese des DOTAZA-basierten Ankermoleküls.....	55
3.3.2 Immobilisierungsexperimente.....	58
3.3.3 Zusammenfassung Oberflächenbeschichtung.....	62
3.4 Integrin-Targeting.....	63
3.4.1 cRGD Synthese	63
3.4.2 Synthese neuartiger DO3A-cRGD-Derivate.....	66
3.4.3 SPECT-Radioassay	80
3.4.5 DOTAZA als Multimerisierungsplattform	82
3.4.5 Zusammenfassung Integrin-Targeting	85
3.5 PSMA-Targeting	86
3.5.1 PET-Radioassay	87
3.5.3 Eu-Assay	99

3.5.4 Zusammenfassung PSMA-Targeting.....	112
4. Zusammenfassung.....	113
5. Summary.....	117
6. Experimenteller Teil	121
6.1 Reinigung.....	121
6.1.1 Säulenchromatographie.....	121
6.1.2 Automatisierte Flüssigkeitschromatographie.....	121
6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	121
6.2 Analytik	122
6.2.1 Kernspinresonanzspektroskopie	122
6.2.2 Relaxationszeiten	122
6.2.3 Massenspektrometrie	123
6.2.4 Infrarotspektroskopie	123
6.2.5 Drehwertmessung	123
6.2.6 Thermogravimetrische Analytik	123
6.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie.....	123
6.2.8 Energiedispersive Röntgenspektroskopie	123
6.3 Arbeitstechnik.....	124
6.3.1 Mikrowelle.....	124
6.3.2 Zentrifuge.....	124
6.4 Arbeitsvorschriften	124
6.4.1 Festphasensynthese	124
6.4.2 Komplexeigenschaften verschiedener Ln-DOTxAZA-Derivate	125
6.4.3 Stabilität DOTA-basierter Zr-Komplexe	133
6.4.4 Oberflächenbeschichtung - Synthese	138
6.4.5 Integrin-Targeting - Synthese	140
6.4.6 PSMA-Targeting - Synthese	152
6.4.7 Immobilisierungsreaktionen.....	177
6.4.8 Testreaktionen zum zwitterionischen Aktivester MH80	177
6.4.9 Testreaktion zur Cu-Fällung aus Click Reaktionen.	178
7. Anhang.....	179
7.1 Relaxationsstudien.....	179
7.2 SPECT-Radioassay.....	180
7.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie.....	182

7.4 Thermogramme	186
7.5 NMR- & LCMS-Analytik	187
7.6 Gefahrstoffverzeichnis.....	247
8. Literaturverzeichnis	252
Curriculum Vitae	280
Publikationen	281
Eidesstattliche Versicherung	282

Abkürzungsverzeichnis

acac	Acetylacetonat
AcOH	Essigsäure
BFC	bifunktionelle Chelatoren
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement
CT	Computertomographie
CuAAC	Cu-katalysierte Alkin-Azid-1,3-Cycloaddition
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
Destatis	Statistisches Bundesamt
DFO	Deferoxamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
2,2-DMP	2,2-Dimethoxypropan
ECM	extrazelluläre Matrix
EDC	3-(Ethyliminomethylidenamino)- <i>N,N</i> -dimethyl-propan-1-amin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
Äq.	Äquivalente
EMA	Europäischen Arzneimittel-Agentur
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FBS	fetales Kälberserum
FDG	2-Fluoro-2deoxy-D-glucose
FID	freier Induktionsverfall
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GBCA	Gd-basierte Kontrastmittel
HBTU	(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yloxy)(dimethylamino)- <i>N,N</i> -dimethylmethaniminiumhexafluoro-phosphat
HOBt	1 <i>H</i> -Benzotriazol
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HSA	humanes Serumalbumin
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IRE	Inversionserholungsexperiment

Kristallstr.	Kristallstruktur
MRT	Magnetresonanztomographie
mAb	monoklonaler Antikörper
NMR	Kernspinresonanz
NP	Nanopartikel
PS	Polystyrol
PSMA	prostataspezifisches Membrantigen
PET	Positronen-Emissionstomographie
ppb	parts per billion
ppt	parts per trillion
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NaAsc	Natriumascorbat
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NIR	Nahinfrarot
NMRD	Kernspinresonanz-Dispersion
QD	Quantumdot
SAP	quadratisch antiprismatisch
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TES	Triethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TGA	thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
TIC	totales Ionenchromatogramm
TIPS	Triisopropylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TSAP	verdreht quadratisch antiprismatisch
WHO	<i>World Health Organisation</i>
XRD	Röntgendiffraktometer

1. Einleitung

Krebs ist weltweit nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache.^{1,2} Laut Schätzungen der World Health Organisation (WHO) war im Jahr 2018 einer von sechs Todesfällen auf Krebserkrankungen zurückzuführen.¹ In Deutschland standen laut Statistischem Bundesamt (Destatis) 2017 sogar ein Viertel aller Todesursachen im Zusammenhang mit bösartigen Neubildungen (Abbildung 1-1).³

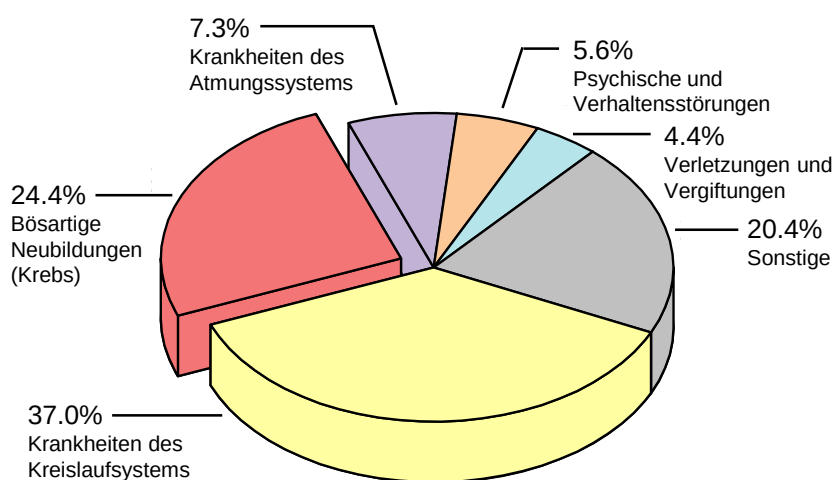


Abbildung 1-1 Todesursachen nach Krankheitsarten 2017 (Destatis).³

Während die Inzidenz und Mortalität in Industrieländern wie Deutschland oder den Vereinigten Staaten relativ zur Population stabil blieben oder leicht zurückgingen,^{1,4,5} wird vermutet, dass in Zukunft die weltweite Krebsbelastung stark steigen wird.^{1,6} Ursächlich dafür ist der demographische und sozioökonomische Wandel der Bevölkerung, welcher mit Häufigkeit und Verteilung von Hauptrisikofaktoren korreliert.^{7,8} Sowohl die WHO als auch die American Cancer Society weisen darauf hin, dass 30-50% aller letalen Krankheitsverläufe vermeidbar wären.^{2,9} Zum einen durch Prävention mit einem entsprechenden Lebensstil und ausgewogener Ernährung,^{1,2,10} zum anderen durch hochsensitive Früherkennungsmethoden, welche Tumore in einem juvenilen Stadium identifizieren können.^{9,11,12} Die Herausforderung einer frühen Diagnose liegt in der Wachstumsart von Krebszellen begründet, die anhand einer asymmetrischen Sättigungskurve verläuft (Abbildung 1-2).¹³ Krebszellen wachsen im zellulären Stadium aufgrund der diffusionsbegrenzten Nährstoffversorgung langsam (Abbildung 1-2, gelb),¹⁴ bis durch Angiogenese eines wachsenden Tumors das Wachstum durch neovaskuläre Nährstoffversorgung exponentiell beschleunigt wird. Diese Transformation wird als angiogenetischer Schalter bezeichnet.^{11,14} In Abbildung 1-2 ist die Karzinogenese

Einleitung

durch die Anzahl der Zellen über einen Zeitraum abgebildet. Der Farbverlauf verdeutlicht die Nährstoffzufuhr von diffusionslimitierter (gelb) zu neovaskulärer Versorgung (rot). Die Detektionsgrenze klinischer Diagnostik ist als gestrichelte Linie dargestellt. Der schraffierte Bereich verdeutlicht die Tumorgenese ohne mögliche Detektion. Auf der linken Seite sind die verschiedenen Stufen der Tumorgenese entsprechend der Zellanzahl erläutert, auf der rechten Seite ist die entsprechende Sensitivität verschiedener klinisch relevanter Detektionsmethoden dargestellt, die in nicht-klinischen Anwendungen sogar um Größenordnungen höher ist; zur Übersichtlichkeit ist die Skala nicht linearisiert.

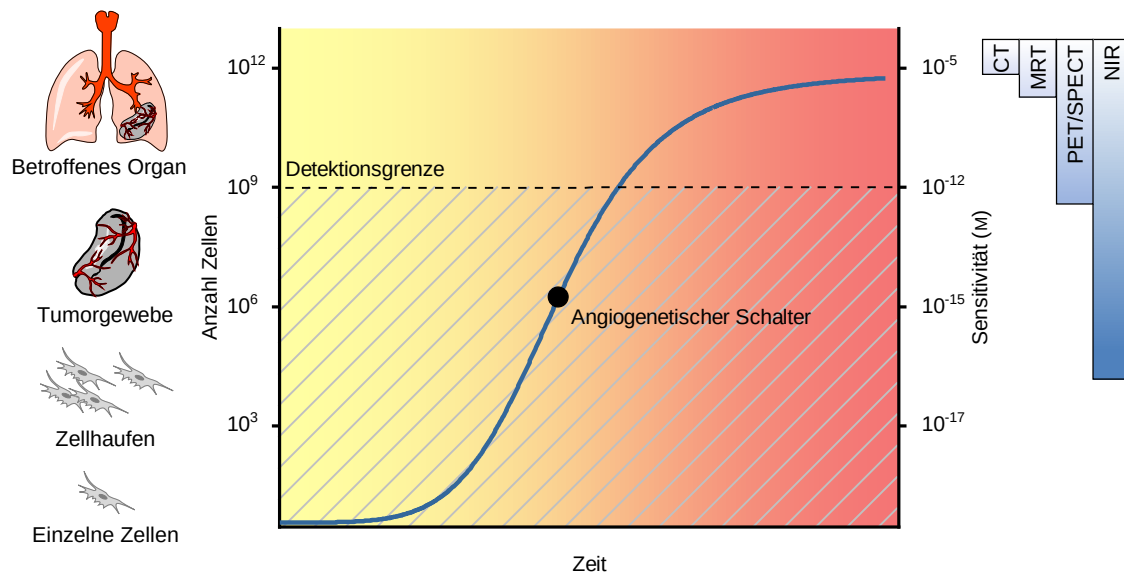


Abbildung 1-2 Karzinogenese als Funktion der Zellanzahl über die Zeit mit markiertem angiogenetischem Schalter. Die Detektionsgrenze ist als gestrichelte Linie dargestellt. Der Bereich unterhalb der Detektionsgrenze ist grau schraffiert. Der Farbgradient verdeutlicht die Nährstoffzufuhr von langsamer (gelb) zu schneller (rot) Aufnahme.¹¹

Wie aus dem Kurvenverlauf hervorgeht, liegt die Detektionsgrenze von 10^9 Zellen (ca. 1 g festes Tumorgewebe) in einem Bereich exponentiellen Wachstums, was das therapeutische Fenster nach einer Diagnose zeitlich limitiert.¹¹ Daher gibt es ein großes Interesse daran, neue diagnostische und therapeutische Methoden zu entwickeln und zu etablieren, die idealerweise eine Diagnose vor dem angiogenetischen Schalter oder auf zellulärer Ebene ermöglichen. Das dafür theoretisch nötige Auflösungsvermögen besitzen einige klinisch genutzten bildgebenden Verfahren bereits heute.

1.1 Bildgebende Verfahren

Bildgebende Verfahren sind wertvoll für die klinische Diagnostik von Tumoren, da sie eine nicht-invasive Methode darstellen, um gezielt Gewebe zu untersuchen. Dabei lassen sich die Methoden in zwei Anwendungsgebiete unterteilen:

- (1) Diagnostische Methoden, welche die Morphologie eines Gewebes abbilden. Häufig werden diese durch die Verabreichung eines Kontrastmittels sichtbar gemacht. Beispiele sind die Computertomographie (CT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT).
- (2) Gewebespezifische Methoden, bei denen selektiv Funktionalitäten durch ein Signal markiert werden. Beispiele dafür sind die Positronen-Emissionstomographie (PET), die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) sowie die Bildgebung mittels Nahinfrarot-fluoreszenz (NIR).

Computertomographie

Die CT ist die Standardmethode der klinischen Radiologie, bei der Röntgenstrahlen zur Bildgebung genutzt werden.^{15, 16} Das grundlegende Prinzip der CT ist, dass Gewebe innerhalb des Körpers Strahlen einer Röntgenquelle unterschiedlich stark abschwächt. Mit Hilfe eines im Gewebe verteilten Kontrastmittels wie I_2 kann auf diese Weise durch schrittweise Tomographie von Sektionen ein dreidimensionales Bild der Anatomie computergeneriert werden. Die CT ist eine exzellente Methode, um Morphologie oder Läsionen eines betroffenen Gewebes darzustellen, allerdings ist das Auflösungsvermögen limitiert (Abbildung 1-2), sodass keine Informationen auf zellulärer Ebene abgebildet werden können.^{16, 17}

Magnetresonanztomographie

Eine weitere Methode um Morphologie zu untersuchen ist die MRT, welche wegen der hohen räumlichen Auflösung, sowie der Fähigkeit zwischen verschiedenen Gewebearten zu unterscheiden, eines der meist genutzten bildgebenden Verfahren für klinische Anwendungen ist.^{18, 19} Die MRT beruht auf den grundlegenden Prinzipien der Kernspinresonanz (NMR).²⁰ Jedem Atomkern wird demnach ein Kernspin mit einem Eigendrehimpuls um die Kernachse zugeordnet. Diese Rotation induziert ein Magnetfeld, welches mit äußeren Magnetfeldern in Wechselwirkung tritt. Für die klinische MRT wird die Wechselwirkung von Protonen mit einem äußeren Magnetfeld als bildgebendes Signal genutzt, da sie günstige Kernspin-Eigenschaften besitzen und in Form von Wasser in einer Konzentration von 80-90 M in verschiedenen Gewebearten vertreten sind.^{18, 20, 21} Bei einer MRT werden Protonen von ihrem magnetischen Gleichgewichtszustand M_0 parallel oder antiparallel zu einem äußerlich

Einleitung

angelegten Magnetfeld B_0 ausgerichtet, wodurch eine vektorielle Gesamtmagnetisierung M parallel zu B_0 resultiert, präzidieren aber weiterhin um ihre eigene Achse (Larmorfrequenz). Wird das statische Magnetfeld entfernt, streben die ausgerichteten Kernspins M_0 an. Diese Relaxation setzt sich aus der Abnahme von longitudinaler (Spin-Gitter-Relaxation, T_1) sowie transversaler Magnetisierung (Spin-Spin-Relaxation, T_2) zusammen, die separat mit unterschiedlichen, gewebespezifischen Geschwindigkeiten ablaufen. Beide Prozesse können getrennt voneinander betrachtet werden, daher soll im Folgenden der Schwerpunkt auf die T_1 -Relaxation gelegt werden. Die Relaxation der Protonenspins zu M_0 bewirkt eine Änderung von M , wodurch gemäß der Faraday'schen Induktion ein Strom in eine umliegende Spule induziert wird.²² Die Spule funktioniert im Fall von MRT als Detektor für das auf diese Weise erzeugte MRT-Signal. Daraus ergibt sich ein Bild, dessen Kontrast auf einer unterschiedlichen Dichte von Protonen und den kontrastgebenden Gewebeeigenschaften beruht.^{17, 20, 23}

Um diesen Kontrast und damit das Auflösungsvermögen zu erhöhen, werden meist intravenös verschiedene Kontrastmittel eingesetzt. Diese paramagnetischen Substanzen erzeugen bei ihrer Diffusion in B_0 durch Brownsche Molekularbewegung fluktuierende Magnetfelder. Entsprechen diese Fluktuationen der Larmorfrequenz naher Protonen, treten die Kernspins in Wechselwirkung und beschleunigen so die T_1 -Relaxation der Protonen.²⁴ Der Parameter, der die Relaxation beschreibt, ist die Relaxivität r_1 , gegeben als reziprokes Produkt der Zeit und der Konzentration ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$). In den letzten 20 Jahren haben sich hauptsächlich Gd-basierte Kontrastmittel (GBCA) neben Mn-basierte Kontrastmittel oder FeO_2 -Nanopartikel (NP) in der klinischen Anwendung etabliert.^{19, 25, 26} Um das toxische Gd^{3+} *in vivo* anwenden zu können, ist eine Komplexierung mit einem geeigneten Chelator essenziell. Insbesondere der Gd-Komplex des Chelators 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1-4-7-10-tetraessigsäure (DOTA) **Gd-DOTA** (Dotarem, Clariscan) gilt als Goldstandard für Stabilität und Inertheit *in vivo*.^{18, 27, 28} In Abbildung 1-3 sind gängige kommerziell erhältliche GBCAs dargestellt.

Einleitung

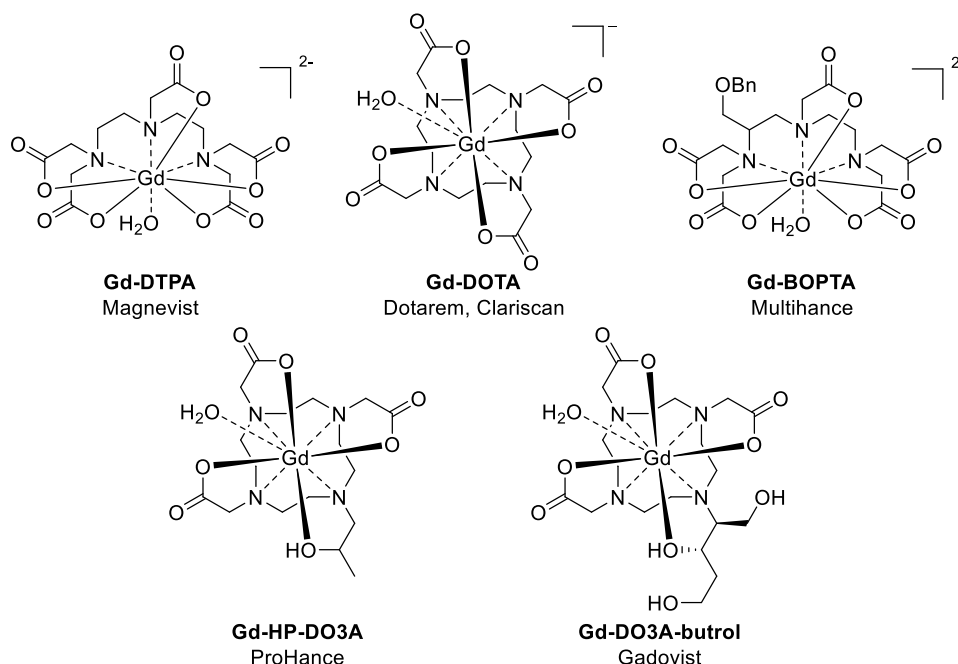


Abbildung 1-3 Strukturformeln der am häufigsten klinisch genutzten GBCAs.^{18, 19}

Durch die Komplexbildung mit entsprechenden Chelatoren sinkt zwar die Anzahl an Gd-koordiniertem Wasser und damit die Relaxivität, dies wird allerdings aufgrund der verminderten Toxizität toleriert. Die in Abbildung 1-3 gezeigten GBCAs unterscheiden sich strukturell stark, da die Relaxivität von verschiedenen Parametern abhängt, welche durch strukturelle Modifikation der Komplexe beeinflusst werden können.^{19, 25, 29, 30} Die Parameter sind der Abstand r_{Gd} zwischen Gd und Gd-koordiniertem H_2O , die Verweilzeit τ_{M} von H_2O in der inneren Koordinationssphäre (Abbildung 1-4, lila), die Diffusionszeit τ_{D} von H_2O der äußeren Koordinationssphäre (Abbildung 1-4, orange) sowie die Rotationszeit τ_{R} des gesamten Komplexes. Eine graphische Darstellung dieser Parameter am Beispiel von Gd-DOTA ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

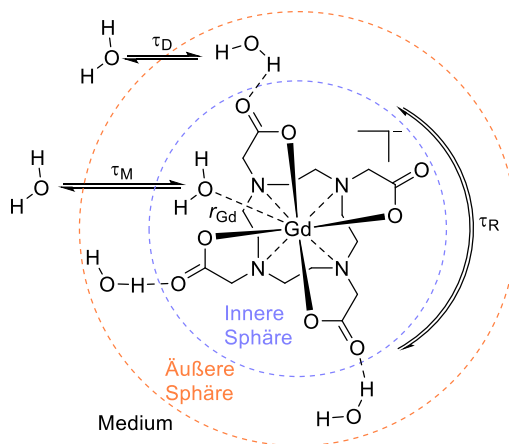


Abbildung 1-4 Parameter der Protonenrelaxation am Beispiel von **Gd-DOTA**. Die innere Sphäre ist lila, die äußere Sphäre in Orange dargestellt.¹⁸

Einleitung

Die Relaxivität r_1 entspricht damit der Summe aller Prozesse, die in der inneren und äußeren Sphäre ablaufen. Den größten Einfluss besitzen jedoch die Prozesse der inneren Koordinationssphäre (Abbildung 1-4, lila),²⁷ bei denen die Interaktion zwischen Gd^{3+} und H_2O direkt beteiligt ist. Gleichung (1-1) beschreibt die Relaxivität der inneren Koordinationssphäre r_{IS} in Abhängigkeit von der Anzahl gebundener Wassermoleküle q , dem Stoffmengenanteil P_M des Wassers, der Verweilzeit τ_M , der Relaxationsgeschwindigkeit T_{1m} sowie der Konzentration c .^{31, 32}

$$r_{IS} = \frac{q/P_Q}{T_{1m} + \tau_M} \times c \quad (1-1)$$

Für hohe Relaxivitäten sind also ein schneller Wasseraustausch sowie eine möglichst hohe Anzahl metallgebundener Wassermoleküle verantwortlich. Die Relaxationsgeschwindigkeit T_{1m} der direkt gebundenen Wassermoleküle ist ein Faktor der Relaxivität und kann näherungsweise durch einen Dipol-Dipol-Relaxationsmechanismus über die Solomon-Bloembergen-Morgan-Gleichungen beschrieben werden (Gleichung (1-2)).^{33, 34} Die Relaxationsgeschwindigkeit T_{1m} wird durch das gyromagnetische Verhältnis des Protons γ , den gyromagnetischen Faktor g , den elektromagnetischen Gesamtspin des Metallions S , das Bohrsche Magneton μ_B , den Abstand r_{Gd} zwischen Gd und Gd-koordiniertem H_2O , den Korrelationszeiten τ_C , der Larmorfrequenz des Protons ω_H , der Larmorfrequenz des Elektrons ω_S sowie der Rotationskorrelationszeit τ_R definiert.

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma^2 g^2 S(S+1) \mu_B^2}{r_{Gd}^6} \left[\frac{3\tau_{C1}}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} + \frac{7\tau_{C2}}{1 + \omega_S^2 \tau_C^2} \right] \quad (1-2)$$

Wie aus der Gleichung hervorgeht, fließt der Faktor r_{Gd} reziprok und exponentiell in die Relaxationsgeschwindigkeit T_{1m} und damit in die Relaxivität r_1 ein. Die Optimierung von Kontrastmittelrelaxivität ist also ein Faktor, welcher die Sensitivität von klinisch genutzten MRT-Methoden weiter erhöhen kann und so neue Anwendungsgebiete ermöglicht.

Zurzeit bleibt die MRT jedoch ein Standardverfahren der klinischen Radiologie, welches aufgrund moderater Sensitivität ausschließlich für die morphologische Diagnostik angewendet wird.

Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie

Im Gegensatz zu MRT und CT erlaubt die Sensitivität von SPECT die Markierung und Erforschung biochemischer Vorgänge und Veränderungen.^{35, 36} Dieses bildgebende Verfahren nutzt Radioisotope mit γ -Zerfallseigenschaften wie ^{99m}Tc ($t_{1/2} = 6.0 \text{ h}$) oder ^{111}In ($t_{1/2} = 2.8 \text{ d}$), deren Signal durch einen rotierenden Kollimator detektiert wird.^{17, 37} Anhand der Detektion eines Photons kann jedoch nicht dessen genauer Ursprungsort ermittelt werden. Dieser kann zwar über die gemittelten Werte des rotierenden Detektors rekonstruiert werden, allerdings nimmt dadurch das Auflösungsvermögen der Methode ab.¹⁷ Die hervorragende Sensitivität erlaubt beispielsweise die Untersuchung von kardiovaskulären Veränderungen.^{37, 38} Diese Eigenschaft macht SPECT zu einer wertvollen Methode der klinischen Diagnostik, um biochemische Prozesse zu untersuchen. Die Nachteile des Verfahrens sind neben der Kostenintensivität die limitierte Auflösung, die keine Bildgebung auf molekularer Ebene erlaubt.

Positronen-Emissionstomographie

Eine ähnlich sensitive Methode, welche jedoch höher aufgelöste Bilder liefert, ist die auf β^+ -strahlenden Radionukliden basierende PET. Dieses bildgebende Verfahren nutzt Positronen, die beim Aufeinandertreffen mit einem Elektron annihilieren. Bei diesem Prozess werden zwei hochenergetische Photonen (511 keV) in entgegengesetzte Richtungen emittiert.^{39, 40} Werden in einer umliegenden Detektorröhre zwei Photonen gleichzeitig von gegenüberliegenden Detektoren registriert, kann ihr Ursprung und damit die Position des Radionuklids rekonstruiert werden. Darin liegt auch die Quantifizierbarkeit dieser Methode begründet, da die gleichzeitige Detektion zweier Photonen dieser spezifischen Energie nur auf die Annihilation zurückzuführen ist. Somit sind Hintergrundsignale durch andere Photonenquellen ausgeschlossen. In Abbildung 1-5 ist das Prinzip der PET-Methode graphisch dargestellt. Das Positron emittierende Radionuklid (rot), die Annihilation (gelb) sowie das detektierte Photonenpaar (orange) sind farblich markiert.

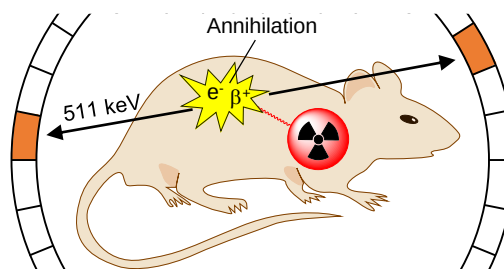
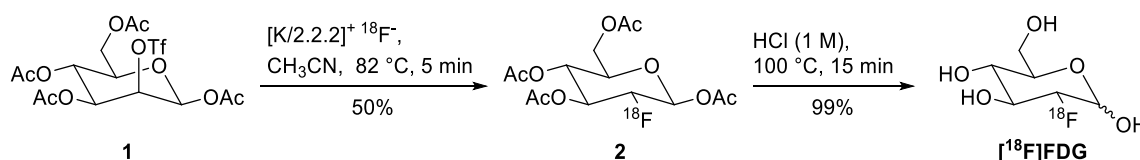


Abbildung 1-5 Graphische Darstellung der PET-Grundlagen. Das Radionuklid ist rot dargestellt. Die Annihilation ist farblich hinterlegt (gelb). Das detektierte Signal auf dem Detektor ist orange markiert.³⁹

Einleitung

Dieses bildgebende Verfahren ist innerhalb der letzten drei Dekaden zu einem Standardwerkzeug der klinischen Diagnostik und Forschung geworden.⁴¹⁻⁴⁴ Grundsätzlich basiert die Methode auf der Wahl eines geeigneten β -Strahlers, dessen Produktion sowie auf dem Labeling einer Substanz mit besagtem Radionuklid.⁴⁵ Das mit Abstand meist genutzte Radionuklid ist ^{18}F als Bestandteil des Glucosemimetikums 2-Fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG),^{46, 47} welches aufgrund des erhöhten Glucosemetabolismus von Krebszellen für deren radioaktive Markierung genutzt werden kann.^{45, 48} Obwohl der Einsatz von FDG ein Standardverfahren ist, stellt es im klinischen Alltag eine Herausforderung dar, weil das Radionuklid sowie die $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Synthese aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ^{18}F ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$) vor Ort oder in unmittelbarer Nähe realisiert werden muss. Dafür sind spezielle Räumlichkeiten und kostenintensives Equipment essenziell.⁴³ Zunächst muss ^{18}F durch eine Kernreaktion von ^{18}O und ^{19}F in einem Zyklotron gewonnen werden.⁴⁵ Anschließend reagiert dieses Fluorid in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit dem Mannosetriplat **1**. Die Form der Fluoridquelle unterscheidet sich dabei und ist abhängig von der abschließenden Reinigungsmethode. Als Standard hat sich die Synthese nach Hamacher *et al.* mit dem Aminopolyether Kryptofix [2.2.2] ($[\text{K}/2.2.2]^+$) durchgesetzt.^{47, 49} Die anschließende saure Hydrolyse der Acetylreste liefert das Glucosemimetikum $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ in einer chemischen Gesamtausbeute von 50% (Schema 1-1).^{50, 51}



Schema 1-1 Synthese des Glucosemimetikums $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ aus dem Mannosederivat **1**.⁵¹

Automatisierte Methoden dieses Verfahrens ermöglichen die Darstellung des radiomarkierten FDG innerhalb von 30 min in klinisch akzeptabler Reinheit.⁴⁷ Voraussetzung der klinischen Anwendung ist jedoch, dass geeignete Synthese- und Isotopenlabore vorhanden sind, da die Halbwertszeit keine längeren Transporte von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ erlaubt.

Eine Alternative zu kovalent verknüpften Radiomarkierungen bieten Radiometalle,⁵² die analog zu MRT-Anwendungen durch passende Chelatoren komplexiert werden müssen. Ein häufig verwendetes Radiometall ist ^{68}Ga ($t_{1/2} = 67.6 \text{ min}$),⁵³ welches im Gegensatz zu ^{18}F nicht in einem Zyklotron erzeugt werden muss, sondern aus einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator eluiert und direkt für die Synthese verwendet werden kann.⁴³ Die Synthese ist ein weiterer Vorteil metallbasierter PET-Diagnostik, da die Komplexbildung in wässrigem Medium innerhalb weniger Minuten quantitativ erfolgt. Ein Beispiel für diese Anwendung ist das

Einleitung

Radiopharmakon ^{68}Ga -DOTATOC (Abbildung 1-6),⁵⁴ welches für die Markierung des Somatostatinrezeptors genutzt wird.^{55, 56}

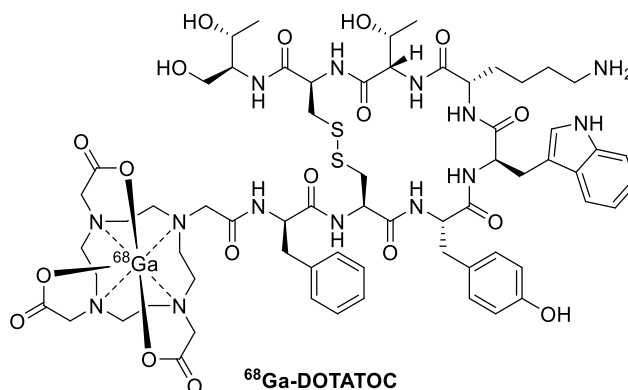


Abbildung 1-6 Radiomarkiertes Edotreotid ^{68}Ga -DOTATOC.⁵⁴

Die klinische Etablierung von ^{68}Ga -DOTATOC und dessen Derivat ^{68}Ga -DOTATATE lösten in der Forschung den Trend aus, sich auch mit anderen Radiometallen wie ^{64}Cu ($t_{1/2} = 12.7$ h) oder ^{89}Zr ($t_{1/2} = 78.5$ h) zu beschäftigen.^{44, 52, 53, 55} Grund dafür ist die Modularität der Markierungsmethode gegenüber kovalent gebundenen Radiomarkern.^{45, 52} Unter Berücksichtigung der Anwendung stehen auf diese Weise eine Reihe Radionuklide mit verschiedenen Halbwertszeiten zur Verfügung.

Aufgrund der Kostenintensität und hohen Strahlenbelastung für den Patienten ist PET eine Diagnostikmethode der zweiten Reihe im klinischen Alltag, die sich durch die exzellente Sensitivität, der Quantifizierbarkeit der Methode und die Modularität durch den Einsatz verschiedener Radionuklide auszeichnet. Wegen dieser Eigenschaften ist die PET-Diagnostik eine der am häufigsten angewandten Methoden in der Krebsforschung, um biochemische Veränderungen zu untersuchen.^{44, 45, 47, 52, 55, 57}

Optische Bildgebung

Das bildgebende Verfahren mit der höchsten Sensitivität und Auflösung ist die optische Bildgebung, bei der Prozesse auf molekularer Ebene dargestellt werden können.^{17, 58} Die Methode ist jedoch durch die Lichtstreuung, die Lichtabsorption und die Autofluoreszenz des Gewebes limitiert, sodass keine Diagnostik tiefliegender Organe möglich ist. Daher wurden in den letzten Jahren viele Ansätze verfolgt, um die detektierbare Gewebetiefe durch den Einsatz von Fluoreszenzstrahlung im NIR-Bereich (700 nm – 900 nm) zu erhöhen.⁵⁹⁻⁶¹ Im Fokus der Forschung stehen unter anderem NIR-Farbstoffe,⁶² Nanocluster und Ln-Komplexe mit außergewöhnlichen optischen Eigenschaften.^{58, 61, 63-65}

Trotz der exzellenten Sensitivität und der niedrigen Kostenintensität ist die optische Bildgebung eine Methode, die aufgrund der limitierten Gewebepenetration mehrheitlich in der Forschung und kaum in der Klinik Anwendung findet.^{17, 66, 67} Abseits der Diagnostik wird die optische Bildgebung jedoch für fluoreszenzgestützte Chirurgie und Endoskopie verwendet.^{68, 69}

1.2 Tumor-Targeting

Für eine erfolgreiche Früherkennung von Krebs stehen diverse sensitive Detektionsmethoden zur Verfügung, welche sich hinsichtlich ihres Anwendungsbereiches und der Kostenintensität stark unterscheiden. Die zuvor diskutierten bildgebenden Verfahren sind mit ihren Eigenschaften in Tabelle 1-1 zusammengefasst.

Tabelle 1-1 Übersicht aktueller diagnostischer Methoden mit entsprechenden Parametern.^{17, 70, 71}

Methoden	Zeit	Sensitivität	Kosten	Signal	Signalgebendes Agens
	Auflösung	(M)			
CT	min	ND	€€	γ	I ₂
MRT	min-h	10 ⁻³ - 10 ⁻⁵	€€€	T ₁	Gd ³⁺
PET	s-min	10 ⁻¹¹ - 10 ⁻¹²	€€€	β^+	⁶⁴ Cu (t _{1/2} = 12.7 h) ¹⁸ F (t _{1/2} = 110 min) ⁶⁸ Ga ³⁺ (t _{1/2} = 67.6 min) ⁸⁹ Zr ⁴⁺ (t _{1/2} = 78.5 h)
SPECT	min	10 ⁻¹⁰ - 10 ⁻¹¹	€€	γ	¹¹¹ In (t _{1/2} = 67.9 d) ^{99m} Tc (t _{1/2} = 6.0 h) ⁹⁰ Y (t _{1/2} = 64.1 h)
NIR	s-min	10 ⁻⁹ - 10 ⁻¹²	€	$\Delta\lambda$	NIR-Farbstoff Ln ³⁺

Die frühestmögliche Identifizierung einer Krebserkrankung ist die Diagnostik auf zellulärer Ebene, für die nicht nur eine Detektionsmethode mit ausreichender Sensitivität (10⁻¹² M), sondern auch die Differenzierung zwischen einer gesunden und einer malignen Zelle essenziell ist. Eine Möglichkeit ist die Unterscheidung anhand der extrazellulären Matrix (ECM), da Krebszellen, im Gegensatz zu gesunden Zellen, bestimmte Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exklusiv exprimieren oder überexprimieren (Abbildung 1-7).^{72, 73} Nach der Identifikation eines Tumor-spezifischen Rezeptors (Target) können bildgebende Substanzen entwickelt werden, die das Target gezielt adressieren.⁷³ Diese Markierung auf zellulärer Ebene durch Targeting-Tracer wird als Tumor-Targeting bezeichnet (Abbildung 1-7).⁷⁴⁻⁷⁶

Einleitung

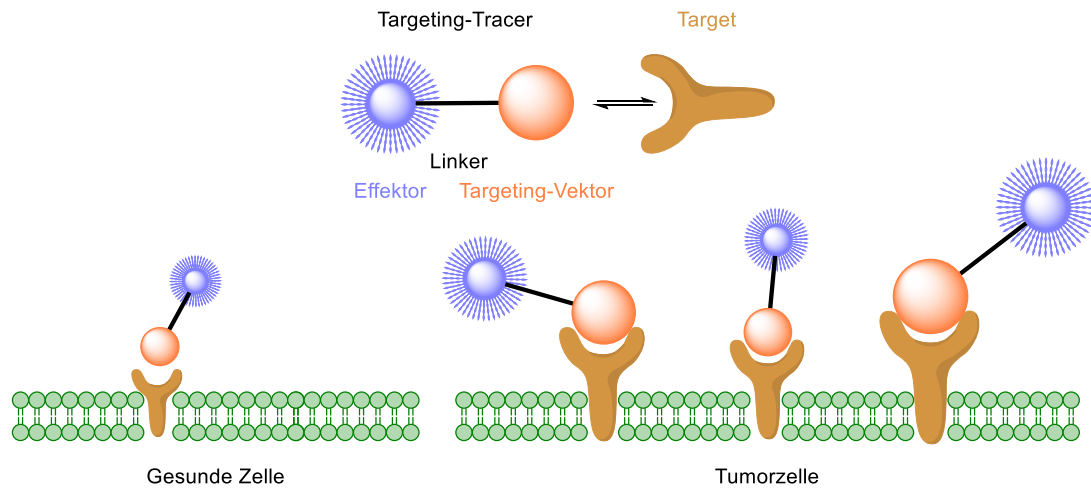


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung eines Targeting-Tracers und dessen Anwendung beim Tumor-Targeting zur Differenzierung von gesunden und Krebszellen.⁷⁴

Das Design eines Targeting-Tracers beruht auf drei Säulen und ist in Abbildung 1-7 graphisch dargestellt: (1) Der Targeting-Vektor (Abbildung 1-7, orange), der mit hoher Spezifität und ausreichender Affinität an ein Target (Abbildung 1-7, braun) bindet. (2) Ein Linker (Abbildung 1-7, schwarz), der Effektor und Targeting-Vektor räumlich voneinander trennt, sodass die Bindungseigenschaften nicht von einer Wechselwirkung der beiden Bausteine beeinflusst wird. (3) Das Effektormolekül (Abbildung 1-7, lila), welches je nach diagnostischer Methode ein detektierbares Signal emittiert. Beispiele dafür sind die bereits diskutierten Substanzen [^{18}F]FDG (Schema 1-1) und ^{68}Ga -DOTATOC (Abbildung 1-6).

1.2.1 Target und Targeting-Vektor

Für das Design und die Entwicklung eines Targeting-Tracers muss zunächst ein Target bekannt sein, dass von den Zellen der entsprechenden Tumorart exprimiert wird.⁷² Diverse tumorspezifische Rezeptoren sind bereits bekannt,^{73, 76} welche unter anderem zentrale Aufgaben des Zellwachstums oder des Metabolismus steuern.^{14, 77, 78} Für das Design der Targeting-Tracer können verschiedene Strategien verfolgt werden, um neben spezifischer Adressierung der identifizierten Targets auch *in vivo*-Stabilität, ausreichende Target-Retention sowie eine vorteilhafte Pharmakokinetik zu gewährleisten.^{76, 79} Die verschiedenen Ansätze können anhand der Größe und Molekulgewichte kategorisiert werden, und sind in Abbildung 1-8 graphisch dargestellt.

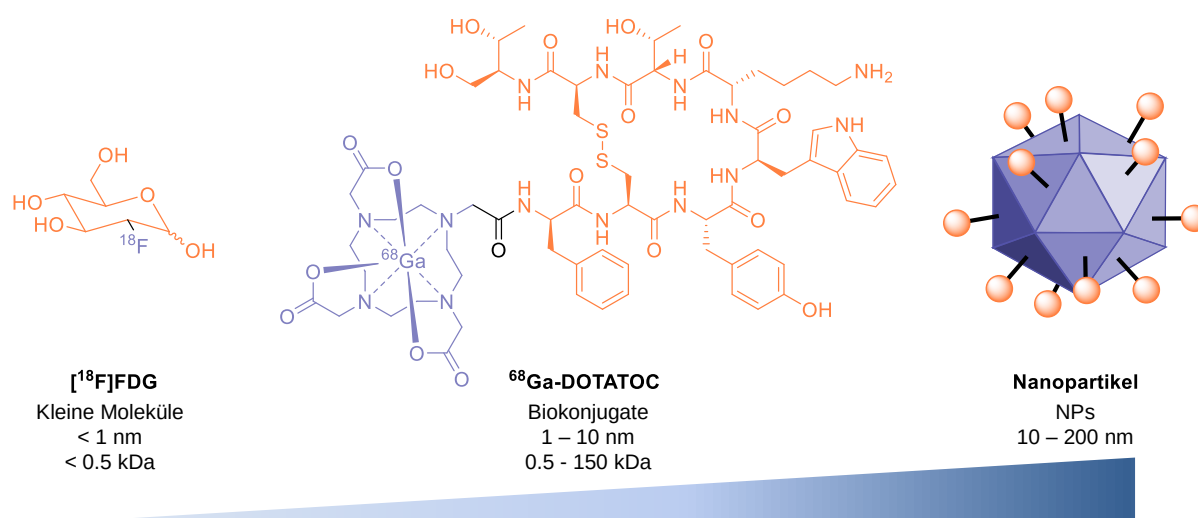


Abbildung 1-8 Beispiele für verschiedene Ansätze von Targeting-Vektoren (orange) mit Linker (schwarz) und Effektor (lila), mit Größen- und Gewichtsreich.^{51, 54, 62}

Ein Ansatz sind kleine Moleküle, die strukturell auf dem natürlichen rezeptorspezifischen Bindungsmotiv basieren,^{75, 80} wodurch die Mimetika ähnliche Pharmakokinetik, sowie Rezeptoraffinität und -spezifität besitzen. Der Nachteil dieser Strategie ist, dass Entwicklung und Evaluation dieser Moleküle langwierige Prozesse sind, welche jedoch durch computergestütztes Moleküldesign beschleunigt werden können.^{17, 75} Des Weiteren können Effektormoleküle aufgrund des geringen Molekulargewichtes die Pharmakokinetik signifikant beeinflussen.¹⁷

Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz von Biomolekülen wie Peptiden,^{73, 81, 82} Aptameren^{83, 84} oder Antikörpern^{85, 86} als Targeting-Vektoren, die sich durch eine hohe Target-Spezifität und Affinität auszeichnen.^{72, 73, 75, 76, 87, 88} Peptidische Biokonjugate sind häufig verwendete Targeting-Vektoren, da mittels Peptidfestphasensynthese Molekülbibliotheken synthetisiert werden können.^{82, 89} Der größte Nachteil peptidbasierter Targeting-Vektoren ist die

Einleitung

proteolytisch limitierte Halbwertszeit *in vivo*.¹⁷ Aptamere und monoklonale Antikörper (mAb) zeigen im Vergleich zu peptidischen Sequenzen höhere Target-Affinitäten,^{17, 72, 90} besitzen jedoch den Nachteil, dass sie wegen der Größe (mAbs) und Ladung (Aptamere) teilweise nicht mehr von den adressierten Rezeptoren internalisiert werden.^{17, 84} Durch die hohe Spezifität und Affinität finden Aptamere und Antikörper jedoch Anwendung in Verbindung mit Nanopartikeln als Multimerisierungsplattform.^{15, 91, 92} Im Folgenden soll anhand prominenter Beispiele die Identifizierung sowie die Adressierung von geeigneten Targets erläutert werden.

Integrin-Targeting

Integrine gehören zur Familie der heterodimeren Transmembranrezeptoren, die an der Zelladhäsion und bidirektionalen Signaltransduktion beteiligt sind.⁹³⁻⁹⁶ Je nach ihrer Rolle bilden eine von 18 α - und 8 β -Untereinheiten 24 verschiedene Integrine mit jeweils mehreren Aktivierungszuständen,⁹⁷ heterogener Glykosylierung und, in einigen Fällen, alternativer Spleißvarianten.⁹⁴ Tumorzellen nutzen Integrine, um die Entstehung, die Entwicklung und die Metastasierung fester Tumore zu fördern.^{93, 98, 99} Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in allen Stadien verschiedener Krebsarten,^{93, 94} stadienkorrelierender Überexpression in der ECM und hohen Rezeptorspezifität,^{93, 100} sind Integrine zu einem intensiv erforschten Thema für zielgerichtete diagnostische und therapeutische Anwendung geworden.^{98, 101} Im Gegensatz zu der komplizierten Struktur können Integrine durch relativ einfache kleine Moleküle spezifisch adressiert werden. Die häufigste Bindungssequenz ist das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD, Abbildung 1-9, blau).

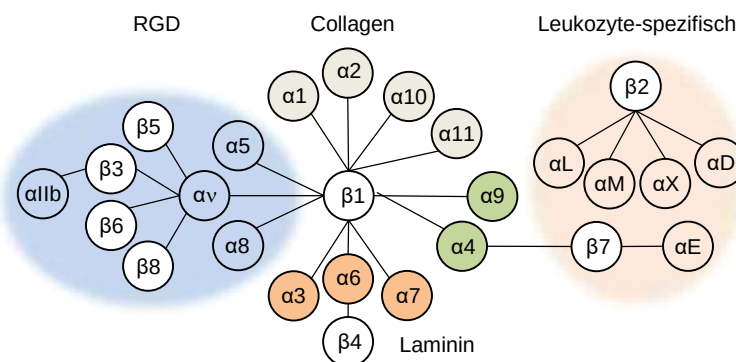


Abbildung 1-9 Schematische Übersicht der Integrinfamilie. Alle 24 verschiedenen Säugetierintegrine (mit Ausnahme der grün markierten Untereinheiten) werden nach ihrer Ligandenspezifität (blau - RGD, grau - Kollagen, orange - Laminin) kategorisiert. Rezeptoren, die $\beta 2$ oder $\beta 7$ enthalten, werden ausschließlich auf Leukozyten exprimiert.^{94, 97}

Seit der Etablierung von RGD als Bindungsmotiv wurde es in vielen natürlichen Bindungsliganden identifiziert.^{78, 102, 103} Durch diese artifiziellen Bindungsepitope können ganze Integrin-Unterfamilien mit hoher Selektivität adressiert werden (Abbildung 1-9, blau).^{95, 99, 101} Strukturelle Modifikationen, wie die Einführung einer D-Aminosäure und die

Cyclisierung der RGD-Sequenz (cRGD), führen zu einer signifikanten Steigerung der Affinität und *in vivo*-Stabilität.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Eine weitere bekannte Methode zur Maximierung der Tumorretention ist der Einsatz multimerer Systeme des Targeting-Vektors cRGD.^{82, 107, 108}

Wegen der Möglichkeit, verschiedene gewebe- und Tumorstadium-spezifische Integrine durch kleinste Veränderungen der Peptidsequenz mit hoher Selektivität und Affinität zu adressieren, etablierten sich cRGD-Sequenzen im Tumor-Targeting als häufig verwendete Targeting-Vektoren von Biokonjugaten.^{78, 82}

Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA)

Prostatakarzinome hatten die zweithöchste Inzidenz aller Krebserkrankungen bei Männern mit weltweit 1.3 Millionen Neuerkrankungen und 360.000 Todesfällen im Jahr 2019.^{1, 4} In diesem Zusammenhang ist das Membranprotein PSMA das vielversprechendste Target für zielgerichtete Diagnostik von Prostatakrebs, da es von Tumorzellen signifikant überexprimiert wird.^{75, 77, 109-111} Ein wichtiger Schritt für das Targeting von Prostatakrebs war die Isolierung einer Lymphknotenkrebs-Zelllinie der Prostata (LNCaP) von Horoszewicz *et al.*¹¹² in den frühen 1980er Jahren. Fast zwei Jahrzehnte später belegten Heston *et al.*¹¹³ die hervorragenden Targeting-Eigenschaften der Zinkpeptidase PSMA. Die PSMA-exprimierende (PSMA(+)) Krebszelllinie LNCaP bildet zusammen mit der nicht-PSMA-exprimierenden (PSMA(-)) Zelllinie PC-3 das Standardtestsystem für die *in vitro* und *in vivo* Evaluation.^{114, 115}

Da PSMA eine Zinkprotease ist, die für die Spaltung von poly- γ -Glu zuständig ist,^{116, 117} imitieren viele PSMA-Inhibitoren dieses Strukturmotiv mit zinkaffinen funktionellen Gruppen wie Thiole,¹¹⁸ Phosphonate^{119, 120} oder Phosphinate.^{116, 121-123} Darüber hinaus wurden PSMA-Inhibitoren auf Harnstoffbasis entwickelt,¹²⁴ die bereits in klinischen Studien untersucht wurden.^{75, 125-130} Beispiele dieser zielgerichteten Strategie mit kleinen Molekülen als Targeting-Vektoren sind der harnstoffbasierte Radio-Tracer ⁶⁸Ga-PSMA-617 und das Phosphinsäure-basierte NIR-Fluorophor **3**,^{122, 129} die in Abbildung 1-10 dargestellt sind.

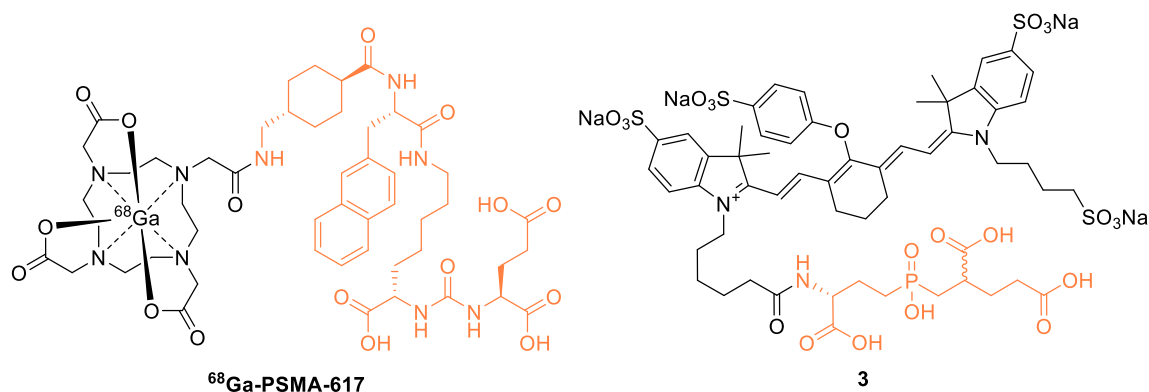


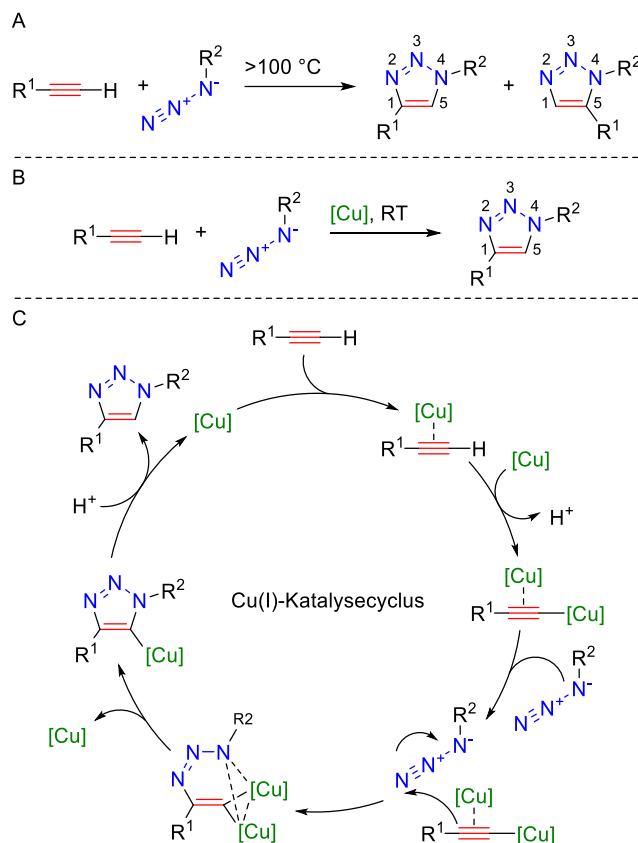
Abbildung 1-10 Beispiele für kleine Moleküle als Targeting-Vektoren für zielgerichtete Tumordiagnostik. Der Targeting-Vektor ist farblich markiert (orange).^{54, 122}

1.2.2 Linker-Einheit

Die Verbindung von Targeting-Vektor und Effektormolekül mit einer Linker-Einheit ist einerseits essenziell, um sekundäre Wechselwirkungen zwischen den beiden Bausteinen zu vermeiden, andererseits ist die Art der Konjugation ein kritischer Punkt in der Synthese von vielen Targeting-Tracern. Die Anforderung an die Reaktion ist, dass meist hochfunktionale (Bio-) Moleküle in kurzer Reaktionszeit unter milden Bedingungen in hohen Ausbeuten miteinander verknüpft werden.¹³¹⁻¹³⁴ Diese Anforderungen werden vor allem von Peptidkupplung und Reaktionen der sogenannten Click-Chemie erfüllt.^{71, 134, 135} Insbesondere für kleine Moleküle oder Biokonjugate mit peptidischen Targeting-Vektoren eignet sich die Peptidkupplung, da sich die Synthese *via* Festphasensynthese durchführen lässt.^{129, 136} Allerdings ist bei der Peptidchemie zu beachten, dass die aktivierten Carbonsäuren oft nur eine geringe Selektivität gegenüber verschiedener Nukleophile haben. Eine regiospezifische Konjugation von Effektor und Biomolekülen kann sich daher als Herausforderung darstellen.¹³⁷ Des Weiteren unterliegen die auf diese Weise geknüpften Peptidbindungen den gleichen enzymatischen Abbaumechanismen wie alle peptidbasierten Biomoleküle, sodass eine Spaltung von Effektor und Targeting-Vektor *in vivo* nicht ausgeschlossen werden kann.^{134, 138} Eine Alternative zur peptidischen Verknüpfung bietet die bereits erwähnte Click-Chemie. Der Begriff bezeichnet nach der Definition von Sharpless *et al.* eine Sammlung verschiedener modularer Reaktionen, die chemoselektiv, stereo- und regiospezifisch Produkte unter milden Bedingungen in hohen Ausbeuten liefern.¹³⁹ Beispiele für diese Reaktionen sind die Thiol-En-Click-Reaktion, die Diels-Alder-Reaktion sowie die 1,3-dipolare Cycloaddition.^{137, 139, 140} Der Begriff ist jedoch im Laufe der Zeit zu einem Synonym der Cu-katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) geworden, seit sie von Rostovtsev *et al.* und Tornøe *et al.* unabhängig entwickelt wurde.^{62, 141, 142} Die Cu-katalysierte Variante liefert im Gegensatz zur

Einleitung

ursprünglichen Huisgen-Reaktion¹⁴³ (Schema 1-2, A) regiospezifisch 1,4-substituierte 1,2,3-Triazole bei Raumtemperatur (Schema 1-2, B). Der exakte Reaktionsmechanismus wurde erst 10 Jahre nach der Entwicklung der Reaktion abschließend aufgeklärt und ist in Schema 1-2 (C) vereinfacht dargestellt.¹⁴⁴



Schema 1-2 Darstellung verschiedener 1,3-dipolarer Cycloadditionen. (A) Huisgen-Reaktion. (B) Cu-katalysierte und regiospezifische Variante mit milderen Reaktionsbedingungen. (C) Katalysezyklus der CuAAC.^{144, 145}

Der Grund für die häufige Anwendung der Reaktion sind die geringen Reaktionszeiten, die milden Reaktionsbedingungen sowie die hohe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen.^{132, 145, 146} Durch den Einsatz von Cu(I)-stabilisierenden Liganden und Natrium-ascorbat (NaAsc) als Reduktionsmittel kann die Reaktion sogar ohne Schutzgasatmosphäre in wässrigem Medium durchgeführt werden.^{147, 148} Zusätzlich sind sowohl terminale Alkine und Azide als auch Triazole bioorthogonal,¹⁴⁹ da diese Funktionalitäten in biologischen Systemen inert sind.¹⁵⁰ Ein weiterer Vorteil der Konjugation von Effektoren und Targeting-Vektoren mittels CuAAC ist die Ähnlichkeit, die 1,2,3-Triazole und Peptidbindungen in Bezug auf Polarität und Bindungslänge besitzen.^{134, 138} Diese Eigenschaften zeichnen die CuAAC als ideale Methode aus, die den konvergenten Aufbau von Targeting-Tracern ermöglicht. Insbesondere bei der Konjugation von Peptiden,¹⁵¹ Proteinen oder Aptameren als Targeting-Vektoren findet diese Methode breite Anwendung.^{134, 137, 149, 152}

1.2.3 Effektor

Die Wahl des Effektormoleküls wird durch die bereits vorgestellten Detektionsmethoden determiniert. Abhängig von der Strategie des Targeting-Tracers kann der Effektor bei kleinen Molekülen direkt und kovalent in das Molekül eingeführt werden, oder nachträglich über die bekannten Konjugationsmethoden mit einem Biokonjugat verknüpft werden.^{73, 80} Nanopartikel können gleichzeitig als Multimerisierungsplattform für Targeting-Vektoren, und Aufgrund ihrer besonderen magnetischen und optischen Eigenschaften als Effektor dienen.^{15, 153, 154} Die verschiedenen Ansätze wurden bereits in Abbildung 1-8 vorgestellt.

Einen modularen Ansatz ermöglichen die bifunktionale Chelatoren (BFC), die neben der Komplexierung verschiedener klinisch relevanter Metallionen auch eine Verknüpfung mit einem Targeting-Vektor erlauben, ohne die komplexbildende Eigenschaften zu verlieren, und auf diese Weise Tumor-Targeting mit allen metallbasierten Detektionsmethoden wie PET, SPECT, MRT oder NIR ermöglichen.¹⁵⁵ Allgemeine Anforderungen an BFC-basierte Targeting-Tracer für bildgebende Verfahren sind hohe Zielselektivität und -affinität, günstige Pharmakokinetik und hervorragende Komplexstabilität *in vivo*. In diesem Zusammenhang sind der Makrocyclus DOTA und darauf basierende Derivate vielseitig für eine Reihe klinisch relevanter Metallkationen einsetzbar und wurden umfangreich untersucht (Abbildung 1-3, **Gd-DOTA**; Abbildung 1-6, **⁶⁸Ga-DOTATOC**; Abbildung 1-10, **⁶⁸Ga-PSMA-617**).^{53, 70, 156} Daher werden DOTA-Biokonjugate derzeit intensiv als Targeting-Tracer für Anwendungen in PET,⁵⁷ SPECT,⁴⁴ MRT und Strahlentherapie verwendet.^{19, 71}

1.3 Anwendung und Eigenschaften des Chelators DOTA

Seit der ersten Synthese von Stetter und Frank 1976 hat der Chelator **DOTA** einen signifikanten Einfluss auf metallbasierte bildgebende Verfahren genommen.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Bryden *et al.* publizierte 1981 erste Ln-Komplexe von DOTA,²⁴ deren Kristallstrukturen,^{26, 160} chemische sowie physikalische Eigenschaften in den folgenden Jahren intensiv erforscht wurden.^{161, 162} Dabei zeigte **DOTA** aufgrund des makrocyclischen Effektes und der Käfigstruktur der Chelate ausgezeichnete Komplexstabilität und -inertheit.^{19, 53, 163} Nach ersten erfolgreichen Anwendungen von **Gd-DOTA** für MRT, in dessen Folge es sich zum Goldstandard für GBCAs entwickelte (1.1 Bildgebende Verfahren),¹⁵⁷ wurde der Chelator 1990 auch für zielgerichtete SPECT- und später auch PET-Anwendungen¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ genutzt.

Einleitung

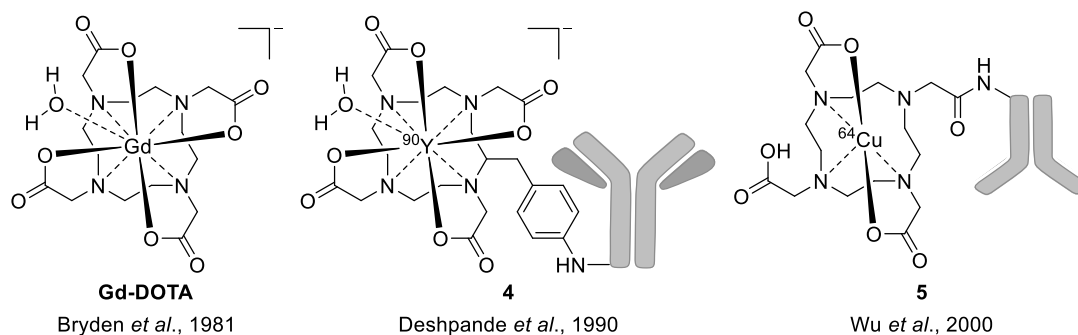


Abbildung 1-11 Beispiele der ersten Anwendungen verschiedener DOTA-Derivate in metallbasierten bildgebenden Verfahren.^{24, 164, 166}

Im Gegensatz zur MRT, bei der **Gd-DOTA** als Kontrastmittel eingesetzt wird, muss DOTA für den Einsatz als Effektormolekül in einem zielgerichteten Tumor-Tracer, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, über einen Linker mit einem Targeting-Vektor verknüpft werden. Grundsätzlich gibt es verschiedene Ansätze, um modifizierbare DOTA-Derivate zu erhalten. In Abbildung 1-12 sind verschiedene Strategien beschrieben und farblich gekennzeichnet. Eine Möglichkeit ist die Peptidkupplung über eines der vier Carboxylate des Chelators (Abbildung 1-12, blau, **p-SCN-Bn-DOTA, 6**), was die Koordinationssphäre in Komplexen des Chelators verändert. Wenn die Peptidkupplung nicht direkt an den Targeting-Vektor erfolgt, können wie in den gezeigten Beispielen Funktionalitäten eingeführt werden, die eine Verknüpfung von Chelator und Targeting-Vektor mittels Click-Chemie ermöglichen. Andere Strategien sind die Seitenkettensubstitution (Abbildung 1-12, rot) und die Ringsubstitution (Abbildung 1-12, grün), die zwar keinen Einfluss auf die Koordinationssphäre haben, aber die Komplexgeometrie beeinflussen.

Einleitung

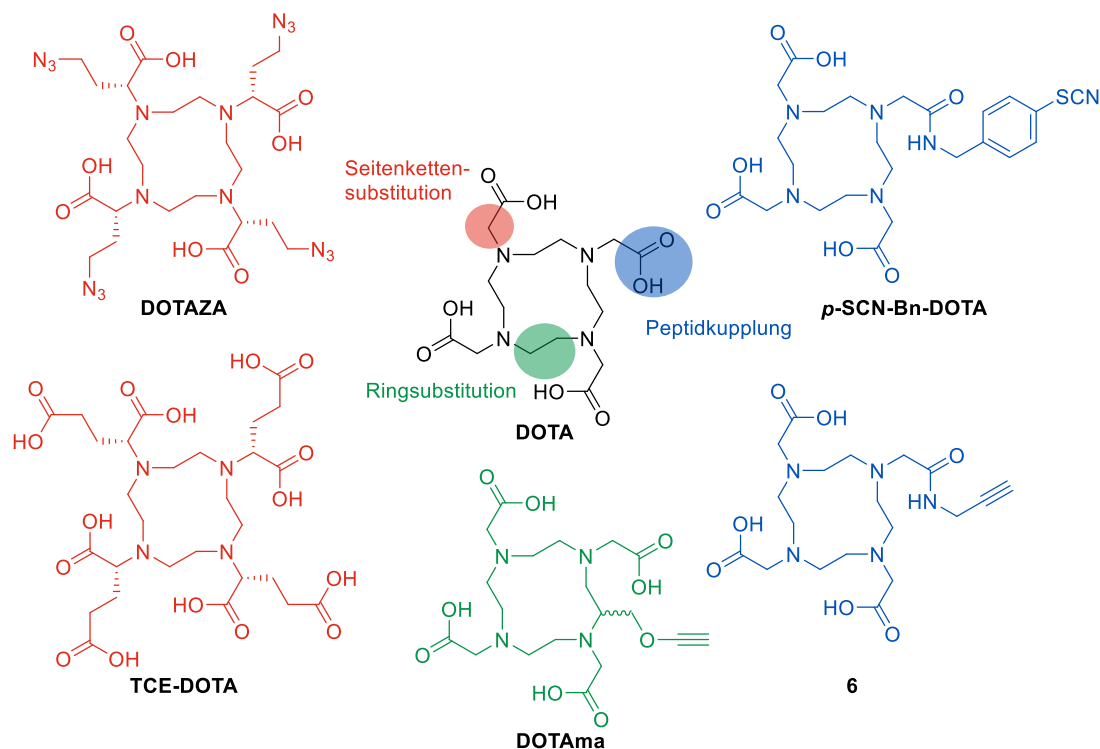
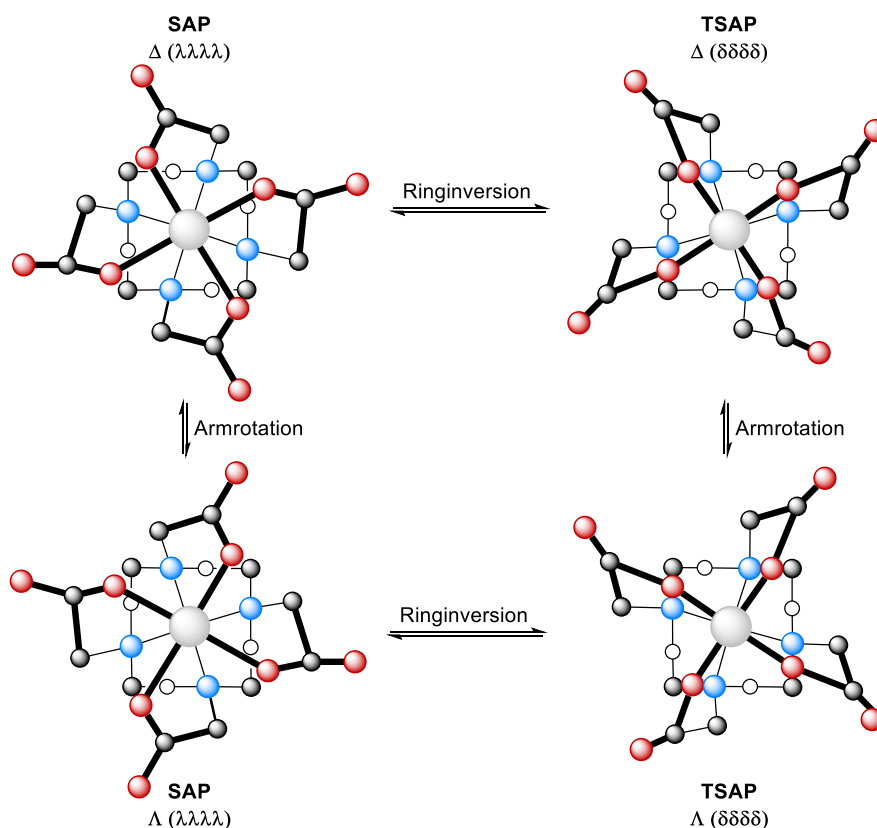


Abbildung 1-12 Verschiedene DOTA-Derivate mit farblich gekennzeichneten Modifizierungsmöglichkeiten.^{19, 24, 53, 164, 166}

Bei den zuvor beschriebenen Targeting-Tracern ^{68}Ga -DOTATOC und ^{68}Ga -PSMA-617 ist der radioaktiv markierte Ga-DOTA-Komplex mittels Peptidkupplung mit dem Targeting-Vektor verknüpft. Dies hat zur Folge, dass eines der vier Carboxylate nicht mehr für die Koordination des Metallions zur Verfügung steht, wodurch die Komplexstabilität signifikant sinkt.^{40, 167} Der Effekt ist für dreiwertige hexadentate Metallionen mit relativ kleinen Ionenradien wie Ga^{3+} gering, sodass es eine Anwendung *in vivo* möglich ist.⁴⁰ Dies gilt nicht für Metallionen höherer Koordinationszahlen wie Ln oder das als PET-Metall der Zukunft gehandelte vierwertige ^{89}Zr .^{28, 168, 169} Sowohl die Seitenkettensubstitution (Abbildung 1-12, rot) als auch die Ringsubstitution (Abbildung 1-12, grün) erhalten die octadentate Koordinationssphäre, haben aber signifikanten Einfluss auf die Komplexgeometrie,^{170, 171} da DOTA-Komplexe in Lösung durch Ringinversion und Armrotation in einem dynamischen Gleichgewicht aus Konformationsisomeren vorliegen.^{19, 172, 173} Das Gleichgewicht der Konformere ist in Schema 1-3 dargestellt. Die Seitenkettensubstitution kann dabei die Armrotation beeinflussen und sogar verhindern.¹⁷⁴ Analog dazu kann die Substitution des Makrocyclus eine Ringinversion unterdrücken.²⁹

Einleitung



Schema 1-3 Gleichgewicht der Konformere eines DOTA-Metallkomplexes in Lösung. Das Metallion (grau), der Kohlenstoff (schwarz), der Stickstoff (blau) sowie der Sauerstoff (rot) sind farblich gekennzeichnet. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Kriemen *et al.* angefertigt.¹⁷²

Die Rigidität, die durch Ring- und Seitenkettensubstitution erreicht wird, führt zu einer extremen Inertheit entsprechender Ln-Komplexe und kann für bestimmte MRT-Anwendungen wünschenswert sein.^{29, 170, 175} Allerdings ist die selektive Ringsubstitution synthetisch anspruchsvoll, und führt im Vergleich zu nicht-ringsubstituierten DOTA-Derivaten zu längeren Reaktionszeiten und hohen Reaktionstemperaturen bei der abschließenden Metallkomplexierung,^{171, 172, 175, 176} was einen Einsatz mit Biomolekülen als Targeting-Vektor erschwerte. Ein vielversprechender Ansatz ist die Seitenkettensubstitution, da die Koordinationssphäre und Komplexbildungseigenschaften auch bei mehrfacher Substitution erhalten bleiben.^{172, 177} In Abbildung 1-12 ist der Ansatz durch die Chelatoren **DOTAZA** und **TCE-DOTA** repräsentiert.^{167, 178} Durch Mehrfachsubstitution können z.B. Bindungseigenschaften des BFCs durch Multimerisierung von Targeting-Vektoren signifikant erhöht werden. Die Multimerisierung ist sowohl für Integrin-^{82, 179-181} als auch für PSMA-Targeting^{122, 182, 183} ein bekanntes Konzept. Des Weiteren ermöglicht der Ansatz Modifikationen der Seitenkette, welche die Pharmakokinetik signifikant beeinflussen. In Abbildung 1-13 sind seitenkettensubstituierte Derivate des Chelators **DOTA** dargestellt, die mittels Click-Chemie weiter modifiziert wurden.

Einleitung

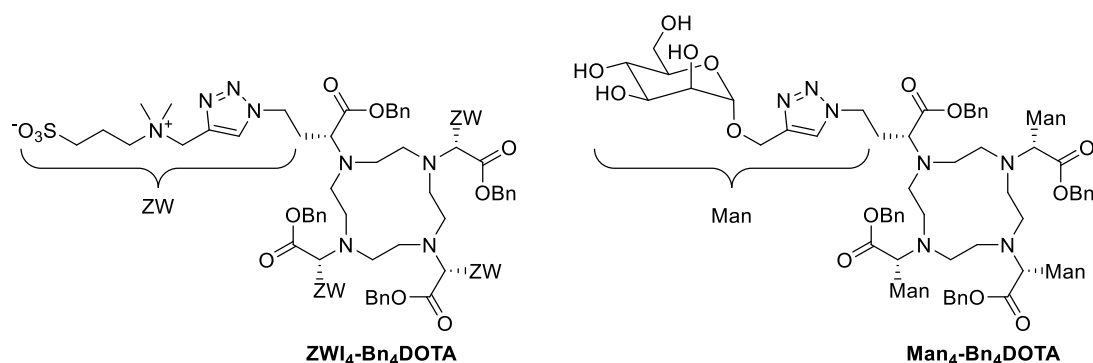


Abbildung 1-13 Mittels Click-Chemie modifizierte Derivate des Chelators **DOTAZA**.^{167, 184}

Das Beispiel **ZWI₄-Bn₄DOTA** verdeutlicht, wie mittels Click-Chemie eingeführte Modifikationen die Pharmakokinetik beeinflussen können. Die zwitterionischen Reste von **ZWI₄-Bn₄DOTA** reduzieren die sekundären Wechselwirkungen *in vivo*,^{185, 186} was zum einen die renale Ausscheidung beschleunigt, zum anderen Off-Target Effekte unterdrückt und so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bildgebender Verfahren vergrößert.^{167, 187, 188} Die mittels Click-Chemie eingeführte Modifikationen des DOTAZA-Derivates **Man₄-Bn₄DOTA** ist ein Beispiel für die Funktion von DOTA-Derivaten als Multimerisierungsplattform, wie sie bereits für **DOTA** und **TCE-DOTA** in Verbindung mit Glucose bekannt sind.^{178, 189} **DOTAZA** bietet jedoch aufgrund der Azidgruppe einen orthogonalen und modularen Modifizierungsansatz *via* Click-Chemie, ohne die octadentate Koordinationssphäre des DOTA-Grundgerüsts zu verlieren.

2. Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit waren die Erforschung und Anwendung verschiedener DOTA-Derivate für diverse metallbasierte bildgebende Verfahren. Dabei sollten besonders drei Schwerpunkte bearbeitet werden: (1) Der Einfluss der Komplexgeometrie verschiedener DOTA-Metallkomplexe auf die Leistungsfähigkeit in bildgebenden Verfahren, (2) DOTA-Derivate als Multimerisierungsplattform und (3) die Anwendung von DOTA-Derivaten als BFC für zielgerichtete Tumordiagnostik.

Die zu untersuchenden Parameter (Zentralatom, lila; Komplexgeometrie, grün, Modifikation, orange) sind anhand eines DOTA-basierten Metallkomplexes in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt und farblich gekennzeichnet.

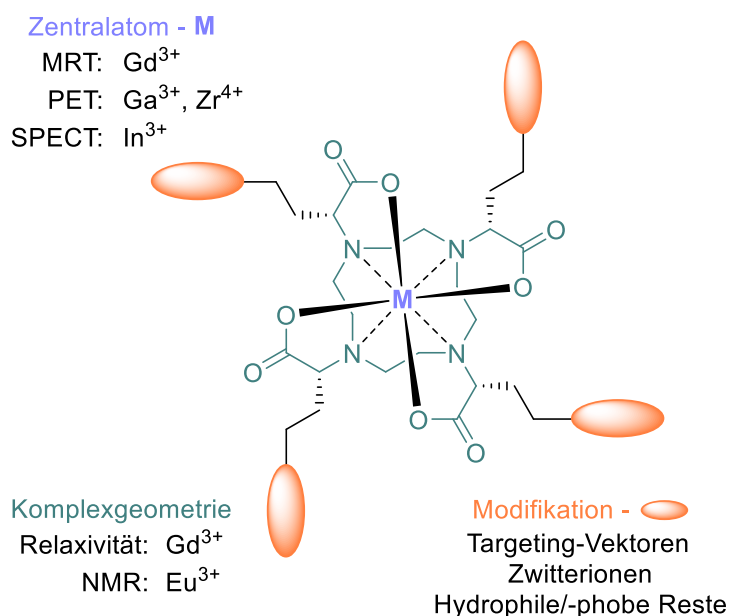


Abbildung 2-1 Konzeptionelle Darstellung eines DOTA-basierten Metallkomplexes mit Modifikationen für zielgerichtete Tumordiagnostik.

Durch hohe Komplexstabilität von DOTA-Metallkomplexen mit drei- und vierwertigen Metallionen können die Chelatoren modular für metallbasierte diagnostische Methoden verwendet werden. Der Einfluss der Komplexgeometrie verschiedener methylierter DOTA-Grundgerüste auf die Relaxivität entsprechender GBCAs wurde in der Literatur bereits beschrieben.^{19, 29, 174, 190, 191} Dieser Effekt soll anhand einer Reihe seitenkettensubstituierter DOTA-Derivate für den modularen Chelator DOTAZA detailliert untersucht werden. Der Chelator könnte nicht nur die hervorragenden Relaxivitäten methylierter DOTA-Derivate besitzen, sondern zusätzlich *via* Click-Chemie modifiziert werden. Auf diese Weise könnte der

Aufgabenstellung

BFC DOTAZA die Grundlage für eine Reihe GBCAs mit maßgeschneiderten *in vivo*-Eigenschaften mittels Click-Chemie bieten.

Die Anwendung von DOTA-Derivaten für zielgerichtete Tumordiagnostik ist in der Literatur als Teil von BFC-Systemen mit mehreren Integrin-bindenden Epitopen beschrieben. Allerdings wurden bis jetzt keine DOTA-basierten Chelatoren publiziert, bei denen DOTA gleichzeitig Chelator und Multimerisierungsplattform ist.^{82, 107, 192, 193} Daher sollten verschiedene Syntheserouten für DOTA-basierte BFCs entwickelt werden, die eine maßgeschneiderte Pharmakokinetik oder eine mögliche Multimerisierung durch Click-Chemie ermöglichen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Komplexeigenschaften verschiedener Ln-DOTxAZA-Derivate

Der aktuelle Konsens der Literatur ist, dass die Relaxivität verschiedener DOTA-basierter Metallkomplexe direkt von der Komplexgeometrie abhängig ist.^{170, 194-197} Dabei liegt ein Gleichgewicht zwischen quadratisch antiprismatischer (SAP) und verdrehter quadratisch antiprismatischer (TSAP) Komplexgeometrie vor.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Die sterisch anspruchsvollere Umgebung des koordinierten Wassermoleküls des TSAP-Konformers begünstigt den dissoziativen Mechanismus des Wasseraustauschs um Faktor 50 und erhöht auf diese Weise die Relaxivität.^{170, 201} Durch α -Substitution der Acetatreste kann das SAP/TSAP-Gleichgewicht durch den sterischen Anspruch beeinflusst und auf die Seite des TSAP-Konformers verschoben werden. Daraus resultiert ein verringerter Torsionswinkel α zwischen der N₄-Ebene des Makrocyclus und der O₄-Ebene der Acetatreste. Die Konsequenz des verdrehten Koordinationspolyeders ist, dass der Komplex eine Streckung entlang der Längsachse ähnlich einer Jahn-Teller-Verzerrung erfährt.^{173, 202, 203} Dies führt nicht nur zu einer Vergrößerung des Abstandes d zwischen N₄- und O₄-Ebene, sondern auch zu einer Stauchung des Winkels ψ , was eine sterische Abschirmung der Koordinationsstelle für H₂O bedeutet. Diese Effekte resultieren in einer Verlängerung der Ln-OH₂-Bindung des koordinierten Wassers,^{170, 172, 199} was die angesprochene Begünstigung des dissoziativen Wasseraustauschs von TSAP-Konformeren begründet.^{199, 204, 205} Dies ist in Abbildung 3-1 graphisch aufgearbeitet.

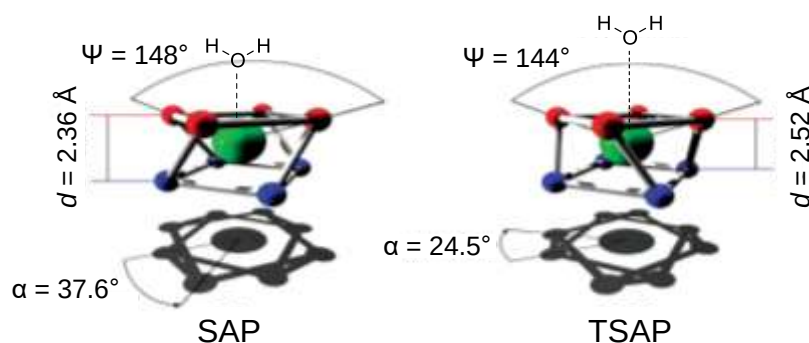


Abbildung 3-1 Unterschiede der SAP/TSAP-Konformere am Beispiel eines Ln-DOTA-Komplexes. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Hermann *et al.* angefertigt.¹⁷³

Ein in der Literatur bekanntes Beispiel ist das DOTA-Derivat DOTMA, welches den Einfluss der Seitenkette auf die Komplexgeometrie und die damit verbundene Erhöhung der Relaxivität verdeutlicht.^{170, 174, 201} In Abbildung 3-2 sind die Gd-Komplexe **Gd-DOTA**, **Gd-DOTMA** und **Gd-DOTAZA** gezeigt und ihre Komplexeigenschaften miteinander verglichen.

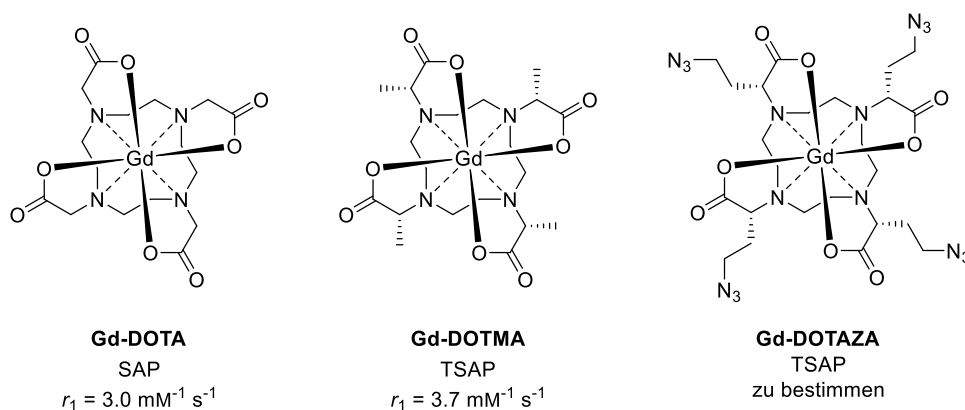


Abbildung 3-2 Strukturformeln der Gd-Komplexe **Gd-DOTA**, **Gd-DOTMA** und **Gd-DOTAZA** mit den entsprechenden Komplexgeometrien aus Kristallstrukturen und Relaxivitäten in H_2O , aufgenommen bei 1.5 T und 310 K.^{167, 170, 174, 201, 206, 207}

Basierend auf den für **Gd-DOTMA** bekannten Eigenschaften könnte der größere sterische Anspruch in **Gd-DOTAZA** die Relaxivität entsprechend begünstigen und zudem eine modifizierbare Alternative darstellen. Ein Parameter beim Vergleich neuer Substanzen mit literaturbekannten Referenzen sollte die Diskussion der Komplexgeometrie in Lösung darstellen. Für die Strukturaufklärung von Gd-Komplexen kann aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften der Substanzen jedoch keine NMR-Spektroskopie verwendet werden. In der Literatur hat sich die indirekte Evaluierung von Strukturmerkmalen anhand der analogen Eu-Komplexe durchgesetzt, deren Eigenschaften den korrespondierenden Gd-Komplexen aufgrund ähnlicher Ionenradien vergleichbar sind.^{168, 175, 177, 190, 191}

Daher sollte im Folgenden eine Reihe seitenkettensubstituierter Chelatoren synthetisiert und der Einfluss systematisch erhöhter Seitenkettensubstitution auf die Komplexgeometrie anhand der entsprechenden Eu-Komplexe untersucht werden. Anschließend sollte die Relaxivität anhand der Gd-Komplexe evaluiert werden und in Korrelation zu den Komplexgeometrien gesetzt werden. Grundlage dafür ist die Synthese des Chelator **DOTAZA**, der mittels Click-Chemie auch als Multimerisierungsplattform dienen kann.¹⁷² In Abbildung 3-3 sind alle über diese Synthese zugänglichen DOTA-Derivate dargestellt.

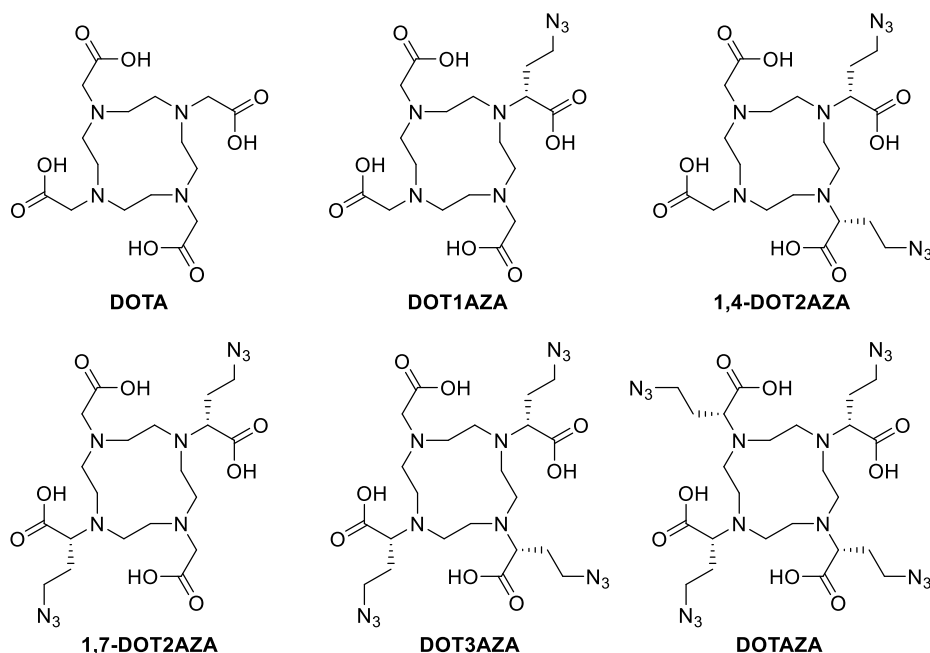
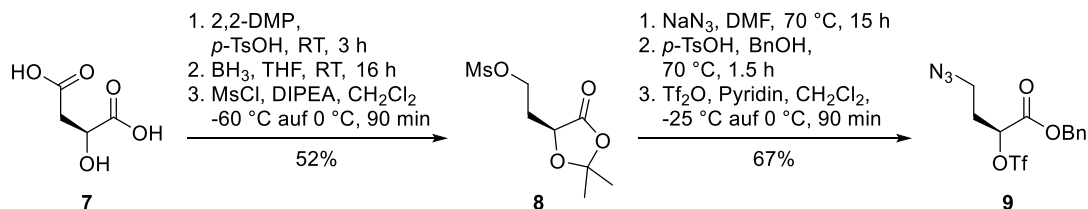


Abbildung 3-3 Strukturformeln aller möglicher DOTA-Derivate mit steigender Seitenkettensubstitution.

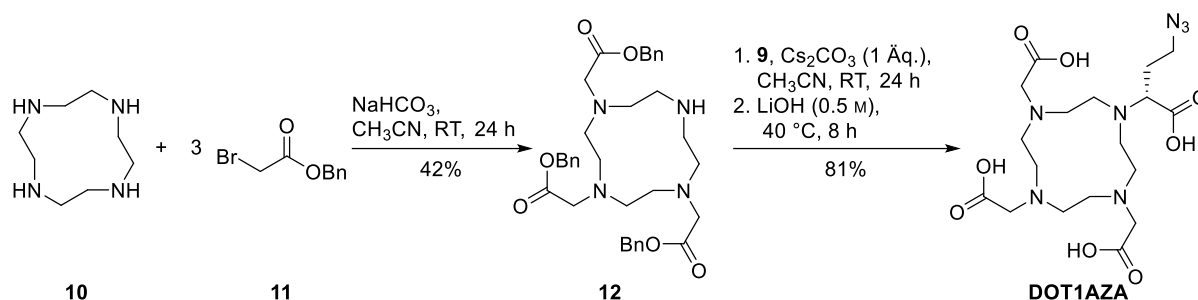
3.1.1 Synthese DOTA-basierter Metallkomplexe

Kriemen *et al.* veröffentlichte 2014 die Synthese des DOTA-Derivates **DOTAZA**,¹⁶⁷ welches durch die *N*-Alkylierung von Cyclen mit dem aus L-Äpfelsäure synthetisierten Triflat **9** erhalten wird. Die Synthese des Triflats **9**, welches ein zentraler Baustein der folgenden Synthese verschiedener DOTA-Derivate ist, ist in Schema 3-1 dargestellt.



Schema 3-1 Synthese des Triflats **9** aus L-Äpfelsäure **7**.

Das Triflat **9** wurde erfolgreich aus L-Äpfelsäure **7** in sechs Schritten mit einer Gesamtausbeute von 35% synthetisiert. Mit diesem Baustein sollte zunächst der literaturbekannte Chelator **DOT1AZA** synthetisiert werden, der über einen ähnlichen Syntheseweg von Wiener *et al.* durch den entsprechenden Methylester erhalten wurde.¹⁷⁷ Die Wahl einer geeigneten Abgangsgruppe ist dabei essenziell, da das Triflat, im Gegensatz zu anderen Abgangsgruppen wie Halogeniden, eine *N*-Alkylierung über einen $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktionsmechanismus ermöglicht.²⁰⁸ Dies gewährleistet die stereospezifische Bildung des Produktes. Die Syntheseroute ist in Schema 3-2 dargestellt.



Schema 3-2 Syntheseroute des Chelators DOT1AZA.

Kommerziell erhältliches Cyclen **10** wurde mit 2-Bromessigsäurebenzylester **11** mit NaHCO_3 als Base zum Tribenzylester **12** nach einem literaturbekannten Protokoll in einer Ausbeute von 42% umgesetzt.^{209, 210} Die Anzahl der Alkylierungen und Regioselektivität lässt sich durch Art und Stöchiometrie der Base sowie Alkylierungsreagenz kontrollieren.^{211, 212} Die Darstellung des freien Chelator DOT1AZA verlief über *N*-Alkylierung mit dem Triflat **9** und anschließender Verseifung in einer Ausbeute von 81%.

Nach der erfolgreichen Synthese des monosubstituierten Chelators DOT1AZA sollte im Rahmen der Arbeit die Synthese des disubstituierten Chelators DOT2AZA untersucht werden. Dabei musste beachtet werden, dass bei der Reaktion zwei Regioisomere (1,4- und 1,7-Derivat, Abbildung 3-4) entstehen könnten.

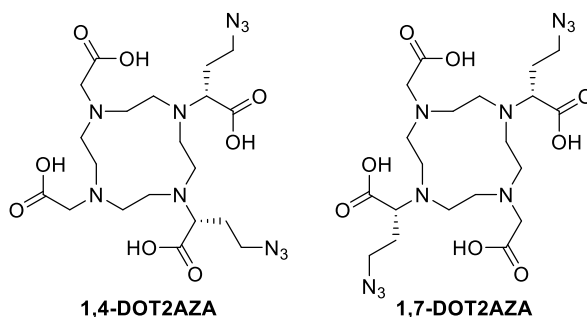
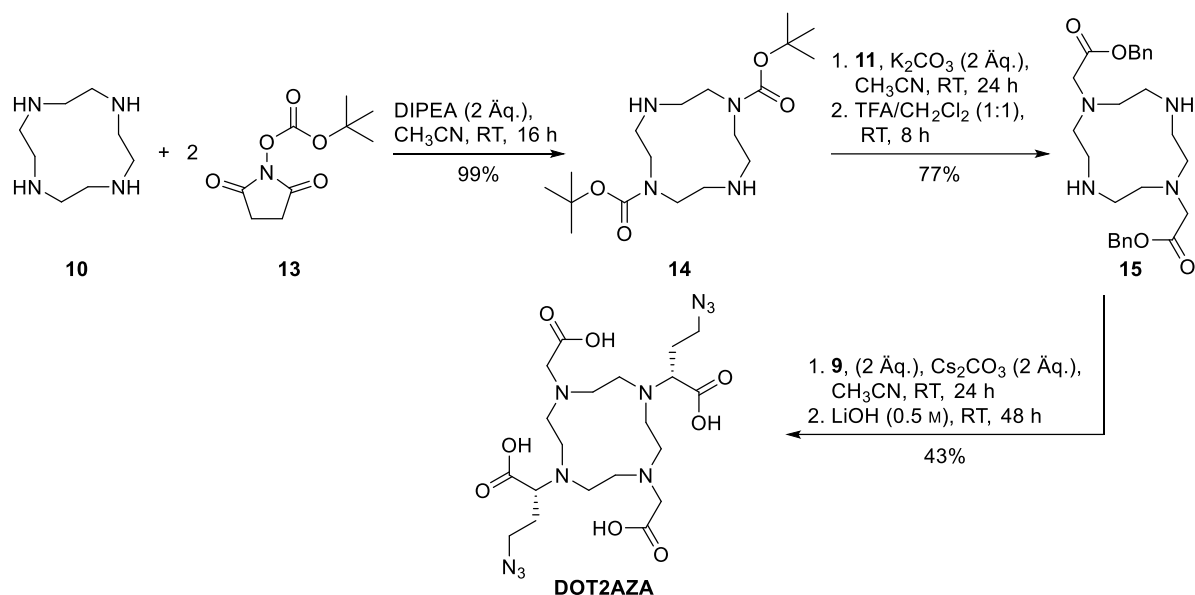


Abbildung 3-4 Strukturen der möglichen Regioisomere von DOT2AZA.

Das Regioisomer 1,4-DOT2AZA kann nur bei der *N*-Alkylierung von Cyclen **10** mit dem Bromid **11** in CHCl_3 selektiv synthetisiert werden, bei der die 1,4-Regioselektivität durch die Polarität des Lösungsmittels begünstigt wird. Es ist anzumerken, dass der disubstituierte Makrocyclus in der Synthese nur als Nebenprodukt des trisubstituierten Makrocyclus auftritt.²¹² Allerdings gibt es literaturbekannte Methoden zur selektiven 1,7-Derivatisierung von Cyclen **10**, bei der zunächst die sekundären Amine des Makrocyclus mit einer Schutzgruppe versehen, und die freien Amine anschließend alkyliert werden. Durch die folgende Entschützung wird selektiv der 1,7-substituierte Makrocyclus **15** erhalten.^{213, 214} Die Synthese des 1,7-substituierten DOTA-Derivates DOT2AZA ist in Schema 3-3 dargestellt.

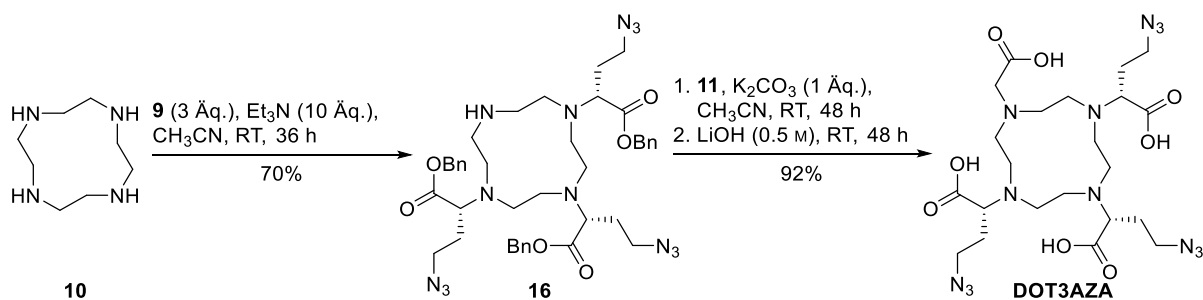
Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-3 Syntheseroute des Chelators **DOT2AZA**.

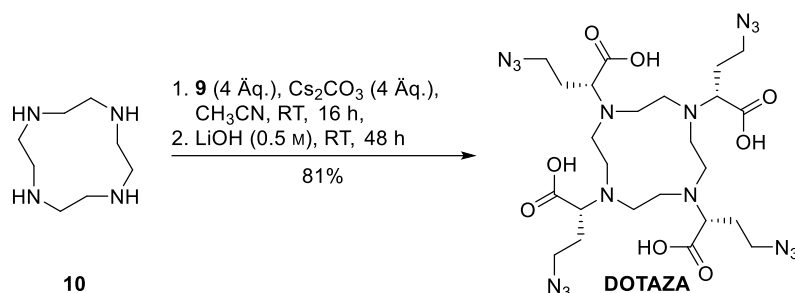
Nach einem Protokoll von De León-Rodríguez *et al.* wurde Cyclen **10** mit jeweils zwei Äquivalenten des Aktivesters BocOSu **13** und DIPEA versetzt. Diese milde Methode in Kombination mit dem sterischen Anspruch des *tert*-Butylcarbamates erlaubt die selektive 1,7-Disubstitution des Makrocyclus **14** in quantitativer Ausbeute.²¹⁵ Im folgenden Schritt wurde durch Zugabe des Bromids **11** und saure Spaltung der Carbamate mit TFA der Makrocyclus **15** in einer Ausbeute von 77% erhalten.²¹⁵ Nach anschließender *N*-Alkylierung mit dem Triflat **9** unter den bereits verwendeten Bedingungen mit folgender Verseifung konnte der Chelator **DOT2AZA** mittels HPLC (C18) in einer Ausbeute von 43% isoliert werden.

Der Chelator **DOT3AZA** wurde durch ein modifiziertes Syntheseprotokoll von Kriemen *et al.* dargestellt.¹⁶⁷ Dabei wurde Cyclen **10** direkt mit dem Triflat **9** umgesetzt. Durch die Wahl von CH_3CN als Lösungsmittel und Et_3N als Base kann die Tetrasubstitution verhindert werden.²¹⁶ Anschließend sollte mittels *N*-Alkylierung des sekundären Amins **16** mit dem Bromid **11** und darauffolgender Verseifung der Benzylester der Chelator **DOT3AZA** erhalten werden. Die Synthese ist in Schema 3-4 dargestellt.



Schema 3-4 Syntheseroute des Chelators **DOT3AZA**.

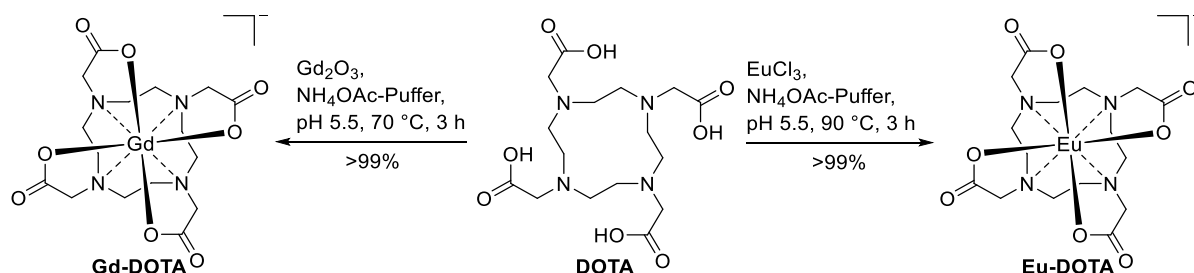
Der trisubstituierte Makrocyclus **16** wurde nach bekanntem Protokoll in einer Ausbeute von 70% synthetisiert und durch *N*-Alkylierung mit dem Bromid **11** unter den bereits verwendeten Bedingungen zum Tetrabenzylester **Bn₄DOT3AZA** mit einer Ausbeute von 92% umgesetzt. Für die vollständige Reihe seitenkettensubstituierter DOTA-Derivate sollte nun nach der etablierten Methode von Kriemen *et al.* der Chelator **DOTAZA** synthetisiert werden.¹⁶⁷ Die Synthese ist in Schema 3-5 dargestellt.



Schema 3-5 Synthese des Chelators **DOTAZA**.

Ausgehend von Cyclen **10** konnte zunächst durch *N*-Alkylierung mit dem Triflat **9** der Tetrabenzylester **Bn₄DOTAZA** gewonnen werden, der durch Verseifung der Benzylester mit LiOH zum freien Chelator **DOTAZA** umgesetzt wurde. Nach Reinigung an RP-Kieselgel (C18) konnte **DOTAZA** quantitativ isoliert werden.

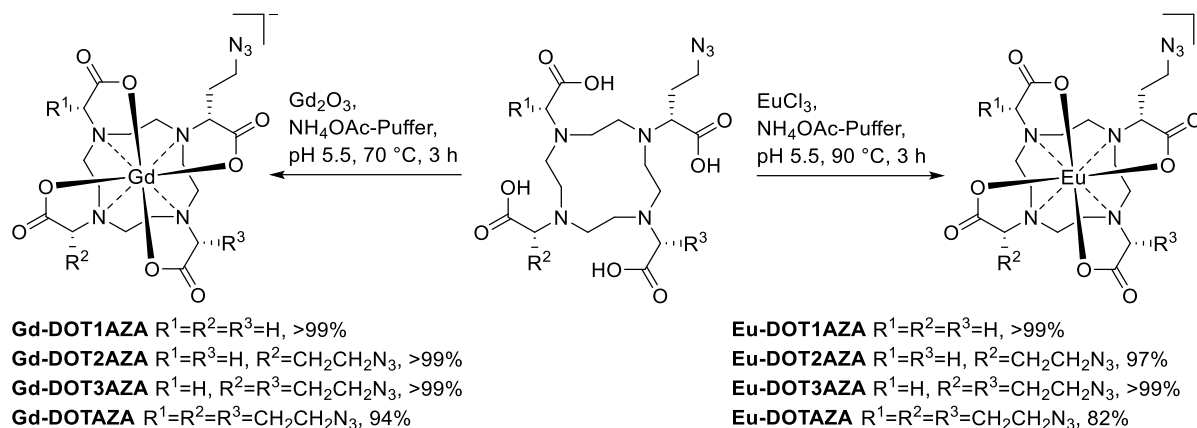
Die Reihe synthetisierter DOTA-basierter Chelatoren sollte im Anschluss in die korrespondierenden Eu- und Gd-Komplexe überführt werden, um Studien über den Einfluss der Seitenkettensubstitution auf Komplexgeometrie und Relaxationseigenschaften durchzuführen. Zu diesem Zweck sollte als Referenz **Eu-DOTA** sowie **Gd-DOTA** aus dem kommerziellen Chelator **DOTA** synthetisiert werden. Die Synthese der Metallkomplexe **Eu-DOTA** und **Gd-DOTA** ist in Schema 3-6 dargestellt.



Schema 3-6 Synthese der Metallkomplexe **Eu-DOTA** und **Gd-DOTA** aus dem Chelator **DOTA**.

Die Synthese der Metallkomplexe verlief nach einer literaturbekannten Methode in jeweils quantitativer Ausbeute.¹⁸⁴ Analog wurde das Protokoll für die zuvor synthetisierten Chelatoren angewandt, um eine Reihe DOTA-basierter Gd- und Eu-Metallkomplexe mit steigendem

sterischen Anspruch der Seitenketten zu erhalten. Die Synthese der Komplexe ist in Schema 3-7 gezeigt.

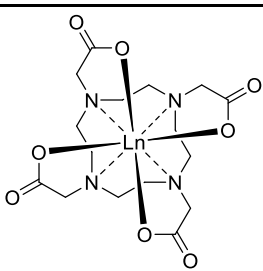
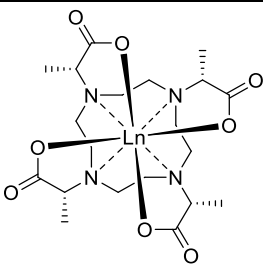
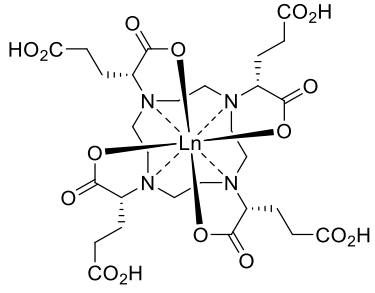
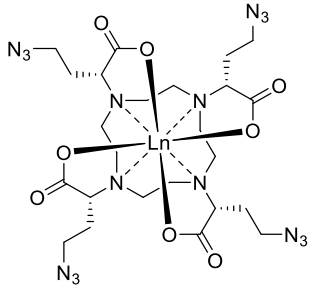


Schema 3-7 Synthese der Eu- und Gd-Metallkomplexe aus den zuvor synthetisierten DOTA-basierten Chelatoren.

Die Metallkomplexe konnten nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-Kieselgel (C18) zwischen 82% und quantitativen Ausbeuten erfolgreich isoliert werden. Die Metallkomplexe **Gd-DOT1AZA** und **Eu-DOT1AZA** wurden in der Literatur bereits von Wiener *et al.* beschreiben.¹⁷⁷ Allerdings wurden die Komplexeigenschaften nicht näher untersucht, da die Substanzen nur als Intermediate synthetisiert wurden. Die Metallkomplexe **Gd-DOTAZA** und **Eu-DOTAZA** wurden bereits mit einer genaueren Analytik der Komplexeigenschaften publiziert, sodass diese Parameter als Referenz dienen.¹⁷² In Tabelle 3-1 sind weitere Referenzen mit diversen Parametern aufgeführt, die für die folgende Diskussion der Komplexgeometrie verschiedener Eu-Komplexe und die anschließende Evaluation der entsprechenden Gd-Komplexe hilfreich sind. Falls publiziert, wurde zunächst die Komplexgeometrie als % d.e. von TSAP angegeben. Wichtige gelistete Parameter der Kristallstruktur sind neben der Komplexgeometrie der Torsionswinkel α des Koordinationspolyeders, und der Abstand zwischen Zentralatom und koordiniertem Wasser. Für Gd-Komplexe ist zusätzlich die Relaxivität angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3-1 Zusammenstellung verschiedener literaturbekannter Eu-/Gd-Komplexe. Falls publiziert, wurde zunächst die Komplexgeometrie als % d.e. TSAP angegeben. Wichtige gelistete Parameter der Kristallstruktur (Kristallstr.) sind neben der Komplexgeometrie der Torsionswinkel α des Koordinationspolyeders, der Abstand zwischen Zentralatom und koordiniertem Wasser sowie die Relaxivität der Gd-Komplexe bei 1.5 T und 310 K.

Chelator	Eu-Komplexe	Gd-Komplexe	Struktur
DOTA	-68% d.e. TSAP ^{a 168}	-66% d.e. TSAP ¹⁷⁰	
	SAP Kristallstr. ²¹⁷	SAP Kristallstr. ²⁰¹	
	$\alpha = 37.7^\circ$	$\alpha = 38.0^\circ$	
	Eu-OH ₂ (Å) 2.480	Gd-OH ₂ (Å) 2.463 $r_1 = 2.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ }^b \text{ }^{206}$	
DOTMA	60% d.e. TSAP ¹⁷⁰	62% d.e. TSAP ¹⁷⁰	
	TSAP Kristallstr. ¹⁷⁴	TSAP Kristallstr. ¹⁷⁰	
	$\alpha = 27.9^\circ$	$\alpha = 26.1^\circ$	
	Eu-OH ₂ (Å) 2.558	Gd-OH ₂ (Å) 2.500 $r_1 = 3.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ }^b \text{ }^{207}$	
TCE-DOTA	60% d.e. TSAP ^{a 200}	n.a.	
	SAP Kristallstr. ²¹⁸	SAP Kristallstr. ¹⁷⁰	
	$\alpha = 34.1^\circ$	$\alpha = 39.2^\circ$	
	Eu-OH ₂ (Å) 2.445	Gd-OH ₂ (Å) 2.431 n.a.	
DOTAZA	78% d.e. TSAP ^{c 172}	n.a.	
	Keine Kristallstr.	TSAP Kristallstr. ¹⁷²	
		$\alpha = 26.1^\circ$	
		Gd-OH ₂ (Å) 2.505 n.a.	

^a in Lösung *via* NMR (D₂O, 298 K).

^b in Lösung mittels Relaxometer (H₂O, 310 K, 1.5 T).

^c in Lösung mittels NMR (CD₃CN/D₂O (4:1), 298 K).

3.1.2 Komplexgeometrie von Eu-DOTA-Derivaten

Wie bereits etabliert, ist die Komplexgeometrie DOTA-basierter Gd-Komplexe ein wichtiger Parameter, um Relaxivitäten zu diskutieren.^{170, 194-197, 200} Die sterisch anspruchsvollere Umgebung der Koordinationsstelle für Wasser des TSAP-Konformers begünstigt den dissoziativen Mechanismus des Wasseraustausch um Faktor 50 und erhöht auf diese Weise die Relaxivität. Die vermeintlich beste Methode ist die Betrachtung der Kristallstruktur jedes Komplexes, allerdings zeigt das in Tabelle 3-1 aufgeführte Beispiel **TCE-DOTA**, dass es eine Diskrepanz zwischen Kristallstruktur und Komplexgeometrie in Lösung vorliegt. Daher sollte die Komplexgeometrie in Lösung indirekt durch die analogen Eu-Komplexe bestimmt werden, da für Eu- und Gd-DOTA-basierte Komplexe das gleiche Konformationsverhalten angenommen wird.^{170, 177} Dieses Verhältnis kann mittels ¹H NMR-Spektroskopie anhand der axialen Protonen des Makrocyclus ermittelt werden,^{172, 219} die in verschiedenen Konformeren unterschiedlich stark einen Ln-induzierten Tieffeld-Shift erfahren.^{220, 221} Die axialen Protonen des SAP-Konformers werden dadurch in den Bereich $\delta = 30-40$ ppm (Abbildung 3-5, blau) verschoben, während die Protonen des TSAP-Konformers zu $\delta = 10-20$ ppm (Abbildung 3-5, gelb) verschoben werden. Somit kann über das Verhältnis der relativen Integrale das SAP/TSAP-Verhältnis direkt bestimmt werden.¹⁶⁷ Im Folgenden soll dieses Verhältnis für alle zuvor synthetisierten DOTA-basierten Eu-Komplexe **Eu-DOT1AZA**, **Eu-DOT2AZA**, **Eu-DOT3AZA** und **Eu-DOTAZA** mittels ¹H NMR-Spektroskopie bestimmt, und mit Eu-DOTA verglichen werden. Alle Spektren wurden in D₂O bei 400 Hz und 295 K aufgenommen und sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

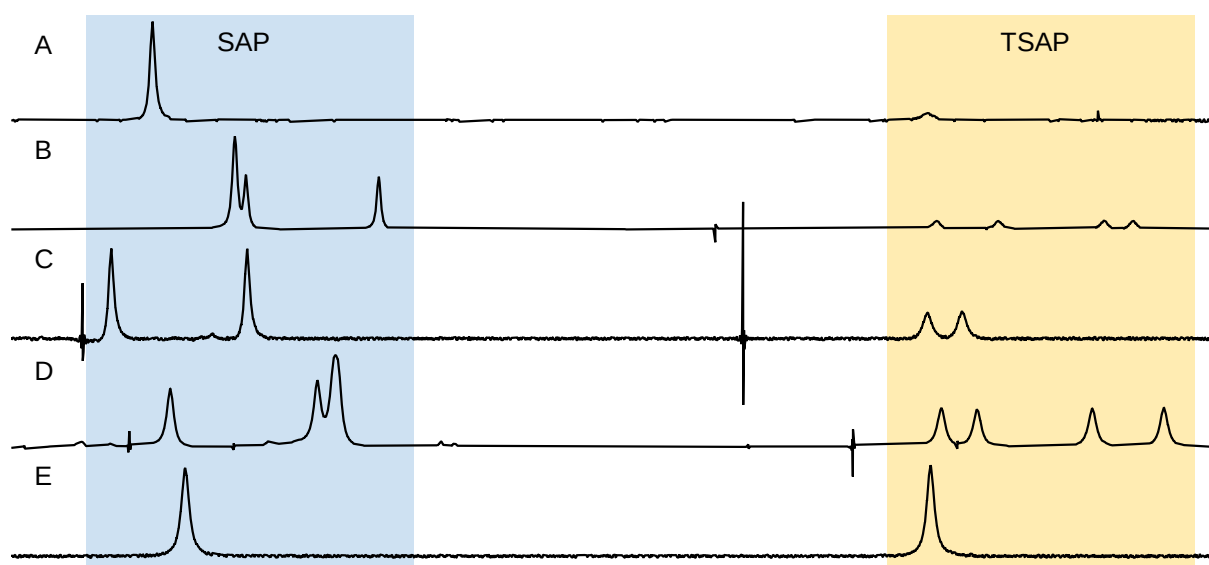


Abbildung 3-5 Ausschnitt zwischen $\delta = 10-40$ ppm der ¹H NMR-Spektren verschiedener Eu-Komplexe in D₂O bei 298 K. Der Bereich $\delta = 30-40$ ppm ist blau eingefärbt. Der Bereich $\delta = 10-20$ ppm ist gelb eingefärbt. (A) **Eu-DOTA**, (B) **Eu-DOT1AZA**, (C) **Eu-DOT2AZA**, (D) **Eu-DOT3AZA**, (E) **Eu-DOTAZA**.

Die SAP/TSAP-Ratio für alle vermessenen Substanzen ist in Tabelle 3-2 dargestellt. Schon auf den ersten Blick wurde die Substitution der Seitenkette in allen NMR-Spektren widergespiegelt, da die symmetrischen Derivate **Eu-DOTA** (A), **Eu-DOT2AZA** (C) und **DOTAZA** (E) im Gegensatz zu **Eu-DOT1AZA** (B) und **Eu-DOT3AZA** (D) entsprechende Symmetrie der Signalsätze zeigten. Erwartungsgemäß zeigte der steigende sterische Anspruch in der Seitenkette einen Einfluss auf die Komplexgeometrie. Dies ist gut an den Referenzwerten **Eu-DOTA**, **Eu-DOT1AZA** und **Eu-DOTAZA** zu erkennen; der Metallkomplex **Eu-DOTA** liegt in -69% d.e. TSAP vor, was dem in der Literatur ermittelten Wert entspricht (-68% d.e., Tabelle 3-1).¹⁶⁸ Auch die Ratio des Eu-Komplexes **Eu-DOT1AZA** (-53% d.e.) stimmt mit dem von Wiener *et al.* publizierten vergleichbaren Eu-Komplex überein (-52% d.e.).¹⁷⁷ Allerdings unterscheiden sich die Literaturwerte von **Eu-DOTAZA** (78% d.e., Tabelle 3-1) signifikant von den experimentellen Daten (1% d.e.).¹⁶⁷ Der Unterschied der beiden Proben ist, dass die Referenz nicht in D₂O, sondern in einem Gemisch aus CD₃CN/D₂O (4:1) gemessen wurde. Der Einfluss von Lösungsmitteln auf die Komplexgeometrie wurde in der Literatur bis jetzt wenig bearbeitet und nicht abschließend geklärt.^{204, 222} Allerdings ist eine Evaluation des Lösungsmittelleffektes besonders bei der Betrachtung der Komplexgeometrie wichtig, da Ergebnisse beispielsweise durch Lösungsmittelgemische aufgrund von Löslichkeitsproblemen der Komplexe verfälscht werden könnten.

Die koordinierenden Eigenschaften von Lösungsmitteln zu Ln-Ionen wurden von Kimura *et al.* und Di Bernarndo *et al.* genauer untersucht und eine Reihe mit zunehmender koordinierender Wirkung für Eu³⁺ erstellt: DMSO > H₂O ~ CH₃OH > CH₃CN.^{223, 224} Aus diesem Grund sollten die zuvor synthetisierten Metallkomplexe in verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln vermessen werden und die SAP/TSAP-Ratio miteinander verglichen werden. Es wurde jeweils eine Reihe in D₂O, D₂O/CD₃CN und CD₃OD vermessen. Aufgrund der geringen Löslichkeit der polaren Eu-Komplexe wurden stellvertretend für die Reihe der Metallkomplex **Eu-DOTAZA** zusätzlich in DMSO-*d*₆ und CD₃CN vermessen, um die von Kimura und Di Bernarndo postulierte Reihe zu vervollständigen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3-2 SAP/TSAP-Ratio bestimmt aus ^1H NMR-Spektren der zuvor synthetisierten Eu-Komplexe. Gezeigt sind die Werte für unterschiedliche Lösungsmittel in % d.e. TSAP.

Substanz	M (g/mol)	DMSO- d_6 (% d.e.)	D $_2$ O (% d.e.)	CD $_3$ OD (% d.e.)	D $_2$ O/CD $_3$ CN (% d.e.)	CD $_3$ CN (% d.e.)
Eu-DOTA	552.35	n.a. ^a	-70	-82	-73	n.a. ^a
Eu-DOT1AZA	621.42	n.a. ^a	-53	-53	-43	n.a. ^a
Eu-DOT2AZA	690.49	n.a. ^a	-37	-33	9	n.a. ^a
Eu-DOT3AZA	759.55	n.a. ^a	-14	-36	28	n.a. ^b
Eu-DOTAZA	828.62	-100	1	-4	50	75

a: Nicht in Lösungsmittel löslich.

b: Wenig in Lösungsmittel löslich.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-6 graphisch aufgearbeitet. Entsprechend der unterschiedlich stark koordinierenden Lösungsmittel wurden DMSO- d_6 (schwarz), D $_2$ O (blau), CD $_3$ OD (lila), D $_2$ O/CD $_3$ CN (1:1) und CD $_3$ CN (gelb) für die Messungen gewählt. Anhand der relativen Integrale des ^1H NMRs wurde die SAP/TSAP-Ratio ermittelt und als % d.e. TSAP gegen das Molekulargewicht als repräsentativer Parameter für den zunehmenden sterischen Anspruch der Seitenketten aufgetragen.

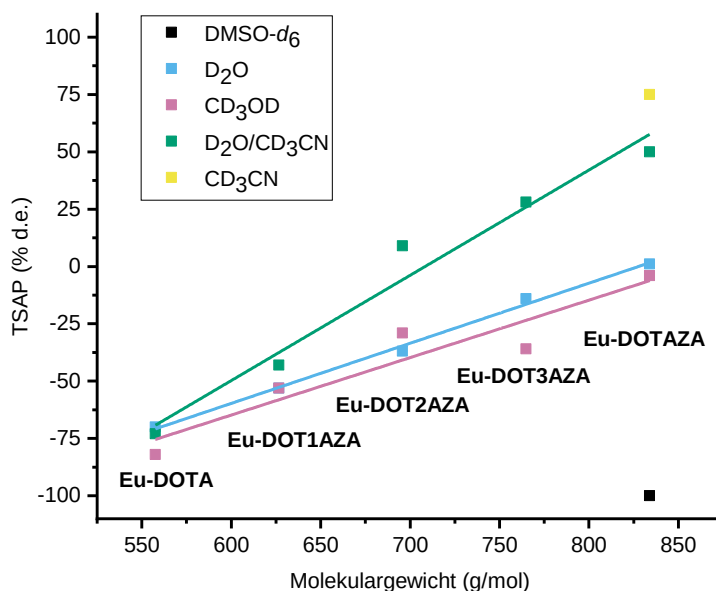


Abbildung 3-6 Veränderung der Komplexgeometrie (TSAP % d.e.) in verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln (DMSO- d_6 , schwarz; D $_2$ O, blau; CD $_3$ OD, lila, D $_2$ O/CD $_3$ CN (1:1); CD $_3$ CN, gelb) mit steigendem sterischen Anspruch der Seitenketten, repräsentiert durch das Molekulargewicht (g/mol).

Für alle als Reihe durchgeführten Experimente zeigte sich eine Bevorzugung des TSAP-Konformers linear proportional mit zunehmendem Molekulargewicht, respektive steigendem

sterischen Anspruch der Seitenkette. Die Unterschiede zwischen D₂O und CD₃OD sind dabei marginal, während der Zusatz von CD₃CN einen signifikanten Einfluss auf die Komplexgeometrie hatte. Des Weiteren nahm der Effekt mit steigender Seitenkettensubstitution des Makrocyclus zu. Während der Eu-Komplex ohne Seitenkettensubstitution **Eu-DOTA** geringe Veränderung der SAP/TSAP-Ratio in verschiedenen Lösungsmitteln zeigte, war der Effekt auf den Eu-Komplex mit der höchsten Seitenkettensubstitution **Eu-DOTAZA** deutlich zu erkennen (Tabelle 3-2, Abbildung 3-6). In Abbildung 3-7 werden die entsprechenden ¹H NMR-Spektren verglichen.

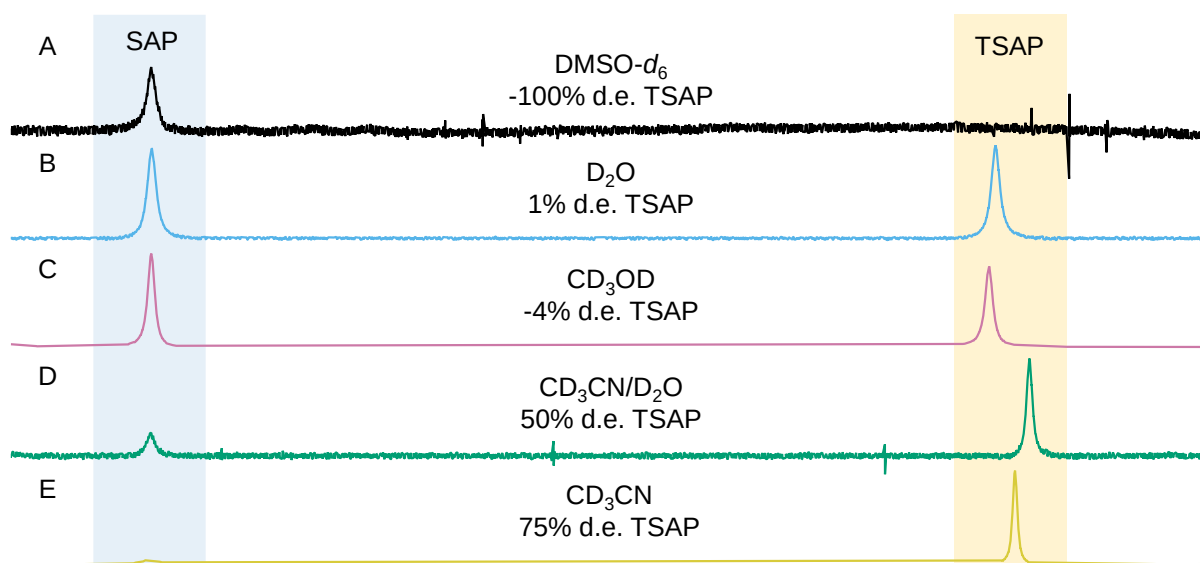


Abbildung 3-7 Ausschnitt zwischen $\delta = 10\text{--}40$ ppm der ¹H NMR-Spektren des Eu-Komplexes **Eu-DOTAZA** bei 298 K in verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln mit abnehmenden koordinierenden Eigenschaften: (A) DMSO-*d*₆, (B) D₂O, (C) CD₃OD, (D) D₂O/CD₃CN (1:1), (E) CD₃CN. Der Bereich $\delta = 30\text{--}40$ ppm ist blau eingefärbt. Der Bereich $\delta = 10\text{--}20$ ppm ist gelb eingefärbt.

Während **Eu-DOTAZA** in DMSO-*d*₆ (A) ausschließlich als SAP-Konformer vorlag, zeigte sich in D₂O (B, 1% d.e. TSAP) und CD₃OD (C, -6% d.e. TSAP) nahezu ein 1:1 Gleichgewicht beider Konformere. Die Zugabe von CD₃CN zu D₂O führte zu einem signifikanten Überschuss des TSAP-Konformers (D, 50% d.e. TSAP). Dieser Trend setzte sich bei der Messung in purem CD₃CN fort (E, 75% d.e.). Entsprechend der Reihe von Lösungsmitteln mit koordinierenden Eigenschaften DMSO > H₂O ~ CH₃OH > CH₃CN liegt mit abnehmender Koordination des Lösungsmittels das TSAP Konformer bevorzugt vor. Dieser Befund scheint auf zwei Faktoren zu beruhen. Zum einen auf den sterischen Anspruch der Seitenkette, der das TSAP-Konformer bevorzugt, zum anderen auf den koordinierenden Eigenschaften des Lösungsmittels, die dem sterischen Effekt entgegenwirken. Der *status quo* ist, dass die Komplexgeometrie die Bindungseigenschaften des koordinierten Lösungsmittels beeinflusst.²²⁵ In dem stark koordinierenden Lösungsmittel DMSO-*d*₆ lag jedoch ausschließlich das SAP-Konformer vor

(Abbildung 3-2, Abbildung 3-7), was darauf schließen lässt, dass die Koordination von DMSO- d_6 stärker ist als der sterische Effekt der Seitenketten. Damit wurde zum ersten Mal beschrieben, dass der koordinierende Effekt des Lösungsmittels Einfluss auf die Komplexgeometrie nimmt und nicht *vice versa*, wie es beim schwach koordinierenden Lösungsmittel CD_3CN zu beobachten ist. Hier scheint der sterische Anspruch den koordinativen Effekt deutlich zu übertreffen. Diese Ergebnisse heben den signifikanten Lösungsmittelleffekt hervor, der in der Literatur häufig ignoriert wird. Seitenkettensubstitutionen von **DOTA** führen oft zu veränderten Löslichkeiten der Produkte. Um die resultierenden DOTA-Derivate dennoch NMR-spektroskopisch untersuchen zu können, werden unpolare Lösungsmittel wie CH_3CN eingesetzt. Die resultierende Komplexgeometrie in solchen Lösungen und der daraus gezogene Rückschluss auf die Relaxivität hat dabei ggf. wenig mit physiologischen Bedingungen zu tun und unterscheidet sich insbesondere für hochsubstituierte DOTA-Derivate dramatisch, wie am Vergleich **DOTA** und **DOTAZA** zu erkennen ist. Zumindest was Rückschlüsse auf physiologische Bedingungen anbelangt, sind NMR-Studien neuer DOTA-Derivate in nicht wässriger Lösung daher mit Zurückhaltung zu interpretieren.

Zusammenfassend konnte die Komplexgeometrie aller synthetisierten Eu-DOTA-Derivate per ^1H NMR evaluiert werden, und zusätzlich neue Denkansätze in Bezug auf den Einfluss koordinierender Lösungsmittel gewonnen werden. Diese Erkenntnisse sollten im Folgenden auf die Gd-Komplexe übertragen werden.

3.1.3 Relaxivitäten von Gd-DOTxAZA

Die NMR-Experimente der Eu-Komplexe deuteten auf eine Zunahme des TSAP-Konformers mit steigender Seitenkettensubstitution hin. Für die synthetisierten Gd-Komplexe (**3.1.1 Synthese DOTA-basierter Metallkomplexe**) wurden konsequenter Weise erhöhte Relaxivitäten im Vergleich zu **Gd-DOTA** erwartet. Die Relaxivität lässt sich durch die Spingitter-Relaxationszeit T_1 ermitteln, die mittels ^1H NMR-Spektroskopie in einem Inversionserholungsexperiment (IRE) direkt bestimmt werden kann, welches in Abbildung 3-8 schematisch dargestellt ist. Die Probe wird zunächst parallel zu einem angelegten magnetischen Feld magnetisiert (dargestellt durch die z -Achse, Abbildung 3-8). Durch einen 180° -Puls wird der Vektor der Gesamtmagnetisierung umgekehrt. Nach verschiedenen Zeitintervallen t_d wird der Vektor durch einen 90° -Puls auf die x -Achse gebracht, um die Aufnahme des freien Induktionsverfalls (FID) zu ermöglichen. Durch den Vergleich der Integrale nach verschiedenen Zeitintervallen t_d kann die Relaxationszeit direkt ermittelt werden.²²⁶

Ergebnisse und Diskussion

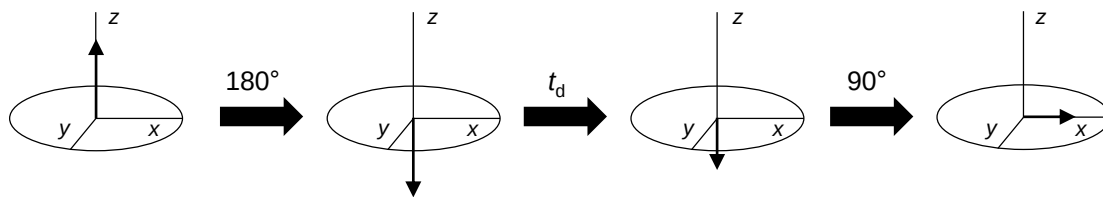


Abbildung 3-8 Schematischer Verlauf des Inversionserholungsexperimentes mit unterschiedlichen Zeitintervallen t_d zwischen den Messungen.²²⁶

Anhand der ermittelten T_1 -Zeit kann die Relaxivität unter Berücksichtigung der Konzentration der jeweiligen Probe berechnet werden. Im Folgenden wurde zunächst ein Referenzpunkt etabliert. Dafür wurde D_2O mit definierter Menge H_2O (0.1% v/v) in einem IRE vermessen. Die relativen Integrale nach verschiedenen Zeitintervallen t_d wurden normiert und die Intensität gegen t_d (s) aufgetragen. Die relativen normierten Integrale für jedes Zeitintervall sind in Abbildung 3-9 (A) zusammen mit der entsprechenden Auftragung (B) graphisch dargestellt.

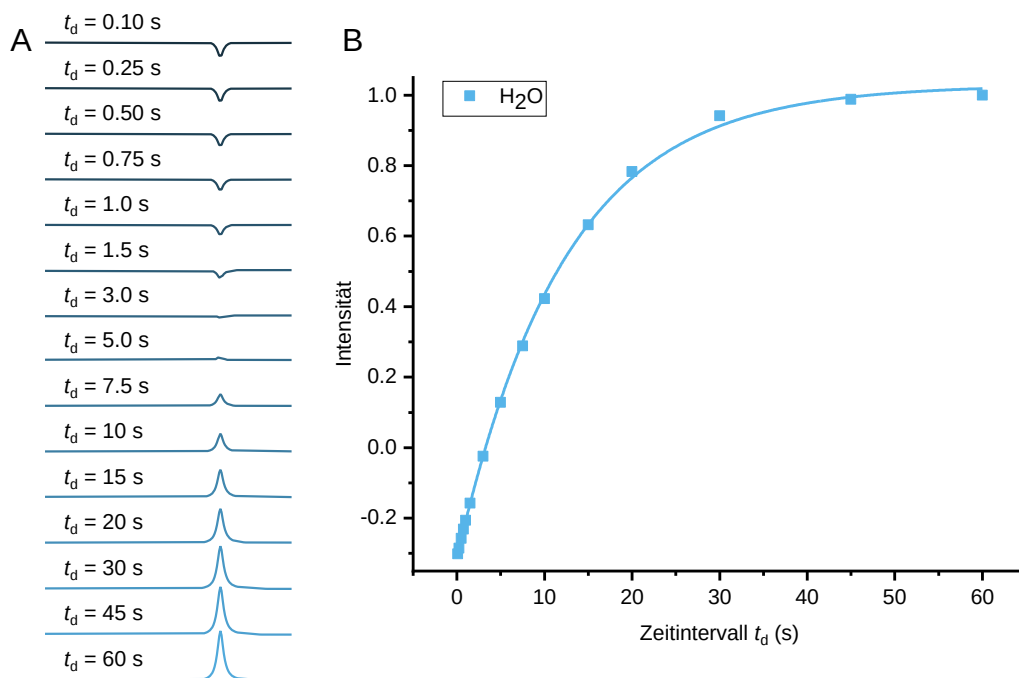


Abbildung 3-9 (A) ^1H NMR-Spektren des IRE nach verschiedenen Zeitintervallen t_d . (B) Entsprechende Auftragung der Intensität der normierten relativen Integrale gegen die Zeitintervalle t_d (s). Anhand nichtlinearer Regression kann die T_1 -Zeit errechnet werden. Alle Daten wurden bei 310 K und 1.5 T akquiriert.

Aus dem Intensitäts-Zeit-Diagramm kann mittels nichtlinearer Regression die Relaxationszeit T_1 anhand der Geradengleichung (3-1) bestimmt werden.

$$I = I_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (3-1)$$

Die Intensität I ist dabei abhängig von der maximalen Intensität I_0 , der Zeit t und der Relaxationszeit T_1 . Alle zuvor synthetisierten Gd-Komplexe sollten auf diese Weise an einem

Ergebnisse und Diskussion

Relaxometer vermessen werden und die Relaxationszeit T_1 sowie die jeweiligen Relaxivitäten bei klinisch relevanten Magnetfeldstärken (1.5 T) ermittelt werden. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe (100%-, 50%- und 10%-Lösung) jedes Gd-Komplexes erstellt und die jeweilige T_1 -Zeit mittels IRE an einem 60 Hz Relaxometer gemessen. Da die Relaxivität signifikant von der Konzentration abhängig ist, wurde die Gd-Konzentration aller Stammlösungen (100%) mittels induktiv gekoppeltem Plasma (ICP)-MS bestätigt. Durch die reziproke Auftragung der T_1 -Zeiten gegen die Konzentration kann die Relaxivität durch lineare Regression ermittelt werden. Abbildung 3-10 zeigt die linearisierte Auftragung mit den Parametern der linearen Regression. Die Steigung, die der Relaxivität entspricht, ist gelb markiert.

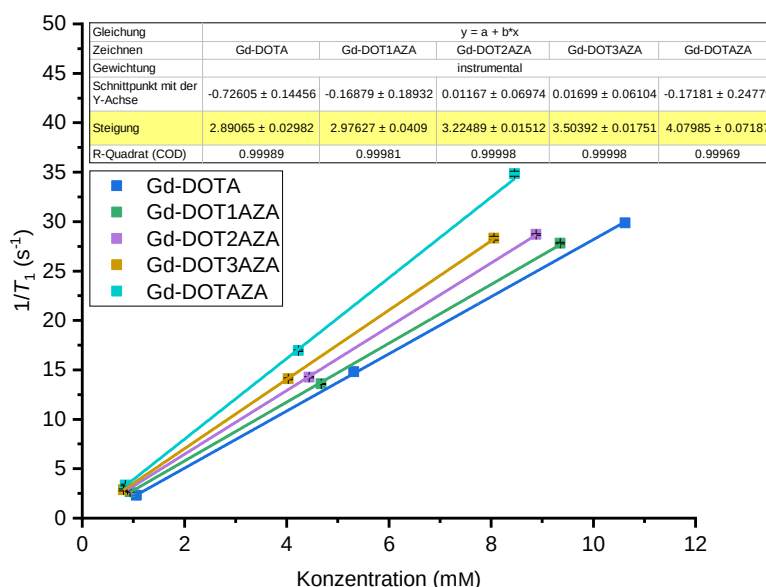


Abbildung 3-10 Linearisierte Auftragung der T_1 -Zeit zuvor synthetisierter Gd-DOTA-Derivate **Gd-DOTA** (blau) **Gd-DOT1AZA** (grün), **Gd-DOT2AZA** (lila), **Gd-DOT3AZA** (braun), **Gd-DOTAZA** (hellblau) gegen die Konzentration (mM). Von den aufgeführten Parametern der linearen Regression entspricht die Steigung der Relaxivität (gelb).

Die für **Gd-DOTA** ermittelte Relaxivität stimmt mit dem literaturbekannten Wert für Dotarem ($r_1 = 2.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) überein.²²⁷ Die Werte der Relaxivität erhöhen sich mit steigender molarer Masse, respektive Seitenkettensubstitution, von **Gd-DOT1AZA** zu **Gd-DOTAZA**. Der Gd-Komplex **Gd-DOTAZA** zeigte eine Relaxivität ($r_1 = 4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), welche die Relaxivitäten des tetrasubstituierten Gd-Komplexes **Gd-DOTMA** ($r_1 = 3.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) übersteigt,²⁰⁷ der als Referenz für seitenkettensubstituierte DOTA-basierte Chelatoren gilt. Anhand der Experimente der topoisomeren Eu-Komplexe, die einen höheren Anteil an TSAP-Konformeren proportional mit steigender Seitenkettensubstitution zeigten, lassen sich die außergewöhnlichen

Relaxivitäten erklären. Der Zusammenhang zwischen Relaxivität und Komplexgeometrie in der Reihe synthetisierter Ln-DOTA-Derivate ist in Abbildung 3-11 dargestellt. Die für die Eu-DOTA-Derivate bestimmte Konformeren-Ratio ist zusammen mit den ermittelten Relaxivitäten der Gd-DOTA-Derivate gegen die entsprechende molare Masse aufgetragen. Der Verlauf der Auftragung wurde durch Hilfslinien verdeutlicht.

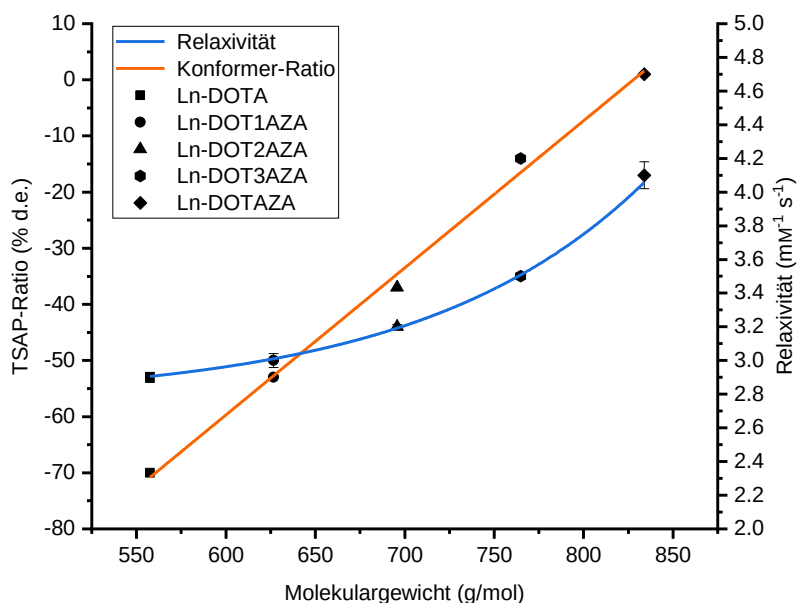


Abbildung 3-11 Auftragung der TSAP/SAP-Ratio (% d.e.) zuvor synthetisierter Eu-Komplexe (linke Y-Achse) und der ermittelten Relaxivität r_1 (mm⁻¹ s⁻¹) zuvor synthetisierter Gd-Komplexe (rechte Y-Achse) für **Ln-DOTA** (Quadrat), **Ln-DOT1AZA** (Kreis), **Ln-DOT2AZA** (Dreieck), **Ln-DOT3AZA** (Hexagon) und **Ln-DOTAZA** (Raute) gegen das Molekulargewicht (g/mol). Der Verlauf der Relaxivität (blau) sowie der Konformer-Ratio (orange) sind farblich gekennzeichnet.

Die Seitenkettensubstitution verschiedener Ln-DOTA-Derivate zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Eigenschaften der Eu-, als auch der Gd-Komplexe. Während die Reihe der Eu-DOTA-Derivate einen linearen Anstieg des TSAP-Konformers proportional zu steigenden molaren Massen zeigt (Abbildung 3-11, orange Linie), wirkt sich die Seitenkettensubstitution exponentiell auf die Relaxivität der Gd-DOTA-Derivate aus (Abbildung 1-12, blaue Linie). Grund dafür ist die höhere Bindungslänge zwischen koordiniertem H₂O und Zentralatom der TSAP-Konformere verglichen mit SAP-Konformeren. Nach der in **1.1 Bildgebende Verfahren** beschriebenen Solomon-Bloembergen-Morgan-Gleichung (Gleichung (1-2)) beeinflusst der Abstand r zwischen Gd und dem zu relaxierenden Proton die Relaxivität exponentiell. Dies geht auch aus den bereits publizierten kristallographischen Daten verschiedener Gd-DOTA-Derivate hervor. Das SAP-Konformer von Gd-DOTA zeigt bei einer Bindungslänge von 2.463 Å eine Relaxivität von 2.9 mm⁻¹ s⁻¹ bei 1.5T und 310 K.^{201, 227} Im

Gegensatz dazu zeigt das TSAP-Konformer des seitenkettensubstituierten Gd-DOTA-Derivats **Gd-DOTMA** eine deutliche höhere Bindungslänge von 2.500 Å und ebenfalls eine höhere Relaxivität von $3.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 1.5T und 310 K.^{170, 207} Für das ebenfalls in TSAP-Konformation kristallisierte **Gd-DOTAZA** eine Bindungslänge von 2.505 Å festgestellt und in dieser Arbeit eine Relaxivität von $4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 1.5T und 310 K ermittelt.¹⁷²

Ein weiterer Faktor der die Relaxivität beeinflusst ist die molare Masse.^{19, 228} Die Korrelation verschiedener GBCAs zeigt einen linearen Anstieg der Relaxivität proportional zur molaren Masse.²²⁸ Klinisch genutzte Kontrastmittel wie **Gd-BOPTA** (Multihance) verfügen über Protein-bindende Funktionalitäten um die Relaxivität *in vivo* zu erhöhen.²²⁷ Obwohl beide Faktoren die Relaxivität beeinflussen können spricht der exponentielle Anstieg jedoch für die stärkere Gewichtung der Komplexgeometrie, respektive die Erhöhung der Bindungslänge zwischen Zentralatom und koordiniertem H₂O.

Um die ermittelten Relaxivitäten einzuordnen, sind alle entsprechenden Substanzen in Tabelle 3-3 zusammen mit klinisch häufig genutzten nicht-Organ-spezifische GBCAs aufgeführt. Neben den Relaxivitäten ist die molare Masse angegeben. Die Strukturformeln aller aufgeführten GBCAs sind Abbildung 1-3 in **1.1 Bildgebende Verfahren** zu entnehmen.

Tabelle 3-3 Relaxivitäten r_1 verschiedener Gd-Komplexe in H₂O bei 1.5 T und 310 K.

Substanz	Name	M (g/mol)	r_1 ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Gd-DOTA	-	557.64	2.9
Gd-DOT1AZA	-	621.42	3.0
Gd-DOT2AZA	-	690.49	3.2
Gd-DOT3AZA	-	759.55	3.5
Gd-DOTAZA	-	828.62	4.1
Gd-DTPA	Magnevist	545.56	3.3^{227}
Gd-DOTA	Dotarem	557.64	2.9^{227}
Gd-BOPTA	Multihance	665.71	4.0^{227}
Gd-HP-DO3A	ProHance	558.69	2.9^{227}
Gd-DO3A-butrol	Gadovist	618.74	3.3^{227}

Die Relaxivität des Gd-DOTA-Derivates **Gd-DOT1AZA** ($r_1 = 3.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zeigte eine leicht höhere Relaxivität als das nicht-substituierte **Gd-DOTA** (Dotarem, $r_1 = 2.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und das nicht-ionische **Gd-HP-DO3A** (ProHance, $r_1 = 2.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), während **Gd-DOT2AZA** ($r_1 = 3.2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und **Gd-DOT3AZA** ($r_1 = 3.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) in einem Bereich mit dem

acyclischen **Gd-DTPA** (Magnevist, $r_1 = 3.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und dem nicht-ionischen **Gd-DO3A-butrol** (Gadovist, $r_1 = 3.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) lagen. Der Gd-Komplex **Gd-DOTAZA** ($r_1 = 4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zeigte sogar eine höhere Relaxivität als **Gd-BOPTA** (Multihance, $r_1 = 4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Alle synthetisierten Gd-Komplexe sind also in Bezug auf ihre Relaxivität vergleichbar mit dem klinischen Standard. Ein Vorteil gegenüber allen diskutierten Kontrastmitteln mit Ausnahme von Dotarem ist das intakte DOTA-Grundgerüst, welches eine hohe Inertheit *in vivo* verspricht. Dem acyclischen GBCA Magnevist wurde wegen Bedenken bezüglich der Inertheit 2018 die Zulassung von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) entzogen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit alle Gd-Komplexe mittels Click-Chemie zu modifizieren um auf diesem Wege die *in vivo*-Relaxivität durch Protein-bindende Funktionen zu erhöhen oder einen Targeting-Vektor für zielgerichtete MRT einzuführen. Künftig sollten jedoch zunächst die Relaxivität aller Gd-Komplexe in Serum ermittelt werden, um den Einfluss abschätzen zu können, den die unpolaren Seitenketten durch Wechselwirkungen mit Serumproteinen auf die Relaxivität besitzen.

3.1.4 Zusammenfassung Komplexeigenschaften

In diesem Kapitel konnte die Synthese einer Reihe DOTA-basierter Chelatoren mit unterschiedlicher Seitenkettensubstitution gezeigt werden, welche die Komplexeigenschaften entsprechender Ln-Komplexe signifikant beeinflusste.

Die Komplexgeometrie aller gezeigten Eu-Komplexe in Lösung konnte *via* ^1H NMR durch das Verhältnis der Lanthanoiden-induzierten Verschiebung der Ringprotonen ermittelt werden. Gemäß der bekannten Literatur zeigte sich ein Anstieg des TSAP/SAP-Verhältnis linear proportional zur Seitenkettensubstitution.^{170, 174} In diesem Zusammenhang konnte auch eine Abhängigkeit der Komplexgeometrie in unterschiedlich stark koordinierenden Lösungsmitteln festgestellt werden, die zwar für Ln(III)-Ionen bekannt ist,^{223, 224} jedoch bisher in Bezug auf Ln-Komplexen für MRT-Anwendungen nicht diskutiert wurde.

Der Trend der Komplexgeometrie spiegelte sich auch in den Relaxivitäten der entsprechenden Gd-Komplexe wider. Aufgrund der Verzerrung von TSAP-Konformeren steigt die Bindungslänge zwischen Gd und koordiniertem Lösungsmittel und bedingt somit einen exponentiellen Anstieg der Relaxivität mit steigender Seitenkettensubstitution. Dabei zeigte Der Gd-Komplex **Gd-DOTAZA** höhere Relaxivität ($r_1 = 4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als alle derzeit klinisch eingesetzten nicht-organ-spezifischen GBCAs ($r_1 = 2.9 - 4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) in H_2O bei 310 K und 1.5 T.²²⁷

3.2 Komplexierungsstudien verschiedener Zr-DOTA-Derivate

Das Radioisotop ^{89}Zr ist in den letzten Jahren für immuno-PET-Anwendungen im Fokus akademischen Interesses gewesen.¹⁵⁶ Der Grund hierfür ist die relativ lange Halbwertszeit ($t_{1/2} = 78.5 \text{ h}$),⁵³ die in einem ähnlichen Bereich wie die *in vivo* Halbwertszeit von Biomolekülen wie mAbs liegt. Allerdings ist der Transfer in klinische Studien noch nicht gelungen, da Zr^{4+} eine anspruchsvolle Komplexchemie in wässrigen Lösungen besitzt und bis jetzt kein geeigneter Chelator identifiziert wurde, der Zr^{4+} *in vivo* stabil bindet. Daher leidet Zr-basiertes immuno-PET zurzeit an geringer Markierungswirksamkeit und Akkumulation von Zr im Knochengewebe.⁴² Derzeit ist der beste Kompromiss für die Zr-Chelatbildung das Siderophor Desferrioxamin (**DFO**, Desferal), bzw. das modifizierte Derivat **DFO***, das sich durch erhöhte Komplexstabilität auszeichnet.²²⁹ Pandya *et al.* publizierten 2017 erstmals die Kristallstruktur von **Zr-DOTA** mit zugehörigen Kompetitions- und Serumstabilitätsexperimenten.²³⁰ Dabei zeigte sich, dass **DOTA** in Bezug auf Komplexstabilität nicht nur **DFO**, sondern auch alle anderen gängigen Zr-Chelatoren übertrifft.^{156, 230} Allerdings beziehen sich die Experimente auf den nicht-konjugierten Chelator, welcher Zr^{4+} in einem neutralen Komplex über vier Carboxylate komplexiert. Für die immuno-PET-Anwendung muss der Chelator jedoch über eines dieser Carboxylate mit einem mAb verknüpft werden, wodurch kationische Zr-Komplexe mit erhöhter Lewis-Acidität resultieren. Daher sind die Komplexeigenschaften des neutralen Komplexes **Zr-DOTA** nicht mit den für immuno-PET eingesetzten kationischen Zr-DOTA-Derivaten vergleichbar. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass trotz exzellenter Komplexstabilität von **Zr-DOTA** bis jetzt noch keine DOTA-basierten Zr-Chelatoren publiziert wurden, welche sich für immuno-PET-Anwendungen eignen.¹⁵⁶ Die Zr-Komplexe der Chelatoren **DFO**, **DFO*** und **DOTA** sind in Abbildung 3-12 gezeigt.

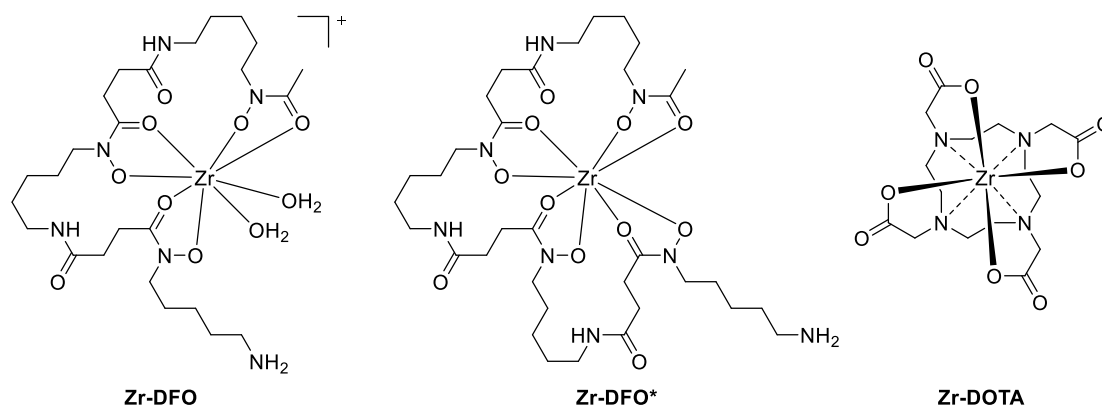
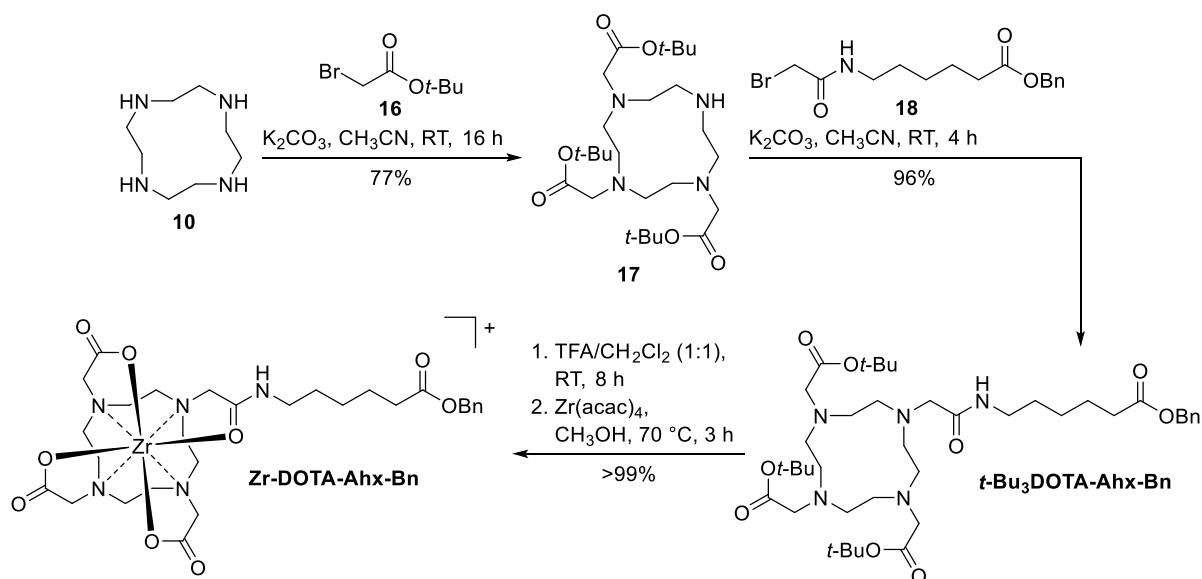


Abbildung 3-12 Strukturformeln der Zr-Komplexe von **DFO**, **DFO*** und **DOTA**.^{229, 230}

3.2.1 Stabilität DOTA-basierter Zr-Komplexe

In einem ersten Versuch sollte ein einfaches DOTA-Derivat synthetisiert werden, welches in Analogie zu anderen DOTA-basierten BFCs über ein Carboxylat des DOTA-Grundgerüsts substituiert ist. Anschließend sollten die Komplexeigenschaften der entsprechenden kationischen Zr-Komplexe evaluiert werden. Dafür wurde das sekundäre Amin **17** nach einem literaturbekannten Protokoll aus Cyclen **10** synthetisiert und mit dem Alkylbromid **18** zum *tert*-Butylester ***t*-Bu₃DOTA-Ahx-Bn** umgesetzt.²³¹ Nach hydrolytischer Spaltung der *tert*-Butylester konnte der freie Chelator mit Zr(acac)₄ zum Zr-Komplex **Zr-DOTA-Ahx-Bn** umgesetzt werden. Die komplette Synthese ist in Schema 3-8 dargestellt.



Schema 3-8 Syntheseroute des Zr-Komplexes **Zr-DOTA-Ahx-Bn** aus Cyclen **10** über vier Reaktionsschritte.

Durch *N*-Alkylierung von Cyclen **10** mit dem kommerziell erhältlichem 2-Brom-Essigsäure-*tert*-butylester **16** und anschließender Alkylierung mit dem Alkylbromid **18** konnte der *tert*-Butylester ***t*-Bu₃DOTA-Ahx-Bn** in Ausbeuten von 77% erhalten werden.^{216, 231} Nach saurer Spaltung der *tert*-Butylester und nachfolgender Behandlung mit Zr(acac)₄ konnte der Zr-Komplex **Zr-DOTA-Ahx-Bn** quantitativ nach Reinigung an RP-Kieselgel (C18) isoliert werden. Allerdings ist anzumerken, dass die Synthese des Komplexes unter wasserfreien Bedingungen mit N₂ als Inertgas erfolgen musste. Ohne diese Vorkehrungen erfolgte die Hydrolyse der Zielverbindung **Zr-DOTA-Ahx-Bn**; mittels LC-MS konnten die jeweiligen Hydrolyseprodukte identifiziert werden. Das LC-MS Chromatogramm der Reaktion ist in Abbildung 3-13 dargestellt. Zu sehen sind die verschiedenen Nebenprodukte **Zr-DOTA** (*t* = 2.20 min), **Zr-DOTA-Ahx** (*t* = 2.20 min), **Zr-DOTA-Ahx-Me** (*t* = 3.60 min), sowie das Produkt **Zr-DOTA-Ahx-Bn** (*t* = 14.63 min) mit entsprechenden Retentionszeiten.

Ergebnisse und Diskussion

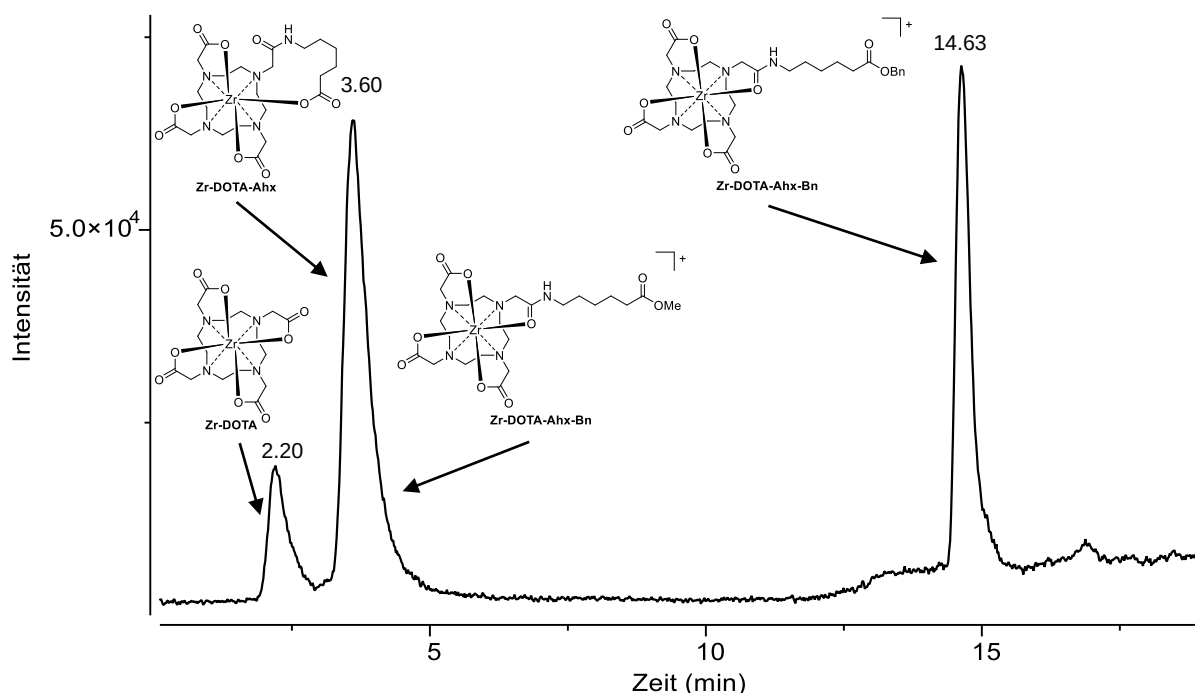
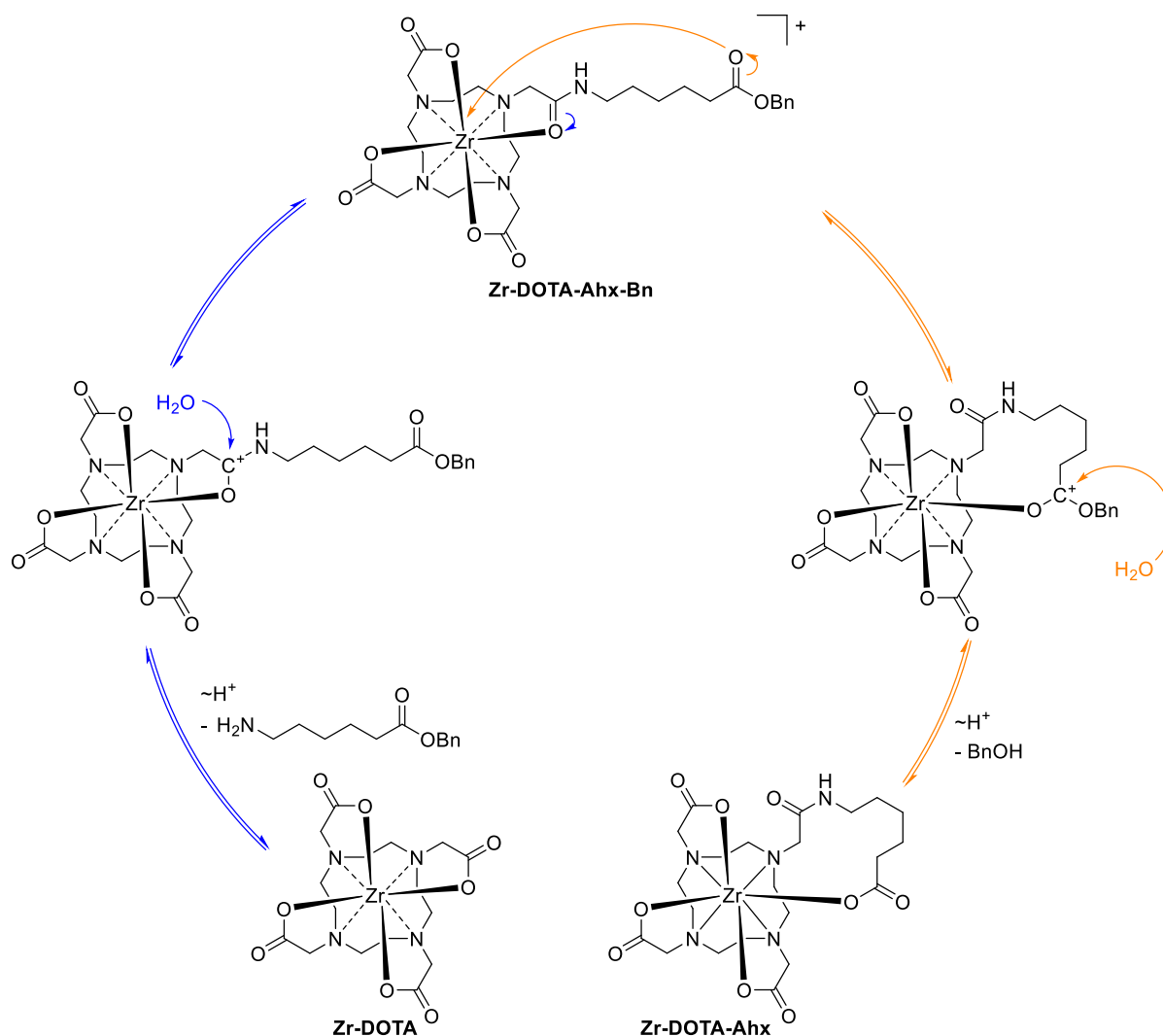


Abbildung 3-13 LC-MS Chromatogramm der Reaktion des Zr-Komplexes **Zr-DOTA-Ahx-Bn** nach 3 h in CH₃OH, aufgenommen mit einer Standardsäule (C18) mit Standardbedingungen (6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie). Hydrolyseprodukte **Zr-DOTA** ($t = 2.20$ min) und **Zr-DOTA-Ahx** ($t = 2.20$ min), sowie **Zr-DOTA-Ahx-Me** ($t = 3.60$ min) wurden neben dem Produkt **Zr-DOTA-Ahx-Bn** ($t = 14.63$ min) mit den entsprechenden Retentionszeiten eingezeichnet.

Für die beobachtete Hydrolyselabilität der kationischen Zr-Komplexe könnte die starke Lewis-Acidität von Zirkonium verantwortlich gewesen sein, sodass Koordinationspartner wie das Amid des DOTA-Acetatrestes oder der Benzylester des Aminohexansäurerestes für einen nukleophilen Angriff intramolekular aktiviert werden. Dabei kann zum einen H₂O als Nukleophil reagieren und so das Amid bzw. den Benzylester hydrolysieren. Zum anderen kann das Lösungsmittel CH₃OH als Nukleophil reagieren und den Methylester **Zr-DOTA-Ahx-Me** bilden. Die beiden postulierten Hydrolysereaktionen sind in Schema 3-9 dargestellt. Zu sehen ist die Hydrolyse des aktivierten Amids (blau) und die Spaltung des Benzylesters (orange).

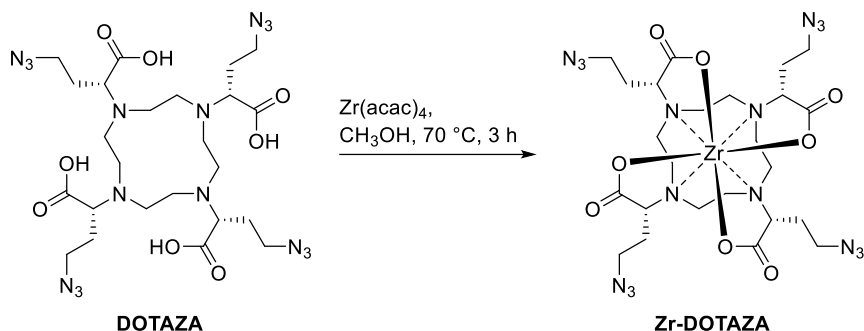


Schema 3-9 Darstellung der Hydrolysereaktionen, die zur Bildung von Nebenprodukten bei der Komplexbildung führen. Zu sehen ist die Amidhydrolyse des DOTA-Acetatrestes (blau) und die Esterhydrolyse der Aminohexansäurerestes (orange).

Über den orangefarbenen Reaktionsweg kann auch der Methylester **Zr-DOTA-Ahx-Me** erhalten werden, wenn der Benzylester durch CH_3OH statt H_2O angegriffen wird. Aus der Hydrolyselabilität geht hervor, dass kationische Zr-Komplexe im Gegensatz zu neutralen Zr-Komplexen Lewis-sauer gespalten werden. Dies erklärt das in der Literatur dominierende Paradigma, nachdem DOTA als Effektormolekül für Zr-PET-Applikationen ungeeignet ist. Dies ist allerdings weniger auf die Komplexeigenschaften von Zr-DOTA zurückzuführen, sondern liegt in der Derivatisierung über ein Carboxylat begründet, welche zu kationischen und damit hydrolyseempfindlichen Komplexen führte. Dieses Problem adressiert der Chelator **DOTAZA**, welcher die Möglichkeit zur Modifikation bietet und gleichzeitig Zr^{4+} über vier Carboxylate in einem neutralen Komplex bindet. Daher sollten im Folgenden verschiedene DOTAZA-basierte Zr-Komplexe synthetisiert und evaluiert werden.

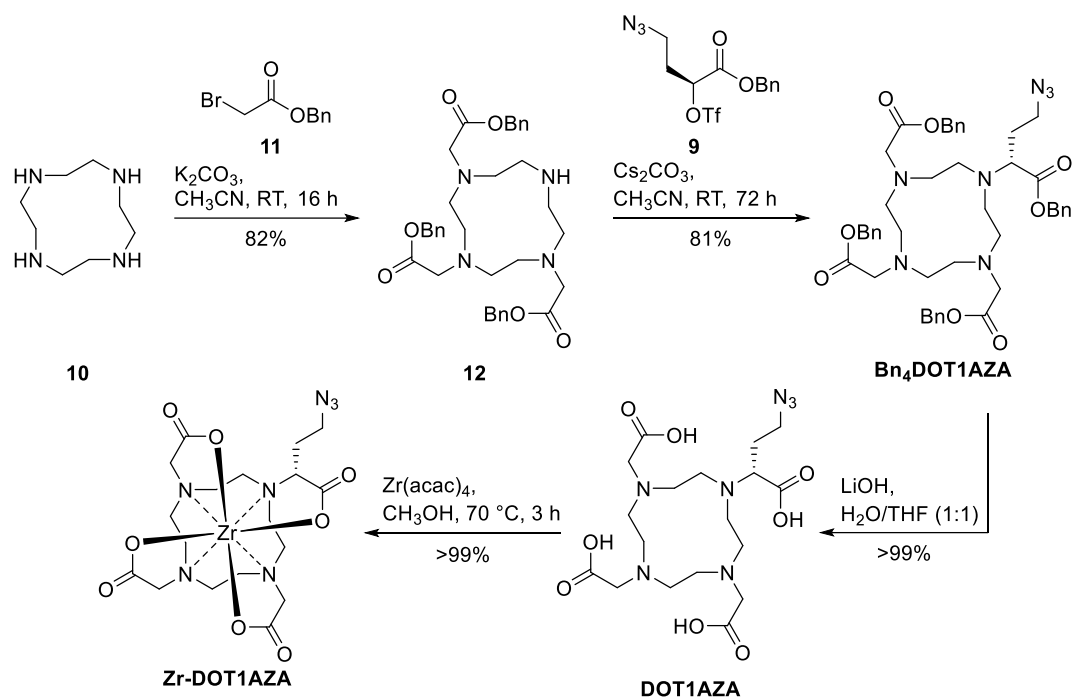
3.2.2 Synthese neuartiger DOTAZA-basierte Zr-Komplexe

Um die Zr-induzierte Hydrolysereaktion zu vermeiden, bietet der Chelator **DOTAZA** durch die octadentate Koordinationssphäre mit vier anionischen Carboxylaten, zusammen mit der Möglichkeit der Derivatisierung *via* Click-Chemie, eine strukturelle Alternative.¹⁶⁷ Die Synthese des Zr-Komplexes **Zr-DOTAZA** ist in Schema 3-10 dargestellt.



Schema 3-10 Synthese des Zr-Komplexes **Zr-DOTAZA**.

Zwar konnte der erfolgreiche Umsatz des Chelators **DOTAZA** zum entsprechenden Zr-Komplex **Zr-DOTAZA** massenspektrometrisch nachgewiesen werden, allerdings zeigte das Produkt Löslichkeitsprobleme. Der Komplex **Zr-DOTAZA** löste sich lediglich in DMSO bei 100 °C vollständig. Um die Symmetrie des Komplexes zu verringern und damit gleichzeitig die Löslichkeit zu verbessern, wurde der Chelator **DOT1AZA** in Anlehnung an das bekannte Protokoll von DOTAZA synthetisiert.¹⁶⁷ Zeitgleich wurde von Wiener *et al.* der freie Chelator **DOT1AZA** aus dem entsprechenden Methylester synthetisiert.¹⁷⁷ In Schema 3-11 ist die Synthese des Chelators **DOT1AZA** ausgehend von Cyclen, sowie die anschließende Komplexierung mit Zr dargestellt.



Schema 3-11 Synthese des Zr-Komplexes **Zr-DOT1AZA** ausgehend von Cyclen **10**.

Die Synthese des Makrocyclus **12** verlief in Ausbeuten entsprechend der Literatur (82%).²⁰⁹ Anschließend wurde durch *N*-Alkylierung mit dem Triflat **9** und Cs_2CO_3 als Base der Benzylester **Bn₄DOT1AZA** in einer Ausbeute von 81% erhalten. Der freie Chelator **DOT1AZA** wurde nach Verseifung der Benzylester mit $LiOH$ und Reinigung an RP-Kieselgel quantitativ isoliert. Nach Umsetzung mit $Zr(acac)_4$ konnte der Zr-Komplex **Zr-DOT1AZA** in quantitativer Ausbeute isoliert werden. Dies ist der erste bekannte DOTA-basierte Zr-Komplex, der über das Azid für weitere Modifikation mittels Click-Chemie Möglichkeiten zur Modifizierung bietet. Um die von Pandya *et al.* postulierte Stabilität von Zr-DOTA-Komplexen zu überprüfen,²³⁰ sollten Ligandenaustauschexperimente durchgeführt werden. Dieser Kompetitionsassay sollte die Stabilität des Komplexes **Zr-DOT1AZA** in Bezug auf Transmetallierung testen, indem dieser mit 100 Äq des Siderophors **DFO** in PBS-Puffer bei 37 °C für 7 d gerührt wurde. Die Stabilität wurde anschließend massenspektrometrisch zum einen über die Detektion des freien Chelators **DOT1AZA**, zum anderen durch die Detektion des Zr-Siderophors **Zr-DFO** untersucht. In Abbildung 3-14 ist das Chromatogramm der Kompetitionsstudie mit dem Extrahierten Ionenchromatogramm (EIC) der Transmetallierungsprodukte gezeigt.

Ergebnisse und Diskussion

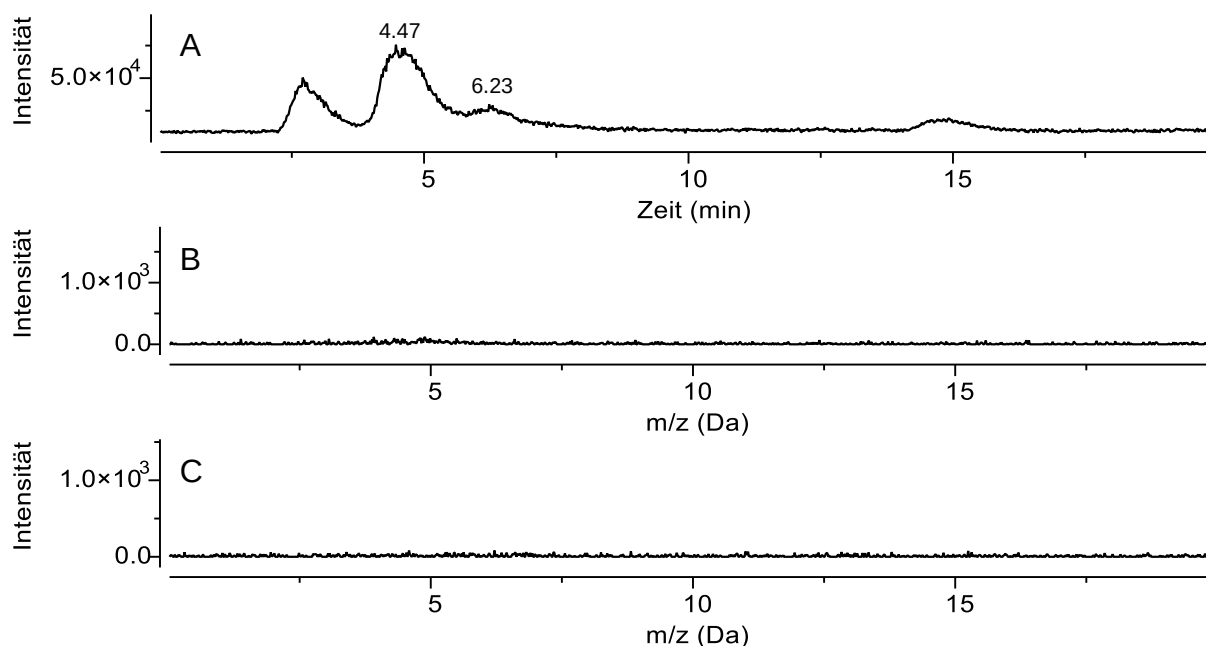
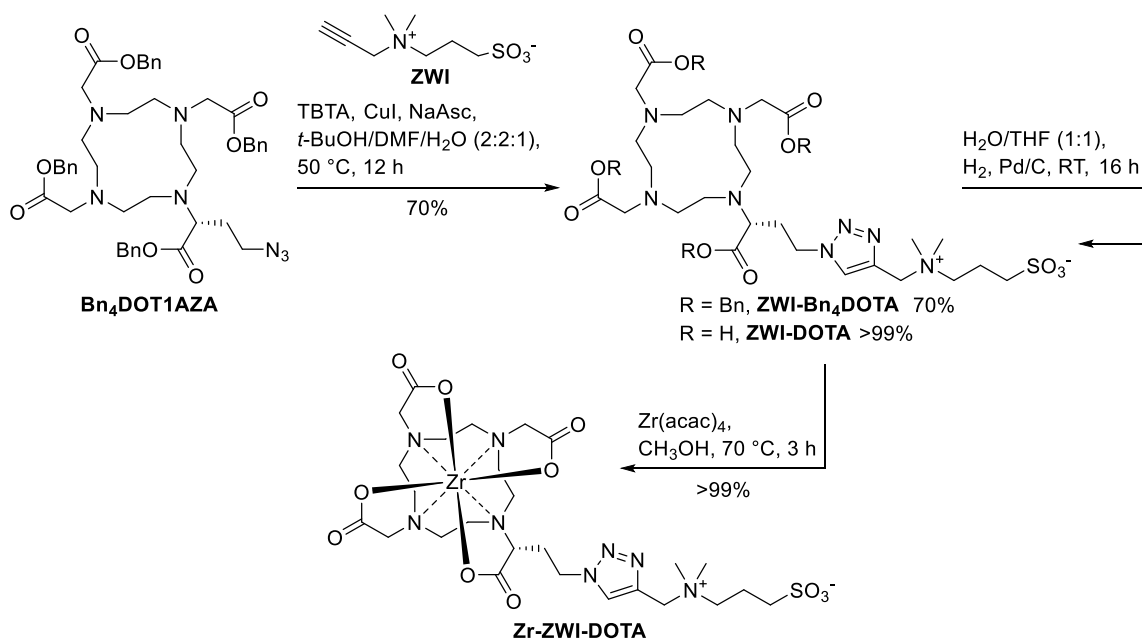


Abbildung 3-14 LC-MS Chromatogramme der Konkurrenz des Zr-Komplexes **Zr-DOT1AZA** ($t_R = 4.47$ min) gegen das Siderophor **DFO** ($t_R = 6.23$ min). Die Chromatogramme wurden unter Standardbedingungen aufgenommen (**6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**) und entsprechen der Auftragung der Intensität gegen die Retentionszeit (min). (A) Totales Ionenchromatogramm (TIC) nach 7 d Reaktionszeit. (B) EIC des freien Chelators **DOT1AZA** ($m/z = 474.2307 \pm 0.1$ Da) nach 7 d Reaktionszeit. (C) EIC des Zr-Komplexes **Zr-DFO** ($m/z = 647.2341 \pm 0.1$ Da) nach 7 d Reaktionszeit.

Neben dem Zr-Komplex **Zr-DOT1AZA** ($t_R = 4.47$ min) und dem Siderophor **DFO** ($t_R = 6.23$ min) konnten nach 7 d keine Transmetallierungsprodukte detektiert werden. Der Wettbewerbsassay bestätigt die *in vitro*-Studien von Pandya *et al.*,²³⁰ die keinen Ligandenaustausch von **Zr-DOTA** beobachteten. Anhand dieser Datenlage ist davon auszugehen, dass DOTAZA-basierte Chelatoren einen exzellenten Ansatz für neue BFCs in zielgerichteten Zr-PET-Anwendungen bieten.

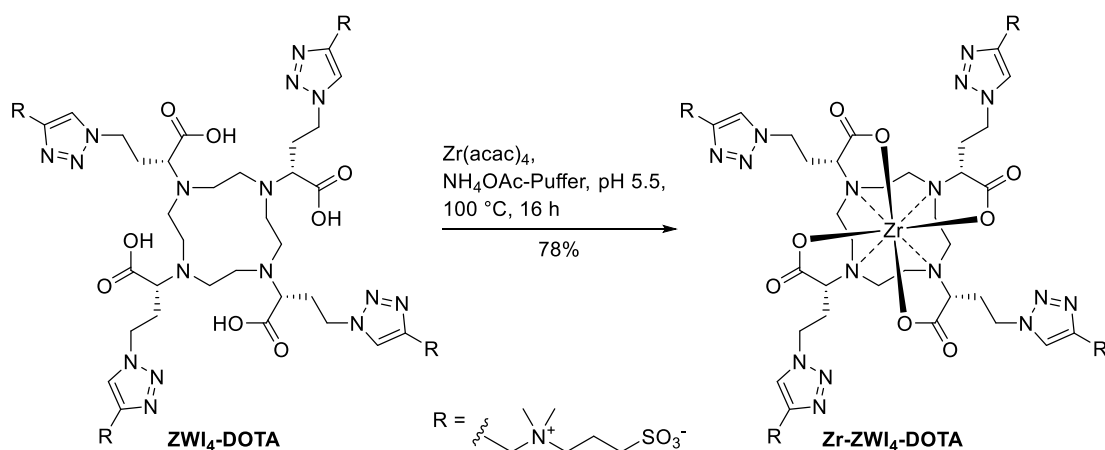
Basierend darauf sollten im Folgenden anhand des Azids **Bn₄DOT1AZA** ein Protokoll zur Synthese modifizierter Chelatoren mittels CuAAC entwickelt werden. In Schema 3-12 ist die Synthese eines modifizierten Chelators **ZWI-DOTA** und die Synthese des entsprechenden Zr-Komplexes **Zr-ZWI-DOTA** darstellt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-12 Synthese des modifizierten Zr-Komplexes **Zr-ZWI-DOTA** aus dem Benzylester **Bn₄DOT1AZA**.

Die Synthese verlief in Anlehnung an ein bekanntes Protokoll für Cu-katalysierte Alkin-Azid-1,3-Cycloaddition (CuAAC) mit anschließender hydrogenolytischer Spaltung der Benzylester über Pd/C.¹⁶⁷ Der freie Chelator **ZWI-DOTA** wurde nach Reinigung an RP-Kieselgel mit einer Gesamtausbeute von 70% über zwei Stufen isoliert. Nach anschließender Behandlung mit Zr(acac)₄ konnte der Zr-Komplex **Zr-ZWI-DOTA** quantitativ isoliert werden. Analog zu dem freien Chelator **ZWI-DOTA** sollte auch der zuvor nach bekanntem Protokoll synthetisierte Chelator **ZWI₄-DOTA** in den entsprechenden Komplex überführt werden (Schema 3-13).

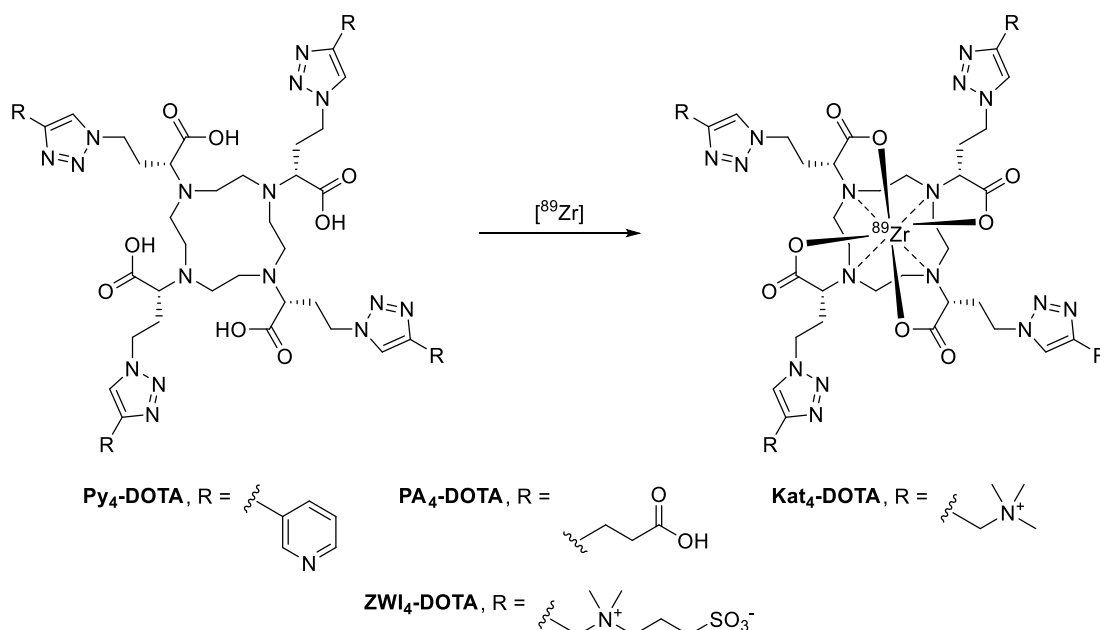


Schema 3-13 Synthese des Zr-Komplexes **Zr-ZWI₄-DOTA** aus dem freien Chelator **ZWI₄-DOTA**.

Der Chelator wurde nach einer literaturbekannten Methode synthetisiert.¹⁶⁷ Der entsprechende Zr-Komplex **Zr-ZWI₄-DOTA** wurde nach der Reinigung an RP-Kieselgel in einer Ausbeute von 78% isoliert. Die dargestellten zwitterionischen Zr-Komplexe **Zr-ZWI-DOTA** und **Zr-**

ZWI₄-DOTA beweisen, dass DOTAZA als Makrocyclus nicht nur stabile Zr-Komplexe bildet, sondern auch die Möglichkeit einer Modifikation mittels Click-Chemie bieten.

Darauf aufbauend sollte eine bereits synthetisierte Bibliothek modifizierter DOTAZA-Derivate in die entsprechenden radiomarkierten ⁸⁹Zr-Komplexe überführt werden, und der Einfluss der Modifizierungen in Biodistributionsstudien evaluiert werden. Neben der Verbesserung der Löslichkeit sollen die eingeführten Funktionalitäten auch die Pharmakokinetik der Komplexe beeinflussen. Aus diesem Grund wurden kationische, anionische und zwitterionische Reste für die Modifizierung gewählt, da diese unspezifische Wechselwirkungen mit Serumproteinen wie HSA *in vivo* beeinflussen können (Abbildung 3-17).¹⁸⁶ Des Weiteren sollte ein Pyridinylrest, welcher die Affinität zu Proteinen wie HSA erhöhen sollte, eingeführt und untersucht werden (Abbildung 3-17).²³² Alle zu testenden Chelatoren wurden zuvor in anderen Arbeiten synthetisiert.^{184, 233} Die Synthese der radiomarkierten ⁸⁹Zr-Komplexe wurden in Kooperation mit Kelly Henry und Jason S. Lewis am Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York durchgeführt und sind in Schema 3-14 dargestellt.



Schema 3-14 Synthese der ⁸⁹Zr-markierten Komplexe ⁸⁹Zr-Py₄-DOTA, ⁸⁹Zr-PA₄-DOTA, ⁸⁹Zr-Kat₄-DOTA und ⁸⁹Zr-ZWI₄-DOTA aus den entsprechenden freien Chelatoren.

Die freien Chelatoren wurden mit ⁸⁹ZrCl₄ in die entsprechenden radiomarkierten Zr-Komplexe ⁸⁹Zr-ZWI₄-DOTA (grün), ⁸⁹Zr-PA₄-DOTA (blau), ⁸⁹Zr-Kat₄-DOTA (grau) und ⁸⁹Zr-Py₄-DOTA (magenta) überführt und sowohl in einem *in vitro*-Assay auf ihre Serumstabilität, als auch mit einem Mausmodell auf ihre Pharmakokinetik *in vivo* untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Abbildung 3-15 graphisch aufgearbeitet.

Ergebnisse und Diskussion

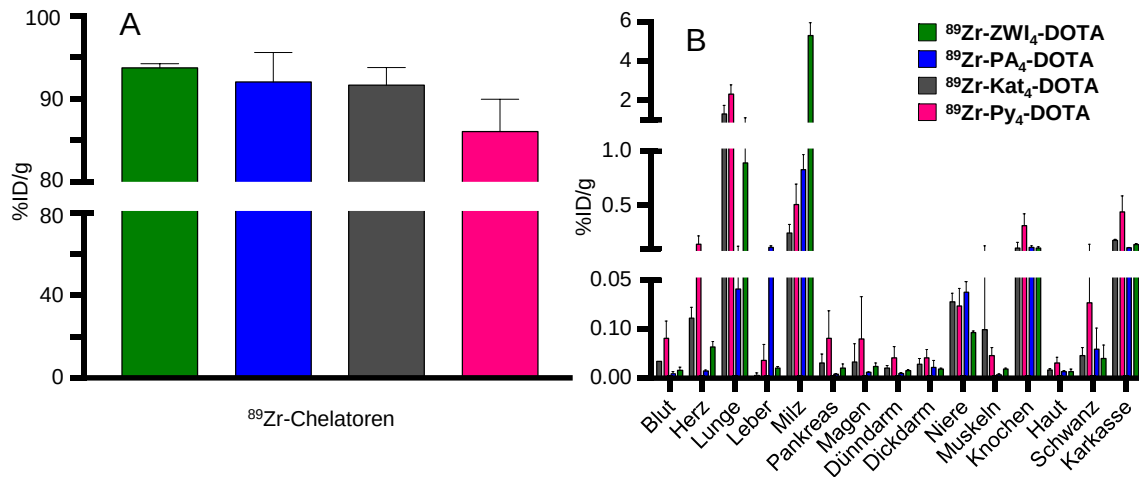


Abbildung 3-15 (A) Serumstabilität der ^{89}Zr -Chelatoren $^{89}\text{Zr-ZWl}_4\text{-DOTA}$ (grün), $^{89}\text{Zr-PA}_4\text{-DOTA}$ (blau), $^{89}\text{Zr-Kat}_4\text{-DOTA}$ (grau) und $^{89}\text{Zr-Py}_4\text{-DOTA}$ (magenta) *in vitro* mit FBS nach 24 h bei 37 °C (%ID/g für jeden Chelator). (B) Biodistribution der ^{89}Zr -Chelatoren in einem Standard-Mausmodell nach 24 h (%ID/g für jedes Organ).

Obwohl alle Chelatoren eine gute Inertheit zwischen 90% und 95% *in vitro* zeigen, scheint trotz der eingeführten Modifizierungen Transmetallierung aufzutreten. Dies könnte jedoch auf die Evaluation mittels Kieselsäure-getränkter Glasfaserstreifen (iTLC-SA) zurückzuführen sein, da die Substanzen unterschiedlich stark an Serumproteine binden und auf diese Weise an der Retention gehindert werden. Dieser Trend spiegelt sich auch in der Polarität der Substanzen wider, da ausschließlich der wenig polare Zr-Komplex $^{89}\text{Zr-Py}_4\text{-DOTAZA}$ verminderte Stabilität zeigt. Die *in vivo* Studie unterstreicht die Komplexstabilität, bei der sich keine signifikante Akkumulation radioaktiven Materials im Knochengewebe zeigte, wie es bei labilen Zr-Komplexen der Fall wäre. Neben der geringen Akkumulation in den Knochen und der Karkasse zeigte der zwitterionische ^{89}Zr -Komplex $^{89}\text{Zr-ZWl}_4\text{-DOTAZA}$ gewebespezifische Akkumulation in der Milz, die anhand der aktuellen Datenlage nicht abschließend geklärt werden konnte. Der anionische ^{89}Zr -Komplex $^{89}\text{Zr-PA}_4\text{-DOTAZA}$ zeigte als einzige Substanz eine Anreicherung in der Leber, die jedoch nicht signifikant höher war als die Akkumulation in Milz oder Knochen. Die ^{89}Zr -Komplexe $^{89}\text{Zr-Kat}_4\text{-DOTAZA}$ und $^{89}\text{Zr-Py}_4\text{-DOTAZA}$ zeigten eine ungewöhnliche Gewebespezifität zu Lunge und Herz. Dies könnte auf die exzellente Löslichkeit des kationischen ^{89}Zr -Komplexes $^{89}\text{Zr-Kat}_4\text{-DOTAZA}$ und die erhöhten HSA-Bindungsaffinität des Pyridinylderivates $^{89}\text{Zr-Py}_4\text{-DOTAZA}$ zurückzuführen sein, die eine Akkumulation in gut durchblutetem Gewebe erklären.

3.2.3 Zusammenfassung Komplexbildungsstudien

In diesem Kapitel wurde die Rolle des Chelators DOTA im Zusammenhang mit Zr-PET-Anwendungen diskutiert. Die Untersuchungen zeigten dabei in Stabilitätsassays die Hydrolyselabilität carboxylat-substituierter Zr-DOTA-Komplexe, welche durch die Lewis-Säure Acidität von Zr hervorgerufen wird (Schema 3-9). Die beobachtete Labilität der DOTA-basierten Komplexe könnte ein Erklärungsansatz für den bisher limitierten Einsatz von DOTA-Derivaten als Chelatoren für Zr-PET-Anwendungen sein.

Des Weiteren konnte mit der Synthese des Zr-Komplexes **Zr-DOT1AZA** erstmals ein DOTA-basierter Komplex synthetisiert werden, der exzellente Komplexstabilität durch die Bindung von Zr^{4+} über vier Carboxylate mit der Modifizierbarkeit mittels Click-Chemie vereint. Auf dieser Grundlage konnten die radiomarkierten ^{89}Zr -Komplexe **$^{89}\text{Zr-ZWI-DOTA}$** und **$^{89}\text{Zr-ZWI}_4\text{-DOTAZA}$** mit modifizierter Pharmakokinetik synthetisiert werden. Die exzellente Serumstabilität dieser ^{89}Zr -Komplexe war dabei vergleichbar mit der publizierten Stabilität für den nicht-modifizierten Komplex **Zr-DOTA**. Des Weiteren wurde die Biodistribution der DOTA-basierten ^{89}Zr -Komplexe in einem Mausmodell untersucht. Dabei zeigte sich neben guter Stabilität aller ^{89}Zr -Komplexe *in vivo* eine geringe Gewebespezifität abhängig von den unterschiedlichen Modifikationen der Komplexe. Es ist anzumerken, dass dieser *in vivo*-Assay einer der ersten ist, der die *in vivo*-Eigenschaften radiomarkierter DOTA-basierter ^{89}Zr -Komplexen beschreibt.

3.3 Exkurs Oberflächenbeschichtung

Die Nahinfrarot (NIR)-basierte Bildgebung ist zu einer wichtigen diagnostischen Methode, insbesondere für intraoperatives Imaging geworden.^{60, 61} In der letzten Dekade wurden besonders Quantumdot (QD)-basierte NIR-Sonden aufgrund der Fluoreszenzintensität,⁶² des größenabhängigen Emissionsmaximums und der Fotostabilität gut erforscht.⁶⁵ Allerdings ist neben Faktoren wie der Biotoxizität oder der Quantenausbeute auch die Fluoreszenzlebensdauer ein optimierbarer Parameter.⁶¹ Ein Ansatz ist die Verlängerung der Lebensdauer durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen einem QD und einem Fluorophor.²³⁴ Ln-Komplexe sind bekannte Lichtemitter über einen Ligand-Metall-Ladungstransfer (LMCT),²³⁵ der zu einer langen Lumineszenzlebensdauer (μs - ms) führt.⁶⁰ Verschiedene Systeme, bei denen Ln(III)-Komplexe als Donoren und QDs als Akzeptor angewendet wurden, sind bereits veröffentlicht.²³⁶⁻²⁴⁰ In Abbildung 3-16 sind die Lumineszenzeigenschaften von einem QD (A) und einem QD-Ln-FRET-Paar (B) schematisch dargestellt.

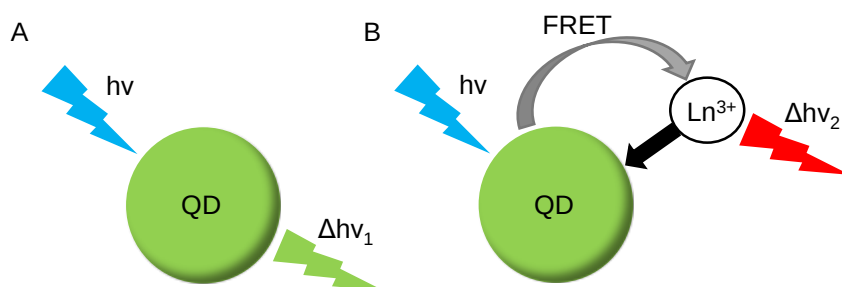


Abbildung 3-16 Schematische Darstellung von (A) Absorption (blau) und Emission (grün) von QDs, und (B) Absorption (blau) und LMCT-beeinflusste Emission (rot) eines FRET-Paar aus QD und Ln-Komplex mit Ankermolekülen (schwarz).⁶³

Ein essenzieller Faktor der Wechselwirkung ist neben der Fluoreszenzlebensdauer die physikalische Nähe der beiden Chromophore, wie aus Gleichung (3-2) hervorgeht.²⁴¹

$$k_{\text{ET}} = \frac{R_0^6}{\tau_D \times r^6} \quad (3-2)$$

Die Energietransferrate k_{ET} ist dabei abhängig von der Fluoreszenzlebensdauer τ_D des Donors (QD), dem Abstand zwischen den Chromophoren r und dem Förster-Radius R_0 , der als Abstand definiert wird, bei dem die Effizienz des Energietransfers zwischen Donor und Akzeptor 50% beträgt. Der Abstand bestimmt k_{ET} als Faktor r^{-6} , daher bewirken kleinste Änderungen einen großen Effekt und der Abstand zwischen Donor und Akzeptor sollte minimal sein. Dies könnte im Fall von Nanopartikeln durch Chemisorption geeigneter Ankermoleküle auf der Oberfläche erreicht werden.²⁴² Phosphonate und Phosphonsäuren sind dafür bekannte Struktur-motive.²⁴³⁻²⁴⁷ Die Modifikation von Ankermolekülen mit einem Ln(III)-Chelator ist ein

vielversprechender Ansatz für QD-basierte NIR-Sonden mit langer Fluoreszenzlebensdauer. Der Chelator DOTAZA vereint diese Eigenschaften und eröffnet die Möglichkeit zur Kombination von Oberflächen-bindende Resten mittels Click-Chemie und exzellenten Komplexbildungs-eigenschaften mit einer Reihe von Lanthanoiden.^{167, 172}

Dieser Exkurs soll eine weitere Anwendungsmöglichkeit des vielseitigen Chelators DOTAZA aufzeigen. Dafür sollten zunächst Phosphonsäurereste mittels Click-Chemie eingeführt werden und der entsprechende Eu-Komplex auf Nanopartikeln immobilisiert werden. Aus den daraus gewonnen Erkenntnissen über die grundlegenden Bindungseigenschaften und den Besetzungsgrad der Moleküle auf den Partikeln sollte ermittelt werden, ob das Konzept auf geeignete QDs übertragbar ist. Dies würde einen modularen Ansatz für FRET-Systeme mit maßgeschneiderten Fluoreszenzeigenschaften ermöglichen. Das Konzept ist schematisch in Abbildung 3-17 dargestellt.

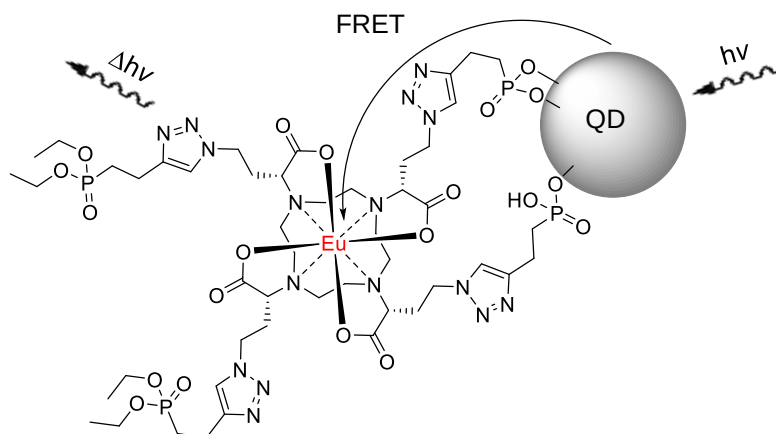
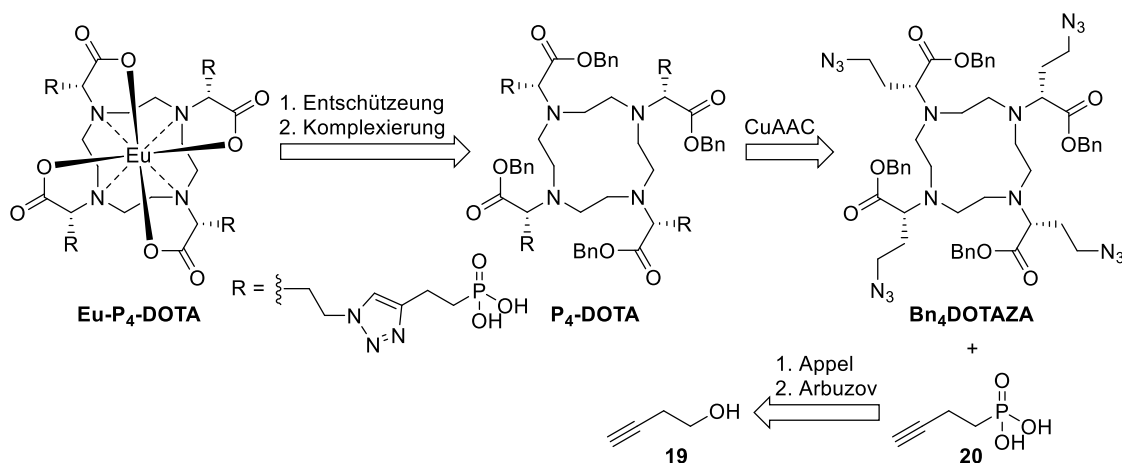


Abbildung 3-17 Schematische Darstellung eines möglichen FRET-Paars zwischen Nanopartikel und Eu-DOTAZA-Komplex.

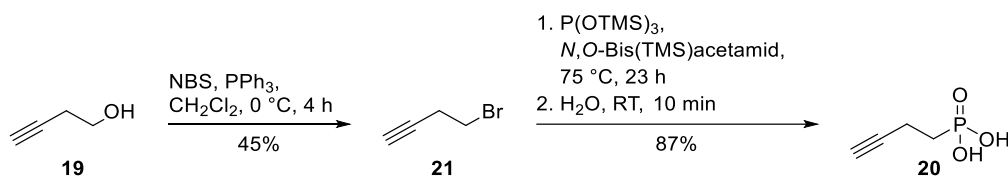
3.3.1 Synthese des DOTAZA-basierten Ankermoleküls

Die Retrosynthese des mittels Click-Chemie modifizierten DOTAZA-basierten Eu-Komplexes **Eu-P₄-DOTA** mit Phosphonaten als Ankermolekülen für die Immobilisierung auf NPs ist in Schema 3-15 dargestellt. Das Zielmolekül sollte ausgehend von dem Azid **Bn₄DOTAZA** in einer CuAAC mit einer Alkin-Phosphonsäure dargestellt werden, die zuvor aus 3-Butinol **19** mit einer Appel-Reaktion und anschließender Arbuzov-Reaktion gewonnen werden sollte.



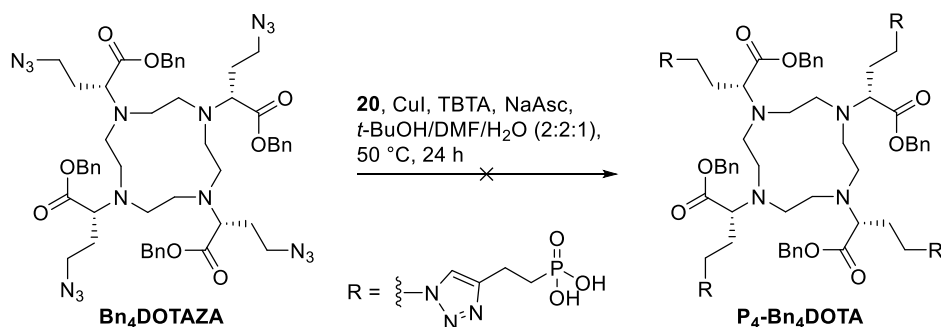
Schema 3-15 Retrosynthese des Eu-Komplexes **Eu-P₄-DOTA** für die Oberflächenimmobilisierung.

Die Synthese der Phosphonsäure aus dem kommerziell erhältlichen 3-Butinol **19** ist in Schema 3-16 dargestellt.



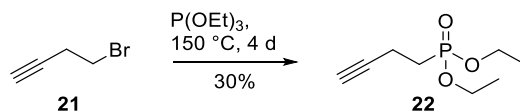
Schema 3-16 Synthese der Alkinphosphonsäure **20** aus dem Alkohol **19**.

Der Alkohol **19** wurde entsprechend der Literatur mit PPh₃ und NBS in einer Appel-artigen Reaktion mit 45% Ausbeute zu 4-Brombutin umgesetzt.^{248, 249} Anschließend wurde die Phosphonsäure **20** nach einem bekannten Protokoll von Wanat *et al.* durch eine Arbuzov-ähnliche Reaktion in einer Ausbeute von 87% erhalten.²⁵⁰⁻²⁵² Allerdings konnte die Phosphonsäure **20** in einer folgenden CuAAC nicht mit dem Azid **Bn₄DOTAZA** umgesetzt werden. Der entsprechende Syntheserversuch ist in Schema 3-17 dargestellt.



Schema 3-17 Click-Reaktion des Azids **Bn₄DOTAZA** mit der Phosphonsäure **20**.

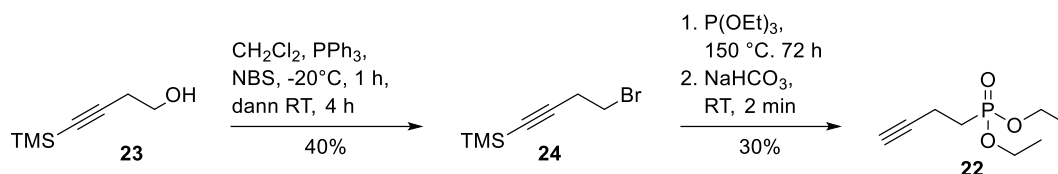
Zwar zeichnet sich die CuAAC im Allgemeinen durch ihre hohe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen aus,²⁵³ jedoch sind in der Literatur bis jetzt keine CuAAC Click-Reaktionen mit freien Phosphonsäuren bekannt. In der Regel wird die Reaktion erst nach einer Veresterung durchgeführt.^{250, 254-257} Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Funktionalität nicht für diesen Reaktionstypus geeignet ist. Grund dafür könnten die exzellenten Metallbindungseigenschaften von Phosphonsäuren sein, die das für die Reaktion nötige Cu komplexieren und so die Reaktion inhibieren.²⁵⁸ Allerdings ist eine Immobilisierung von TiO₂-Oberflächen auch mit Phosphonsäureestern bekannt,²⁴⁴ die bereits mittels CuAAC modifiziert werden konnten.^{256, 259-261} Daher sollte für die Click-Reaktion der Alkin-Phosphonsäureester **22** nach einer bekannten Methode synthetisiert werden.²⁶² Die Reaktion ist in Schema 3-18 dargestellt.



Schema 3-18 Synthese des Phosphonsäurediethylesters **22** aus dem Alkinbromid **21**.

Die Darstellung des Alkin-Phosphonsäureesters erfolgte über eine Michaelis-Arbuzov Reaktion, die dünnschichtchromatographisch bis zum kompletten Umsatz verfolgt wurde. Allerdings zeigte sich, dass sich entstandenes Triethylphosphit nach der Reaktion säulenchromatographisch nicht vom Produkt trennen ließ. Mittels Kugelrohrdestillation konnten 30% Produkt isoliert werden. In weiteren Fraktionen der Destillation konnte neben dem Produkt **22** auch Triethylphosphat *via* ³¹P NMR nachgewiesen werden ($\delta = 0.44$ ppm). Aus diesem Grund sollte eine alternative Syntheseroute gefunden werden, die eine ökonomische Synthese des Alkin-Phosphonsäurediethylesters ermöglicht. Die Synthese sollte nach bekannten Methoden aus dem kommerziell erhältlichen Alkohol **23** synthetisiert werden und ist in Schema 3-19 dargestellt.²⁵⁰ Ziel der Synthese war eine vereinfachte Reinigung des Alkin-Phosphonsäureesters **22** durch die eingeführte terminale TMS-Schutzgruppe des Alkins.

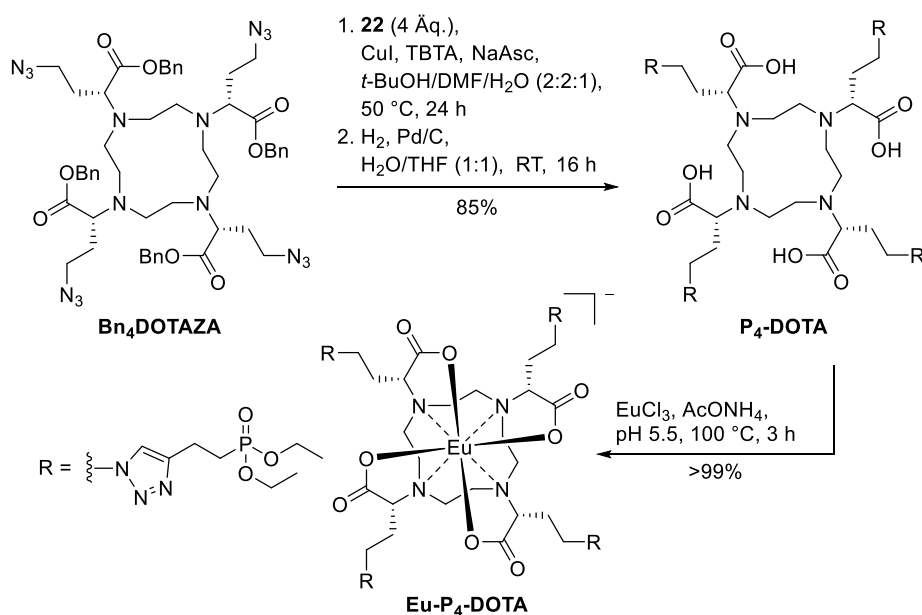
Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-19 Alternative Syntheseroute des Phosphonsäurediethylesters **22** aus dem Alkohol **23**.

Die Synthese des silylierten Alkinbromids **24** erfolgte entsprechend der Literatur in einer Ausbeute von 40%.²⁶³ Die anschließende Synthese des Phosphonsäureesters **22** erfolgte nach der bereits verwendeten Methode von Simpson *et al.* in einer Ausbeute von 30%.²⁶² Auch wenn sich die Reinigung im Gegensatz zum nicht-silylierten Phosphonsäurediethylester **22** einfacher gestaltete, bot diese Syntheseroute keine ökonomische Alternative zur bereits vorgestellten Methode (Schema 3-18).

Der zuvor synthetisierte Phosphonsäureester **22** sollte anschließend in einer CuAAC mit dem Azid **Bn₄DOTAZA** umgesetzt und nach hydrogenolytischer Spaltung der Benzylester zum Eu-Komplex **Eu-P₄-DOTA** umgesetzt werden. Die komplette Synthese ist in Schema 3-20 dargestellt.



Schema 3-20 Synthese des Eu-Komplexes **Eu-P₄-DOTA** aus dem Benzylester **Bn₄DOTAZA**.

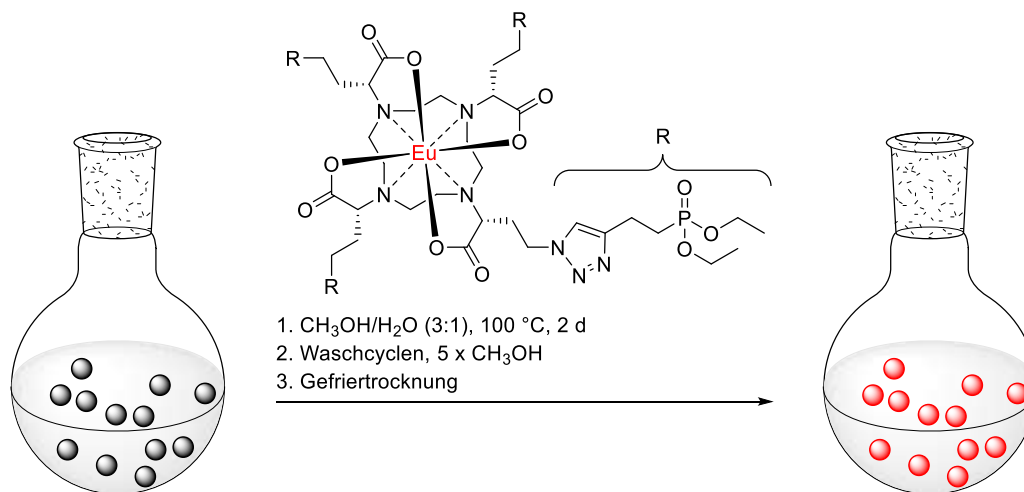
Die CuAAC des Alkin-Phosphonsäureesters **22** mit dem Azid **Bn₄DOTAZA** mit anschließender hydrogenolytischer Spaltung der Benzylester über Pd/C verlief in guter Ausbeute von 85%. Nach anschließender Umsetzung mit EuCl_3 konnte der korrespondierende Eu-Komplex **Eu-P₄-DOTA** quantitativ nach Reinigung an RP-Kieselgel (C18) isoliert werden.

3.3.2 Immobilisierungsexperimente

Die in Schema 3-20 synthetisierten Eu-Komplexe wurden anschließend auf TiO₂-Nanopartikel immobilisiert, um erste Oberflächenwechselwirkungen (oder Bindungseigenschaften) der Phosphonsäureester zu evaluieren. Dafür musste zunächst die für die Immobilisierung erforderliche Stoffmenge zuvor synthetisierter Eu-Komplexe mittels der spezifischen Oberfläche (51.8 m²/g) der TiO₂-Nanopartikel errechnet werden, wobei eine Oberflächenbesetzung von einem Molekül pro nm² angenommen wurde. Die Annahme stützt sich auf die Topologie des Moleküls und die Bindungsmodi in der Literatur beschriebener einfacher Phosphonsäuren.^{243, 246, 264, 265} Die maximale Beladungsdichte $B_{\max}$ wurde mit der Formel (3-3) berechnet.

$$B_{\max} = \frac{A_s \times n}{N_A} = \frac{51.8 \times 10^{12} \text{ nm}^2/\text{mg} \times 1 \text{ nm}^{-2}}{6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}} = 6.02 \text{ nmol/mg} \quad (3-3)$$

In der Reaktion wird die maximale Beladungsdichte $B_{\max}$ für 1 Molekül pro nm² durch die spezifische Oberfläche A_s , die Anzahl der Moleküle n pro nm² und die Avogadro-Konstante N_A definiert. Die maximale Beladungsdichte der eingesetzten TiO₂-Nanopartikel entspricht 6.02 nmol/mg. Damit konnten die Immobilisierungen mit nach einem literaturbekannten Protokoll von Gao *et al.* durchgeführt werden.²⁴⁵ Der schematische Verlauf der Immobilisierung ist in Schema 3-21 dargestellt.



Schema 3-21 Schematische Durchführung der Beschichtung von TiO₂ Nanopartikeln.

Die TiO₂-Nanopartikel wurden in CH₃OH/H₂O (3:1) suspendiert und mit einem 4-fachen Überschuss des Eu-Komplexes **Eu-P4-DOTA** versetzt. Zeitgleich wurden als Negativkontrolle TiO₂-Partikel identisch, allerdings ohne Zusatz des Eu-Komplexes behandelt. Beide Ansätze wurden je zweimal durchgeführt. Die Proben wurden 2 d bei 100 °C gerührt. Anschließend

wurde die Suspension zentrifugiert und gewaschen. Nach insgesamt 5 Waschcyclen wurde der Rückstand gefriergetrocknet und die Nanopartikel analysiert. Im Folgenden sollen die Analysemethoden kurz beschrieben werden.

Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Die EDX ermöglicht eine elementspezifische Charakterisierung durch die Bestrahlung einer Probe mit Elektronen. Diese bewirkt eine Tiefenionisation des bestrahlten Materials durch das Herausschlagen von Elektronen aus der Elektronenhülle. Die entstandene Lücke wird durch ein Elektron mit einer höheren Hauptquantenzahl ausgeglichen. Bei dieser Relaxation wird ein Energiequant in Form von Röntgenstrahlung frei, welches als elementspezifische Spektrallinie detektierbar ist.²⁶⁶

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM ermöglicht mikroskopische Aufnahmen unterhalb des durch Beugungsphänomene determinierten Auflösungsvermögens der Lichtmikroskopie. Der Elektronenstrahl wird durch thermische- oder Feldemitter erzeugt und analog zur Lichtmikroskopie in einem Strahlengang durch verschiedene Linsen fokussiert und auf die Probe gelenkt. Durch Interaktion mit der Probe kann Streuabsorptions-, Beugungs- und Phasenkontrast auftreten, der von einem hinter der Probe liegenden CCD-Sensor detektiert werden kann.²⁶⁷

Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Mithilfe der TGA lassen sich thermische Zersetzungsprozesse gravimetrisch quantifizieren. Hierbei wird die Probe einem Temperaturgradienten ausgesetzt und das Gewicht mittels Ultramikrofeinwaage bestimmt. Prozesse wie Oxidation, Reduktion, Zersetzung, Verdampfung oder Sublimierung können dabei gezielt untersucht werden.²⁶⁸ Durch den Vergleich der Thermogramme beschichteter und unbeschichteter Nanopartikel kann die Beladungsdichte evaluiert werden.

Die Beschichtung der TiO₂-Nanopartikel mit dem Eu-Komplex **Eu-P4-DOTA** sollte zunächst mittels EDX evaluiert werden. Die EDX-Spektren der Nanopartikel mit elementspezifischen Spektrallinien sind in Abbildung 3-18 dargestellt. Der Vergleich der beiden Spektren zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Negativkontrolle (A) und der behandelten Nanopartikel (B), die in der Abbildung farblich gekennzeichnet sind. Die Intensität der K-Linie von

Kohlenstoff (gelb), die K-Linie von Phosphor (blau), sowie die L- und M-Linie von Europium (rot) zeigten eine erhöhte Intensität bei den behandelten Nanopartikeln.

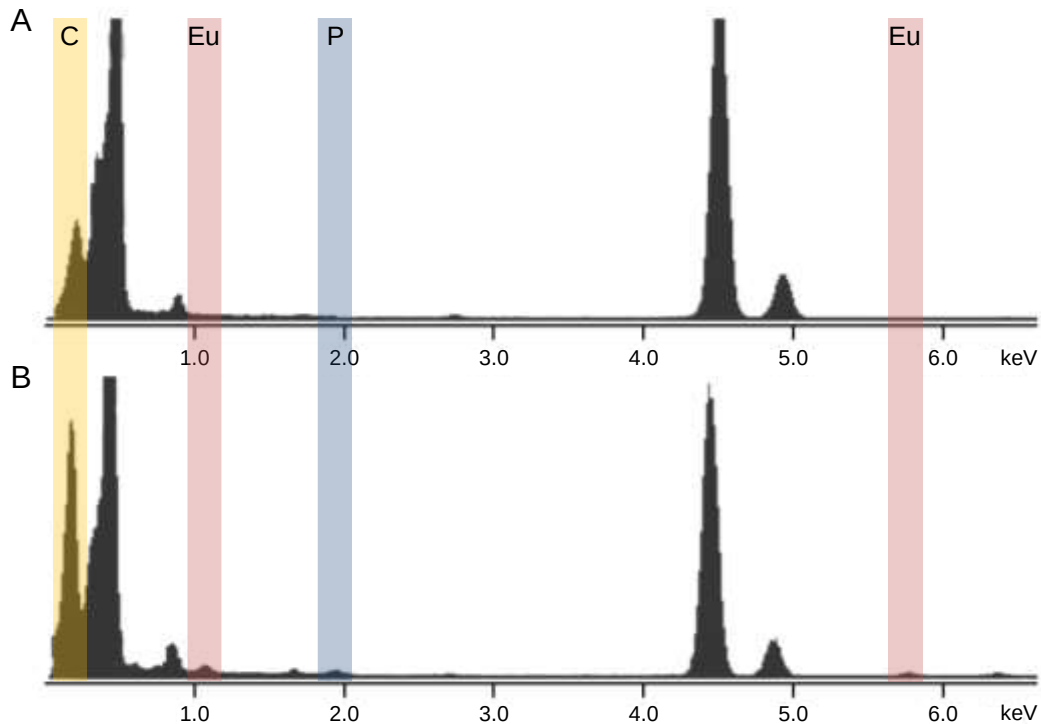


Abbildung 3-18 EDX-Spektren der Negativkontrolle (A) und der behandelten Nanopartikel (B), mit farblich markierten elementspezifischen Spektrallinien.

Für die Negativkontrolle wurde durch EDX ein Masseanteil von 0.7% Eu ermittelt, der durch Verunreinigungen des Cu-TEM-Grids hervorgerufen wird, welches als Probenträger für die Analysemethode diente. Die behandelten Partikel zeigten einen Gesamtmasseanteil von 2.7% Eu. Dieser signifikante Anteil und die erhöhte Intensität der Spektrallinien von C, P und Eu deuten auf eine erfolgreiche Beschichtung der Partikel hin. Zur Abschätzung der Beladungsdichte wurden die Partikel anschließend mittels TGA untersucht. Die aufgenommenen Thermogramme sowie die TEM-Bilder der vermessenen Partikel sind in Abbildung 3-19 dargestellt.

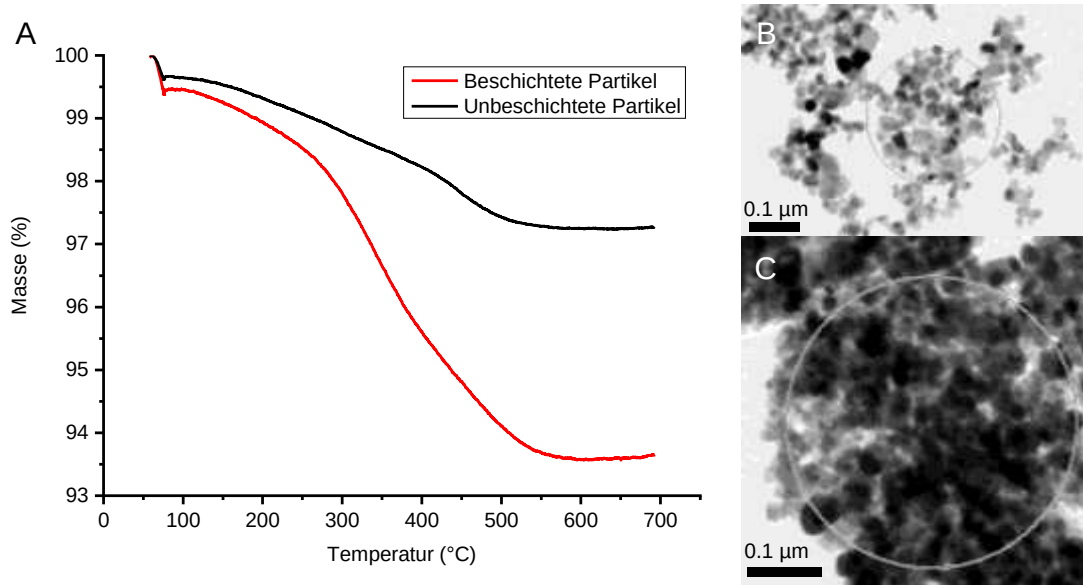


Abbildung 3-19 (A) Thermogramme der beschichteten (rot) und unbeschichteten (schwarz) TiO₂-Partikel. (B) TEM-Aufnahme beschichteter TiO₂-Partikel. (C) TEM-Aufnahme unbeschichteter TiO₂-Partikel. Der Kreis (grau) auf den TEM-Aufnahmen dient als örtliche Markierung für anschließend durchgeführte EDX.

Das Thermogramm (A) der unbeschichteten Ti₂O-Partikel (schwarz) zeigt einen Masseverlust 2.5%, der auf oberflächenadsorbiertes Wasser zurückzuführen ist. Der signifikante Massenverlust von 6.5% bestätigt die erfolgreiche Beschichtung der Partikel (schwarz), obwohl sie deutlich unter der theoretisch möglichen maximalen Beladungsdichte (11%) liegt. Allerdings ist die theoretische Beladungsdichte unter der Annahme berechnet worden, dass 1 Molekül pro nm² in einer dichtesten Packung beschichtet wird. Der Wert der Thermogravimetrie deutet auf 0.4 Moleküle pro nm² hin. Im Hinblick auf die raumgreifende Beschaffenheit des Moleküls ist dieser Wert nachvollziehbar. Des Weiteren zeigen die TEM-Bilder ein unterschiedliches Verhalten der Partikel. Dabei zeigten die beschichteten Partikel (B) eine geringere Aggregation als die unbeschichteten Partikeln (C).

3.3.3 Zusammenfassung Oberflächenbeschichtung

In diesem Exkurs wurde eine weitere Anwendungsmöglichkeit des Chelators **DOTAZA** diskutiert. Dabei konnte ein Chelator mit Oberflächen-bindenden Phosphonsäureestern erfolgreich synthetisiert und in ersten Untersuchungen auf TiO₂-Nanopartikel immobilisiert werden. Die Detektion erfolgte sowohl mittels TGA als auch über EDX. Dabei wurde eine Beladungsdichte von 0.4 Molekülen pro nm² ermittelt. Basierend auf den Erkenntnissen der Voruntersuchung können künftig Bindungsstudien auf modifizierte DOTAZA-Derivate und andere Partikelsysteme übertragen werden, so ist ein FRET zwischen Partikel und Eu-Komplex denkbar, der maßgeschneiderte Eigenschaften des Partikelsystems für verschiedene Anwendungen ermöglicht.

3.4 Integrin-Targeting

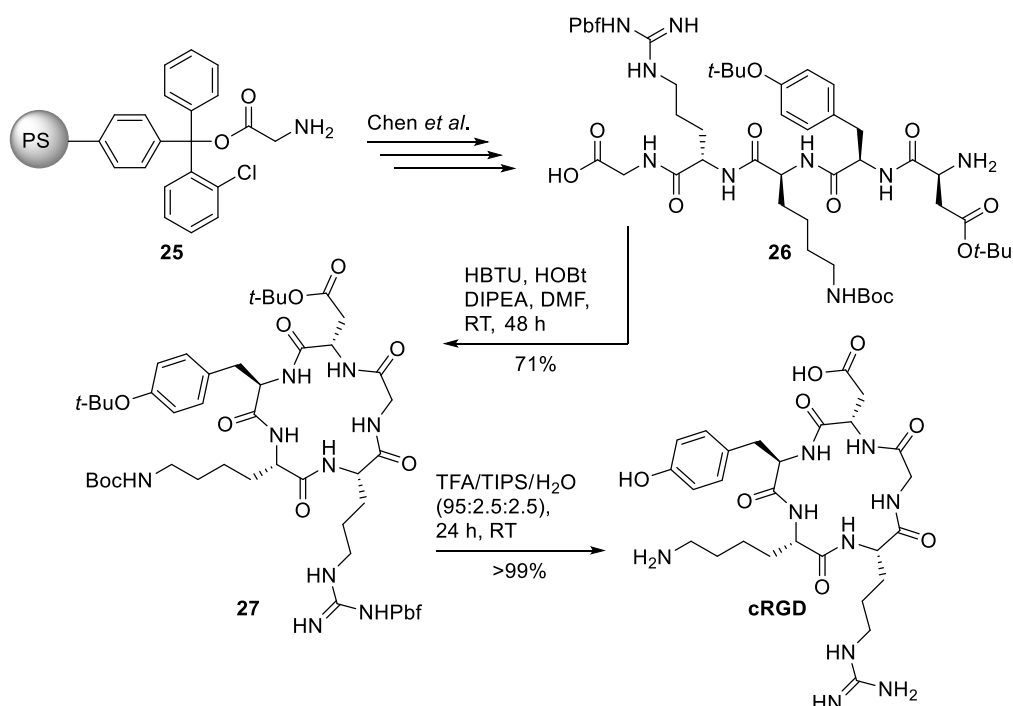
Wie in **1.2.3 Effektor** erwähnt, ist die Verknüpfung des Chelators DOTA als Effektormolekül mit einem Targeting-Vektor eine häufig genutzte Strategie, um zielgerichtete Diagnostika und Therapeutika zu synthetisieren.^{19, 70, 157} Zwar findet diese Vorgehensweise bereits Anwendung in Bezug auf Integrin-Targeting,²⁶⁹ jedoch zeigen aktuelle DOTA-cRGD-Derivate unvorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften.^{270, 271} Dies ist durch die verhältnismäßig geringe Affinität der peptidischen Targeting-Vektoren zu erklären, deren Bindungsaffinität gegenüber Integrinen im Vergleich zu Antagonisten wie Echistatin bis zu 100-fach geringer sind.²⁷² Eine Vielzahl an Publikationen thematisierte die Erhöhung der Bindungsaffinität durch Multimerisierung.^{179, 180} Dadurch konnte die Affinität zu isolierten Integrinen erhöht werden, allerdings intensivieren sich dadurch auch unspezifische Wechselwirkungen *in vivo*, die eine Tumorlokalisation erschweren.²⁷³

Im Folgenden sollen diverse DOTA-cRGD-Derivate synthetisiert werden, die für zielgerichtete metallbasiertes bildgebende Verfahren genutzt werden können. Dabei soll basierend auf dem DOTA-Derivat DOTAZA eine Strategie entwickelt werden, welche die Synthese von DOTA-cRGD-Derivaten mit maßgeschneiderter Pharmakokinetik ermöglicht.

3.4.1 cRGD Synthese

In **1.2.1 Target und Targeting-Vektor** wurde bereits die Vielfalt der Integrin-Rezeptoren und deren diverse Funktion in unterschiedlichen Tumorstadien diskutiert.^{78, 108, 274} Daher muss zunächst ein Target gewählt werden, welches essenziell in einem möglichst frühen Tumorstadium ist. Das für Tumor-induzierte Angiogenese verantwortliche Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist ein vielversprechendes Target und kann über das Cyclopeptid **cRGD** selektiv adressiert werden.^{103, 272} Grundlegend für alle zu entwickelnden Substanzen ist also zunächst die Synthese des Targeting-Vektors **cRGD**.

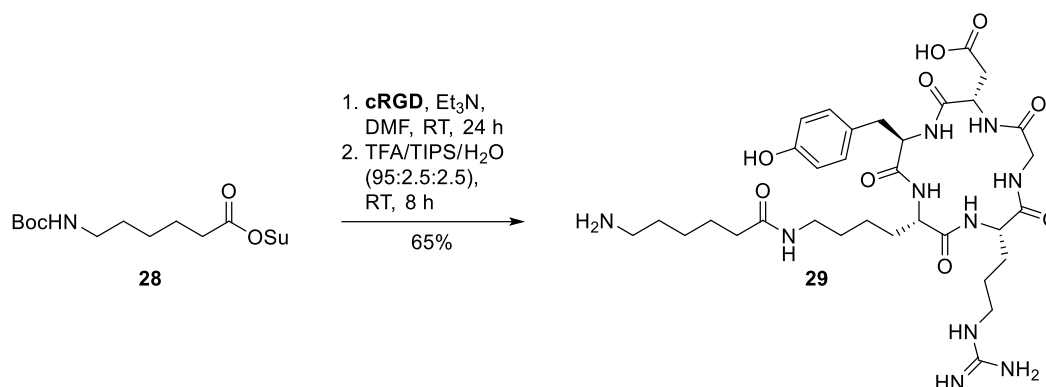
Die Peptidsequenz wurde nach einem bekannten Protokoll von Chen *et al.* mittels Festphasen-Peptidsynthese dargestellt und cyclisiert.^{275, 276} Das lineare Pentapeptid **26** wurde mittels Festphasensynthese dargestellt und ist zusammen mit der Cyclisierung und der Entschützung in Schema 3-22 dargestellt. Im Folgenden wird dieser Targeting-Vektor vereinfacht mit cRGD bezeichnet.



Schema 3-22 Syntheseroute des Pentapeptides cRGD nach dem Protokoll von Chen *et al.* und Dai *et al.*.^{275, 276}

Ausgehend von einem mit Glycin-vorbeladenem 2-Chlorotrityl-Harz **25** wurden nacheinander die Aminosäuren Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Tyr(*t*-Bu) und Fmoc-L-Asp(*t*-Bu)-OH mit den Kupplungsreagenzien HOBt/HBTU mit der Festphase verknüpft. Nach jeder Amidkupplung wurde mittels Piperidin das Carbamat gespalten, um das freie Amin für die nächste Amidkupplung bereitzustellen. Nach abschließender Carbamatspaltung wurde das Pentapeptid mit Trifluorethanol (TFE) vom Harz gespalten. Das lineare Pentapeptid **26** wurde in einer Ausbeute von 38% erhalten, was einer Ausbeute von 90% pro Reaktionsschritt entspricht. Das Pentapeptid Asp(*t*-Bu)-D-Tyr(*t*-Bu)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly wurde anschließend in einer intramolekularen Amidkupplung mittels HOBt/HBTU cyclisiert. Dabei musste in hoher Verdünnung (0.01 M) gearbeitet werden, um die konkurrierende intermolekulare Amidkupplung zu unterdrücken. Die Reaktion lieferte das Cyclopeptid **27** in einer Ausbeute von 71% nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel. Abschließend wurden alle Schutzgruppen des Cyclopeptids **27** mittels Trifluoressigsäure (TFA) und Triisopropylsilan (TIPS) in Anwesenheit von H₂O gespalten. Das Cyclopeptid **cRGD** wurde nach Fällung aus Et₂O in hoher Reinheit und quantitativer Ausbeute erhalten.

Wie in **1.2.2 Linker-Einheit** beschrieben, ist die räumliche Trennung von Effektmolekül und Targeting-Vektor essenziell. Aus diesem Grund wurde das Cyclopeptid **cRGD** mit dem, nach einem Standardprotokoll synthetisierten,^{277, 278} Aktivester **28** in einer Aktivester-vermittelten Amidkupplung umgesetzt. Anschließend wurde das Carbamat in saurem Milieu gespalten, um das Amin für weitere Reaktionen freizugeben. Die Synthese von **29** ist in Schema 3-23 dargestellt.

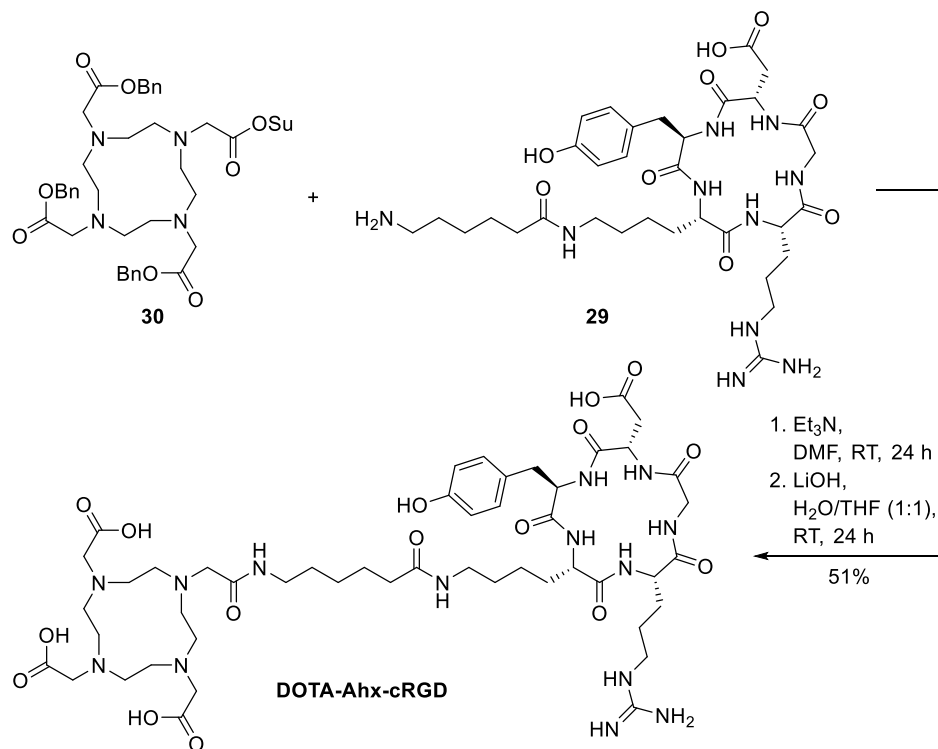


Schema 3-23 Synthese des cRGD-Derivates **29**.

Die Reaktion lieferte das bereits in einem Patent von Jonczyk *et al.* beschriebene langkettige cRGD-Derivat **Ahx-cRGD** in einer Ausbeute von 65%,²⁷⁹ die in dieser Arbeit erstmalig mit der entsprechenden NMR-Analytik beschrieben wurde; die Daten sind **6.4.5 Integrin-Targeting - Synthese** zu entnehmen.

3.4.2 Synthese neuartiger DO3A-cRGD-Derivate

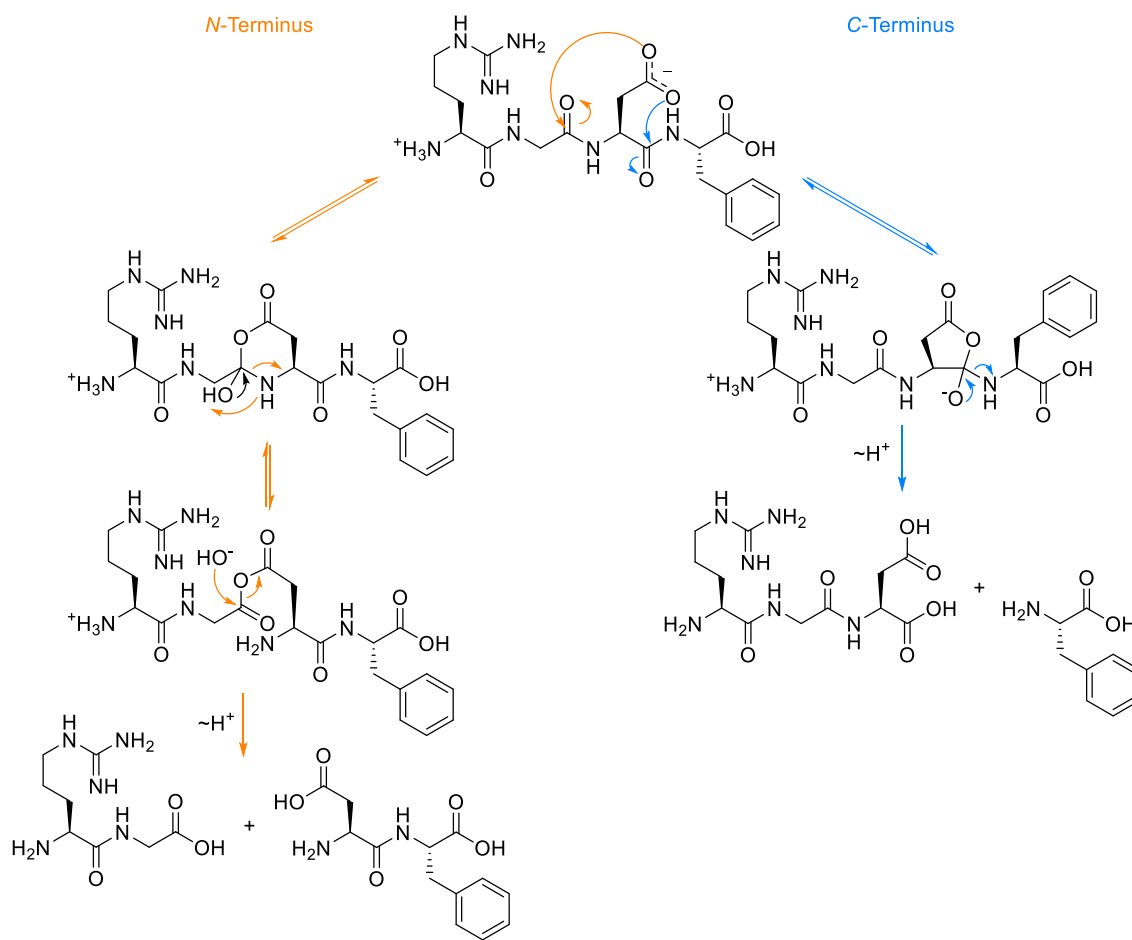
Das Amin **29** sollte ein zentraler Baustein für weitere Reaktionen sein und mit verschiedenen DOTA-Derivaten verknüpft werden. In Schema 3-24 ist die Verknüpfung desamins mit dem zuvor synthetisierten Aktivester **30** dargestellt.



Schema 3-24 Synthese des DOTA-cRGD-Derivates **DOTA-Ahx-cRGD**.

Die Reaktion mit dem Aktivester **30** wurde massenspektrometrisch bis zum kompletten Umsatz des freienamins **29** verfolgt. Das Rohprodukt der Reaktion wurde ohne weitere Reinigung mit LiOH versetzt, um den Tribenzylester zu verseifen. Nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-Kieselgel (C18) wurde der BFC **DOTA-Ahx-cRGD** in einer Ausbeute von 51% erhalten. Der Ausbeuteverlust ist auf die Hydrolyse des Cyclopeptids zurückzuführen, die bei der Verseifung mit LiOH beobachtet wurde. Bogdanowich-Knipp *et al.* untersuchten die Zersetzung von cRGD in stark sauren und basischen Lösungen,¹⁰⁴ welche für die Benzylesterspaltung essenziell ist. Dabei wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem Aspartat am *N*- (orange) oder C-Terminus (blau) nukleophil angreifen kann.¹⁰⁴ Der postulierte Reaktionsmechanismus ist in Schema 3-25 dargestellt.

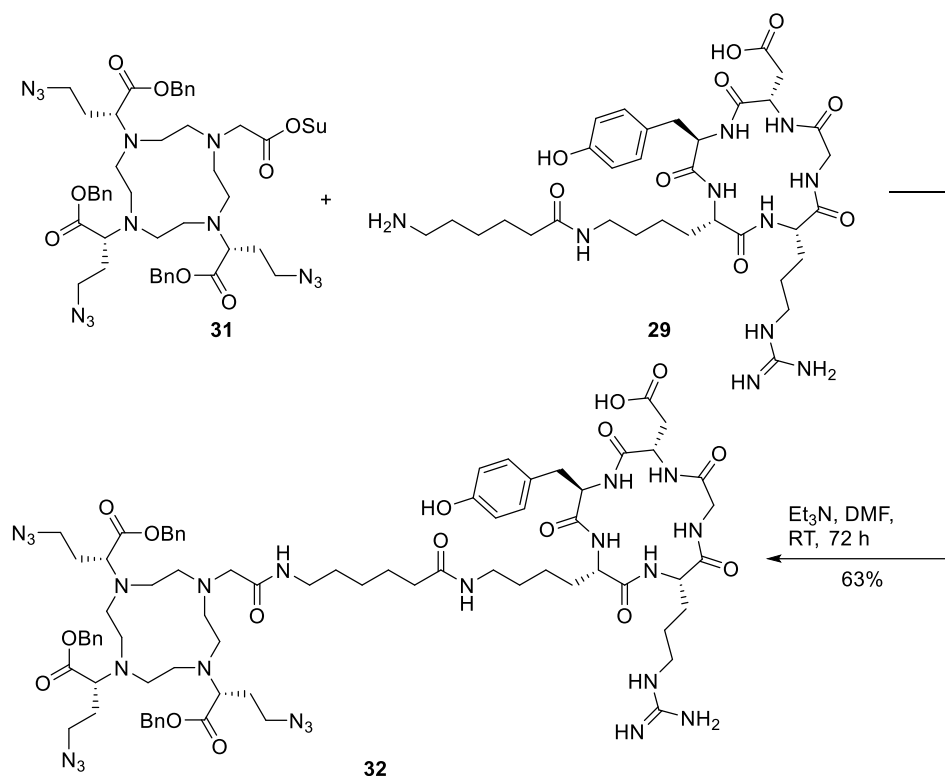
Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-25 Postulierte Aspartatspaltung am *N*- (orange) und *C*-Terminus (blau) der Peptidsequenz Arg-Gly-Asp-Phe.¹⁰⁴

Für eine bessere Ausbeute sollte in Zukunft eine hydrogenolytische Spaltung der Benzylester statt der Verseifung mit LiOH in Betracht gezogen werden.

Neben dem Chelator **DOTA-Ahx-cRGD** sollte eine Syntheseroute etabliert werden, welche die Synthese von BFCs mit maßgeschneiderter Pharmakokinetik ermöglicht. Basierend auf den Ergebnissen von Kriemen *et al.* wurde der mittels Click-Chemie derivatisierbare Chelator DOT3AZA als Grundgerüst ausgewählt.¹⁶⁷ Dieser sollte zunächst als Aktivester **31** mit dem freien Amin **29** verbunden und anschließend mit dem zwitterionischen Alkin **ZWI** in einer CuAAC modifiziert werden. In Schema 3-26 ist die Synthese des cRGD-Derivates **32** dargestellt.



Schema 3-26 Aktivesterkupplung des Aktivesters **31** mit dem freien Amin **29**.

Die Aktivester-vermittelte Peptidkupplung wurde massenspektrometrisch verfolgt, jedoch wurde dabei schon bei der Reaktion eine schnelle Hydrolyse des Aktivesters **31** festgestellt. Auch durch Erhöhung der eingesetzten Äquivalente an Aktivester konnte die Ausbeute mit 63% nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-Kieselgel nicht verbessert werden. Da die Reaktion unter Ausschluss von Sauerstoff und Wasser erfolgte, kann das für die Hydrolyse nötige H_2O nur aus bereits erfolgten Amidkupplungen stammen. Diese Hydrolyse scheint ab einer gewissen Wasserkonzentration schneller abzulaufen als die konkurrierende Amidkupplung. Dies könnte die stagnierende Ausbeute unabhängig von den eingesetzten Äquivalenten erklären. Auch die Reinigung des Produktes gestaltete sich als anspruchsvoll. So wurde eine starke Wechselwirkung zwischen Produkt und stationärer Phase (C18) beobachtet, die auf die Polarität des Moleküls zurückzuführen ist. Durch die hydrophoben Benzylester einerseits und das hydrophile Peptid andererseits besitzt das Molekül seifenartige Eigenschaften, welche die Retention beeinflussen und das beobachtete Tailing verursachen. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 3-20 dargestellt und zeigt das starke Tailing der Substanz auf der stationären Phase.

Ergebnisse und Diskussion

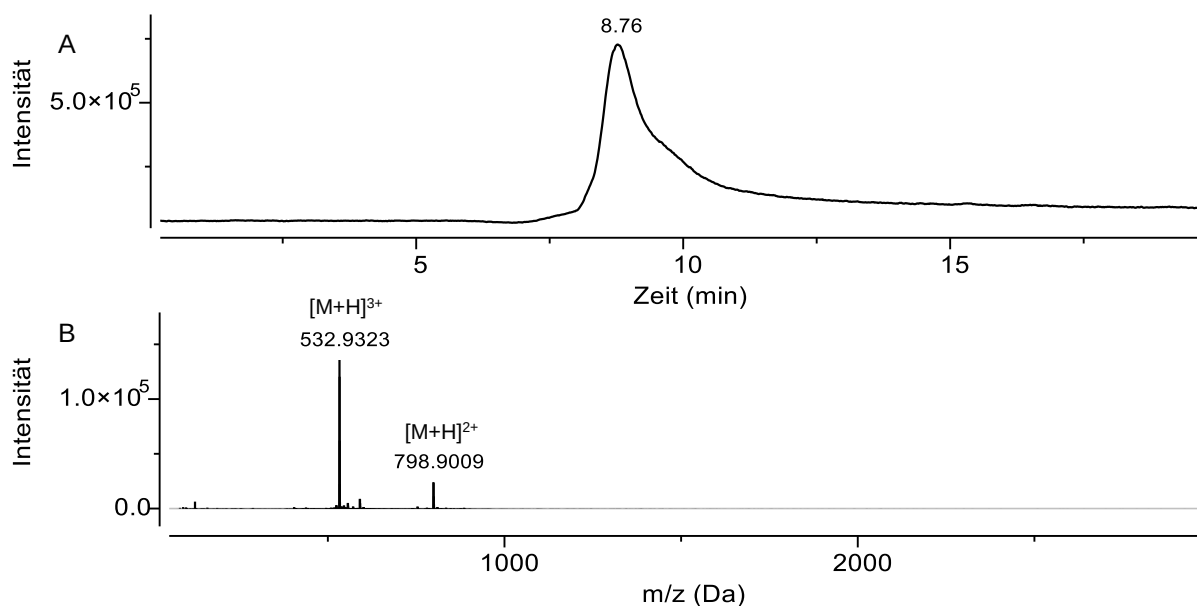
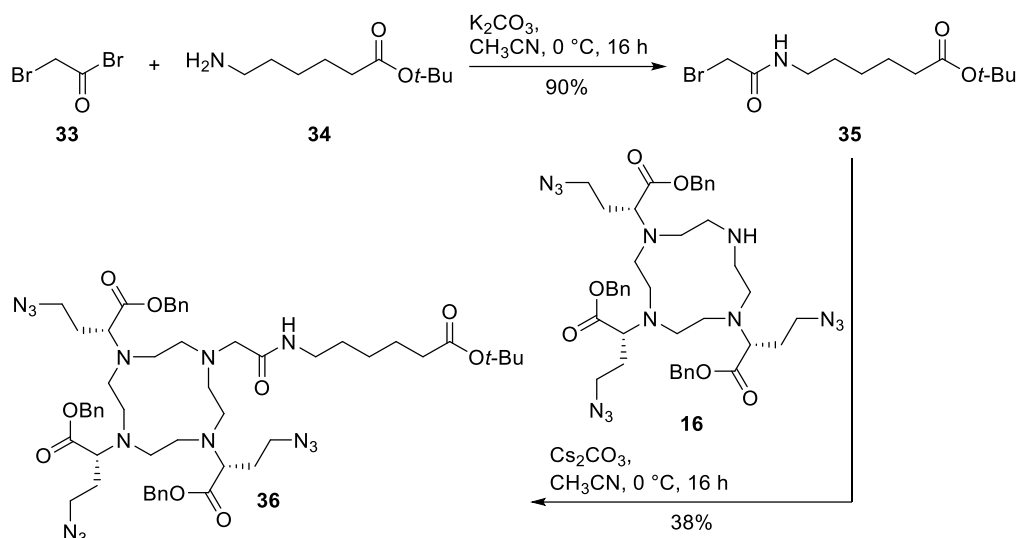


Abbildung 3-20 LC-MS Chromatogramm des Azids **32** über eine Standardsäule (C18) mit isokratischem Standardlösungsmittelgemisch (1:1). Die Standardbedingungen sind dem Kapitel **6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie** zu entnehmen. (A) TIC; Intensität aufgetragen gegen die Zeit (min). (B) EIC des Peaks bei einer Retentionszeit von 8.76 min; Intensität aufgetragen gegen m/z (Da).

Selbst bei unpolaren Bedingungen zeigt das Azid **32** deutliches Tailing und eine für die Bedingungen ungewöhnlich hohe Retentionszeit, was den Ausbeuteverlust durch starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase erklärt.

Da die eingesetzten Edukte der in Schema 3-26 gezeigten Amidkupplung bereits aufwendig synthetisiert werden müssen, sollte eine ökonomische Syntheseroute entwickelt werden, die zum selben Produkt führt. Ein Faktor, der die Amidkupplung verlangsamt, könnte die Umgebung des Acetatrestes sein, sodass der nukleophile Angriff des freien Amids auf den Aktivester sterisch gehindert ist. Durch die Einführung eines Abstandhalters könnte der sterische Einfluss reduziert werden. Die Synthese des langkettigen DOT3AZA-Derivates ist in Schema 3-27 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

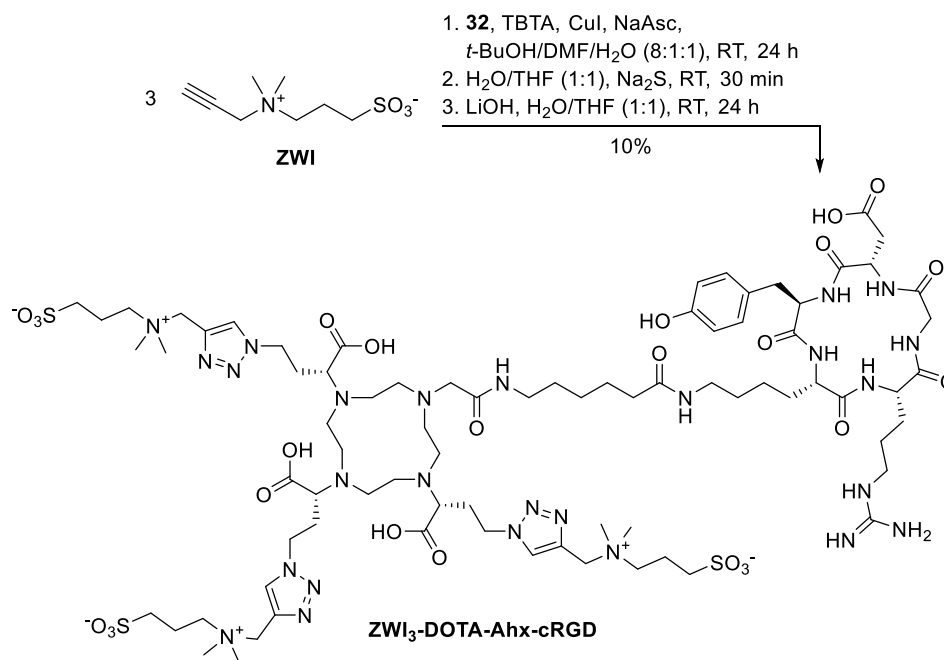


Schema 3-27 Synthese des alternativen DOT3AZA-Synthesebausteins **36**.

Zunächst wurde das Alkylhalogenid **35** aus Bromoacetyl bromid **33** und ϵ -Aminohexansäure *tert*-Butylester **34** in einer Ausbeute von 90% synthetisiert. Nach der Reaktion mit dem literaturbekannten sekundären Amin **16** und Cs_2CO_3 als Base nach einem Protokoll von Kriemen *et al.* konnte das Produkt **36** nach Reinigung an Kieselgel mit einer Ausbeute von 38% isoliert werden.¹⁶⁷ Grund für die geringe Ausbeute ist die überraschend hohe Polarität des Produktes, die zu einer herausfordernden Reinigung führte. So zeigte sich bei der säulenchromatographischen Reinigung, selbst mit polaren Eluenten wie $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (7:1), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}/\text{CH}_3\text{OH}$ (4:3:1) oder EtOAc/EtOH (1:1), stets eine extreme Wechselwirkung des Produktes mit der stationären Phase. Passivierende Additive wie Et_3N erlaubten eine bessere Trennung von Produkt und Edukten, aber lösten das Problem der starken Wechselwirkung nicht.

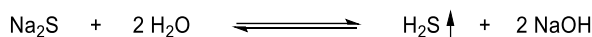
Im Folgenden sollte das cRGD-Derivat **32** mit dem zwitterionischen Alkin **ZWI** in einer CuAAC umgesetzt und der Tribenzylester anschließend mit LiOH verseift werden, um einen BFC mit maßgeschneiderter Pharmakokinetik zu erhalten. Die Reaktion ist in Schema 3-28 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-28 Synthese des pharmakokinetisch modifizierten BFC **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD**.

Die Synthese des BFC **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** mit modifizierter Pharmakokinetik wurde massenspektrometrisch bis zum vollständigen Umsatz des Azids **32** verfolgt. Anschließend wurde das für die Click-Reaktion verwendete Cu mittels Na₂S-Fällung entfernt, und der Überrest mittels säulenchromatographischer Reinigung an RP-Kieselgel (C18) gereinigt. Der zwitterionische Benzylester konnte trotz mehrfacher Reinigungsversuche nicht in befriedigender Reinheit isoliert werden, da starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase auftraten, und das Produkt mit dem Cu(I)-Stabilisator TBTA eluierte. Aufgrund dessen wurde das Substanzgemisch ohne weitere Aufarbeitung mit LiOH umgesetzt. Das Produkt **ZWI₃-DOT3AZA-Ahx-cRGD** konnte mittels HPLC in einer Ausbeute von 10% isoliert werden. Die Faktoren, die zu der niedrigen Ausbeute führten, sollen im Folgenden genauer erläutert werden. Ein Faktor ist die in der Literatur beschriebene und für das cRGD-Derivat **DOTA-Ahx-cRGD** bereits diskutierte Hydrolyse des Cyclopeptiderestes,¹⁰⁴ die bei der Verseifung der Benzylester mit LiOH auftritt. Eine hydrogenolytische Spaltung der Benzylester war nicht zu realisieren, da das für die Cu-Fällung verwendete Na₂S den Pd-Katalysator vergiftete. In diesem Fall wurde bereits die Hydrolyse des Peptids nach der Click-Reaktion beobachtet. Dies könnte ebenfalls auf die Cu-Fällung zurückzuführen sein, da das im Überschuss (~5 mg/mg CuI) eingesetzte Na₂S in wässrigem Medium NaOH bildet.



Schema 3-29 Gleichgewicht Na₂S in wässrigem Medium. Die Triebkraft der Reaktion ist die Bildung von gasförmigem H₂S.

Die auf diese Weise freigesetzte Base könnte zur Spaltung des Cyclopeptids beitragen. Eine Alternative verspricht der Cu-spezifische Ionentauscher Purolite®S984. Des Weiteren sind in der Literatur Beispiele bekannt, in denen Cu durch Competition mit EDTA aus der Reaktionslösung entfernt wurde.²⁸⁰ In einer Testreaktion wurde neben diesen Möglichkeiten auch die Fällung durch gasförmiges H₂S getestet. Der qualitative Kupfernachweis nach der Reaktion wurde mit Blutlaugensalz K₄[Fe(CN)₆] durchgeführt.

Tabelle 3-4 Tabelle verwendeter Reagenzien für die Cu-Fällung nach CuAAC. Erfolgreiches Entfernen von Cu wurde grün gekennzeichnet. Positive Cu-Nachweise durch K₄[Fe(CN)₆] (rotbrauner Niederschlag) wurde rot gekennzeichnet.

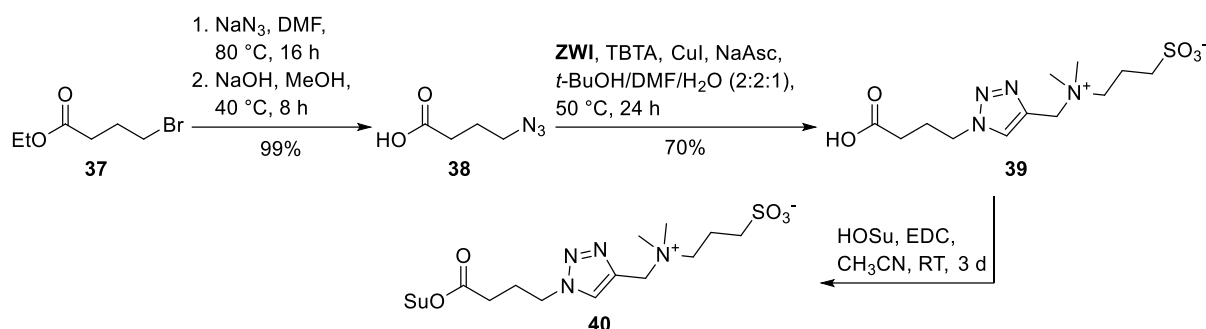
Reagenz	Cu-Indikation
Purolite®S984	
Na ₂ S	
EDTA-Lsg. (5 M)	
EDTA-Lsg. (5 M, pH 1) ^a	
H ₂ S (g)	

^aEingestellt mit HCl (3 M)

Aus den Vorversuchen lässt sich keine effektive Alternative zu Na₂S ableiten. Eine Alternative könnte eine Modifikation der Syntheseroute darstellen. Dabei würde im Gegensatz zur bisherigen Syntheseroute zuerst die Click-Reaktion mit dem zwitterionischen Alkin durchgeführt werden, bevor der Targeting-Vektor cRGD als freies Amin mittels Peptidkupplung eingeführt wird.

Eine Testreaktion sollte zeigen, ob die für die alternative Strategie nötige Aktivesterbildung einer Carbonsäure in Anwesenheit einer moderat-nukleophilen Sulfonsäure prinzipiell möglich ist, da innerhalb der Literatur keine Präzedenz für diesen Reaktionstyp gefunden werden konnte. Dafür wurde das Azid 4-Azidobuttersäure nach einem literaturbekannten Protokoll aus 4-Brombuttersäure synthetisiert und in einer CuAAC mit dem Alkin **ZWI** umgesetzt.²⁸¹ Anschließend sollte der Aktivester **40** synthetisiert werden. Die Reaktionssequenz ist in Schema 3-30 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-30 Testreaktion der Aktivesterbildung mit der zwitterionischen Carbonsäure **39**.

Die Synthese des Azids **38** verlief nach der bekannten Methode in einer Ausbeute von 99%.²⁸¹ Nach der folgenden Click-Reaktion konnten 70% der zwitterionischen Carbonsäure **39** durch Reinigung an RP-Kieselgel (C18) isoliert werden. Mit der Carbonsäure **39** sollten im Folgenden Bedingungen gefunden werden, unter denen der Aktivester **40** gebildet werden kann. Dafür wurde *N*-Hydroxysuccinimid mit einem Aktivierungsreagenz in verschiedenen Lösungsmitteln 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-5 aufgeführt.

Tabelle 3-5 Synthesebedingungen des zwitterionischen Aktivester **40** mit HOSu bei RT für 3 d. Jede Reaktion wurde qualitativ mittels Massenspektrometrie verfolgt.

Ansatz	Lösungsmittel	Aktivator	Umsatz
1	CH_3CN	HBTU	
2	CH_3CN	DDC	
3	CH_3CN	EDC	
5	DMF	EDC	
6	DMSO	EDC	
7	CH_3OH	EDC	

Die Reaktionen wurden qualitativ mittels Massenspektrometrie verfolgt. Die Aktivesterbildung wurde ausschließlich Carbodiimid-vermittelt in CH_3CN beobachtet (2, 3). Andere Lösungsmittel, sowie HBTU als Aktivator zeigten keinen Umsatz. Es ist anzumerken, dass in diesem Fall nur die gängigsten Aktivatoren und Lösungsmittel getestet wurden. Die Auswahl an Lösungsmitteln ist limitiert, da durch die starke Polarität der zwitterionischen Buttersäure nur sehr polare Lösungsmittel verwendet werden konnten. Die erfolgreiche Aktivesterbildung mit HOSu und EDC als Aktivator in CH_3CN bei Raumtemperatur soll im Folgenden genauer diskutiert werden. Die Chromatogramme des Reaktionsverlaufes sind in Abbildung 3-21 dargestellt. Der Bereich, in dem Edukt detektiert wurde ist blau gekennzeichnet. Die Detektion

des Produktes wurde mit gelb gekennzeichnet. Zusätzlich sind die Strukturformeln des Eduktes **39** und Produktes **40** abgebildet.

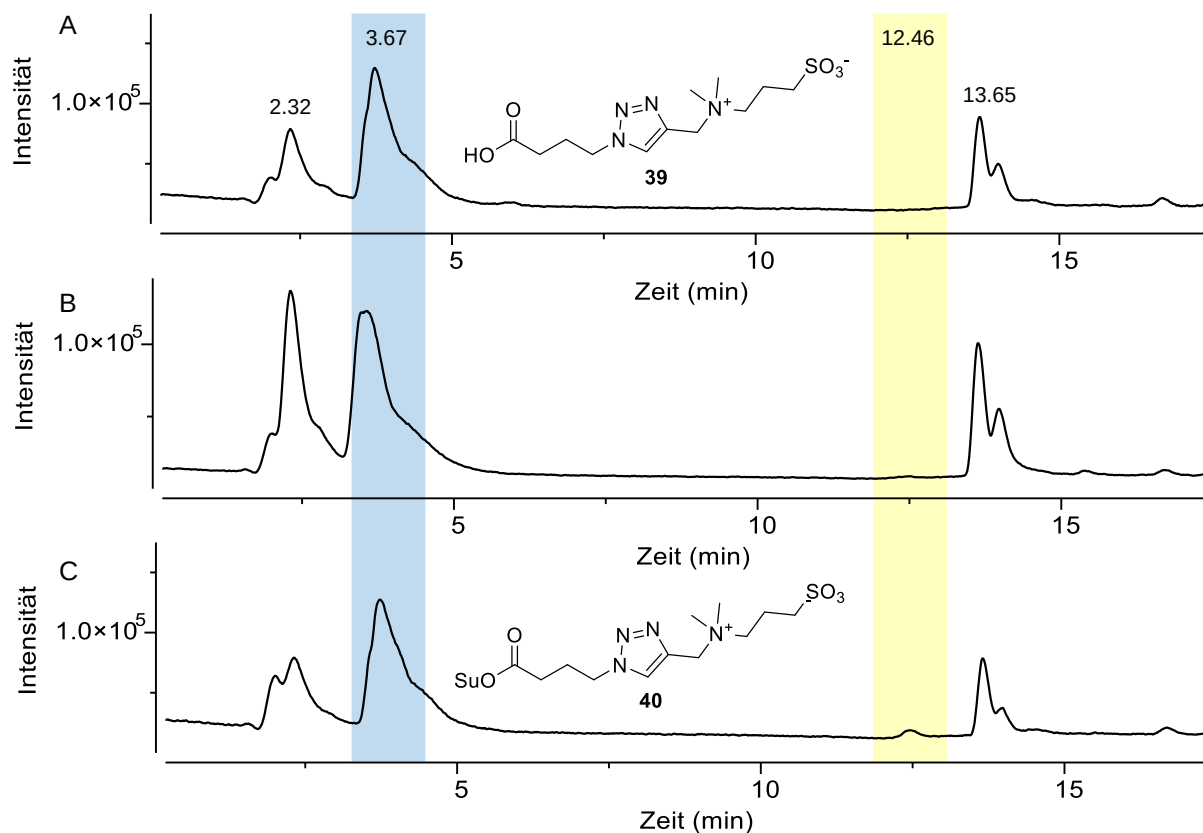
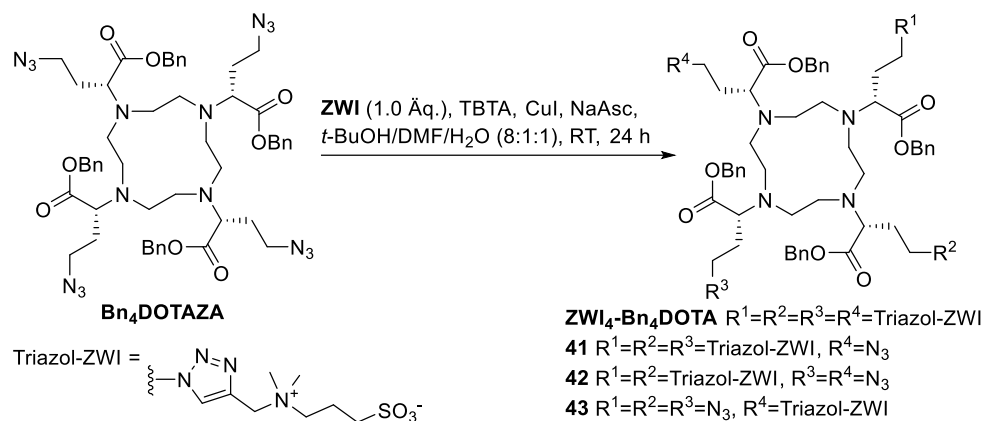


Abbildung 3-21 LC-MS Chromatogramme des Reaktionsverlaufs der Aktivesterbildung mit HOSu und EDC als Aktivator in CH_3CN bei Raumtemperatur. Die Chromatogramme wurden unter Standardbedingungen aufgenommen (**6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**) und entsprechen der Auftragung der Intensität gegen die Retentionszeit (min). (A) TIC nach 1 d Reaktionszeit. (B) TIC nach 2 d Reaktionszeit. (C) TIC nach 3 d Reaktionszeit. Die Retentionszeit des Eduktes **39** bei 3.67 min ist blau unterlegt. Die Retentionszeit des Produktes **40** bei 12.46 min ist gelb hinterlegt.

Die Bildung des Aktivesters verlief extrem langsam. Nach 3 d konnten neben Edukt (3.67 min, blau) im LC-Chromatogramm nur Spuren des Produktes (12.46 min, gelb) detektiert werden. Hinzu kommt, dass sich mittels Säulenchromatographie mit RP-Kieselgel (C18) ausschließlich Edukt isolieren ließ. Dies könnte auf die Verwendung von H_2O als Eluenten zurückzuführen sein, das den Aktivester spontan hydrolysiert. Ob der zwitterionische Rest, genauer gesagt das Sulfonat, einen direkten Einfluss auf die Reaktion besitzt oder durch einen sekundären Mechanismus die Hydrolyse des Aktivesters katalysiert, konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Allerdings scheint die Synthese des Aktivesters unter diesen Bedingungen nicht befriedigend zu verlaufen. Unter diesem Aspekt ist die Syntheseroute des zwitterionischen cRGD-Derivats durch Einführen des Targeting-Vektors **cRGD** nach der Einführung der zwitterionischen Reste mittels Click-Chemie keine sinnvolle Synthesestrategie.

Eine Alternative wäre die selektive Click-Reaktion des Tetraazids **Bn₄DOTAZA** mit dem zwitterionischen Alkin **ZWI**, sodass nach der Einführung der zwitterionischen Reste noch eine Azidfunktion für die Konjugation des Targeting-Vektors mittels Click-Chemie zur Verfügung steht. In Schema 3-31 sind die Bedingungen der Testreaktion dargestellt, die in Kooperation mit Inga Blanck durchgeführt wurde.²⁸²



Schema 3-31 Click-Reaktion des Azids **Bn₄DOTAZA** und 1.0 Äq. des zwitterionischen Alkins **ZWI**.

Im Gegensatz zu der bereits bekannten Synthese des zwitterionischen DOTA-Chelators **ZWI4-DOTA**, bei der das Alkin im Überschuss von 1.3 Äq./Azid eingesetzt wurde,¹⁸⁴ verläuft diese Reaktion mit 1.0 Äq. zwitterionischen Alkins **ZWI**. Die Reaktion wurde nach 24 h massenspektrometrisch überprüft. Das LC-Chromatogramm der Reaktion ist in Abbildung 3-22 dargestellt. Neben dem Edukt **Bn4DOTAZA** (22.30 min, lila) wurden auch die Triazole **43** (18.24 min, grün), **42** (19.01 min, blau) und **43** (19.85 min, gelb) beobachtet. Für das zwitterionische DOTA-Derivat **42** wurde nicht überprüft, ob selektiv die Azide in 1,4- oder 1,7-Position des Makrocyclus reagierten. Stellvertretend wird in Abbildung 3-22 das 1,7-Derivat gezeigt. Ein Salzgemisch aus dem in der Reaktion verwendeten Reduktionsmittel NaAsc und HCO₂H, das als Zusatz der Elutionsmittel verwendet wurde, ist zusammen mit nicht-umgesetzten Alkin **ZWI** bei 2.34 min im Chromatogramm zu erkennen.

Ergebnisse und Diskussion

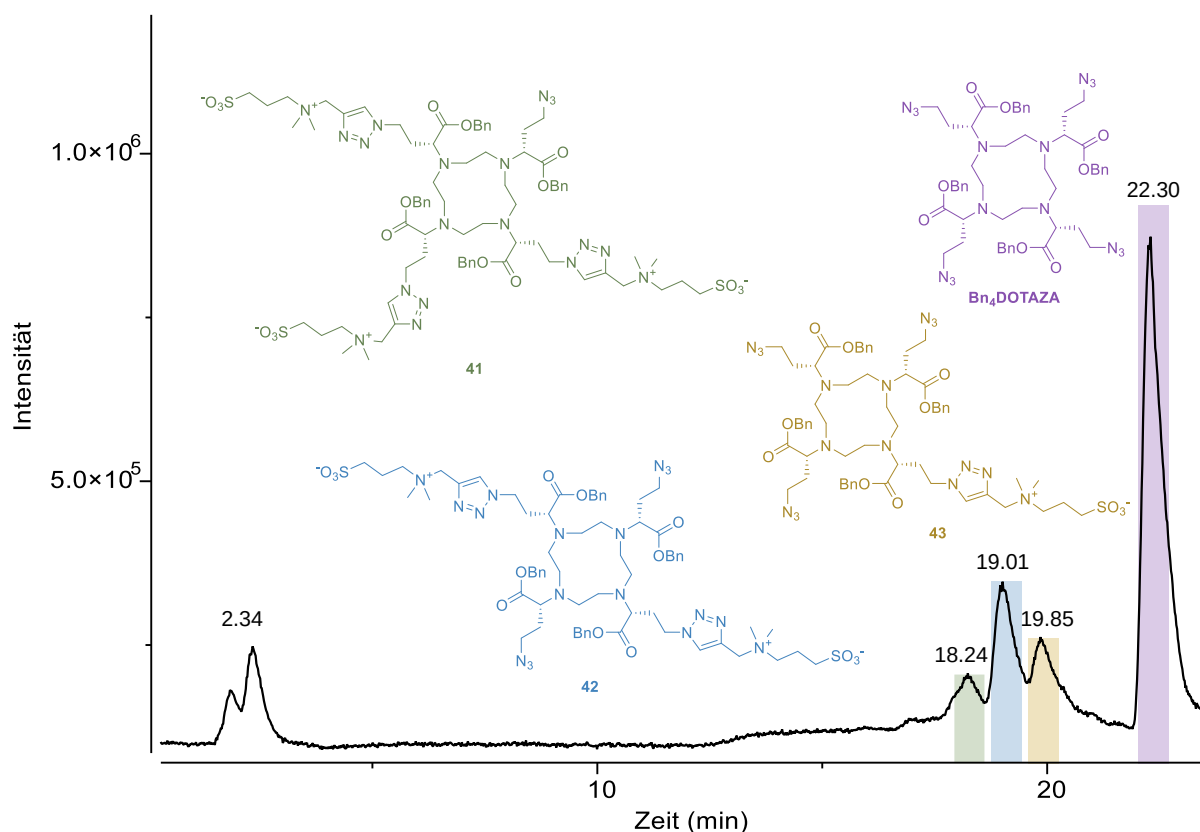
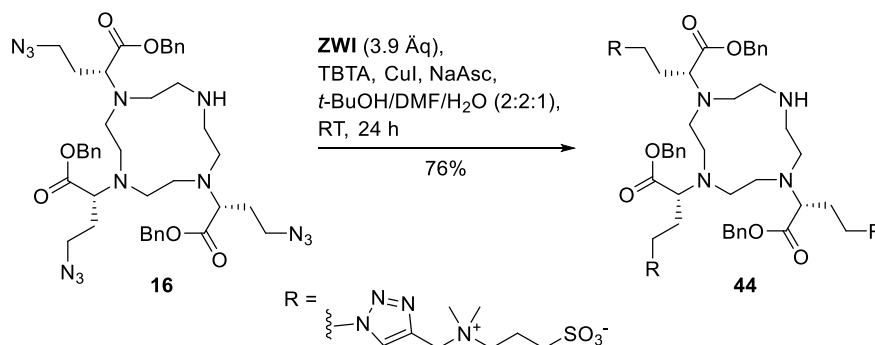


Abbildung 3-22 LC-MS Chromatogramm der Click-Reaktion des Azids **Bn₄DOTAZA** mit dem zwitterionischen Alkin **ZWI**. Das Chromatogramm wurde nach 24 h mit der Standardsäule (C18) und dem Standardlösungsmittelgemisch aufgenommen (**6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**). Der Gradient wurde von 2% CH₃CN auf 95% in 25 min gefahren. Das TIC ist als Auftragung der Intensität gegen die Retentionszeit (min) dargestellt.

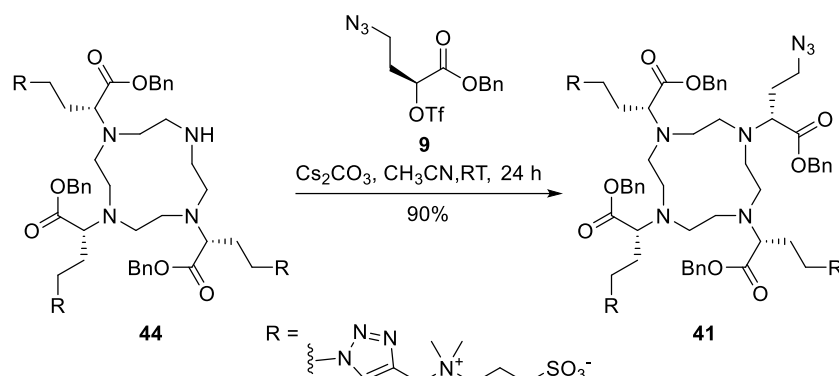
Die Verteilung der Produkte zeigt, dass die Cu-katalysierte Reaktion nicht selektiv verläuft. Aus diesem Grund sollte das Molekül **41** auf andere Weise synthetisiert werden. Ausgehend von dem zuvor synthetisierten Makrocyclus **16** sollte zuerst die Click-Reaktion mit dem zwitterionischen Alkin **ZWI** durchgeführt, und im Anschluss das Azid **41** durch *N*-Alkylierung gewonnen werden. Die Click-Reaktion ist in Schema 3-32 dargestellt.



Schema 3-32 Click-Reaktion des Azids **16** mit dem zwitterionischen Alkin **ZWI**.

Nach der Click-Reaktion konnte das zwitterionische, sekundäre Amin **44** nach Reinigung an RP-Kieselgel (C18) in einer Ausbeute von 76% isoliert werden. Außerdem wurde 13% des entsprechenden Cu-Komplexes erhalten, da im Gegensatz zu vorigen Click-Reaktionen auf die

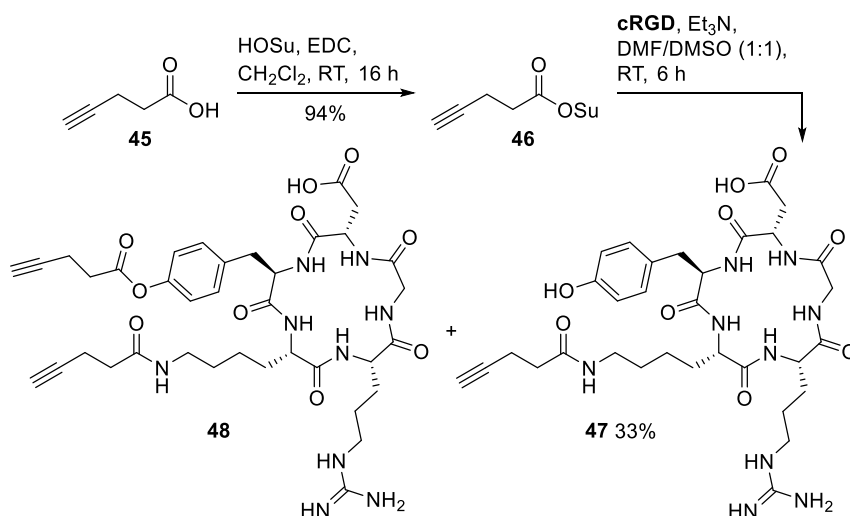
Cu-Fällung mit Na₂S verzichtet wurde. Das erhaltene zwitterionische sekundäre Amin **44** wurde anschließend mit dem zuvor synthetisierten Triflat **9** umgesetzt. Die Reaktion ist in Schema 3-33 dargestellt.



Schema 3-33 N-Alkylierung des zwitterionischen sekundären Amins **44** mit dem Triflat **9**.

Das zwitterionische Azid **41** konnte nach N-Alkylierung mit dem Triflat **9** in einer Ausbeute von 90% isoliert werden. Dieses Azid bietet die Grundlage, um künftig einen Targeting-Vektor mittels Click-Chemie zu konjugieren und auf diese Weise einen BFC mit maßgeschneiderter Pharmakokinetik zu synthetisieren.

Um die Verknüpfung eines Targeting-Vektors mit dem Azid **Bn₄DOTAZA** zu gewährleisten, muss zunächst eine Alkinfunktionalität eingeführt werden. Das Alkin-cRGD-Derivat **47** wurde bereits in einem Patent und einer Publikation zur Anwendung gebracht und ist vom koreanischen Chemikalienhersteller FutureChem kommerziell erwerbbar.^{283, 284} Allerdings wurde das Molekül in dieser Arbeit erstmals mit der entsprechenden vollständigen NMR-Analytik beschrieben. Die an ein Protokoll von Passemard *et al.* angelehnte Synthese des Alkin-cRGD-Derivates **47** ist in Schema 3-34 dargestellt.²⁸⁵



Schema 3-34 Synthese des Alkin-cRGD-Derivates **47** mit dem Nebenprodukt **48**.

Die Synthese des Aktivesters **46** aus Pentinsäure **45** verlief nach einem literaturbekannten Protokoll.²⁸⁶ Das Alkin-cRGD-Derivat **47** konnte nach Reinigung an RP-Kieselgel (C18) in einer Ausbeute von 33% isoliert werden. Bei der massenspektrometrischen Kontrolle der Reaktion wurde neben dem Produkt **47** (m/z gef.: 700.7255 Da) auch ein Nebenprodukt (m/z gef.: 780.7700 Da) detektiert, welches bei Betrachtung auf ein seltenes Ionisierungsaddukt mit CH_3CN (m/z ber.: 779.3238 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{K}]^+$) zurückgeführt wurde. Allerdings widersprach die große Abweichung der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS) der These. Durch den Einsatz von LC-MS konnte das Nebenprodukt identifiziert werden, da für Produkt und Nebenprodukt verschiedene Retentionszeiten ermittelt wurden. Das Nebenprodukt eluierte bei einer späteren Retentionszeit (15.69 min) als das Produkt (14.17 min), was auf eine geringe Polarität des Nebenproduktes schließen lässt. In Abbildung 3-23 ist das LC-MS-Chromatogramm der Reaktion gezeigt.

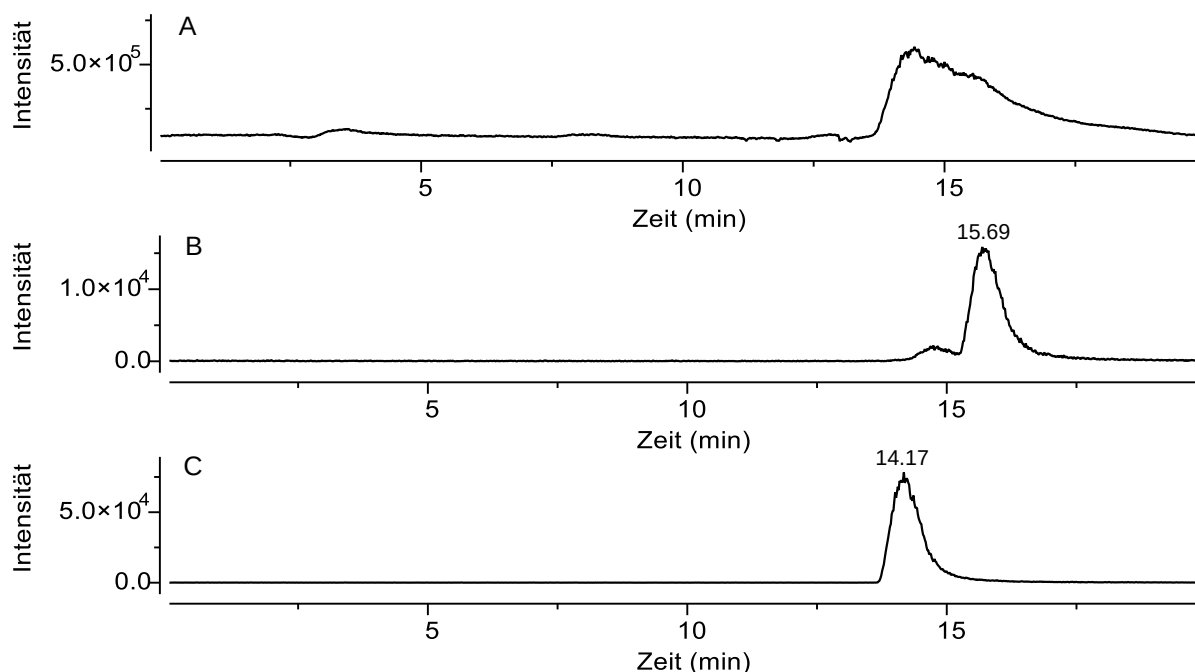
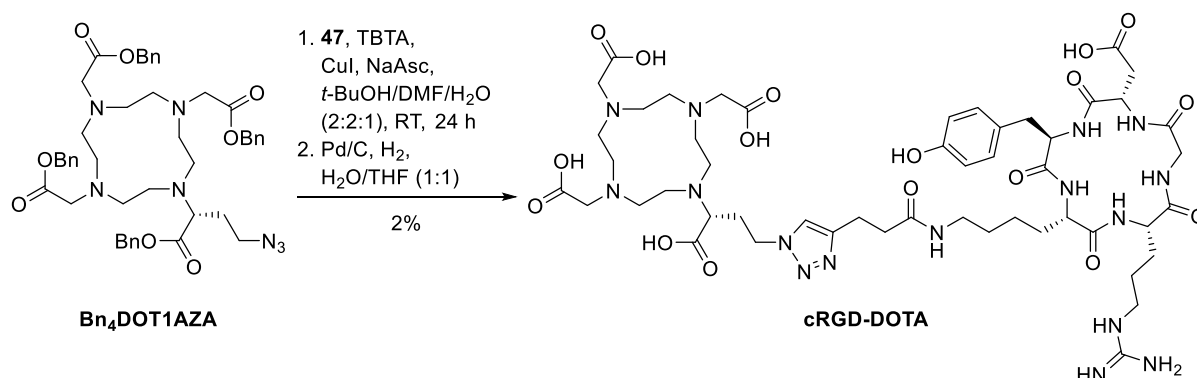


Abbildung 3-23 LC-MS Chromatogramm der Reaktion des freien Amins **cRGD** mit dem Alkin **46**. Das Chromatogramm wurde nach 6 h mit der Standardsäule (C18) unter Standardbedingungen aufgenommen (**6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**) und entsprechen der Auftragung der Intensität gegen die Retentionszeit (min). (A) TIC nach 6 h Reaktionszeit. (B) EIC des Nebenproduktes **48**; $m/z = 780.3675 \pm 0.5$ Da. (C) EIC des Produktes PA-cRGD; $m/z = 700.7735 \pm 0.5$ Da.

Die Massendifferenz deutet darauf hin, dass der Aktivester mit dem Edukt mehrfach reagierte. An welcher Stelle die zweite Substitution stattfand, kann aus der LC-MS nicht abgeleitet werden. Allerdings lässt sich bei der Reaktion eine nichtselektive Reaktion des Aktivesters postulieren, welcher nicht nur mit dem freien Amin reagierte, sondern auch mit der phenolischen Hydroxidgruppe des Tyrosins. Dies kann nur auf die basischen Bedingungen zurückgeführt werden, welche zur Deprotonierung des mild aciden Phenolprotons führten, und

somit einen nukleophilen Angriff des Phenolats auf das aktivierte Carboxylat **46** ermöglichten, da es unter den gegebenen Bedingungen den stärksten nukleophilen Charakter besitzt.

Nach der erfolgreichen Synthese des Alkin-cRGD-Derivates **47** sollte es im nächsten Schritt mittels Click-Chemie mit den zuvor synthetisierten Chelatoren **Bn₄DOT1AZA** und **41** verknüpft werden. Diese Chelatoren stellen mittels Click-Chemie verknüpfte Analoga zu den in Abschnitt 3.4.2 **Synthese neuartiger DO3A-cRGD-Derivate** diskutierten Chelatoren **DOTA-Ahx-cRGD** und **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** dar. Die Synthese des BFCs **cRGD-DOTA** mittels Click-Chemie aus dem Azid **Bn₄DOT1AZA** und dem Alkin **47** ist in Schema 3-35 dargestellt.



Schema 3-35 Synthese des BFCs **cRGD-DOTA** mittels CuAAC.

Nach der Synthese konnte das Produkt **cRGD-DOTA** in einer Ausbeute von 2% nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-Kieselgel (C18) isoliert werden. Die Click-Reaktion wurde bis zum kompletten Umsatz des Azids **Bn₄DOT1AZA** verfolgt, sodass ein signifikanter Ausbeuteverlust während des ersten Reaktionsschritts ausgeschlossen werden konnte. Da das Produkt und der Stabilisator TBTA sich mittels Säulenchromatographie an RP-Kieselgel (C8) nicht voneinander trennen ließen, sollte die Reinigung erst nach der Spaltung der Benzylester erfolgen. Da eine Behandlung im basischen Milieu wegen der bereits diskutierten Labilität von cRGD (**3.4.2 Synthese neuartiger DO3A-cRGD-Derivate**) umgangen werden sollte, wurde auf die Cu-Fällung mit Na₂S verzichtet. Aus diesem Grund wurde auch von der Verseifung der Benzylester mit LiOH abgesehen. Als Alternative sollten die Ester hydrogenolytisch mit Pd/C unter H₂-Atmosphäre gespalten werden. Nach der Reaktion konnte das DOTA-cRGD-Derivat **cRGD-DOTA** jedoch nur in Spuren isoliert werden. Auch nach Zugabe zusätzlicher Essigsäure (AcOH) als Protonenquelle konnte die Ausbeute nicht erhöht werden. Grund dafür sind vermutlich die Verunreinigungen aus der vorhergehenden Reaktion, die zur Vergiftung des Katalysators beitragen könnten.

Um diese Synthesestrategie anzuwenden und gegebenenfalls auch auf den pharmakokinetisch optimierten Chelator **41** zu übertragen, müssen künftig alternative Reinigungsmethoden,

beispielsweise über Größenausschlusschromatographie oder modifiziertes Kieselgel (C4, C18 Pyramid, C18 PolarTec) optimiert werden. Auch wenn sich während der Synthese der Targeting-Vektoren diverse Probleme ergaben, konnten die DOTA-basierten BFCs **DOTA-Ahx-cRGD** und **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** mit cRGD als Targeting-Vektor erfolgreich synthetisiert werden. Die beiden Substanzen stellen ein gutes Testsystem dar, um die Auswirkung zwitterionischer Reste auf die pharmakokinetischen Eigenschaften der Moleküle zu evaluieren. Im Folgenden wurden die Moleküle mit einem Radionuklid gelabelt und in einem Mausmodell *in vivo* getestet.

3.4.3 SPECT-Radioassay

Die zuvor synthetisierten BFCs **DOTA-Ahx-cRGD** und **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** wurden mit ¹¹¹In radioaktiv markiert und in einem bilateralen Melanom-Tumormodell mit α_vβ₃(+) M21 und α_vβ₃(-) M21-L als Negativkontrolle auf ihre Eigenschaften *in vivo* untersucht. Die Versuche mit den radioaktiv markierten Substanzen wurden in Kooperation mit Kelly Henry und Jason S. Lewis am Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York durchgeführt. Abbildung 3-24 zeigt die Strukturformeln der zu untersuchenden Moleküle.

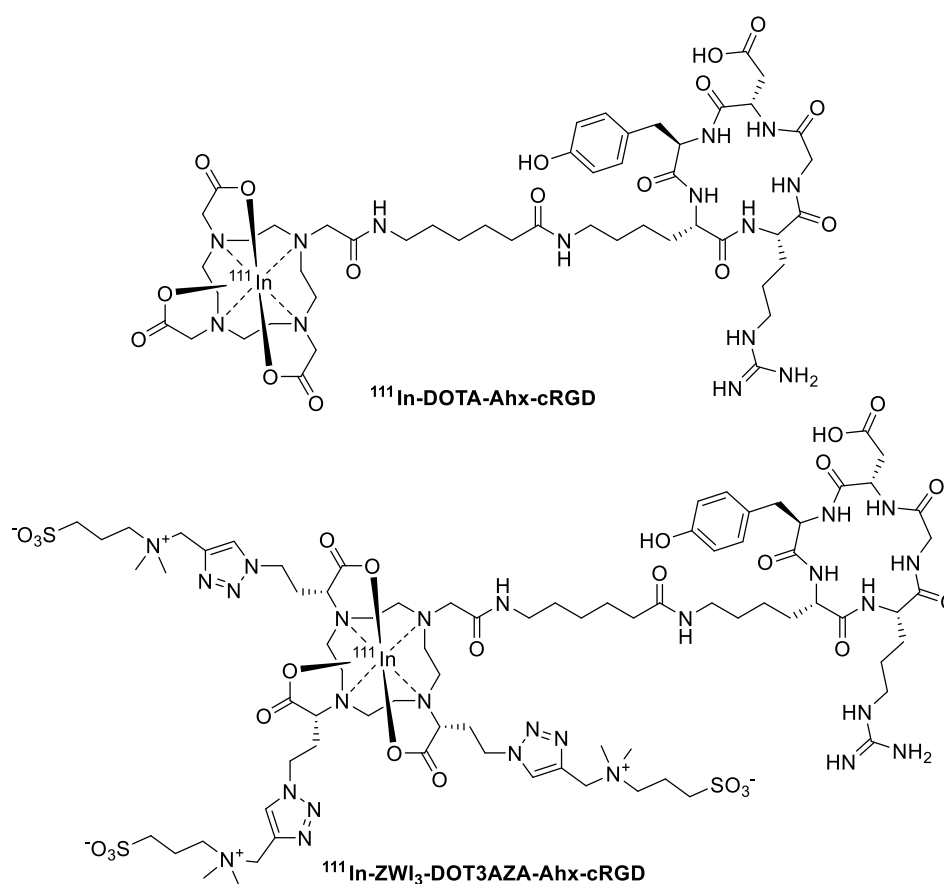


Abbildung 3-24 ¹¹¹In-gelabelte DOTA-cRGD-Derivate ¹¹¹In-DOTA-Ahx-cRGD (oben) und ¹¹¹In-ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD (unten) für *in vivo*-SPECT-Assays.

Um die Biodistribution sowie die tumorspezifische Retention zu ermitteln, wurden die radiomarkierten Substanzen injiziert und anschließend nach 1 h, 4 h, 8 h und 24 h der prozentuale Anteil der injizierten Dosis (%ID) in verschiedenem Gewebe mittels Radiodetektion gemessen. Die Biodistribution der cRGD-Derivate nach einer Stunde (A) ist in Abbildung 3-25 mit dem zugehörigen SPECT-Bild (B, C) dargestellt. Der komplette Datensatz über mehrere Messpunkte ist 7.2 SPECT-Radioassay zu entnehmen.

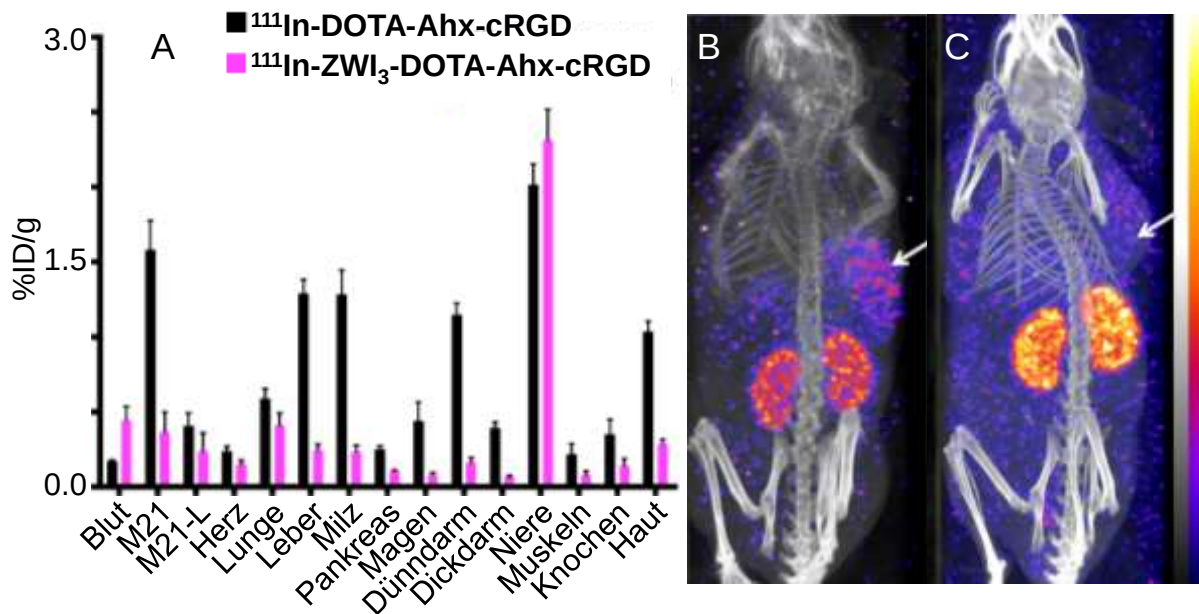


Abbildung 3-25 (A) Direkter Vergleich der Radioaktivität (%ID/g) jedes Gewebes 1 h nach Injektion der cRGD-Derivate $^{111}\text{In-DOTA-Ahx-cRGD}$ (schwarz) und $^{111}\text{In-ZWI}_3\text{-DOTA-Ahx-cRGD}$ (pink). Entsprechende SPECT-Bilder nach 1 h von (B) $^{111}\text{In-DOTA-Ahx-cRGD}$ und (C) $^{111}\text{In-ZWI}_3\text{-DOTA-Ahx-cRGD}$; (B, C) $\alpha_v\beta_3(+)$ M21 wurden auf der rechten Seite (Pfeil) und $\alpha_v\beta_3(-)$ M21-L auf der linken Seite inokuliert. Die Intensität der Radiodetektion ist auf den Maximalwert normiert.

Nach 1 h zeigte $^{111}\text{In-DOTA-Ahx-cRGD}$ erwartungsgemäß eine Tumorretention in $\alpha_v\beta_3(+)$ M21 im Gegensatz zu $\alpha_v\beta_3(-)$ M21-L. Die selektive Tumorretention bestätigte die hervorragende Selektivität des Targeting-Vektors **cRGD**, allerdings zeigte sich auch signifikante Aktivität in der Lunge, der Leber, der Milz, dem Dünndarm, der Haut und besonders in der Niere (Abbildung 3-25, A). Diese sekundären Wechselwirkungen sind die in **1.3 Anwendung und Eigenschaften des Chelators DOTA** bereits diskutierten Probleme, die bei jedem Reagenz für bildgebende Verfahren auftreten. Die Konsequenz ist ein Hintergrundsignal des Bildes, welches intensiver ist als das adressierte Tumorgewebe (Abbildung 3-25, B). Aus diesem Grund wurde der pharmakokinetisch modifizierte BFC $^{111}\text{In-ZWI}_3\text{-DOTA-Ahx-cRGD}$ mit zwitterionischen Resten synthetisiert, dessen Biodistribution (A) in Abbildung 3-25 mit dem zugehörigen SPECT-Bild (Abbildung 3-25, C) dargestellt ist.

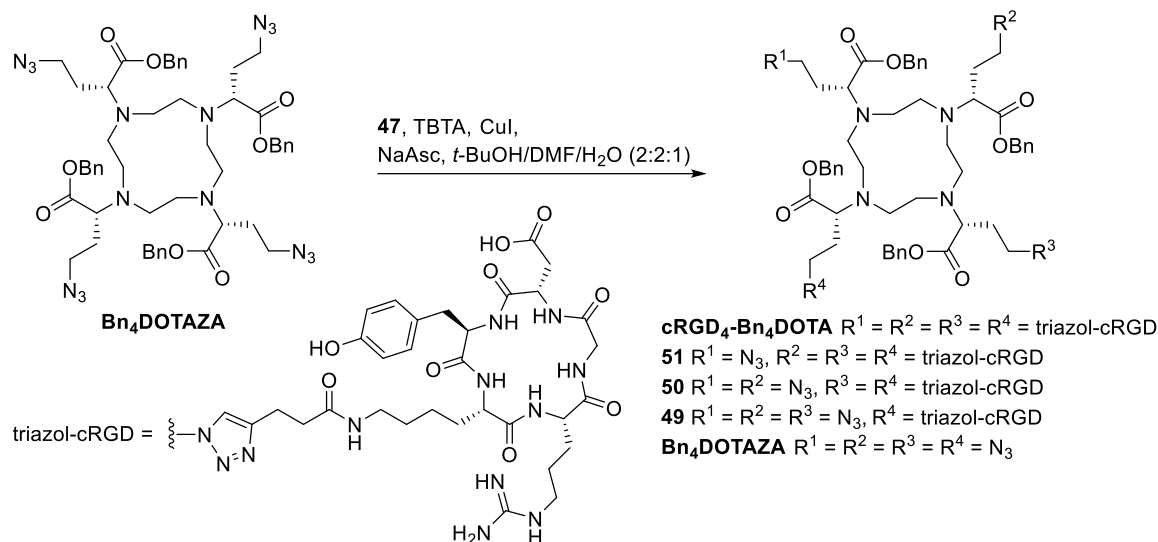
Im Gegensatz zum cRGD-Derivat $^{111}\text{In-DOTA-Ahx-cRGD}$ zeigte $^{111}\text{In-ZWI}_3\text{-DOTA-Ahx-cRGD}$ nach 1 h keine signifikante Tumorretention in $\alpha_v\beta_3(+)$ M21 und $\alpha_v\beta_3(-)$ M21-L. Allerdings konnte in keinem anderen Gewebe außer der Niere Radioaktivität detektiert werden. Zusammenfassend konnte das System aus DOTA als Effektormolekül und cRGD als Targeting-Vektor erfolgreich *in vivo* angewendet werden. Dabei zeigte das System jedoch die literaturbekannten Probleme sekundärer Wechselwirkungen,¹⁸⁶ die durch die Einführung zwitterionischer Reste erfolgreich unterdrückt wurden. Allerdings scheint die Pharmakokinetik dadurch derart erhöht, dass keine Retention im Tumorgewebe stattfand und die gelabelten Reagenzien direkt in der Niere akkumulierten. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, sollte die Anzahl zwitterionischer Funktionalitäten pro Molekül reduziert werden. Alternativ könnte die Anzahl an Targeting-Vektoren erhöht werden, um die Tumorretention weiter zu erhöhen.

3.4.5 DOTAZA als Multimerisierungsplattform

Neben der modularen Verknüpfung von Targeting-Vektoren und der Modifikation pharmakokinetischer Eigenschaften mittels Click-Chemie eignet sich der Chelator DOTAZA als Multimerisierungsplattform. Wie zuvor diskutiert, ist dies in Bezug auf Integrin-Targeting eine vielgenutzte Strategie, um Bindungsaffinitäten zu erhöhen.^{107, 151, 193}

In der Literatur werden oftmals die Vorteile beschrieben, die eine Synthesestrategie mittels CuAAC bietet.^{107, 151, 193} Dabei werden viele Nachteile nicht ausreichend diskutiert. So ist die Entfernung des Cu nach der Reaktion ein großes Problem für Systeme, die auf azacyclischen Chelatoren (DOTA-/NOTA-Derivate) als Effektormolekül basieren,²⁸⁰ da diese eine extreme Affinität zu $\text{Cu}^{1+/2+}$ besitzen.^{42, 183, 280} Eine weitere Herausforderung ist die Reinigung der Verbindungen, die selbst bei vollem Umsatz des Azids geringe Ausbeute produzieren. Insbesondere bei größeren Molekülen (>3000 Da) wurde oft beobachtet, dass nach einer Standardreinigung über RP-Kieselgel (C18) die Zielstrukturen in geringen Ausbeuten isoliert wurden.^{182, 193, 287} Diese Faktoren sollten bei einer Synthese multimerer cRGD-Derivate im Folgenden beachtet werden.

Für die Synthese wurden zunächst die bereits etablierten Reaktionsbedingungen für die CuAAC angewendet. Die Synthese ist in Schema 3-36 dargestellt.



Schema 3-36 Synthese des tetrameren cRGD-Derivates **cRGD₄-Bn₄DOTA**.

Massenspektrometrische Reaktionsverfolgung ergab, dass die Reaktion unter den verwendeten Bedingungen keinen vollständigen Umsatz des Azids **Bn₄DOTAZA** lieferte. Auch nach langer Reaktionszeit von 72 h bei Raumtemperatur wurde ein Substanzgemisch verschiedener Multimere beobachtet. Erst nach einer Erhöhung der Reaktionstemperatur und zusätzlicher Energiezufuhr durch einen Mikrowellenreaktor konnte das Tetramer **cRGD₄-Bn₄DOTA** als Hauptprodukt beobachtet werden. Die Reaktion wurde massenspektrometrisch verfolgt. Die Chromatogramme des Reaktionsverlaufes sind in Abbildung 3-26 gezeigt. Die Retentionszeiten der Produkte und Nebenprodukte, sowie verwendeter Reagenzien sind farblich gekennzeichnet (**47**, grün; **cRGD₄-Bn₄DOTA**, cyan; **51**, hellblau; **50**, blau; **49**, violett; **Bn₄DOTAZA**, lila; TBTA, grau). Die farbliche Kennzeichnung wurde der Markierung durch Retentionszeiten vorgezogen, da diese durch Peak-Tailing und Überlagerung verschiedener Peaks in den Chromatogrammen nicht eindeutig ist. Über den Verlauf der Reaktion ist eine Abnahme der Edukte (grün, lila) bei Zunahme des Produktes (cyan) zu beobachten. Es ist anzumerken, dass die Detektionsmethode nicht quantitativ ist. So scheint im Chromatogramm (Abbildung 3-26, A) wenig Edukt **Bn₄DOTAZA** (lila) vorhanden zu sein, dies ist jedoch auf die Darstellung der Abbildung zurückzuführen, die an die Intensität des wesentlich besser ionisierbaren Cyclopeptids **47** angepasst ist. Ähnlich verhält es sich mit dem Cu-Stabilisator TBTA (grau), der im Chromatogramm (Abbildung 3-26, D) vom Peak-Tailing des Produktes **cRGD₄-Bn₄DOTAZA** überlagert wird.

Ergebnisse und Diskussion

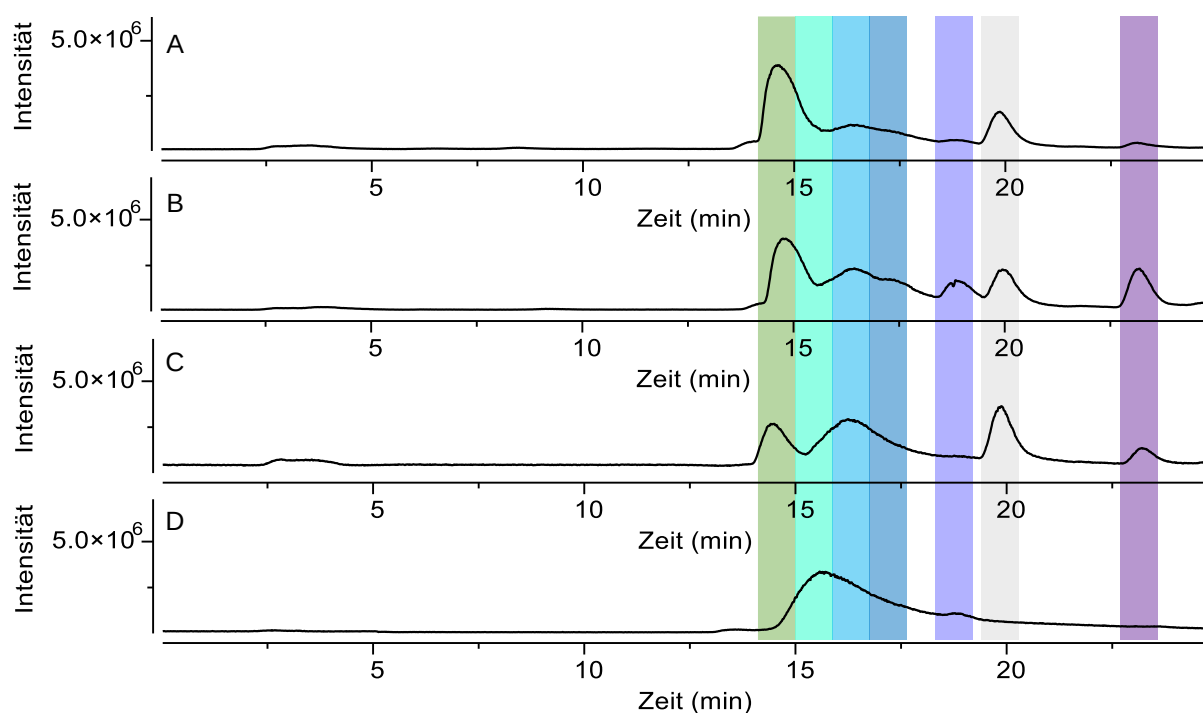


Abbildung 3-26 LC-MS Chromatogramm der Reaktion des Azids **Bn₄DOTAZA** (lila) mit dem Alkin **47** (grün). Die Chromatogramme wurden mit der Standardsäule (C8) in einem Gradienten (5% auf 95% CH₃CN in 25 min) mit Standardlösungsmitteln aufgenommen (**6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**). Die Chromatogramme entsprechen der Intensität aufgetragen gegen die Retentionszeit (min). (A) TIC nach 72 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur. (B) TIC nach zusätzlichen 72 h Reaktionszeit bei 50 °C im Mikrowellenreaktor. (C) TIC nach 120 h Reaktionszeit bei 70 °C im Mikrowellenreaktor. (D) TIC nach 140 h Reaktionszeit bei 100 °C im Mikrowellenreaktor. Das Produkt **cRGD₄-Bn₄DOTAZA** ist cyan markiert, die Nebenprodukte sind hellblau (**51**), blau (**50**), und violett (**49**) markiert. Der Cu-Stabilisator TBTA ist grau markiert.

Die Reaktionsverfolgung zeigt deutlich, welche Herausforderung die vermeintlich einfache Click-Reaktion an den Anwender stellt. Nach 24 h Reaktionszeit wurde neben den Edukten ein Substanzgemisch aus verschiedenen Multimeren (Abbildung 3-26, cyan, hellblau, blau, violett) detektiert. Auch nach einer langen Reaktionszeit von 72 h bei Raumtemperatur (Abbildung 3-26, A) konnte das Produkt nur in einem Substanzgemisch ohne befriedigenden Umsatz des Azids **Bn₄DOTAZA** (lila) detektiert werden. Ein Vorteil der CuAAC ist unter anderem die Vermeidung hoher Reaktionstemperaturen (>50 °C), um das peptidbasierte Alkin **47** nicht zu hydrolysieren. Aufgrund der geringen Umsetzung nach 72 h wurde in folgenden Versuchen die Reaktionstemperatur auf 50 °C unter Verwendung von Mikrowellenstrahlen erhöht, um die Reaktionszeit zusätzlich zu reduzieren. Massenspektrometrische Untersuchungen nach 72 h bei 50 °C (Abbildung 3-26, B) zeigten weiterhin die Edukte **47** (grün) sowie **Bn₄DOTAZA** (lila). Erst nach einer Reaktionszeit von weiteren 48 h bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C wurde das Tetramer deutlich als Hauptprodukt detektiert (Abbildung 3-26, C). Der vollständige Umsatz der Edukte wurde jedoch erst nach einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf unkonventionelle 100 °C bei weiteren 12 h Reaktionszeit beobachtet. Allerdings wurde neben dem Produkt **cRGD₄-Bn₄DOTAZA** (cyan) auch das Nebenprodukt **49** (violett) in der

Reaktionslösung detektiert. Da der Umsatz zu diesem Zeitpunkt befriedigend ausfiel, wurde die Reaktion zu diesem Zeitpunkt beendet und das Produkt **cRGD4-Bn4DOTAZA** mittels HPLC (C8) isoliert (17%). Wie in Abbildung 3-26 (D) zu erkennen ist, entsteht durch extremes Peak-Tailing ein Reinigungsproblem, dem auch durch unpolare Eluenten und erhöhte Flussraten nicht entgegengewirkt werden konnte. Die starke Interaktion mit der stationären Phase hat zu dem Ausbeuteverlust beigetragen. Wie bereits diskutiert, wurde die Reinigung von multimeren cRGD-Derivaten in der Literatur bereits als herausfordernd beschrieben, aufgrund dessen, sowie der hohen funktionellen Dichte des Moleküls, sind 17% Ausbeute befriedigend.^{182, 193, 287} Der auf diese Weise synthetisierte Benzylester **cRGD4-Bn4DOTA** kann künftig nach Verseifung für bildgebende Targeting-Anwendungen *in vivo* eingesetzt werden.

3.4.5 Zusammenfassung Integrin-Targeting

In diesem Abschnitt wurde die Synthese verschiedener DOTA-basierter BFCs für Integrin-Targeting vorgestellt, deren Pharmakokinetik mittels Click-Chemie modifiziert werden konnten. Dabei wurden zwei Syntheserouten vorgestellt, die zusätzlich die Konjugation eines Targeting-Vektors ermöglichen. Die Evaluation mittels SPECT *in vivo* zeigte, dass zwitterionische Reste prinzipiell unspezifische Wechselwirkungen unterdrücken können, gleichzeitig aber auch die Tumorretention verschlechtern. Künftig sollte hier noch das Verhältnis zwischen zwitterionischen Resten und Targeting-Vektoren untersucht werden.

Des Weiteren wurde ein Ansatz präsentiert, der auf der Basis des Chelators **DOTAZA** als Multimerisierungsplattform die Konjugation mehrerer Targeting-Vektoren *via* Click-Chemie ermöglicht. Ein großer Vorteil dieser Verbindungen gegenüber aktuellen BFCs ist die Modularität der Tetracarbonsäure, die nicht nur gängige Metallionen ($^{68}\text{Ga}^{3+}$, $^{111}\text{In}^{3+}$, $^{86}\text{Y}^{3+}$) mit hoher Affinität und Stabilität komplexieren können, sondern auch Metallionen wie $^{89}\text{Zr}^{4+}$, welches als PET-Metall der Zukunft gehandelt wird.^{169, 229}

3.5 PSMA-Targeting

Wie in 1.2.1 **Target und Targeting-Vektor** beschrieben, kommen beim PSMA-Targeting, im Gegensatz zu den Biokonjugaten des Integrin-Targeting,⁸² kleine pseudopeptidische Moleküle als Targeting-Vektoren zur Anwendung.^{110, 288} Ein vielversprechender Targeting-Vektor, um PSMA gezielt zu adressieren, ist die Phosphinsäure **GPI**, die auf dem natürlichen PSMA-Substrat Folat-poly- γ -Glu **52** basiert. Das Substrat bindet an PSMA unter anderem durch günstige Wechselwirkungen des Pteroylrestes mit der Proteininnenwand, sodass die poly- γ -Glu Hydrolyse im aktiven Zentrum der Zinkprotease begünstigt ist (Abbildung 3-27, A). Die Zn-katalysierte Hydrolysereaktion ist in Abbildung 3-27 (B) abgebildet. Der Folatrest, der durch sekundäre Wechselwirkungen Bindungsaffinität zur Zinkprotease PSMA schafft, ist in grün dargestellt.²⁸⁹ Der hydrolysierbare poly- γ -Glu-Rest ist in lila dargestellt. Dabei ist die zu hydrolysierende Amidbindung in orange hervorgehoben. Beim Vergleich der Strukturen des natürlichen Substrates **52** und der pseudopeptidischen Phosphinsäure **GPI** (Abbildung 3-27, C) wird deutlich, dass **GPI** ein Analogon des tetraedrischen Zwischenschrittes der Hydrolysereaktion ist. Im Gegensatz zur Amidbindung kann die P-C-Bindung jedoch nicht auf diese Weise hydrolysiert werden. Die starke Affinität des Phosphinates zu Zn zeichnen **GPI** als ein interessantes Bindungsmotiv in neuartigen PSMA-Targeting-Vektoren aus.

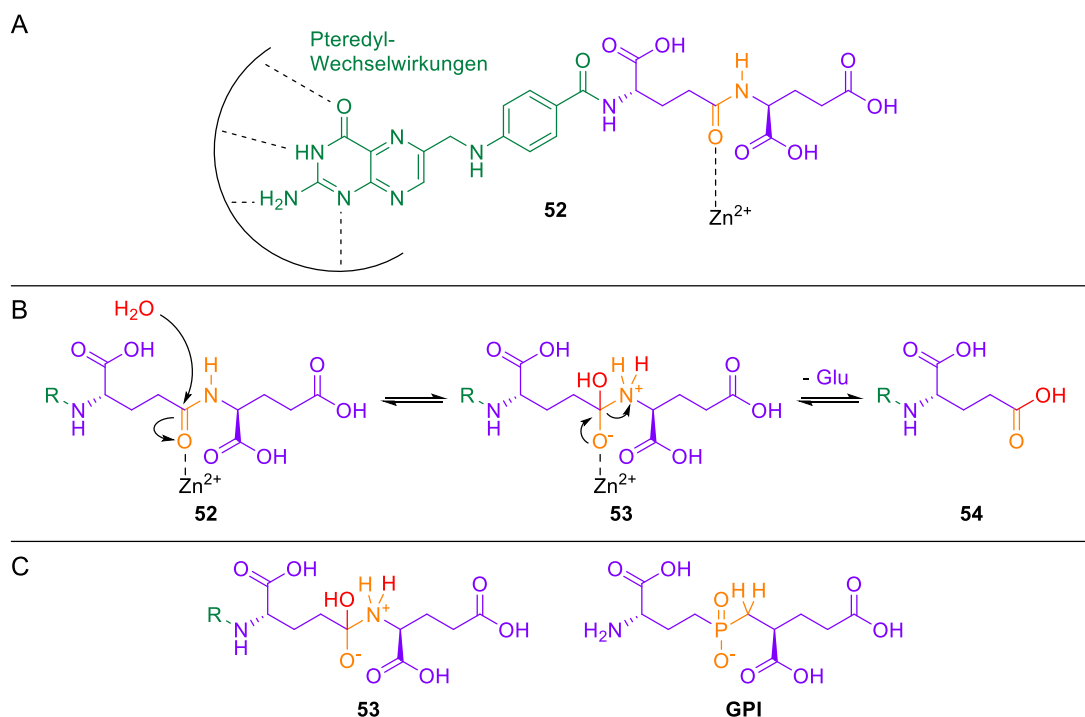


Abbildung 3-27 (A) Strukturformel und (B) Hydrolysereaktion des natürlichen Substrates Folat-poly- γ -Glu **52** mit (C) strukturellem Vergleich der pseudopeptidischen Phosphinsäure **GPI** und dem Bindungsmodus **53** des natürlichen Substrats. Der Pteroylrest (grün), das poly- γ -Glu-Motiv (lila), die zu hydrolysierende Bindung (orange) und das Nukleophil (H₂O, rot) sind farblich gekennzeichnet.

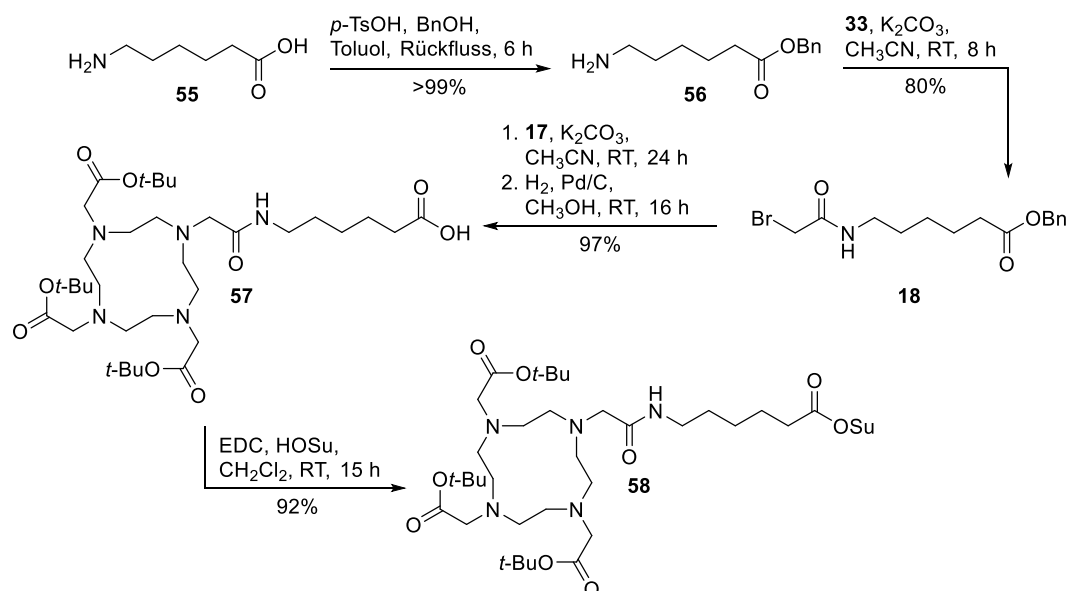
Allerdings ist eine Konkurrenz zwischen **GPI** und Phosphat zu PSMA *in vitro* nachgewiesen,¹²² was es für Anwendungen *in vivo* disqualifiziert, da Phosphat hier ubiquitär vorhanden ist. Eine Strategie zur Erhöhung der Bindungsaffinität von **GPI** ist, neben der Multimerisierung, die Derivatisierung der Phosphinsäure, um sekundäre Wechselwirkungen mit den Proteinstrukturen zu begünstigen,^{121, 122} welche in unmittelbarer Umgebung zum aktiven Zentrum liegen.¹¹⁷ Dabei ist das Strukturmotiv Folat (Abbildung 3-27, grün) mit einem Heteroaromaten und einem *para*-Aminobenzoat die Grundlage für alle neuen GPI-basierten Targeting-Vektoren, deren Synthese von Dr. Natalija Peric,²⁹⁰ Sharah Chandralingam,²⁹¹ und Dr. Florian Rüping durchgeführt wurde.²⁹²

Im Folgenden sollen neue potenzielle Targeting-Vektoren mit DOTA gekuppelt werden, um ihre Bindungseigenschaften in einem geeigneten Zellassay zu evaluieren.

3.5.1 PET-Radioassay

3.5.1.1 Synthese DOTA-konjugierter BFCs mit GPI-basierten Targeting-Vektoren

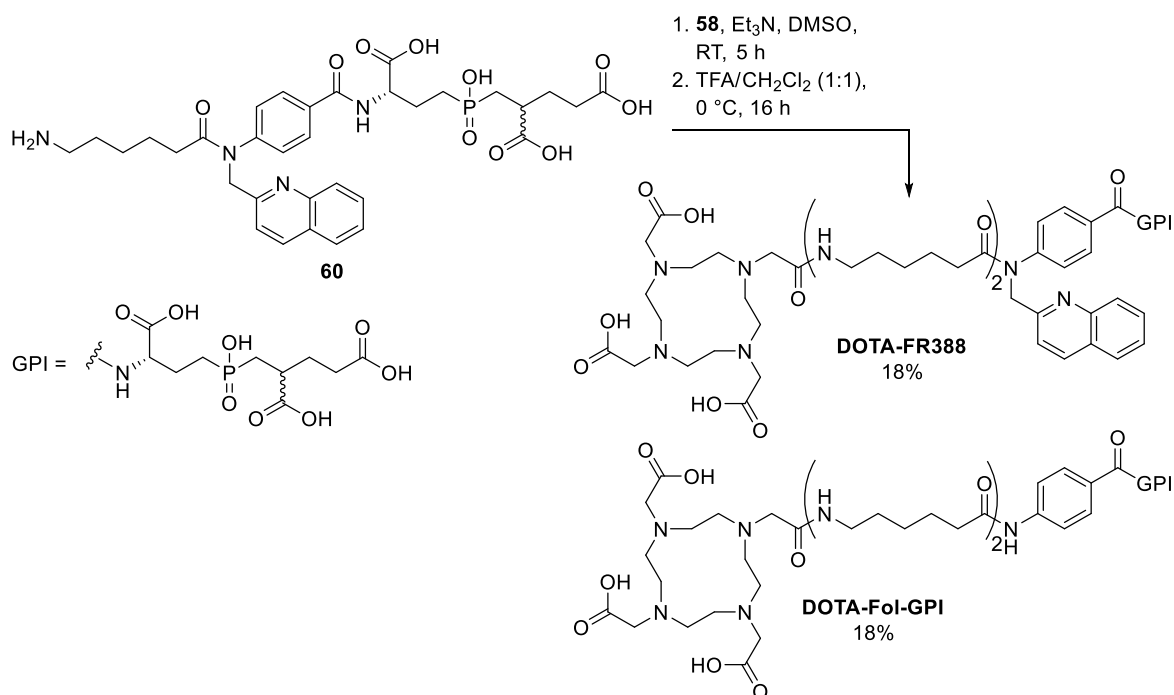
Für die Evaluierung verschiedener Targeting-Vektoren sollen diese im Folgenden mit einem DOTA-basierten Chelator verbunden werden, um die Komplexierung signalgebender Metallionen zu ermöglichen. Dafür sollte zunächst der Grundbaustein **58** synthetisiert werden, welcher durch Aktivesterkupplung mit potentiellen PSMA-Targeting-Vektor verknüpft wurde. In Schema 3-37 ist die Syntheseroute dargestellt.



Schema 3-37 Syntheseroute für den Synthesebaustein **58**.

Der ϵ -Aminohexansäurebenzylester **56** wurde nach einer literaturbekannten Methode aus kommerziell erhältlicher 6-Aminohexansäure **55** synthetisiert und anschließend nach einem Protokoll von Geninatti *et al.* mit Bromoacetyl bromid **33** alkyliert.^{231, 293} Nach demselben

Protokoll wurde anschließend der zuvor synthetisierte Makrocyclus **17** mit dem Alkylbromid **18** alkyliert und der entstandene Benzylester unter H₂-Atmosphäre hydrogenolytisch gespalten.²³¹ Die auf diese Weise synthetisierte freie Carbonsäure **57** wurde mit EDC und HOSu in den Aktivester **58** überführt. Der zentrale Baustein **58** konnte in einer Ausbeute von 92% erhalten werden. Im Folgenden sollte dieser Baustein mit den potenziellen Targeting-Vektoren mittels Peptidkupplung verknüpft werden, die in Kooperation mit Dr. Florian Rüping und Dr. Natalija Peric synthetisiert wurden.²⁹² Alle potenziellen Liganden verfügen über die Phosphinsäure **GPI**, die zusammen mit einer Aminobenzoesäure und verschiedenen Heteroaromaten das Strukturmotiv von Folat-poly- γ -Glu imitieren. Für die Verknüpfung und die räumliche Trennung wurde ein Linker verwendet, der durch Acylierung oder Alkylierung das Folatmimetikum mit dem Chelator DOTA verbindet. In Schema 3-38 ist die Synthese eines Derivates mit 2-Chinolin als Heteroaromat dargestellt. Für die Übersichtlichkeit wird im Folgenden das Kürzel GPI anstelle der kompletten Strukturformel verwendet. Dieses Kürzel wird in allen folgenden Schemata verwendet.



Schema 3-38 Synthese des acylierten 2-Chinolin-GPI-Derivates **DOTA-FR388**.

Die Synthese lieferte das Produkt in einer Ausbeute von 18%. Ein Nebenprodukt **DOTA-Fol-GPI** konnte ebenfalls in 18% Ausbeute isoliert werden, welches keinen Heteroaromaten im Folatmotiv enthielt. Da dieses Nebenprodukt bei der Peptidkupplung nicht beobachtet wurde, konnte darauf geschlossen werden, dass die sauren Bedingungen der *tert*-Butylesterspaltung zum Nebenprodukt führten. Durch den fehlenden Heteroaromaten sinkt die Ähnlichkeit zum natürlichen PSMA Substrat, dennoch eignet sich die isolierte Verbindung als Referenzsubstanz,

um den Einfluss des Heteroaromaten auf die Bindungseigenschaften der Folatmimetika abzuschätzen. Folglich sollten beide Substanzen in dem folgenden Assay getestet werden. Abbildung 3-28 zeigt das Chromatogramm der Reaktion aus Schema 3-38 nach 1 h Reaktionszeit. Das gewünschte Produkt **DOTA-FR388** (blau), das Nebenprodukt **DOTA-AB-GPI** (grün), sowie das freie Amin **60** (gelb) und das Hydrolyseprodukt **59** (grau) konnten identifiziert werden.

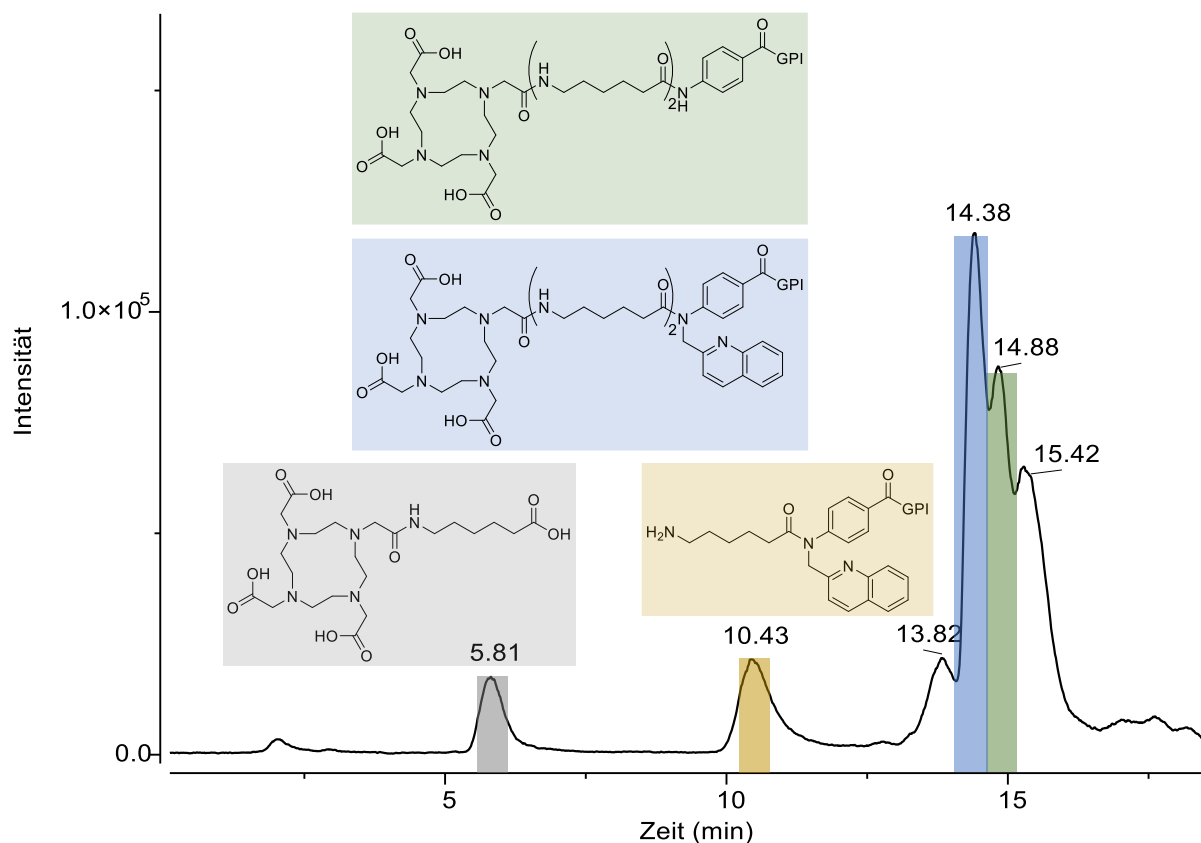
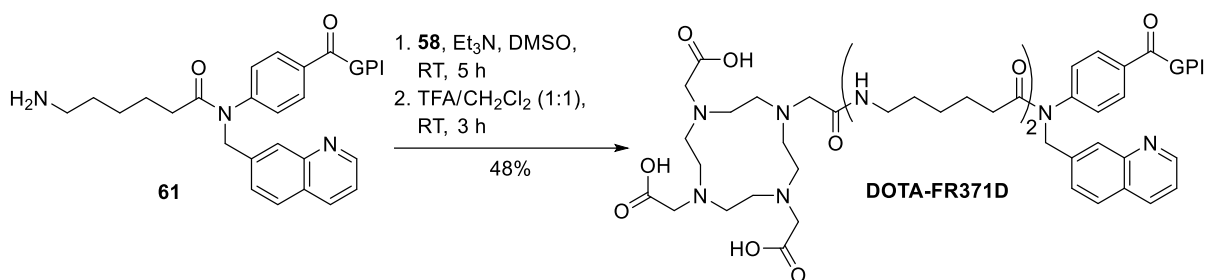


Abbildung 3-28 LC-MS Chromatogramm der Reaktion nach 1 h Reaktionszeit. Die Retentionszeit ist gegen die totale Ionenintensität aufgetragen. Produkte der Reaktion sind farblich gekennzeichnet: **59** (grau, 5.81 min), **60** (gelb, 10.43 min) **DOTA-FR388** (blau, 14.38 min), **DOTA-Fol-GPI** (grün, 14.88 min). Das Chromatogramm wurde unter Standardbedingungen aufgenommen, die in **6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie** aufgeführt sind.

Aus dem Chromatogramm lässt sich ableiten, dass der Aktivester **58** im ersten Reaktionsschritt nicht vollständig mit dem freien Amin **60** umgesetzt wurde, da sowohl der vollständig hydrolysierte Aktivester **59** (Abbildung 3-28, grau, 5.81 min), als auch das freie Amin **60** (Abbildung 3-28, gelb, 10.43 min) im Chromatogramm zu sehen sind. Bei einer Retentionszeit von 13.82 min ist außerdem der *tert*-Butylester **57** zu sehen, der aufgrund der Reaktionszeit und geringer Temperatur (0 °C) noch nicht gespalten wurde. Die Retentionszeiten des Produktes **DOTA-FR388** und des Nebenproduktes **DOTA-Fol-GPI** erklären die niedrigen Ausbeuten (jeweils 18%), da sich selbst mittels HPLC die Isolierung anspruchsvoll gestaltete.

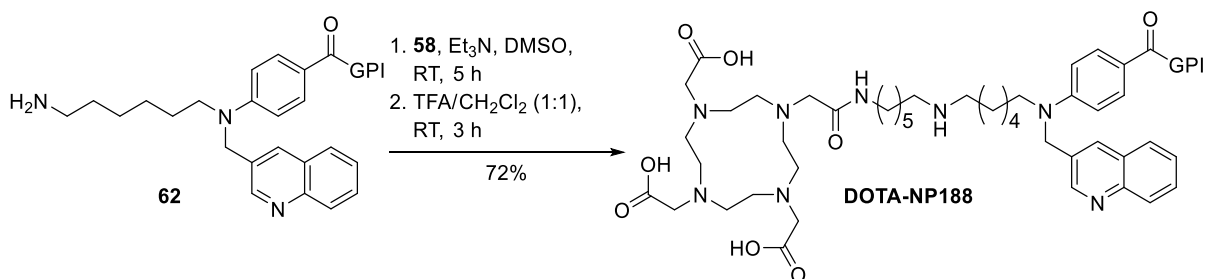
Als nächstes wurde das 7-Chinolin-Derivat **DOTA-FR371D** synthetisiert. Die Reaktion ist in Schema 3-39 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-39 Synthese des acylierten 7-Chinolin-GPI-Derivates **DOTA-FR371D**.

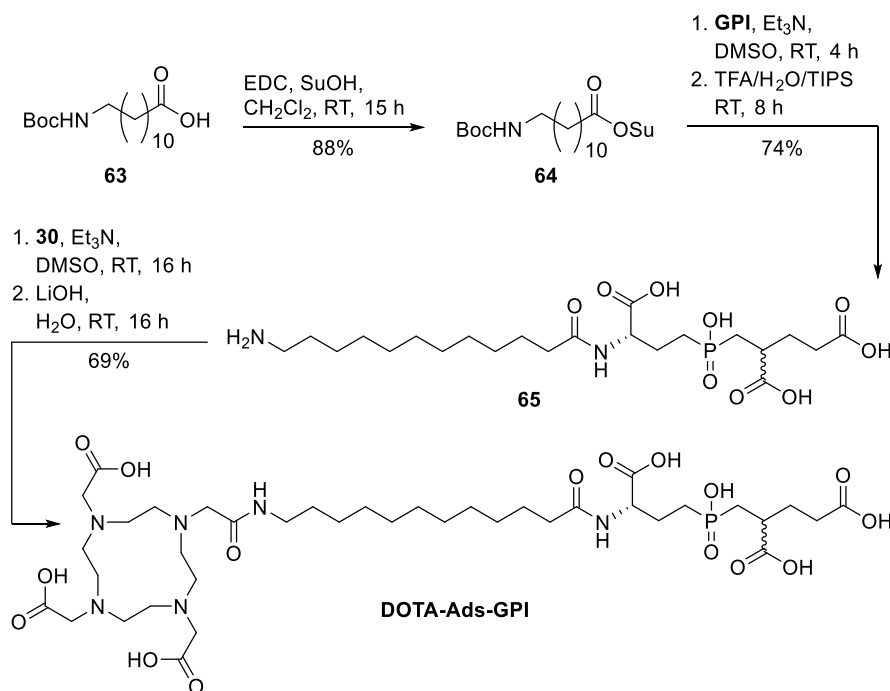
Die Synthese lieferte das Produkt **DOTA-FR371D** in befriedigender Ausbeute von 48%. Im Gegensatz zur Synthese von des 2-Chinolin-Derivates **DOTA-FR388** wurde kein Nebenprodukt ohne Heteroaromat beobachtet. Neben dem acylierten Folatmimetikum wurde die Verbindung von Linker und Folatmotiv auch über Buchwald-Hartwig-Alkylierung realisiert.²⁹⁴⁻²⁹⁶ Die Synthese eines alkylierten Derivates mit 3-Chinolin als Heteroaromat ist in Schema 3-40 dargestellt.



Schema 3-40 Synthese des alkylierten 3-Chinolin-GPI-Derivates **DOTA-NP188**.

Die Synthese lieferte das Produkt **DOTA-NP188** in guter Ausbeute von 72%. Auch bei dieser Reaktion wurde kein Verlust des Heteroaromaten als Nebenprodukt beobachtet. Für den Assay wurden neben den in dieser Arbeit synthetisierten Substanzen auch Referenzsubstanzen benötigt. Zu diesem Zweck sollte das DOTA-GPI-Konjugat **DOTA-Ads-GPI** ohne zusätzliche Funktionalitäten synthetisiert werden, welches anschließend als Negativkontrolle eingesetzt werden konnte. Die Synthese ist in Schema 3-41 dargestellt.

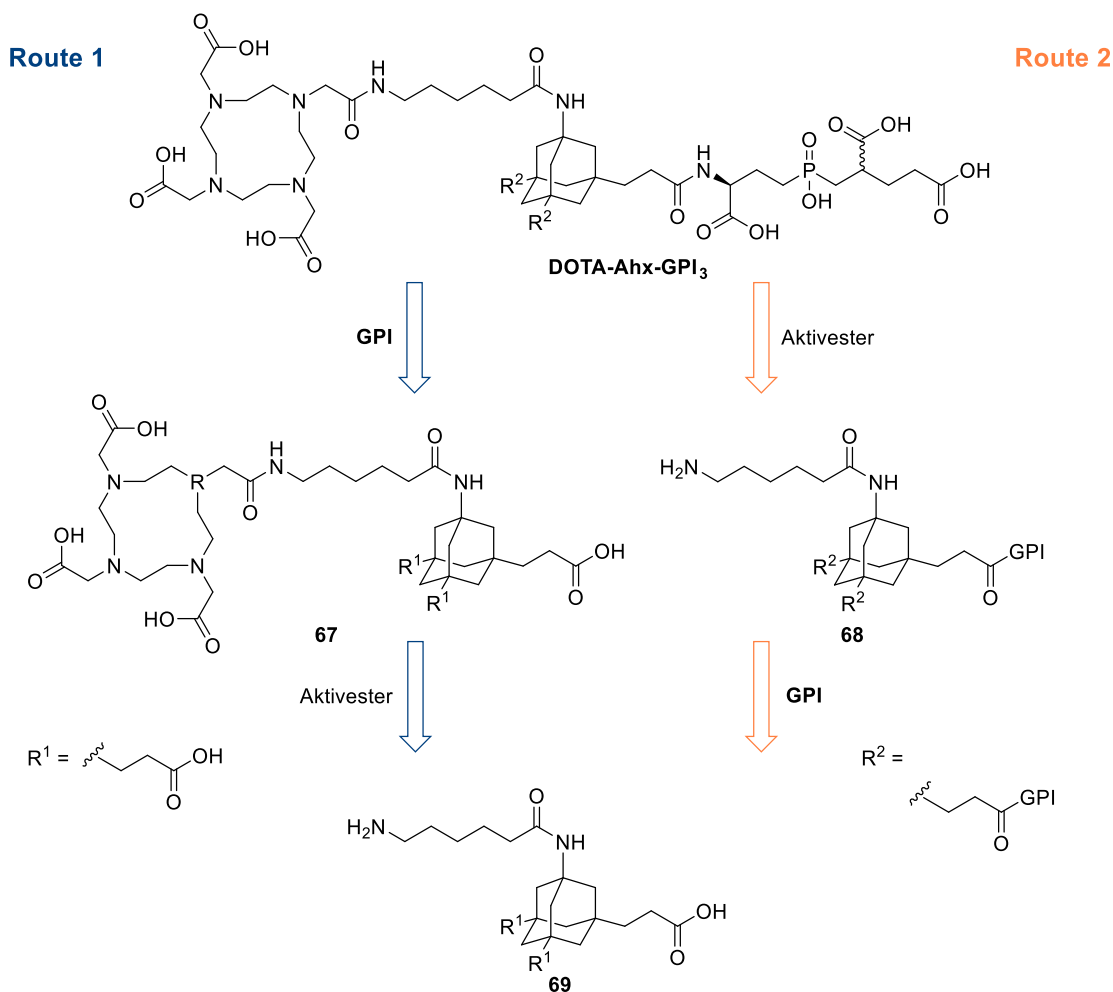
Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-41 Syntheseroute der Referenzsubstanz **DOTA-Ads-GPI**.

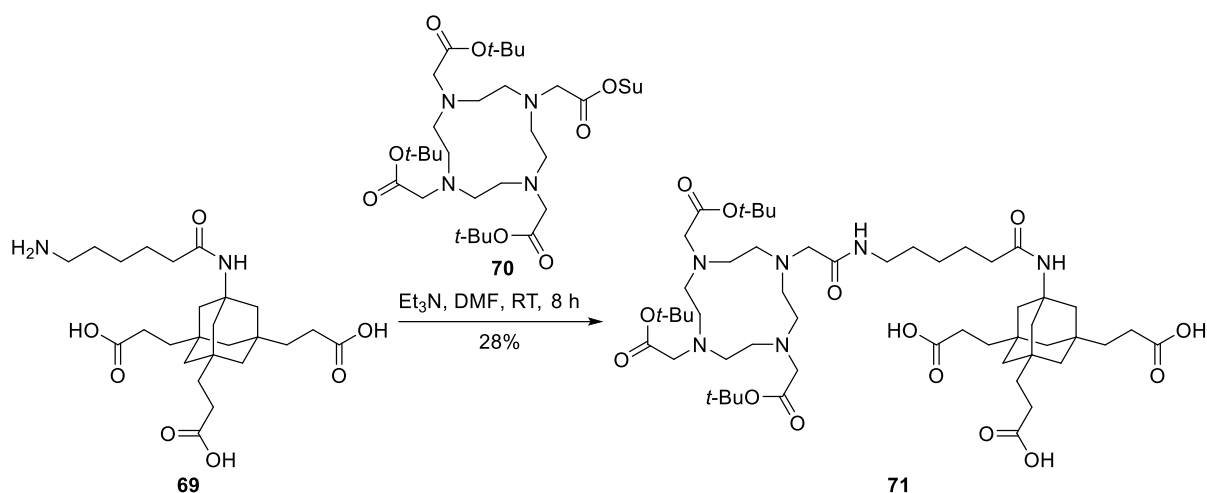
Zunächst wurde die kommerziell erworbene *N*-Boc-12-Aminododekansäure **63** mittels Aktivsterkupplung mit **GPI** verbunden. Anschließende Spaltung des Carbamates lieferte das freie Amin **65** in guter Ausbeute von 74%. Durch die Reaktion mit dem zuvor synthetisierten Aktivester **30** und anschließender Verseifung der Benzylester konnte das GPI-Monomer **DOTA-Ads-GPI** in guter Ausbeute von 69% erhalten werden.

Zusätzlich zur Negativkontrolle wurde für einen biologischen Assay eine Positivkontrolle benötigt, die denselben Targeting-Vektor (**GPI**) besitzt wie die Negativkontrolle und die zu untersuchenden neuen Substanzen. Ein GPI-Trimer wurde bereits von Humblet *et al.* erfolgreich in einem Fluoreszenzassay als selektiver Ligand für PSMA(+) LNCaP Zellen angewendet.¹²² Es zeigte sich, dass GPI-Multimere im Gegensatz zu Monomeren auch in phosphathaltigem Medium eine Affinität zu PSMA(+) Ziellinien aufweisen.¹²² Auf dieser Basis sollte ein DOTA-Derivat entwickelt werden, dass als Positivkontrolle in einem Radioassay dienen sollte. Für die Synthese können zwei Ansätze gewählt werden. In Schema 3-42 sind beide Syntheserouten schematisch dargestellt.



Schema 3-42 Gegenüberstellung der beiden Syntheserouten eines DOTA-konjugierten GPI-Trimers.

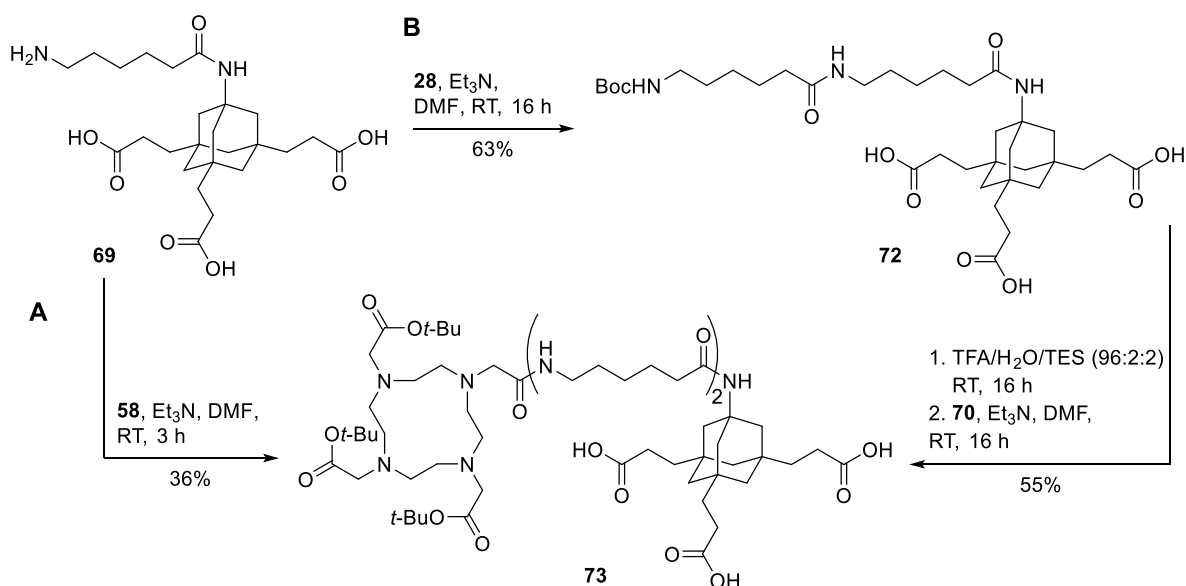
Route 1 (blau) verfolgt die Konjugation des Adamantangrundgerüsts mit dem DOTA-Chelator und anschließender Kupplung mit der Phosphinsäure **GPI**. Die Strategie von Route 2 (orange) ist die Bindung des Grundgerüsts mit **GPI** im ersten Schritt, mit darauffolgender DOTA-Konjugation. In diesem Zuge sollte auch der Einfluss unterschiedlicher Linkerlängen (6 Methyleneinheiten vs. 12 Methyleneinheiten) untersucht werden, die durch 6-Aminohexansäure-Bausteine aufgebaut wurden. Zunächst wurde Route 1 verfolgt, da es sich vom ökonomischen Aspekt anbietet die Phosphinsäure **GPI** erst spät in der Syntheseroute zu implementieren. In Schema 3-43 ist die Synthese des Adamantanderivates mit kurzem Linker (C6) dargestellt.



Schema 3-43 Synthese des Adamantanderivates **71** mit kurzem Linker.

Die Konjugation des literaturbekannten Adamantanderivates mit dem zuvor synthetisierten Aktivester **70** lieferte die Tricarbonsäure **71** in einer Ausbeute von 28%. Die moderate Ausbeute lässt sich möglicherweise mit dem sterischen Anspruch beider Reagenzien erklären. Auch die Reinigung des Produktes gestaltete sich schwierig, da sich der hydrolysierte Aktivester nach säulenchromatischer Reinigung sowohl an Kieselgel, als auch an RP-Kieselgel (C18) nicht komplett entfernen ließ.

Die Synthese des Adamantanderivates *t*-Bu₃DOTA-Ahx₂-Ad mit längerer Linkereinheit (C12) wurde in Analogie zu *t*-Bu₃DOTA-Ahx-Ad realisiert. Die Syntheseroute ist in Schema 3-44 dargestellt.



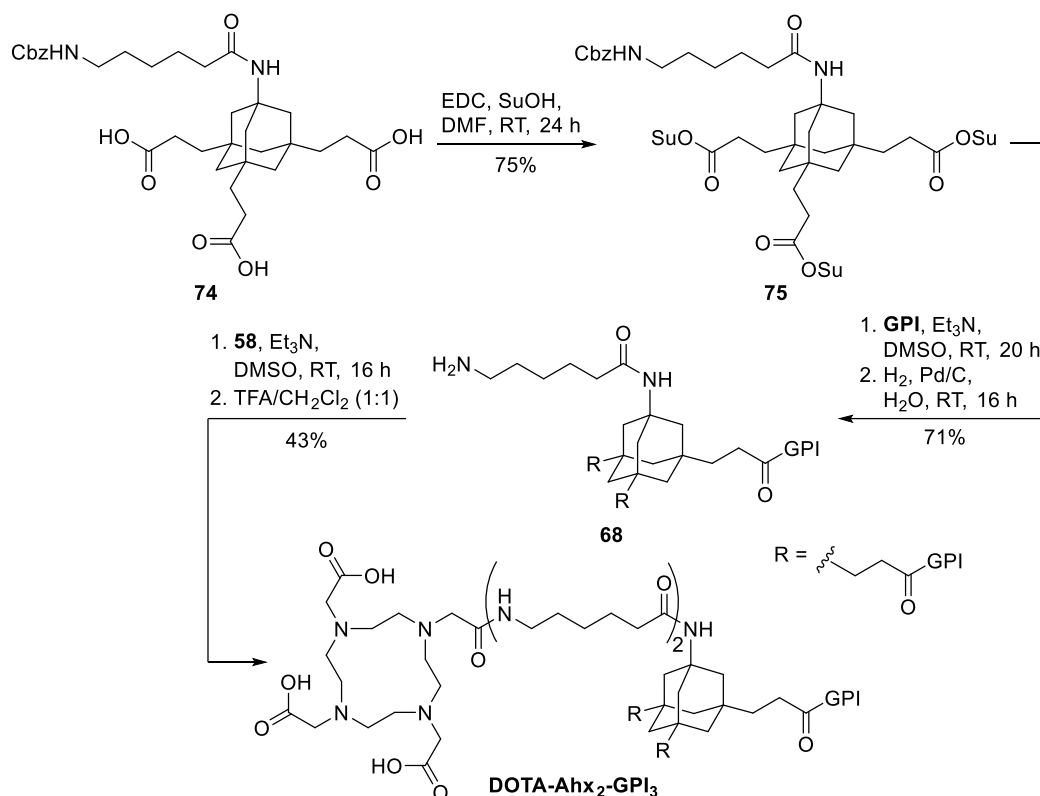
Schema 3-44 Synthese des Adamantanderivates **73** mit langem Linker über zwei verschiedene Routen **A** und **B**.

Die Konjugation des Adamantanderivates **69** mit dem zuvor synthetisierten Aktivester **58** lieferte das Produkt **73** in einer Ausbeute von 36% (Route **A**). Die Reaktion wurde

dünnschichtchromatographisch verfolgt, bis keine Färbung mit Ninhydrin zu erkennen war. Auch massenspektrometrisch wurde der komplette Umsatz des Amins **69** verifiziert. Allerdings gestaltete sich die Reinigung wie beim Adamantanderivat **73** als anspruchsvoll. Route **B** (Schema 3-42) lieferte das Produkt **73** in einer zweistufigen Synthese. Zuerst wurde das freie Amin **69** mit dem Aktivester **28** umgesetzt und lieferte das Adamantangrundgerüst mit verlängerter Linkereinheit **72** in einer Ausbeute von 63%. Anschließend wurde das Carbamat sauer gespalten und das freigewordene Amin mit dem Aktivester **70** umgesetzt. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 55% isoliert werden. Zwar zeigte Route **B** deutlich bessere Ausbeuten bei der Konjugation des Adamantangrundgerüsts mit dem DOTA-Derivat, allerdings liefert die Gesamtausbeute von Route **B** mit 35% über 3 Stufen keine sinnvolle Alternative zu Route **A** (36%). Auffällig war, dass die Produkte trotz verschiedener Reinigungsprotokolle nicht restlos isoliert werden konnten, sobald der Chelator mit dem Adamantangrundgerüst verknüpft war. Insgesamt scheint der Ansatz, zuerst den Chelator mit dem Adamantangrundgerüst zu verknüpfen, wenig erfolgsversprechend für eine ökonomische Syntheseroute.

Die in Schema 3-45 dargestellte Route 2, bei der zuerst die Phosphinsäure **GPI** mit dem Adamantangrundgerüst verbunden wird, sollte im Folgenden untersucht werden. Ausgehend von literaturbekannten Adamantangrundgerüsten soll in Anlehnung an die bereits bekannte Synthese das freie Amin **68** synthetisiert werden (Schema 3-45).²⁹⁷

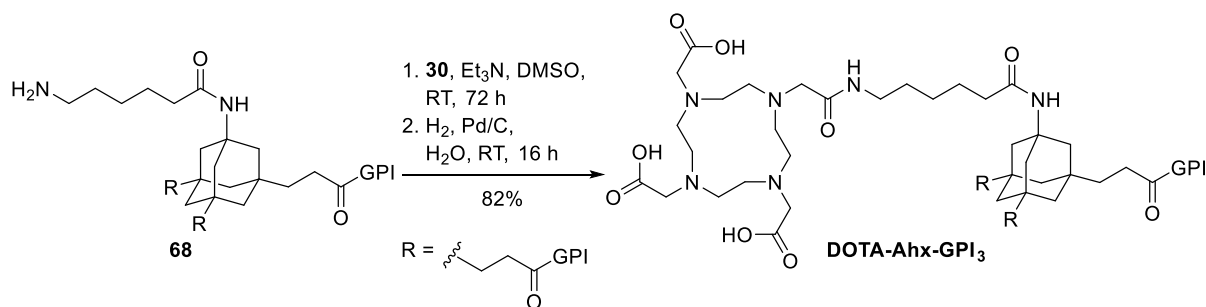
Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-45 Syntheseroute der Positivkontrolle **DOTA-Ahx-GPI₃**.

Zunächst wurde die Tricarbonsäure **74** in Anlehnung an ein Standardprotokoll in den Aktivester **75** überführt.²⁹⁷ Durch Konjugation der Phosphinsäure **GPI** und anschließender hydrogenolytischer Spaltung des Benzylcarbamates konnte das GPI-Trimer **68** erhalten werden. Dieses wurde in der Literatur bereits durch eine andere Syntheseroute beschrieben,¹²² allerdings zeigt diese Arbeit zum ersten Mal die komplette Analytik der Verbindung. Das freie Amin **68** wurde dann mit dem Aktivester **58** versetzt. Der synthetisierte *tert*-Butylester wurde mit Trifluoressigsäure gespalten, sodass das gewünschte Zielmolekül **DOTA-Ahx₂-GPI₃** nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-Kieselgel (C8) in einer Ausbeute von 43% isoliert werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine der beiden Routen einen deutlichen Vorteil besitzt. Route 2 lieferte das Produkt in einer Gesamtausbeute von 24%. Um diese Ausbeute zu erreichen, müsste das Produkt **73** aus Route 2 das Zielmolekül **DOTA-Ahx₂-GPI₃** in einer Ausbeute von mindestens 70% nach GPI-Kupplung und anschließender Esterhydrolyse liefern. Der Vorteil von Route 2 ist die Modularität, die ausgehend vom GPI-Trimer **68** nicht nur die Synthese des **DOTA-Ahx₂-GPI₃** durch **58** ermöglicht, sondern auch die Synthese des kurzkettigen Derivates **DOTA-Ahx-GPI₃** mit **70** (Schema 3-46).



Schema 3-46 Synthese des Positivkontrolle **DOTA-Ahx-GPI₃**.

Die Synthese der kurzkettigen Positivkontrolle **DOTA-Ahx-GPI₃** aus dem freien Amin **68** mit dem Aktivester **30** verlief in einer guten Ausbeute von 82%.

3.5.1.2 Evaluation neuer PSMA-Liganden mittels ⁶⁸Ga *in vivo*

Alle zuvor synthetisierten potentiellen PSMA-Liganden sollten im Folgenden mit dem Radioisotop ⁸⁶Ga markiert, und ihre PSMA-Bindungseigenschaften in einem Radioassay evaluiert werden. Dabei sollten unter verschiedenen Bedingungen Faktoren wie Spezifität, Internalisierung und Phosphatkompetition untersucht werden. Die Spezifität der neuen Targeting-Vektoren sollte mit PSMA exprimierenden (PSMA(+)) und nicht-PSMA-exprimierenden (PSMA(-)) Krebszellen getestet werden. In der Literatur sind eine Reihe von Ziellinien mit passenden Eigenschaften bekannt,^{114, 115} als Standard hat sich jedoch das System aus PSMA(+) LNCaP und PSMA(-) PC-3 für *in vivo* und *in vitro* Anwendungen etabliert.^{115, 298} Eine Differenzierung zwischen den Ziellinien würde für eine Affinität der Targeting-Vektoren zu PSMA sprechen. Allerdings müssen die Targeting-Vektoren für eine diagnostische Anwendung nicht nur eine PSMA-Affinität besitzen, sondern auch von den Zellen internalisiert werden, um eine Detektion zu ermöglichen. Um die Internalisierung der radiomarkierten Substanzen zu beurteilen, sollten die Zellen mit den Substanzen bei 4 °C und 37 °C inkubiert werden, da die Bioaktivität der Zellen bei 4 °C minimiert ist. Auf diese Weise kann eine Anreicherung an radioaktivem Material auf Internalisierung (37 °C), respektive unspezifische Oberflächenbindung (4 °C) zurückgeführt werden. Wegen der bekannten Kompetition GPI-basierter Targeting-Vektoren mit Phosphat sollte der Assay sowohl in fetalem Kälberserum (FBS), als auch in phosphatfreiem Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- (TRIS) Puffer durchgeführt werden. Idealerweise sollten Targeting-Vektoren eine Differenzierung zwischen LNCaP und PC-3 in phosphathaltigem Medium bei 37 °C zeigen und keine unspezifische Oberflächenbindung bei 4 °C aufweisen.

Der Assay mit entsprechender ^{68}Ga -Markierung als Tracer wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jason S. Lewis am Memorial Kettering Cancer Center durchgeführt. Für die Validierung des Assays wurde der Harnstoff-basierte Targeting-Vektor **PSMA-617** verwendet, der eine literaturbekannte Affinität zu PSMA(+) LNCaP besitzt.^{128, 129} Neben der Reproduktion literaturbekannter Parameter von ^{68}Ga -**PSMA-617** (effektiver $K_d = 2.34 \pm 2.94 \text{ nM}$),¹²⁹ wurde eine PSMA-Selektivität der GPI-Trimere ^{68}Ga -**DOTA-Ahx-GPI₃** und ^{68}Ga -**DOTA-Ahx₂-GPI₃** in Serum erwartet, da deren Targeting-Eigenschaften bereits in einem Fluoreszenzassay evaluiert wurde.¹²² Des Weiteren sollte das GPI-Monomer ^{68}Ga -**DOTA-Ads-GPI** zwar eine PSMA-Selektivität bei 37 °C in TBS-Puffer zeigen, diese jedoch aufgrund der bekannten Kompetition mit Phosphat in Serum signifikant verringern. Im Gegensatz dazu sollte überprüft werden, ob die neuen GPI-basierten Targeting-Vektoren in ^{68}Ga -**DOTA-FR388**, ^{68}Ga -**DOTA-Fol-GPI**, ^{68}Ga -**DOTA-FR371D** und ^{68}Ga -**DOTA-NP188** durch die strukturellen Änderungen auch in Serum eine PSMA-Selektivität besitzen. Die Ergebnisse des Radioassays sind in Abbildung 3-29 zusammengefasst.

Ergebnisse und Diskussion

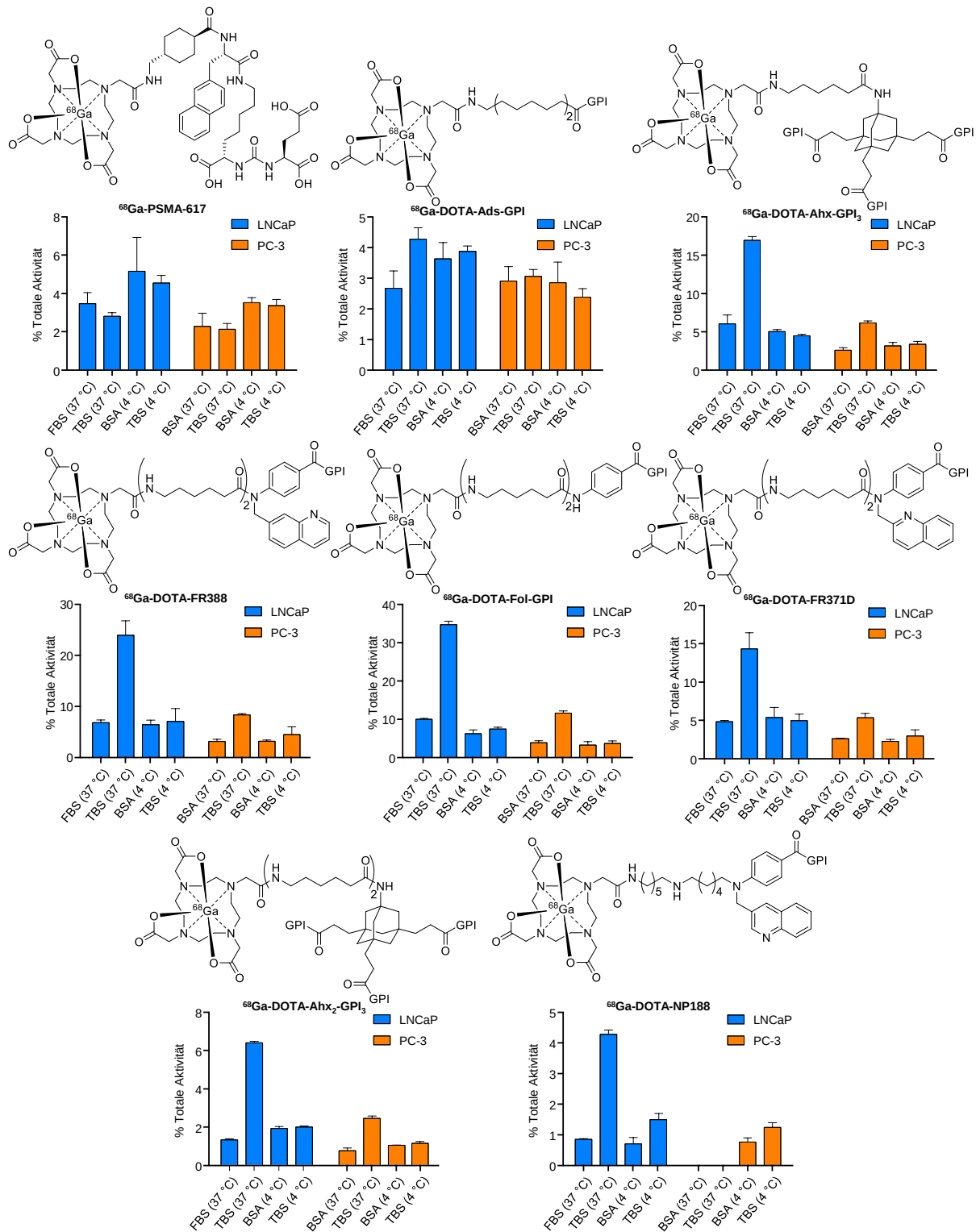


Abbildung 3-29 Übersicht des Radioassays mit den radiomarkierten Targeting-Vektoren ⁶⁸Ga-PSMA-617, ⁶⁸Ga-DOTA-Ads-GPI, ⁶⁸Ga-DOTA-Ahx-GPI₃, ⁶⁸Ga-DOTA-FR388, ⁶⁸Ga-DOTA-Fol-GPI, ⁶⁸Ga-DOTA-FR371D, ⁶⁸Ga-DOTA-Ahx₂-GPI₃ und ⁶⁸Ga-DOTA-NP188. Dargestellt sind jeweils verschiedene Bedingungen für LNCaP (blau) und PC-3 (orange) Zelllinien mit den entsprechenden Strukturformeln der eingesetzten Substanzen.

Die radiomarkierte Referenzsubstanz ⁶⁸Ga-PSMA-617 zeigte nicht die erwarteten Ergebnisse.^{128, 129} Zum einen konnte nicht zwischen den beiden Zelllinien differenziert werden, was im Gegensatz zu der literaturbekannten Affinität von PSMA-617 zu LNCaP Zellen steht,¹²⁹

zum anderen zeigte sich eine höhere Anreicherung radioaktiven Materials bei 4 °C als bei 37 °C. Dieser Befund ist nicht zu erklären, da bei 37 °C zusätzlich zur unspezifischen Oberflächenbindung Akkumulation durch Internalisierung von Targeting-Vektoren stattfindet. Da die Literaturwerte von ⁶⁸Ga-PSMA-617 nicht reproduziert werden konnten, sind die Ergebnisse dieses Assays als nicht-validiert zu betrachten. Da der Assay in einem externen Labor von einem Kooperationspartner durchgeführt wurde, ist eine detaillierte Fehleranalyse an dieser Stelle nicht möglich. Es ist bekannt, dass LNCaP Zellen zwar ein hervorragendes Testsystem für PSMA-Targeting darstellen, jedoch extrem empfindlich sind und eine moderate Adhärenz besitzen.²⁹⁹ Diese Faktoren könnten die Ergebnisse beeinflusst haben.

Abschließend lieferte der Radiosay nicht die gewünschten Ergebnisse. Keine der getesteten Substanzen zeigte eine PSMA-Spezifität in phosphathaltigem Medium bei 37 °C. Allerdings ließ sich aus dem Assay ein Trend ableiten: Alle neuen Substanzen, sowie die GPI-Trimere zeigten PSMA-Selektivität in TBS-Puffer. Dieser Effekt kann durch zwei Hypothesen erklärt werden: (1) Durch die Abwesenheit von Phosphat liegt keine Konkurrenz zwischen Phosphinsäure und Phosphat vor, was zu einer erhöhten Internalisierung führt. (2) Das im TBS enthaltene TRIS begünstigt über ein sich bildendes Ionenpaar die Bindung über einen bis jetzt unbekannten Mechanismus. Die Hypothese (2) wurde basierend auf diesem Assay von Dr. Natalija Peric detailliert bearbeitet.²⁹⁰ In diesem Zuge wurden in Kooperation mit Dr. Natalija Peric und Sharah Chandralingam neue DOTA-Derivate synthetisiert,²⁹¹ die Variationen in der Linkereinheit zwischen DOTA und GPI besitzen. Allerdings sollte in Zukunft eine alternative Evaluierungsmethode entwickelt werden, um eine hausinterne Analytik der neuen DOTA-konjugierten Targeting-Vektoren zu ermöglichen.

3.5.3 Eu-Assay

Für die neuen potentiellen PSMA-Liganden sollte eine schnelle Prä-Evaluation etabliert werden, um potenzielle Leitstrukturen zuverlässig, zeit- und kosteneffizient zu identifizieren. Aufgrund des hohen apparativen und ökonomischen Aufwands radioaktiver Assays sollte eine nicht-radioaktive Alternative gefunden werden, um eine schnelle, hausinterne Analytik zu gewährleisten. Die Durchführung des Zellassays soll jedoch nicht verändert werden, sodass die alternative Analytikmethode eine ähnliche Sensitivität wie die Radiodetektion aufweisen muss. Naheliegender ist die Detektion der Ligandenbindung *via* Fluoreszenzmarkierung, die eine etablierte Methode für die verwendeten Zelllinien ist.¹²² Allerdings gestaltet sich die Detektion der absoluten Fluoreszenz *in vivo* als schwierig. Grund dafür sind neben der Fluoreszenzlöschung und Photobleichung auch die Absorption von Fluoreszenzstrahlung,

selbst im Nahinfrarotbereich.¹¹ Ein weiterer Nachteil wären die strukturellen Änderungen, die an den zu untersuchenden Liganden durch den Fluoreszenzfarbstoff nötig wären. Diese könnten die Pharmakokinetik des PSMA-Liganden signifikant beeinflussen und so einen direkten Vergleich von Targeting-Vektoren mit Fluoreszenz- und Radiomarkierung beeinträchtigen.

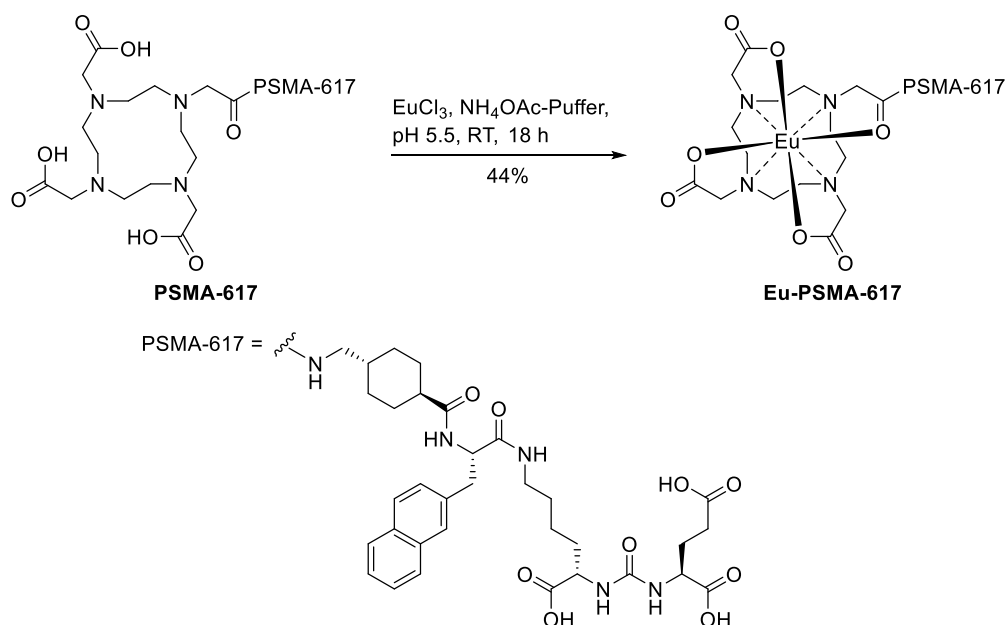
Dank der exzellenten Komplexierungseigenschaften des Chelators DOTA kann durch Austauschen des radioaktiven Isotops durch ein nicht-radioaktives Metallion als Tracer eine alternative Analytikmethode genutzt werden. Eine Methode, die eine ähnliche Sensitivität besitzt wie die im Radioassay verwendete PET-Methode, bietet ICP-MS, die eine Detektion bis zum ppt-Bereich ermöglicht.³⁰⁰ Aus diesem Grund wird diese Methode bereits für Elementaranalytik in Zellen *in vitro* und *ex vivo* angewendet.³⁰¹⁻³⁰⁴ Welche Sensitivität für die Detektion von PSMA-Liganden in Zellexperimenten nötig ist, kann mit Formel (3-1) überschlagsweise ermittelt werden.

$$B_{\max} = \frac{10^5 \text{ Zellen} \times 10^6 \text{ Epitope}}{N_A} = 0.17 \text{ pmol} \quad (3-1)$$

Die maximale Beladungsdichte $B_{\max}$ durch PSMA-Liganden kann durch die Anzahl der LNCaP Zellen, der exprimierten Bindungsepitope sowie die Avogadro-Konstante N_A ($6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) berechnet werden. In einer Mikrotiterplatte (1 mL) liegt die Anzahl der LNCaP Zellen typischerweise bei etwa 10^5 . Die Zelllinie exprimiert näherungsweise 10^6 Kopien von PSMA an der Zelloberfläche.³⁰⁵ Daher kann eine maximale Konzentration des PSMA-Liganden (und damit auch des Tracers) von 0.17 nM erwartet werden, ohne die Internalisierung zu berücksichtigen. Daher ist ICP-MS grundsätzlich in der Lage diese Konzentrationen zu detektieren, falls das zu untersuchende Element eine hohe elementspezifische Empfindlichkeit und geringe natürliche Häufigkeit aufweist, um das Hintergrundsignal zu minimieren. Lanthanoide zählen durch ihre geringe Interferenz mit anderen Isotopen zu den Elementen mit der niedrigsten elementspezifischen Nachweisgrenze mit ICP-MS.³⁰⁶ Insbesondere Eu besitzt eine besonders niedrige Nachweisgrenze im ppt-Bereich.^{306, 307} Außerdem zeichnen sich Eu-DOTA-Komplexe durch hohe Komplexstabilitäten aus.³⁰⁸ Ein weiterer Vorteil ist, dass trivalentes Eu^{3+} die Komplexeigenschaften vieler klinisch relevanter Metallkationen widerspiegelt. Aus diesem Grund sollten die Unterschiede zwischen Ga-DOTA-Derivaten und korrespondierenden Eu-DOTA-Derivaten minimal sein. Aus diesen Gründen fiel die Wahl des ICP-MS-Tracers auf Eu.

3.5.3.1 Etablierung der ICP-MS Methodik

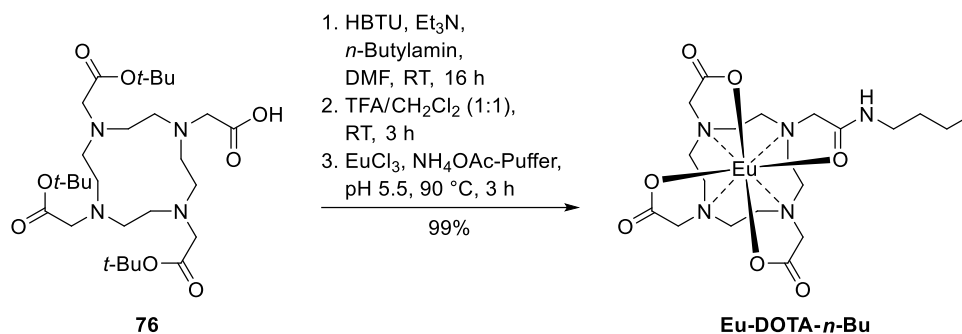
Für den Assay sollten analog zum bereits durchgeführten Radioassay das literaturbekannte System aus PSMA(+) LNCaP und PSMA(-) PC-3 Zelllinien verwendet werden.^{114, 115} Als Grundlage für alle folgenden Experimente sollte der Assay zuerst mit dem PSMA-Liganden **PSMA-617** validiert werden. Im Anschluss sollten die PSMA-Bindungseigenschaften aller neuen Substanzen anhand einer Ein-Punkt-Messung mit einer positiven und negativen Kontrolle bei 50 nM evaluiert werden. Da die zelluläre Retention einer der wichtigsten Parameter von Imaging-Substanzen ist, soll in einem nicht-kompetitiven Assay zunächst der effektive K_d -Wert des literaturbekannten PSMA-Liganden PSMA-617 mittels ICP-MS reproduziert werden, um die Methodik zu validieren. Der Ligand PSMA-617 wurde in der Literatur bereits mit diversen Metallionen auf seine Bindungseigenschaften an PSMA mit verschiedenen Detektionsmethoden untersucht. Die effektiven K_d -Werte sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. Die Synthese der Referenz **Eu-PSMA-617** wurde in Kooperation mit Sharah Chandralingam durchgeführt.²⁹⁸



Schema 3-47 Synthese der Referenzsubstanz **Eu-PSMA-617**.²⁹⁸

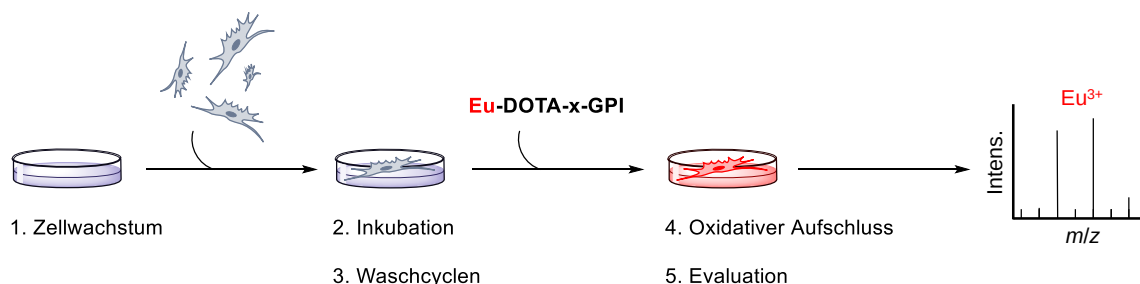
Als Negativkontrolle wurde **Eu-DOTA-*n*-Bu** ohne PSMA-Bindungsmotiv synthetisiert. Die Syntheseroute ist in Schema 3-48 dargestellt. Die kommerziell erhältliche Carbonsäure **76** wurde mit HBTU aktiviert und mit *n*-Butylamin umgesetzt. Die saure Spaltung der *tert*-Butylester lieferte den freien Chelator mit 99% Ausbeute. Die anschließende Synthese des Eu-Komplexes verlief in Anlehnung an ein Standardprotokoll mit quantitativer Ausbeute.³⁰⁹

Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-48 Synthese der Negativkontrolle **Eu-DOTA-n-Bu**.

Der Ablauf des Assays ist in Schema 3-49 dargestellt und wurde in Kooperation mit Dr. Marina Mutas und Indranath Chakraborty durchgeführt.²⁹⁸ Zunächst wurden Zellen in einer Mikrotiterplatte mit 1 mL Kavitäten zu einer Dichte von etwa 5×10^5 Zellen pro Kavität gezüchtet. Jeweils eine Kavität der Mikrotiterplatten wurde für das Auszählen der Zellen mittels Trypanblau in einer Zählkammer verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit dem zu untersuchenden Eu-Komplex 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach drei Waschcyclen mit PBS-Puffer erfolgte der oxidative Aufschluss der organischen Matrix mit Königswasser bei Raumtemperatur für 24 h.



Schema 3-49 Schematischer Ablauf des Eu-Assays.²⁹⁸

Um Kontaminierungen auszuschließen, wurden alle verwendeten Reagenzien mittels ICP-MS vermessen und auf Verunreinigungen durch Eu untersucht. Vorab wurden zudem Untersuchungen mit der maximal eingesetzten Eu-Konzentration (50 nM) ohne Zellen durchgeführt, um eine mögliche Oberflächenadsorption der Eu-Komplexe auf den Platten auszuschließen. Hierbei wurde keine signifikante Eu-Konzentration mittels ICP-MS detektiert. Für die Etablierung des Assays sollte der effektive K_d -Wert von **Eu-PSMA-617** mit PSMA(+) LNCaP Zellen ermittelt und mit aktuellen Literaturwerten verglichen werden. Dafür wurden die Zellen mit einer Konzentrationsreihe von 0-50 nM des Eu-Komplexes behandelt. Um eine Spezifität auf PSMA zurückzuführen, sollte außerdem die gleiche Konzentrationsreihe mit PSMA(-) PC-3 Zellen vermessen werden. In dieser Konzentrationsreihe wurden keine signifikanten Anreicherungen von Eu in den Zellen erwartet. Als Negativkontrolle wurde

außerdem der Eu-Komplex **Eu-DOTA-*n*-Bu** in einer Konzentration von 50 nM zu den Zellen gegeben. Da der Komplex kein PSMA-Bindungsmotiv besitzt, sollte keine Zellretention zu beobachten sein. Aus den gemessenen Werten der ICP-MS, aufgetragen gegen die eingesetzte Konzentration der jeweiligen Eu-Komplexe, konnten für jede Zelllinie die effektiven K_d -Werte durch lineare Regression aus den Bindungskurven ermittelt werden. Die Bindungskurven sind in Abbildung 3-30 dargestellt.

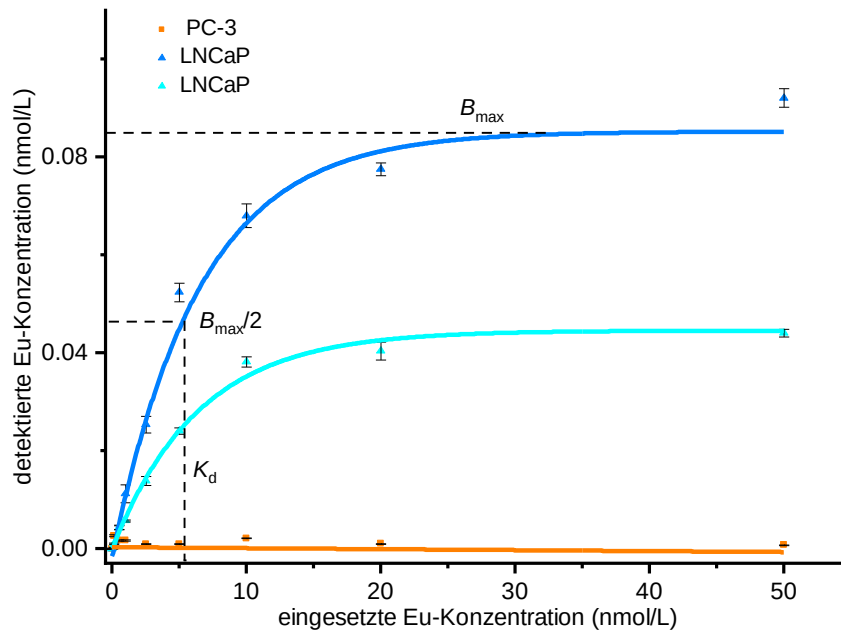


Abbildung 3-30 Detektierte Eu-Konzentration (nmol/L) aufgetragen gegen die eingesetzte Konzentration (nmol/L) von **Eu-PSMA-617** mit PSMA(+) LNCaP Zellen ($8,3 \times 10^5$ Zellen, blau; $6,4 \times 10^5$ Zellen, hellblau) und PSMA(-) PC-3 Zellen (orange). Eingezeichnet ist die Bestimmung des effektiven K_d mittels nichtlinearer Regression.

Die in hellblau und blau dargestellten Bindungskurven ergaben sich aus der Inkubation verschiedener Konzentrationen **Eu-PSMA-617** (0 nM, 0.1 nM, 0.5 nM, 1.0 nM, 2.5 nM, 5.0 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM) mit PSMA(+) LNCaP Zellen. Die Experimente der blauen Kurve wurden mit $8,3 \times 10^5$ Zellen und die der hellblauen Kurve mit $6,4 \times 10^5$ Zellen durchgeführt. Die Bindungskurven erreichen jeweils eine Sättigung bei ungefähr 30 nM eingesetzter Eu-Konzentration. Die orangefarbene Bindungskurve wurde bei der Inkubation verschiedener Konzentrationen **Eu-PSMA-617** mit PSMA(-) PC-3 Zellen erhalten. Der lineare Zusammenhang der gemessenen Werte ohne nennenswerte Erhöhung der gemessenen Eu-Konzentration ließ nicht auf eine Anreicherung von Eu innerhalb der Zellen schließen.

PSMA(+) LNCaP Zellen (hellblau, blau) zeigten im Gegensatz zu PSMA(-) PC-3 Zellen (orange) eine spezifische Anreicherung der detektierten Eu-Konzentration in exponentieller Abhängigkeit zur eingesetzten Eu-Konzentration. Die unterschiedlich starke Aufnahme ließ sich durch die verschiedene Zellanzahl erklären. Durch nichtlineare Regression konnte aus beiden Bindungskurven der K_d -Wert ermittelt werden. Die ermittelten K_d -Werte sind in Tabelle

3-6 zusammen mit den literaturbekannten Werten aufgeführt. Unabhängig von der Zellanzahl konnten effektive K_d -Werte von 4.44 ± 0.63 nM (blau, 8.3×10^5 Zellen) und 4.24 ± 0.70 nM (hellblau, 6.4×10^5 Zellen) bestimmt werden.

Tabelle 3-6 Effektive K_d -Werte verschiedener Metallkomplexe des DOTA-basierten Chelators **PSMA-617** mit PSMA(+) LNCaP Zellen.

Substanz	Methode	Effektiver K_d
^{68}Ga -PSMA-617	PET	2.34 ± 2.94 nM ¹²⁹
$^{55/57}\text{Co}$ -PSMA-617	PET	4.69 ± 0.49 nM ³¹⁰
^{111}In -PSMA-617	SPECT	5.40 ± 0.80 nM ³¹¹
Eu-PSMA-617	ICP-MS	4.44 ± 0.63 nM ²⁹⁸
Eu-PSMA-617	ICP-MS	4.24 ± 0.70 nM ²⁹⁸

Um einen unspezifischen Bindungsmechanismus auszuschließen, wurden die Zellen nicht nur mit **Eu-PSMA-617**, sondern auch mit der Negativkontrolle **Eu-DOTA-*n*-Bu** inkubiert. Durch den direkten Vergleich beider Komplexe bei einer festen eingesetzten Eu-Konzentration von 50 nM sollten die Bindungseigenschaften genauer untersucht werden. Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Abbildung 3-31 dargestellt.

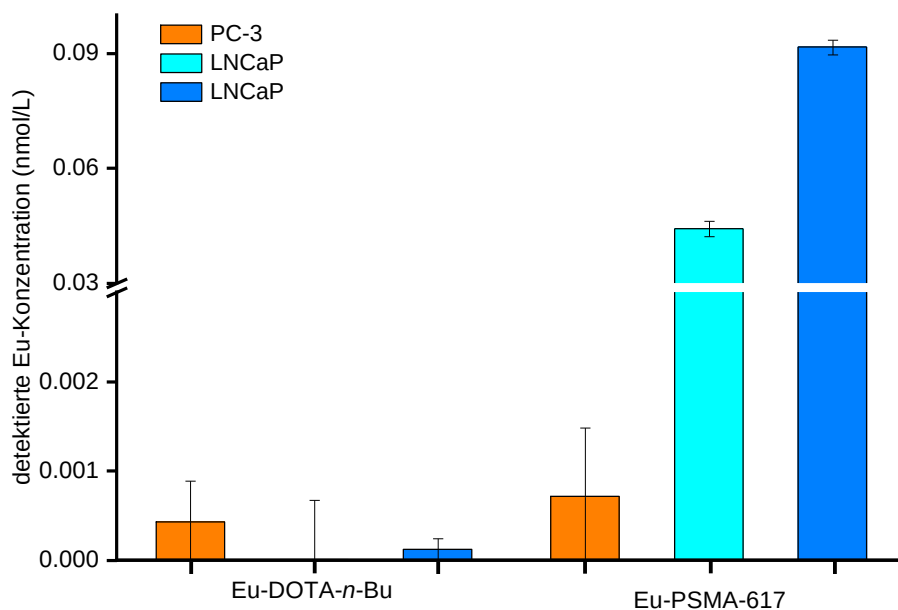


Abbildung 3-31 Direkter Vergleich von **Eu-DOTA-*n*-Bu** und **Eu-PSMA-617** bei derselben eingesetzten Konzentration mit PSMA(-) PC-3 Zellen (orange) und PSMA(+) LNCaP Zellen (6.4×10^5 Zellen, blau; 8.3×10^5 Zellen, hellblau).

Beide Substanzen zeigen eine vernachlässigbare Bindung an PSMA(-) PC-3 Zellen (orange). Außerdem zeigte **Eu-DOTA-*n*-Bu** eine extrem niedrige Aufnahme mit PSMA(+) LNCaP Zellen, was die Substanz als Negativkontrolle in einem Assay mit diesen Zelllinien qualifiziert.

Der Komplex **Eu-PSMA-617** adressierte wie erwartet nur LNCaP Zellen (blau, hellblau) und kann für zukünftige Experimente als Positivkontrolle dienen.

Durch die Identifizierung der Positiv- und Negativkontrolle und die Reproduktion literaturbekannter Bindungseigenschaften konnte eine neuartige ICP-MS-basierte Methodik etabliert werden. Auf diese Weise wird eine hausinterne Evaluation von Bindungseigenschaften neuer Substanzen durch Einzelpunktmessungen ermöglicht, ohne dabei auf Isotopenlabore angewiesen zu sein. Vielversprechende PSMA-Liganden können auf diese Weise identifiziert werden und Parameter wie K_D -Werte oder die Internalisierung ausführlicher evaluiert werden. Die Prä-Evaluation mittels Eu-Assay reduziert somit den ökonomischen und zeitlichen Aufwand auf vielversprechende Substanzen.

3.5.3.2 Synthese neuer Substanzen

Da der Radioassay keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, sollten alle neuen von Dr. Natalija Peric und Sharah Chandralingam synthetisierten Targeting-Vektoren mit einem DOTA-basierten BFC konjugiert werden, um sie mittels Eu-Tracer über den zuvor etablierten Eu-Assay zu evaluieren. Strukturelle Unterschiede (Abbildung 3-32) der neuen Target Vektoren sind (1) die Anzahl an Methylengruppen zwischen Amid und *para*-Benzoat, (2) der Einfluss verschiedener rigider und flexibler Systeme anstelle des *para*-Benzoats, (3) die Modifikation der Phosphinsäure **GPI** mit TRIS.

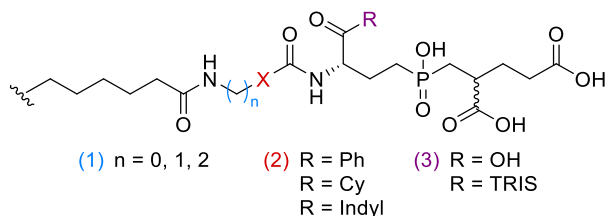
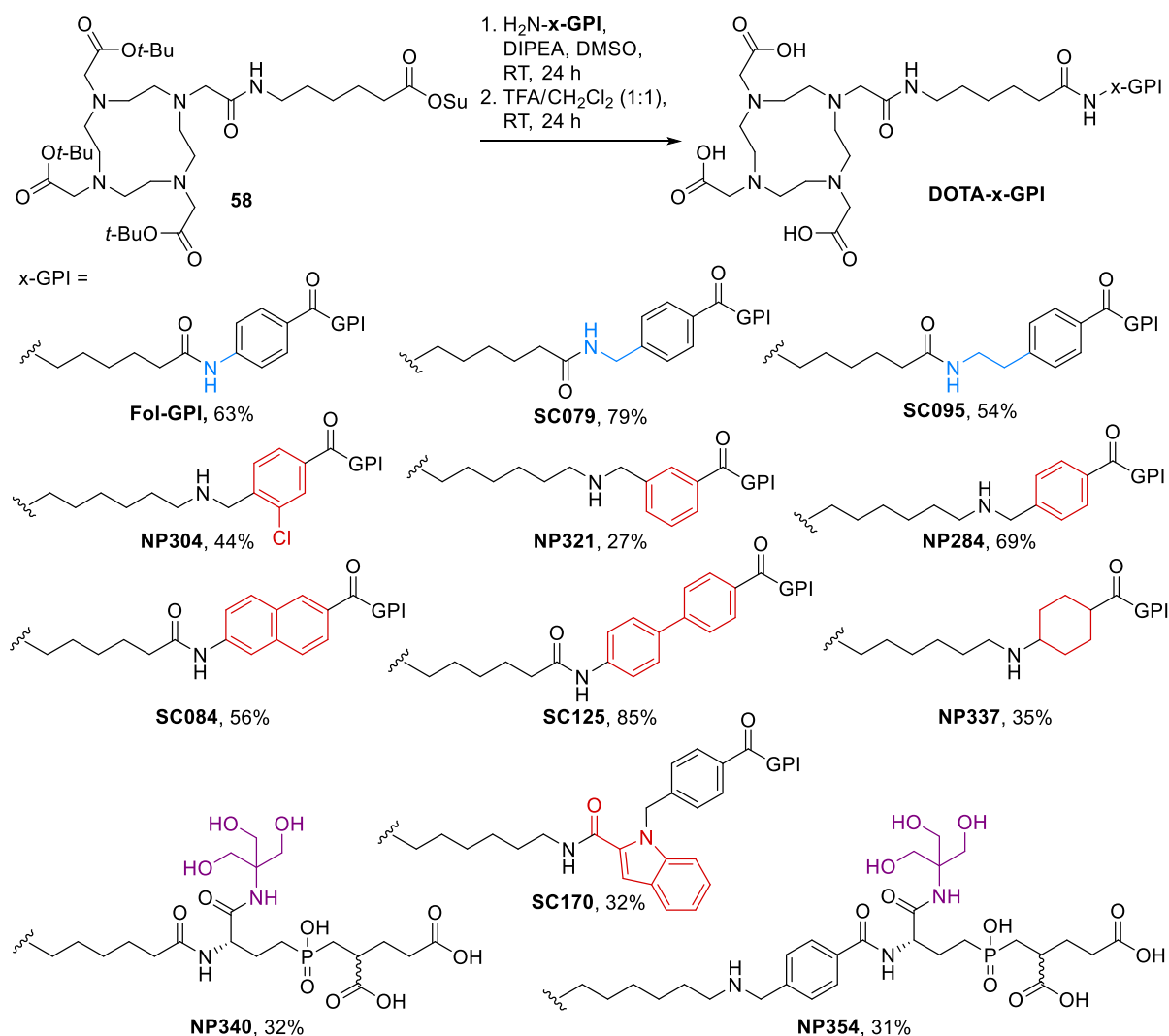


Abbildung 3-32 Ansätze der Derivatisierung. (1) Kettenlänge, (2) rigide oder flexible Reste, (3) zusätzliche Funktionalität.

Alle nach diesem Design synthetisierten Targeting-Vektoren wurden mit dem zuvor synthetisierten Aktivester 58 in einer Aktivester-vermittelten Peptidkupplung mit DIPEA umgesetzt und anschließend der *tert*-Butylester mittels TFA gespalten. Alle auf diese Weise synthetisierten Produkte wurden an RP-Kieselgel (C18) gereinigt. In Schema 3-50 sind alle neu synthetisierten DOTA-GPI-Derivate dargestellt.

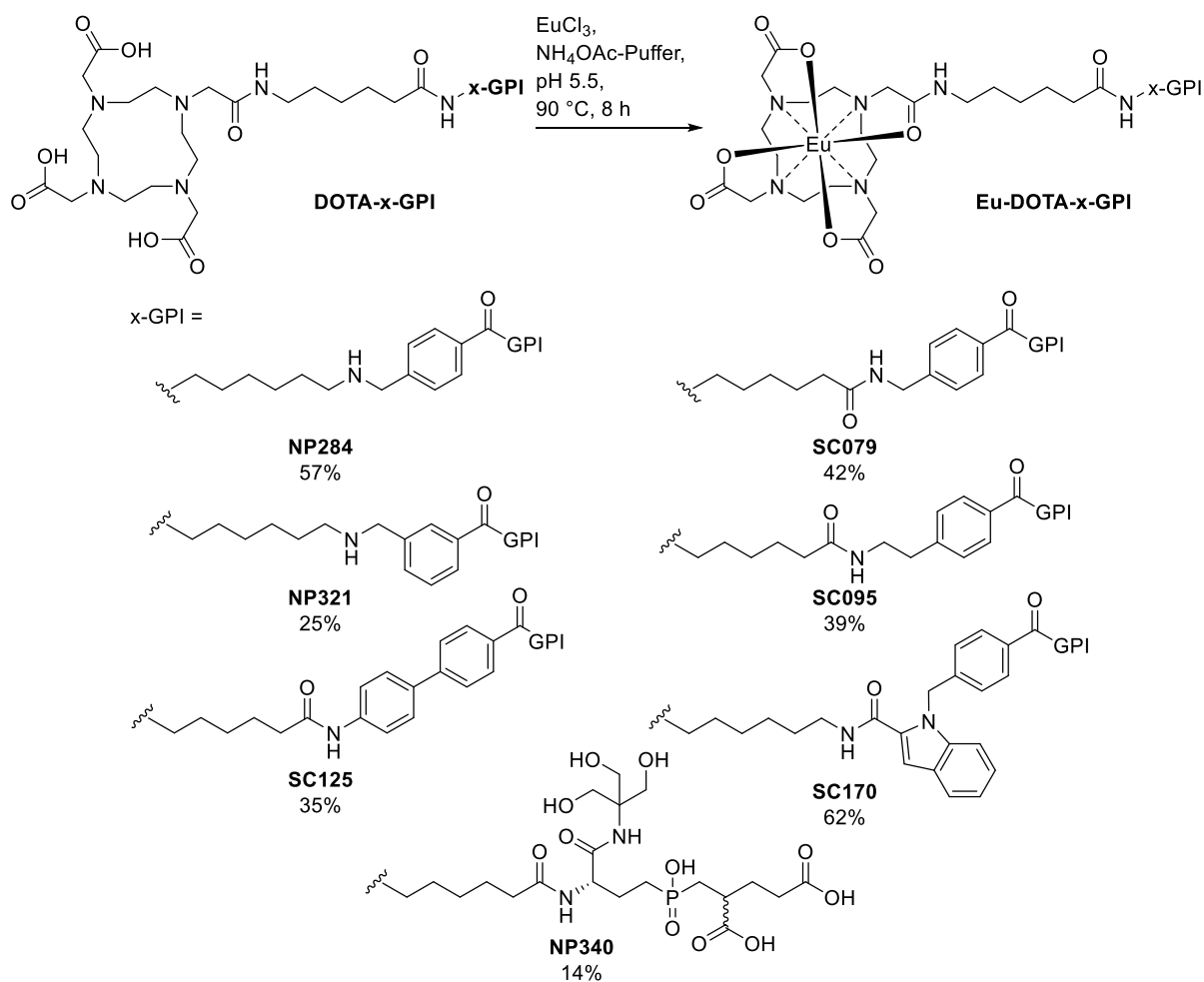
Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-50 Synthese neuer GPI-Derivate mit Modifikationen in: (1) Kettenlänge, (2) rigiden oder flexiblen Resten, (3) zusätzlicher Funktionalität.

Die DOTA-GPI-Konjugate konnten in Ausbeuten von 27% bis 85% erfolgreich dargestellt werden. Eine Auswahl der auf diese Weise synthetisierten potentiellen PSMA-Liganden sollten im Folgenden durch den etablierten Eu-Assay mit Hilfe eines Eu-Tracers auf ihre PSMA-Bindungseigenschaften untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten alle synthetisierten DOTA-GPI-Derivate in die entsprechenden Eu-Komplexe überführt werden. Die Synthese der Eu-Komplexe wurde in Anlehnung an ein Standardprotokoll³⁰⁹ durchgeführt und ist in Schema 3-51 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 3-51 Synthese neuer Eu-markierter DOTA-GPI-Derivate.

Alle Komplexe zeigten in der LC-MS kompletten Umsatz nach spätestens 8 h. Die Reinigung der Komplexe erfolgte überwiegend über RP-Chromatographie (C18). Aufgrund der höheren Hydrophobizität wurden die Substanzen **Eu-DOTA-SC125** und **Eu-DOTA-SC170** an einer C8-Phase gereinigt.

Zusätzlich zum α -alkylierten Indol-Derivat **Eu-DOTA-SC170** sollten auch die von Sharah Chandralingam synthetisierten β -alkylierten Indolderivate **Eu-DOTA-SC260** und **Eu-DOTA-SC259** mittels ICP-MS-Assay untersucht werden. Beide Eu-Komplexe sind in Abbildung 3-33 dargestellt.

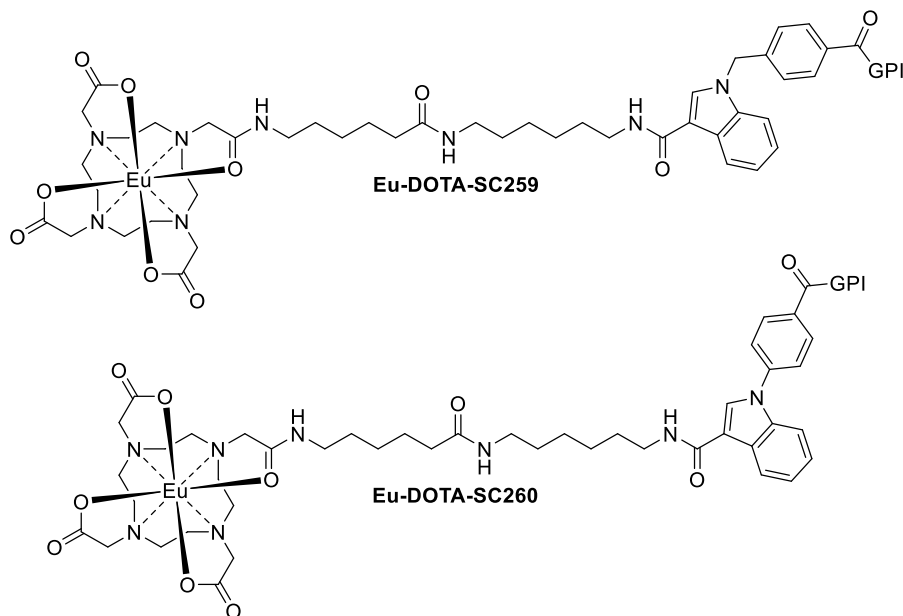
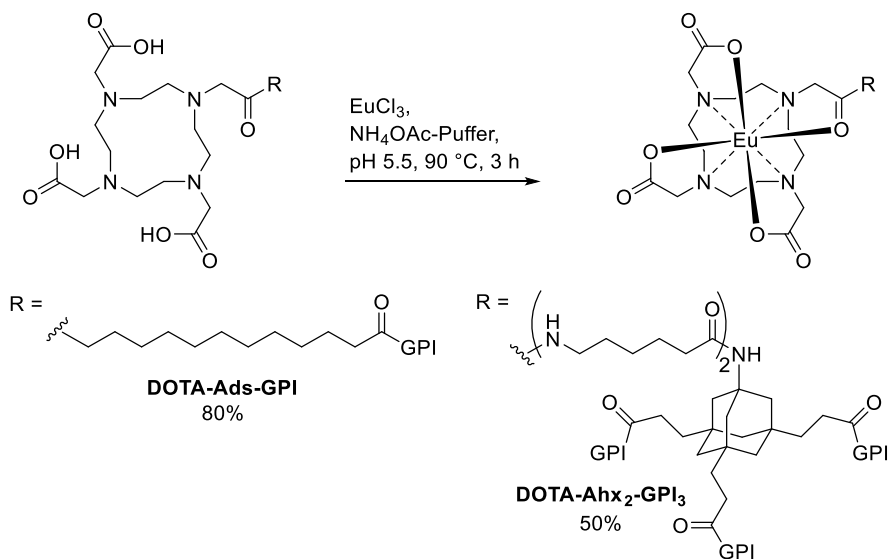


Abbildung 3-33 DOTA-Indolderivate Eu-DOTA-SC259 und Eu-DOTA-SC260.

Im Kapitel **3.5.1 PET-Radioassay** wurden das GPI-Monomer **DOTA-Ads-GPI** und das GPI-Trimer **DOTA-Ahx₂-GPI₃** diskutiert, die in dem Assay als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle eingesetzt wurden. Für den Eu-Assay sollten beide Substanzen in die entsprechenden Eu-Komplexe überführt und massenspektrometrisch analysiert werden, um die Bindungseigenschaften mit den von Humblet *et al.* in einem Fluoreszenzassay ermittelten Parametern zu vergleichen.¹²² Die Synthese wurde in Anlehnung an ein Standardprotokoll durchgeführt und ist in Schema 3-52 dargestellt.³⁰⁹



Schema 3-52 Synthese der Eu-Komplexe des GPI-Monomers **Eu-DOTA-Ads-GPI** und des GPI-Trimers **DOTA-Ahx₂-GPI₃**.

Die Synthese des GPI-Monomers **Eu-DOTA-Ads-GPI** verlief in einer guten Ausbeute von 80% nach Reinigung mittels HPLC (C18). Die Synthese des GPI-Trimers **DOTA-Ahx₂-GPI₃**

lieferte das Produkt in einer Ausbeute von 50% nach Reinigung mittels HPLC (C8). Die Reinigung gestaltete sich als anspruchsvoll, da sich selbst auf wenig hydrophoben stationären Phasen (C8) deutliches Tailing der Substanzen zeigte, was den Ausbeuteverlust erklären könnte. Diese starke Wechselwirkung steht im Gegensatz zur hohen Polarität des Moleküls, dass sich nur in sehr polaren Lösungsmitteln wie H₂O oder DMSO löste.

3.5.3.3 Evaluierung neuer Targeting-Vektoren *via* Eu-Tracer

Die Eu-markierten Substanzen sollten anschließend mit dem etablierten Eu-Assay in einer Ein-Punkt-Messung bei 50 nM mit Referenzsubstanzen **Eu-PSMA-617** und **Eu-DOTA-*n*-Bu** im direkten Vergleich auf die detektierte Eu-Konzentration mit LNCaP Zellen untersucht werden. Unter der Annahme, dass GPI in phosphathaltigem Medium kein PSMA-Inhibitor ist,¹²² wurden die Zellexperimente in phosphathaltigem Medium (10% FBS) durchgeführt, um eventuelle Bindungseffekte direkt auf die modifizierte Linkereinheit zurückzuführen. Der direkte Vergleich detektierter Eu-Konzentrationen mittels ICP-MS ist in Abbildung 3-34 dargestellt.

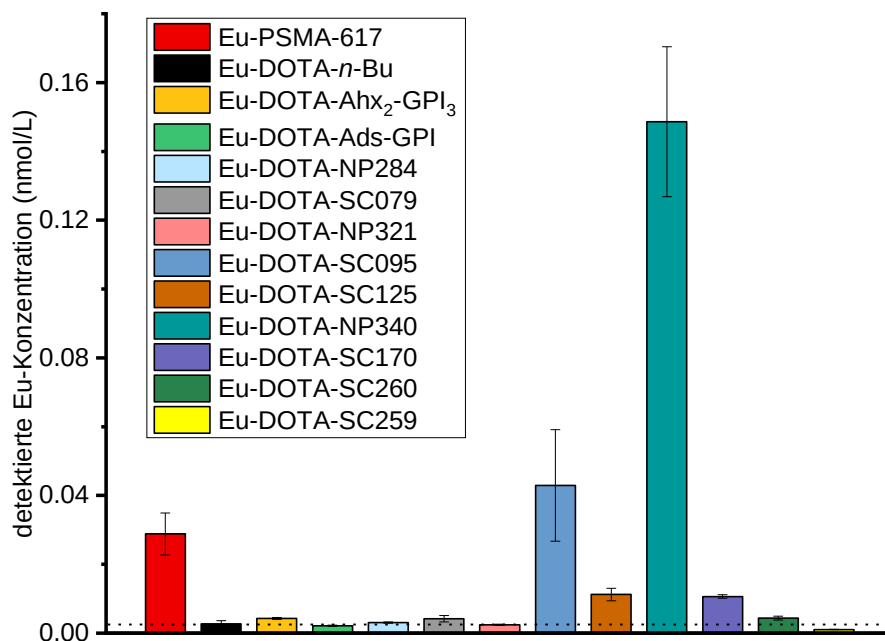


Abbildung 3-34 Direkter Vergleich detektierter Eu-Konzentrationen bei gleicher eingesetzter Eu-Konzentration (50 nM) verschiedener Eu-Komplexe mit LNCaP Zellen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Grenzwert von **Eu-DOTA-*n*-Bu**. Die verschiedenen Substanzen sind in der Legende farblich gekennzeichnet.

Die Positivkontrolle **Eu-PSMA-617** (rot) zeigte erwartungsgemäß eine gute Eu-Anreicherung, die im Bereich der zuvor gemessenen Werte (**3.5.3.1 Etablierung der ICP-MS Methodik**) lag. Die Negativkontrolle **Eu-DOTA-*n*-Bu** (schwarz) zeigte keine signifikante Anreicherung. Alle Substanzen, deren detektierte Eu-Konzentrationen oberhalb des Maximalwertes von **Eu-DOTA-*n*-Bu** (Abbildung 3-34, gestrichelte Linie) liegen, können für eine genauere

Untersuchung in Betracht gezogen werden. Das GPI-Trimer **Eu-DOTA-Ahx₂-GPI₃** (dunkelgelb) besitzt laut Literatur eine exzellente Bindungsaffinität zu LNCaP Zellen ($K_d = 0.5 \pm 0.1$ nM).¹²² Der Maximalwert sollte folglich deutlich oberhalb der Referenz liegen ($K_d = 4.44 \pm 0.63$ nM).²⁹⁸ Dieser Wert konnte in diesem Assay nicht reproduziert werden. Allerdings wurde der K_d -Wert für das Trimer in einem Fluoreszenzassay ermittelt. Der dafür verwendete Fluoreszenzfarbstoff könnte die Bindungseigenschaften des Trimers beeinflussen, was die Diskrepanz beider Befunde erklären könnte. Erwartungsgemäß wurde für das GPI-Monomer **Eu-DOTA-Ads-GPI** (grün) keine signifikante Eu-Anreicherung in LNCaP Zellen detektiert. Dies galt auch für die Aminomethylbenzoesäurederivate **Eu-DOTA-NP284** (hellblau) und **Eu-DOTA-NP321** (rosa), und das β -alkylierte Indolderivat **Eu-DOTA-SC259** (gelb). Geringe Anreicherungen wurden für das Aminomethylbenzoesäurederivat **Eu-DOTA-SC079** (grau) und das β -alkylierte Indolderivat **Eu-DOTA-SC260** (dunkelgrün) detektiert. Entgegen der Erwartung scheinen Aminomethylbenzoesäurereste keinen positiven Effekt auf die Bindungseigenschaften zu haben, wie es bereits für Urea-basierte Inhibitoren literaturbekannt ist.¹²⁸ Das β -alkylierte Indolgrundgerüst scheint ebenfalls keinen positiven Einfluss auf die Bindungseigenschaften zu haben. Das Biphenylderivat **Eu-DOTA-SC125** (braun) und das α -alkylierte Indolderivat **Eu-DOTA-SC170** (lila) zeigten eine signifikante Eu-Konzentration. Grund für die erhöhten Bindungsaffinitäten könnte der aromatische Charakter in Kombination mit der Topologie des Indol-Grundgerüsts sein, der eine hydrophobe Seitentasche neben dem aktiven Zentrum von PSMA adressiert. Für das Aminoethylbenzoesäurederivat **Eu-DOTA-SC095** (blau) wurde eine detektierte Eu-Konzentration in der Größenordnung der Referenz **Eu-PSMA-617** festgestellt, was die Substanz zu einem Kandidaten für weitere Zellexperimente qualifiziert. Der Grund für die Überlegenheit des Aminoethylbenzoesäure-Derivats gegenüber dem strukturell sehr ähnlichen Aminomethylbenzoesäure-Derivat konnte im Zuge der Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Weitere Docking-Studien könnten klären, ob in diesem Bereich in der Bindungstasche Wechselwirkungen auftreten. Interessanterweise zeigte das TRIS-Derivat **Eu-DOTA-NP340** (petrol) eine außergewöhnliche hohe Eu-Konzentration, die das Fünffache der Referenz übersteigt. Dieser Befund deutet auf exzellente PSMA-Bindungseigenschaften im subnanomolaren Bereich hin. Um diesen Befund zu verifizieren, sollte im Folgenden der effektive K_d -Wert des TRIS-Derivates **Eu-DOTA-NP340** mit PSMA(+) LNCaP (petrol) und PSMA(-) PC-3 Zellen (dunkles petrol) mittels ICP-MS bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-35 dargestellt.

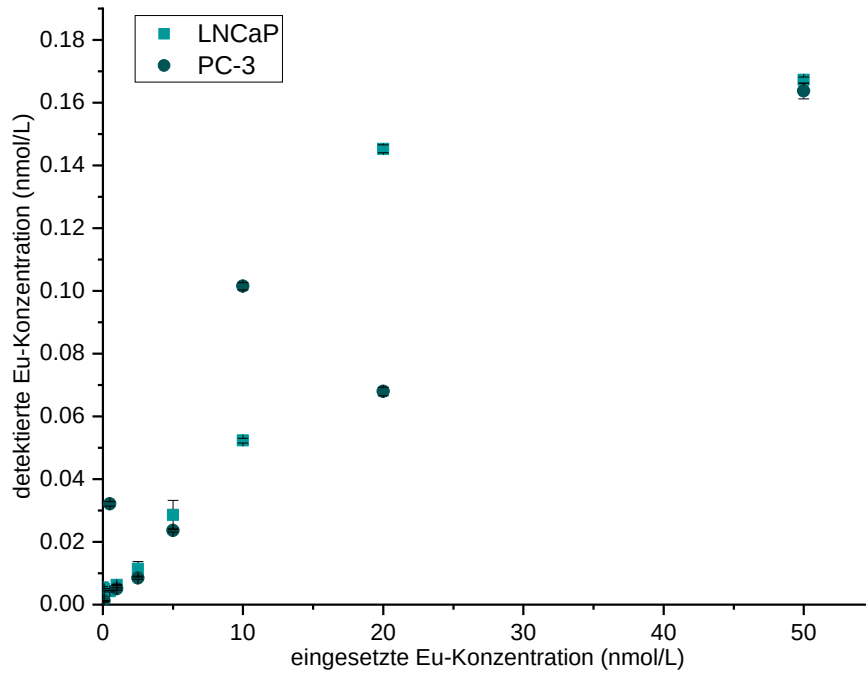


Abbildung 3-35 Detektierte Eu-Konzentration (nmol/L) aufgetragen gegen die eingesetzte Konzentration (nmol/L) von **Eu-DOTA-NP340** mit PSMA(+) LNCaP Zellen (petrol) und PSMA(-) PC-3 Zellen (dunkles petrol).

Das TRIS-Derivat **Eu-DOTA-NP340** zeigte widersprüchliche Ergebnisse. Die detektierte Eu-Konzentration bei 50 nM eingesetzter Eu-Konzentration entsprach den Werten, die bereits im direkten Vergleich beobachtet wurden. Allerdings konnte keine Bindungskurve erstellt, und somit kein K_d -Wert ermittelt werden. Entgegen der Erwartungen zeigten auch PC-3 Zellen eine signifikante detektierte Eu-Konzentration. Dieser außergewöhnliche Befund ist jedoch mit der aktuellen Datenlage nicht zu erklären. Der nahezu lineare Anstieg spricht für eine schnelle nicht-PSMA-selektive Anreicherung. Eine Erklärung könnte sein, dass durch den zusätzlichen TRIS-Rest ein Rezeptor adressiert wird, der sowohl auf PC-3 als auch auf LNCaP Ziellinien exprimiert wird. Dies würde zwar die Anwendung für zielgerichtetes PSMA-Targeting aufgrund geringer Selektivität verhindern, da jedoch Krebszelllinien adressiert werden, könnte der Targeting-Vektor für nicht-gewebespezifisches Tumor-Targeting Anwendung finden. Hier sind weitere Zellexperimente nötig, um eine Klärung herbeizuführen.

3.5.4 Zusammenfassung PSMA-Targeting

In diesem Kapitel wurde die Synthese neuer DOTA-GPI-Derivate beschrieben, die sich strukturell in ihrer Linkereinheit zwischen Targeting-Vektor und BFC unterscheiden. Die Konjugation der Targeting-Vektoren mit einem DOTA-basierten BFC ermöglichte die Evaluation der PSMA-Bindungseigenschaften mittels metallbasierten bildgebenden Verfahren. Die Evaluation *in vitro* mittels ^{68}Ga -Radiotracer ergab widersprüchliche Daten, sodass eine alternative metallbasierte Methodik benötigt wurde, um die neuen Substanzen ohne den Einsatz von Radioisotopen zu evaluieren. Daher wurde ein Eu-basierter Zellassay entwickelt und etabliert, der *via* Ein-Punkt-Messung mit Eu-Tracer eine Evaluation der Targeting-Vektoren in Bezug auf ihre PSMA-Bindungseigenschaften ermöglicht. Im direkten Vergleich zeigten neben dem Biphenylderivat **Eu-DOTA-SC125** und dem α -alkylierten Indolderivat **Eu-DOTA-SC170** vor allem das Aminoethylbenzoesäure-Derivat **Eu-DOTA-SC095** und das TRIS-Derivat **Eu-DOTA-NP340** teilweise sehr hohe Anreicherungen des Tracers in LNCaP Zellen.

Besonders bemerkenswert ist die hohe Anreicherung des TRIS-Derivates **Eu-DOTA-NP340**, welches im Vergleich zur Referenz **Eu-PSMA-617** bei gleicher eingesetzter Eu-Konzentration (50 nM) mehr als die fünffache detektierte Eu-Konzentration aufwies. Dieser außergewöhnliche Befund würde für einen PSMA-Liganden mit Bindungseigenschaften im subnanomolaren Bereich sprechen. In der anschließenden detaillierten Evaluation mit einer Konzentrationsreihe mit LNCaP und PC-3 Zellen zeigte sich jedoch keine PSMA-spezifische Eu-Anreicherung. Der Effekt, der zu einem nahezu linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Eu-Konzentration und Eu-Traceranreicherung unabhängig von der Zelllinie führt, konnte mit der aktuellen Datenlage nicht abschließend erklärt werden. Obwohl die ersten Versuche einen K_d -Wert für das TRIS-Derivat zu ermitteln scheiterten, sollten künftige Experimente durchgeführt werden, die sich auf die Spezifität gegenüber weiteren Rezeptoren konzentrieren. Zelllinien wie 22Rv1, die sich durch die extrazelluläre Matrix unterscheiden, könnten Aufschluss darüber geben, ob weitere Rezeptoren für das außergewöhnliche Bindungsverhalten verantwortlich sein könnten. Auch der vielversprechende Eu-Komplex **Eu-DOTA-SC095** sollte weiter untersucht werden, da der direkte Vergleich ähnliche Bindungseigenschaften wie **Eu-PSMA-617** suggeriert.

4. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit waren die Erforschung und Anwendung makrocyclischer DOTA-Derivate für verschiedene metallbasierte bildgebende Verfahren. Dabei führten Modifikationen des DOTA-Grundgerüsts, abhängig von der jeweiligen Anwendung, zu maßgeschneiderten Eigenschaften der entsprechenden Metallkomplexe.

Durch die Synthese einer Reihe DOTA-basierter Chelatoren mit unterschiedlicher Seitenkettensubstitution konnte gezeigt werden, dass die Komplexeigenschaften entsprechender Ln-Komplexe signifikant beeinflusst wurde. Eine ^1H NMR-Studie der entsprechenden Eu-Komplexe zeigte einen Anstieg des TSAP/SAP-Verhältnis linear proportional zur Seitenkettensubstitution. In diesem Zusammenhang konnte auch eine Abhängigkeit der Komplexgeometrie in unterschiedlich stark koordinierenden Lösungsmitteln festgestellt werden. In der Reihe $\text{DMSO} > \text{H}_2\text{O} \sim \text{CH}_3\text{OH} > \text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} > \text{CH}_3\text{CN}$ begünstigt DMSO das SAP-Konformer und CH_3CN das TSAP-Konformer. Der Trend der Komplexgeometrie spiegelte sich auch in den Relaxivitäten der entsprechenden Gd-Komplexe wider, die mit zunehmender Seitenkettensubstitution einen exponentiellen Anstieg der Relaxivität zeigten. Besonders der Gd-Komplex **Gd-DOTAZA** zeigte außergewöhnlich hohe Relaxivität ($r_1 = 4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) bei klinischen Magnetfeldstärken (1.5 T) und 310 K, die alle aktuell verwendeten GBCAs übersteigt. Darüber hinaus können *in vivo*- und Relaxationseigenschaften durch Modifikationen mittels CuAAC maßgeschneidert werden. Die entsprechenden Ln-Komplexe sind in Abbildung 4-1 mit den experimentell ermittelten Komplexgeometrien und Relaxivitäten dargestellt.

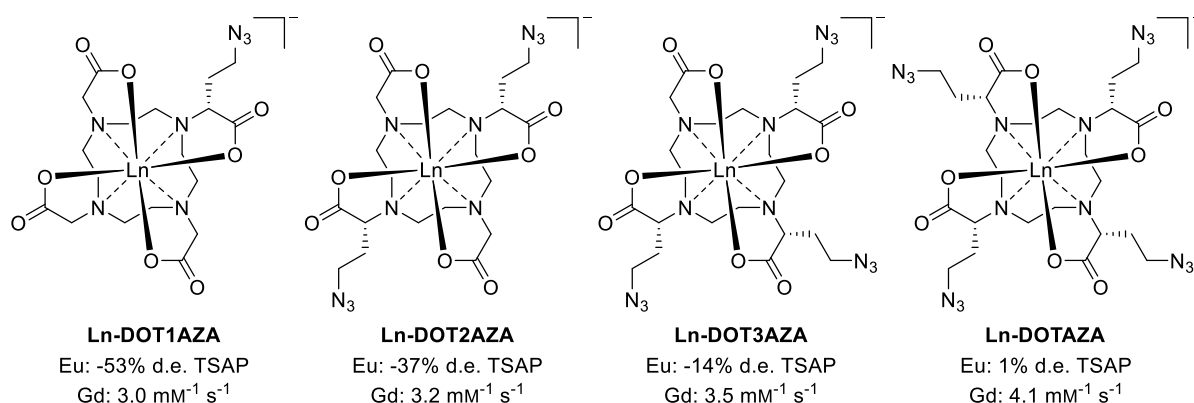


Abbildung 4-1 Ln-Komplexe mit entsprechenden Komplexgeometrien der Eu-Komplexe in D_2O und den Relaxivitäten der Gd-Komplexe bei 1.5 T und 310 K in H_2O .

Des Weiteren wurden die auf diese Weise synthetisierten Chelatoren auf ihre Bindungseigenschaften mit Zr untersucht, dessen Radioisotop ^{89}Zr im Zusammenhang mit

metallbasiertem PET-Imaging stark diskutiert wird.^{156, 312} Dabei konnte nicht nur die Zr-katalysierte Autohydrolyse carboxylatsubstituierter Zr-DOTA-Komplexe gezeigt werden, sondern auch mit der Synthese des Zr-Komplexes **Zr-DOT1AZA** erstmals ein DOTA-basierter Komplex synthetisiert werden, der exzellente Komplexstabilität durch die Bindung von Zr^{4+} über vier Carboxylate mit der Modifizierbarkeit mittels Click-Chemie vereint. Auf dieser Grundlage konnten die modifizierten Zr-Komplexe **Zr-ZWI-DOTA** und **Zr-ZWI₄-DOTAZA** synthetisiert werden, die als Modell für maßgeschneiderte Zr-Komplexe unterschiedlicher Pharmakokinetik dienen.

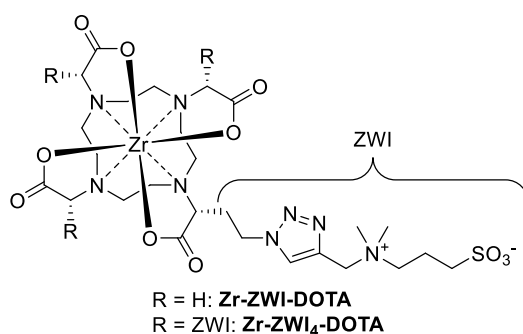


Abbildung 4-2 Modifizierte Zr-Komplexe, basierend auf den zuvor synthetisierten Chelatoren **DOT1AZA** und **DOTAZA**.

Nach dem gleichen Prinzip wurde eine Reihe modifizierter DOTA-Derivate mit ^{89}Zr markiert und *in vivo* untersucht. Neben exzellenter Serumstabilität zeigten alle ^{89}Zr -Komplexe eine geringe Gewebespezifität abhängig von den unterschiedlichen Modifikationen der Komplexe. Es ist anzumerken, dass dieser *in vivo*-Assay einer der ersten ist, der die *in vivo*-Eigenschaften radiomarkierter DOTA-basierter ^{89}Zr -Komplexen beschreibt.

Neben der Aufklärung von Komplexeigenschaften verschiedener DOTA-Derivate wurden diverse Syntheseprotokolle etabliert, die zu DOTA-basierten BFCs führten, welche modular mit Targeting-Vektoren konjugiert werden können und so den Einsatz für verschiedene metallbasierte bildgebende Verfahren ermöglichen. In Abbildung 4-3 sind die DOTA-Konjugate **DOTA-Ahx-cRGD** und **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** des Targeting-Vektors **cRGD** dargestellt, deren entsprechende ^{111}In -markierten Komplexe *in vivo* auf ihre Pharmakokinetik untersucht wurden.

Zusammenfassung

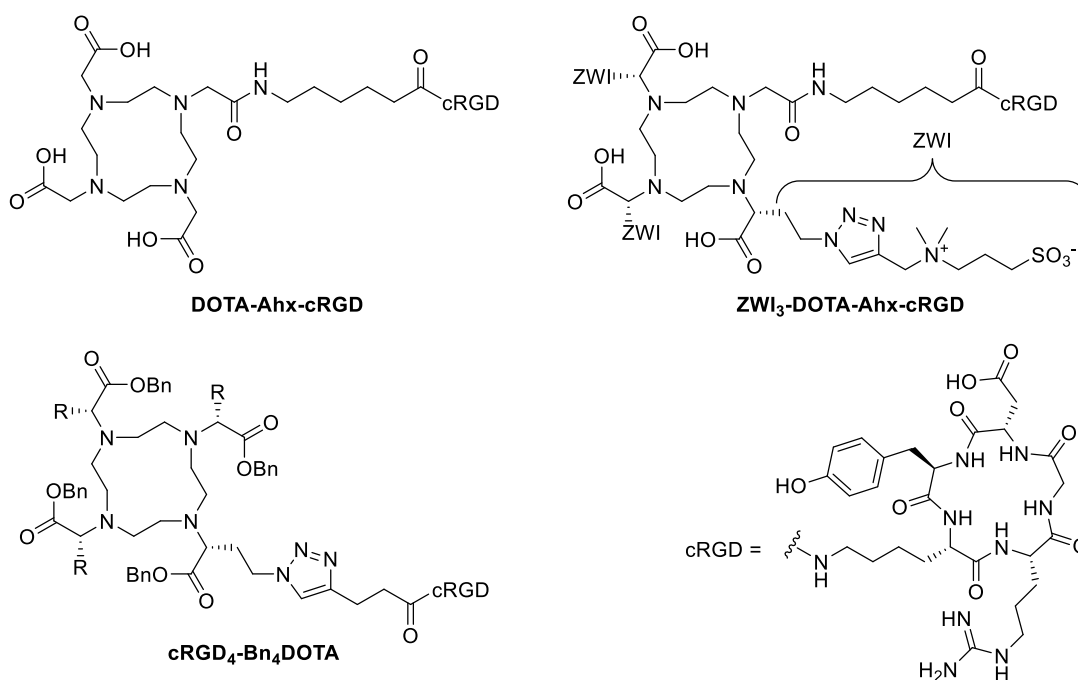


Abbildung 4-3 DOTA-basierte Peptidkonjugate **DOTA-Ahx-cRGD**, **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** und **cRGD₄-Bn₄DOTA** mit dem Targeting-Vektor **cRGD**.

Die Evaluation mittels SPECT zeigte, dass zwitterionische Reste prinzipiell unspezifische Wechselwirkungen unterdrücken können, gleichzeitig aber auch die Tumorretention verschlechtern. Künftig sollte hier noch das Verhältnis zwischen zwitterionischen Resten und Targeting-Vektoren untersucht werden.

Des Weiteren wurde ein Ansatz präsentiert, den Chelator **Bn₄DOTAZA** als Multimerisierungsplattform für die Konjugation mehrerer Targeting-Vektoren *via* Click-Chemie zu nutzen. Ein großer Vorteil dieser Verbindungen gegenüber aktuellen BFCs ist die Modularität der Tetracarbonsäure, die nicht nur gängige Metallionen (⁶⁸Ga³⁺, ¹¹¹In³⁺, ⁸⁶Y³⁺) mit hoher Affinität und Stabilität komplexieren können, sondern auch das bereits diskutierte ⁸⁹Zr⁴⁺, welches als PET-Metall der Zukunft gehandelt wird.

Neben dem Targeting-Vektor **cRGD** wurde auch Derivate der pseudopeptidischen Phosphinsäure **GPI** untersucht, deren Evaluation eine metallbasierte Methodik erforderte, um die neuen Substanzen ohne den Einsatz von Radioisotopen zu evaluieren. Daher wurde ein Eu-basierter Zellassay entwickelt und etabliert, der *via* Ein-Punkt-Messung mit Eu-Tracer eine Evaluation der Targeting-Vektoren in Bezug auf ihre PSMA-Bindungseigenschaften ermöglicht. In Abbildung 4-4 sind die Verbindungen gezeigt, die in diesem Zellassay bei gleicher eingesetzter Eu-Konzentration eine vergleichbare detektierte Eu-Konzentration zeigten wie die Referenz **Eu-PSMA-617**.

Zusammenfassung

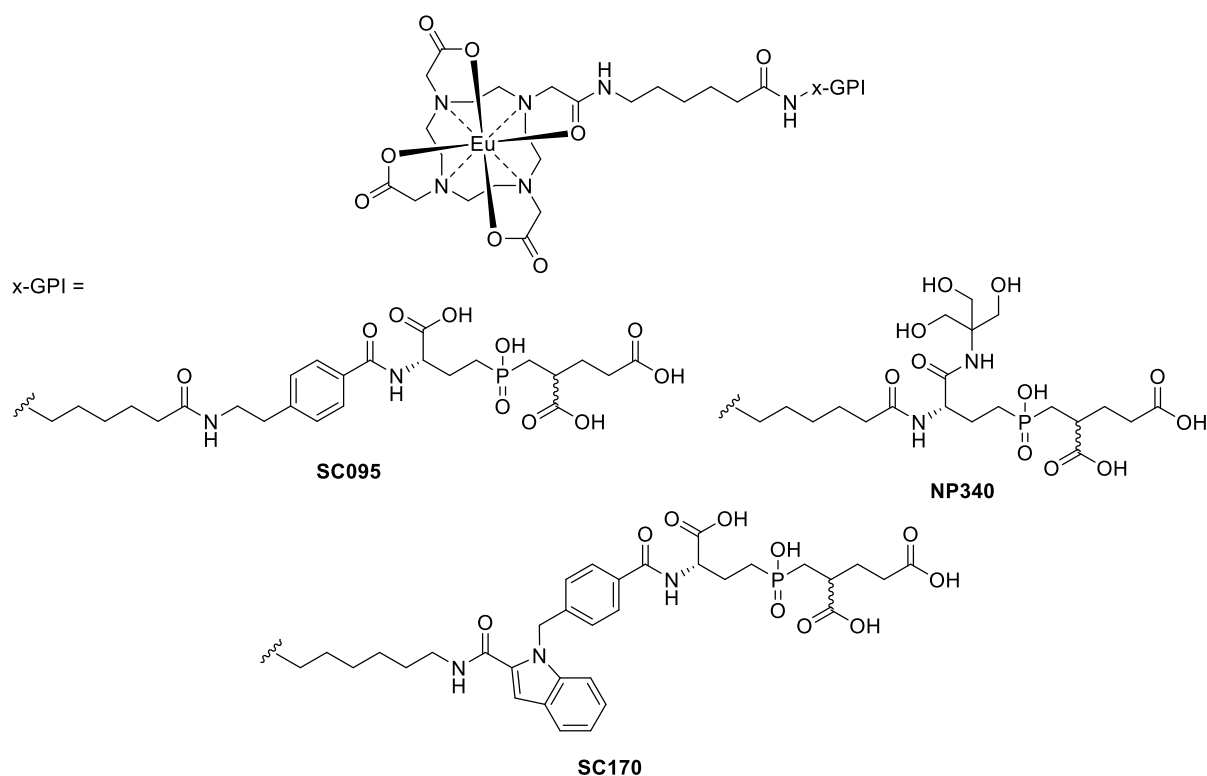


Abbildung 4-4 Mittels Eu-basiertem Zellassay identifizierte PSMA-Binder.

Besonders bemerkenswert ist die hohe Anreicherung des TRIS-Derivates **Eu-DOTA-NP340**, welches auf eine PSMA-Bindung im niedrigen nanomolaren Bereich hindeutet. In der anschließenden detaillierten Evaluation mit einer Konzentrationsreihe mit LNCaP und PC-3 Zellen zeigte sich jedoch keine PSMA-spezifische Eu-Anreicherung, welche mit der aktuellen Datenlage nicht abschließend erklärt werden konnte. Obwohl die ersten Versuche einen K_d -Wert für das TRIS-Derivat zu ermitteln scheiterten, sollten künftige Experimente durchgeführt werden, die sich auf die Spezifität gegenüber weiteren Rezeptoren konzentrieren. Zelllinien wie 22Rv1, die sich durch die extrazelluläre Matrix unterscheiden, könnten Aufschluss darüber geben, ob weitere Rezeptoren für das außergewöhnliche Bindungsverhalten verantwortlich sein könnten. Des Weiteren sollten alle auf diese Weise identifizierten PSMA-Binder in einem Radioassay auf ihre *in vivo*-Eigenschaften überprüft werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Substanzen sind aufgrund der ausgezeichneten Komplexbildungseigenschaften des DOTA-Grundgerüsts nicht nur für metallbasierte diagnostische Methoden, sondern auch modular für metallbasierte therapeutische oder theragnostische Verfahren anwendbar. Der Chelator DOTA ist ein bekannter Chelator für Metalle wie ^{90}Y , ^{177}Lu oder ^{225}Ac , welche beispielsweise als ^{177}Lu -DOTATATE bereits klinisch verwendet werden.³¹³

5. Summary

The aim of this work was the investigation and application of DOTA derivatives for various metal-based imaging techniques. Modifications of the DOTA scaffold led to tailor-made characteristics of the corresponding metal complexes with respect to the intended application. The synthesis of a number of DOTA-based chelators with different side chain substitutions was shown to significantly influence the complex properties of corresponding Ln complexes. Studies of the corresponding Eu complexes *via* ^1H NMR revealed an increase in the TSAP/SAP ratio in linear proportion with side chain substitution. In this context, a dependence of the complex geometry in solvents coordinating to different degrees was also detected. In the series $\text{DMSO} > \text{H}_2\text{O} \sim \text{CH}_3\text{OH} > \text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} > \text{CH}_3\text{CN}$, the solution structure in DMSO is predominantly SAP. On the contrary, in CH_3CN TSAP is the favored conformation. The trend in complex geometry was reflected by the relaxivity rates of the corresponding Gd complexes, which showed an exponential increase in relaxivity with increasing side chain substitution. Especially the Gd-complex **Gd-DOTAZA** showed remarkable relaxivity ($r_1 = 4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) at magnetic field strength of 1.5 T and 310 K, outperforming all currently used GBCAs. In addition, *in vivo* and relaxation properties can be tailored for a variety of applications by modifications *via* CuAAC. The corresponding Ln-complexes are shown in Figure 5-1 with the experimentally determined complex geometries and relaxabilities.

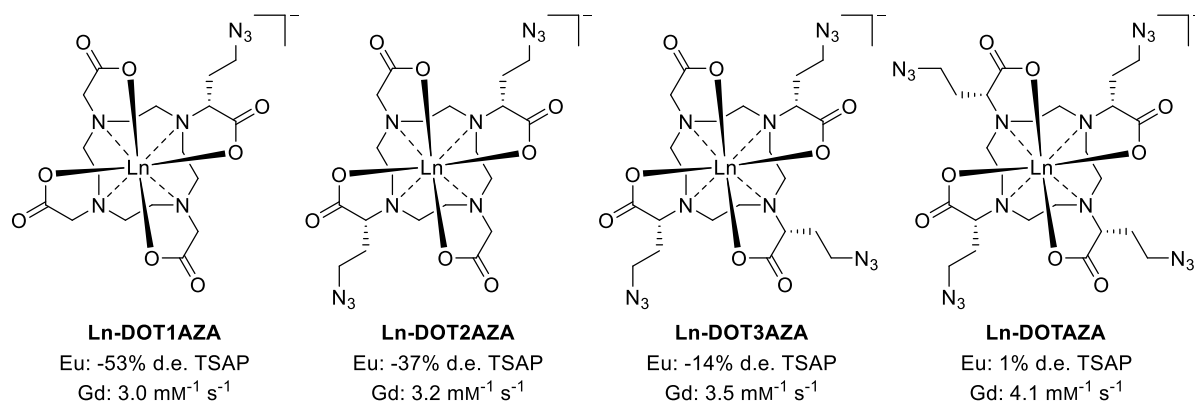


Figure 5-1 Ln complexes with corresponding complex geometries of the Eu complexes in D_2O and the relaxivity of the Gd complexes at 1.5 T and 310 K in H_2O .

Furthermore, the chelators synthesized in this way were examined for their binding properties with Zr, whose radioisotope ^{89}Zr is strongly discussed in connection with metal-based PET imaging. Here, it was possible to demonstrate the Zr-catalyzed autohydrolysis of carboxylate-substituted Zr-DOTA complexes. In addition, the synthesis of the Zr complex **Zr-DOT1AZA** was established, yielding the first DOTA-based Zr complex, which combines excellent complex

Summary

stability by binding of Zr^{4+} via four carboxylates with the modifiability by click chemistry. On this basis, the modified Zr-complexes **Zr-ZWI-DOTA** and **Zr-ZWI₄-DOTAZA** were synthesized, which serve as a model for tailor-made Zr-complexes of different pharmacokinetics.

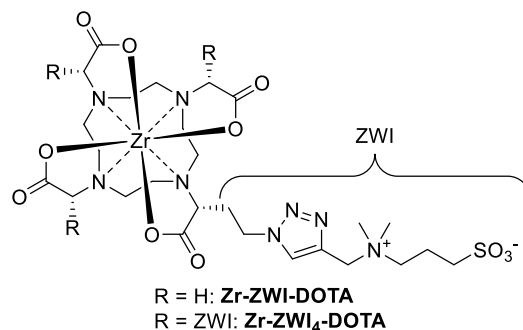


Figure 5-2 Modified Zr complexes **Zr-ZWI-DOTA** and **Zr-ZWI₄-DOTA**, based on the previously synthesized chelators **DOTIAZA** and **DOTAZA**.

Following the same principle, a number of modified DOTA derivatives were labelled with ^{89}Zr and investigated *in vivo*. In addition to excellent serum stability, all ^{89}Zr complexes showed a low tissue specificity depending on the different modifications of the complexes. It should be noted that this assay is one of the first to describe the *in vivo* properties of radiolabelled DOTA-based ^{89}Zr complexes.

In addition to the elucidation of complex properties of several DOTA-derivatives, various synthesis protocols for DOTA-based BFCs have been established. Key features of these compounds are effortless conjugation with targeting vectors and the modular applicability for various metal-based imaging techniques. Figure 5-3 shows the DOTA conjugates **DOTA-Ahx-cRGD** and **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** of the target vector cRGD, whose corresponding ^{111}In -labeled complexes were examined *in vivo* for their pharmacokinetics.

Summary

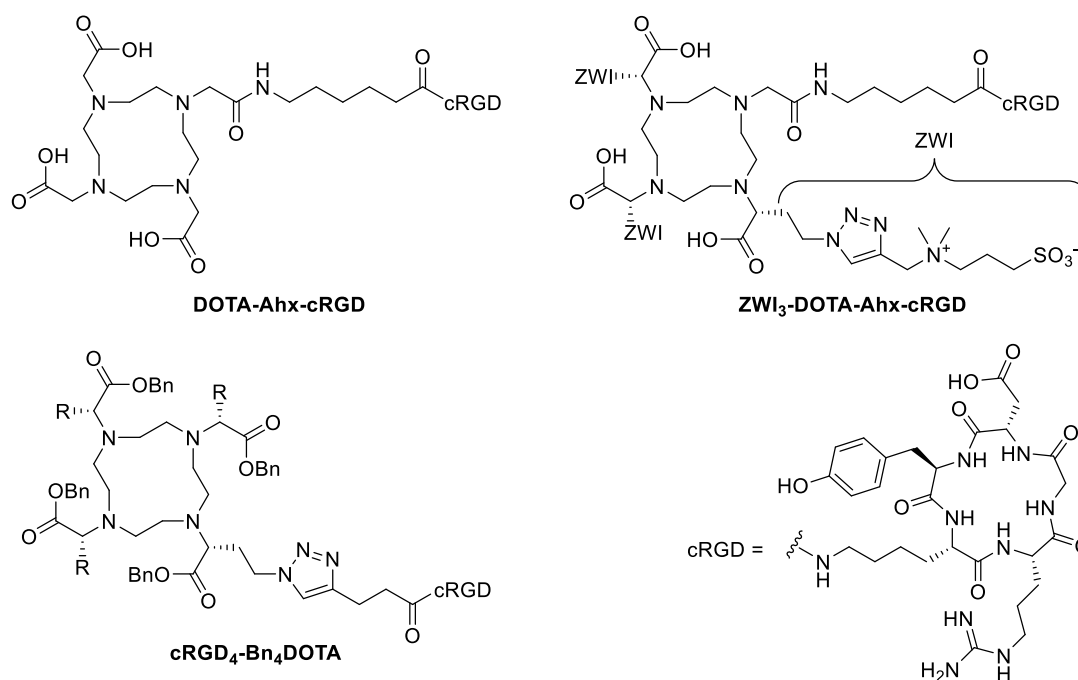


Figure 5-3 DOTA-based peptide conjugates **DOTA-Ahx-cRGD**, **ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD** and **cRGD₄-DOTA** with the targeting vector **cRGD**.

The evaluation using SPECT showed that zwitterionic residues can in principle suppress unspecific interactions, but at the same time impair tumor retention. In the future, the ratio between zwitterionic residues and targeting vectors should be investigated here.

Furthermore, an approach was presented that utilizes the chelator **Bn₄DOTAZA** as a multimerization platform for conjugation of several target vectors *via* CuAAC. A major advantage of these compounds in comparison to current BFCs is the modularity of tetracarboxylic acid, which is not only able to complex common metal ions ($^{68}\text{Ga}^{3+}$, $^{111}\text{In}^{3+}$, $^{86}\text{Y}^{3+}$) with high affinity and stability, but also the already discussed $^{89}\text{Zr}^{4+}$, which is considered to be the PET metal of the future.^{156, 312}

In addition to the target vector **cRGD**, derivatives of the pseudo-peptidic phosphinic acid **GPI** were also investigated. Their evaluation required a metal-based methodology to evaluate the new substances without the use of radioisotopes. Therefore, an Eu-based cell assay was developed and established, which allows the evaluation of target vector-conjugates in terms of their PSMA binding properties *via* one-point measurement with an Eu-Tracer. Figure 5-4 shows the most promising compounds, which showed a comparable detected Eu concentration in this cell assay in comparison to the reference **Eu-PSMA-617** at the same applied Eu concentration.

Summary

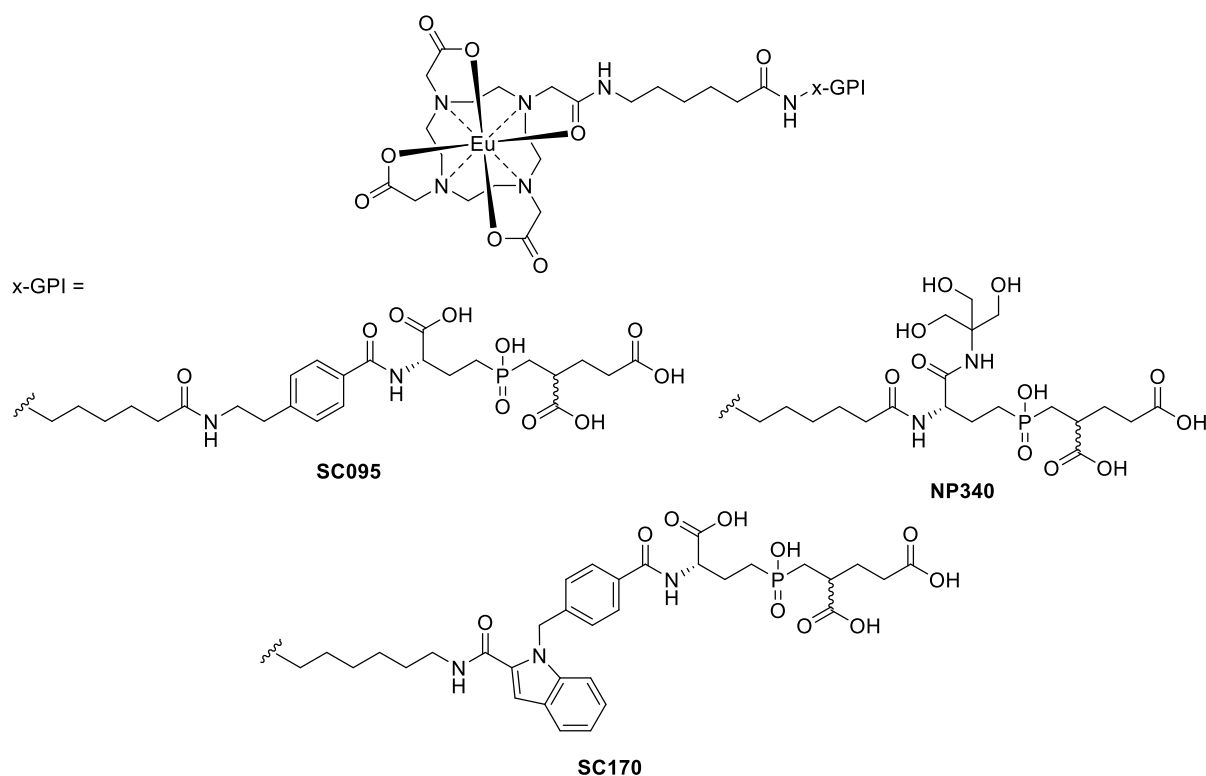


Figure 5-4 PSMA binders identified by Eu-based cell assay.

Especially remarkable is the high accumulation of the TRIS derivative **Eu-DOTA-NP340**, which indicates a PSMA binding in the low nanomolar range. However, in the subsequent detailed evaluation with a concentration row with LNCaP and PC-3 cells, no PSMA-specific Eu-enrichment was found, which could not be conclusively explained with the current data. Although the first attempts to determine an effective K_d -value for the TRIS derivative failed, future experiments should be carried out that focus on the specificity towards further receptors. Cell lines such as 22Rv1, which are distinguished by their extracellular matrix, could provide information as to whether additional receptors could be responsible for the unusual binding behavior. Furthermore, all PSMA binders identified in this way should be checked for their *in vivo* properties in a radio assay.

Due to the complex formation properties of the DOTA scaffold, the substances presented in this thesis are not only applicable for metal-based diagnostic methods, but also in a modular way for metal-based therapeutic or theranostic procedures. The chelator DOTA is a well-known chelator for metals such as ^{90}Y , ^{177}Lu or ^{225}Ac , which are already clinically used as ^{177}Lu -DOTATATE for example.³¹³

6. Experimenteller Teil

Alle Reaktionen wurden, sofern nötig, unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Als Schutzgas wurde Stickstoff verwendet. Kommerziell erhältliche trockene Lösungsmittel wurden von der Firma Acros unter Stickstoffatmosphäre und über Molekularsieb bezogen. Andere Lösungsmittel wurden an einer Destille nach Standardmethoden getrocknet und destilliert.³¹⁴

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros Organics, Macherey-Nagel, Merck, Roth, Sigma-Aldrich oder VWR Chemicals bezogen. Der Reinheitsgrad entsprach „zur Synthese“. Die Chemikalien wurden, sofern nicht näher beschrieben, nicht weiter gereinigt.

6.1 Reinigung

6.1.1 Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Trennung erfolgte durch Kieselgel als stationäre Phase. Für unpolare Verbindungen wurden Kieselgel der Korngröße 60-200 µm der Firma Macherey-Nagel verwendet. Der R_F -Wert wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf Fluorophor-beschichteten Kieselgelplatten der Firma Macherey-Nagel bestimmt. Die Detektion erfolgte mit Cersulfat (5 g Ammoniummolybdat, 0.1 g Cersulfat, 90 mL H₂O, 10 mL konz. H₂SO₄), Vanillin (15 g Vanillin, 250 mL EtOH, 2.5 mL konz. H₂SO₄), Bromkresolgrün (40 mg Bromkresolgrün, 100 mL EtOH, 2 mL NaOH (0.1 M)) und UV-Licht (254 nm, 366 nm). Polare Verbindungen wurden über Polygoprep[®] 100-50 C18 oder C8 Kieselgel der Korngröße 40-63 µm gereinigt. Die Detektion erfolgte massenspektrometrisch (ESI-TOF).

6.1.2 Automatisierte Flüssigkeitschromatographie

Für die automatisierte Flüssigkeitschromatographie wurden Chromabond[®] Flash RS Kartuschen der Firma Macherey-Nagel an einer Interchim PuriFlash[®] 450 mit automatischem Fraktionssammler und DAD-Detektor verwendet.

6.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für die analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril der Firma VWR Chemicals verwendet. Der Reinheitsgrad entsprach „für HPLC“. Demineralisiertes Wasser wurde durch eine Merck Millipore Mili-Q Filteranlage gereinigt.

Für die analytische HPLC wurde eine VWR Hitachi LaChrom Elite mit Pumpensystem (L-2130), einem Diodenarray-Detektor (DAD, L-2455) und einem Autosampler (L-2200)

verwendet. Als Standardsäule wurden eine EC 150/2 eine Nucleodur C18 HTec, 5 μm und eine Nucleodur C₈ ec, 5 μm der Firma Macherey & Nagel genutzt. Für die präparative HPLC wurde eine VWR Hitachi LaChrom Elite mit einem UV-Detektor (UV-2400) und einem L-2130 Pumpensystem verwendet. Je nach Substanz wurde eine 250/10 Nucleodur C18 HTec, 5 μm oder eine 250/10 Nucleodur C18 ec, 5 μm der Firma Macherey & Nagel verwendet. Als mobile Phase wurde ein Standardlösungsmittelgemisch aus H₂O/CH₃CN mit 0.05% HCO₂H als Additiv verwendet. Tabelle 6-1 zeigt den Standardgradienten mit entsprechenden Retentionszeiten.

Tabelle 6-1 Standardgradient mit Retentionszeiten für analytische (t_{Analyt}) und präparative ($t_{\text{Präp}}$) HPLC-MS.

t_{Analyt} (min)	$t_{\text{Präp}}$ (min)	H ₂ O (%)	CH ₃ CN (%)
2	7	98	2
17	32	5	95
19	40	5	95

6.2 Analytik

6.2.1 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Messungen der ¹H- und ¹³C-Spektren erfolgte an einem Bruker Fourier 300 MHz NMR-Spektrometer oder einem Bruker AVANCE 400 MHz bzw. 600 MHz NMR-Spektrometer. Die Struktur neuer Substanzen wurde mit 2D-Analytik (H-H-COSY, HMBC, HSQC) ermittelt.

Die Verschiebung wird in δ -Werten in ppm in Bezug auf TMS angegeben. Die Spektren wurden auf nicht-deuterte Lösungsmittel kalibriert.³¹⁵ Zur Charakterisierung der Signale wurden die Abkürzungen s (Singulett), d (Duplett), t (Triplett) q (Quartett), m (Multiplett) und br (Breit) verwendet. Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben.

Die Nummerierung der Atomkerne weicht von den IUPAC-Regeln ab und stimmt nicht mit der IUPAC-Nomenklatur der Moleküle überein.

Die NMR-Spektren wurden mit der Software MestReNova 9.0.1 ausgewertet.

6.2.2 Relaxationszeiten

Die T_1 -Relaxationszeiten wurden an einem microspect mq60 Relaxometer der Firma Bruker bei 1.5 T bei 37 °C über 15 Messpunkte in Intervallen von 5 – 400 ms ermittelt.

6.2.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie erfolgte an einem Bruker MicroTOF-Q II oder AmazonSL mit ESI-Quelle. Für HRMS und LC-MS-Chromatogramme wurde das Bruker MicroTOF-Q II mit ESI-TOF Tunemix der Firma Bruker kalibriert und an eine VWR Hitachi LaChrom Elite gekoppelt, welche ein Pumpensystem (L-2130), einen Diodenarray-Detektor (L-2455) und einen Autosampler (L-2200) enthielt.

ICP-MS Messungen wurden an einem 7500cs series Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies durchgeführt.

6.2.4 Infrarotspektroskopie

Infrarotspektroskopie (IR)-Messungen wurden an einem Jasco FT/IT-4100 durchgeführt.

6.2.5 Drehwertmessung

Der Drehwert α wurde an einem Polarimeter P 8000-T der Firma Krüss ermittelt ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Unter Berücksichtigung der Küvettenlänge d (dm) und der Massenkonzentration β (g/mL) wurde mit Formel (6-1) der spezifische Drehwert $[\alpha]_D$ ermittelt.

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{\beta \cdot d} \quad (6-1)$$

6.2.6 Thermogravimetrische Analytik

Alle Thermogramme wurden mit einer Pyris 1 TGA der Firma PerkinElmer aufgenommen. Die verwendete Temperatur wurde 10 min isotherm bei 80 °C gehalten, bevor ein Temperaturgradient von 80 °C bis 700 °C mit einer Temperaturerhöhung von 10 °C/min angewendet wurde.

6.2.7 Transmissionselektronenmikroskopie

Alle Probe wurde auf TEM-Cu-Grids mit 400Mesh Carbonfilm aufgetragen und an einem JEM-1011 HRTEM-Mikroskop der Firma JEOL vermessen.

6.2.8 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

EDX wurde an einem CM 300 UT der Firma Philips durchgeführt.

6.3 Arbeitstechnik

6.3.1 Mikrowelle

Reaktionen unter Mikrowellenbedingungen wurden in einem Discover Mikrowellenreaktor der Firma CEM durchgeführt.

6.3.2 Zentrifuge

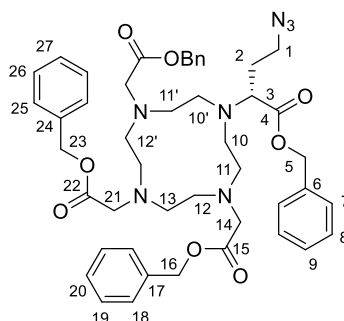
Zentrifugationen wurden an einer Biofuge Stratos der Firma Heraeus durchgeführt.

6.4 Arbeitsvorschriften

Im Folgenden beziehen sich Mischverhältnisse in Lösungen auf die Volumenverhältnisse, sofern nicht anders angegeben. Aufgrund der Komplexität der Moleküle weicht die Nomenklatur von den IUPAC-Empfehlungen ab.

6.4.1 Festphasensynthese

Die Festphasenpeptidsynthese erfolgte an einem CEM Liberty 12 Peptidsynthesizer auf einem 2-Chlorotriptyl-Harz 100-200 mesh (1.0 Äq.). Pro Kupplungssequenz wurde eine Aminosäure in DMF (6.4 Äq., 0.2 M) mit *Activator* (HOBt (5.0 Äq.) und HBTU (5.0 Äq.) in DMF (5.0 mL)), *Activator Base* (DIPEA (1.4 mL) in *N*-Methylpyrrolidon (2.8 mL)), *Deprotection* (Piperidin (8.0 mL) in DMF (32 mL)) verwendet. Die Abspaltung des Peptids erfolgte durch Zugabe von AcOH/TFE/CH₂Cl₂ (1:1:8, 2.0 mL) und anschließendem Rühren (15 min) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung filtriert und der Rückstand mit AcOH/TFE/CH₂Cl₂ (1:1:8, 2.0 mL) versetzt. Der Vorgang wurde viermal wiederholt. Die Filtrate wurden vereinigt und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

6.4.2 Komplexeigenschaften verschiedener Ln-DOT_xAZA-DerivateBn₄DOT1AZA

Der Tribenzylester Bn₃DO3A **12** (113 mg, 183 mmol, 1.00 Äq.) wurde in CH₃CN (15 mL) gelöst und mit Cs₂CO₃ (66.0 mg, 202 mmol, 1.10 Äq.) versetzt. Anschließend wurde das Triflat **9** (135 mg, 367 mmol, 2.00 Äq.) in CH₃CN gelöst und tropfenweise zugegeben. Die Suspension wurde 72 h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert, das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 99:1→50:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (123 mg, 148 mmol, 81%) erhalten.

R_f = 0.30 (CH₂Cl₂/THF, 15:1, Cersulfat)

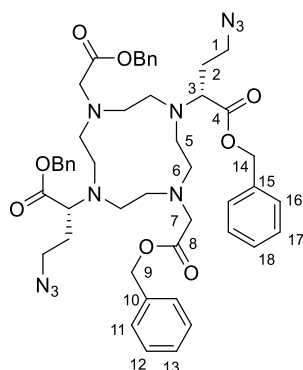
$[\alpha]_D^{25} = -26^\circ$ (c = 1 mg/mL, CH₂Cl₂, 25 °C)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.38 – 7.27 (m, 20H, H-7 – H-9, H-18 – H-20, H-25 – H-27), 5.25 – 5.03 (m, 8H, H-5, H-16, H-23), 3.67 – 3.62 (m, 1H, H-3), 3.58 (d, ^3J = 7.1 Hz, 1H, H-10a, HSQC), 3.51 – 3.38 (m, 4H, H-10b, H-14, H-21a, HSQC), 3.22 – 2.92 (m, 7H, H-1a, H-10', H-14', H-21b, HSQC), 2.61 – 2.35 (m, 12H, H-11 – H-13), 1.92–1.86 (m, 2H, H-2).

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 175.5 (C-4, HMBC), 174.0 (C-22), 173.9 (C-15), 135.3 (C-17), 135.3, 135.1 (C-6, C-24), 128.8, 128.8, 128.7, 128.7, 128.7, 128.5, 128.5, 128.4, 128.4 (C-7 – C-9, C-18 – C-20, C-25 – C-27), 67.7 (C-5), 67.2, 67.1, 67.1 (C-16, C-23), 58.2 (C-3), 55.4 (C-14), 55.3 (C-21), 52.89, 52.73, 50.2, 48.55, 48.40, 48.20, 47.59 (C-10 – C-13), 44.52 (C-1), 23.83 (C-2).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₄₆H₅₅N₇O₈: 417.7129, gef.: 417.1775 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2831.9, 2097.2, 1725.0, 1448.3, 1143.6, 1103.1, 1028.8, 948.8, 742.5, 695.21, 569.9.

Bn₄DOT2AZA

Das sekundäre Amin Bn₂DO2A **15** (260 mg, 554 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in CH₃CN (35.0 mL) gelöst, mit Cs₂CO₃ (361 mg, 1.11 mmol, 2.00 Äq.) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Die Suspension wurde portionsweise mit dem Triflat **9** (652 mg, 1.50 mmol, 2.77 Äq.) versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert, das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/CH₃OH, 50:1→5:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (350 mg, 387 μ mol, 70%) erhalten.

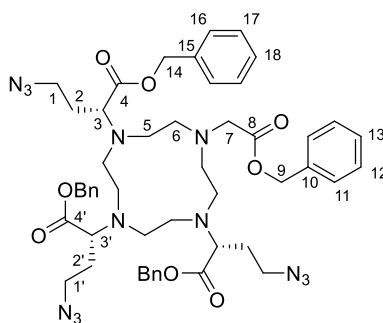
$[\alpha]_D = -2.8^\circ$ ($\beta = 12.6$ mg/mL, CH₃CN, 25 °C).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.47 - 7.21$ (m, 20H, H-11 – H-13, H-16 – H-18), 5.24 – 5.06 (m, 8H, H-9, H-14), 3.69 – 3.62 (m, 2H, H-3), 3.65 – 3.62 (m, 2H, H-1a), 3.51 – 3.39 (m, 4H, H-1b, H-7a), 3.27 – 2.05 (m, 18H, H-5 – H-7), 1.93 – 1.72 (m, 4H, H-2)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 175.5$ (C-4), 174.0 (C-8), 135.3 (C-15), 135.2 (C-10), 128.83, 128.80, 128.72, 128.67, 128.42, 128.33, 122.30 (C-11 – 13, C-16 – 18), 67.7 (C-9), 67.1 (C-14), 58.2 (C-3), 55.4 (C-7), 52.8 (C-5), 50.2 (C-1), 48.6, 47.5, 44.5 (C-5', C-6, C-6'), 23.1 (C-2).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₄₈H₅₈N₁₀O₈: 452.2293, gef.: 452.2213 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2979.48, 2883.06, 2096.24, 1731.76, 1455.99, 1254.47, 1192.763, 1111.76, 1029.80, 968.09, 748.25, 697.14, 638.32.

Bn₄DOT3AZA

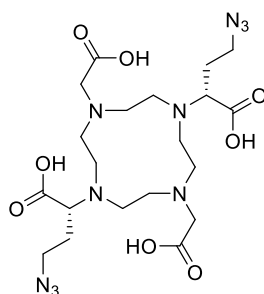
Das sekundäre Amin **12** (358 mg, 435 μmol , 1.00 Äq.) wurde in CH_3CN (7.00 mL) gelöst, mit Cs_2CO_3 (141 mg, 435 μmol , 1.00 Äq.) versetzt und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Die Suspension wurde mit 2-Bromessigsäurebenzylester **11** (652 mg, 1.50 mmol, 2.77 Äq.) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert, das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 99:1→7:1) gereinigt. Das Produkt **Bn₄DOT3AZA** wurde als gelbes Öl (388 mg, 399 μmol , 92%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -10.6^\circ$ ($\beta = 1.5 \text{ mg/mL}$, CH_3CN , 25 °C)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.39 - 7.27$ (m, 20H, H-11-13, H-16-18), 5.24 – 5.07 (m, 8H, H-9, H-14), 3.75 – 3.70 (m, 1H, H-3'), 3.62 – 3.61 (m, 1H, H-7a) 3.51 – 3.16 (m, 11H, H-3, H-5a, H-6a, H-7b), 2.93 – 2.34 (m, 14H, H-1, H-1', H-5b, H-6b), 2.03 – 1.72 (m, 6H, H-2, H-2').

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 175.65, 175.54$ (C-4), 173.95 (C-8), 172.25 (C-4'), 128.80, 128.76, 128.69, 128.64, 128.48, 128.44, 128.36, 128.32, 128.27, 128.21, (C-11 - 13, C-16 - 18) 60.61 (C-3), 58.15 (C-3'), 135.79, 135.27, 135.09, 135.04 (C-10, C-15), 67.65, 67.05, 66.32, 66.09 (C-9, C-14), 60.52 (C-3'), 58.12 (C-3), 56.27, 53.54, 52.69, 50.89, 50.62, 50.43, 50.20, 49.34, 48.67, 48.58, 48.49, 47.57, 44.71 (C-1, C-5 – 7), 29.12, 28.94, 23.82 (C-2).

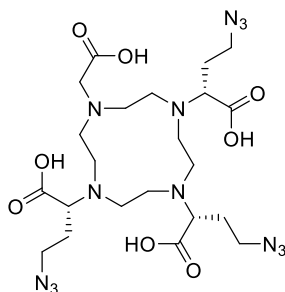
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{50}\text{H}_{61}\text{N}_{13}\text{O}_8$: 971.4766, gef.: 971.4732.

DOT2AZA

Der Benzylester **Bn₄DOT2AZA** (50 mg, 45 μ mol, 1.0 Äq.) wurde mit LiOH (5.0 mg, 0.20 μ mol, 4.4 Äq.) in THF/H₂O (1.0 mL, 1:1) gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit HCl (500 μ L, 1.0 M) versetzt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, H₂O/CH₃CN, 98:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (24 mg, 44 μ mol, 98%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₀H₃₁EuN₁₀O₈: 543.2634, gef.: 543.2649 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2980.45, 2098.17, 1688.37, 1627.63, 1375.00, 1228.43, 1159.97, 691.36, 626.75.

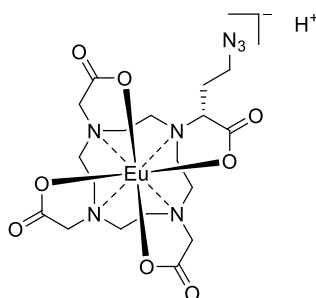
DOT3AZA

Der Benzylester **Bn₄DOT3AZA** (14 mg, 15 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in mit LiOH THF/H₂O (1.0 mL) gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit HCl (1 M, 2.0 mL) versetzt und 24 h bei 40 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, H₂O/CH₃CN, 98:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (9.1 mg, 15 μ mol, >99%) erhalten.

[α]_D = -27.6° (β = 3.6 mg/mL, H₂O, 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₂H₃₇N₁₃O₈: 612.2961, gef.: 612.2825 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2377.80, 2098.17, 1695.12, 1624.73, 1398.14, 1348.00, 1222.65, 1155.15, 1097.30, 823.46, 784.89, 643.14.

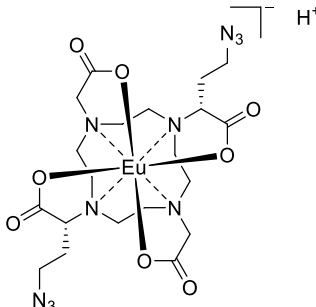
Eu-DOT1AZA¹⁷⁷

Der freie Chelator **DOT1AZA** wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 (29.4 mg, 114 μmol , 1.10 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (64.1 mg, 103 μmol , >99%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -0.7^\circ$ ($\beta = 3.5 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{EuN}_7\text{O}_8$: 624.1285, gef.: 624.1238 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2980.45, 2098.17, 1688.37, 1627.63, 1375.00, 1228.43, 1159.97, 691.36, 626.75.

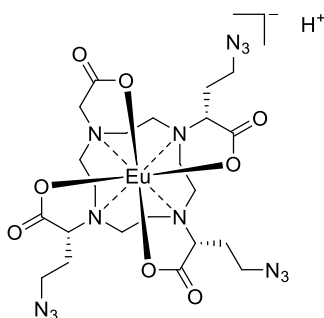
Eu-DOT2AZA

Der freie Chelator **DOT2AZA** (18.8 mg, 20.0 μmol , 1.00 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 (29.4 mg, 114 μmol , 1.10 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 85:15→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (13.3 mg, 19.3 μmol , 97%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -21.3^\circ$ ($\beta = 3.5 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{EuN}_{10}\text{O}_8$: 693.1611, gef.: 693.1565 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2980.45, 2098.17, 1688.37, 1627.63, 1375.00, 1228.43, 1159.97, 691.36, 626.75.

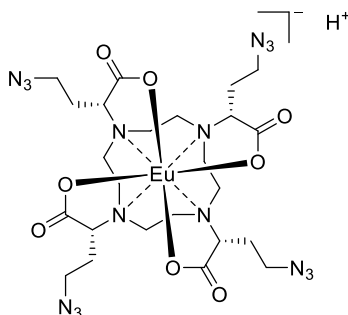
Eu-DOT3AZA

Der freie Chelator **DOT3AZA** (5.0 mg, 8.2 μmol , 1.0 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 (2.3 mg, 9.0 μmol , 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 8:2 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (6.2 mg, 8.2 μmol , >99%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -13.4^\circ$ ($\beta = 3.5 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{EuN}_{13}\text{O}_8$: 762.1938, gef.: 762.1918 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2925.48, 2096.24, 1608.34, 1382.71, 1276.65, 1092.48, 635.43.

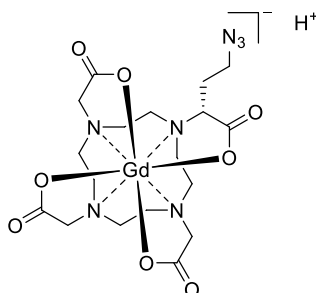
Eu-DOTAZA¹⁷²

Der freie Chelator **DOTAZA** (38.6 mg, 56.7 μmol , 1.00 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 (16.1 mg, 62.4 μmol , 1.10 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 8:2 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (38.7 mg, 46.6 μmol , 82%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -140.7^\circ$ ($\beta = 3.5 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{EuN}_{16}\text{O}_8$: 831.2265, gef.: 831.2227 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3373.85, 2980.45, 2098.17, 1604.48, 1377.89, 1272.79, 1093.44, 633.50.

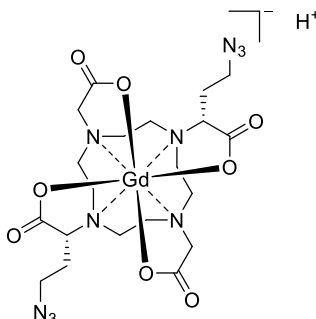
Gd-DOT1AZA¹⁷⁷

Der freie Chelator **DOT1AZA** wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit Gd_2O_3 (3.6 mg, 10 μmol , 0.60 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (10.4 mg, 16.6 μmol , >99%) erhalten.

$[\alpha]_D = -2.0^\circ$ ($\beta = 3.3$ mg/mL, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{GdN}_7\text{O}_8$: 629.1314, gef.: 629.1317 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2979.48, 2925.48, 2381.66, 2096.24, 1591.95, 1386.57, 1319.07, 1244.83, 1084.76, 943.02, 908.31, 719.32.

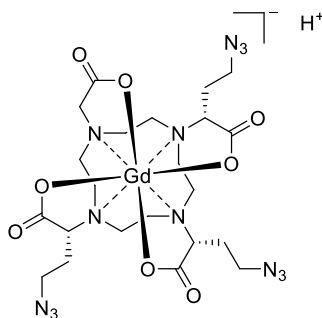
Gd-DOT2AZA

Der freie Chelator **DOT2AZA** (5.5 mg, 10 μmol , 1.0 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit Gd_2O_3 (2.2 mg, 6.1 μmol , 0.61 Äq.) versetzt und 16 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ mit 0.05% HCO_2H , 85:15→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (6.9 mg, 9.9 μmol , >99%) erhalten.

$[\alpha]_D = -7.8^\circ$ ($\beta = 1.8$ mg/mL, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{GdN}_{10}\text{O}_8$: 698.1641, gef.: 698.1633 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2921.63, 2856.06, 2096.24, 1594.84, 13887.53, 1315.21, 1085.73, 904.45, 647.00.

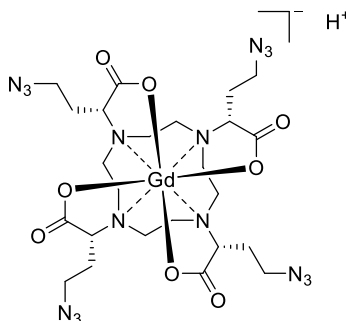
Gd-DOT3AZA

Der freie Chelator **DOT3AZA** (9.2 mg, 15 μmol , 1.0 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit Gd_2O_3 (2.8 mg, 7.7 μmol , 0.77 Äq.) versetzt und 16 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 8:2 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (11.5 mg, 15 μmol , >99%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -10.8^\circ$ ($\beta = 1.2 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{GdN}_{13}\text{O}_8$: 767.1967, gef.: 767.1768 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2921.63, 2856.06, 2098.17, 1608.34, 1387.53, 1085.73, 650.86, 631.57.

Gd-DOTAZA¹⁷²

Der freie Chelator **DOTAZA** (13 mg, 16 μmol , 1.0 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit Gd_2O_3 (6.4 mg, 18 μmol , 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 2:8 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (12.5 mg, 15 μmol , 94%) erhalten.

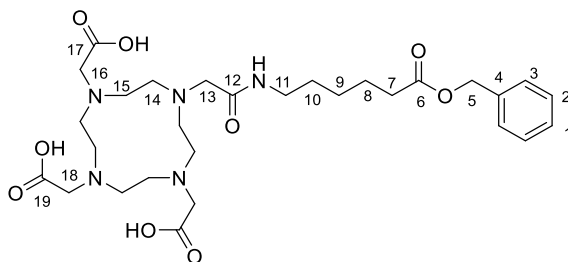
$[\alpha]_{\text{D}} = -115.0^\circ$ ($\beta = 3.0 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{GdN}_{16}\text{O}_8$: 836.2295, gef.: 836.2262 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2979.48, 2925.48, 2381.66, 2096.24, 1608.34, 1386.57, 1269.90, 1093.44, 639.29.

6.4.3 Stabilität DOTA-basierter Zr-Komplexe

DOTA-Ahx-Bn



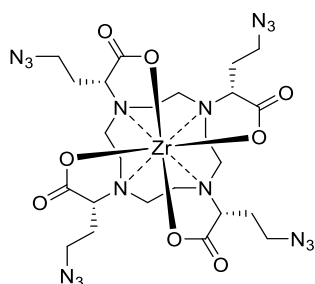
Der Tri-*tert*-butylester ***t*-Bu₃DOTA-Ahx-Bn** (26.5 mg, 34.2 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in TFA/CH₂Cl₂ (2.00 mL, 1:1) gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (C18, H₂O/CH₃CN, 99:1→1:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (20.8 mg, 34.2 μ mol, >99%) erhalten.

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ = 7.47 – 7.41 (m, 5H, H-1 – 3), 5.16 (s, 1H, H-5), 3.86 – 3.74 (m, 4H, H-13, H-18), 3.66 – 3.54 (m, 4H, H-16), 3.48 – 3.30 (m, 8H, H-14, H-15), 3.30 – 3.20 (m, 8H, H-14', H-15'), 1.67 – 1.25 (m, 8H, H-7 - 10).

¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ = 176.68 (C-17, C-18), 135.77 (C-5), 128.81, 128.54, 128.16 (C-1 – 3), 66.77 (C-13, C-16, C-18), 55.26 (C-14, C-15), 39.14 (C-11), 33.78 (C-7), 27.82, 25.51, 23.90 (C-8 – 10).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₆H₄₅N₅O₉: 608.3290, gef.: 608.3100 [M+H]⁺.

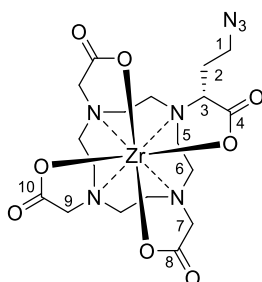
IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2937.06, 1718.26, 1633.41, 1455.99, 1382.71, 1351.86, 1197.58, 1162.87, 1085.73, 977.73, 908.31, 700.03.

Zr-DOTAZA

Der freie Chelator **DOTAZA** (10 mg, 15 μmol , 1.0 Äq.) und $\text{Zr}(\text{acac})_4$ (7.9 mg, 16 μmol , 1.0 Äq.) wurden in CH_3OH (1.0 mL) gelöst und 3 h bei 60 °C gerührt, wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete. Die Suspension wurde filtriert und der Filterkuchen mit CH_3OH (10 mL) gewaschen und 3 h bei 70 °C getrocknet. Das Produkt **Zr-DOTAZA** wurde als farbloser Feststoff (12 mg, 15 μmol , >99%) erhalten. Die Identität des Produktes konnte aufgrund der geringen Löslichkeit in DMSO bei 200 °C nicht abschließend bestätigt werden.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_{16}\text{O}_8\text{Zr}$: 767.2022, gef.: 767.1913 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2097.2, 1691.3, 1672.0, 1257.4.

Zr-DOT1AZA

Der freie Chelator **DOT1AZA** (1.6 mg, 3.4 μmol , 1.0 Äq.) wurde mit $\text{Zr}(\text{acac})_4$ (1.8 mg, 3.7 μmol , 1.1 Äq.) in CH_3OH (1.0 mL) gelöst und 3 h bei 70 °C gerührt. Der entstehende farblose Niederschlag wurde filtriert, mit CH_3OH gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (2.0 mg, 3.4 μmol , >99%) erhalten.

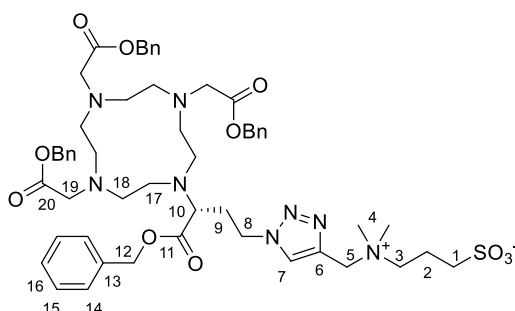
$[\alpha]_{\text{D}} = -3.6^\circ$ ($\beta = 0.7 \text{ mg/mL}$, H_2O , 25 °C).

^1H NMR (700 MHz, CD_3CN): $\delta = 3.96 - 3.82$ (m, 4H, H-7), 3.71 – 3.68 (m, 1H, H-1a), 3.64 – 3.58 (m, 3H, H-3, H-9), 3.52 – 3.42 (m, 4H, H-5', H-6', H-1b) 3.18 – 2.69 (m, 13H, H-5, H-6), 2.08 – 2.04 (m, 1H, H-2a), 1.81 -1.77 (m, 1H, H-2b).

^{13}C NMR (175 MHz, CD_3CN): $\delta = 179.39$ (C-4, C-10) 68.2 (C-7, HSQC), 64.8 (C-9, HSQC), 56.6 (C-5, C-6, s_{br} , HSQC), 56.2 (C-3), 49.1 (C-1), 25.0 (C-2, HSQC).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_8$: 560.1041, gef.: 560.1004 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2102.0, 1699.0, 1673.9, 1470.5, 13342.2, 1267.0, 930.5, 719.3.

ZWI-Bn₄DOTA

Das Lösungsmittel *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1) wurde entgast, bevor CuI (1.0 µg, 5.1 µmol, 0.043 Äq.), TBTA (3.4 mg, 6.4 µmol, 0.053 Äq.) und Natriumascorbat (3.8 mg, 19 µmol, 0.16 Äq.) zugegeben, und 30 min bei Raumtemperatur gerührt wurden. Anschließend wurden das Alkin **ZWI** (32 mg, 0.15 mmol, 1.3 Äq.), sowie das Azid **Bn₄DOTAZA** (0.10 g, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 12 h bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt, der Rückstand in H₂O/THF (2 mL, 1:1) aufgenommen, mit Na₂S (5.0 mg) versetzt, 30 min bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, H₂O/CH₃CN, 9:1→5:95) gereinigt. Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff (90 mg, 87 µmol, 70%) erhalten.

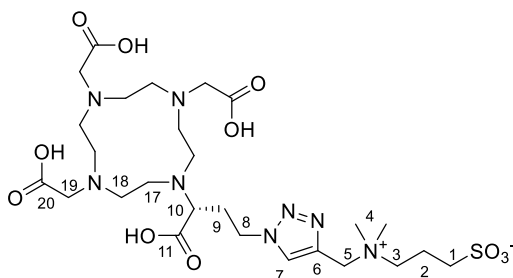
$[\alpha]_D = -3.3^\circ$ ($\beta = 3.0$ mg/mL, H₂O, 25 °C).

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 8.42 (s, 1H, H-7), 8.31 (s, 1H, SO₃H), 7.39 – 7.28 (m, 20H, H-14 – H-16), 5.17 – 5.11 (m, 8H, H-12), 4.63 – 4.51 (m, 2H, H-5), 3.83 – 3.66 (m, 7H, H-10, H-19), 3.43 – 3.39 (m, 2H, H-3), 3.12 – 2.78 (m, 24H, C-1, C-4, C-17, C-18), 2.50 – 2.44 (m, 1H, H-9a), 2.32 – 2.25 (m, 3H, H-2, H-9b).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ = 172.75 (C-11, H-19), 136.99, 136.97, 136.94, (C-13), 136.47 (C-6), 129.94, 129.89, 129.78, 129.70, 129.66, 129.56, 129.51, (C-14 – H-16), 129.47 (C-7), 68.16, 68.13, 67.99 (C-12), 63.0 (C-3), 62.0 (C-10), 58.7 (C-5), 56.0, 55.3 (C-19), 54.2, 53.2 (C-17, C-18), 51.5, 51.4 (C-4), 51.20 (C-17'), 48.9 (C-8, HSQC), 48.1 (C-1), 29.9 (C-9), 19.9 (C-2).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₄H₇₀N₈O₁₁: 520.2515, 520.2419 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2979.48, 1731.76, 1455.99, 1258.32, 1160.94, 1029.80, 968.09, 741.50, 698.11, 637.36, 601.68, 516.83.

ZWI-DOTA

Der Benzylester **ZWI-Bn₄DOT1AZA** (81 mg, 78 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in H₂O/THF (1:1, 3.0 mL) gelöst, mit Pd/C (8.1 mg, 10wt%) versetzt und unter H₂-Atmosphäre 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (53 mg, 78 μ mol, >99%) erhalten.

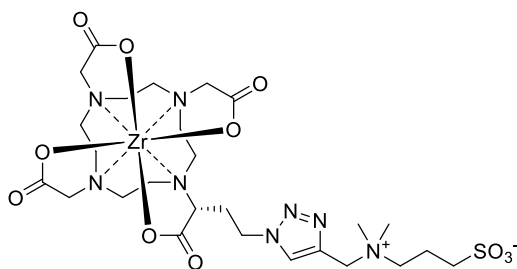
$[\alpha]_D = -1.8^\circ$ ($\beta = 8.5$ mg/mL, H₂O, 25 °C).

¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ = 8.44 (s, 1H, H-7), 4.72 (m, 2H, H-8, H-5), 4.01 – 3.00 (m, 35H, H-1, H-3, H-4, H-8, H-10, H-17, H-18, H-19), 2.46 – 2.42 (m, 1H, H-9a), 2.38 – 2.33 (m, 3H, H-2, H-9b).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ = 178.3 (C-11, C-20, HMBC), 135.0 (C-6), 129.4 (C-7), 62.2 (C-19), 61.5 (C-10), 60.7 (C-3), 58.1 (C-5), 55.8 (br, C-17, C-18), 50.1 (C-4), 48.60 (C-8), 47.2 (C-1), 27.8 (C-9), 18.2 (C-2).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₂₆H₄₆N₈O₁₁S: 340.1576, gef.: 340.1443 [M+H]⁺.

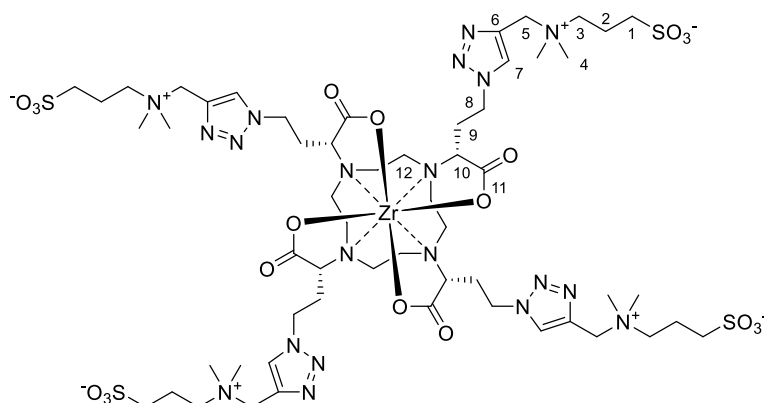
IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2980.45, 2884.02, 1683.55, 1386.575, 1251.58, 1156.12, 1087.66, 1028.84, 954.59, 638.32.

Zr-ZWI-DOTA

Der freie Chelator **ZWI-DOTA** (1.0 mg, 1.5 μmol , 1.0 Äq.) wurde in CH_3OH (0.50 mL) gelöst, mit $\text{Zr}(\text{acac})_4$ (170 μL , 10 mM, 1.1 Äq.) und 3 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 98:2→5:95) gereinigt. Der Zr-Komplex wurde als farbloser Feststoff (1.1 mg, 1.5 μmol , >99%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -99.5^\circ$ ($\beta = 1.0 \text{ mg/mL}$, H_2O , 25 °C).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{SZr}$: 765.1814, gef.: 765.1800 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Zr-ZWI₄-DOTA

Der freie Chelator **ZWI₄-DOTA** (10 mg, 6.7 μmol , 1.0 Äq.) wurde mit $\text{Zr}(\text{acac})_4$ (3.9 mg, 8.0 μmol , 1.2 Äq.) in NH_4OAc -Puffer (1.0 mL, pH 5.5) gelöst und 16 h bei 100 °C gerührt. Der entstehende beigefarbene Niederschlag wurde filtriert, mit CH_3OH gewaschen und an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 98:1→1:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (8.2 mg, 5.2 μmol , 78%) erhalten.

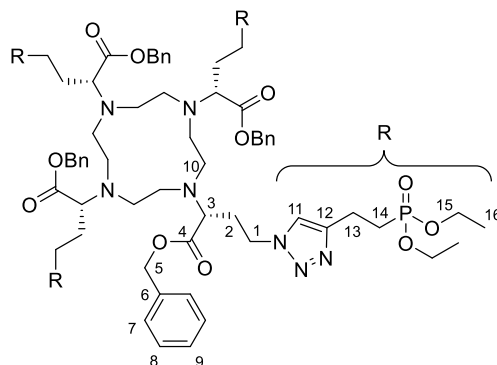
$[\alpha]_{\text{D}} = -24.8^\circ$ ($\beta = 4.2 \text{ mg/mL}$, H_2O , 25 °C).

^1H NMR (600 MHz, D_2O): $\delta = 8.45$ (s, 4H, H-6), 4.89 – 4.86 (m, 8H, H-8), 4.77 (s, 8H, H-5), 3.67 (d, $^3J = 10.5 \text{ Hz}$, 4H, H-10), 3.51 – 2.94 (m, 56H, H-1, H-3, H-4, H-12), 2.40 – 2.34 (m, 16H, H-2, H-9).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{56}\text{H}_{96}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{S}_4\text{Zr}$: 794.2593, gef.: 794.2590 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2916.81, 1700.91, 1678.73, 1476.24, 1333.53, 1253.50, 1177.33, 1036.55.

6.4.4 Oberflächenbeschichtung - Synthese

P₄-Bn₄DOTA

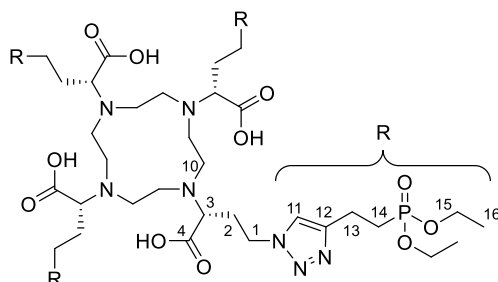
Das Lösungsmittel *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1) wurde entgast, bevor CuI (0.95 µg, 5.0 µmol, 0.043 Äq./Azid), TBTA (2.2 mg, 6.2 µmol, 0.053 Äq./Azid) und Natriumascorbat (3.7 mg, 19 µmol, 0.16 Äq./Azid) zugegeben, und 30 min bei Raumtemperatur gerührt wurden. Anschließend wurden das Alkin **22** (20 mg, 0.15 mmol, 1.3 Äq./Azid), sowie das Azid **Bn₄DOTAZA** (30 mg, 29 µmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 1 h bei 50 °C im Mikrowellenreaktor (15 W) und danach 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in H₂O/THF (2 mL, 1:1) aufgenommen, mit Na₂S (5.0 mg) versetzt, 30 min bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Der Rückstand wurde an Kieselgel (EtOAc/EtOH, 50:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (43 mg, 24 µmol, 82%) erhalten.

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN/D₂O, 4:1) δ = 7.59 - 7.53 (m, 4H, H-11), 7.53 - 7.25 (m, 20H, H-7 - 9), 5.36 - 4.99 (m, 8H, H-5), 4.56 - 4.28 (m, 8H, H-1), 4.08 - 3.97 (m, 16H, H-15), 3.39 - 3.23 (m, 4H, H-3), 2.95 - 2.79 (m, 8H, H-2), 2.69 - 2.45 (m, 8H, H-13), 2.29 - 2.18 (m, 16H, 10-H), 2.10 - 2.03 (m, 8H, 14-H), 1.32 - 1.21 (m, 24H, 16-H).

¹³C NMR (125 MHz, D₂O): δ = 175.3 (C-4, HMBC), 146.0 (C-12, HMBC), 135.3 (C-6, HMBC), 128.6 (C-9, C-8, C-7, HSQC), 122.1 (C-11, HSQC), 66.8 (C-5, HSQC), 62.7 (C-15, HSQC), 57.7 (C-3, HSQC), 48.4 (C-1, HSQC), 46.3 (C-14, HSQC), 43.5 (C-2, HSQC), 23.4, 18.8 (C-10, HSQC, HMBC), 17.9 (C-13, HSQC), 15.3 (C-15, HSQC).

³¹P NMR (242 Hz, D₂O): δ = 33.48.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₈₄H₁₂₄N₁₆O₂₀P₄: 901.4137, gef.: 901.4152 [M+H]²⁺.

P₄-DOTA

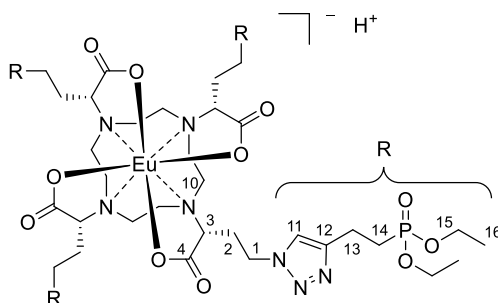
Der Tetrabenzylester **P₄-Bn₄DOTA** (10 mg, 5.5 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in H₂O/THF (1 mL) gelöst, mit Pd/C (10%, 1 mg) versetzt und unter H₂-Atmosphäre 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das Produkt wurde als farbloses Öl (7.9 mg, 5.5 μ mol, >99%) erhalten.

¹H NMR (500 MHz, D₂O/CD₃CN, 1:1) δ = 8.12 - 8.02 (m, 4H, 11-H), 4.94 - 4.82 (m, 16H, 15-H), 4.76 - 4.68 (m, 8H, 1-H), 4.35 - 4.27 (m, 8H, 13-H), 4.13 - 4.03 (m, 4H, 3-H), 3.23 - 3.08 (m, 8H, 10-H), 2.93 - 2.83 (m, 4H, 2-H), 2.48 - 2.41 (m, 4H, 2-H), 2.27 - 2.23 (m, 16 H, 10-H, 14-H), 1.61 - 1.32 (m, 24 H, 16-H).

³¹P NMR (242 MHz, D₂O): δ = 33.08.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₆H₁₀₀N₁₆O₂₀P₄: 721.3198, gef.: 721.3223 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 3386.39, 3102.90, 1579.41, 1366.32, 1170.58, 1044.26, 787.78, 625.79.

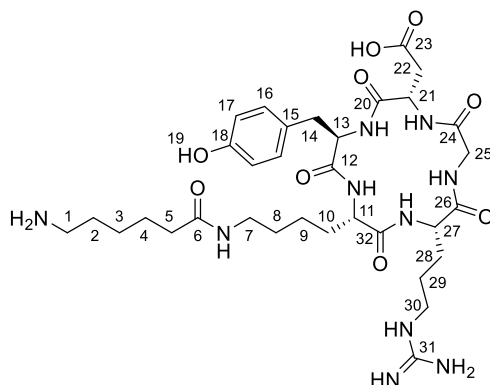
Eu-P₄-DOTA

Der freie Chelator **P₄-DOTA** (30 mg, 23 μ mol, 1.00 Äq.) wurde in NH₄OAc-Puffer (1 mL, pH 5.5) gelöst, mit EuCl₃ (6.5 mg, 25 μ mol, 1.1 Äq.) versetzt und 2 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 98:2→5:95) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (39.7 mg, 25 μ mol, >99%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₆H₉₇N₁₆O₂₀P₄: 796.2691, gef.: 796.2689 [M+H]⁺.

6.4.5 Integrin-Targeting - Synthese

Ahx-cRGD 29



Das Boc-geschützte cRGD-Derivat **Boc-29** (12.5 mg, 15.0 μmol , 1.00 Äq.) wurde in TFA/TIPS/ H_2O (95:2.5:2.5, 5 mL) gelöst und 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde mit N_2 abgedampft und mit CH_2Cl_2 (2 x 3 mL) koevaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (2:1, 1 mL) gelöst und gefriergetrocknet. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (10.4 mg, 14.2 μmol , 95%) erhalten.

$[\alpha]_{\text{D}} = -2.8^\circ$ ($\beta = 0.4 \text{ mg/mL}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 $^\circ\text{C}$).

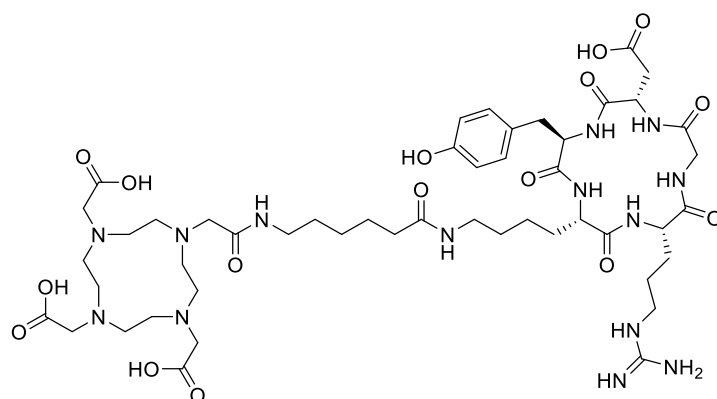
^1H NMR (600 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 1:1): $\delta = 7.48 - 7.25$ (m, 2H, Amid), 7.00 (d, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H, H-16), 6.70 (d, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, 2H, H-17), 4.58 (t, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, H-21), 4.40 (HSQC, H-13), 4.27 (HSQC, H-27), 4.09 (d, $^2J = 14.9 \text{ Hz}$, 1H, H-25a), 3.75 (dd, $^3J = 10.7$, 4.2 Hz, 1H, H-11), 3.35 (d, $^2J = 14.8 \text{ Hz}$, 1H, H-25b), 3.09–2.75 (m, 8H, H-1, H-7, H-14, H-30), 2.64–2.56 (m, 2H, H-22), 2.12 (t, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, H-5), 1.78–1.18 (m, 14H, H-2–4, H-8, H-10, H-28, H-29), 0.86–0.81 (m, 2H, H-9).

^{13}C NMR (150 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}/\text{D}_2\text{O}$, 1:1): $\delta = 175.8$ (C-23, HMBC), 175.4 (C-6, HMBC), 173.6 (C-26, HMBC), 172.6 (C-32, HMBC), 171.58 (C-20, HMBC), 171.0 (C-24, HMBC), 154.6 (C-18), 131.1 (C-16), 129.8 (C-31, HMBC), 127.6 (C-15, HMBC), 116.5 (C-17), 56.5 (C-13), 56.3 (C-11), 53.2 (C-27, HSQC), 51.2 (C-21, HSQC), 44.53 (C-25), 41.46 (C-7), 40.12 (C-30), 39.6 (C-1, HSQC), 37.6 (C-22), 37.2 (C-14), 36.6 (C-5), 31.0 (C-10), 28.7 (C-8), 28.3 (C-28), 27.6 (C-29), 26.12, 25.77, 25.31 (C-1–3), 23.7 (C-9, HSQC).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_9$: 732.392, gef.: 366.906 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3195.47, 2917.77, 2848.35, 1652.70, 15240.85, 1516.74, 1196.61, 1171.54, 1144.55, 1023.05, 819.60, 719.32, 612.29.

DOTA-Ahx-cRGD

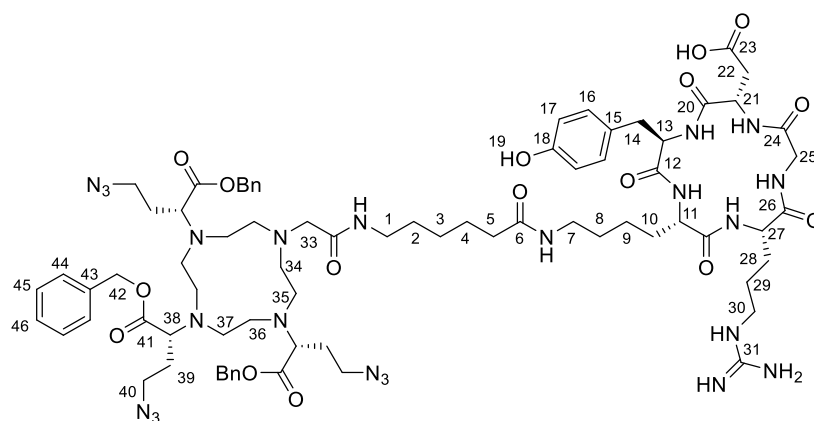


Das cRGD-Derivat **29** (10 mg, 14 μmol , 1.0 Äq.) wurde mit NHS-Ester **30** (12 mg, 17 μmol , 1.2 Äq.) in DMF (2 mL) gelöst, mit Et_3N (0.15 mL) und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (1:1, 3 mL) aufgenommen, mit LiOH (0.5 M, 400 μL) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt *via* HPLC (Nucleodur RP18, 250 x 10 mm ID, 5 μm Partikel, 2% CH_3CN in H_2O mit 0.05% HCO_2H , 2 min halten, anschließend 2% $\rightarrow$ 95% in 18 min, 5 mL/min, 255 nm, t_R = 6.50 min) gereinigt. Das DOTA-cRGD-Konjugat wurde als farbloser Feststoff (8.0 mg, 7.2 μmol , 51%) erhalten.

$[\alpha]_D = -2.2^\circ$ (β = 1.8 mg/mL, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1), 25 $^\circ\text{C}$).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{N}_{14}\text{O}_{16}$: 560.2933, gef.: 560.2940 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

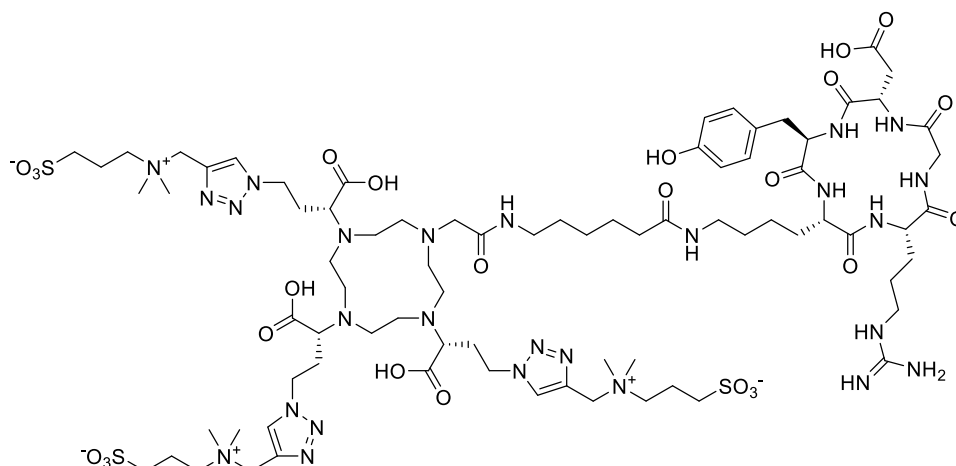
IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3207.04, 2983.34, 1652.70, 1567.84, 1417.42, 1205.29, 1182.15, 1135.87, 842.74, 800.31, 723.18, 554.43.

Bn₃DOT3AZA-Ahx-cRGD 32

Das cRGD-Derivat **29** (9.0 mg, 12 μ mol, 1.0 Äq.) wurde mit NHS-Ester **31** (13 mg, 14 μ mol, 1.2 Äq.) in DMF (2 mL) gelöst, mit Et₃N (0.15 mL) und 72 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt *via* HPLC (Nucleodur RP18, 250 x 10 mm ID, 5 μ m Partikel, 5 mL/min, 255 nm, t_R = 6.50 min) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (12 mg, 7.6 μ mol, 63%) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, D₂O/CD₃CN, 4:1): 8.34 (s, 4H, N-H), 7.44 – 7.21 (m, 15H, H-44 - 46), 7.08 – 6.95 (m, 2H, H-16), 6.70 – 6.63 (m, 2H, H-17), 5.55 – 5.04 (m, 6H, H-42), 4.59 – 4.52 (m, 1H, H-21), 4.47 – 4.43 (m, 1H, H-13), 4.38 – 4.31 (m, 1H, H-27), 4.15 (d, ²*J* = 15.2 Hz, 1H, H-25a), 3.98 – 3.86 (m, 1H, H-11), 3.69 – 3.51 (m, 5H, H-33, H-38), 3.45 – 2.74 (m, 50H, H₂O, H-1, H-7, H-14, H-22, H-25b, H-30, H-34a – 37a, H-40), 2.67 – 2.24 (m, H-34b – 37b), 2.10 (t, ³*J* = 7.9 Hz, 2H, H-5), 1.84 – 1.71 (m, 2H, H-39a), 1.68 – 1.57 (m, 2H, H-39b), 1.55 - 1.21 (m, 14H, H-2 - 4, H-8, H-10, H-28, H-29), 0.97 – 0.91 (m, 2H, H-9).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₇₆H₁₀₅N₂₃O₁₆: 798.9128, gef.: 798.9564 [M+H]³⁺.

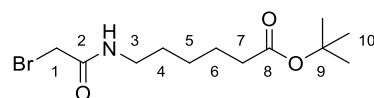
ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD

Für die folgende Reaktion wurde eine Stammlösung aus CuI (491 µg, 2.58 µmol), TBTA (1.69 mg, 3.18 µmol) und NaAsc (1.90 mg, 9.60 µmol) in einem entgasten Gemisch aus DMF/*t*-BuOH/H₂O (1:2:2, 5 mL) hergestellt. Danach wurde das Alkin **ZWI** (1.18 mg, 5.75 µmol, 3.28 Äq.) und das Azid **32** (2.80 mg, 1.75 µmol, 1.00 Äq) in DMF (200 µL) gelöst, mit der Stammlösung (440 µL) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C-18, 2% CH₃CN in Wasser mit 0.05% HCO₂H) gereinigt und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₀₀H₁₀₅N₂₆O₂₅S₃: 738.3560, gef.: 738.3592 [M+H]³⁺.

Das Rohprodukt wurde in H₂O gelöst, mit LiOH (0.5 M, 20 µL) versetzt und 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt *via* HPLC (Nucleodur RP18, 250×10 mm ID, 5 µm Partikel, 2% CH₃CN in H₂O mit 0.05% HCO₂H, 2 min halten, anschließend 2%→95% in 18 min, 5 mL/min, 218 nm, *t_R* = 12.87 min) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (0.5 mg, 0.3 µmol, 10%) erhalten.

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₇₉H₁₃₂N₂₆O₂₅S₃: 647.9746, gef.: 647.9801 [M+H]³⁺.

6-(2-bromoacetamido)-hexansäure-*tert*-butylester 35

Eine Suspension aus Hexansäure-*tert*-butylester **34** (100 mg, 534 μmol , 1.00 Äq.) und K_2CO_3 (148 mg, 1.07 mmol, 2.00 Äq.) in CH_3CN (1.00 mL) wurde bei 0 °C mit einer Lösung aus Bromacetyl bromid **33** (50 μL , 575 μmol , 1.08 Äq.) in CH_3CN (100 μL) versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 16 h bei Raumtemperatur gerührt.

Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel gereinigt (Pentan/EtOAc 5:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (148 mg, 481 μmol , 90%) erhalten.

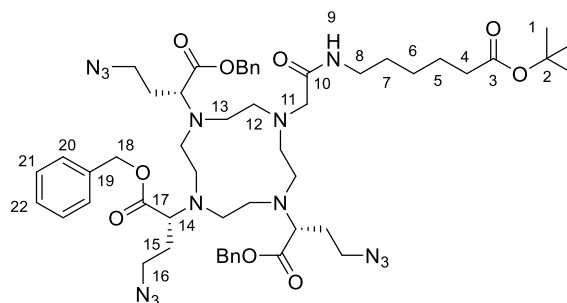
R_f = 0.5 (Pentan/EtOAc 5:1, Cersulfat)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ = 3.81 (s, 2H, H-1), 3.20 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-3), 2.23 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-7), 1.67 – 1.49 (m, 4H, H-4, H-6), 1.45 (s, 9H, H-10), 1.41 – 1.28 (m, 2H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD): δ = 174.9 (C-8), 169.4 (C-2), 81.4 (C-9), 40.72 (C-3), 36.3 (C-7), 29.8 (C-4), 28.8 (C-1), 28.4 (C-10), 27.3 (C-5), 25.8 (C-6).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{BrNO}_3$: 308.0856, gef.: 308.0850 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2980.45, 2925.48, 2854.13, 1716.34, 1646.91, 1540.85, 1508.06, 1455.99, 1396.21, 1233.25, 1167.69, 1093.44, 1013.41, 956.52, 796.46, 777.17.

Bn₃DOT3AZA-Ahx-*t*-Bu 36

Zu einer Suspension aus dem sekundären Amin **16** (49.4 mg, 160 μ mol, 1.00 Äq.) und Cs₂CO₃ (104 mg, 320 μ mol, 2.40 Äq.) in CH₃CN (3.00 mL) wurde bei 0 °C eine Lösung vom Alkylhalogenid **35** (160 mg, 49.4 μ mol, 1.2 Äq.) in CH₃CN (1.50 mL) zugegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/THF 8:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloses Öl (52.9 mg, 50.1 μ mol, 38%) erhalten.

R_f = 0.3 (CH₂Cl₂/THF 3:2, Cersulfat)

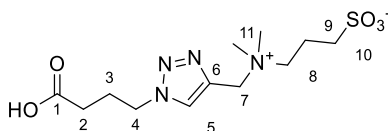
$[\alpha]_D = -21.0^\circ$ (β = 1.5 mg/mL, CH₃CN, 25 °C).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.53 (s, 1H, H-9), 7.42 – 7.27 (m, 15H, H-20 – H-22), 5.13 (s, 6H, H-18), 3.51 – 3.17 (m, 11H, H-11, H-14, H-16), 3.01 – 2.41 (m, 18H, H-8, H-12, H-13), 2.18 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H, H-8), 2.08 – 1.91 (m, 3H, H-15a), 1.82 – 1.96 (m, 3H, H-15b), 1.63 – 1.23 (m, 17H, H-1, H-4 – H-7).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 173.0 (C-3), 171.98 (C-17), 171.02 (C-10, HMBC), 135.6 (C-19), 128.7 (C-21), 128.6 (C-22), 128.5 (C-20), 80.0 (C-2), 66.6 (C-18), 60.3 (C-14), 54.93, 51.47, 50.75, 49.49 (C-12, C-13), 48.6 (C-16), 39.1 (C-11), 35.5 (C-8), 29.8 (C-7), 29.1 (C-6), 28.8 (C-15), 28.2 (C-1), 26.6 (C-5), 24.8 (C-8).

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₃H₇₄N₁₄O₉: 526.2955, gef.: 526.2896 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 2929.34, 2850.27, 2098.17, 1725.98, 1676.80, 1558.20, 1455.03, 1366.32, 1256.40, 1151.29, 1122.37, 965.20, 750.17, 698.11.

Zwitterion-Buttersäure 39

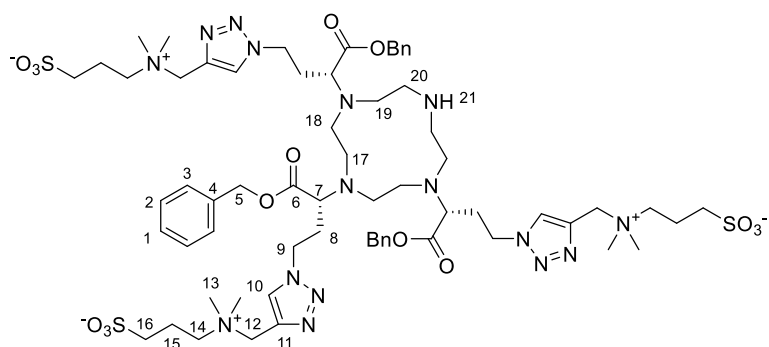
TBTA (28.1 mg, 53.0 μmol , 0.053 Äq.), CuI (8.18 mg, 43 μmol , 0.043 Äq.) und NaAsc (31.7 mg, 160 μmol , 0.16 Äq.) wurden in *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1, 2 mL) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 4-Azidobuttersäure **38** (129 mg, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) und das Zwitterion **ZWI** (267 mg, 1.3 mmol, 1.3 Äq.) zugegeben und für 24 h bei 50 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel gereinigt (C18, H₂O/CH₃CN, 98:2). Das Produkt wurde als farbloser Schaum (236 mg, 700 μmol , 70%) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 8.39 (s, 1H, H-5), 4.70 (s, 2H, H-7), 4.55 (t, ³*J* = 6.7 Hz, 2H, H-4), 3.49 – 3.43 (m, 2H, H-8), 3.12 (s, 6H, H-11), 2.98 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 2H), 2.46 – 2.20 (m, 6H, H-2, H-3, H-9).

¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ = 176.9 (C-1), 135.0 (C-6), 128.9 (C-5), 62.3 (C-8), 58.1 (H-7), 50.03 (C-11), 49.96 (C-4), 47.2 (C-10), 38.7 30.6 (C-3), 24.6 (C-2), 18.2 (C-9).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₁₂H₂₂N₄O₅S 335.1384, gef.: 335.1389 [M+H]⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2983.34, 1716.34, 1473.35, 1413.57, 1203.36, 1151.29, 1032.69, 896.74, 857.20, 804.17, 728.00, 600.72, 521.65.

ZWI₃-Bn₃DO3A 44

TBTA (5.6 mg, 11 μ mol, 0.053 Äq./Azid), CuI (1.6 mg, 8.6 μ mol, 0.043 Äq./Azid) und NaAsc (6.3 mg, 32 μ mol, 0.16 Äq./Azid) wurden in *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1, 2 mL, entgast) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Alkin **ZWI** (54 mg, 0.26 mmol, 3.9 Äq.) und das Azid **16** (55 mg, 67 μ mol, 1.0 Äq.) zugegeben und 24 h bei 50 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel gereinigt (C18, H₂O/CH₃CN, 98:2→5:95). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (73 mg, 51 μ mol, 76%) erhalten.

$[\alpha]_D^{25} = 14.0^\circ$ ($\beta = 1.0$ mg/mL, H₂O, 25 °C).

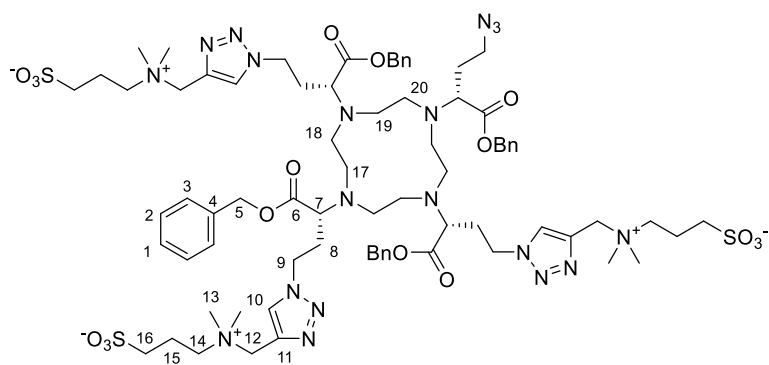
¹H NMR (300 MHz, D₂O): $\delta = 8.48 - 8.35$ (m, 3H, H-10), 7.44 – 7.32 (m, 15H, H-1 – H-3), 5.18 – 5.04 (m, 6H, H-5), 4.68 – 4.47 (m, 12H, H-12, H-9), 3.66 – 2.00 (m, 62H, H-7, H-8, H-13 – H-20).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 171.15$, 170.52 (C-6), 135.79 (C-4), 135.18 (C-11, HMBC), 128.51, 128.48, 128.31 (C-1 - 3), 128.23 (C-10), 66.05 (C-5), 61.43, 61.15 (C-14, C-14'), 57.68 (C-7), 56.74 (C-12), 49.84, 49.79, 49.68, 49.61 (C-13, C-13'), 47.51 (C-9), 47.42 (C-16), 47.28, 45.68 (br, C-17 – 20, HSQC), 30.21 (C-8, HSQC), 18.84, 18.79 (C-15, C-15').

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₆₅H₉₈N₁₆O₁₅S₃: 720.3353, gef.: 720.3310 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 3446.2, 2972.7, 1725.0, 1597.7, 1456.9, 1162.0, 1030.8, 905.4, 740.2, 636.4, 601.7.

Schmelzpunkt: 96.2 °C.

ZWI₃-Bn₃DOT1AZA 41

Das Triflat **9** (32.6 mg, 100 μ mol, 1.00 Äq) und Cs_2CO_3 (32.6 mg, 100 μ mol, 1.00 Äq) wurden in CH_3CN (5.00 mL) suspendiert, das sekundäre Amin **44** (144 mg, 100 μ mol, 1.00 Äq) zugegeben und die Reaktion 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Suspension filtriert, das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 4:1 $\rightarrow$ 1:19) gereinigt. Das alkylierte Produkt wurde als gelbliches Öl (148 mg, 89.5 μ mol, 90%) erhalten.

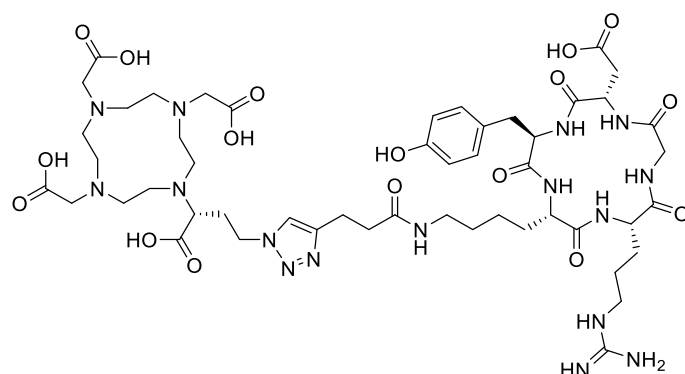
$[\alpha]_D = 22.0^\circ$ ($\beta = 1.0$ mg/mL, H_2O , 25 $^\circ\text{C}$).

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 8.55\text{--}8.51$ (m, 3H, 7-H, 7'-H), 7.40-7.29 (m, 20H, Ph), 5.22-5.03 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.68-4.60 (m, 6H, 5-H, 5'-H), 4.48-4.41 (m, 6H, 8-H, 8'-H), 3.69-3.20 (m, 22H, 14-H, 12-H, 10-H, 10'-H, 3-H, 3'-H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, HSQC), 3.05-2.95 (m, 18H, 4-H, 4'-H), 2.79-2.69 (m, 6H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 2.44-2.33 (m, 6H, 1-H, 1'-H), 2.26-2.07 (m, 12H, 2-H, 2'-H, H-9, H-9'), 1.87-1.16 (m, 2H, 13-H).

^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 171.62, 171.48$ (C-15, C-11, C-11', HMBC), 136.00, 135.91, 135.71, 135.21, 135.14 (C-6, C-6', Ph), 128.52, 128.41, 128.29, 128.13, 128.05 (C-7, C-7', Ph, HSQC), 67.13, 66.17, 65.71, 65.56 (CH_2PH , HSQC), 61.96, 61.73 (C-3, C-3', HSQC), 60.24, 60.17, 59.95 (C-12, C-10, C-10', HSQC), 56.84, 56.74 (C-5, C-5', HSQC), 49.86 (N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 49.73, 49.63 (C-4, C-4', HSQC), 48.03, 47.59, 47.36, 47.31, 47.27, 47.22, 46.05 (C-14, C-8, C-8', C-1, C-1', N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, HSQC), 30.90, 29.08, 28.94, 28.07 (C-13, C-9, C-9', HSQC), 18.95 (C-2, C-2', HSQC).

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{76}\text{H}_{109}\text{N}_{19}\text{O}_{17}\text{S}_3$: 828.8778, gef. 828.8701 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 3462.6, 2963.1, 2101.1, 1726.0, 1455.0, 1164.8, 0132.7, 898.7, 699.1, 601.7, 521.7.

cRGD-DOTA

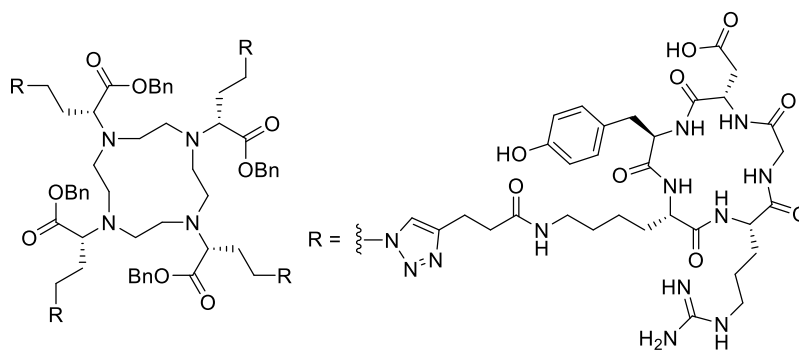
Für die Synthese wurde das Azid **Bn4DOT1AZA** (28 mg, 34 μmol , 1.0 Äq.) und das Alkin **47** (23 mg, 34 μmol , 1.0 Äq.) für 10 min evakuiert und anschließend in DMF/*t*-BuOH/H₂O (0.50 mL, 2:2:1) gelöst. Anschließend wurden CuI (1.0 mg, 5.2 μmol , 0.15 Äq.), TBTA (1.1 mg, 2.1 μmol , 0.062 Äq.) und NaAsc (1.3 mg, 6.6 μmol , 20 Äq.) für 5 min evakuiert und ebenfalls in DMF/*t*-BuOH/H₂O (0.50 mL, 2:2:1) gelöst. Beide Lösungen wurden vereint und bis zum vollständigen Umsatz des Azids gerührt. Die Reaktion wurde mittels LC-MS verfolgt.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₀H₇₆N₁₆O₁₇: 511.9224, gef. 511.9142 [M+H]²⁺.

Das Rohprodukt wurde gefriergetrocknet und der Rückstand ohne weiter Reinigung in H₂O/THF (1:1, 4 mL) gelöst und mit Pd-Kohle versetzt. Die Suspension wurde mit H₂ gesättigt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung filtriert, das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, H₂O/CH₃CN, 95:5 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (0.6 mg, 0.5 μmol , 2%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₀H₇₆N₁₆O₁₇: 587.2860, gef. 587.2870 [M+H]²⁺.

cRGD₄-Bn₄DOTA

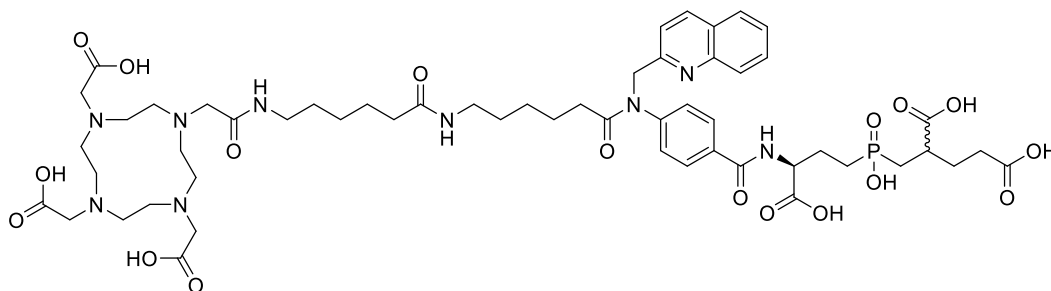


Für eine Stammlösung wurde TBTA (8.4 mg, 16 μmol), CuI (2.5 mg, 13 μmol) und NaAsc (9.5 mg, 48 μmol) in *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1, 5.0 mL) gelöst, entgast und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zeitgleich wurde das Alkin **47** (4.6 mg, 6.6 mmol, 4.4 Äq.) und das Azid **Bn₄DOTAZA** (1.6 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.) in *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1, 0.40 mL) gelöst und mit der Stammlösung (0.10 mL) versetzt. Die Lösung wurde 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion im Mikrowellenreaktor 72 h bei 50 °C, 48 h bei 70 °C und 12 h bei 100 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel gereinigt (C8, H₂O/CH₃CN, 22:78→5:95). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.0 mg, 0.26 μmol , 17%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $C_{180}H_{244}N_{52}O_{44}$: 640.9825, gef. 640.9822 $[M+H]^{6+}$.

6.4.6 PSMA-Targeting - Synthese

DOTA-FR388

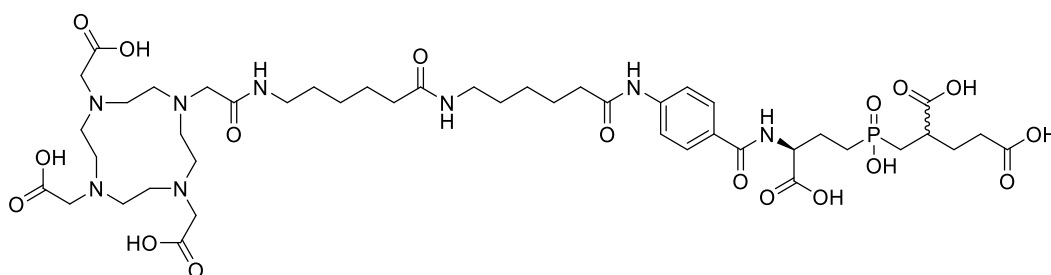


Das freie Amin (3.3 mg, 4.8 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.20 mL) gelöst, mit Et_3N (14 μL , 0.10 mmol, 21 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **58** (2.1 mg, 2.7 μmol , 1.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt direkt umgesetzt.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{67}\text{H}_{102}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}$: 451.5766, gef.: 451.5713 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

Das Rohprodukt wurde in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1 mL, 1:1) gelöst und 16 h bei 0 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand mittels HPLC (EC Nucleodur C18 HTec, 250/10, H_2O in CH_3CN + 0.1% HCO_2H , 98% auf 5% in 25 min, 5 mL/min, λ = 210 nm) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.0 mg, 0.84 μmol , 18%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{78}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}$: 395.5140, gef.: 395.5088 $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$.

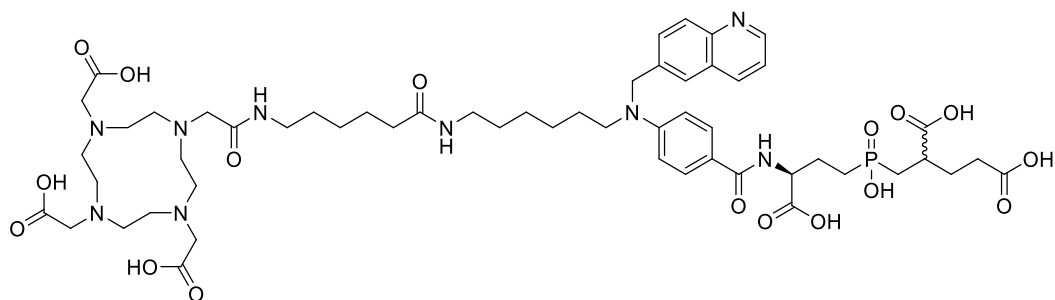
DOTA-Fol-GPI

Das freie Amin (3.3 mg, 4.8 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.20 mL) gelöst, mit Et_3N (14 μL , 0.10 mmol, 21 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **58** (2.1 mg, 2.7 μmol , 1.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt direkt umgesetzt.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{67}\text{H}_{102}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}$: 451.5766, gef.: 451.5713 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$

Das Rohprodukt wurde in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1 mL, 1:1) gelöst und 16 h bei 0 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand mittels HPLC (EC Nucleodur C18 HTec, 250/10, H_2O in CH_3CN + 0.1% HCO_2H , 98% auf 5% in 25 min, 5 mL/min, λ = 210 nm) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (0.9 mg, 0.86 μmol , 18%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{71}\text{N}_8\text{O}_{18}\text{P}$: 522.2385, gef.: 522.2306 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

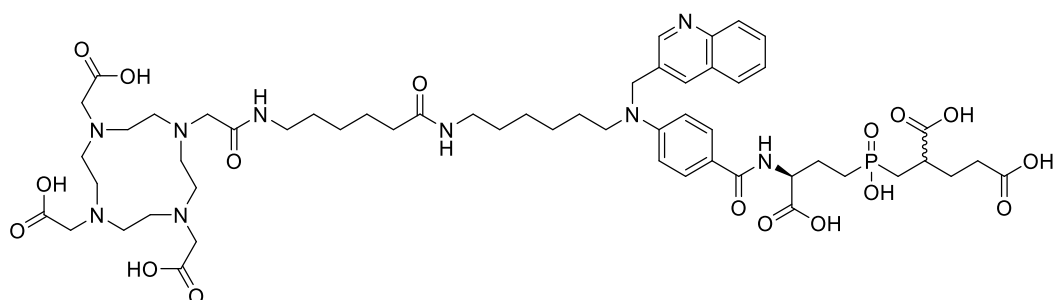
DOTA-FR371D

Das freie Amin **FR371D** (2.9 mg, 2.1 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.20 mL) gelöst, mit Et_3N (6.1 μL , 44 μmol , 21 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **58** (2.9 mg, 2.3 μmol , 1.1 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt direkt umgesetzt.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{67}\text{H}_{102}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}$: 451.5766, gef.: 451.5661 $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$.

Das Rohprodukt wurde in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1 mL, 1:1) gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand mittels HPLC (EC Nucleodur C18 HTec, 250/10, H_2O in CH_3CN + 0.1% HCO_2H , 98% auf 5% in 15 min, 5 mL/min, $\lambda = 210$ nm) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (0.7 mg, 1.0 μmol , 48%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{78}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}$: 395.5140, gef.: 395.5037 $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$.

DOTA-NP188 MH174

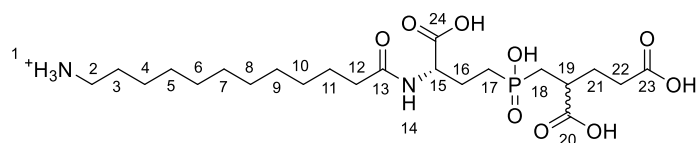
Das freie Amin **NP188** (1.3 mg, 1.9 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.15 mL) gelöst, mit Et_3N (5.6 μL , 40 μmol , 21 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **58** (1.7 mg, 2.1 μmol , 1.1 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt **MH173** direkt umgesetzt.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{67}\text{H}_{104}\text{N}_9\text{O}_{17}\text{P}$: 446.9169, gef.: 446.9304 $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$.

Das Rohprodukt wurde in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1 mL, 1:1) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand mittels HPLC (EC Nucleodur C18 HTec, 250/10, H_2O in CH_3CN + 0.1% HCO_2H , 98% auf 5% in 15 min, 5 mL/min, $\lambda = 240$ nm) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.6 mg, 1.4 μmol , 72%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{80}\text{N}_9\text{O}_{17}\text{P}$: 390.8543, gef.: 390.8557 $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$.

Ads-GPI 65



Das freie Amin **GPI** (33 mg, 107 μmol , 1.10 Äq.) wurde mit dem Aktivester **64** (40 mg, 97.0 μmol , 1.00 Äq.) in DMSO (5 mL) und Et_3N (533 μL , 3.85 mmol, 12 Äq.) gelöst und 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet. Das Zwischenprodukt wurde Massenspektrometrisch validiert und ohne weitere Reinigung verarbeitet.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$: 509.2623, gef.: 509.2655 $[\text{M}-\text{H}]^+$.

Der Rückstand wurde in TFA/TIPS/ H_2O (95:2.5:2.5, 3 mL) gelöst und für 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt (C-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1 $\rightarrow$ 1:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (36.7 mg, 72.2 μmol , 74%) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ = 4.35 (dd, ^3J = 8.6, 4.9 Hz, 1H, H-15), 2.98 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H, H-2), 2.75 – 2.70 (m, 1H, H-19), 2.49 - 2.27 (m, 4H, H-12, H-22), 2.09-1.91 (m, 5H, H-16, H-18a, H-21), 1.76 – 1.70 (m, 1H, H-18b), 1.67 – 1.59 (m, 6H, H-3, H-11, H-17), 1.38 – 1.28 (m, 14H, H4 - 10).

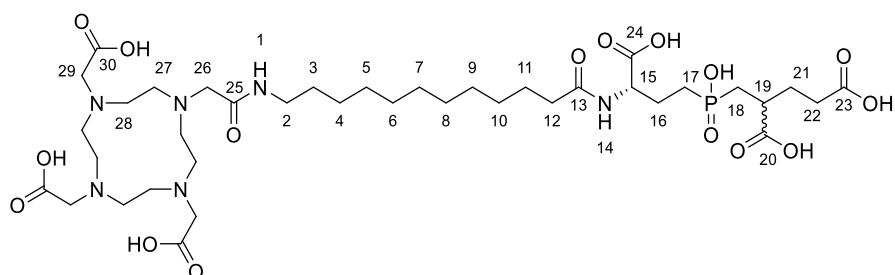
^{13}C NMR (150 MHz, D_2O): δ = 178.93 (C-20), 177.44 (C-23, HMBC), 177.32 (C-13, HMBC), 175.53 (C-24, HMBC), 53.68 (C-15), 53.49 (C-15'), 39.47 (C-2), 39.16 (C-19), 35.42 (C-12), 31.35 (d, $^1J_{\text{CP}}$ = 90 Hz, C-18), 31.25 (C-22), 28.47, 28.41, 28.39, 28.33, 28.29, 28.11, 28.07, (C-4 - 10, C-21), 26.14 (d, $^1J_{\text{CP}}$ = 90 Hz, C-17), 25.51 (C-11), 25.23 (C-3), 24.00 (C-16).

^{31}P NMR (242 MHz, D_2O): δ = 43.0.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}$ 255.1377, gef.: 255.1377 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2980.45, 2925.48, 2854.13, 1716.34, 1684.52, 1646.91, 1558.20, 1540.85, 1523.49, 1455.99, 1396.21, 1233.25, 1167.69, 1099.23, 1013.41, 956.52.

DOTA-Ads-GPI



Das freie Amin **65** (6.6 mg, 13 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in DMSO (1.0 mL) gelöst, mit Et₃N (0.10 mL, 5.0 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **30** (10 mg, 13 μ mol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Lösung für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt (C-18, H₂O/CH₃CN, 9:1→1:9). Das Produkt wurde als gelblicher Feststoff (11 mg, 9.4 μ mol, 69%) erhalten und direkt umgesetzt.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₉H₈₅N₆O₁₆P: 583.2953, gef.: 583.2974 [M+H]²⁺.

Der Benzylester (11 mg, 9.4 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in LiOH aq. (100 μ L, 0.5 M, 5.0 Äq.) gelöst und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt (C-18, H₂O/CH₃CN, 98:2→1:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (6.5 mg, 7.3 μ mol, 81%) erhalten.

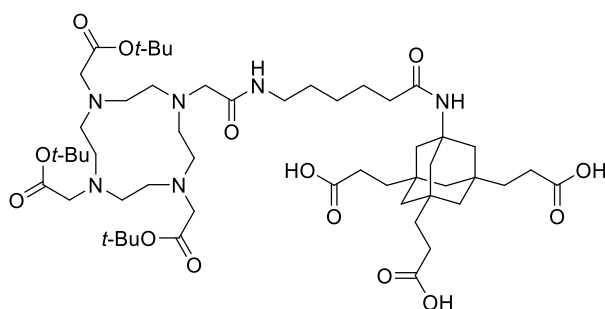
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ = 4.36 (dd, ³ J = 8.6, 4.9 Hz, 1H, H-15), 3.85 - 3.17 (m, 24H, H-26 – 29), 2.81 – 2.68 (m, 1H, H-19), 2.47 (t, ³ J = 7.6 Hz, 2H, C-22), 2.29 (t, ³ J = 7.2 Hz, 2H, H-12), 2.18-1.41 (m, 24H, H-2 – H-11, H-16 – H-21).

¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ = 179.2 (C-23, HMBC), 179.1 (C-30) 177.6 (C-25, HMBC), 177.4 (C-13, HMBC), 176.0 (C-24, HMBC), 55.8, 54.4, 53.7, 50.4, 48.3, 39.8 (C-15, C26 – 29, HSQC), 39.5 (C2), 39.2 (C-19), 35.4 (C-12), 31.3 (C-22), 30.8, 28.5, 28.4, 28.3 (C-21, HMBC), 28.1, 28.1, 26.6 (C-3), 25.5, 25.2, 24.0 (C-18, HSQC).

³¹P NMR (242 MHz, D₂O): δ = 42.51, 42.49.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₃₈H₆₇N₆O₁₆P: 448.2249, gef.: 448.2179 [M+H]²⁺.

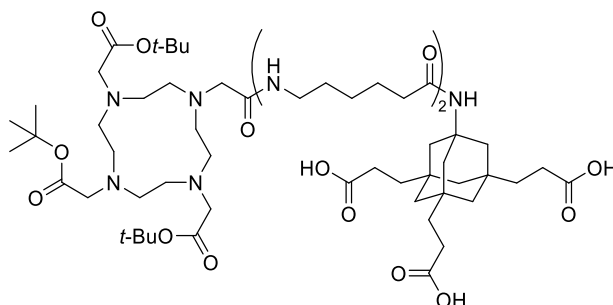
IR: $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹) = 3384.46, 2979.48, 2921.63, 2358.52, 2335.37, 2157.95, 1992.11, 1614.13, 1047.16, 777.17.

***t*-Bu₃DOTA-Ahx-Ad 71**

Das freie Amin **69** (16.2 mg, 33.7 μmol , 1.10 Äq.) wurde in DMF (5.00 mL) gelöst, mit Et₃N (21.0 μL , 152 μmol , 4.80 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **70** (21.0 mg, 31.4 μmol , 1.00 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 3 h gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 8:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (9.6 mg, 9.3 μmol , 28%) erhalten.

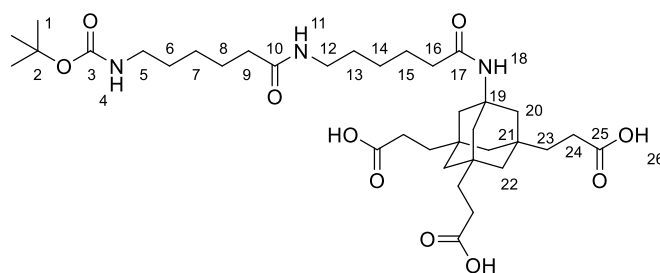
HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₃H₉₀N₆O₁₄: 537.3030, gef.: 537.3030 [M+H+K]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2929.34, 2852.20, 2359.48, 2339.23, 2003.68, 1712.48, 1666.20, 1452.14, 1368.25, 1228.43, 1108.87, 509.12.

***t*-Bu₃DOTA-Ahx₂-Ad 73**

Das freie Amin **69** (21.3 mg, 35.5 μmol , 1.30 Äq.) wurde in DMF (5.00 mL) gelöst, mit Et₃N (21.0 μL , 151 μmol , 4.80 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **58** (17.3 mg, 25.8 μmol , 1.00 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 3 h gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 8:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (10.6 mg, 9.3 μmol , 36%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₉H₁₀₁N₇O₁₅: 574.8751, gef.: 574.8739 [M+H+K]²⁺.

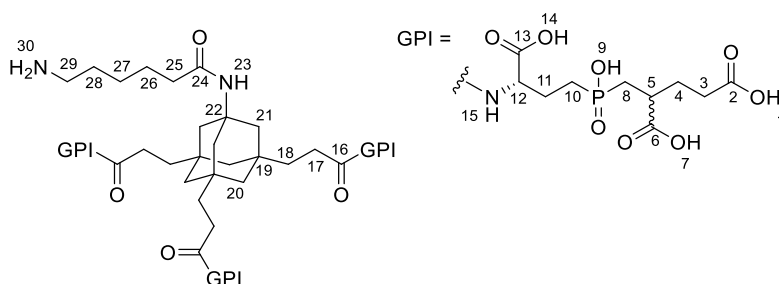
Boc-Ahx₂-Ad 72

Das freie Amin **69** (18.7 mg, 38.9 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DMSO (500 μL) gelöst, mit Et₃N (53.8 μL , 389 μmol , 10.0 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **28** (15.3 mg, 46.7 μmol , 1.20 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, H₂O/CH₃CN, 80:20→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelbes Öl (17.0 mg, 24.5 μmol , 63%) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.98 (s_{br}, 2H, H-26), 7.71 (t, ³*J* = 5.6 Hz, 1H, H-4), 7.28 (s, 1H, H-18), 6.74 (t, ³*J* = 5.7 Hz, 1H, H-11), 2.99 (q, ³*J* = 6.6 Hz, 2H, H-12), 2.87 (q, ³*J* = 6.7 Hz, 2H, H-5), 2.13 (t, ³*J* = 8.2 Hz, 6H, H-24), 1.99 (dt, ³*J* = 17.0, 7.4 Hz, 4H, H-9, H-16), 1.50 – 0.98 (m, 39H, H-1, H-6 – H-8, H13 – 15, H-20, H-22, H-23).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 175.0 (C-25), 171.7 (C-10), 171.6 (C-17), 155.52 (C-2), 77.24 (C-2), 52.53 (C-19), 44.63 (C-20), 44.41 (C-22), 38.28 (C-5), 37.50 (C-12), 36.06 (C-16), 35.38 (C-9), 34.21 (C-23), 29.26 (C-24), 28.96 (C-21), 28.25 (C-1), 27.92 (C-6, C-13), 26.0 (C-7, C-14), 25.1 (C-8, C-15).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₃₆H₅₉N₃O₁₀: 694.4273, gef.: 694.4272 [M+H]⁺.

Ahx-GPI₃ 68

Das freie Amin **GPI** (29.0 mg, 93.2 μmol , 7.70 Äq.) wurde 1 h evakuiert, unter N_2 -Atmosphäre in DMSO (400 μL) gelöst und mit Et_3N (100 μL , 726 μmol , 60 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Gleichzeitig wurde der Aktivester **58** (11.0 mg, 12.1 μmol , 1.00 Äq.) für 1 h evakuiert und unter N_2 -Atmosphäre in DMSO (500 μL) gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 99:1 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als hygroskopischer, farbloser Feststoff (12.9 mg, 8.63 μmol , 71%) erhalten, welcher direkt weiter umgesetzt wurde.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{63}\text{H}_{94}\text{N}_5\text{O}_{30}$: 747.7671, gef.: 747.7585 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

Das Carbamat **75** (13 mg, 8.6 μmol , 1.0 Äq.) wurde in H_2O (2 mL) gelöst, mit Pd/C versetzt (1.3 mg, 10% m/m) und unter H_2 -Atmosphäre bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung filtriert, das Filtrat gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel gereinigt. (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 98:2 $\rightarrow$ 1:1). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (12 mg, 8.6 μmol , >99%) erhalten.

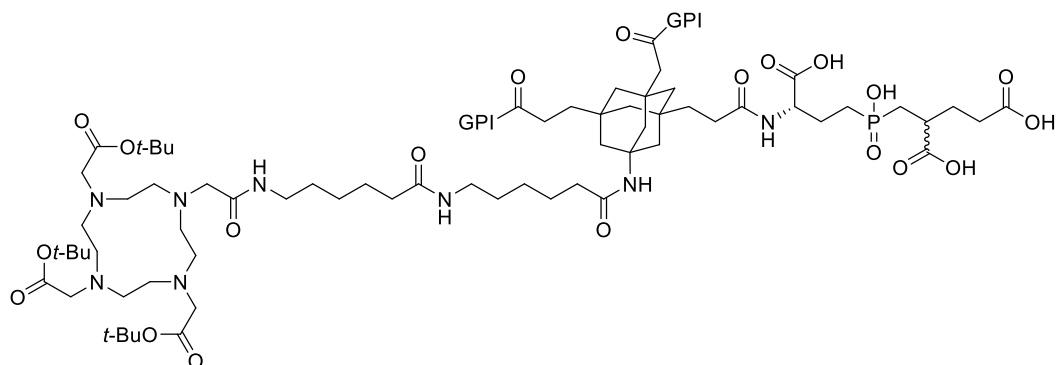
^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 8.43 – 7.17 (m, 9H, NH, CO_2H), 4.21 – 4.13 (m, 3H, H-12), 2.80 – 2.71 (m, 2H, H-29), 2.55 – 2.46 (m, 3H, H-5), 2.30 – 2.19 (m, 6H, H-3), 2.16 – 1.97 (m, 8H, H-11, H-25), 1.91 – 1.21 (m, 42H, H-4, H-8, H-10, H-17, H-18, H-21, H-26 – H-28), 1.10 – 0.94 (m, 6H, H-20).

^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 175.7 (C-6), 174.1 (C-2), 173.4 (C-13), 172.9 (C-16), 171.6 (C-24), 52.8 (C-21), 52.6 (C-12), 44.8 (br, C-20), 38.7 (C-29), 38.3 (C-5), 38.1 (C-19), 35.8 (C-25), 34.6 (C-22), 31.4 (C-3), 31.0 (C-8), 30.5 (C-17), 29.3 (C-11), 28.3 (C-4), 26.7 (C-10), 26.06 (C-17), 25.3 (C-28), 24.8 (C-26), 24.4 (C-27).

^{31}P NMR (242 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 46.3.

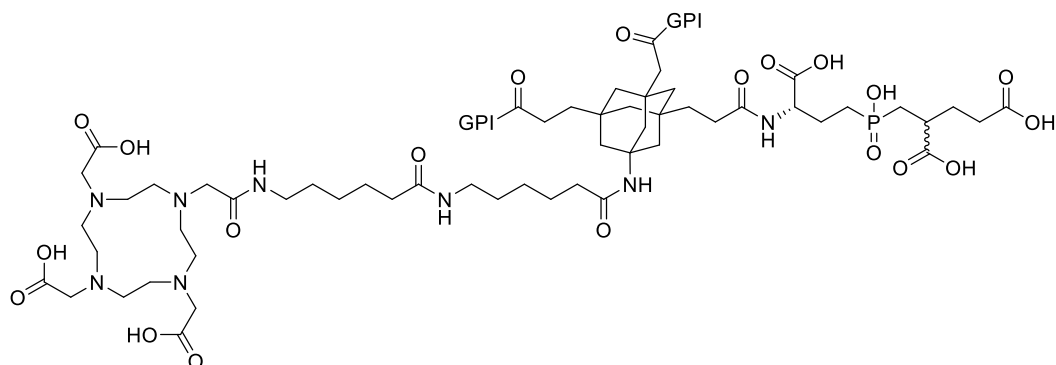
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{28}\text{P}_3$: 680.7487, gef.: 680.7440 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2915.84, 2852.20, 2358.52, 2331.52, 1711.51, 1641.13, 1546.63, 1450.21, 1407.78, 1351.86, 1218.79, 1167.69, 1114.65, 1009.55, 946.88, 780.06, 539.97.

***t*-Bu₃DOTA-Ahx₂-GPI₃**

Das freie Amin **68** (4.0 mg, 2.9 μmol , 1.2 Äq.) wurde in DMSO (0.20 μL) gelöst, mit Et₃N (12 μL , 87 μmol , 30 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **58** (2.0 mg, 2.5 μmol , 1.0 Äq.) zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, H₂O/CH₃CN, 8:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (3.0 mg, 1.5 μmol , 60%) erhalten.

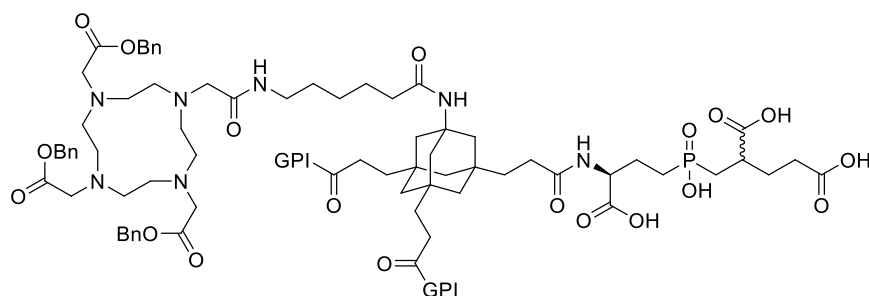
HRMS (ESI): m/z ber. für C₈₉H₁₄₉N₁₀O₃₆P₃: 676.6523, gef.: 676.6522 [M+H]³⁺.

DOTA-Ahx₂-GPI₃

Der *tert*-Butylester ***t*-Bu₃DOTA-Ahx₂-GPI₃** (1.5 mg; 0.74 μmol , 1.0 Äq.) wurde in CH₂Cl₂/TFA (0:50 mL, 1:1) gelöst und 16 h bei 0 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, H₂O/CH₃CN, 98:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.0 mg, 0.54 μmol , 73%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₇₇H₁₂₅N₁₀O₃₆P₃: 620.5787, gef.: 620:5896 [M+H]³⁺.

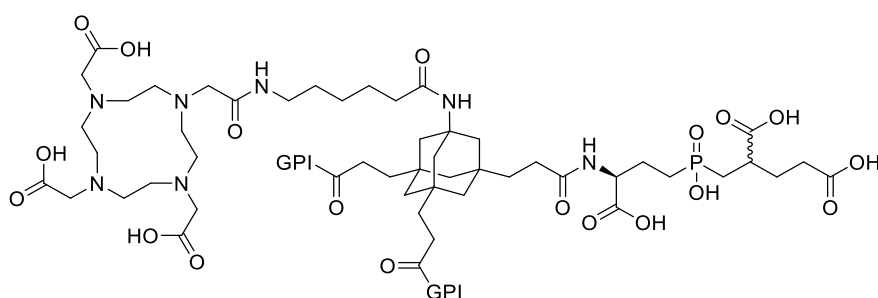
IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2933.20, 2917.77 1715.37, 1644.98, 1541.81, 1452.14, 1411.64, 1351.86, 1219.76, 12022.40, 1176.36, 1120.44, 1018.23, 827.31, 796.46.

Bn₃DOTA-Ahx-GPI₃

Das freie Amin **68** (4.6 mg, 3.4 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.30 mL) gelöst, mit Et₃N (14 μL , 30 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **30** zugegeben und die Reaktionslösung für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand mittels HPLC (EC Nucleodur C18 HTec, 250/10, H₂O in CH₃CN + 0.1% HCO₂H, 80% auf 5% in 25 min, 5 mL/min, λ = 210 nm) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (5.7 mg, 2.8 μmol , 83%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₉₂H₁₃₂N₉O₃₅P₃: 1009.4108, gef.: 1009.4118 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2933.20, 2366.23, 2358.52, 2343.09, 1957.39, 1725.01, 1711.51, 1656.55, 1641.13, 1548.56, 1452.14, 1391.39, 1352.82, 1213.97, 1163.83, 1086.69, 1026.91, 968.09, 750.17, 700.03.

DOTA-Ahx-GPI₃**Vorschrift**

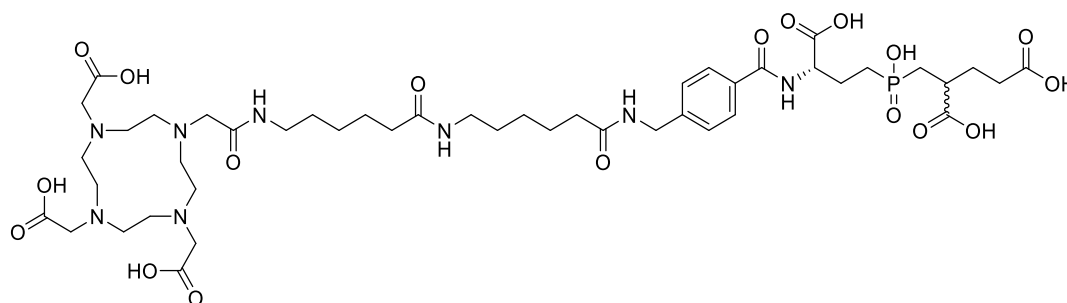
Der Tribenzylester (2.2 mg, 1.1 μmol , 1.0 Äq.) und LiOH (1.0 mg, 44 μmol , 40 Äq.) wurden in H₂O gelöst und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit HCl (1 M) neutralisiert und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Der Rückstand wurde an RP-Kieselgel (H₂O/CH₃CN, 98:2→5:95) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (0.8 mg, 0.46 μmol , 42%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₇₁H₁₁₄N₉O₃₅P₃: 582.8950, gef.: 582.8928 [M+H]³⁺.

Vorschrift 2

Der Tribenzylester (1 mg, 0.5 μmol , 1 Äq.) wurde in H_2O (0.5 mL) gelöst, mit Pd/C (10%, 1 mg) versetzt und unter H_2 -Atmosphäre 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (0.9 mg, 0.5 μmol , >99%).

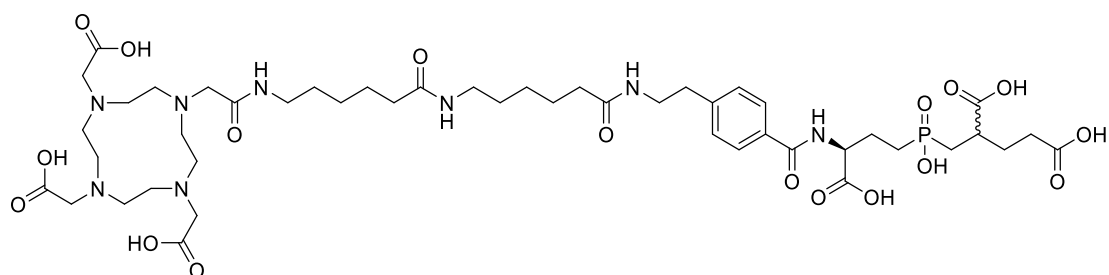
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{71}\text{H}_{114}\text{N}_9\text{O}_{35}\text{P}_3$: 871.8456, gef.: 871.8242 $[\text{M}-\text{H}]^{2-}$.

DOTA-SC79

Das freie Amin **SC79** (11.0 mg, 16.4 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DMSO (1.00 mL) gelöst, mit DIPEA (50.0 μL , 230 μmol , 14.0 Äq.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit dem Aktivester **58** (15.0 mg, 19.2 μmol , 1.17 Äq.) versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1.00 mL, 1:1) aufgenommen und für 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ mit 0.1% HCO_2H , 99:1→1:9) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (13.7 mg, 13.0 μmol , 79%) erhalten.

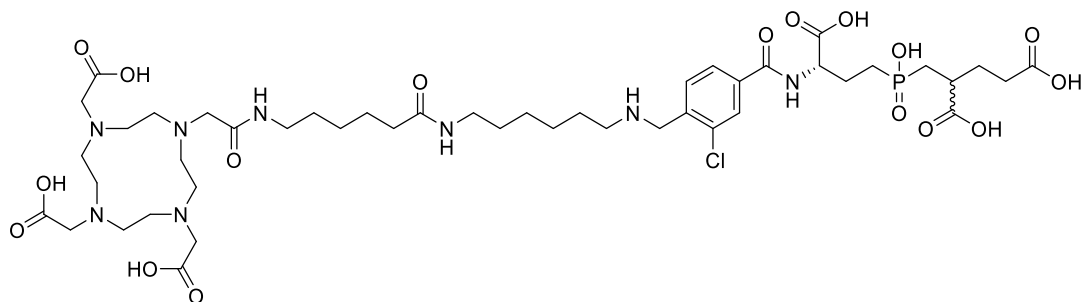
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{73}\text{N}_8\text{O}_{18}\text{P}$: 529.2463, gef.: 529.2187 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2979.48, 2933.20, 2358.52, 2339.23, 2022.96, 1968.96, 1722.12, 1656.55, 1633.41, 1548.56, 1444.42, 1378.85, 1351.86, 1232.29, 1162.87, 1089.58, 1016.30, 970.02, 670.14.

DOTA-SC095

Das freie Amin **SC095** (5.0 mg, 8.7 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMF (1.0 mL) gelöst, mit DIPEA (0.10 mL, 0.14 mmol, 16 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit dem Aktivester **58** (8.0 mg, 10 μmol , 1.2 Äq.) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/ CH_2Cl_2 (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 98:2 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (5.0 mg, 4.6 μmol , 54%) erhalten.

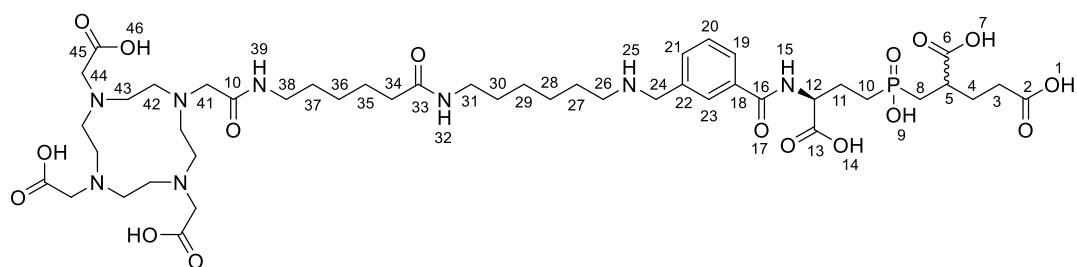
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{N}_8\text{O}_{18}\text{P}$: 536.2541, gef.: 536.5688 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

DOTA-NP304

Das freie Amin **NP304** (5.0 mg, 8.7 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.50 mL) gelöst, mit DIPEA (0.10 mL, 0.14 mmol, 16 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit dem Aktivester **58** (8.0 mg, 10 μmol , 1.2 Äq.) versetzt und für 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/ CH_2Cl_2 (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 98:2 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (4.1 mg, 3.8 μmol , 44%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{75}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}$: 1081.4619, gef.: 1081.4590 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2981.41, 2931.27, 2358.52, 2337.30, 2015.25, 1968.96, 1631.48, 1549.52, 14442.49, 1391.39, 1239.04, 1198.54, 1167.69, 1120.44, 1084.76, 1031.73.

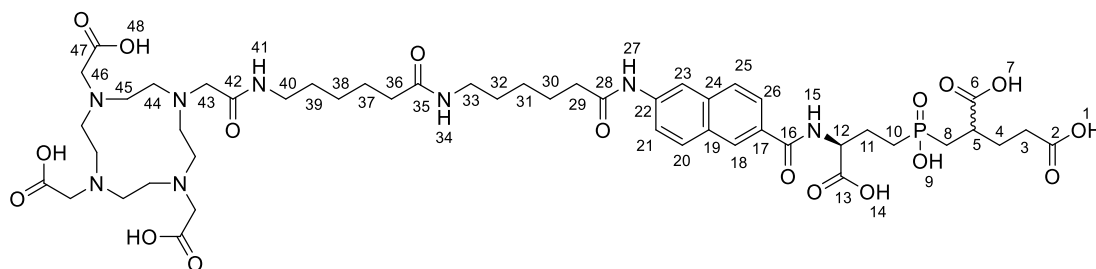
DOTA-NP321

Das freie Amin **NP321** (9.9 mg, 18 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.50 mL) gelöst, mit DIPEA (24 μ L, 0.14 mmol, 7.8 Äq.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung wurde in DMSO (0.10 mL) gelöster Aktivester **58** (17 mg, 22 μ mol, 1.2 Äq.) gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/CH₂Cl₂ (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C8, H₂O/CH₃CN 98:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (5.0 mg, 4.8 μ mol, 27%) erhalten.

³¹P NMR (242 MHz, D₂O): δ = 42.52, 42.47.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₄₆H₇₅N₈O₁₇P: 522.2567, gef.: 522.2547 [M+H]²⁺.

DOTA-SC084



Das freie Amin **SC84** (16 mg, 27 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.50 mL) gelöst, mit DIPEA (50 μL , 0.29 mmol, 11 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit dem Aktivester **58** (24 mg, 30 μmol , 1.1 Äq.) versetzt und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/ CH_2Cl_2 (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und für 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ mit 0.1% HCO_2H , 99:1 $\rightarrow$ 1:9) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (16 mg, 15 μmol , 56%) erhalten.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 10.25 (s, 1H, H-27, H-15), 9.09 (d, ^3J = 7.3 Hz, 1H, H-48), 8.45 (s, 1H, H-18), 8.37 (d, ^3J = 2.1 Hz, 1H, H-26), 7.95 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H, H-20, H-25), 7.84 (d, ^4J = 8.8 Hz, 2H, H-21), 7.66 (d, ^4J = 8.8 Hz, 2H, H-23), 4.47 – 4.45 (m, 1H, H-12), 3.56 – 3.40 (m, 8H, H-43, H-46), 3.25 – 3.15 (m, 2H, H-29), 3.09 – 2.84 (m, 16H, H-44, H-45), 2.66 – 2.57 (m, 1H, H-5), 2.38 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H, H-33), 2.27 – 2.20 (m, 2H, H-3), 2.10 – 2.00 (m, 4H, H-11, H-40), 1.92 – 1.87 (m, 1H, H-8a), 1.83 – 1.78 (m, 2H, H-4), 1.73 – 1.60 (m, 5H, H-8b, H-10, H-36), 1.54 – 1.11 (m, 12H, H-30 – H-32, H-37-39).

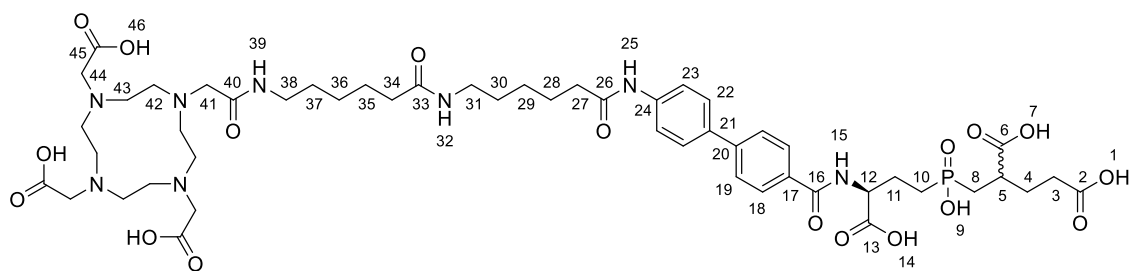
^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 175.7 (C-2), 175.6 (C-47), 174.01 (C-2), 173.4 (C-13), 171.9 (C-42, C-28), 171.8 (C-35), 166.5 (C-16), 138.5 (C-22), 134.9 (C-17), 129.7 (C-24), 129.5 (C-20), 128.6 (C-19), 127.6 (C-18), 127.1 (C-21), 124.8 (C-25), 120.6 (C-21), 114.5 (C-26), 54.5 (s_{br} , C-43, C-46), 53.4 (C-12), 50.03, 38.4 (s_{br} , C-44, C-45), 38.4 (C-5, HSQC), 36.4 (C-29, C-33, HSQC), 35.3 (C-40), 31.3 (C-3), 30.8 (d, ^2J = 89.3, C-8), 29.0 (C-32), 28.6 (C-39), 28.3 (C-4), 26.7 (C-10), 26.1 (C-31, C-38), 25.0 (C-30, C-37), 24.9 (C-36), 23.7 (C-11).

^{31}P NMR (242 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 43.58.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_8\text{O}_{18}\text{P}$: 547.2463, gef.: 547.2477 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2975.62, 2925.48, 2358.52, 2335.37, 2157.95, 1706.69, 1641.13, 1548.56, 1390.42, 1216.86, 1170.58, 1085.73, 819.60.

DOTA-SC125

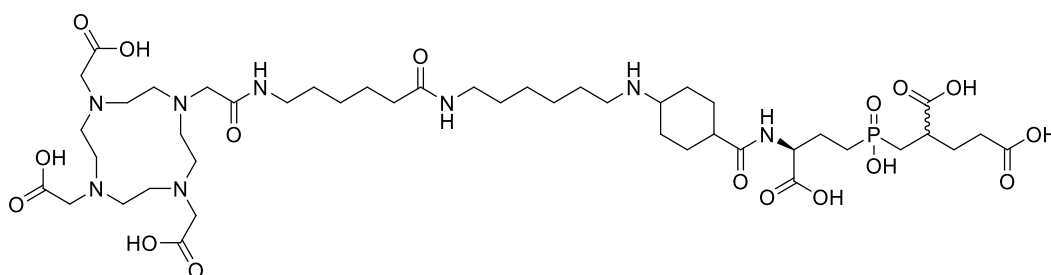


Das freie Amin **SC125** (10 mg, 13 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.50 mL) gelöst, mit DIPEA (22 μ L, 0.13 mmol, 9.9 Äq.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung wurde in DMSO (0.10 mL) gelöster Aktivester **58** (9.8 mg, 16 μ mol, 1.2 Äq.) gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/CH₂Cl₂ (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C18, H₂O/CH₃CN 98:2→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (13 mg, 11 μ mol, 85%) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.03 (s, 2H, H-15, H-17), 9.25 (s, 3H, H-46, O-*H*, N-*H*), 8.10 (s, 2H, H-39, N-*H*), 8.02 – 7.63 (m, 6H, H-18, H-19, H-22, H-23), 4.48 – 4.39 (m, 1H, H-12), 3.63 – 2.71 (m, 46H, H-41 – 44, H₂O), 2.34 – 1.13 (m, 30H, H-3, H-4, H-8, H-10, H-11, H-27 – 31, H-34 – 38).

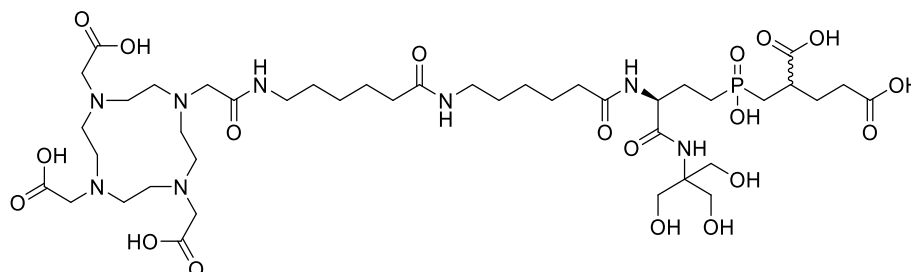
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.6 (C-26), 172.1 (C-40, HMBC), 142.9 (C-17, HMBC), 133.3, (C-21, HMBC), 132.9 (C-20, HMBC), 128.2 (C-18), 127.1 (C-19), 125.8 (C-22), 119.4 (C-23, HSQC), 53.5 (C-12, HSQC), 38.5 (C-42, C-43, HSQC), 38.3 (C-5, HSQC), 36.7 (C-38, HSQC), 36.6 (C-31, HSQC), 35.6 (C-27, HSQC), 31.7 (C-3, HSQC), 30.9 (C-8, HSQC), 29.2 (C-34, HSQC), 29.1 (C-30, C-37, HSQC), 28.4 (C-4, HSQC), 26.4 (C-29, C-36, HSQC), 25.4 (C-10, HSQC), 25.1 (C-28, C-35, HSQC), 23.9 (C-11, HSQC).

HRMS (ESI): *m/z* ber. für C₅₁H₇₅N₈O₁₈P: 560.2541, gef.: 560.2466 [M+H]²⁺.

DOTA-NP337

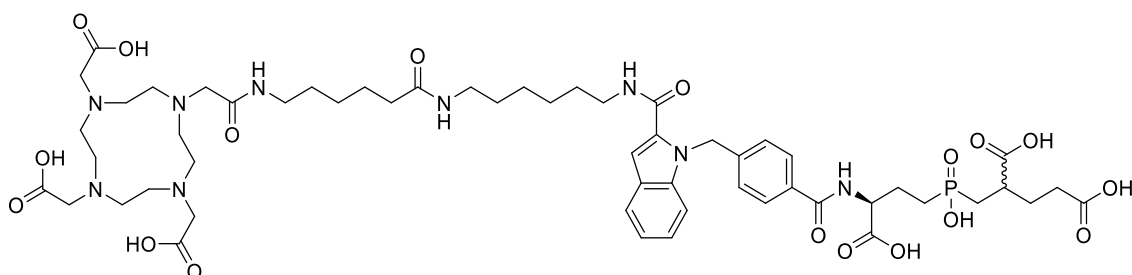
Das freie Amin **NP337** (4.5 mg, 8.4 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.50 mL) gelöst, mit DIPEA (15 μL , 86 μmol , 10 Äq.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung wurde in DMSO (0.10 mL) gelöster Aktivester **58** (7.9 mg, 10 μmol , 1.2 Äq.) gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/ CH_2Cl_2 (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 98:2 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (3.0 mg, 2.9 μmol , 35%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{79}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}$: 518.2723, gef.: 518.2723 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

DOTA-NP340

Das freie Amin Ahx-GPI-TRIS **NP340** (4.0 mg, 7.6 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (1.0 mL) gelöst, mit DIPEA (0.13 mL, 0.76 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Aktivester **58** (12 mg, 15 μmol , 2.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in CH_2Cl_2 /TFA (2 mL, 1:1) aufgenommen und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 98:1 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als hygroskopischer Feststoff (2.5 mg, 2.4 μmol , 32%) erhalten.

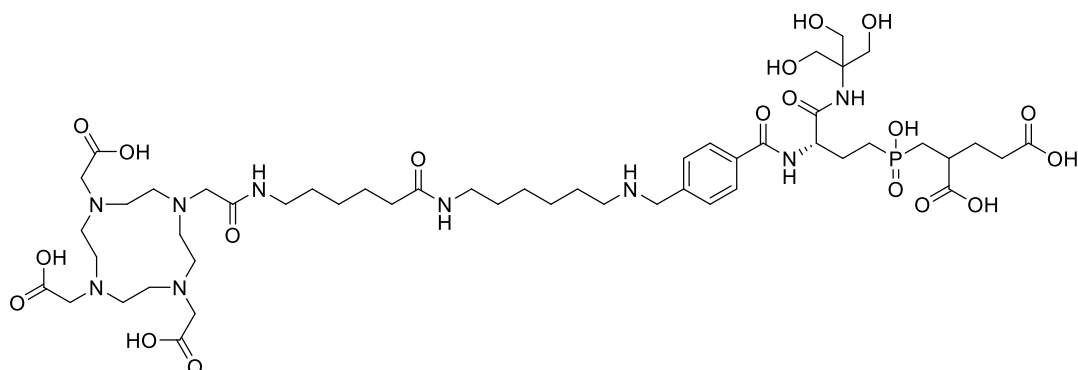
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{75}\text{N}_8\text{O}_{19}\text{P}$: 514.2516, gef.: 514.2531.

DOTA-SC170

Das freie Amin **SC170** (19.9 mg, 29.0 μmol , 1.00 Äq.) wurde in DMF (500 μL) gelöst, mit Et_3N (40.0 μL , 290 μmol , 10.0 Äq.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung wurde in DMF (100 mL) gelöster Aktivester **58** (22.7 mg, 29.0 μmol , 1.00 Äq.) gegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/ CH_2Cl_2 (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt mittels HPLC (Nucleodur RP8, 250×10 mm ID, 5 μm Partikel, 20% CH_3CN in H_2O mit 0.05% HCO_2H , 7 min halten, anschließend 20%→95% in 25 min, 5 mL/min, 310 nm, $t_R = 14.50$ min) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (2.0 mg, 1.7 μmol , 77%) erhalten.

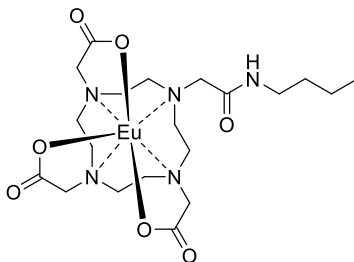
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{55}\text{H}_{80}\text{N}_9\text{O}_{18}\text{P}$: 610.8018, gef.: 610.8014 $[\text{M}+\text{NH}_4]^{2+}$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2979.48, 2358.52, 2157.95, 1706.69, 1664.27, 1463.71, 1394.28, 1213.01, 1166.72, 1078.01, 1020.16, 835.03, 647.00.

DOTA-NP354

Das freie Amin **NP354** (1.8 mg, 2.8 μmol , 1.0 Äq.) wurde in DMSO (0.50 mL) gelöst, mit DIPEA (5 μL , 29 μmol , 10 Äq.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung wurde in DMSO (0.10 mL) gelöster Aktivester **58** (2.6 mg, 3.3 μmol , 1.2 Äq.) gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, der Rückstand in TFA/ CH_2Cl_2 (1.0 mL, 1:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und das Rohprodukt an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 98:2 $\rightarrow$ 0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.0 mg, 0.87 μmol , 31%) erhalten.

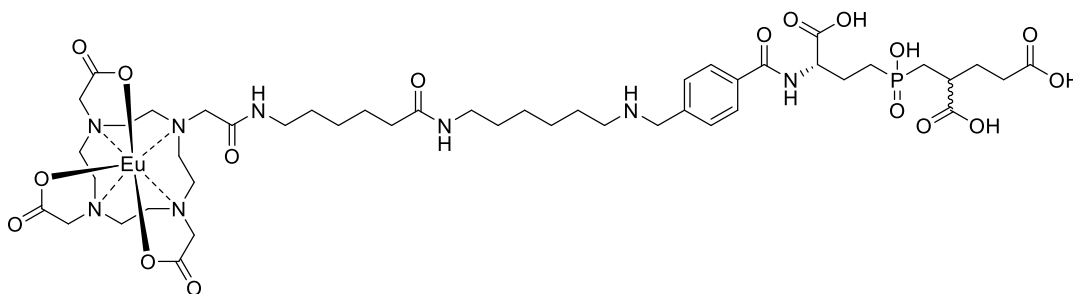
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{N}_9\text{O}_{19}\text{P}$: 382.8613, gef.: 382.8580 $[\text{M}+\text{H}]^{3+}$.

Eu-DOTA-*n*-Bu

Der freie Chelator **DOTA-*n*-Bu** (5.0 mg, 11 μmol , 1.0 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (1.0 mL, pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 (3.1 mg, 12 μmol , 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1 $\rightarrow$ 1:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (6.6 mg, 11 μmol , >99%) erhalten.

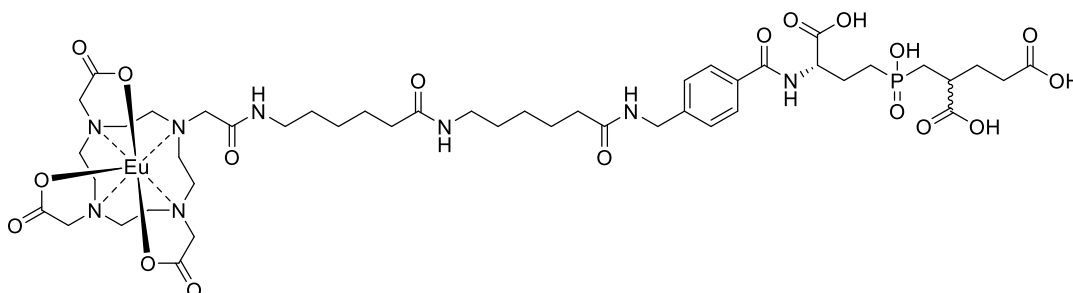
HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{EuN}_5\text{O}_7$: 610.1743, gef.: 610.1326 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}) = 2964.05, 2929.34, 2863.77, 2365.26, 2358.52, 2158.92, 2017.18, 1640.16, 1592.91, 1391.39, 1382.71, 1369.21, 1317.14, 1240.00, 1159.01, 1084.76, 935.31.

Eu-DOTA-NP284

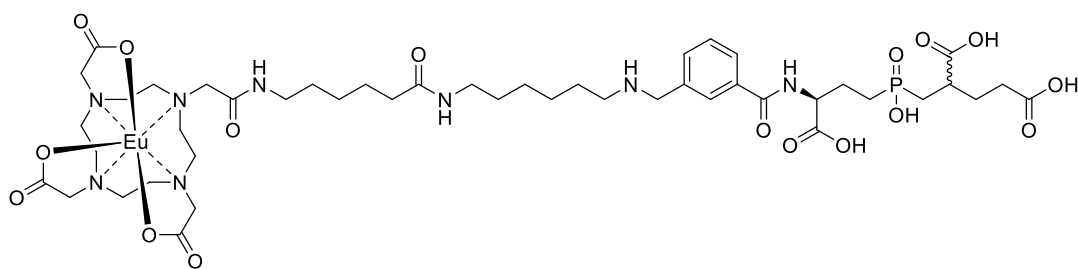
Der freie Chelator **DOTA-NP284** (1.00 mg, 960 nmol, 1.00 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (500 μL , pH 5.5) gelöst, mit einer EuCl_3 -Stammlösung (1.0 μL , 10 mM, 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (650 μg , 550 nmol, 57%) erhalten. Es ist anzumerken, dass die Ausbeute aufgrund der geringen Menge und der Elektrostatik nicht direkt gewogen werden konnte. Die dabei eingesetzten tarierten Gefäße können das Gewicht signifikant beeinflussen.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{EuN}_8\text{O}_{11}\text{P}$: 597.2056, gef 597.2061 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Eu-DOTA-SC079

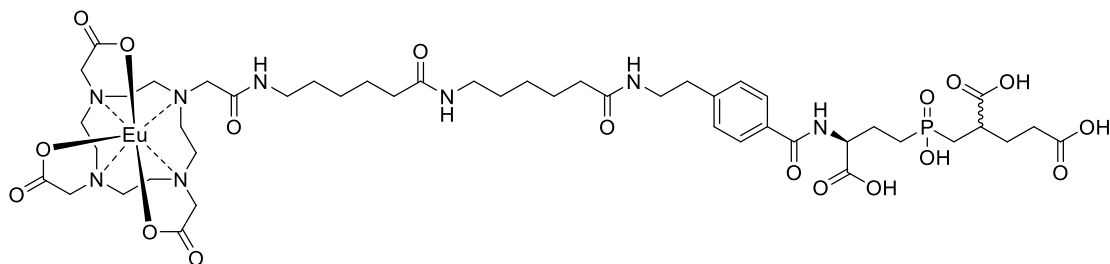
Der freie Chelator **DOTA-SC079** (1.00 mg, 946 nmol, 1.00 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (100 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 -Stammlösung (1.0 μL , 10 mM, 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (583 μg , 401 nmol, 42%) erhalten. Es ist anzumerken, dass die Ausbeute aufgrund der geringen Menge und der Elektrostatik nicht direkt gewogen werden konnte. Die dabei eingesetzten tarierten Gefäße können das Gewicht signifikant beeinflussen.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{EuN}_8\text{O}_{18}\text{P}$: 604.1955, gef.: 604.1933 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

Eu-DOTA-NP321

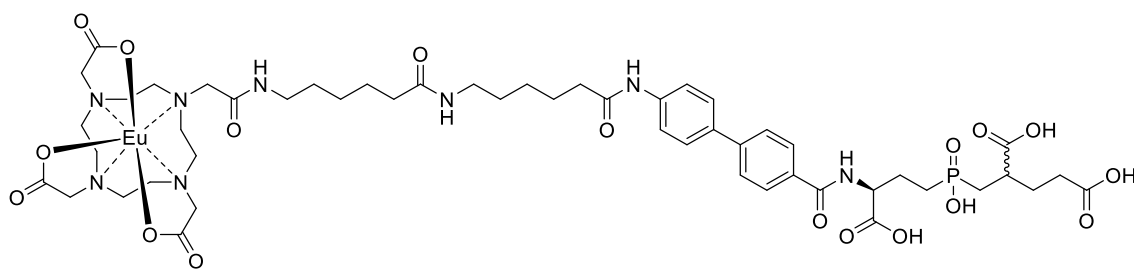
Der freie Chelator **DOTA-NP321** (1.00 mg, 960 nmol, 1.00 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (100 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 -Stammlösung (1.0 μL , 10 mM, 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (285 μg , 239 nmol, 25%) erhalten. Es ist anzumerken, dass die Ausbeute aufgrund der geringen Menge und der Elektrostatik nicht direkt gewogen werden konnte. Die dabei eingesetzten tarierten Gefäße können das Gewicht signifikant beeinflussen.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{46}\text{H}_{72}\text{EuN}_8\text{O}_{17}\text{P}$: 597.2059, gef.: 597.1951 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

Eu-DOTA-SC095

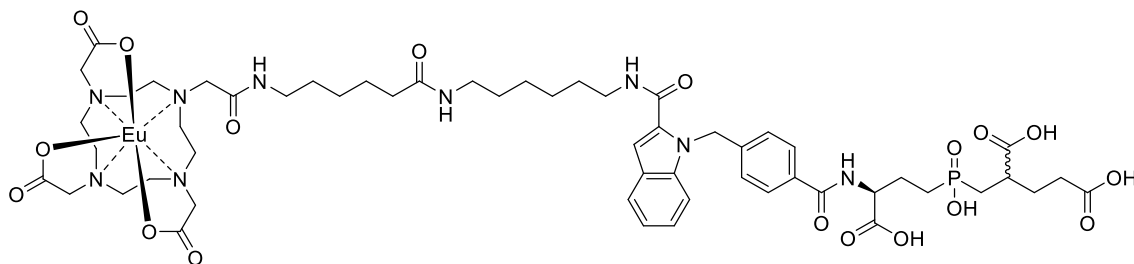
Der freie Chelator **DOTA-SC095** (1.00 mg, 934 nmol, 1.00 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (100 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 -Stammlösung (1.0 μL , 10 mM, 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (432 μg , 354 nmol, 39%) erhalten. Es ist anzumerken, dass die Ausbeute aufgrund der geringen Menge und der Elektrostatik nicht direkt gewogen werden konnte. Die dabei eingesetzten tarierten Gefäße können das Gewicht signifikant beeinflussen.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{45}\text{H}_{70}\text{EuN}_8\text{O}_{18}\text{P}$: 611.2030, gef.: 611.2024 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

Eu-DOTA-SC125

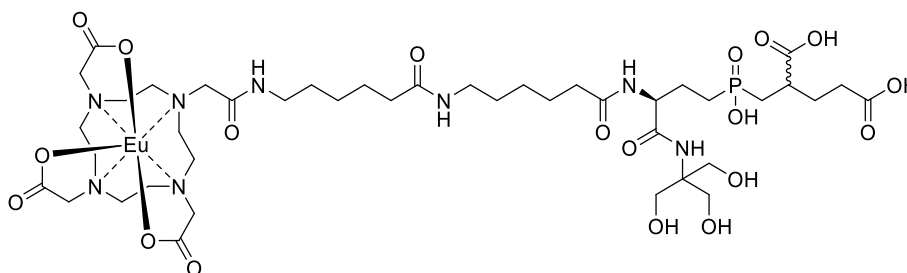
Der freie Chelator **DOTA-SC125** (1.00 mg, 894 nmol, 1.00 Äq.) wurde in NH₄OAc-Puffer (100 µL, pH 5.5) gelöst, mit EuCl₃-Stammlösung (1.0 µL, 10 mM, 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, H₂O/CH₃CN, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (400 µg, 315 nmol, 35%) erhalten. Es ist anzumerken, dass die Ausbeute aufgrund der geringen Menge und der Elektrostatik nicht direkt gewogen werden konnte. Die dabei eingesetzten tarierten Gefäße können das Gewicht signifikant beeinflussen.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₁H₇₂EuN₈O₁₈P: 635.2034, gef.: 635.2012 [M+H]²⁺.

Eu-DOTA-SC170

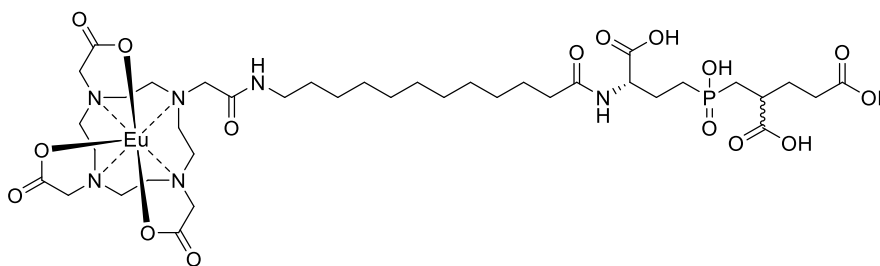
Der freie Chelator **DOTA-SC170** (1.00 mg, 843 nmol, 1.00 Äq.) wurde in NH₄OAc-Puffer (100 µL, pH 5.5) gelöst, mit EuCl₃-Stammlösung (1.0 µL, 10 mM, 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, H₂O/CH₃CN, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (698 µg, 523 nmol, 62%) erhalten. Es ist anzumerken, dass die Ausbeute aufgrund der geringen Menge und der Elektrostatik nicht direkt gewogen werden konnte. Die dabei eingesetzten tarierten Gefäße können das Gewicht signifikant beeinflussen.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₅₅H₇₇EuN₉O₁₈P: 677.2374, gef.: 677.2397 [M+NH₄]²⁺.

Eu-DOTA-NP340

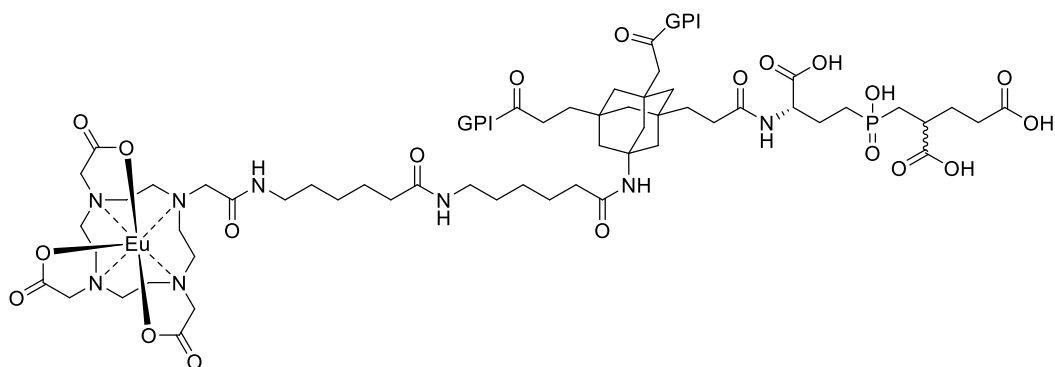
Der freie Chelator **DOTA-SC170** (1.00 mg, 974 nmol, 1.00 Äq.) wurde in NH_4OAc -Puffer (100 μL , pH 5.5) gelöst, mit EuCl_3 -Stammlösung (1.0 μL , 10 mM, 1.1 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser hygroskopischer Feststoff (159 μg , 135 nmol, 14%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{EuN}_8\text{O}_{19}\text{P}$: 589.2007, gef.: 589.1986 $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$.

Eu-DOTA-Ads-GPI

Der freie Chelator **DOTA-Ads-GPI** (2.7 mg, 3.02 μmol , 1.0 Äq.) und EuCl_3 (1.5 mg, 5.8 μmol , 1.9 Äq.) wurden in AcONH_4 -Puffer (1 mL, 1 M, pH = 5.5) gelöst und für 3 h bei 70 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und *via* HPLC (C18, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$, 99:1→0:1, R_t = 14.44 min) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (2.5 mg, 2.4 μmol , 80%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{EuN}_6\text{O}_{16}\text{P}$: 523.1739, gef.: 523.1816 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Eu-DOTA-Ahx₂-GPI₃

Der freie Chelator **DOTA-Ahx₂-GPI₃** (3.0 mg, 1.5 μ mol, 1.0 Äq.) wurde in NH₄OAc-Puffer (1.0 mL, pH 5.5) gelöst, mit EuCl₃-Stammlösung (1 μ L, 15 mM, 1.5 Äq.) versetzt und 3 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C8, H₂O/CH₃CN, 9:1→0:1) gereinigt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (1.5 mg, 0.75 μ mol, 50%) erhalten.

HRMS (ESI): m/z ber. für C₇₇H₁₂₂EuN₁₀O₃₆P₃: 1005.3304, gef.: 1005.2976 [M+H]²⁺.

IR: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹) = 2932.23, 2857.99, 2359.48, 2166.63, 22005.61, 1723.09, 1612.20, 1443.46, 1376.93, 1239.04, 1084.76.

6.4.7 Immobilisierungsreaktionen

TiO₂-Nanopartikel (70.0 mg, $d = 21$ nm) wurden in CH₃OH/H₂O (3:1, 4.00 mL) suspendiert und mit dem der Phosphonsäure **Eu-P₄-DOTA** (Tabelle 6-2, 4.00 Äq., 1 Molekül/nm²) versetzt und 43 h bei 100 °C gerührt. Anschließend wurde die Suspension auf Raumtemperatur gekühlt und zentrifugiert (15 min, 4000 rpm). Der Überstand wurde dekantiert und der Rückstand in CH₃OH/H₂O (3:1, 4.00 mL) resuspendiert. Der Vorgang wurde vier Mal wiederholt und der Rückstand gefriergetrocknet.

Tabelle 6-2 Eingesetzte Mengen für die Immobilisierungsreaktionen.

Probe	Eingesetzte Stoffmenge
MH253_1	0 µmol, Blindprobe
MH253_2	0 µmol, Blindprobe
MH252x_1	24.7 µmol
MH252x_2	22.8 µmol

6.4.8 Testreaktionen zum zwitterionischen Aktivester MH80

Die zwitterionische Carbonsäure **39** (1.0 mg, 3.0 µmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Lösungsmittel (0.5 mL) gelöst und mit einem Aktivierungsreagenz (1.2 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 d bei RT gerührt. Die Reaktion wurde alle 24 h mittels Massenspektrometrie verfolgt. Nach 3 d wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch an RP-Kieselgel (C18) gereinigt. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 6-3 aufgeführt.

Tabelle 6-3 Reagenzien der Testreaktionen.

Reagenz	Einwaage	Lösungsmittel
HBTU	1.4 mg, 3.6 µmol	CH ₃ CN
DDC	0.7 mg, 3.6 µmol	CH ₃ CN
EDC	0.7 mg, 3.6 µmol	CH ₃ CN
EDC	0.7 mg, 3.6 µmol	DMF
EDC	0.7 mg, 3.6 µmol	DMSO
EDC	0.7 mg, 3.6 µmol	CH ₃ OH

6.4.9 Testreaktion zur Cu-Fällung aus Click Reaktionen.

TBTA (3.4 mg, 6.3 μmol , 0.052 Äq.), CuI (1.0 mg, 5.2 μmol , 0.043 Äq.) und NaAsc (3,87 mg, 20 μmol , 0.16 Äq.) wurden in *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1, 0.70 mL) gelöst, entgast und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Azid **38** (38 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.) und das zwitterionische Alkin **ZWI** (33 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.) in *t*-BuOH/H₂O/DMF (2:2:1, 1.3 mL) gelöst, entgast und mit der Stammlösung vereinigt. Die Reaktionslösung wurde bei 50 °C bis zum vollständigem Umsatz gerührt.

Von der Reaktionslösung wurden jeweils ein Aliquot (0.20 mL) entnommen, mit einer Cu-bindenden Reagenz versetzt und mit H₂O *ad* 0.50 mL versetzt. Die Resultierende Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, filtriert und mit K₄[Fe(CN)₆] versetzt. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 6-4 aufgeführt.

Tabelle 6-4 Tabelle verwendeter Reagenzien zur Entfernung von überschüssigem Cu. Erfolgreiches Entfernen von Cu wurde grün gekennzeichnet. Positive Cu-Nachweise durch K₄[Fe(CN)₆] (Rotebrauner Niederschlag) wurde rot gekennzeichnet.

Reagenz	Menge	Cu-Indikation
Purolite®S984	10	
Na ₂ S	5 mg	
EDTA-Lsg. (5 M)	0.21 mL	
EDTA-Lsg. (5 M, pH 1) ^a	0.21 mL	
H ₂ S	gas	

^aEingestellt mit HCl (3 M)

7. Anhang

7.1 Relaxationsstudien

Tabelle 7-1 Verifizierung der Gd-Konzentration verschiedener Stammlösungen für Relaxationsstudien.

Substanz	ICP-MS ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	RSD (%)	Konzentration (mM)	Relaxivität ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Gd-DOTA	0.83532582	0.84	10.3	2.9
Gd-DOT1AZA	0.73519598	0.74	9.35	3.0
Gd-DOT2AZA	0.69807408	0.70	8.88	3.2
Gd-DOT3AZA	0.63340224	0.63	8.06	3.5
Gd-DOTAZA	0.66528548	0.67	8.46	4.1

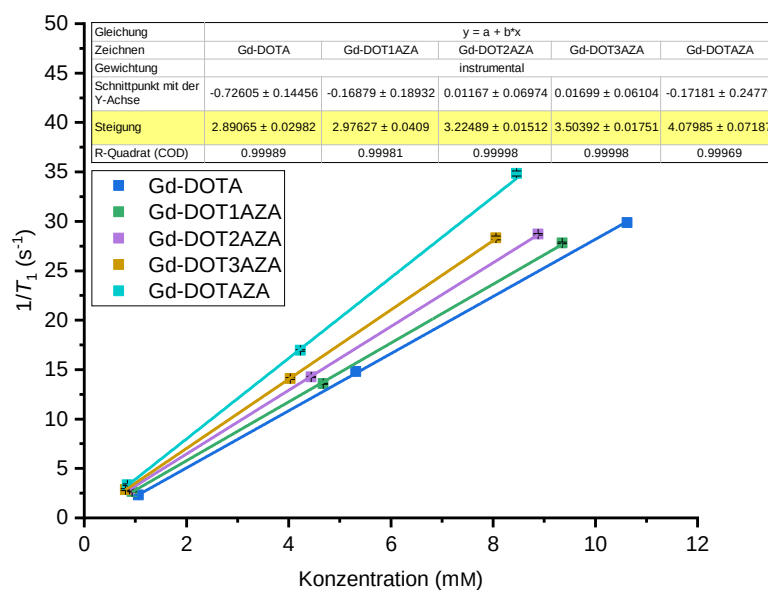


Abbildung 7-1 Linearisierte Auftragung der ermittelten T_1 -Zeit verschiedener Gd-DOTA-Derivate **Gd-DOTA** (blau) **Gd-DOT1AZA** (grün), **Gd-DOT2AZA** (lila), **Gd-DOT3AZA** (braun), **Gd-DOTAZA** (hellblau) gegen die mittels ICP-MS verifizierte Konzentration (mM).

7.2 SPECT-Radioassay

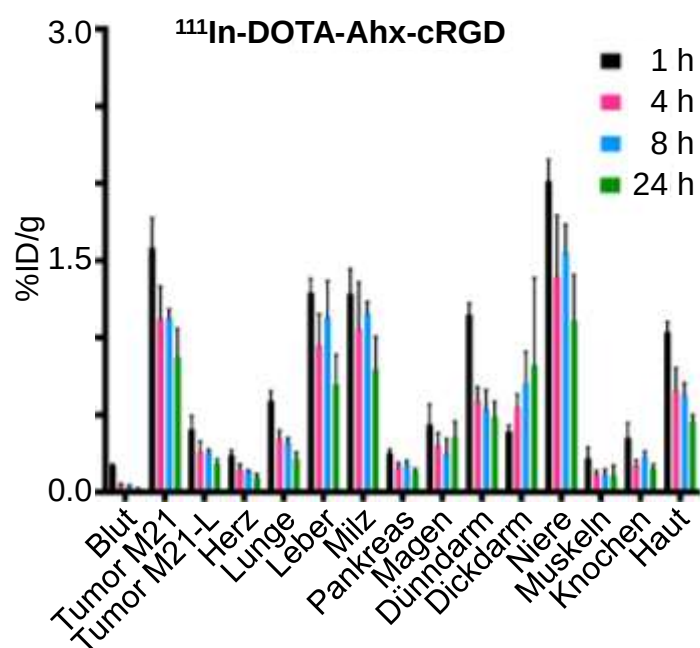


Abbildung 7-2 Biodistribution des cRGD-Derivates ¹¹¹In-DOTA-Ahx-cRGD. Gezeigt ist die Radioaktivität (%ID/g) jedes Gewebes zu vier Messpunkten (1

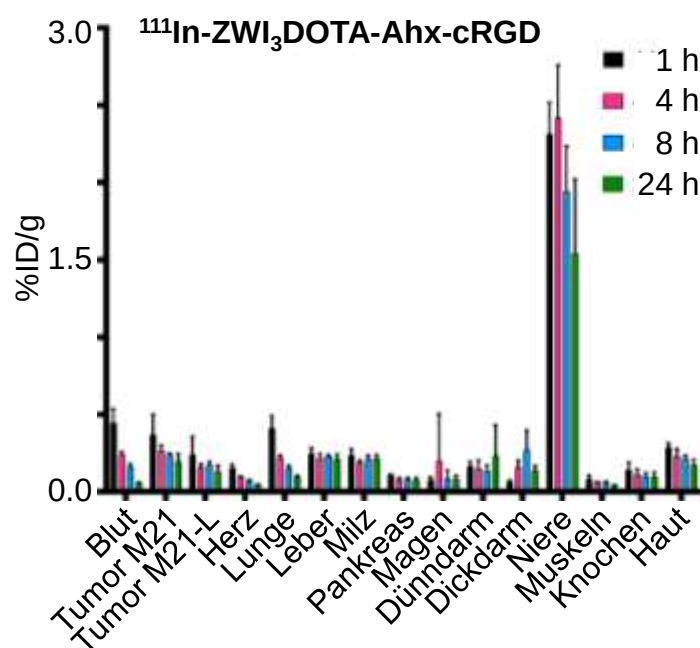


Abbildung 7-3 Biodistribution des cRGD-Derivates ¹¹¹In-ZWl₃-DOTA-Ahx-cRGD. Gezeigt ist die Radioaktivität (%ID/g) jedes Gewebes zu vier Messpunkten (1

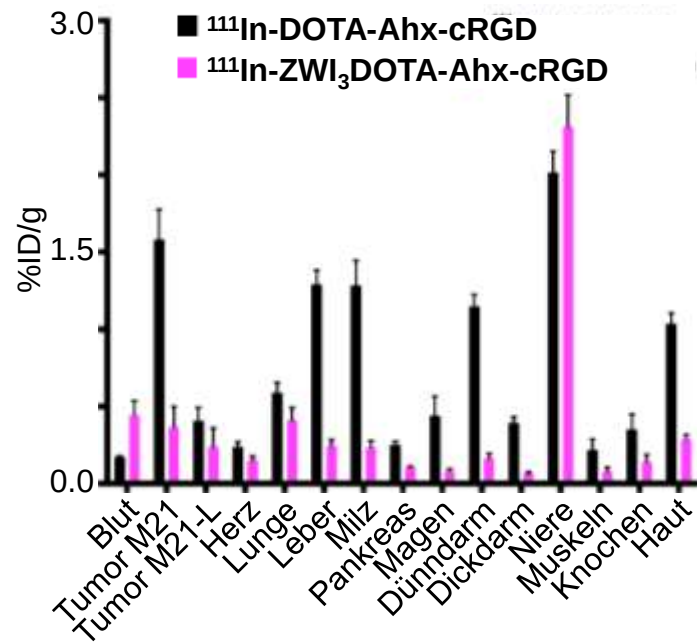


Abbildung 7-4 Direkter Vergleich der Radioaktivität (%ID/g) jedes Gewebes 1 h nach Injektion der cRGD-Derivate ^{111}In -DOTA-Ahx-cRGD (schwarz) und ^{111}In -ZnI₃-DOTA-Ahx-cRGD (Pink).

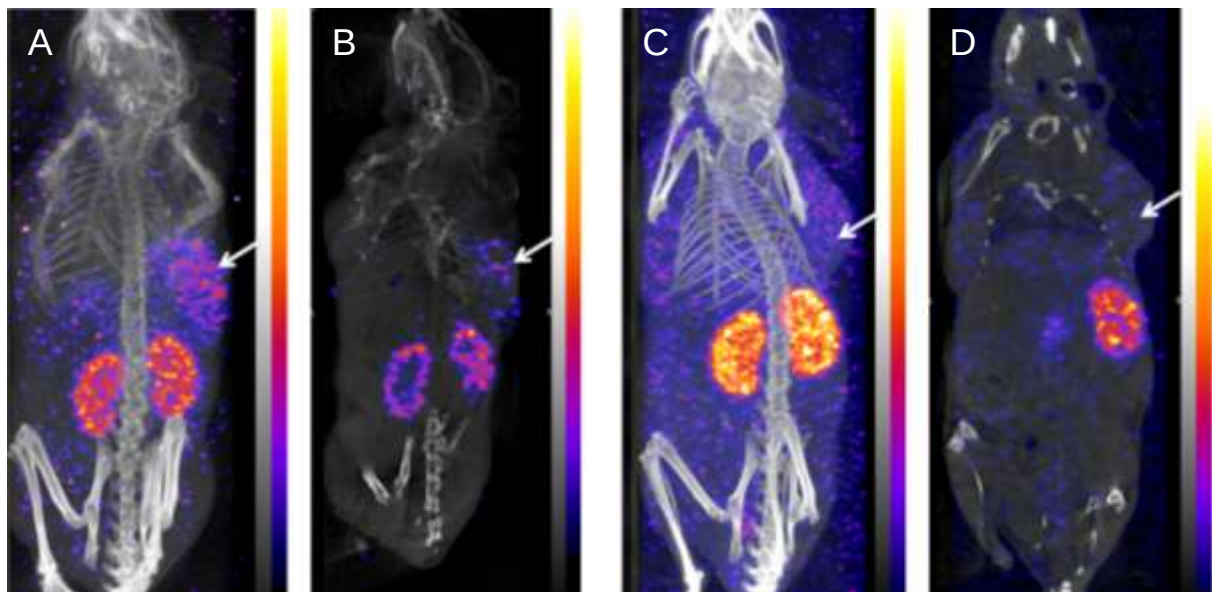


Abbildung 7-5 SPECT-Bilder der Biodistribution 1 h nach Injektion der ^{111}In -gelabelten cRGD-Derivate. $\alpha_v\beta_3(+)$ M21 wurden auf der rechten (Pfeil) und $\alpha_v\beta_3(-)$ M21-L auf der linken Seite inokuliert. Maximalintensitätsprojektion (A) und Koronalschnitt (B) von ^{111}In -DOTA-Ahx-cRGD. Maximalintensitätsprojektion (C) und Koronalschnitt (D) von ^{111}In -ZnI₃-DOTA-Ahx-cRGD.

7.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

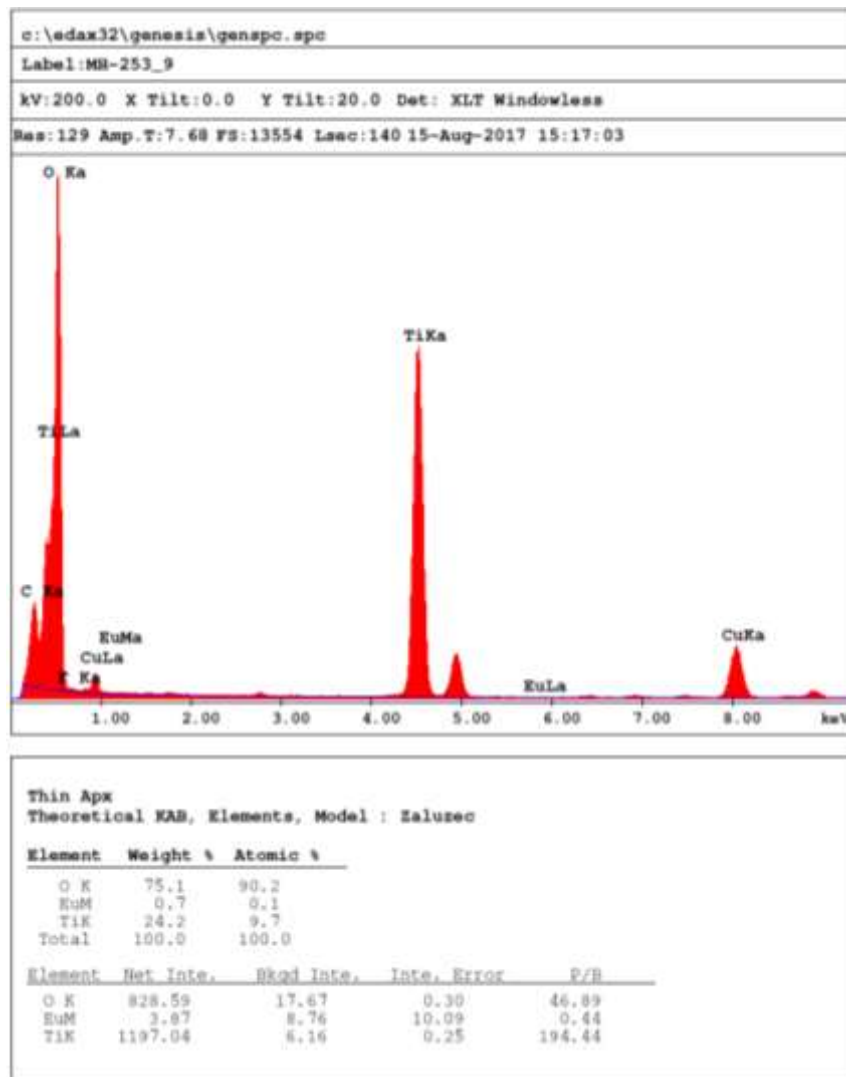


Abbildung 7-6 Energiedispersive Röntgenspektroskopie unbeschichteter Partikel (MH253_2).

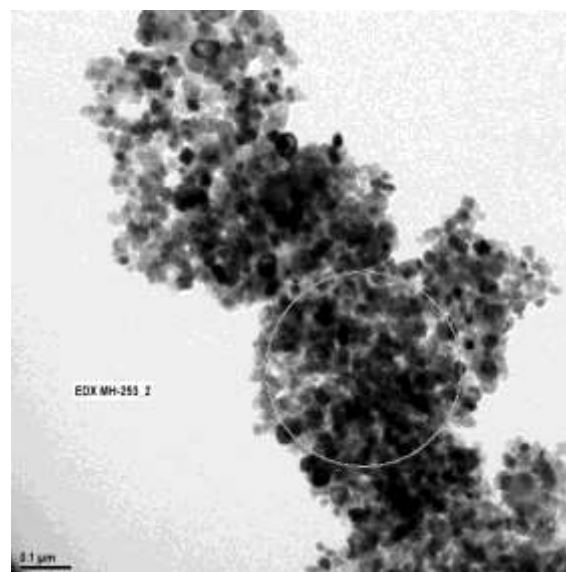


Abbildung 7-7 Energiedispersive Röntgenspektroskopiebilder unbeschichteter Partikel (MH253_2).

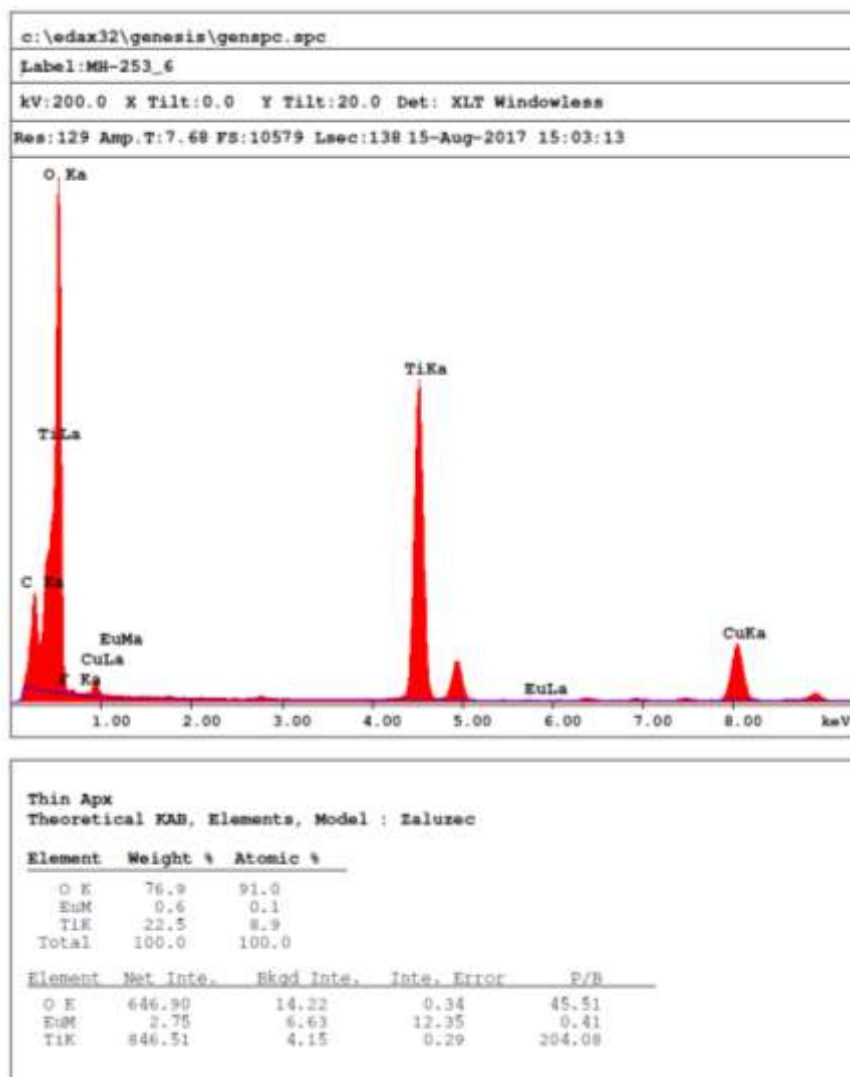


Abbildung 7-8 Energiedispersive Röntgenspektroskopie unbeschichteter Partikel (MH253_1).

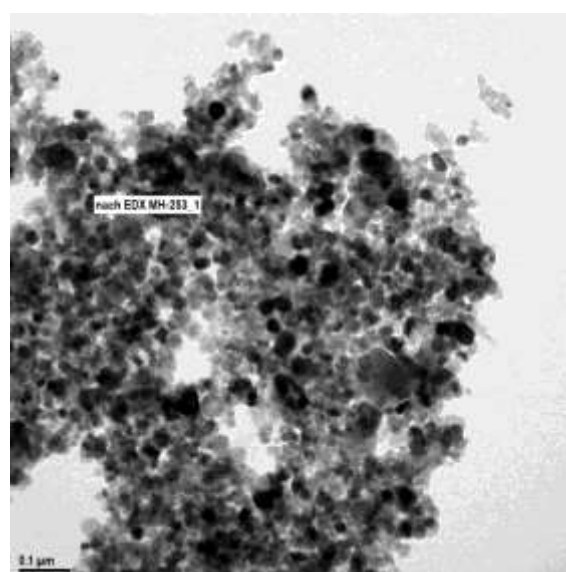


Abbildung 7-9 Energiedispersive Röntgenspektroskopiebilder unbeschichteter Partikel (MH253_1).

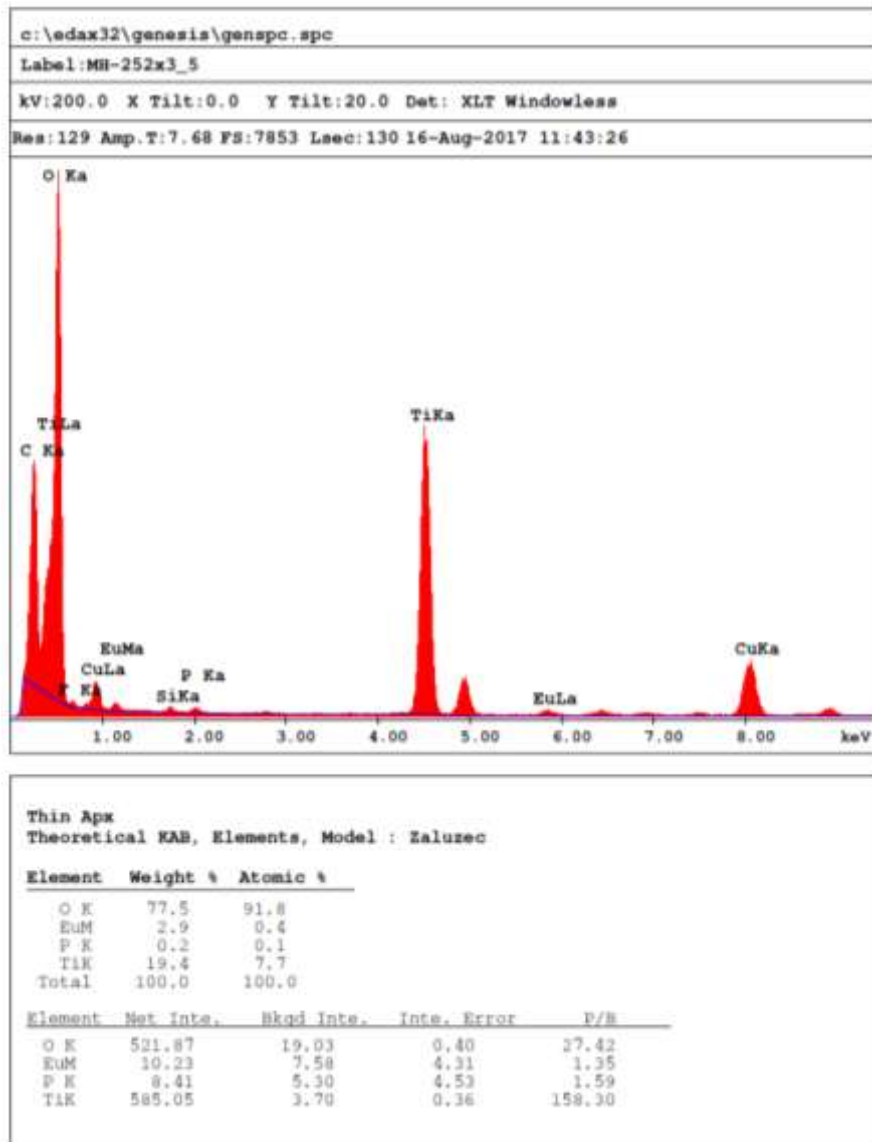


Abbildung 7-10 Energiedispersive Röntgenspektroskopie beschichteter Partikel (MH252x_1).

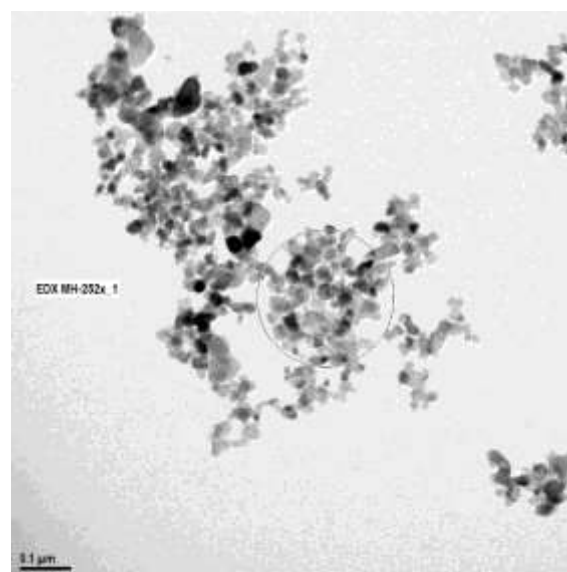


Abbildung 7-11 Energiedispersive Röntgenspektroskopiebilder beschichteter Partikel (MH252_4).

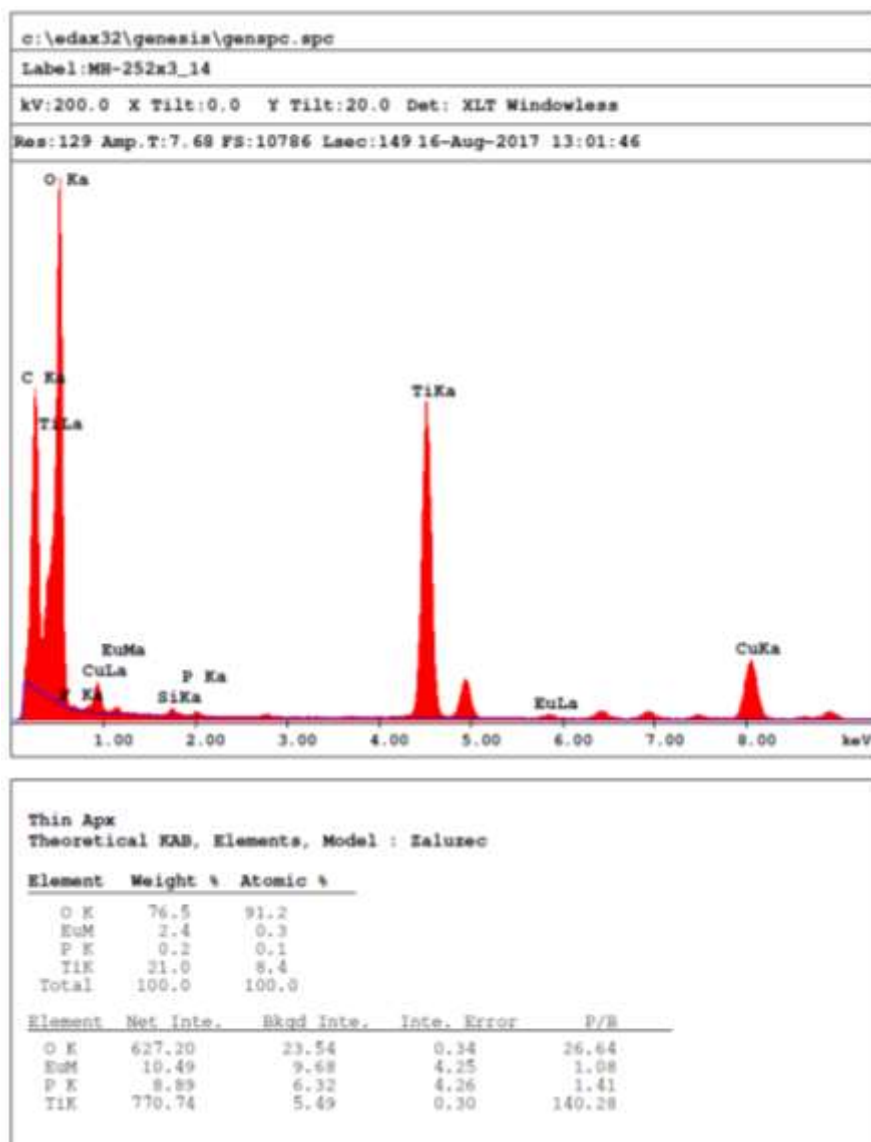


Abbildung 7-12 Energiedispersive Röntgenspektroskopie beschichteter Partikel (MH252x_2).

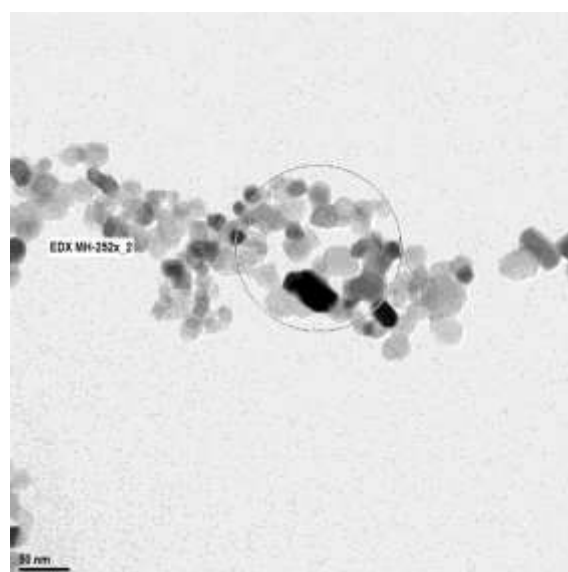


Abbildung 7-13 Energiedispersive Röntgenspektroskopiebilder beschichteter Partikel (MH252x_2).

7.4 Thermogramme

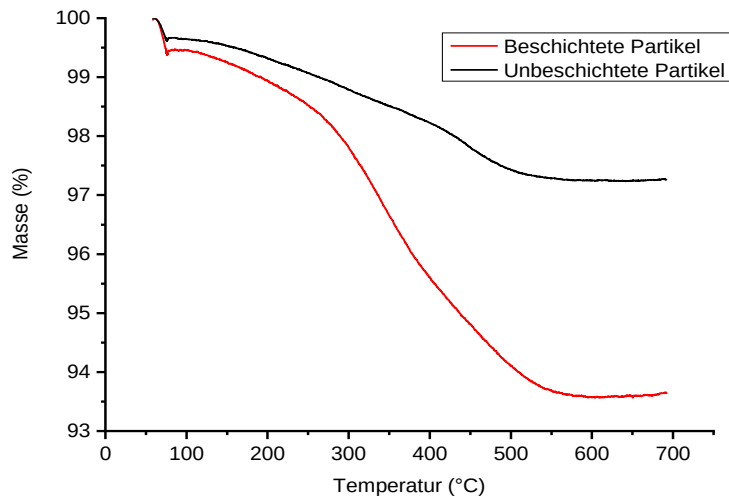
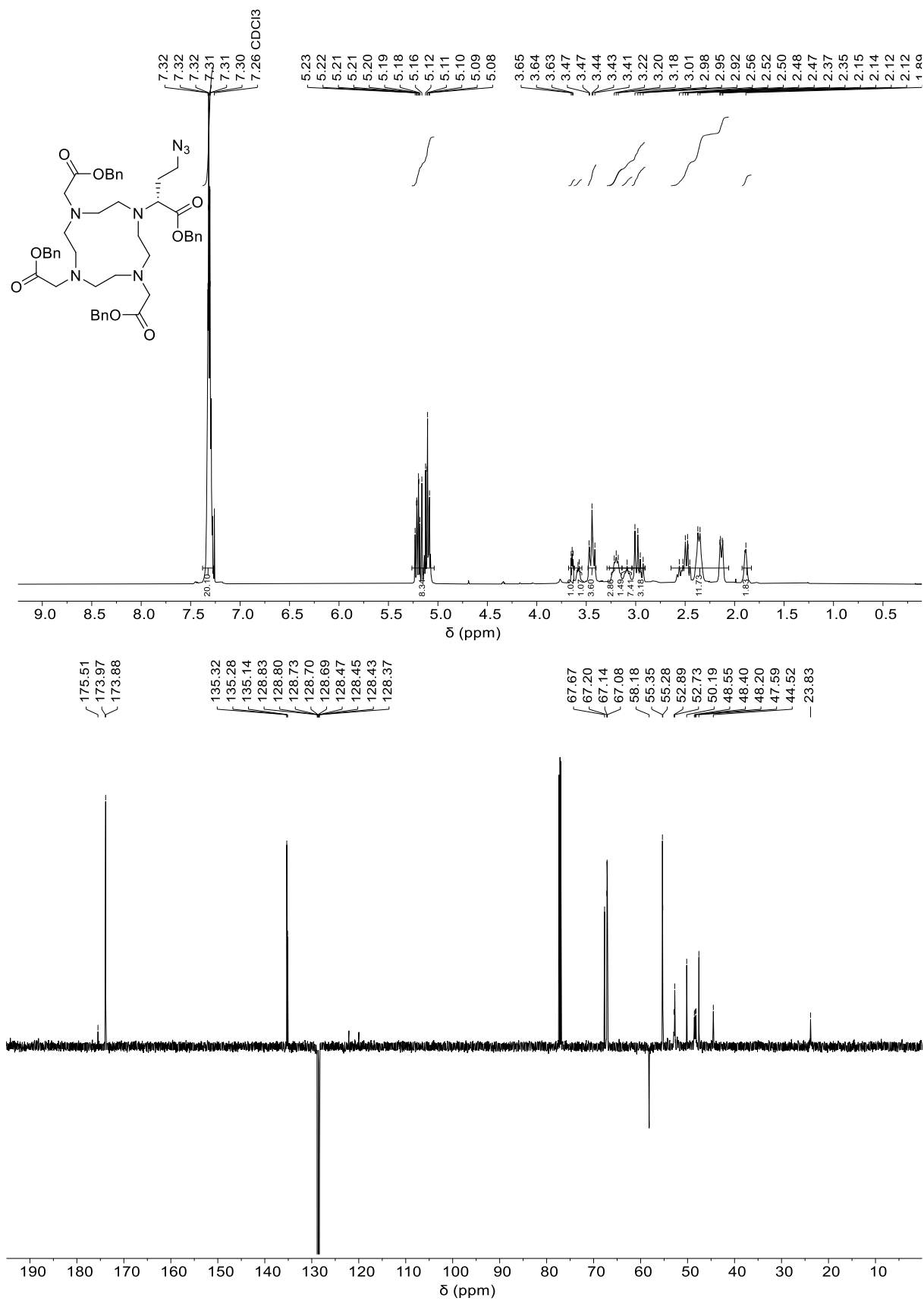


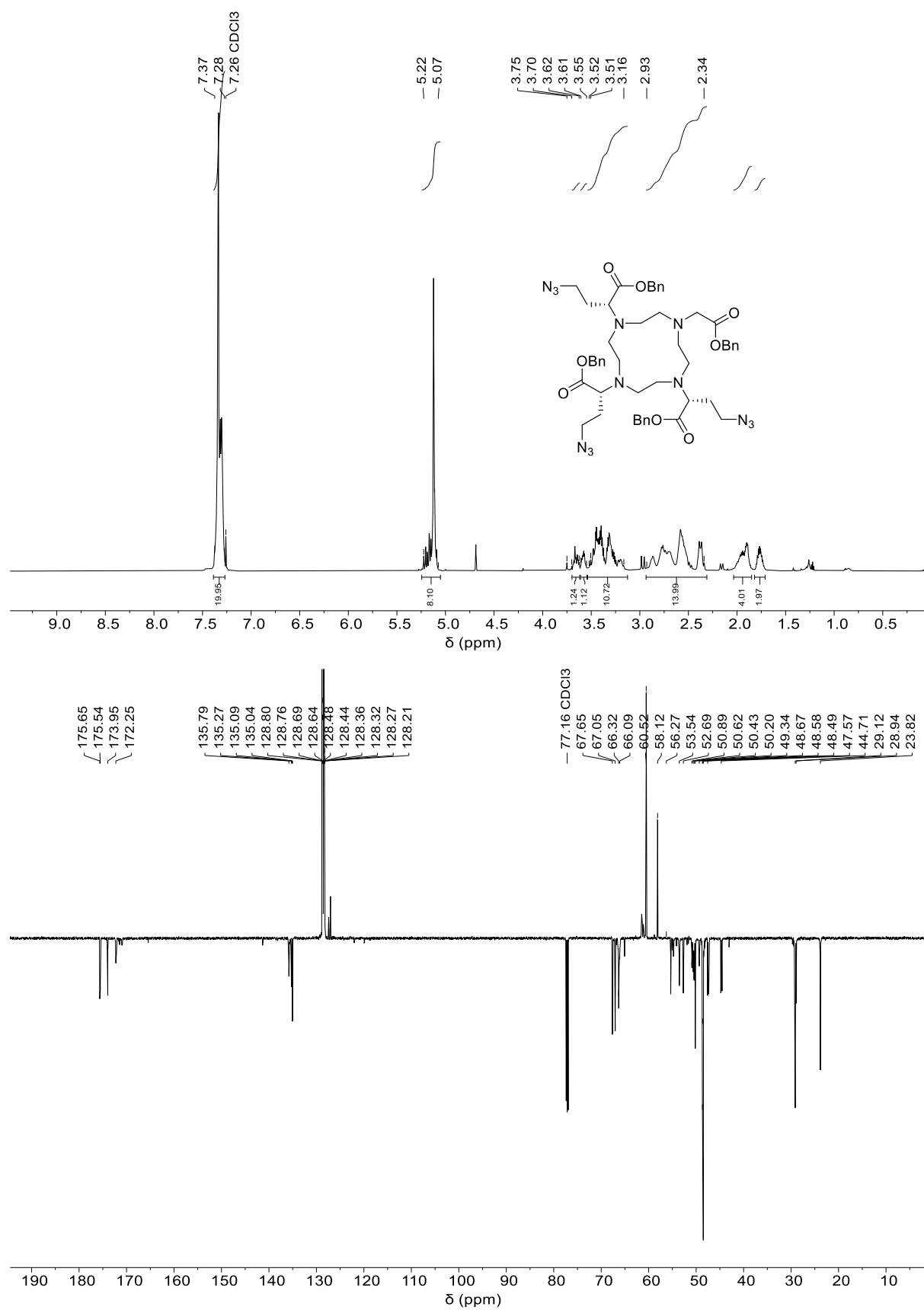
Abbildung 7-14 Thermogramme der beschichteten (schwarz) und unbeschichteten (rot) TiO_2 -Partikel.

7.5 NMR- & LCMS-Analytik

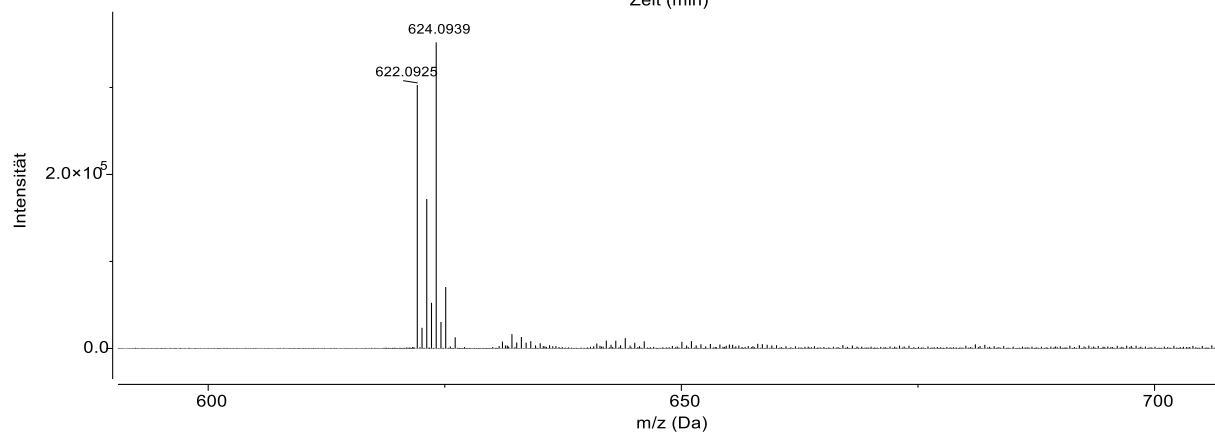
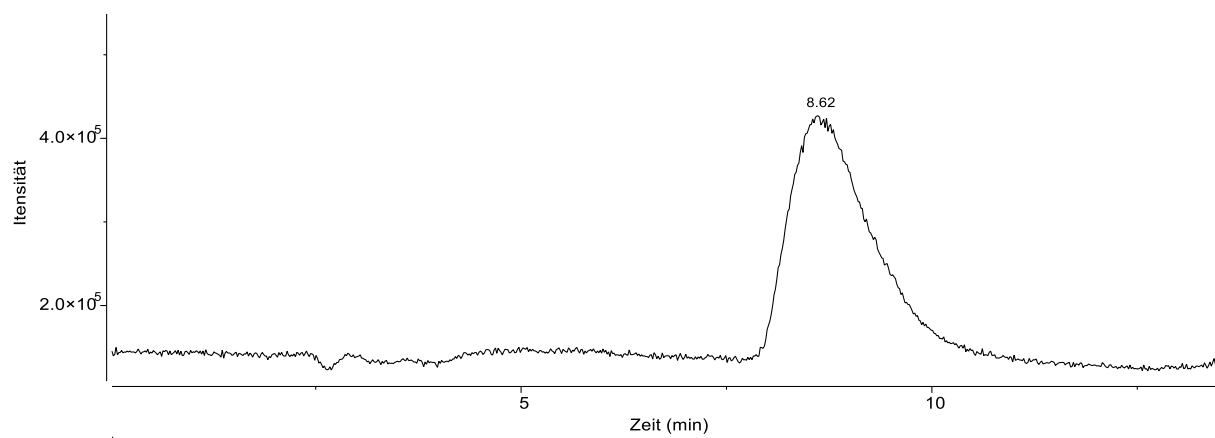
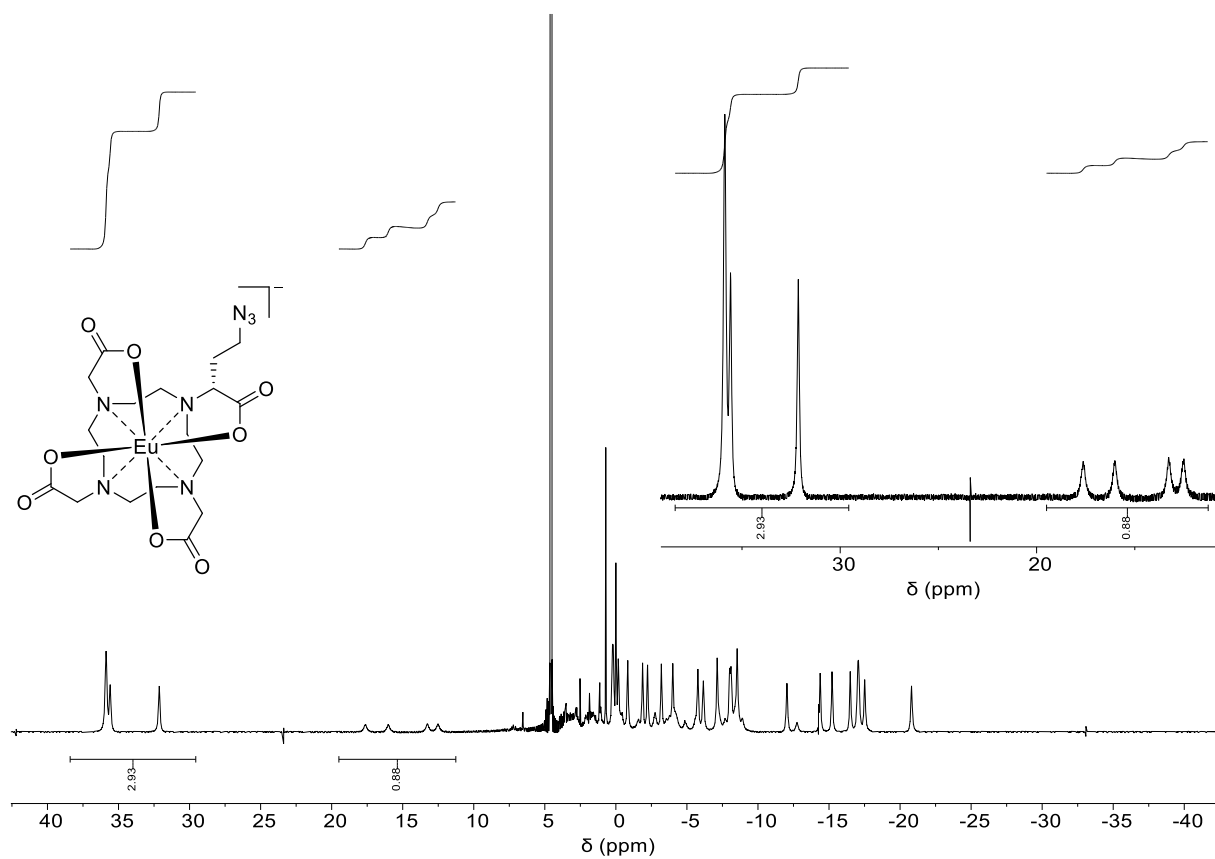
Bn₄DOT1AZA



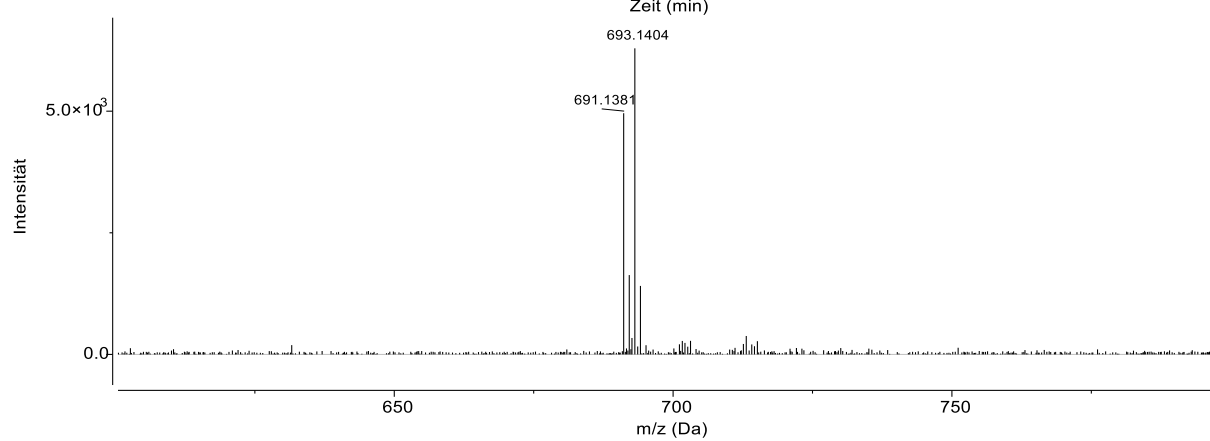
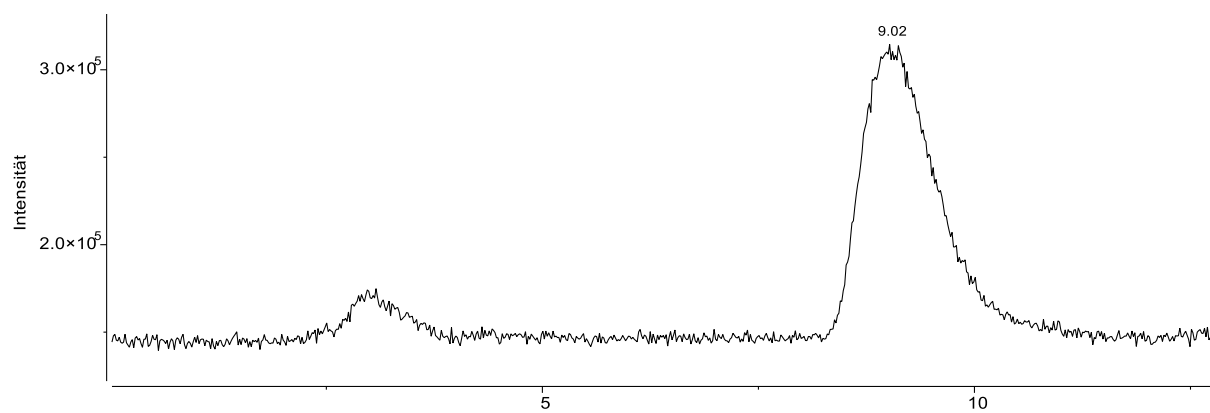
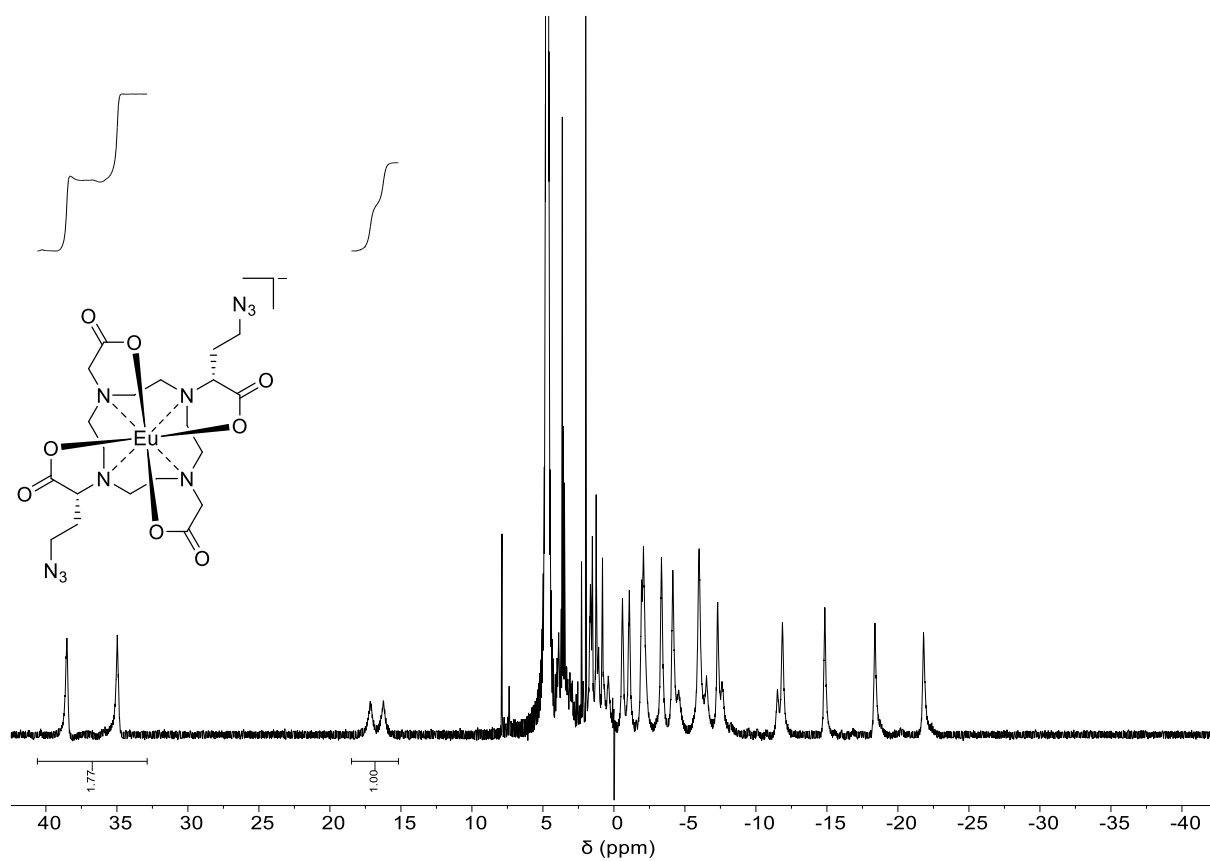
Bn₄DOT3AZA



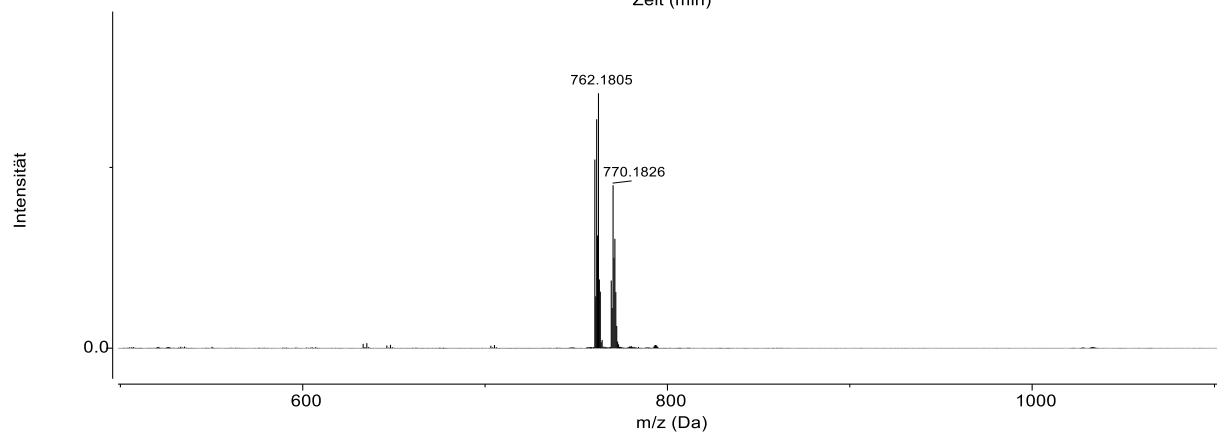
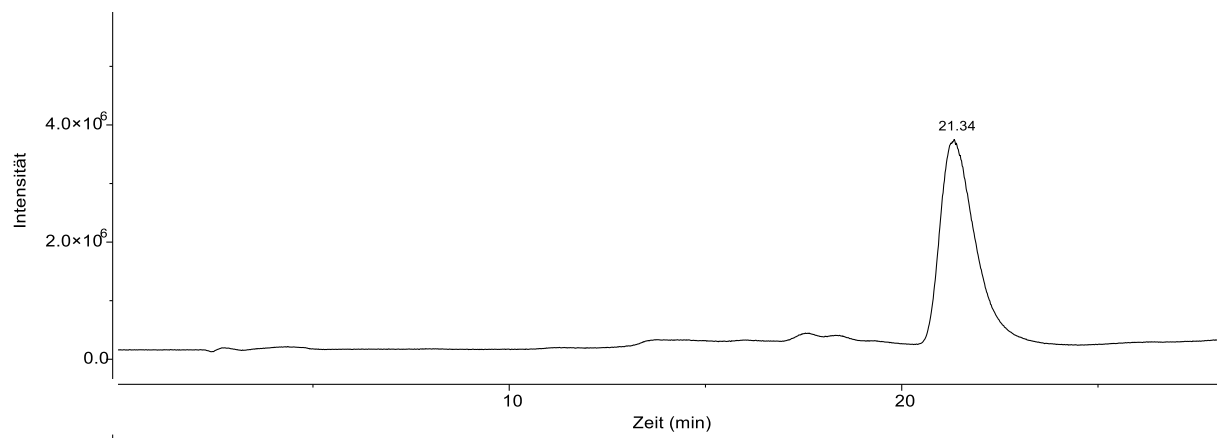
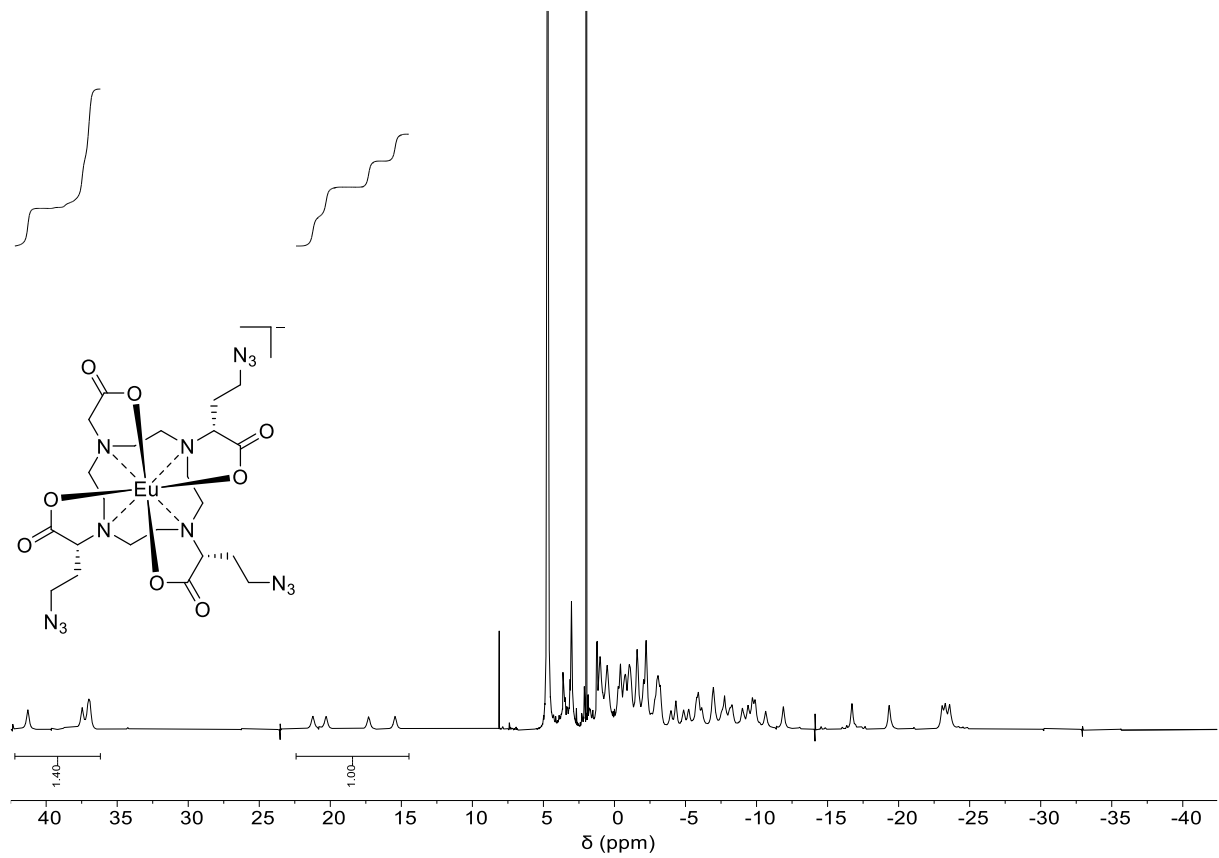
Eu-DOT1AZA



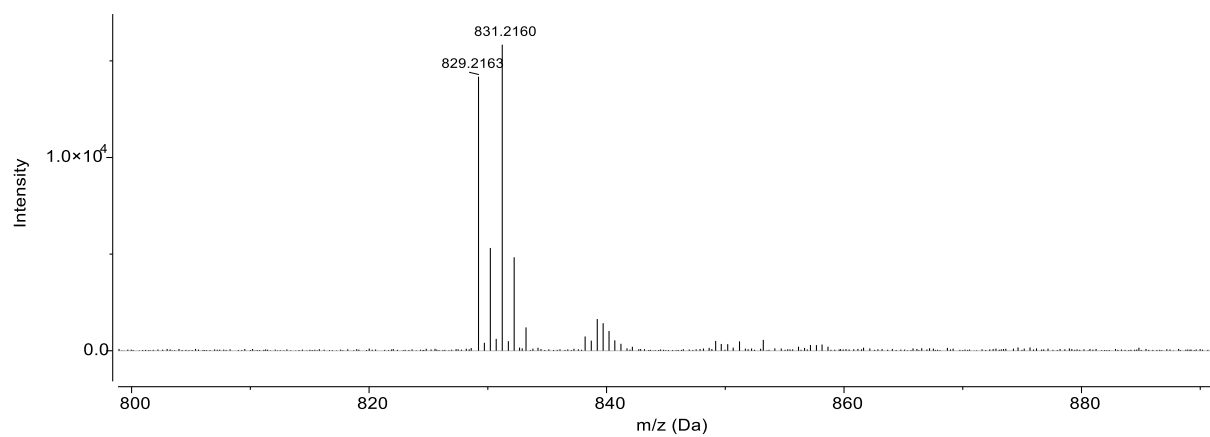
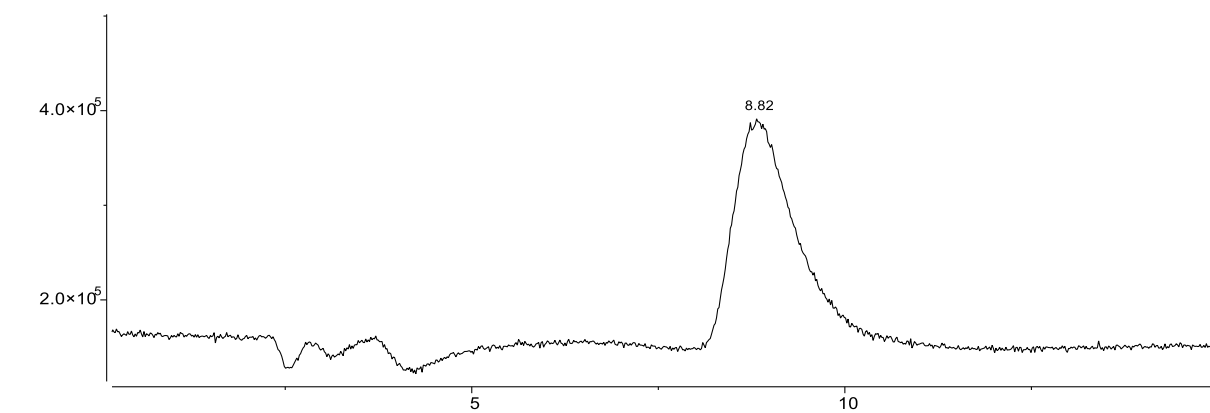
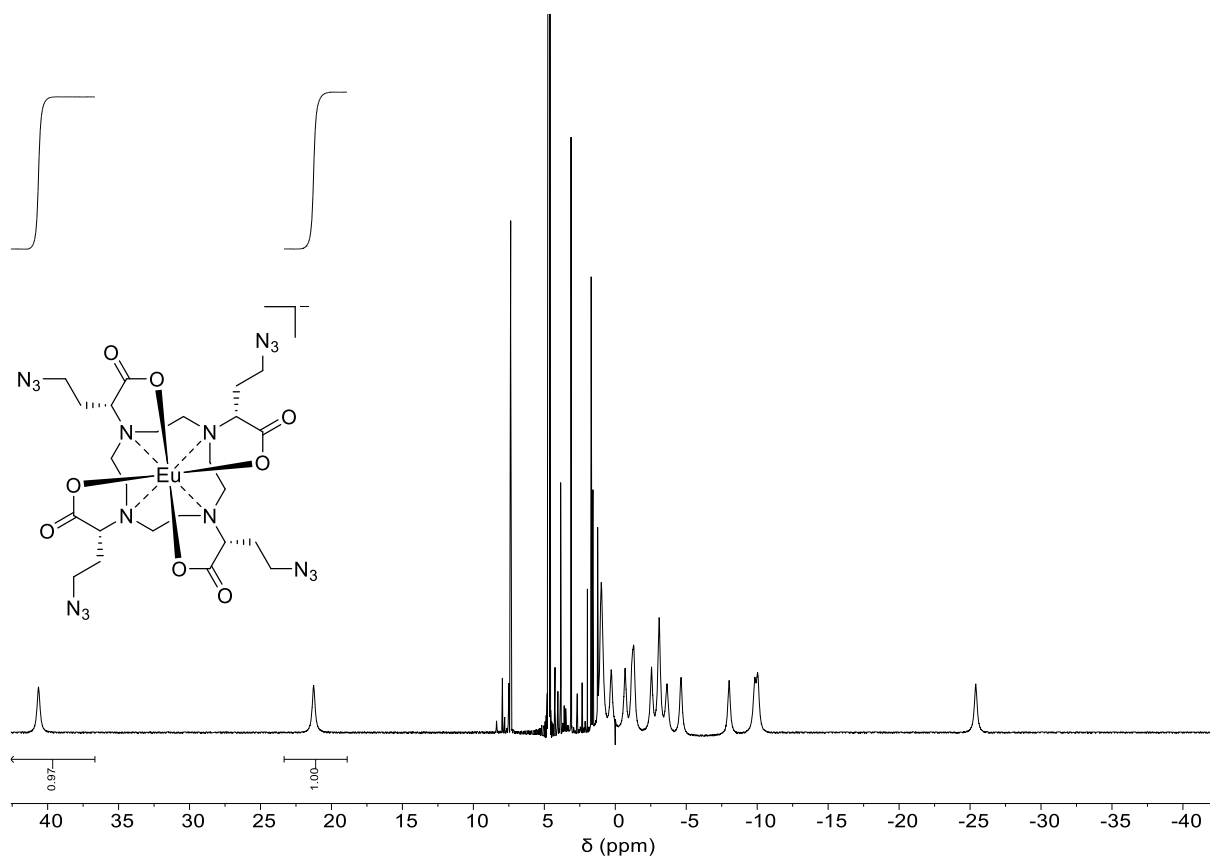
Eu-DOT2AZA



Eu-DOT3AZA

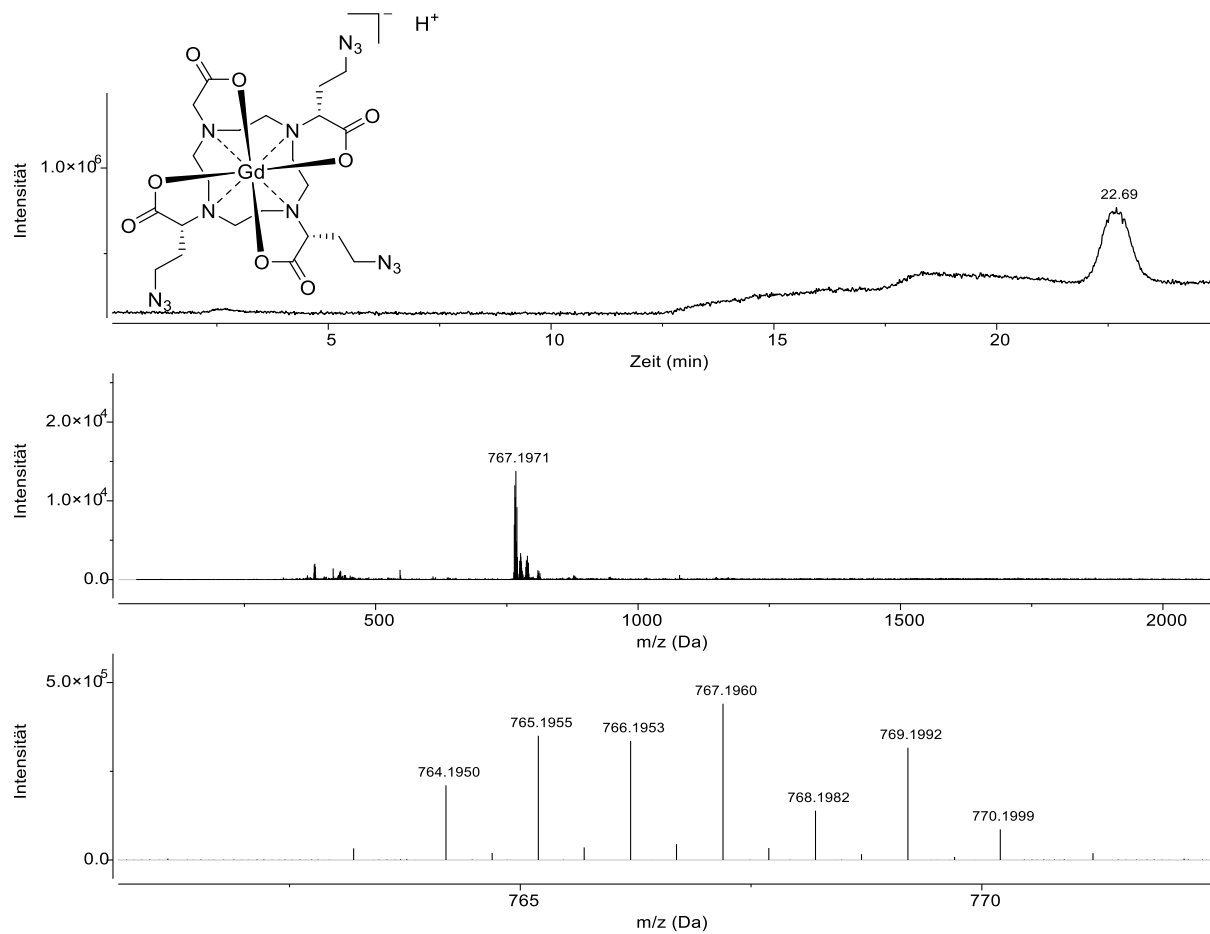


Eu-DOTAZA

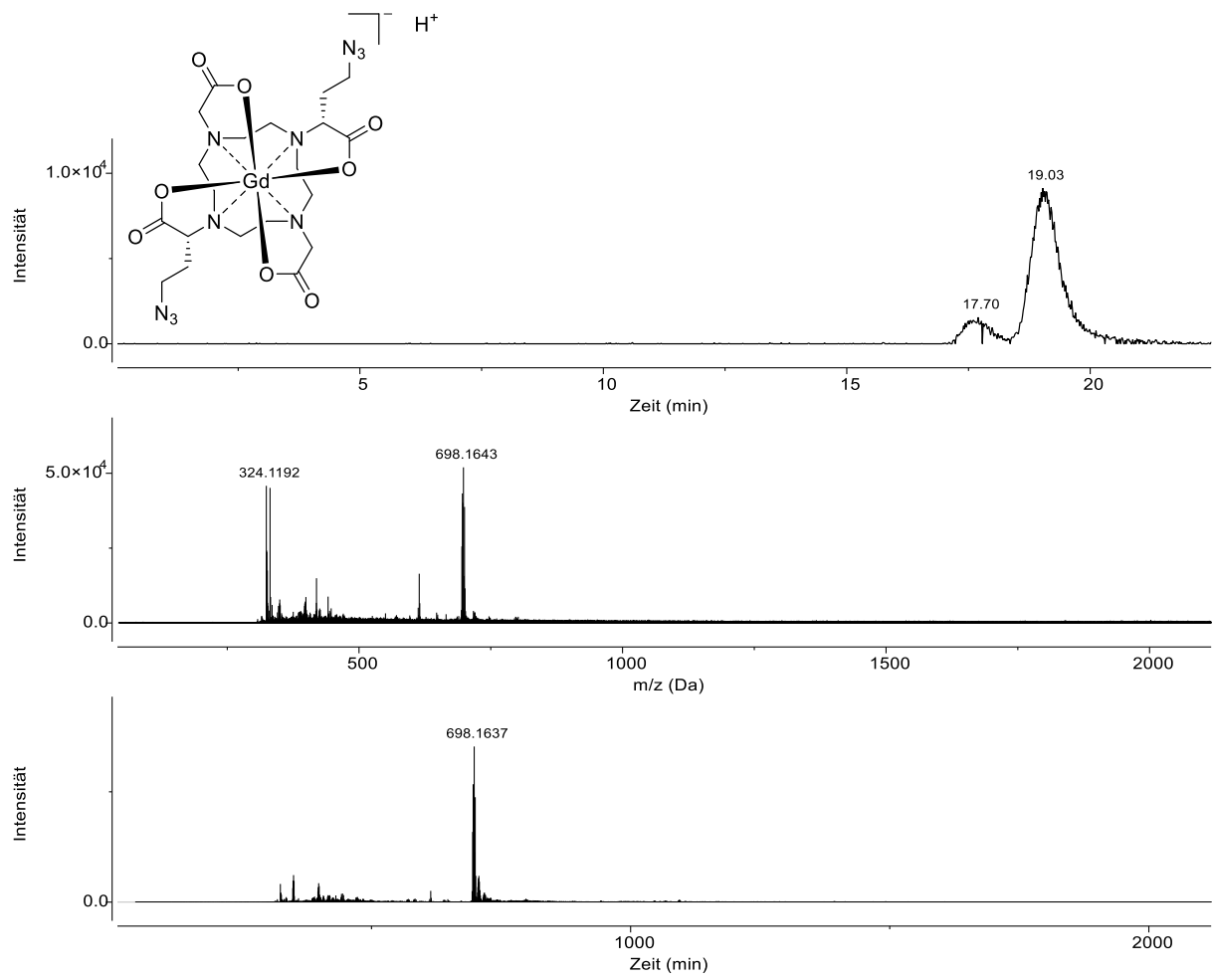


Anhang

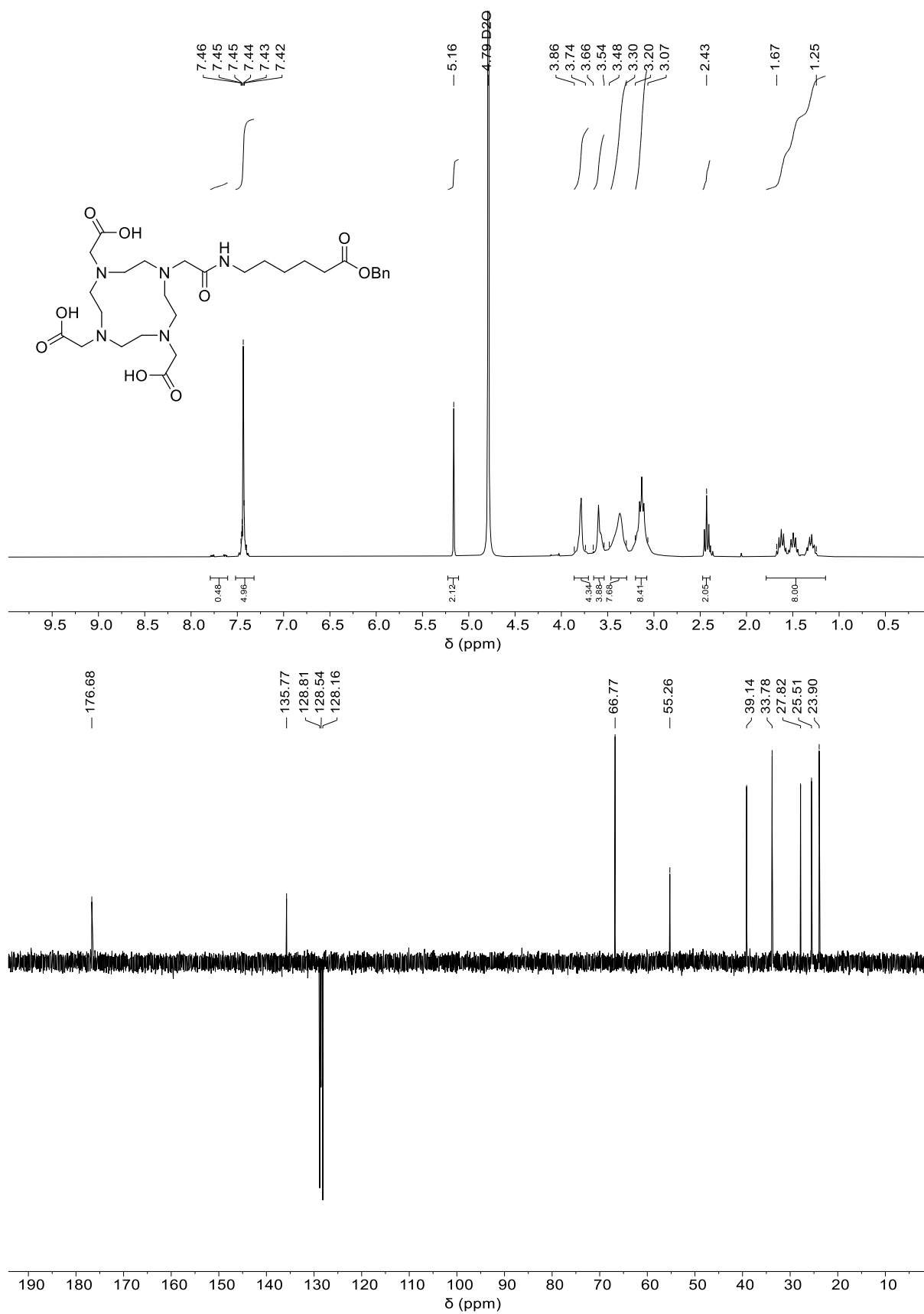
Gd-DOT3AZA



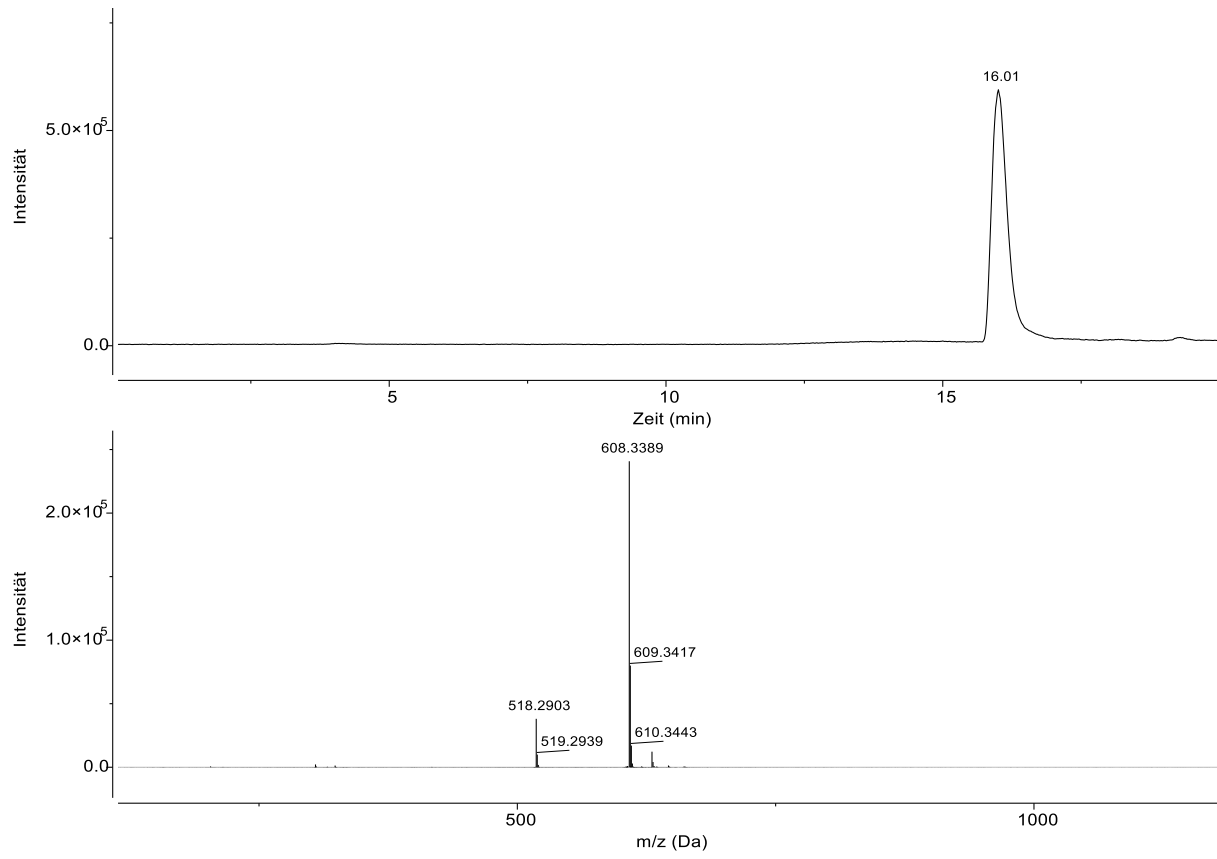
Gd-DOT2AZA



DOTA-Ahx-Bn



Anhang

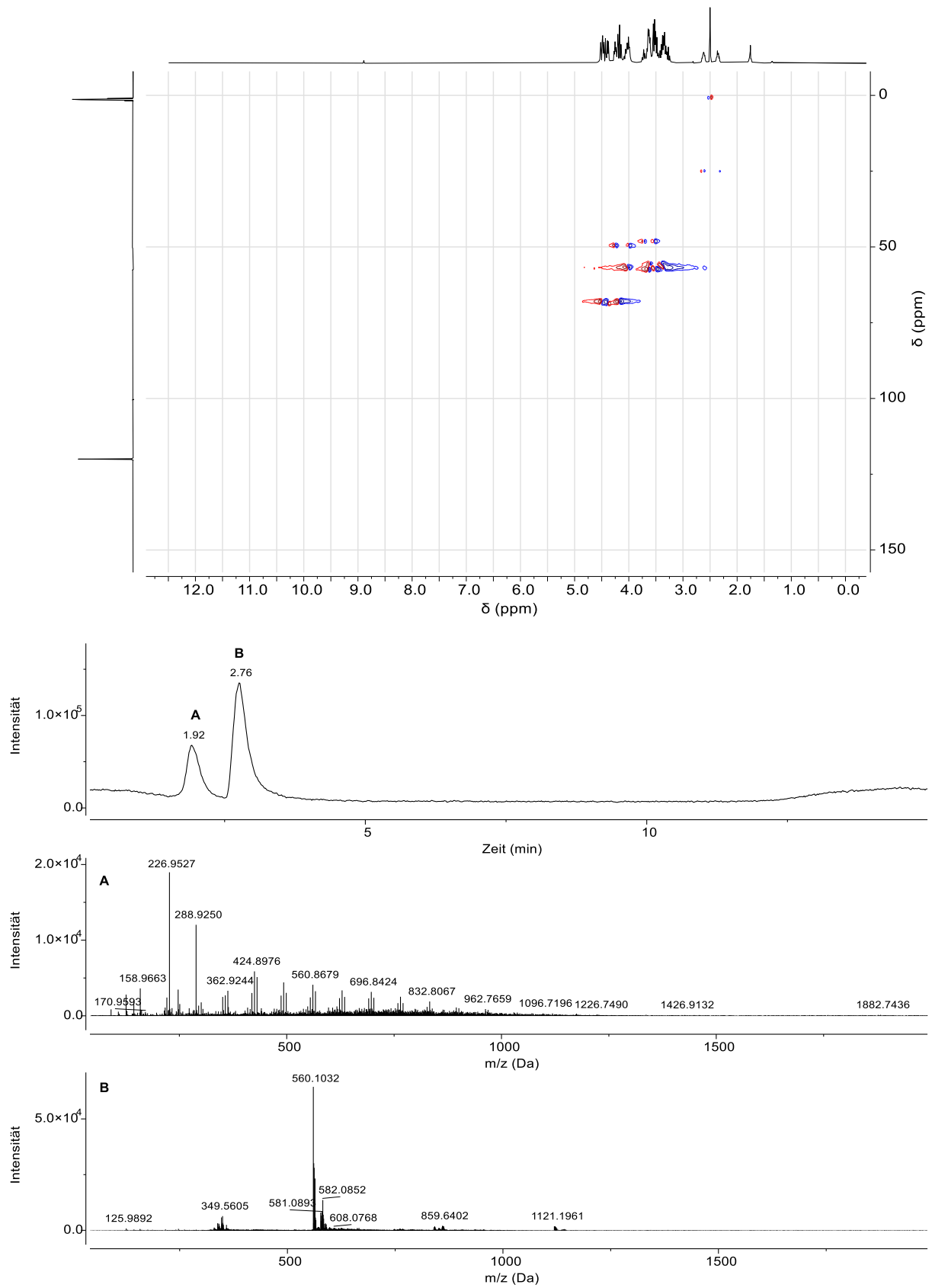


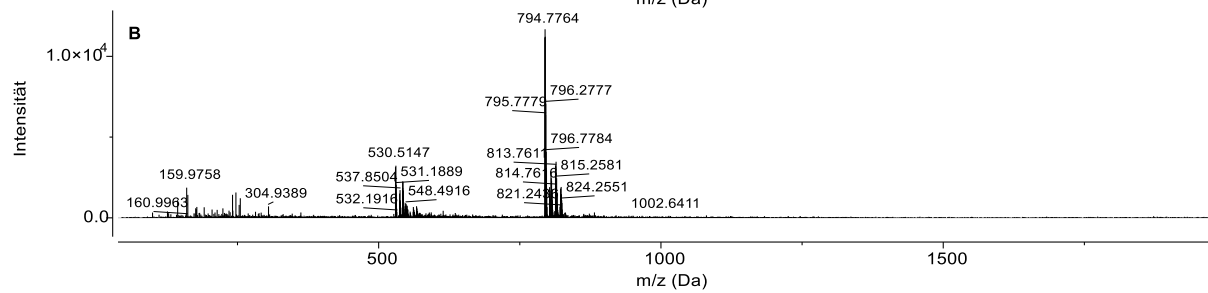
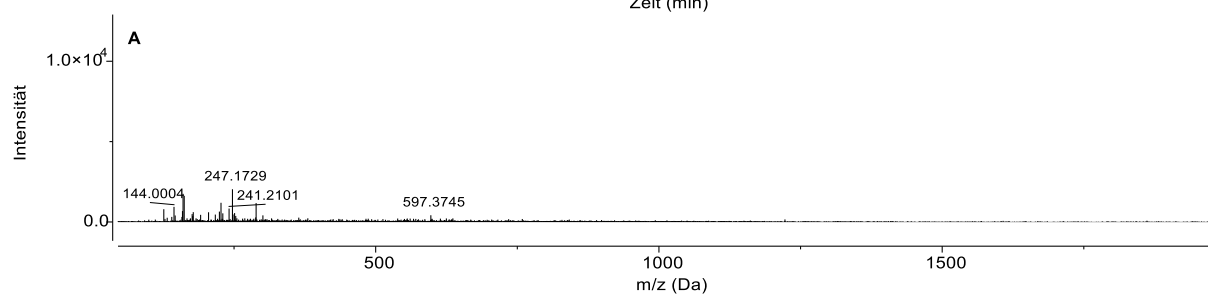
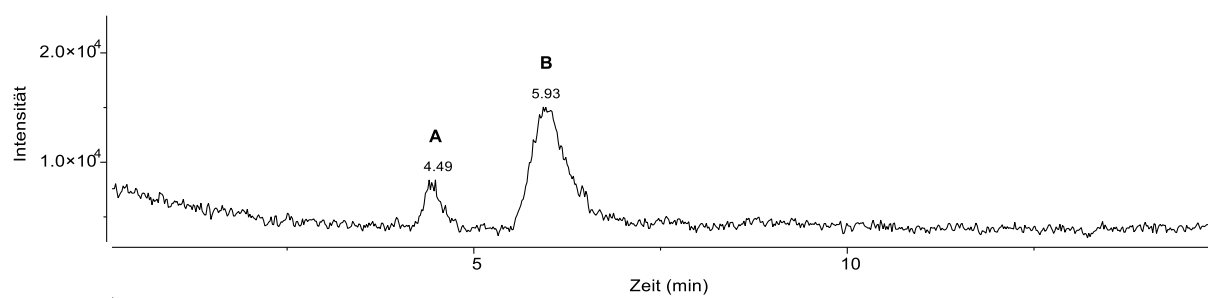
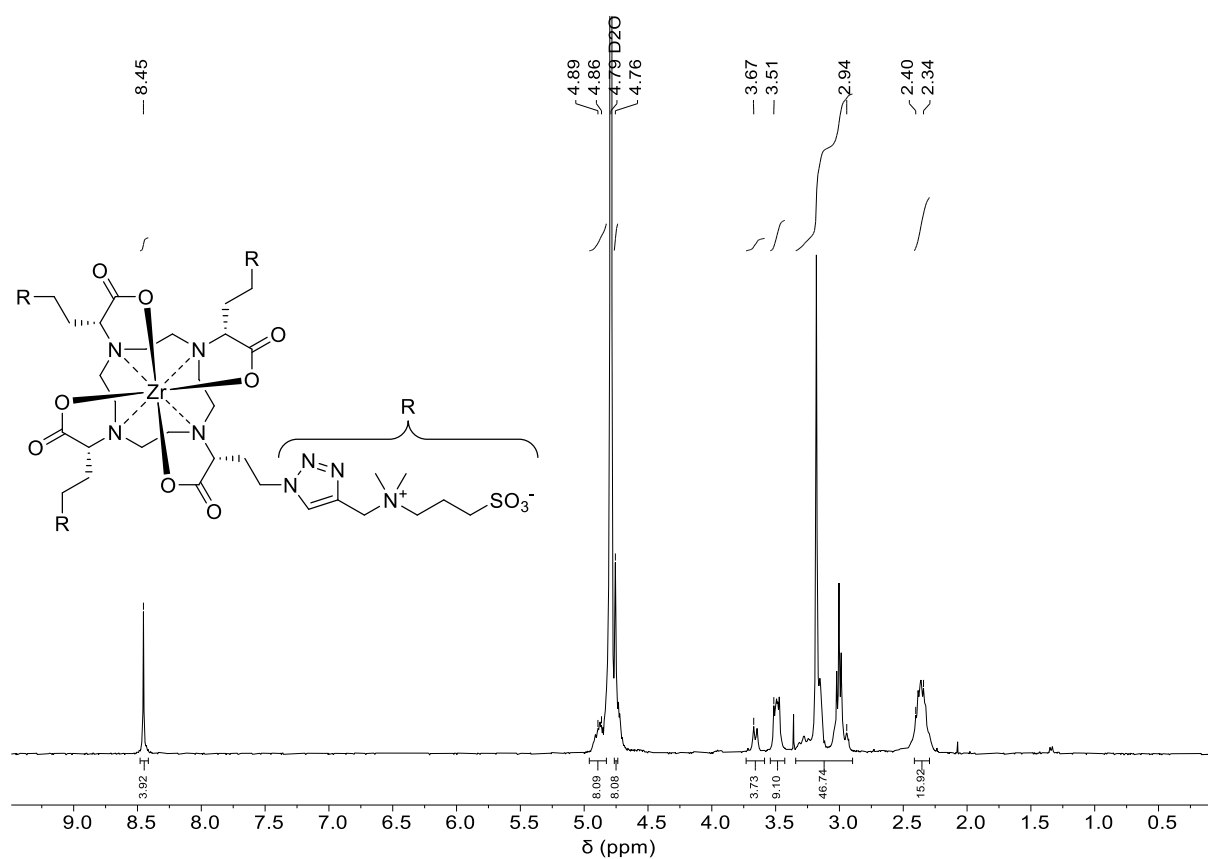
The figure displays the chemical structure of a Zr(IV) complex and its corresponding ^1H and ^{13}C NMR spectra. The chemical structure is a Zr(IV) complex with a diazoacetate ligand, featuring a central Zr atom coordinated by four nitrogen atoms and two oxygen atoms, with a diazo group (N_2) attached to one of the nitrogen atoms.

The ^1H NMR spectrum (top) shows peaks in the aromatic region (6.5-7.5 ppm) and aliphatic region (2.6-4.0 ppm). The chemical shifts are labeled as follows: 3.96, 3.82, 3.71, 3.68, 3.64, 3.58, 3.52, 3.42, 3.18, and 2.69 ppm. Integration values are provided below the peaks: 3.64, 0.97, 2.84, 3.93, 12.73, 3.64, 0.97, 2.84, 3.93, 12.73, 1.08, and 1.01.

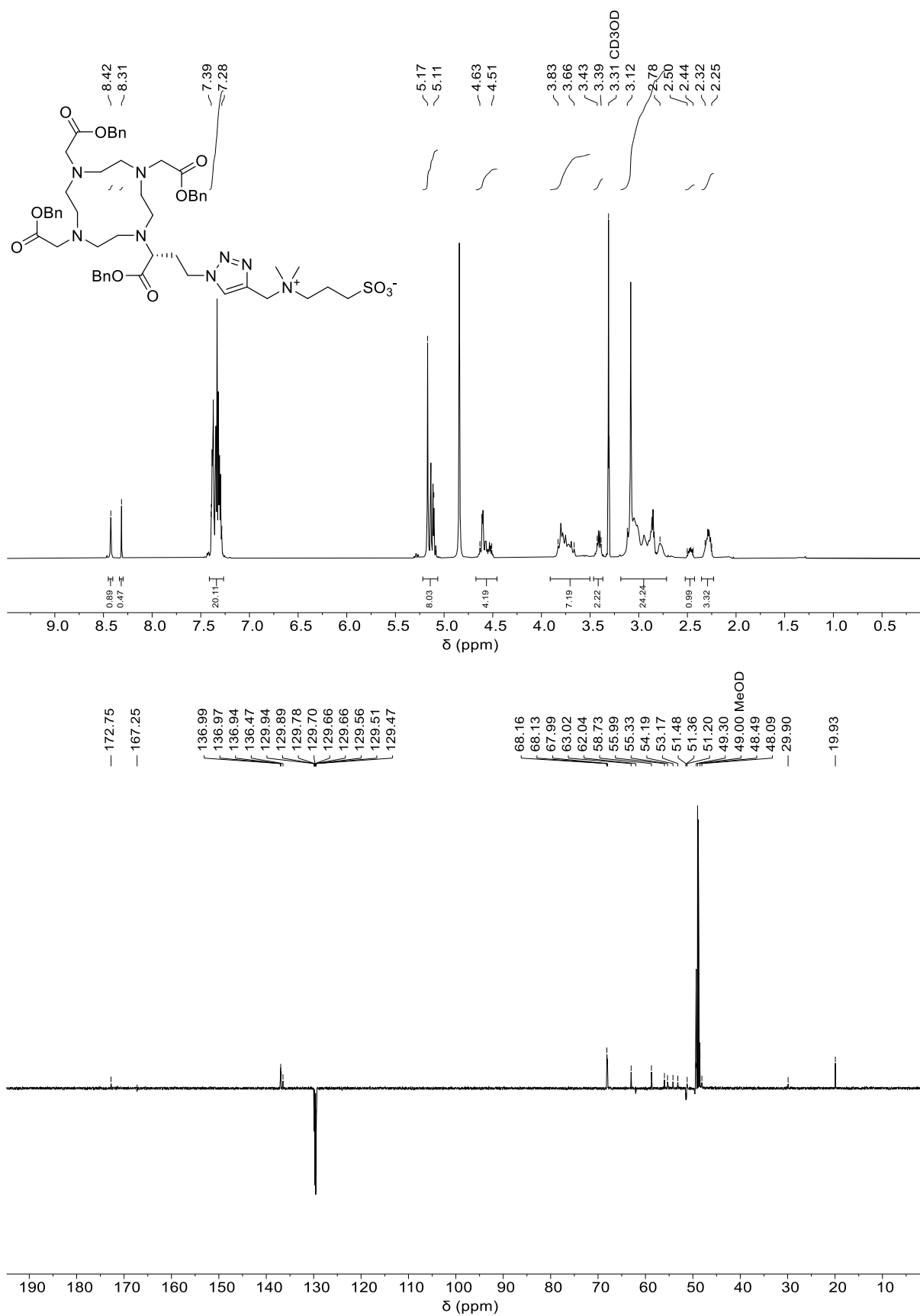
The ^{13}C NMR spectrum (bottom) shows peaks in the aliphatic region (49-65 ppm) and a carbonyl peak at 179.39 ppm. The chemical shifts are labeled as follows: 179.39, 64.84, 56.56, 56.20, and 49.10 ppm.

Anhang

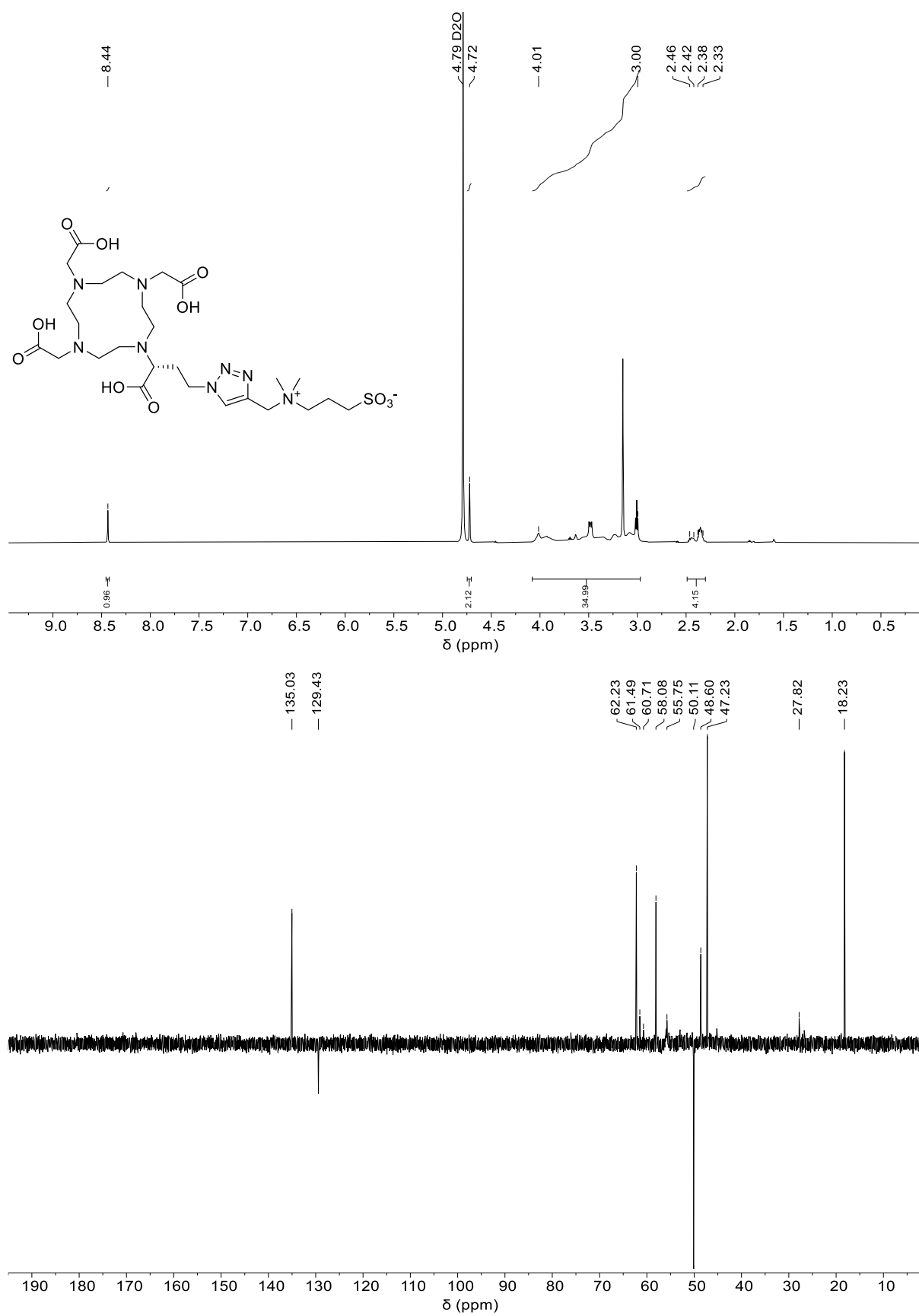


Zr-ZWI₄-DOTA

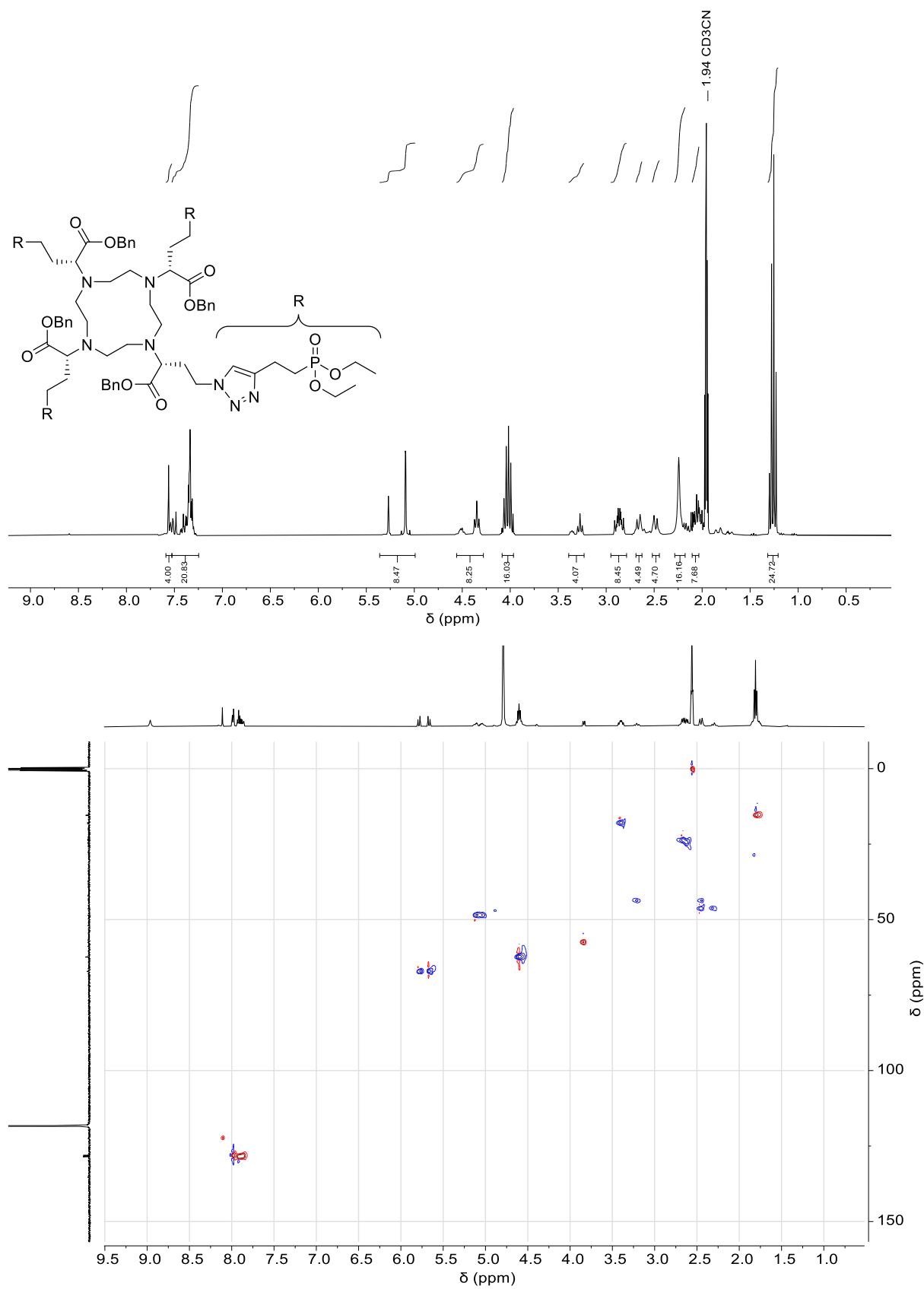
ZWI-Bn₄DOTA



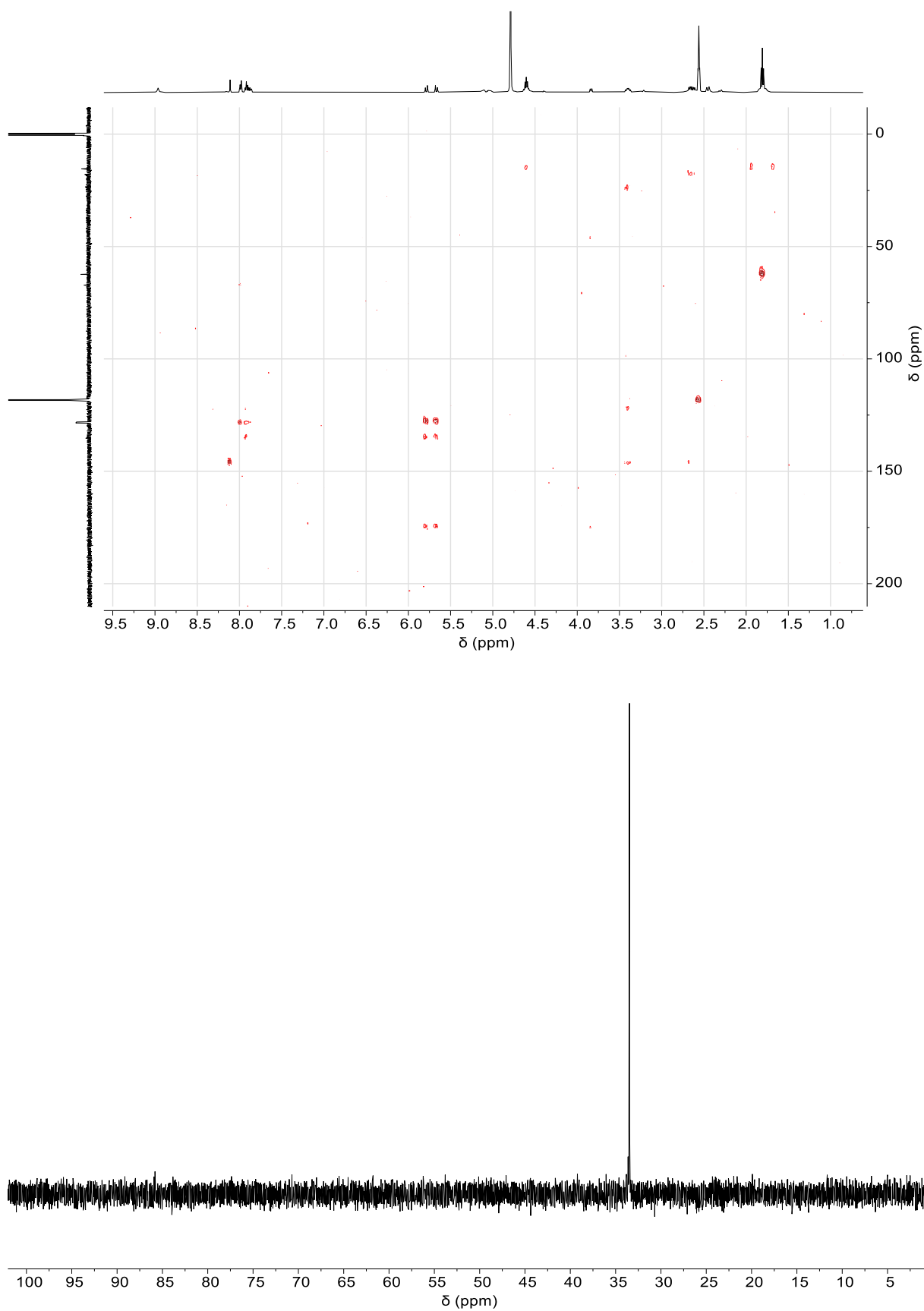
ZWI-DOTA



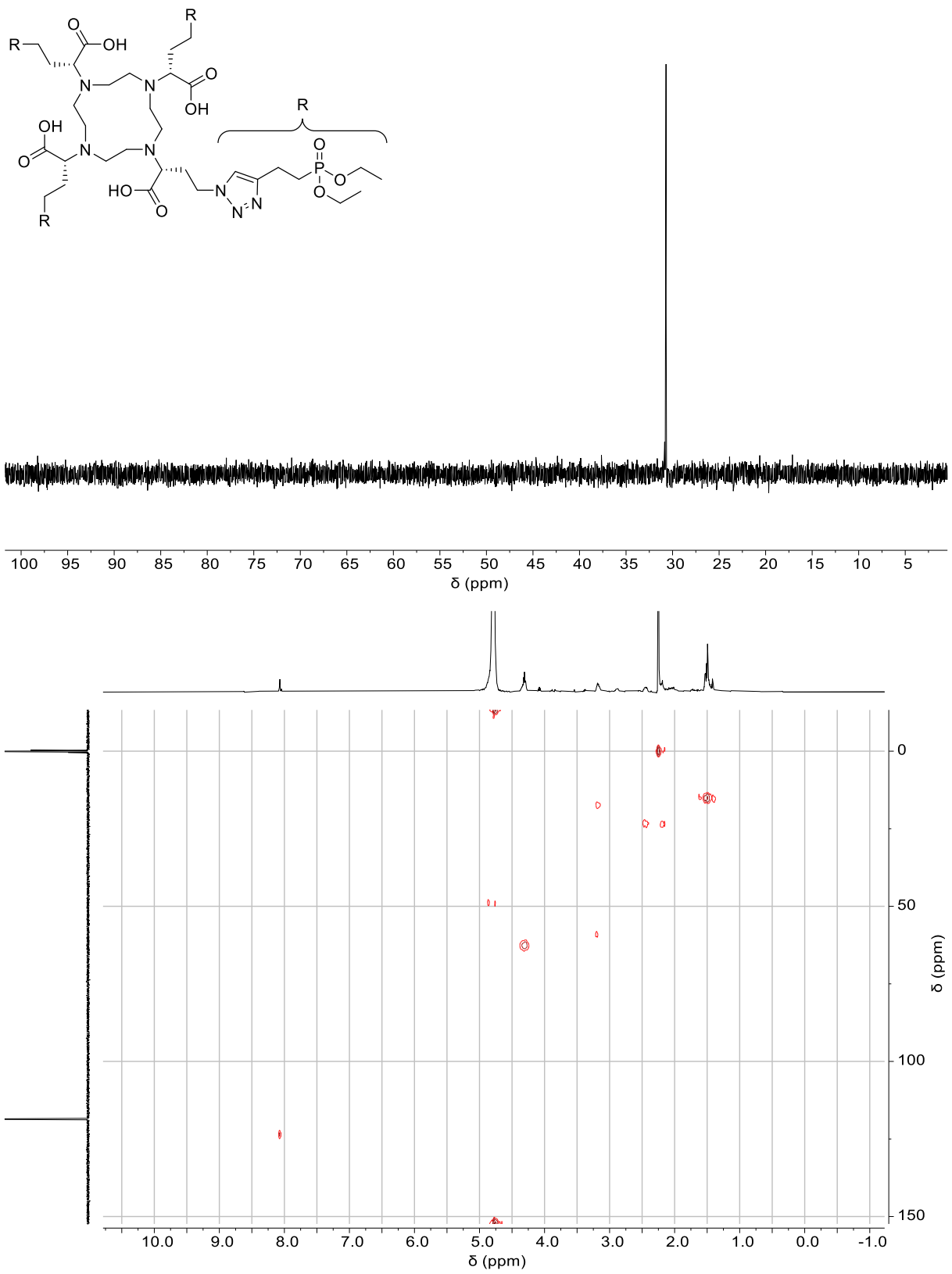
P₄-Bn₄DOTA



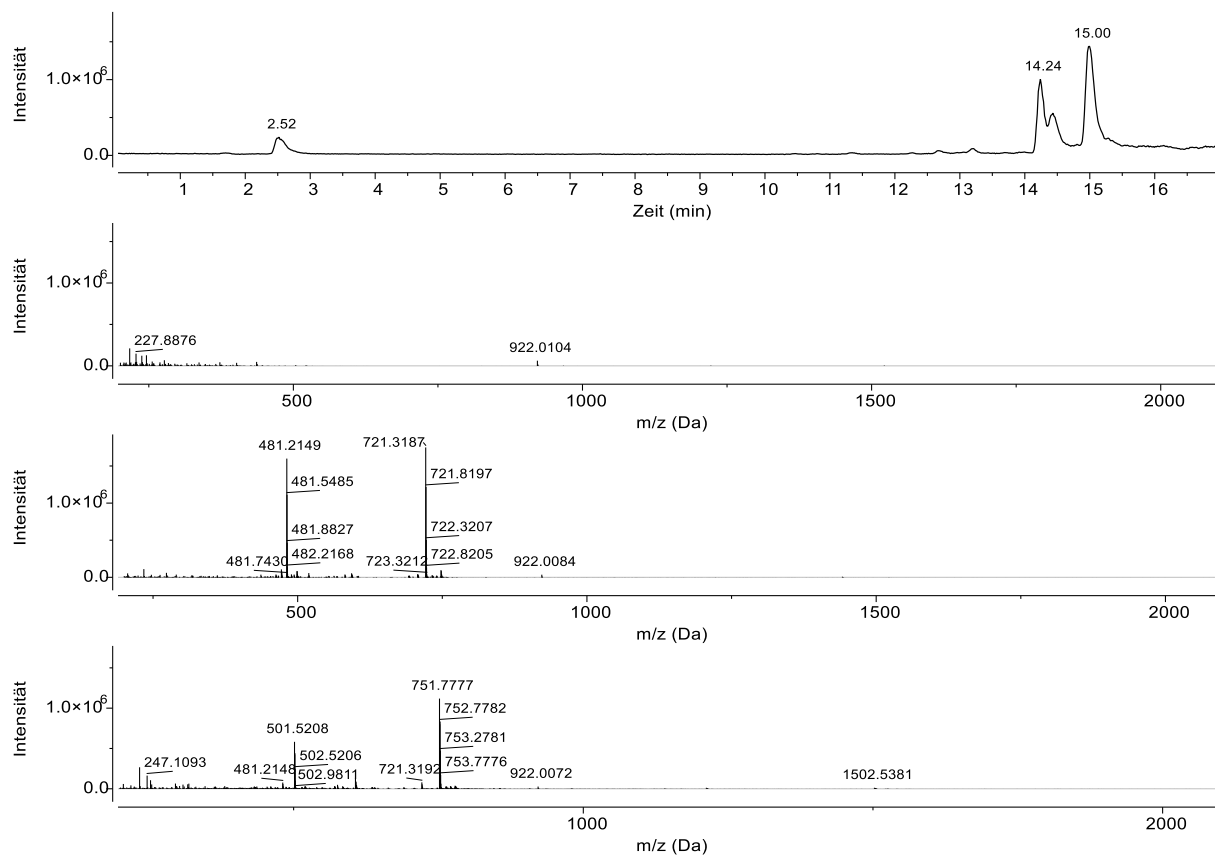
Anhang



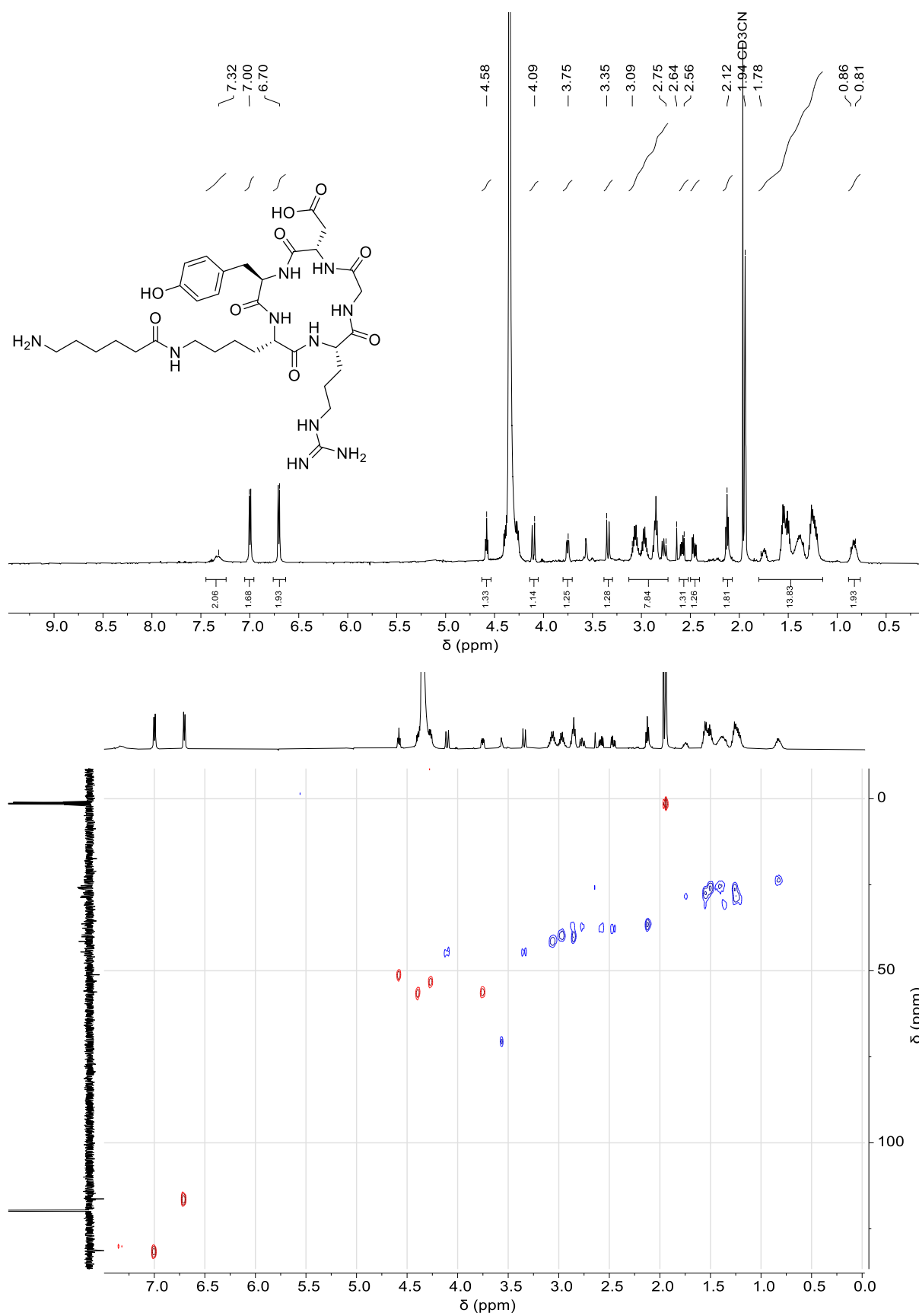
P4-DOTA



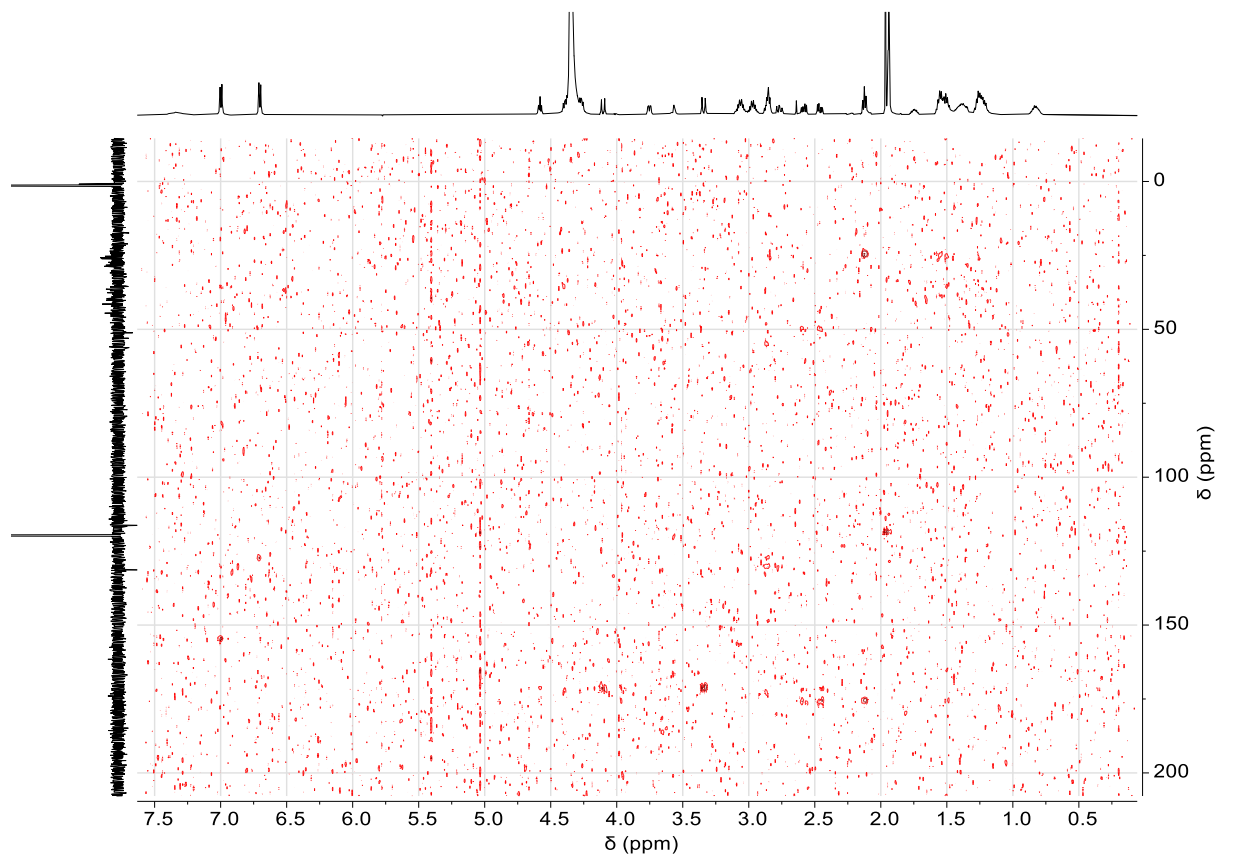
Anhang

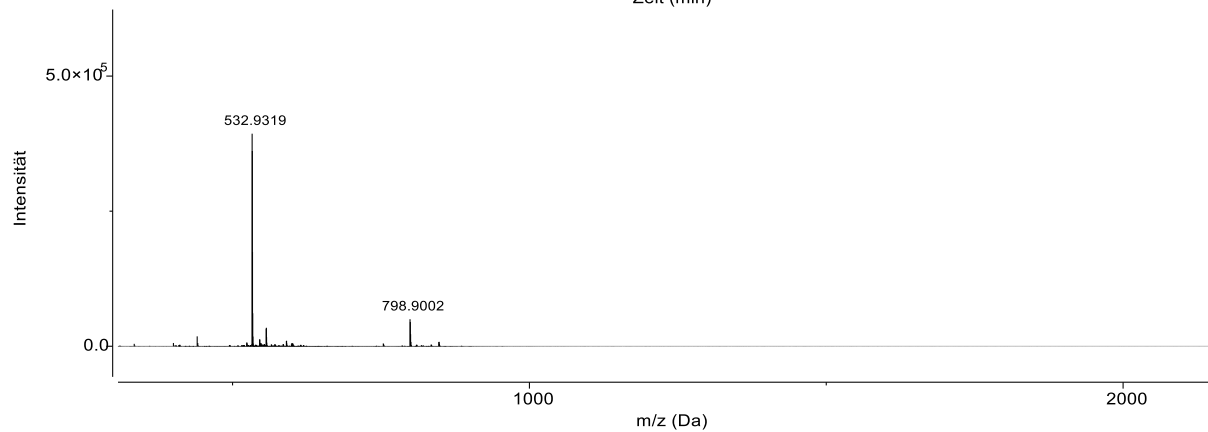
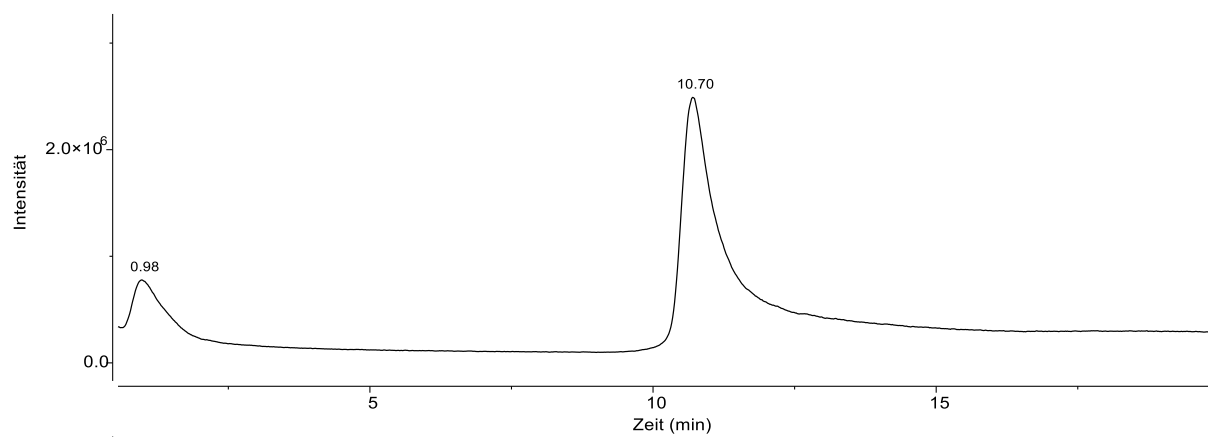
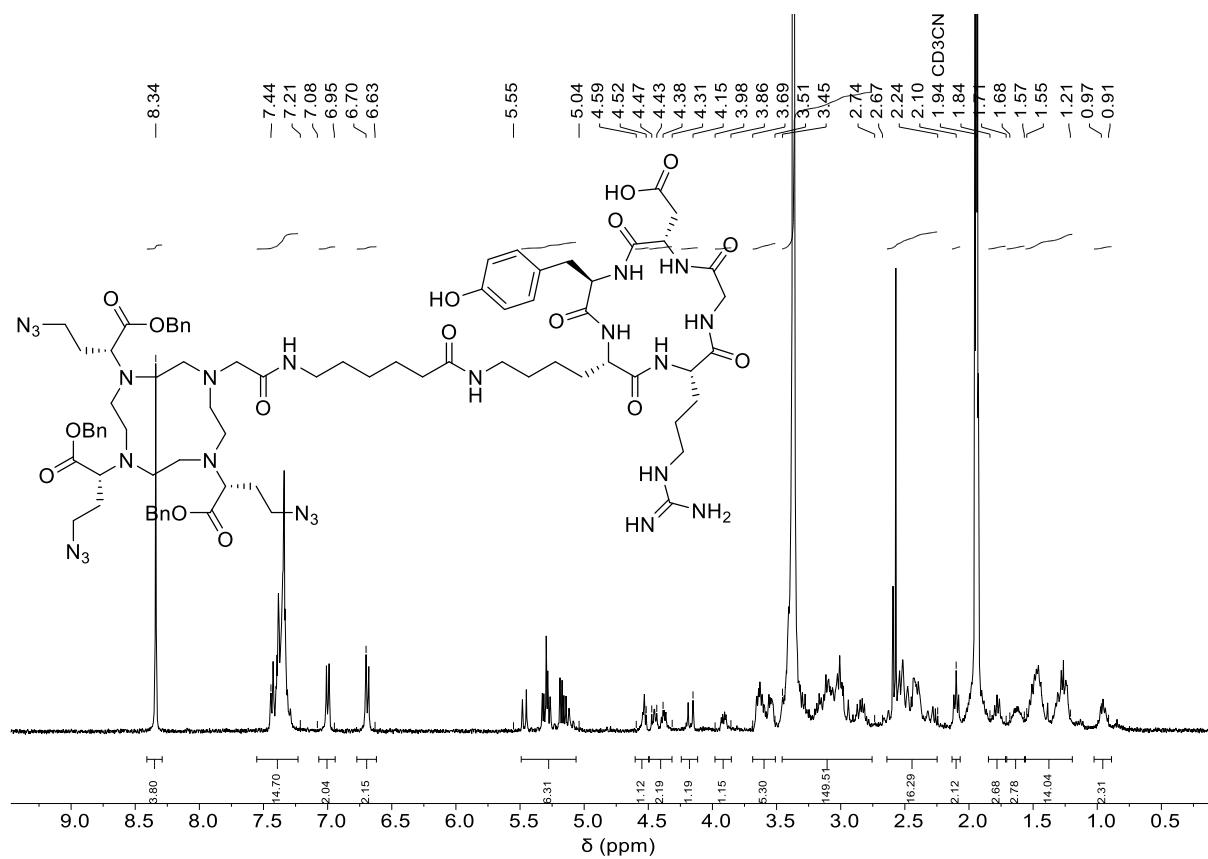


Ahx-cRGD 29

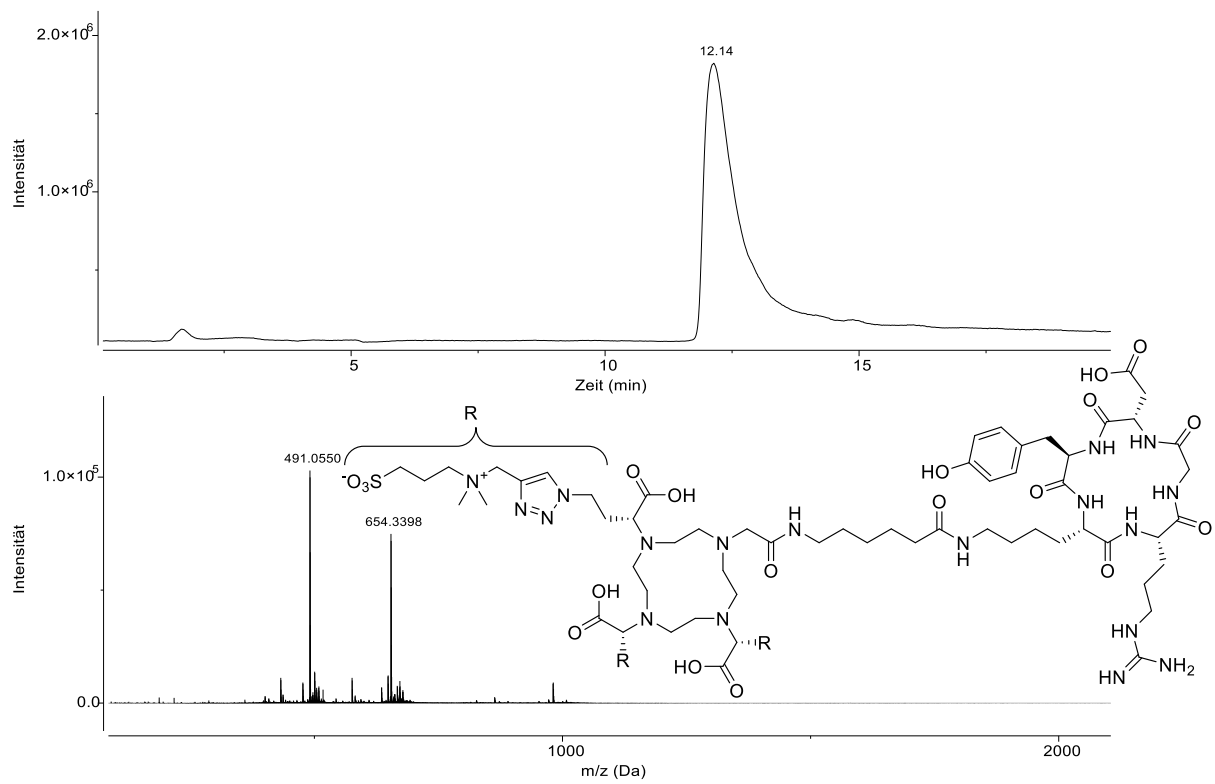


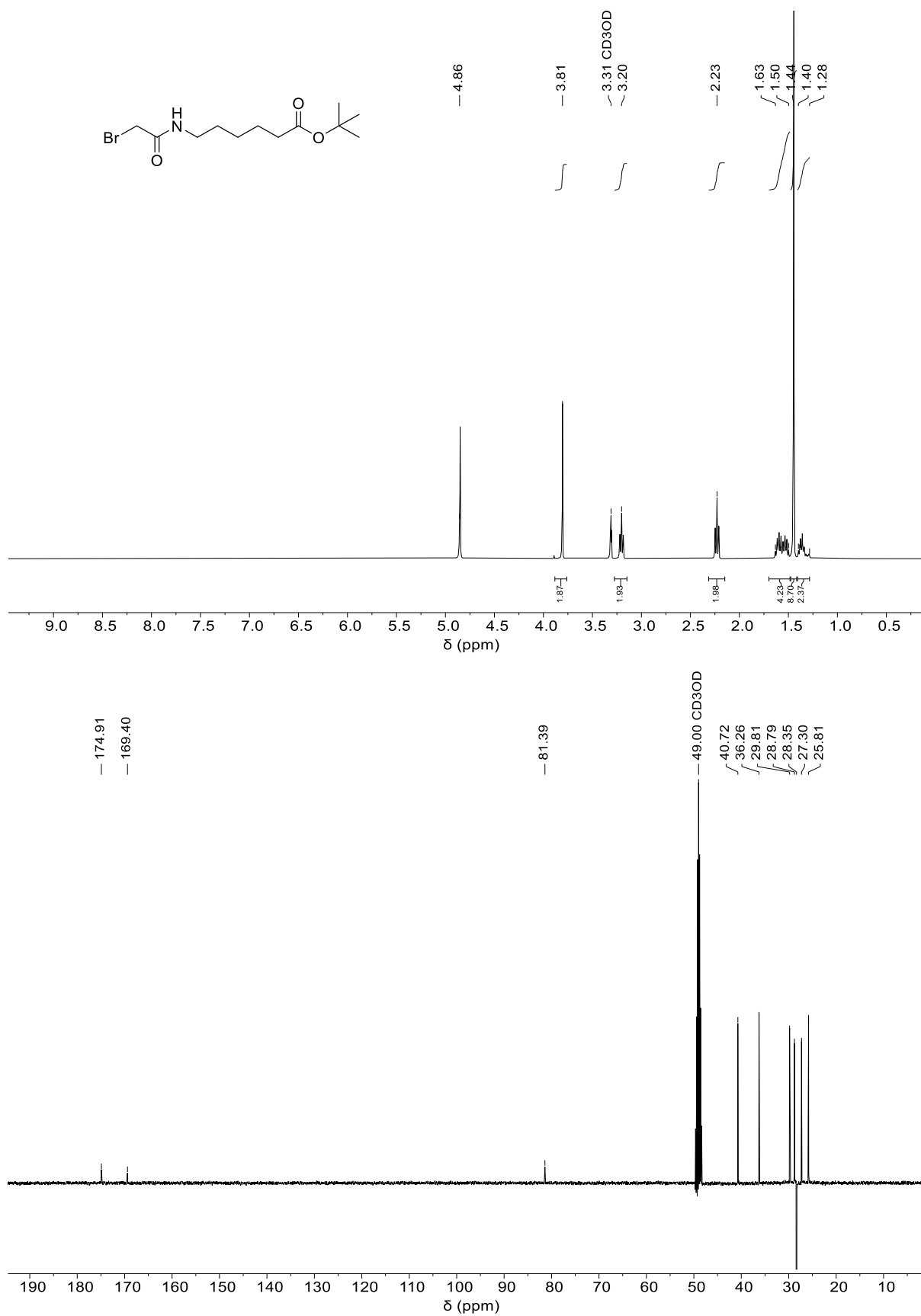
Anhang



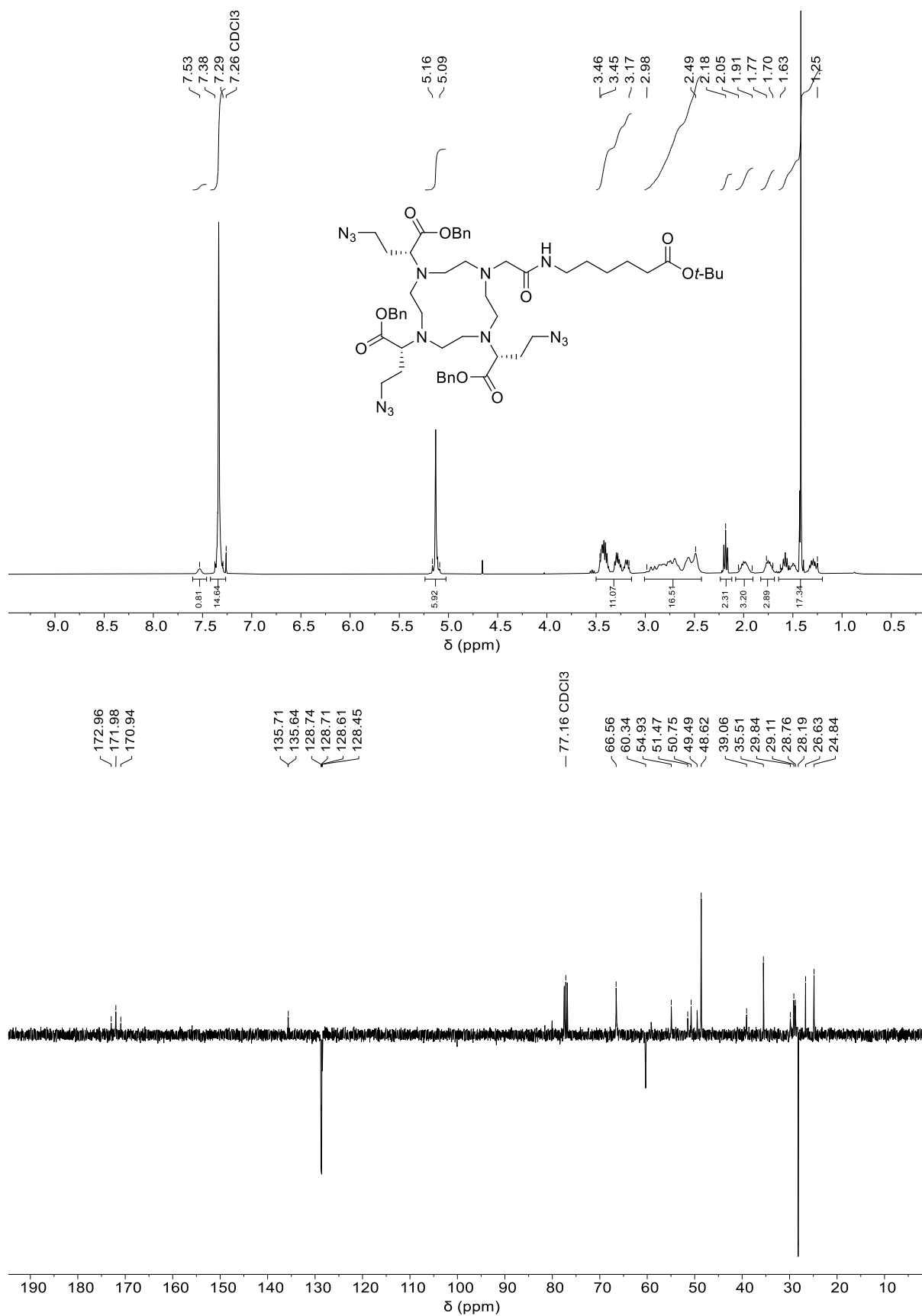
Bn₃DOT3AZA-Ahx-cRGD 32

ZWI₃-DOTA-Ahx-cRGD

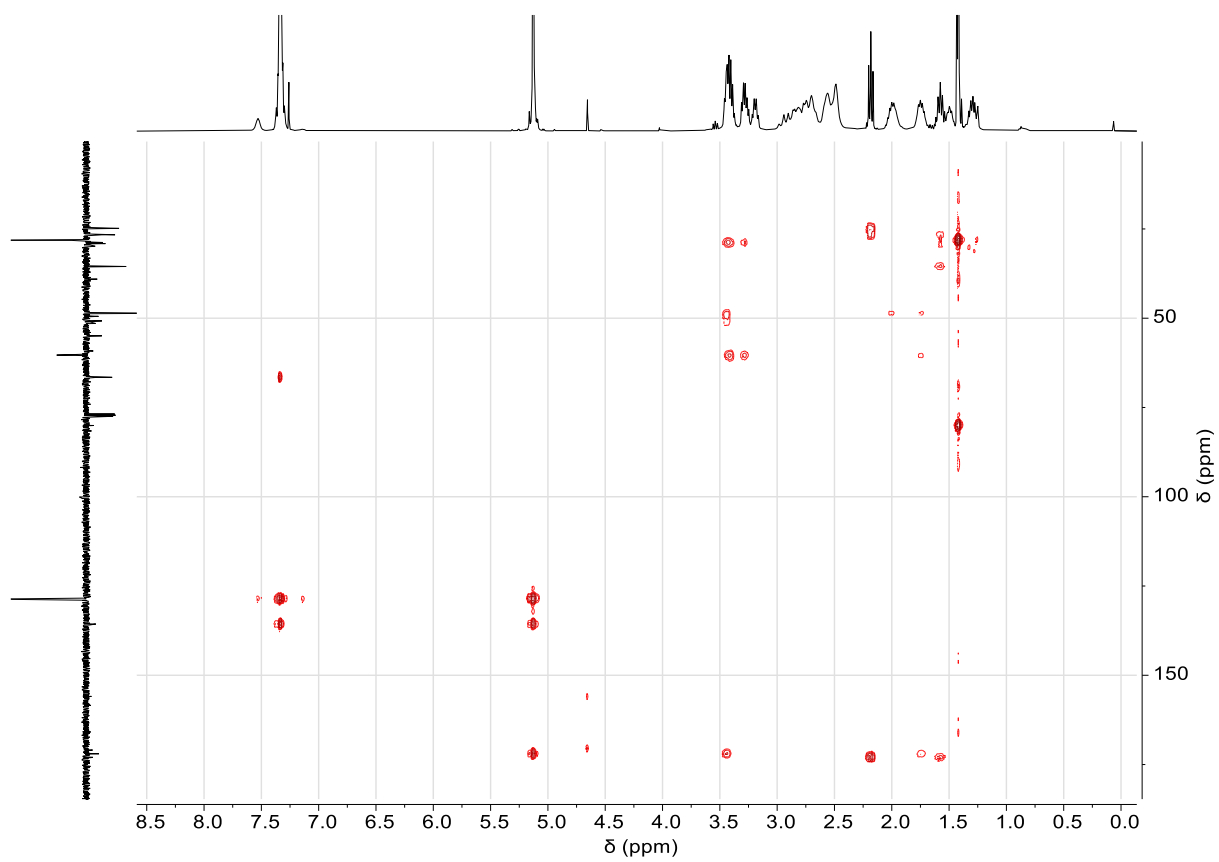
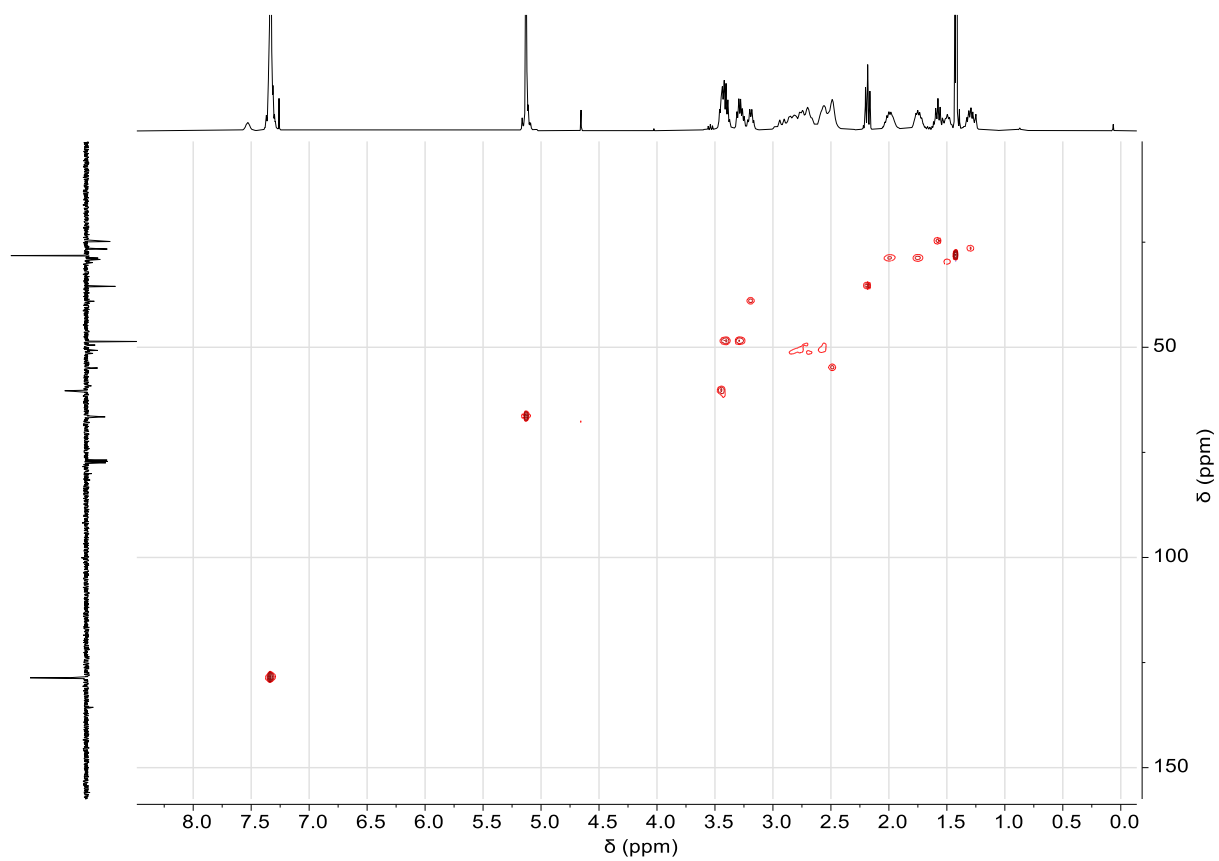


6-(2-bromoacetamido)-hexansäure-*tert*-butylester 35

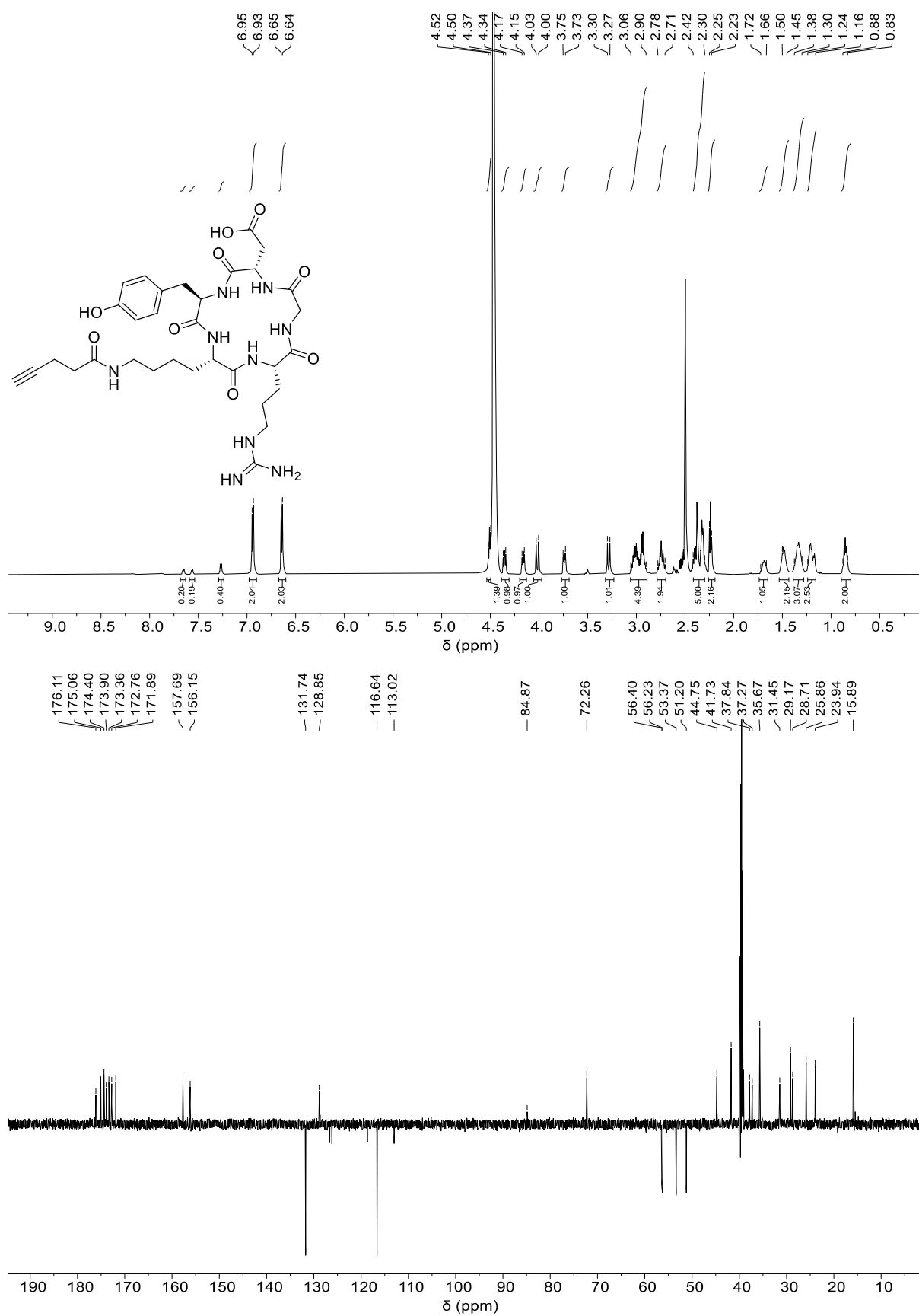
Bn₃DOT3AZA-Ahx-*t*-Bu 36



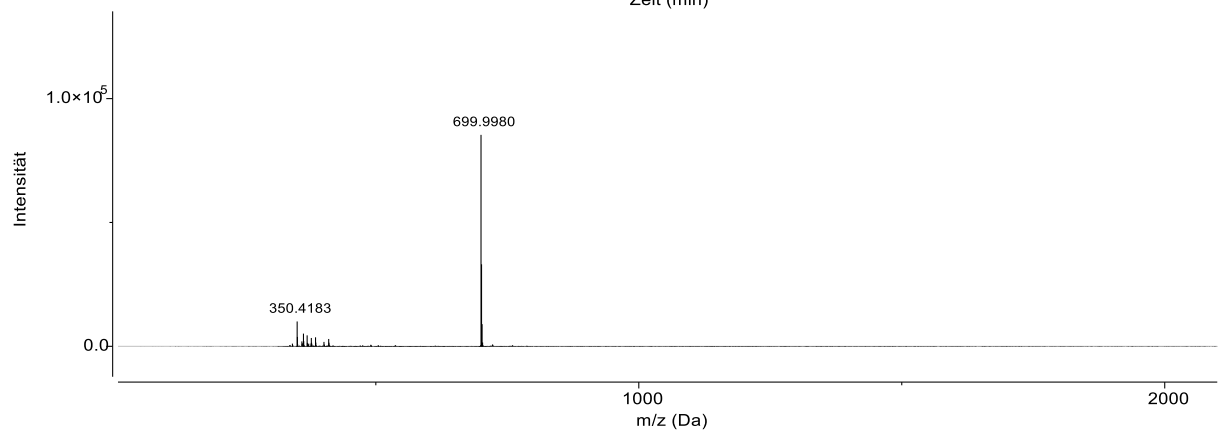
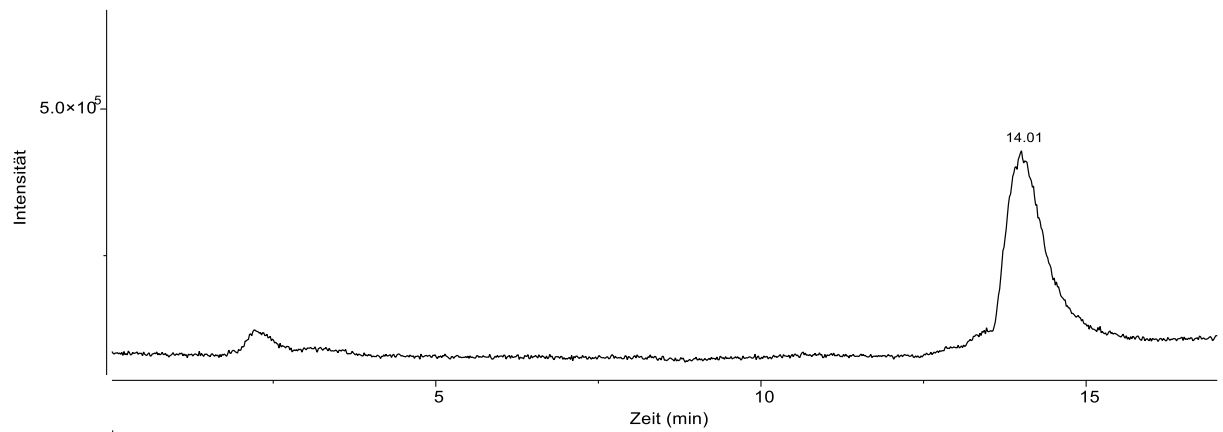
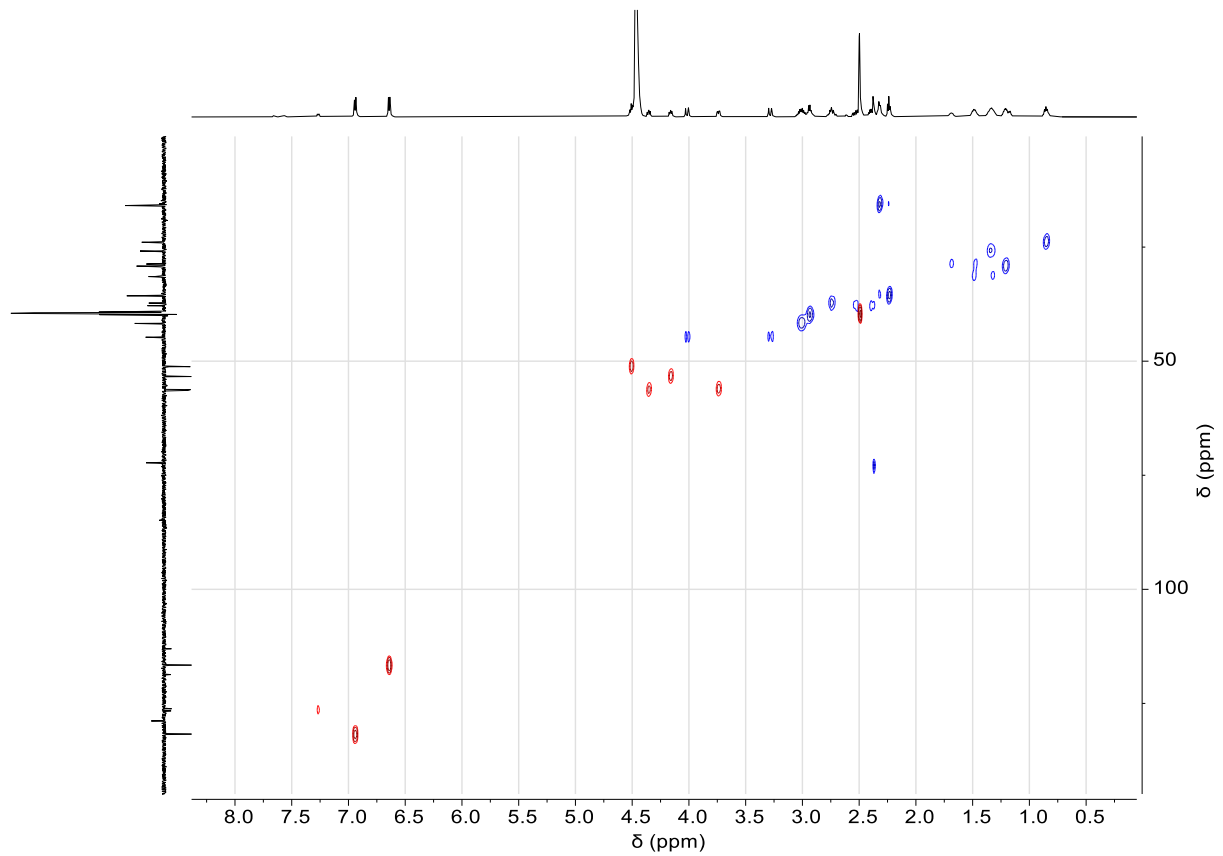
Anhang



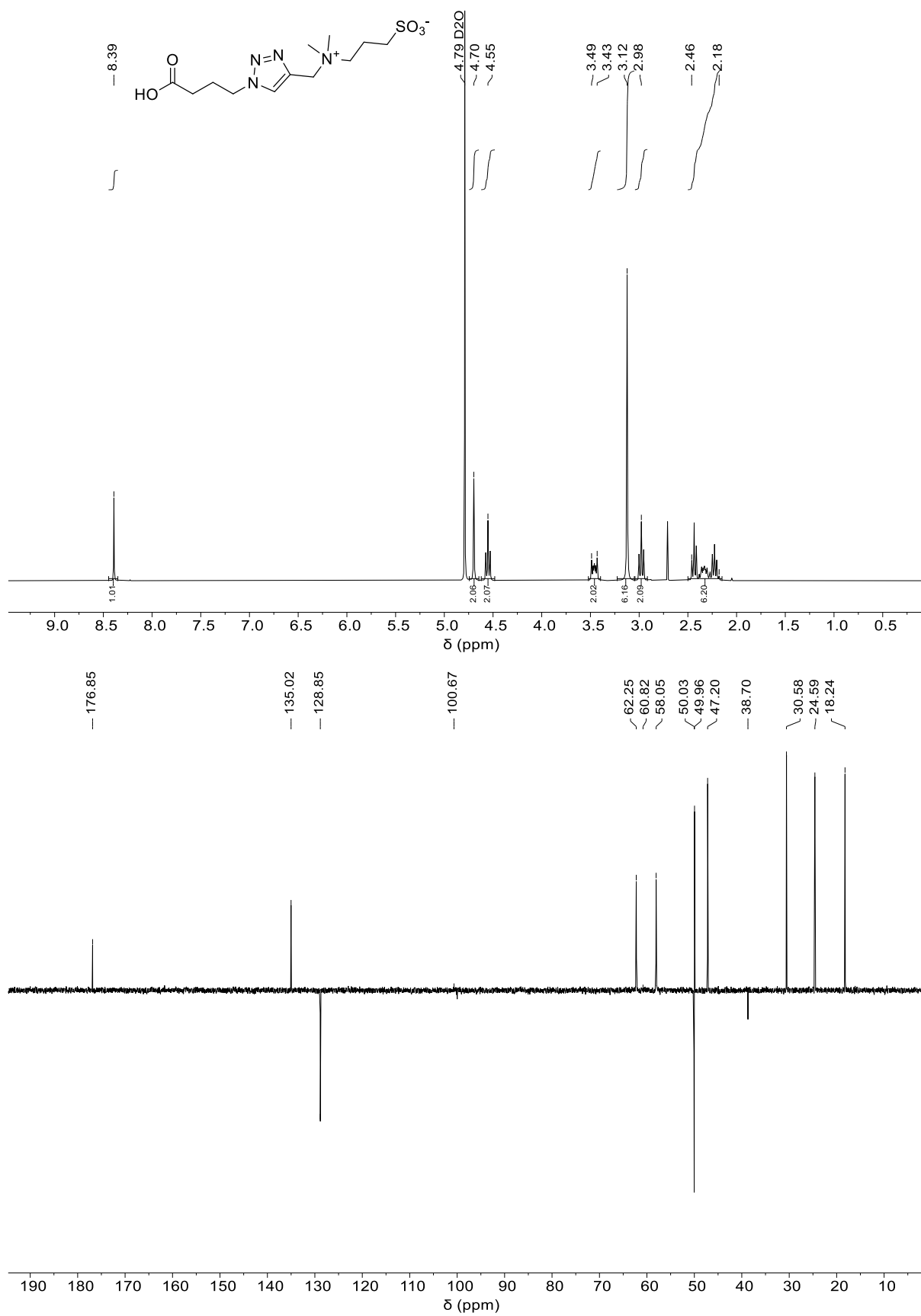
PA-cRGD 47

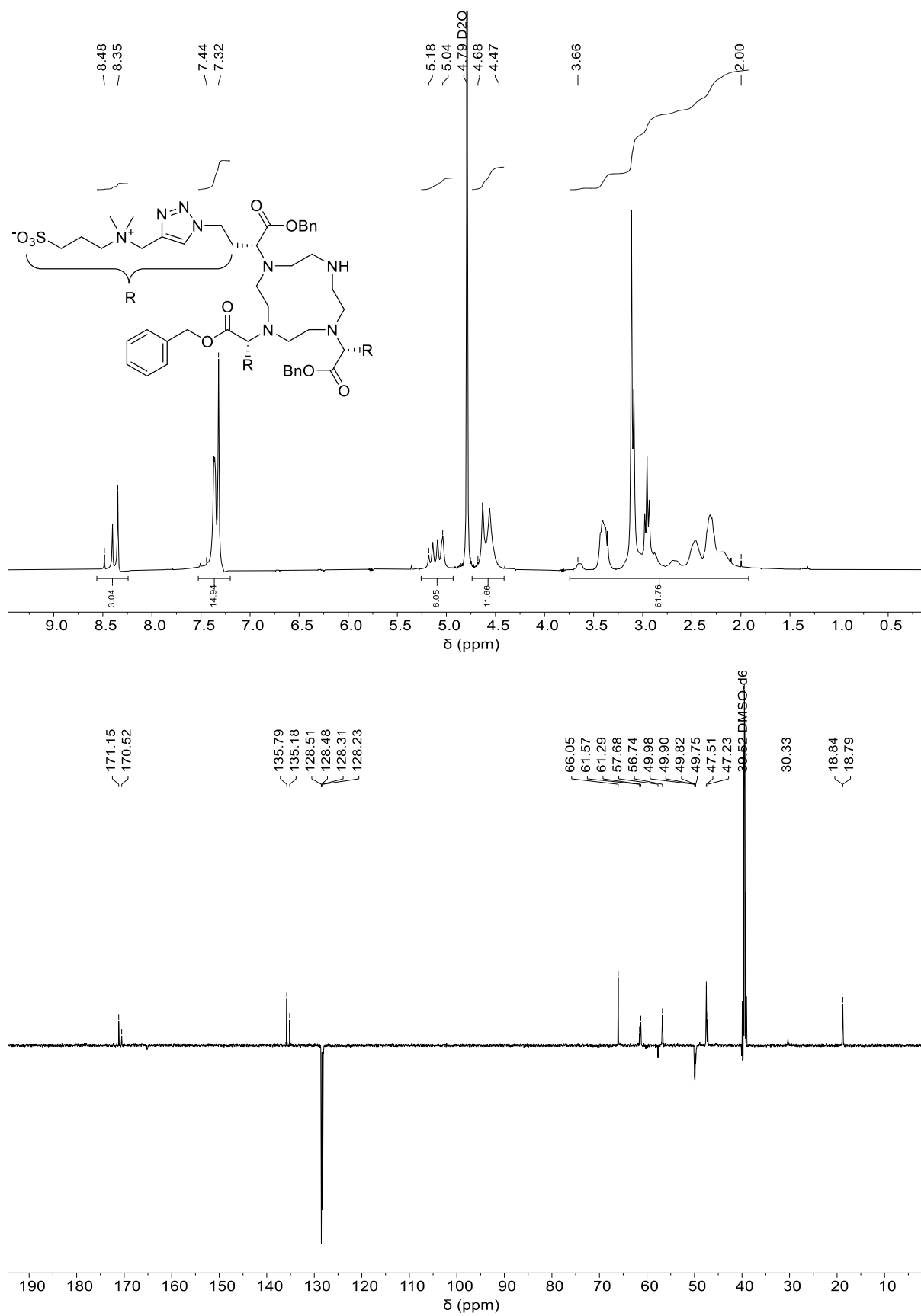


Anhang

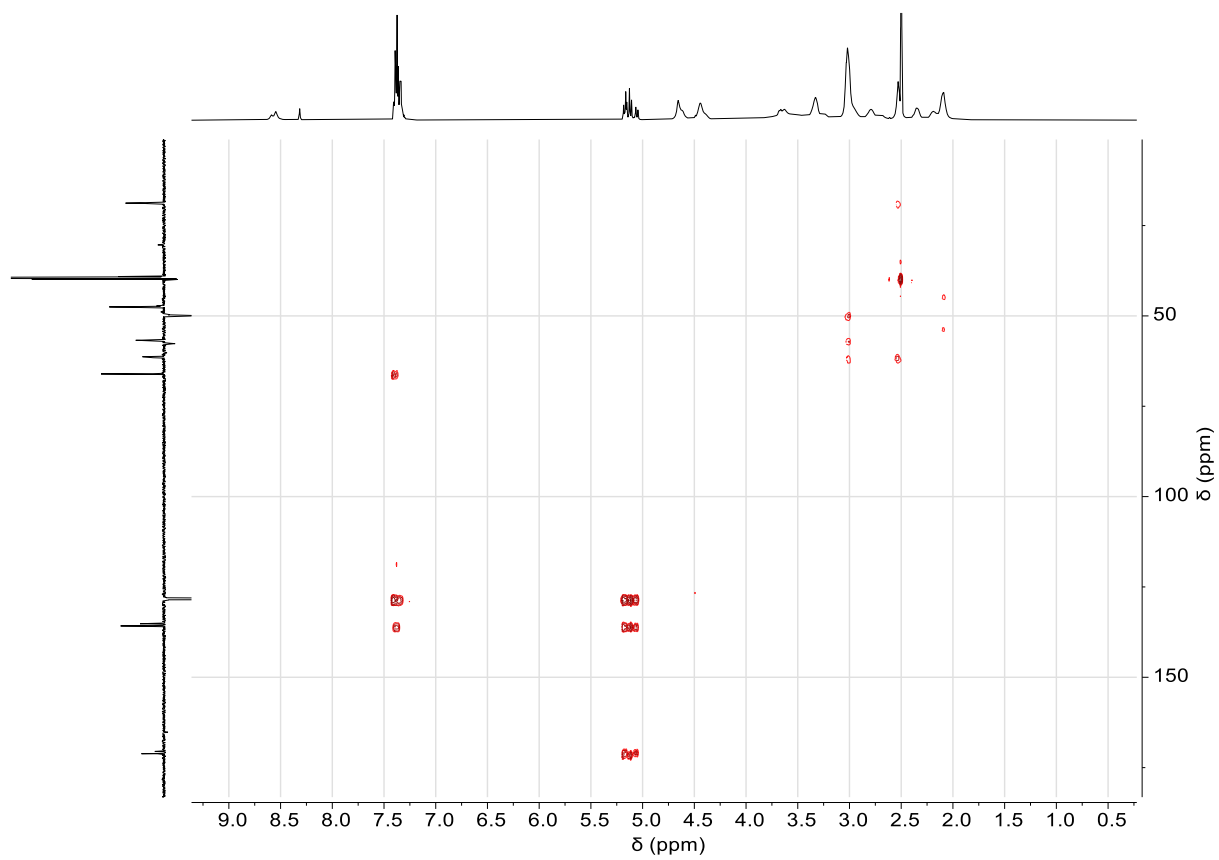
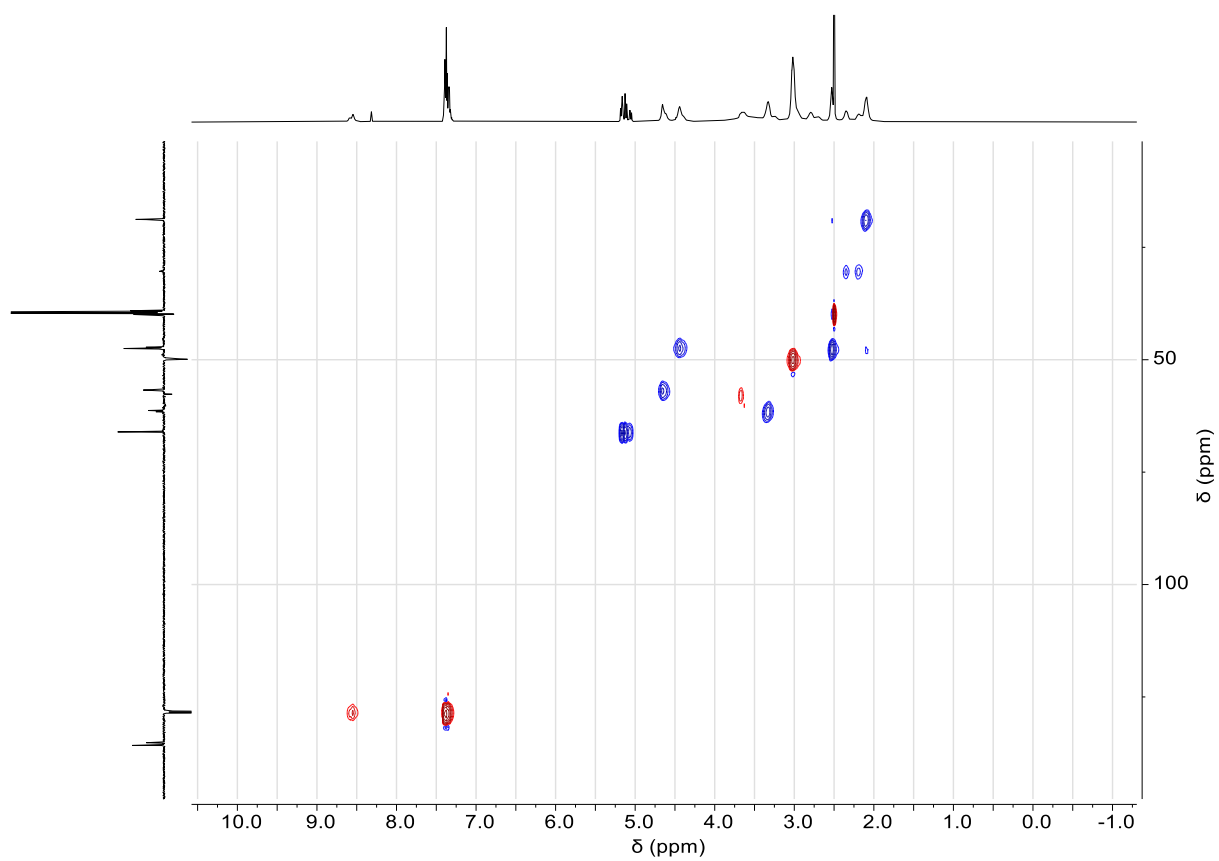


Zwitterion-Buttersäure 39



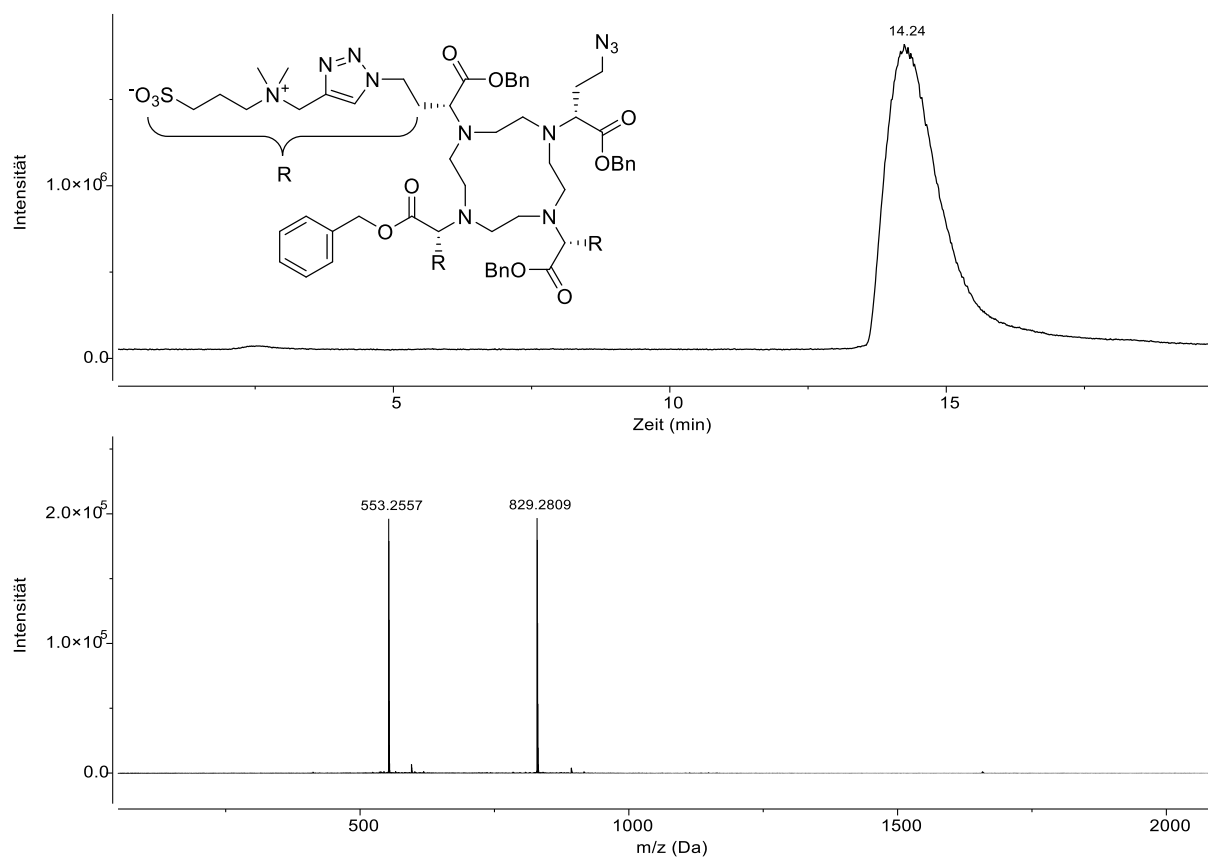
ZWI₃-Bn₃DO3A 44

Anhang

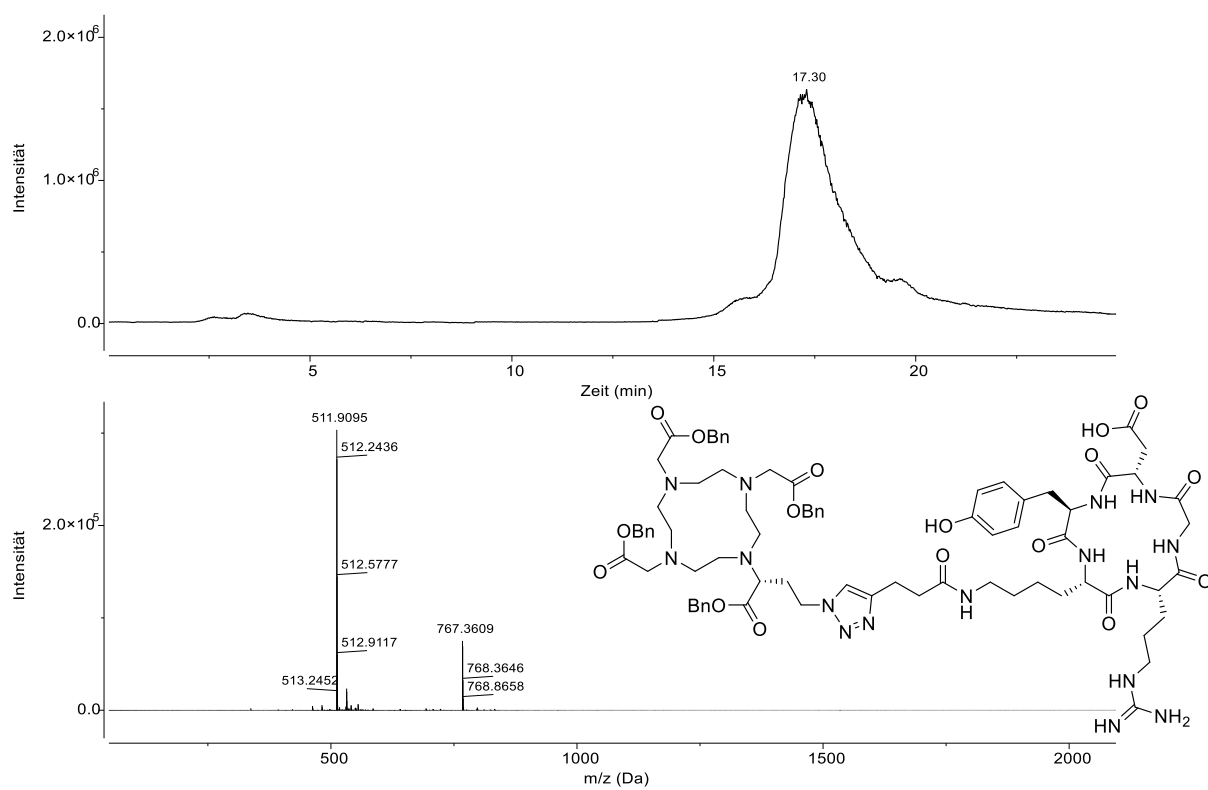


Anhang

ZWI₃-Bn₄DOT1AZA 41

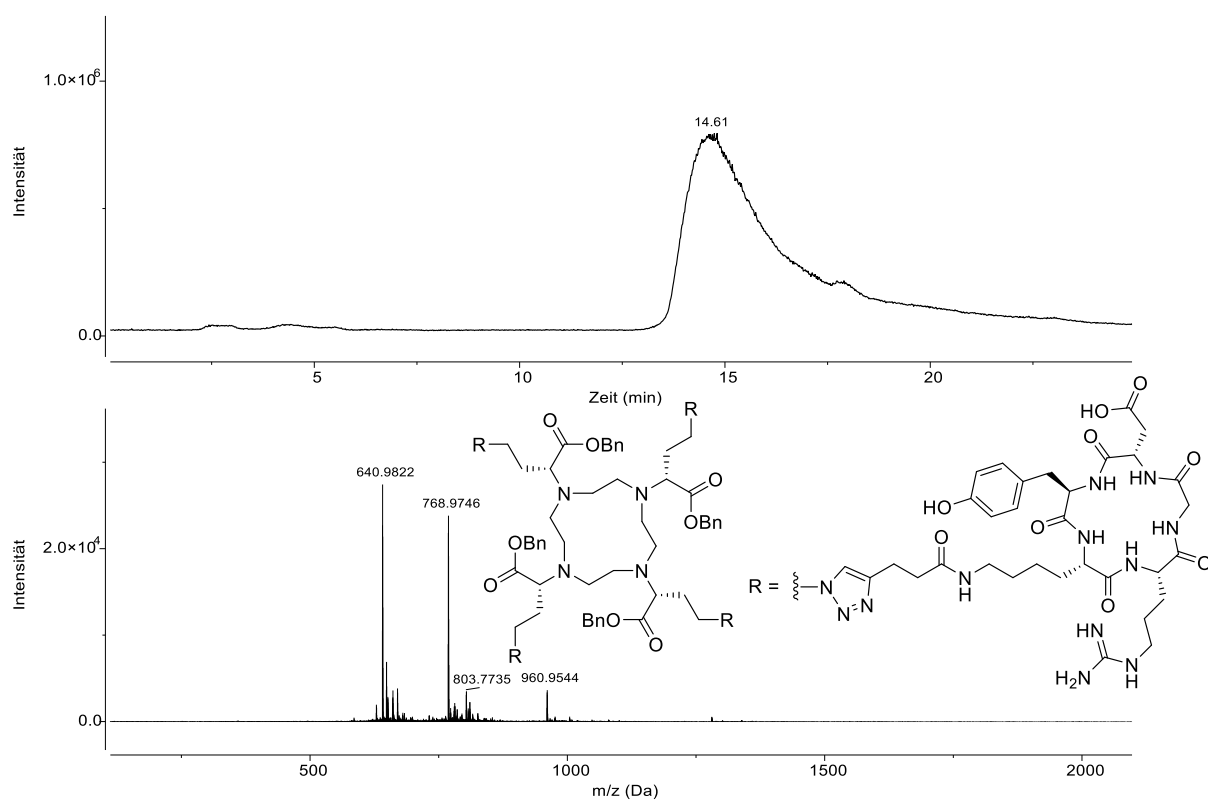


cRGD-Bn₄DOTA

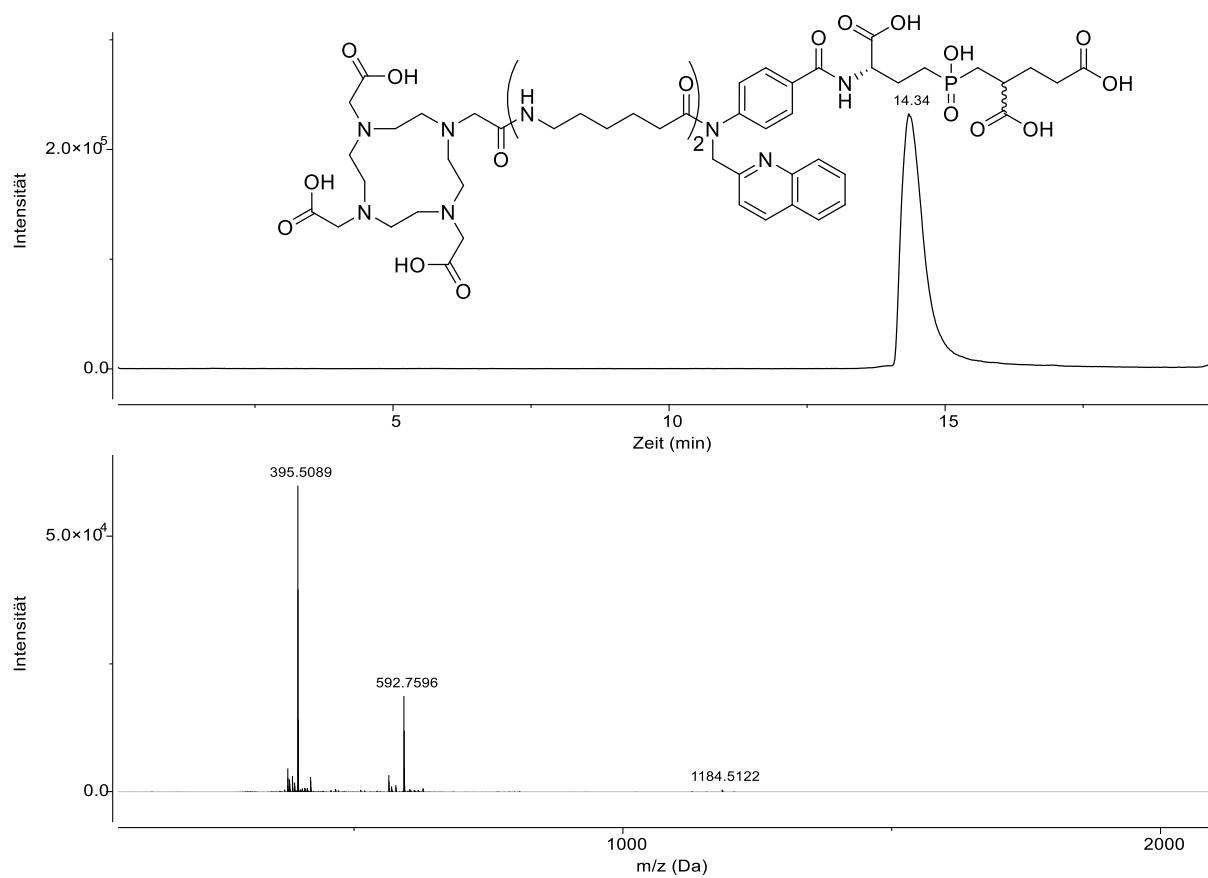


Anhang

cRGD₄-Bn4DOTA

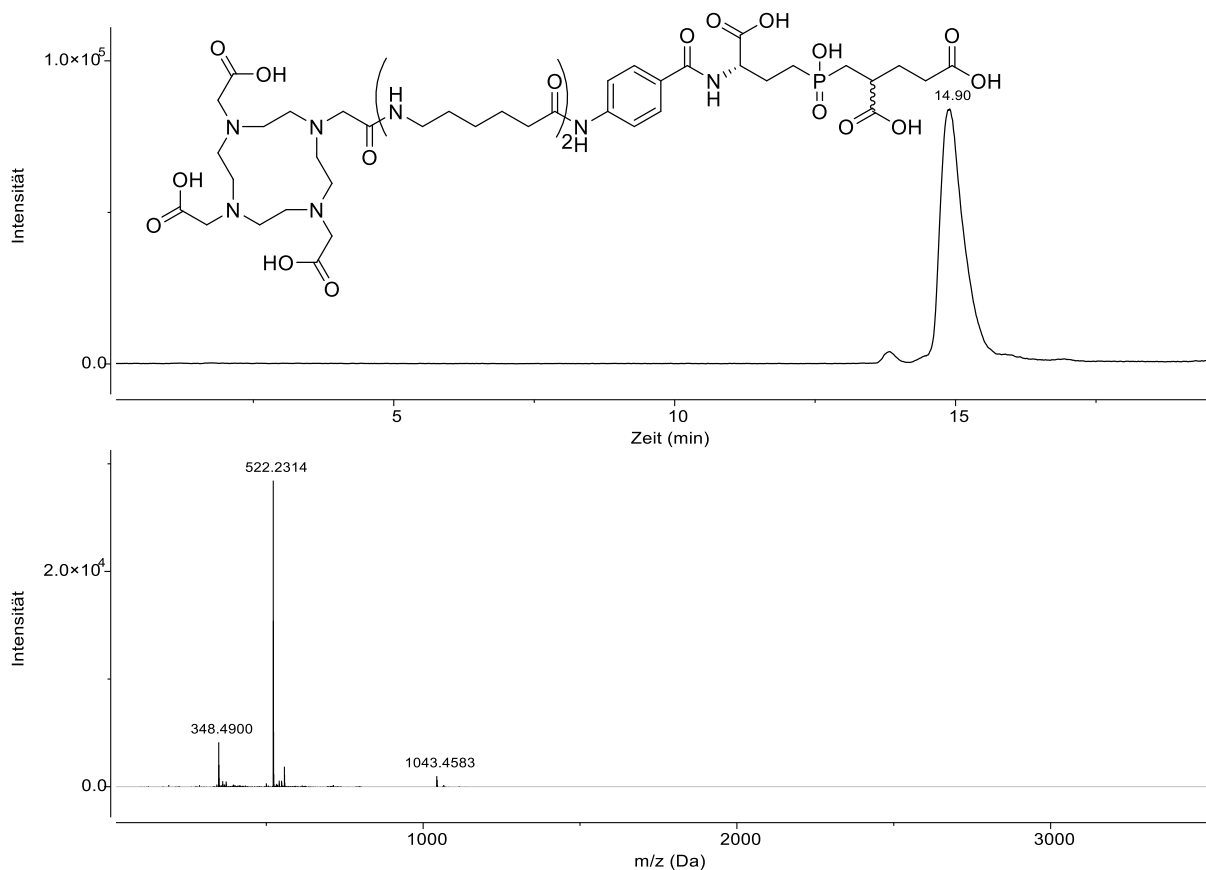


DOTA-FR388

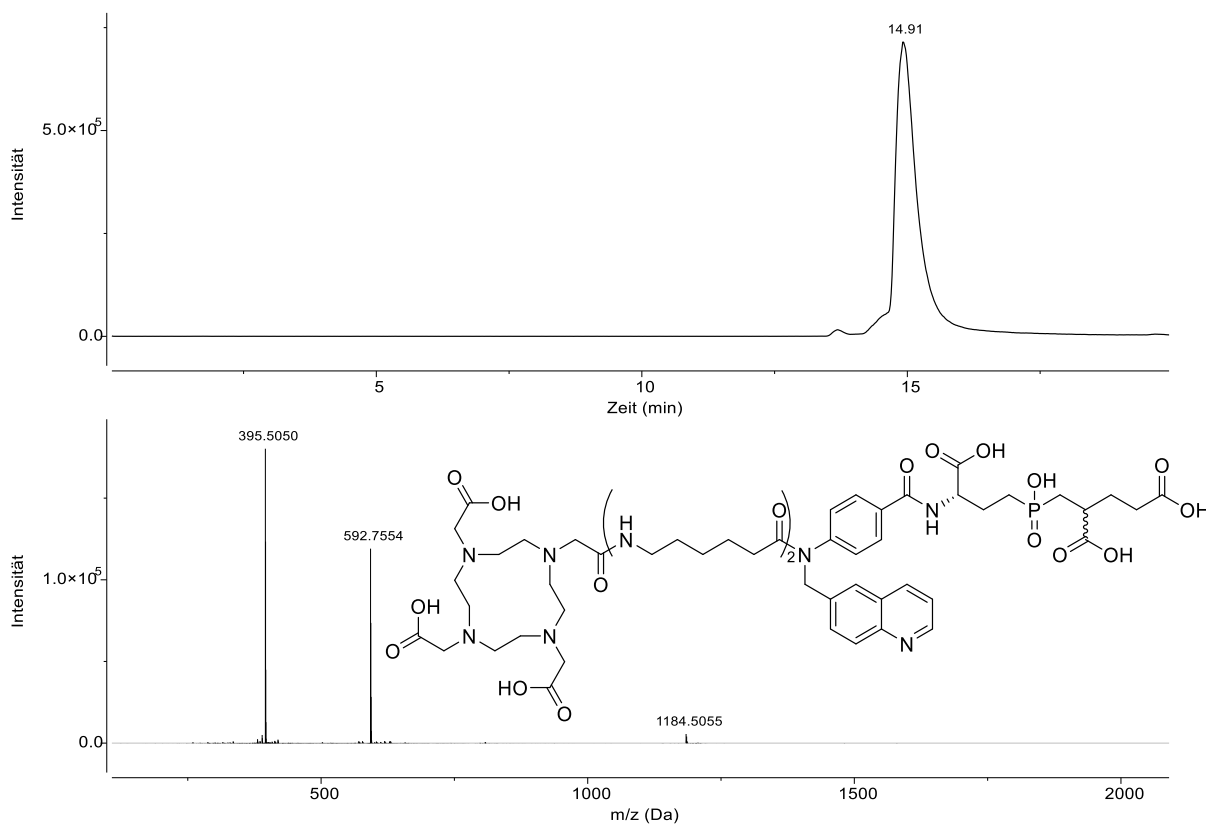


Anhang

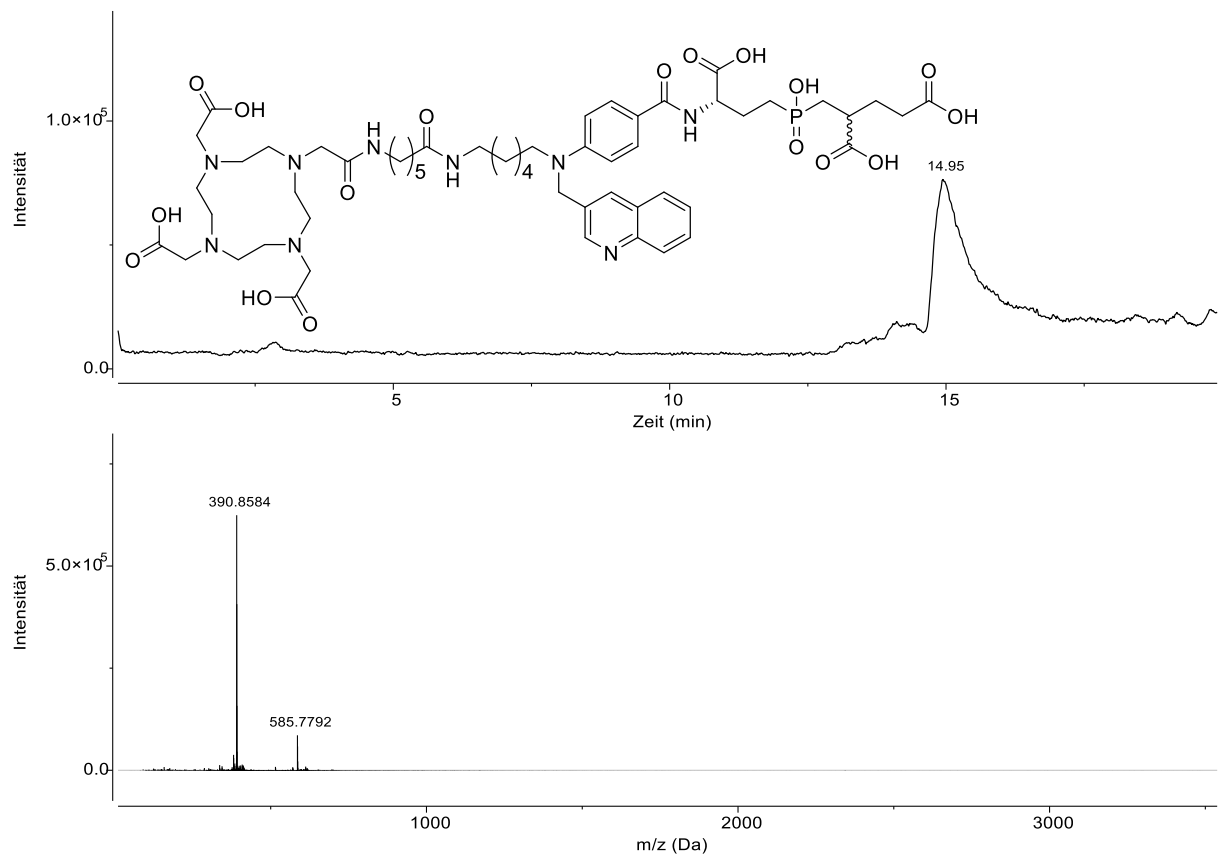
DOTA-Fol-GPI



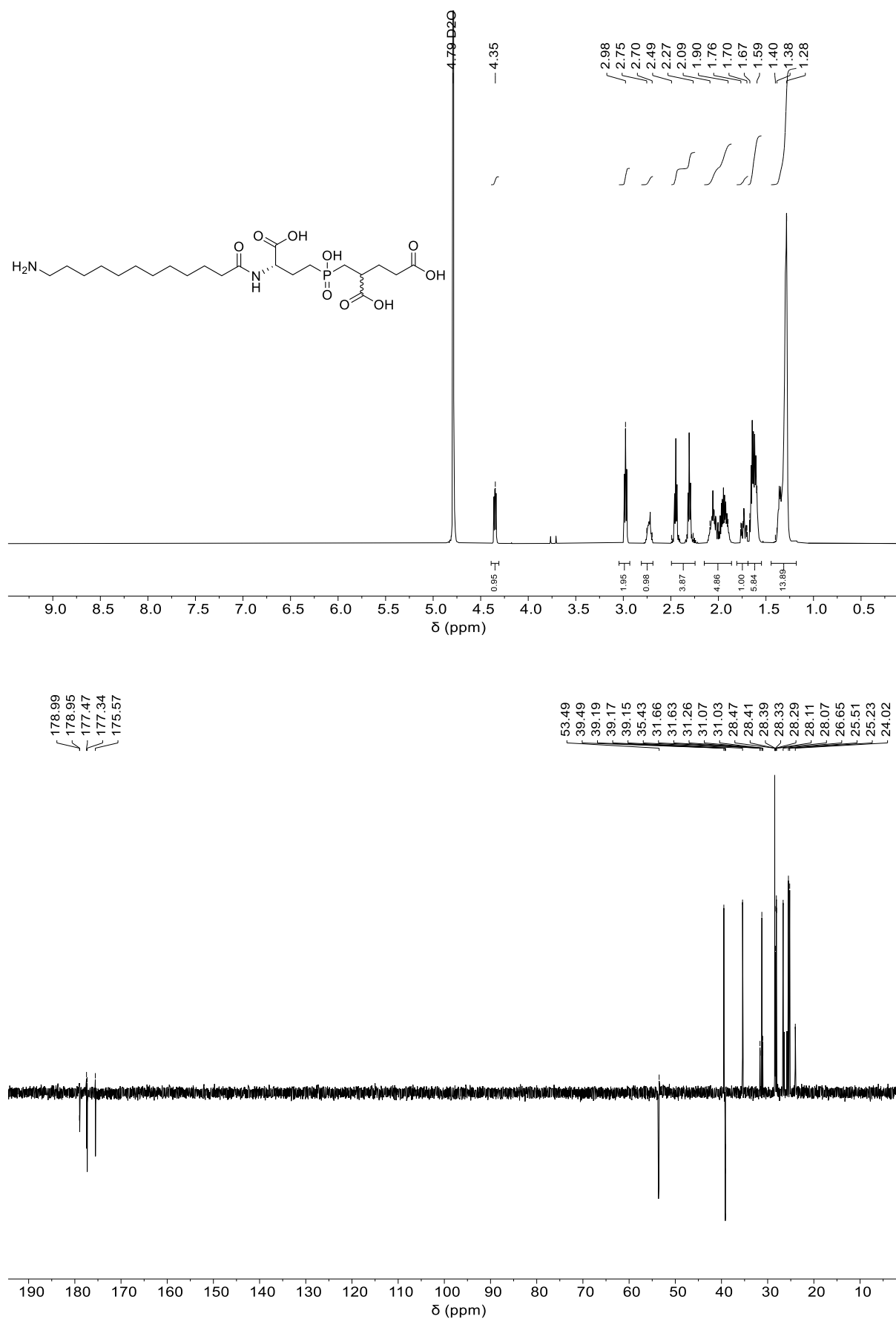
DOTA-FR371D



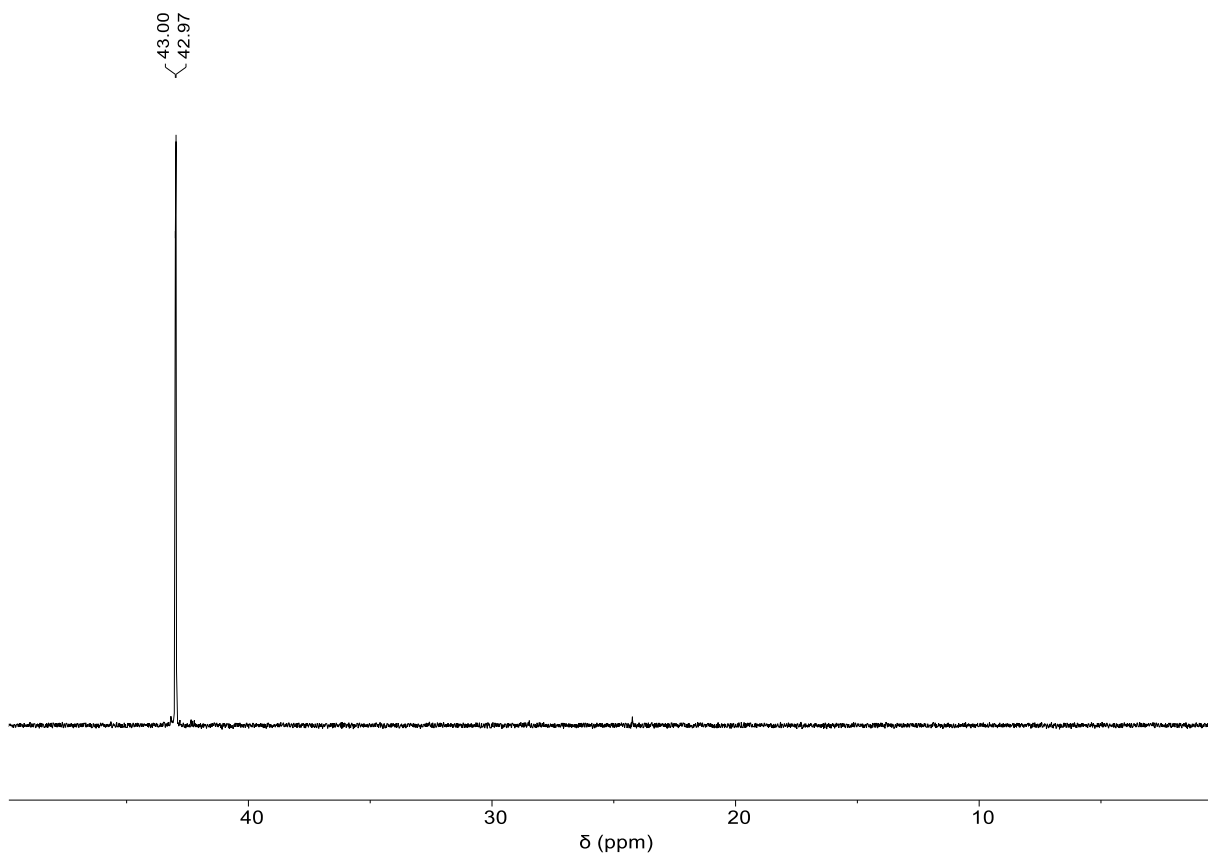
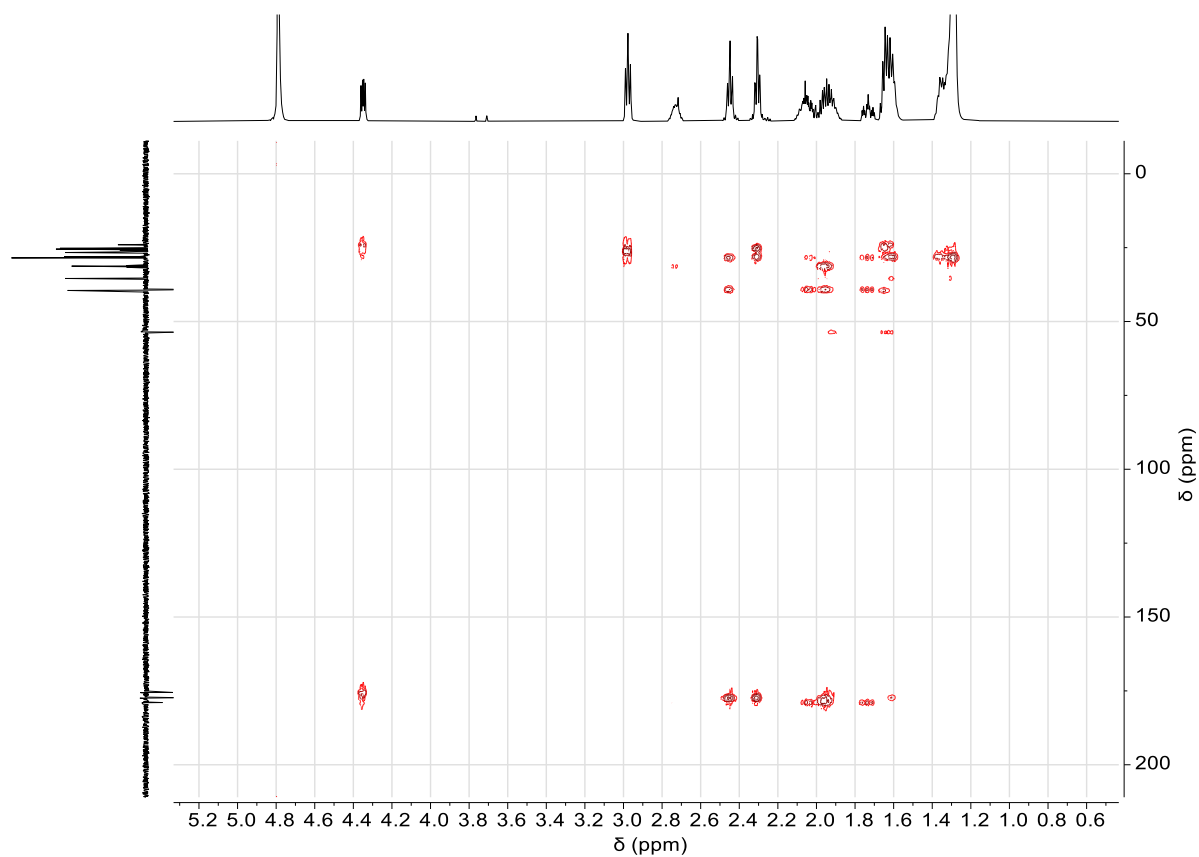
DOTA-NP188



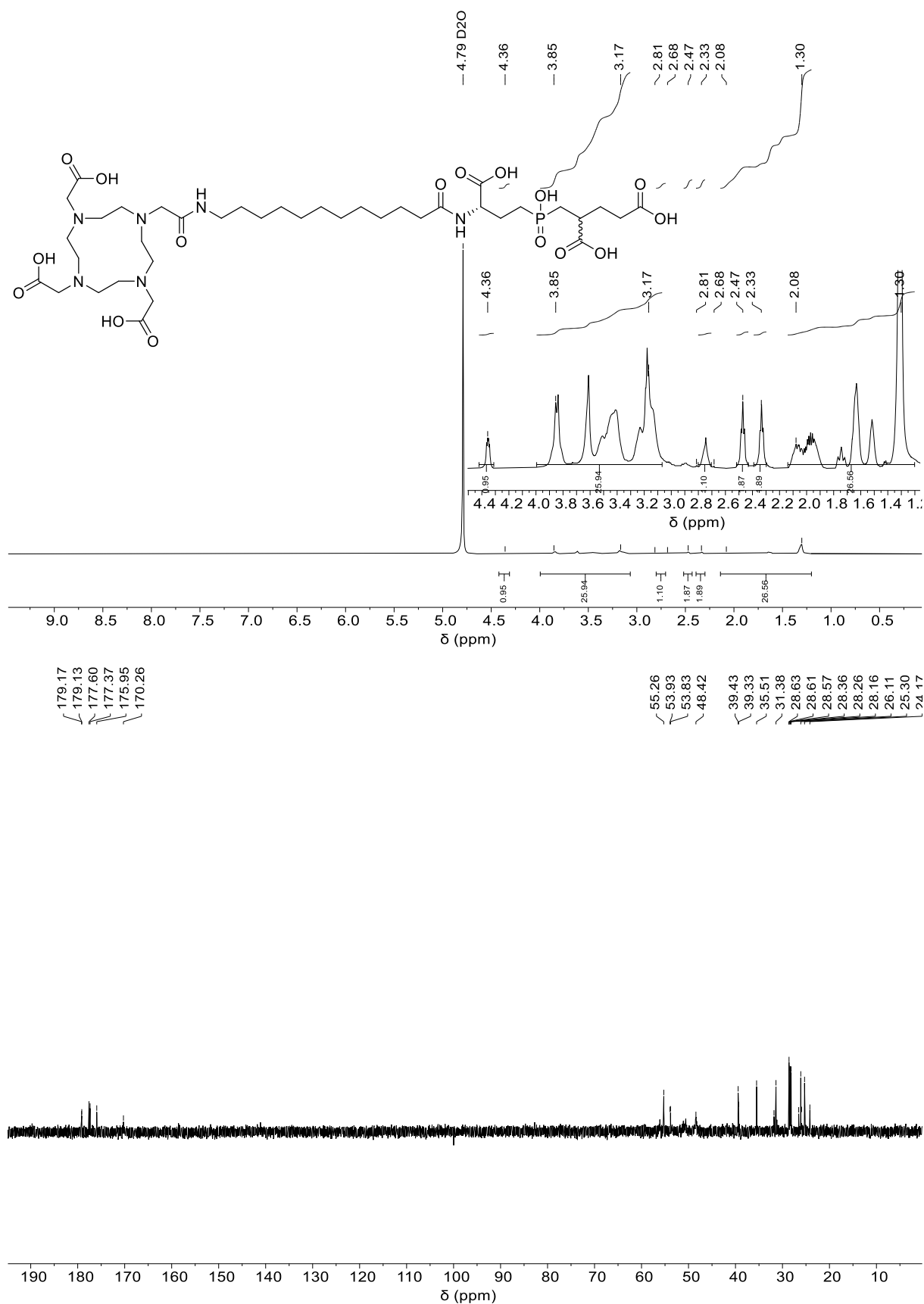
Ads-GPI 65



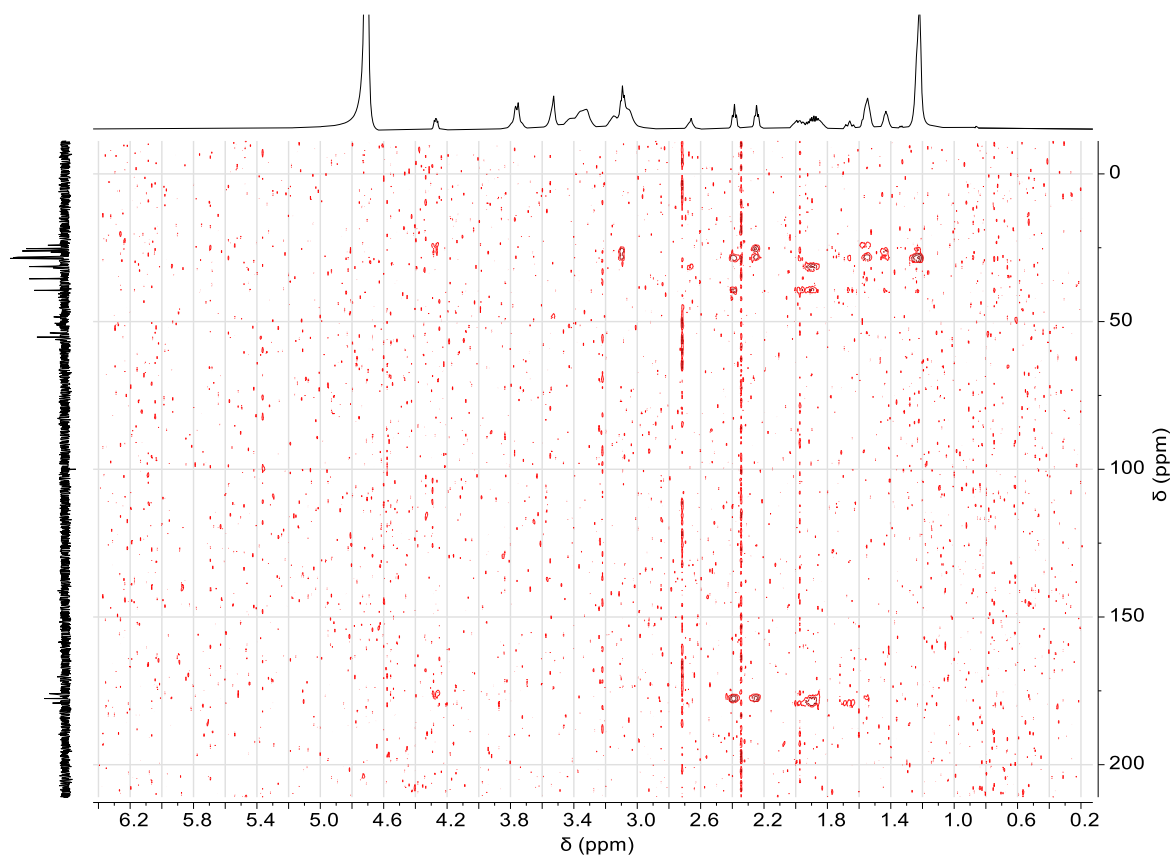
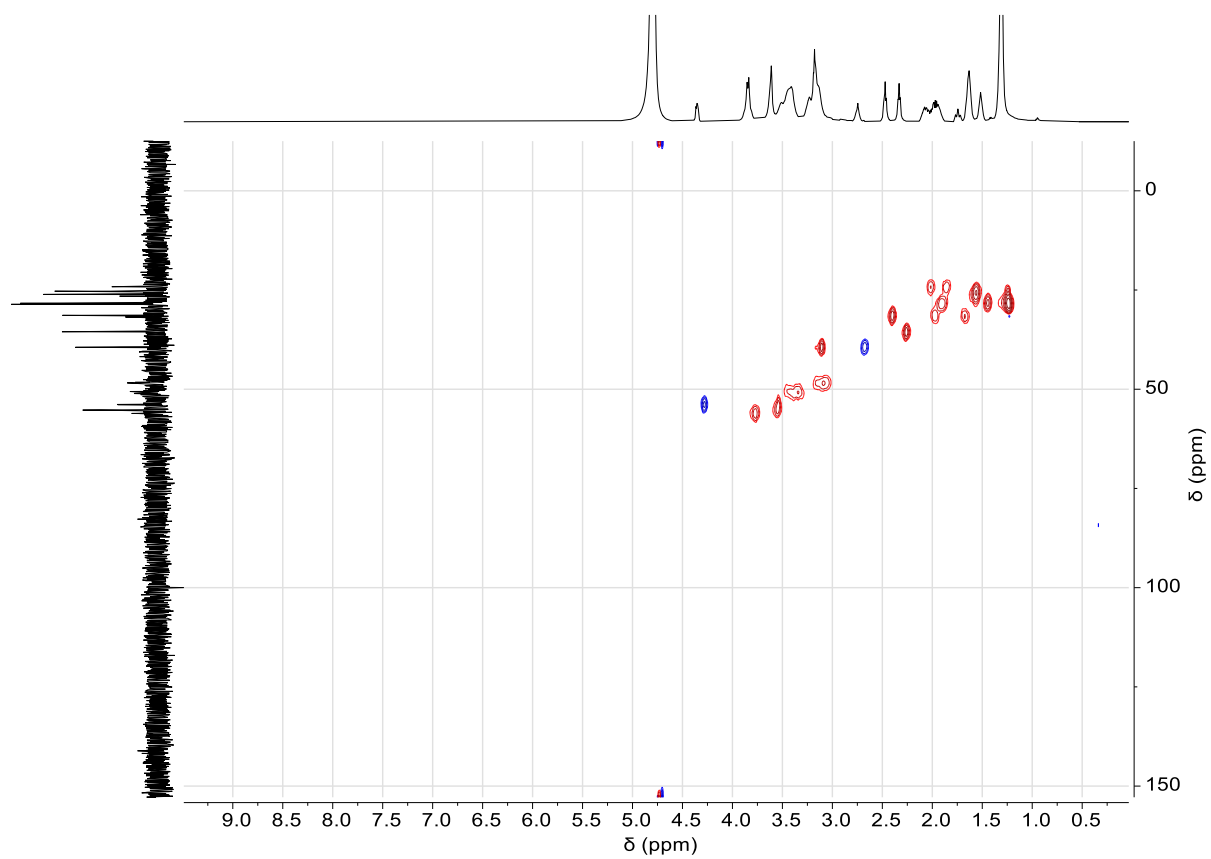
Anhang



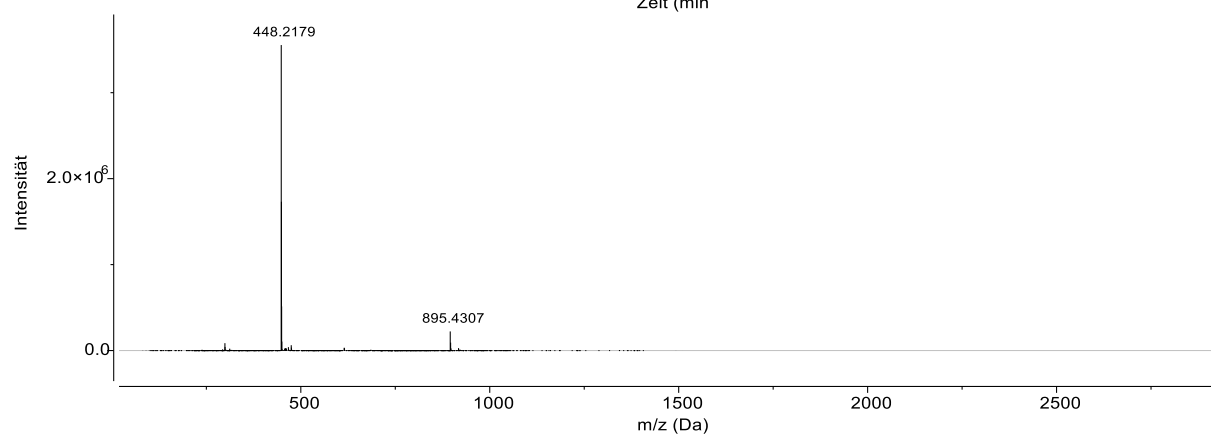
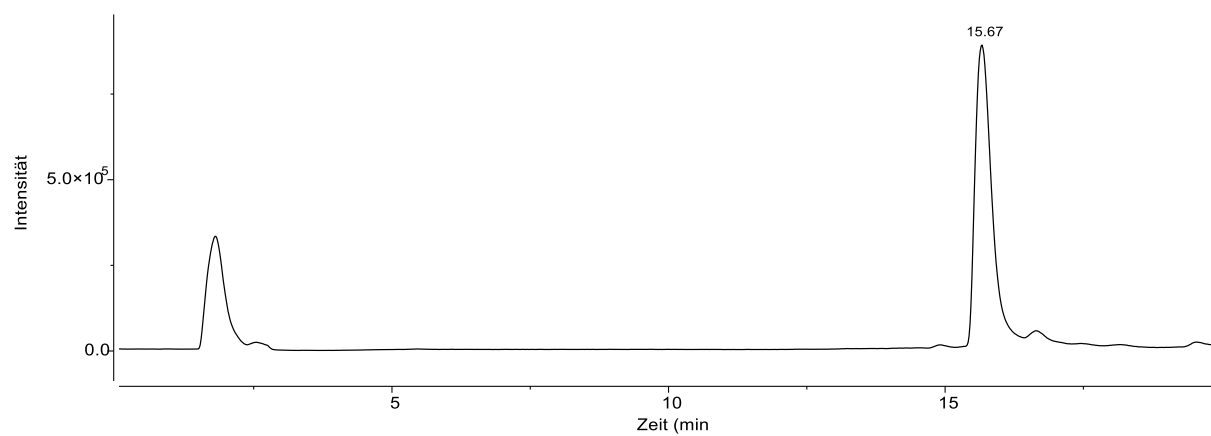
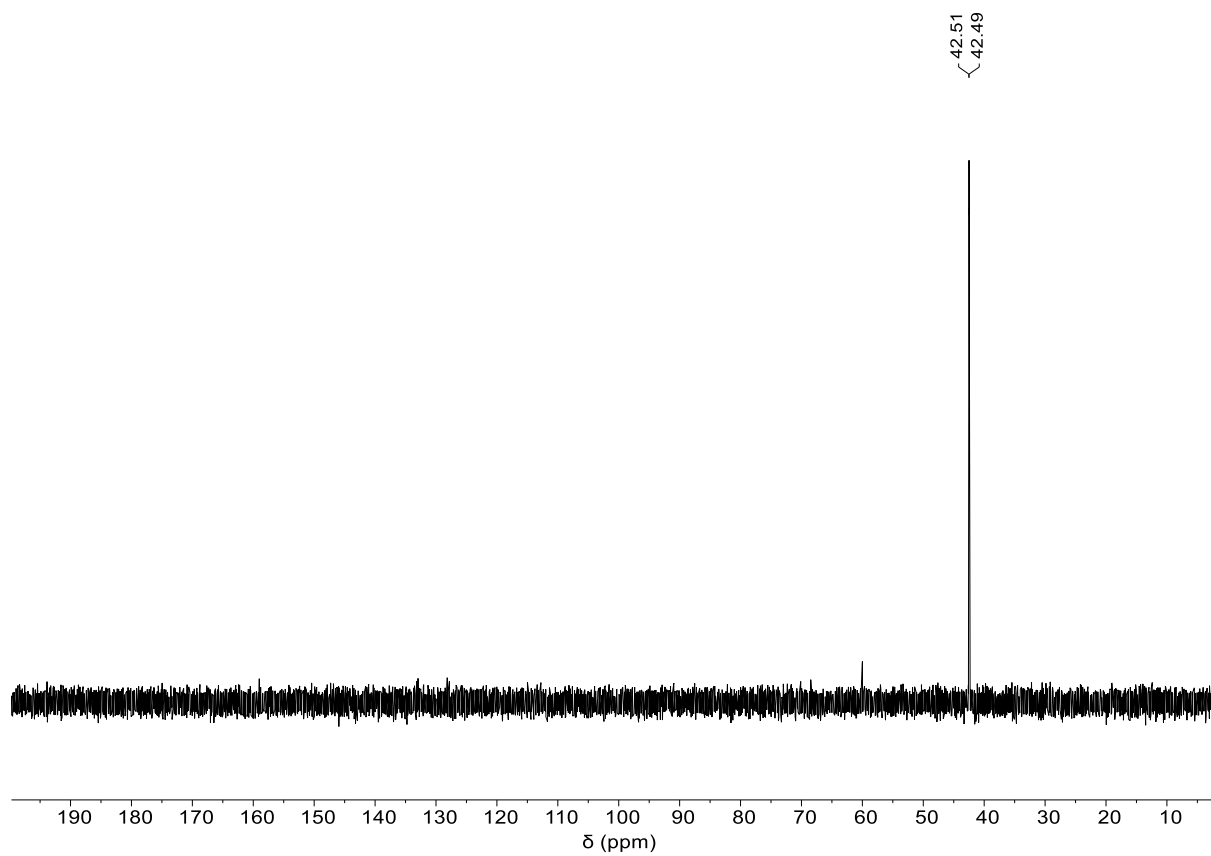
DOTA-Ads-GPI



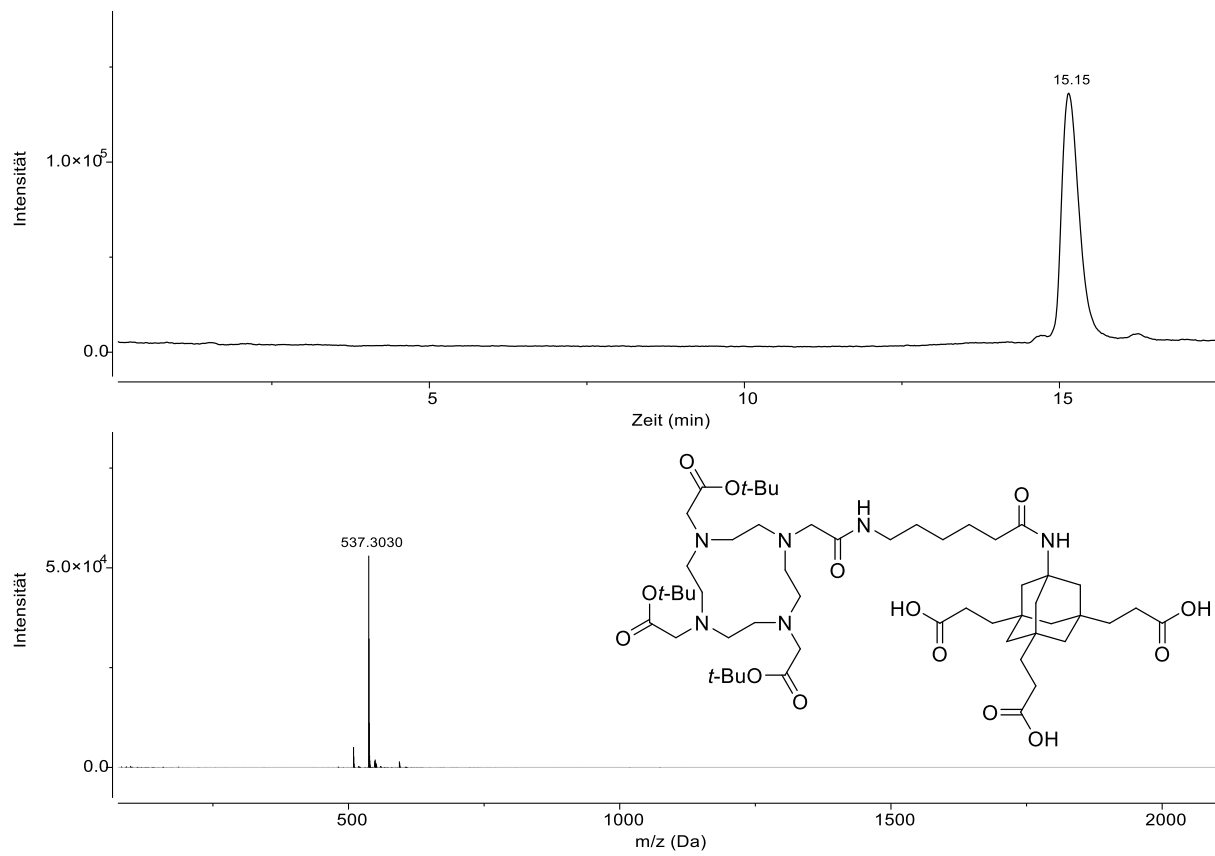
Anhang

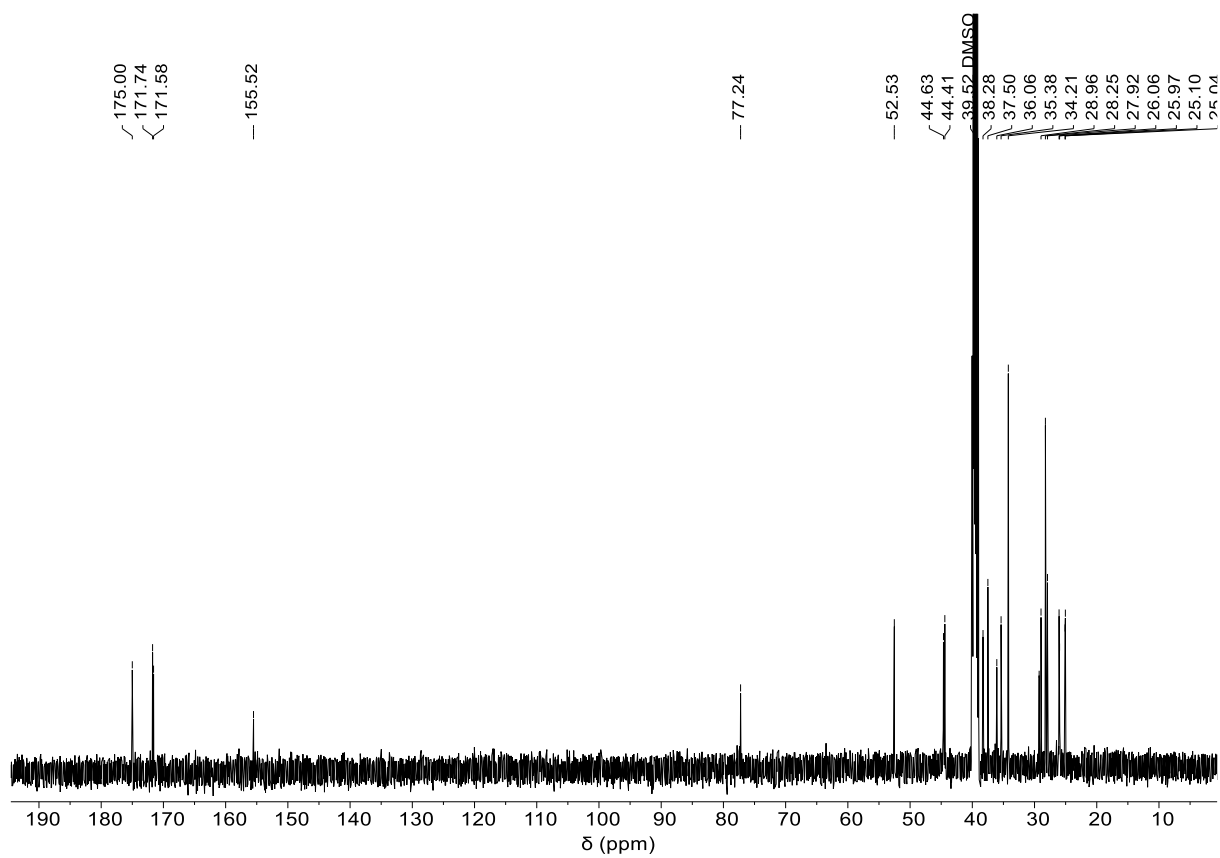
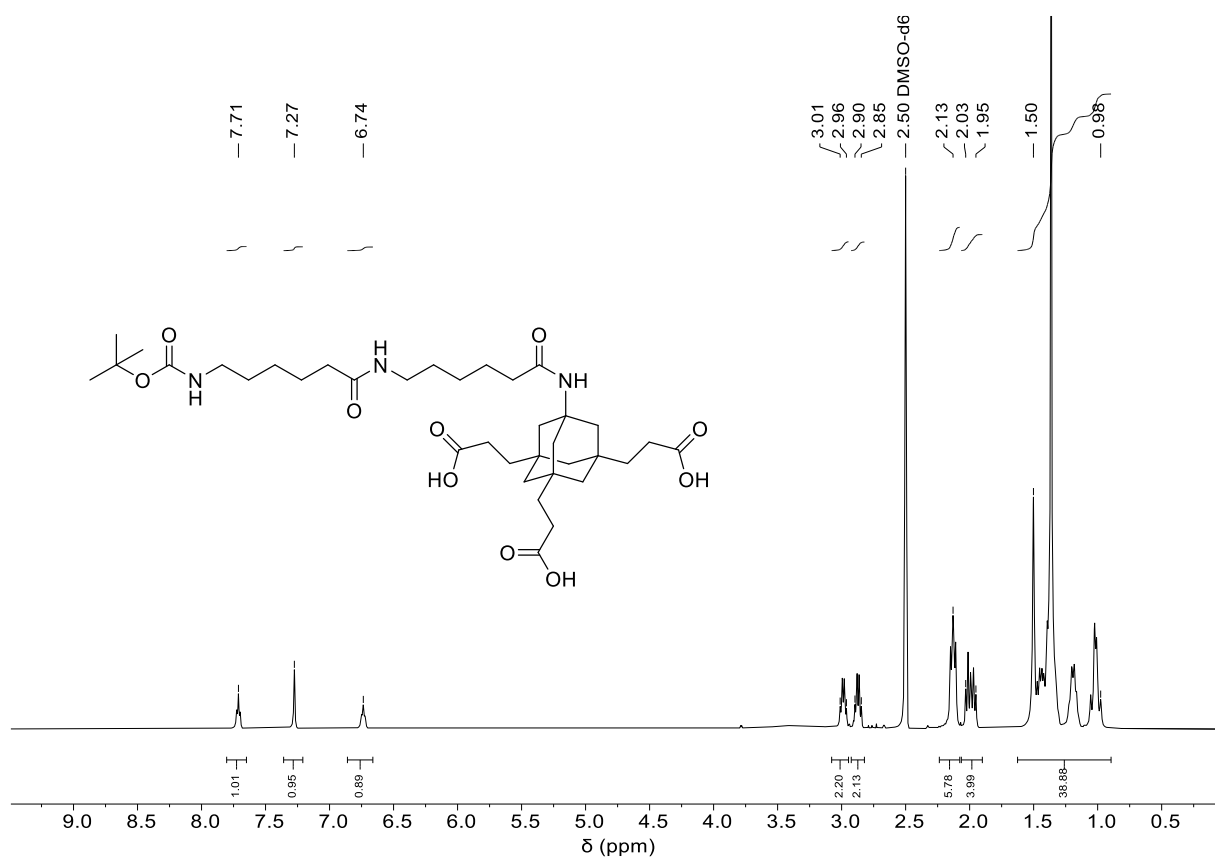


Anhang

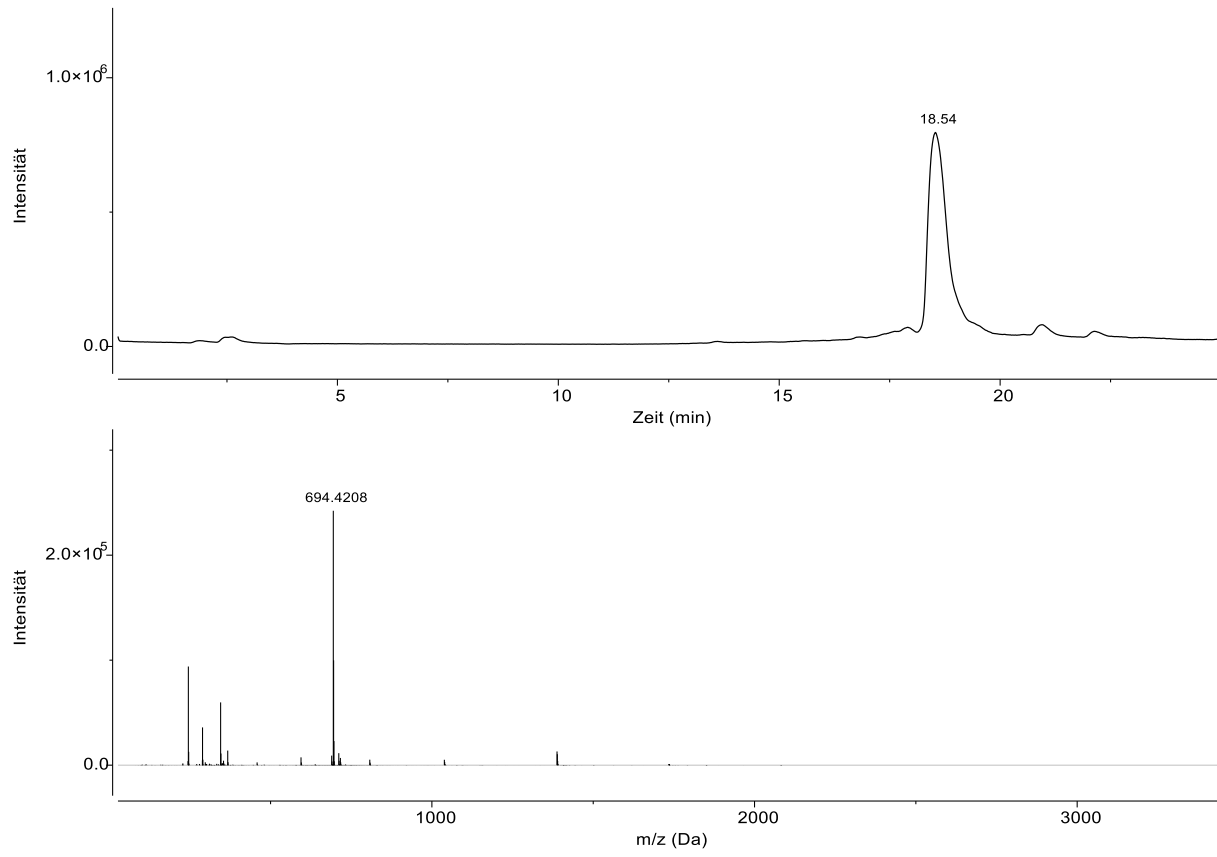


***t*-Bu₃DOTA-Ahx-Ad 71**



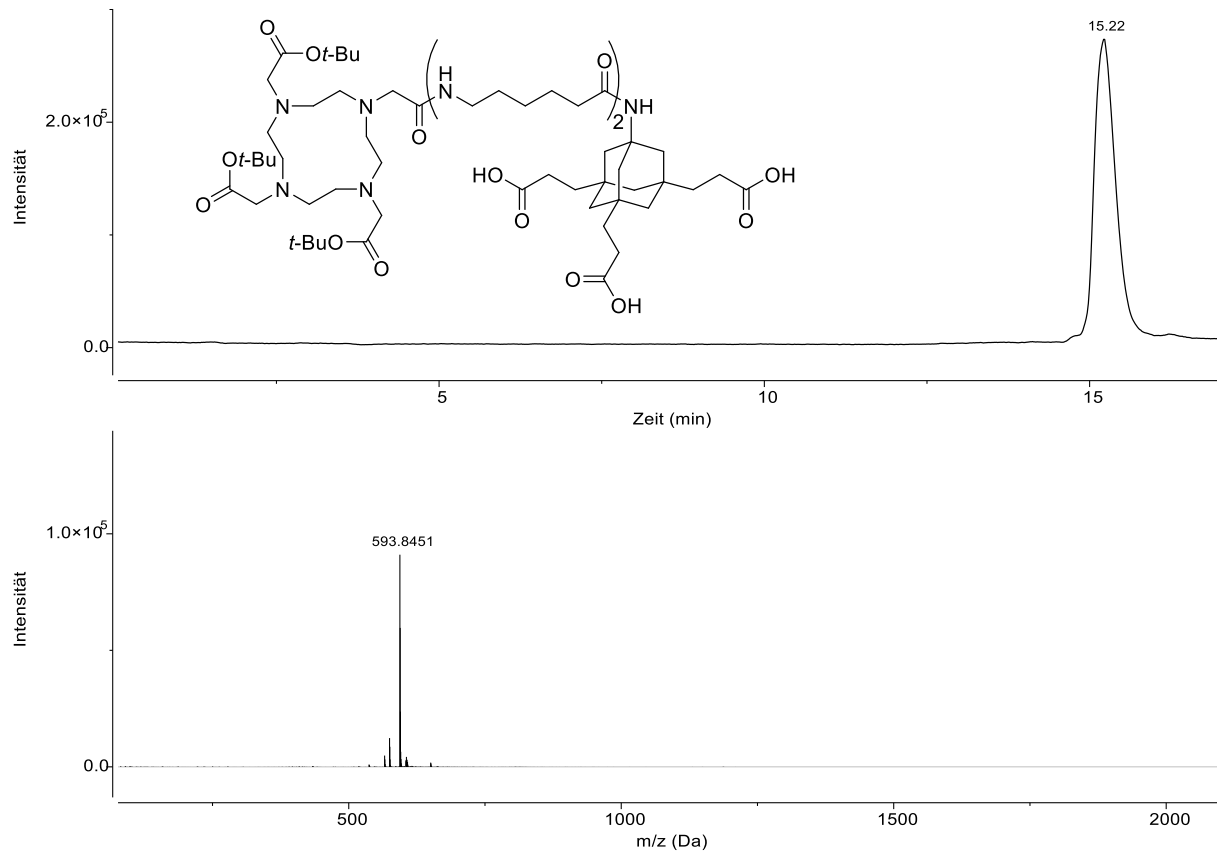
Boc-Ahx₂-Ad 72

Anhang



Anhang

t-Bu₃DOTA-Ahx₂-Ad 73



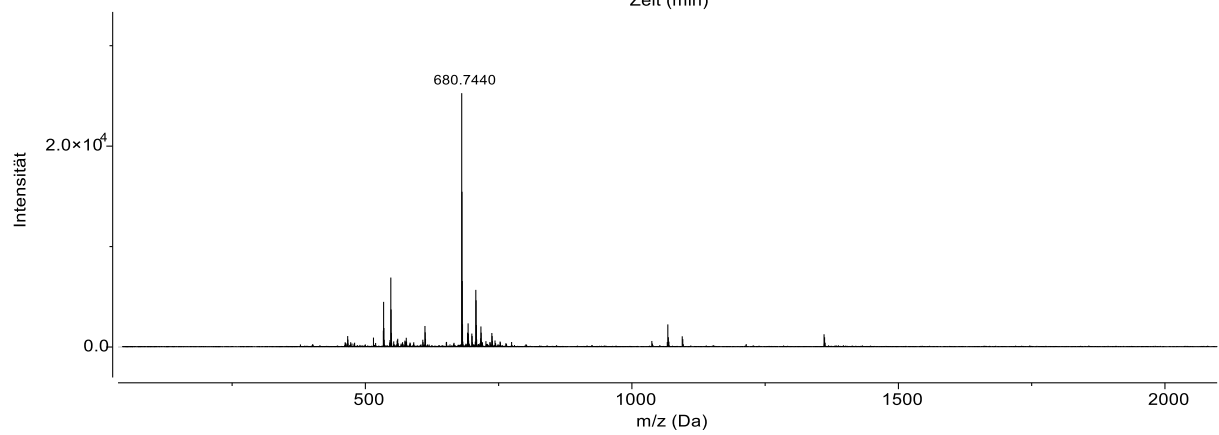
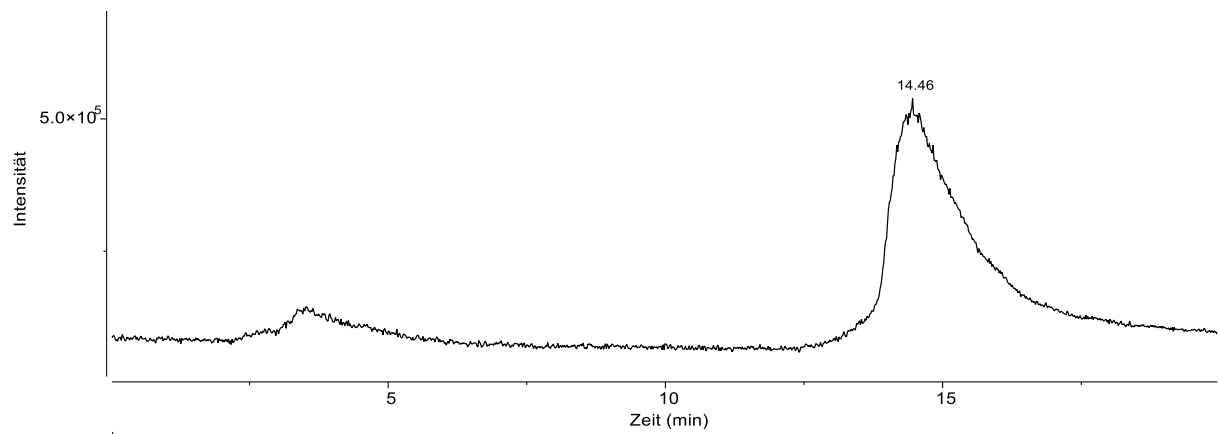
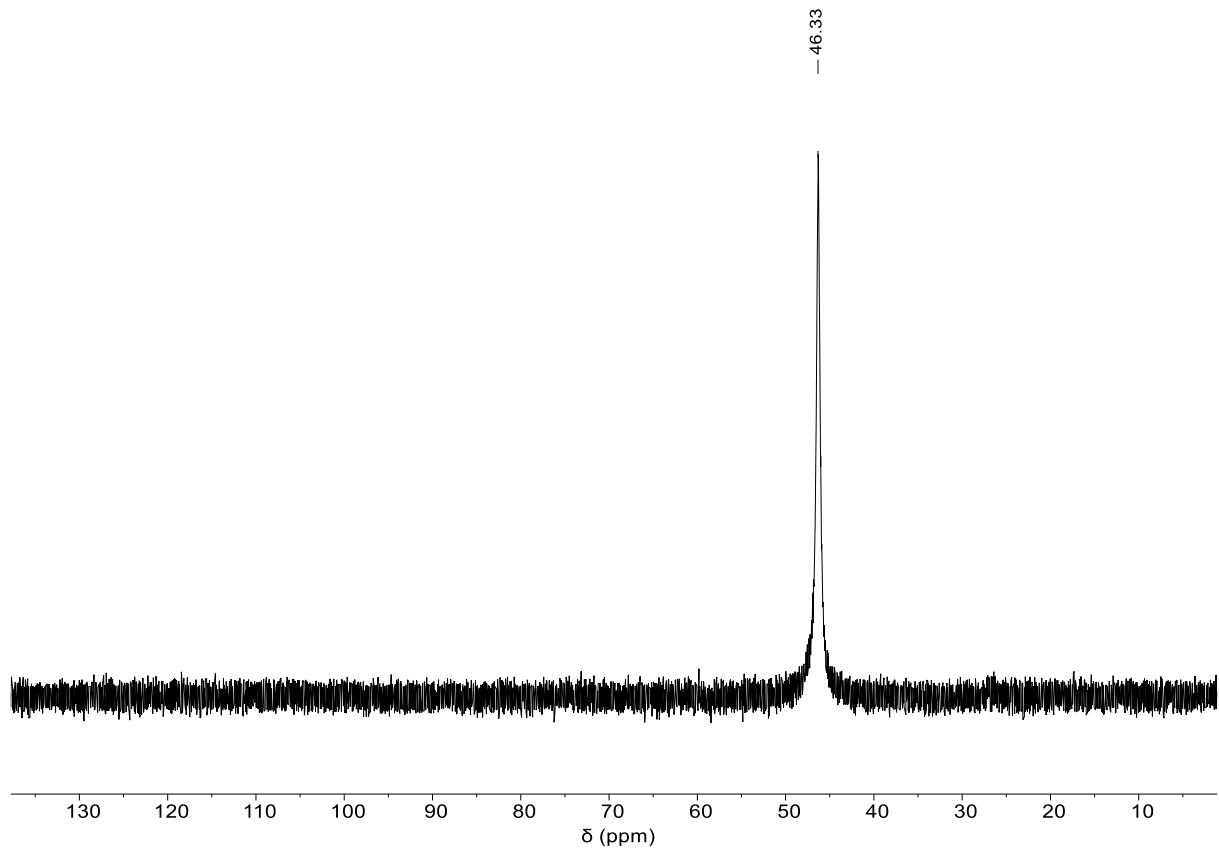
The figure displays the chemical structure of a GPI-anchored bicyclic amide compound and its corresponding ¹H and ¹³C NMR spectra in DMSO-d₆.

Chemical Structure: The molecule consists of a bicyclic core (bicyclo[2.2.2]octane derivative) with an amide group (NH) and a carboxylic acid group (COOH). The GPI (Glycosyl Phosphate Inositol) anchor is attached to the bicyclic core via an amide linkage. The GPI structure is shown as a separate entity, consisting of a glycerol backbone linked to an inositol ring, which is further linked to a phosphate group and a carboxylic acid group.

¹H NMR Spectrum (Top): The spectrum shows peaks in the aromatic region (7.27, 7.78, 8.26 ppm) and the aliphatic region (1.09, 1.23, 1.85, 2.01, 2.12, 2.21, 2.25, 2.57, 2.75 ppm). Integration values are provided below the peaks: 3.28, 3.31, 1.23, 3.72, 2.71, 3.83, 0.97, 7.26, 8.74, 16.45, 29.11, 6.89, and 0.95.

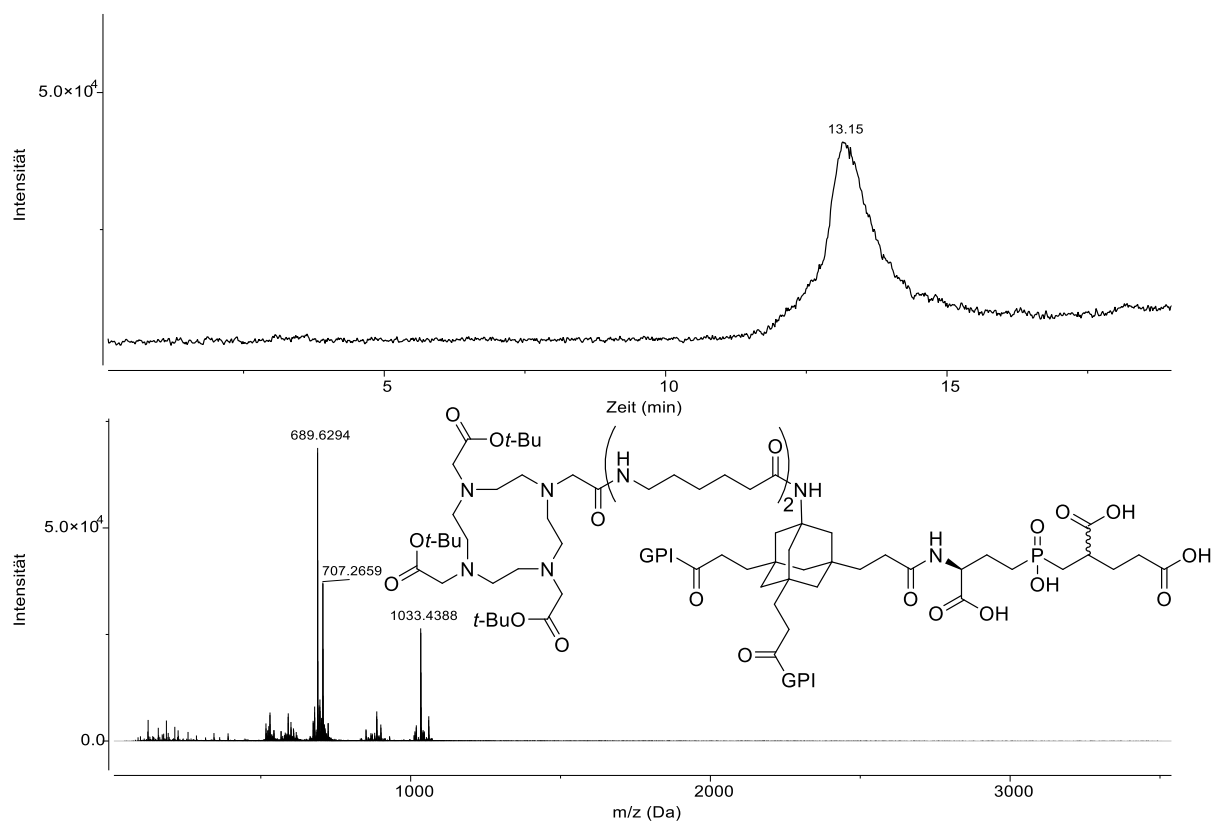
¹³C NMR Spectrum (Bottom): The spectrum shows peaks in the carbonyl region (171.56, 172.92, 173.44, 174.09, 175.71 ppm) and the aliphatic region (24.42, 24.84, 25.33, 26.86, 28.32, 31.04, 31.38, 34.56, 35.79, 38.11, 38.34, 38.72, 39.52, 52.55, 52.76 ppm). The solvent peak for DMSO-d₆ is visible at 39.52 ppm.

Anhang

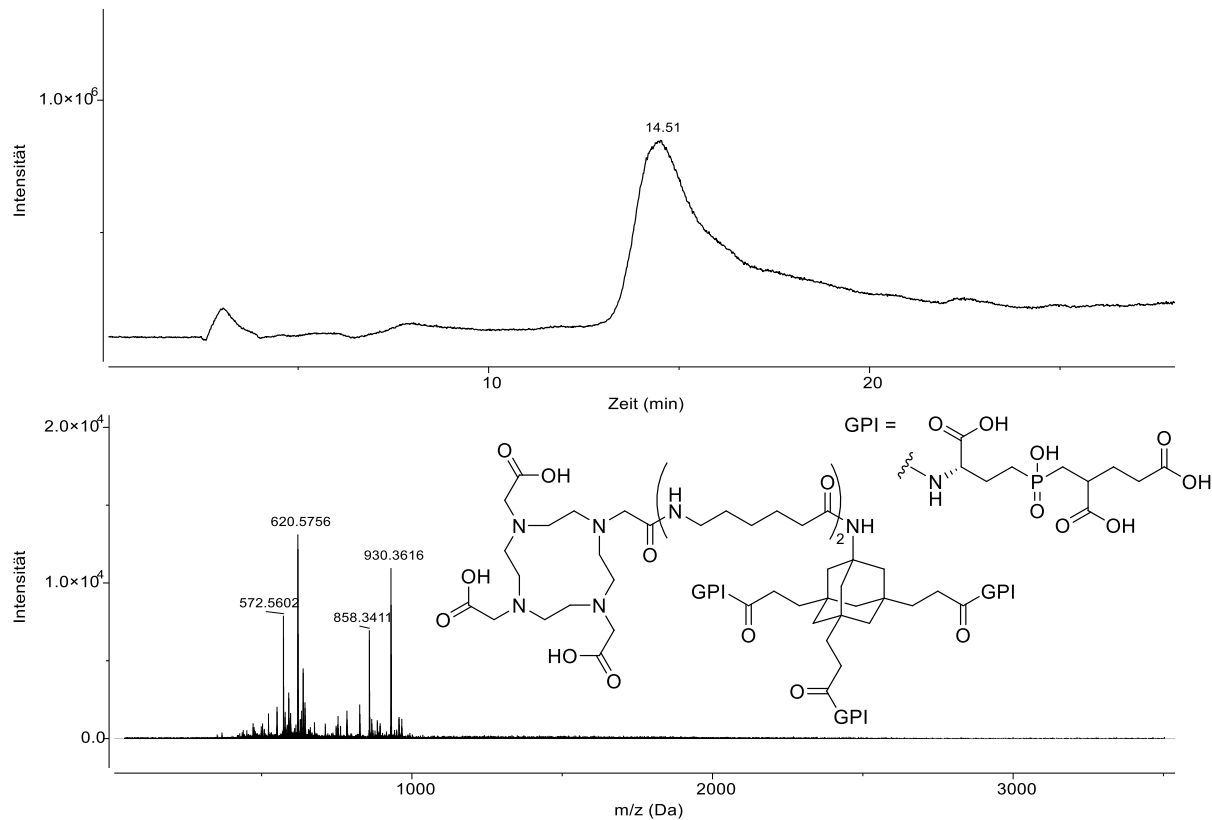


Anhang

t-Bu₃DOTA-Ahx₂-GPI₃

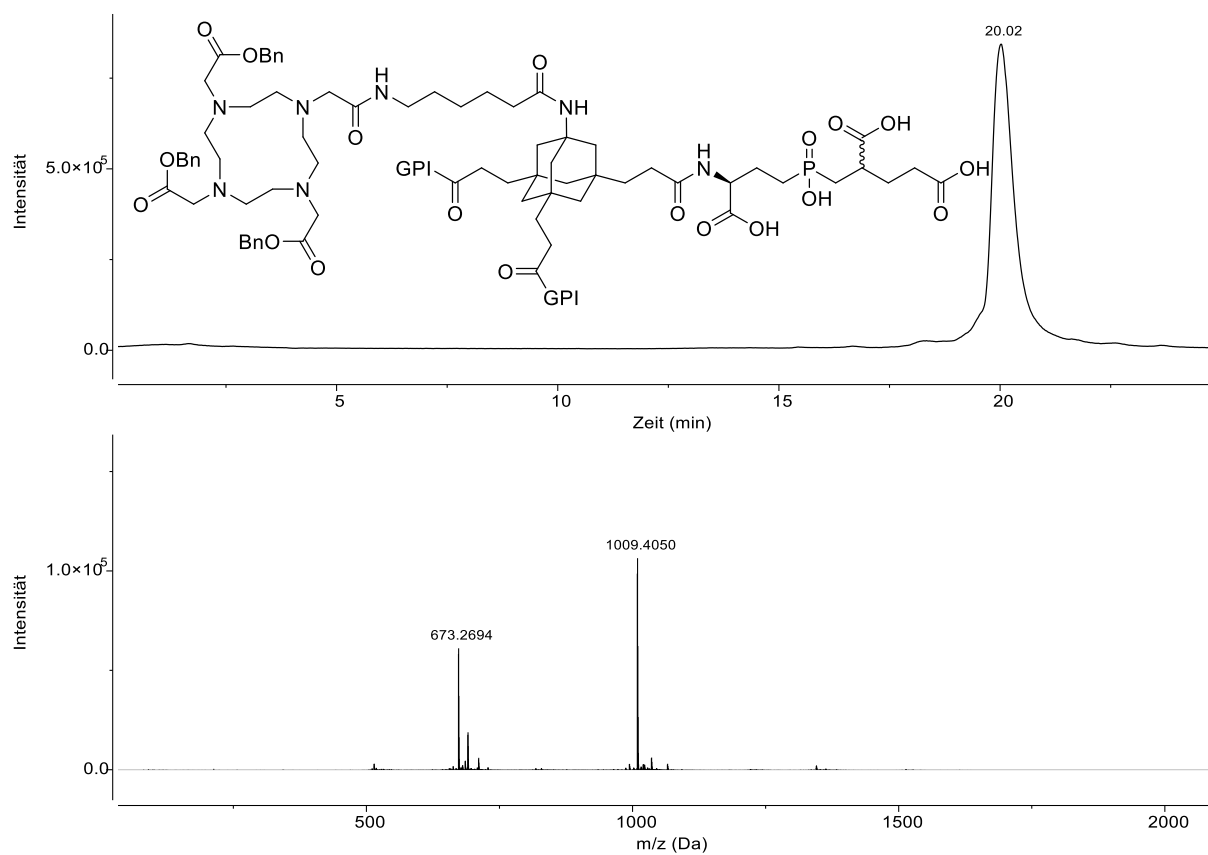


DOTA-Ahx₂-GPI₃

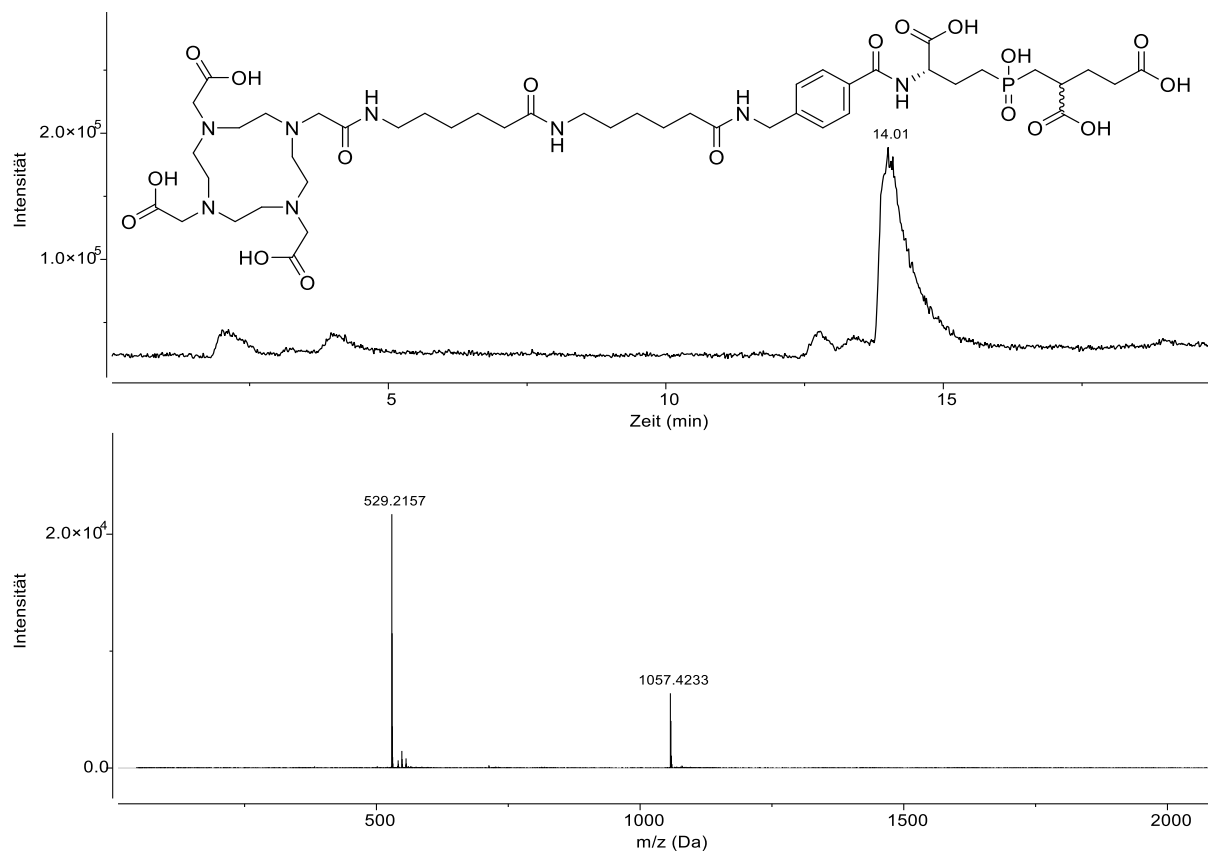


Anhang

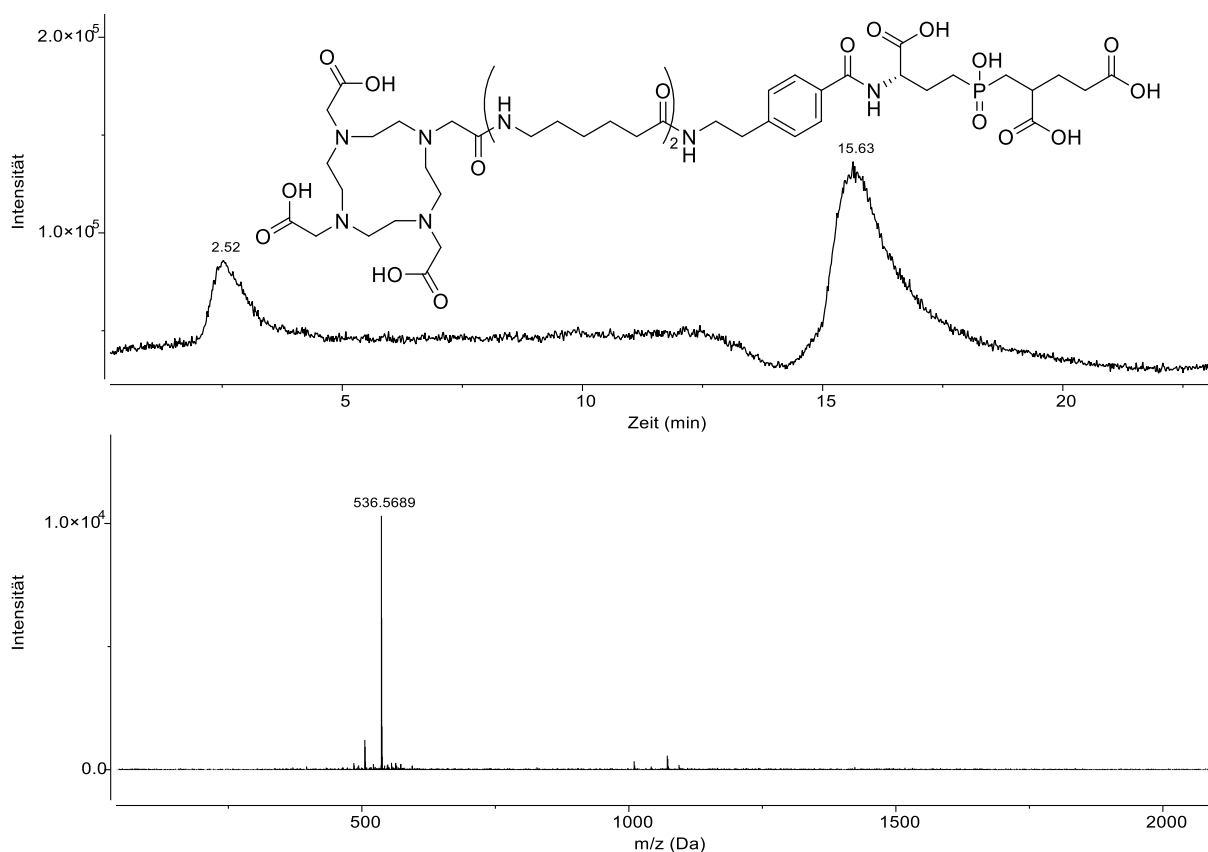
Bn₃DOTA-Ahx-GPI₃



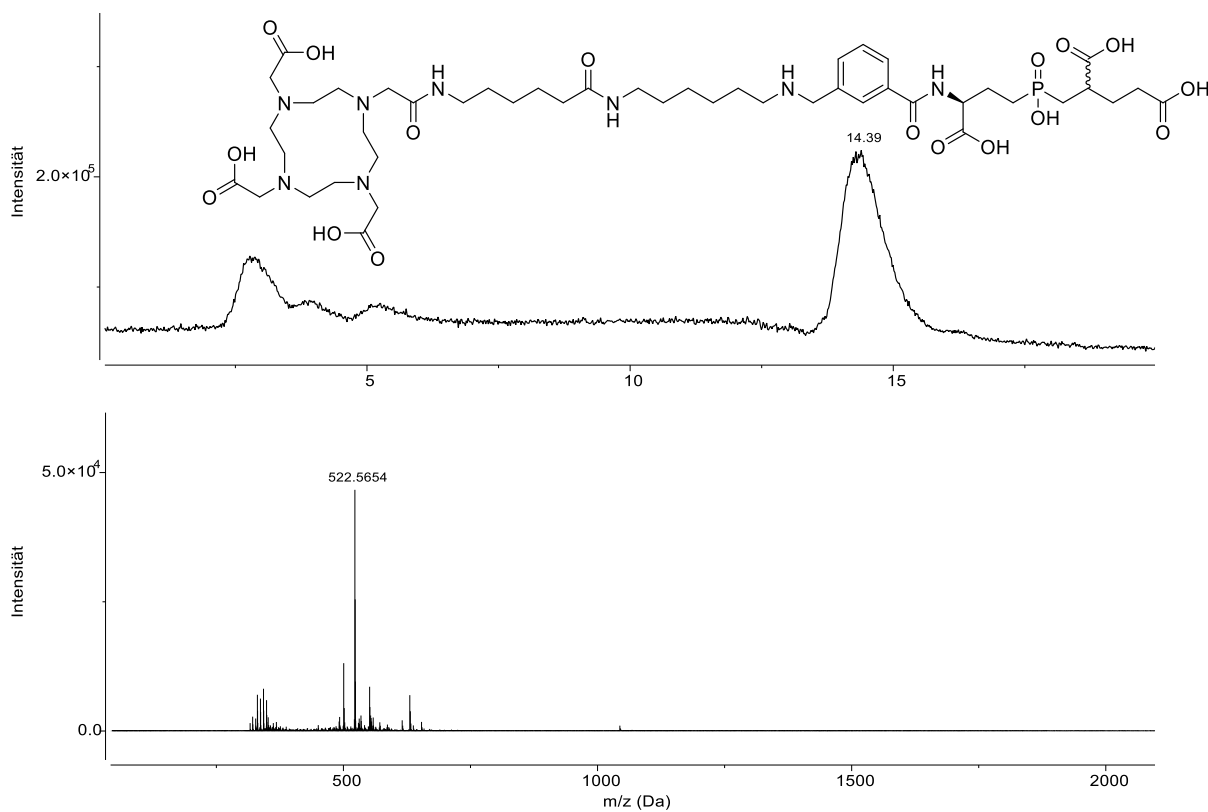
DOTA-SC079



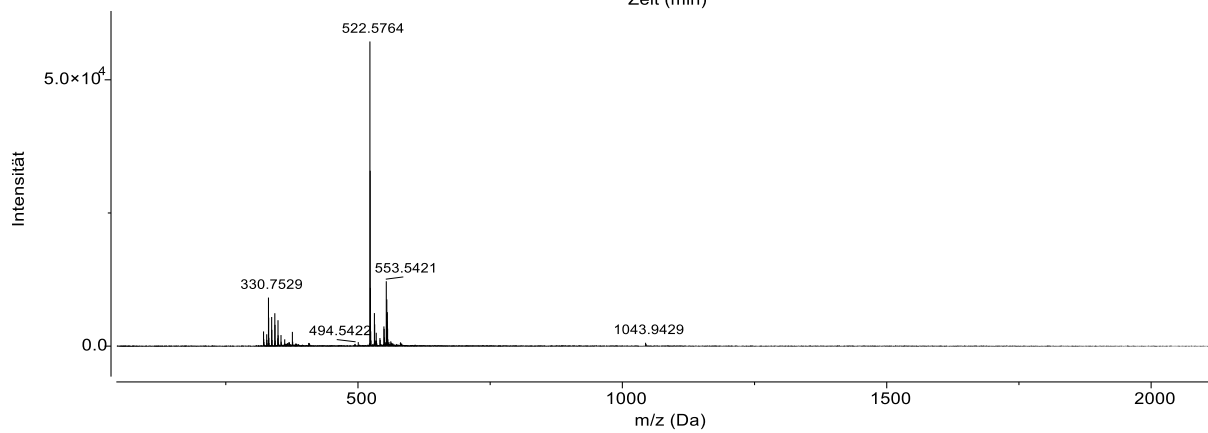
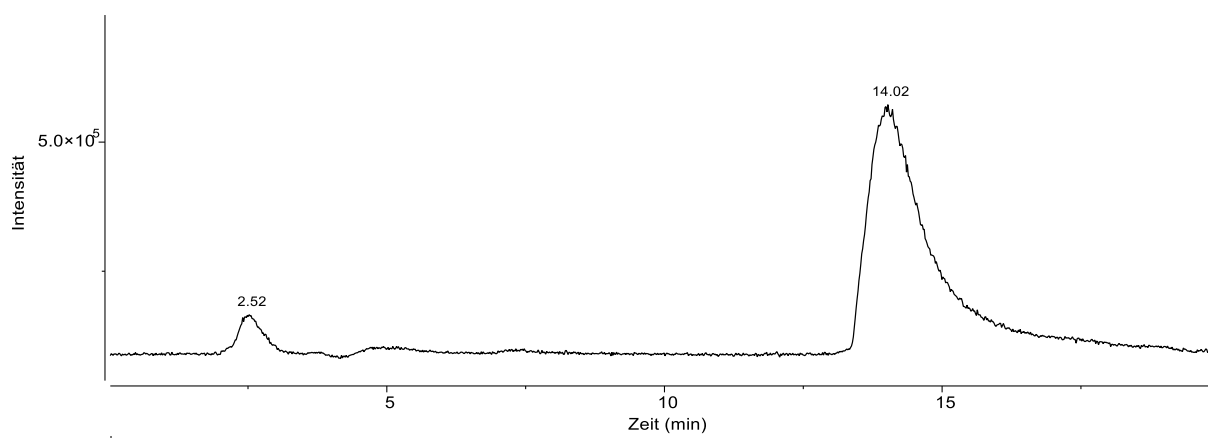
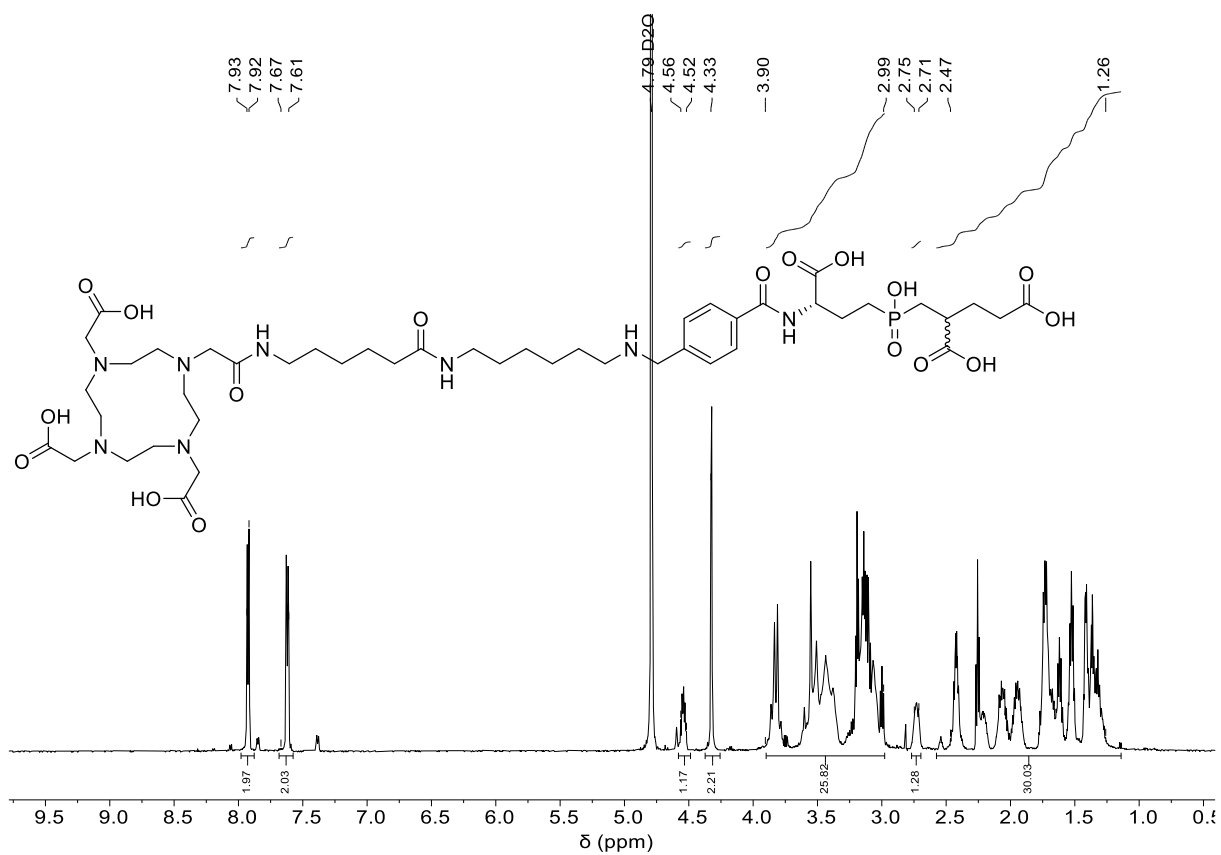
DOTA-SC095



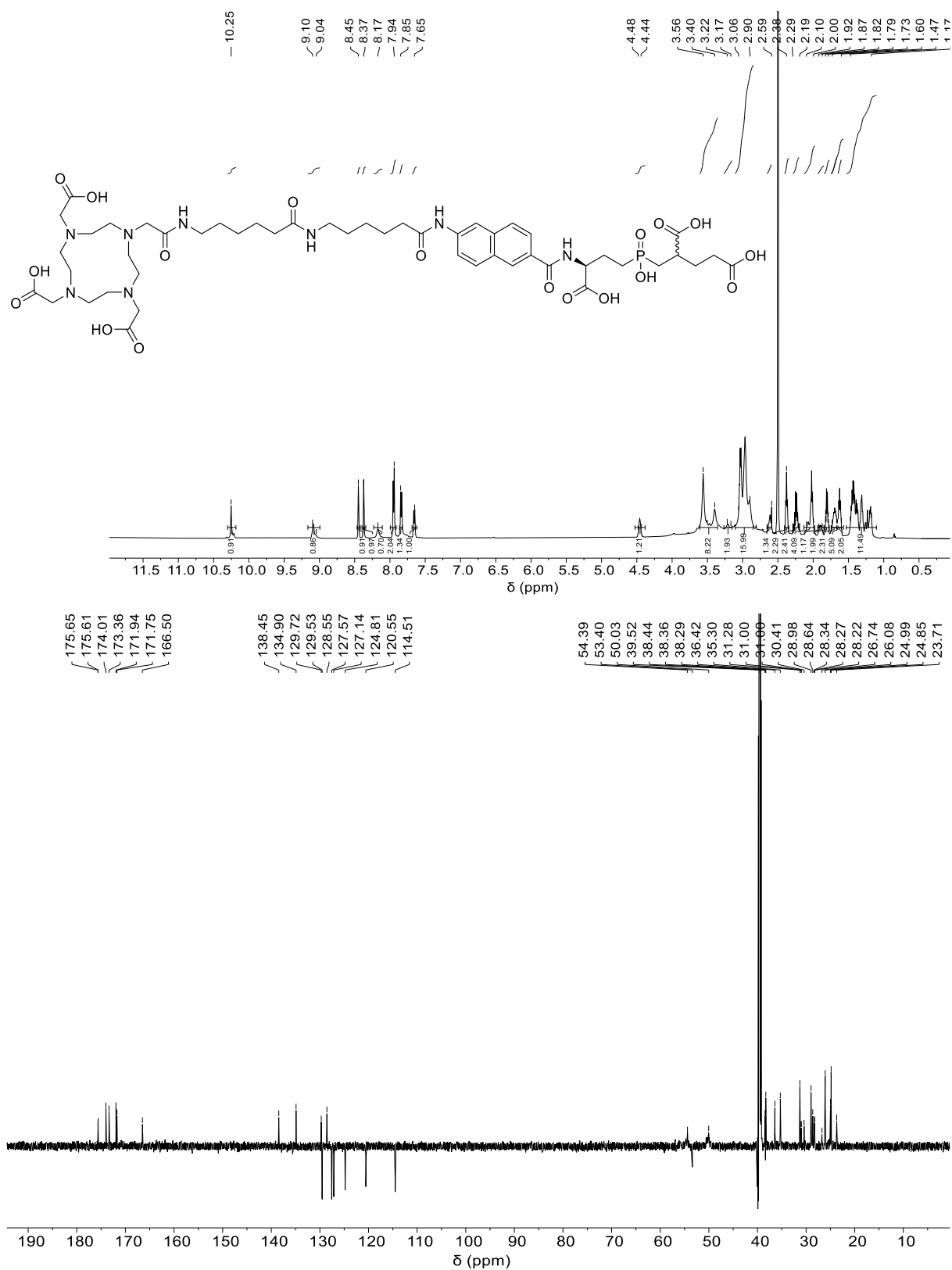
DOTA-NP321



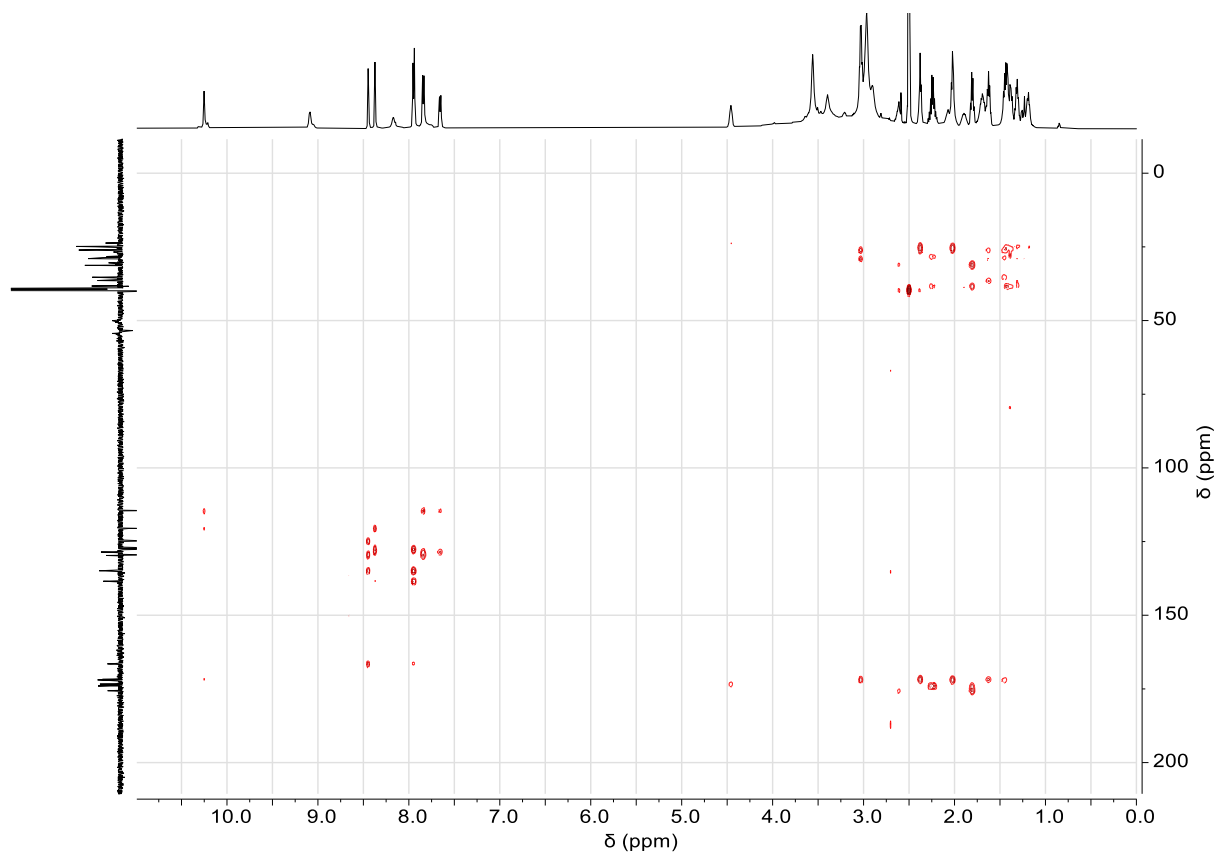
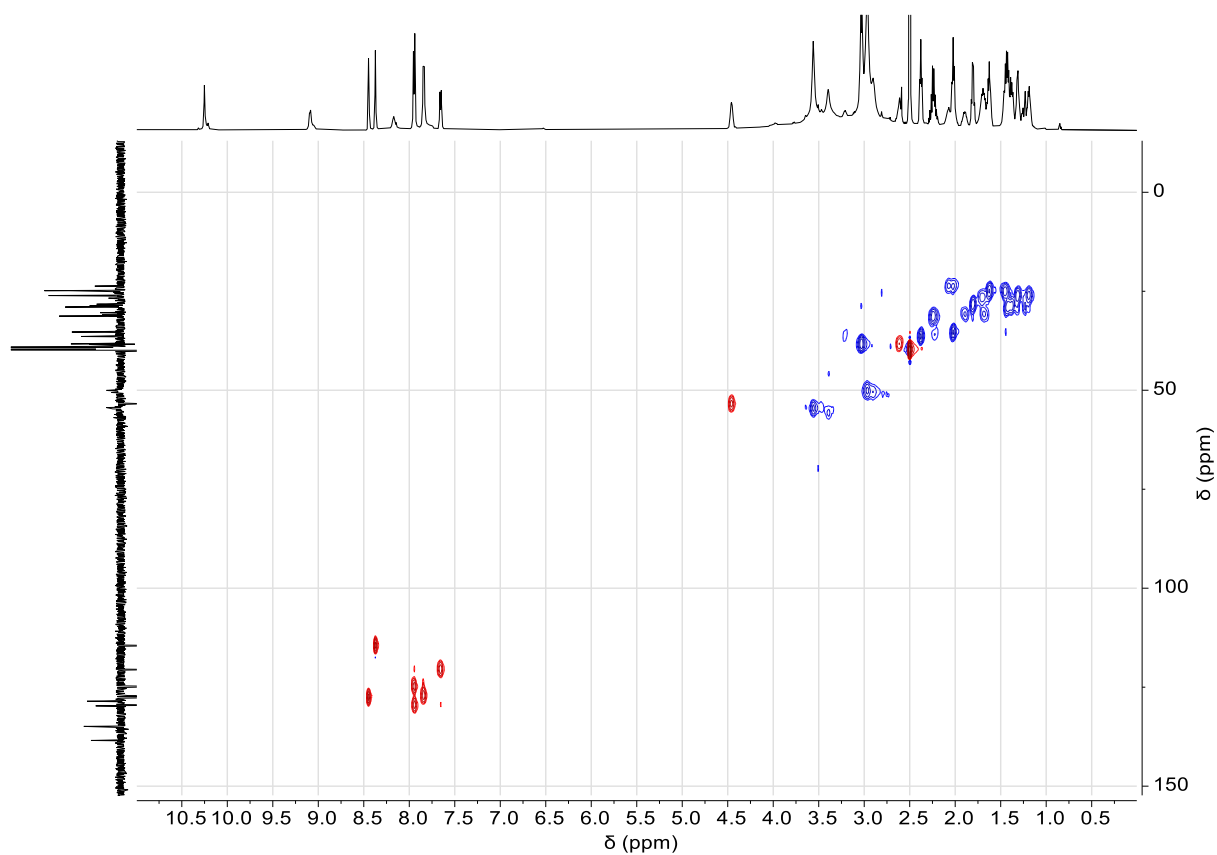
DOTA-NP284



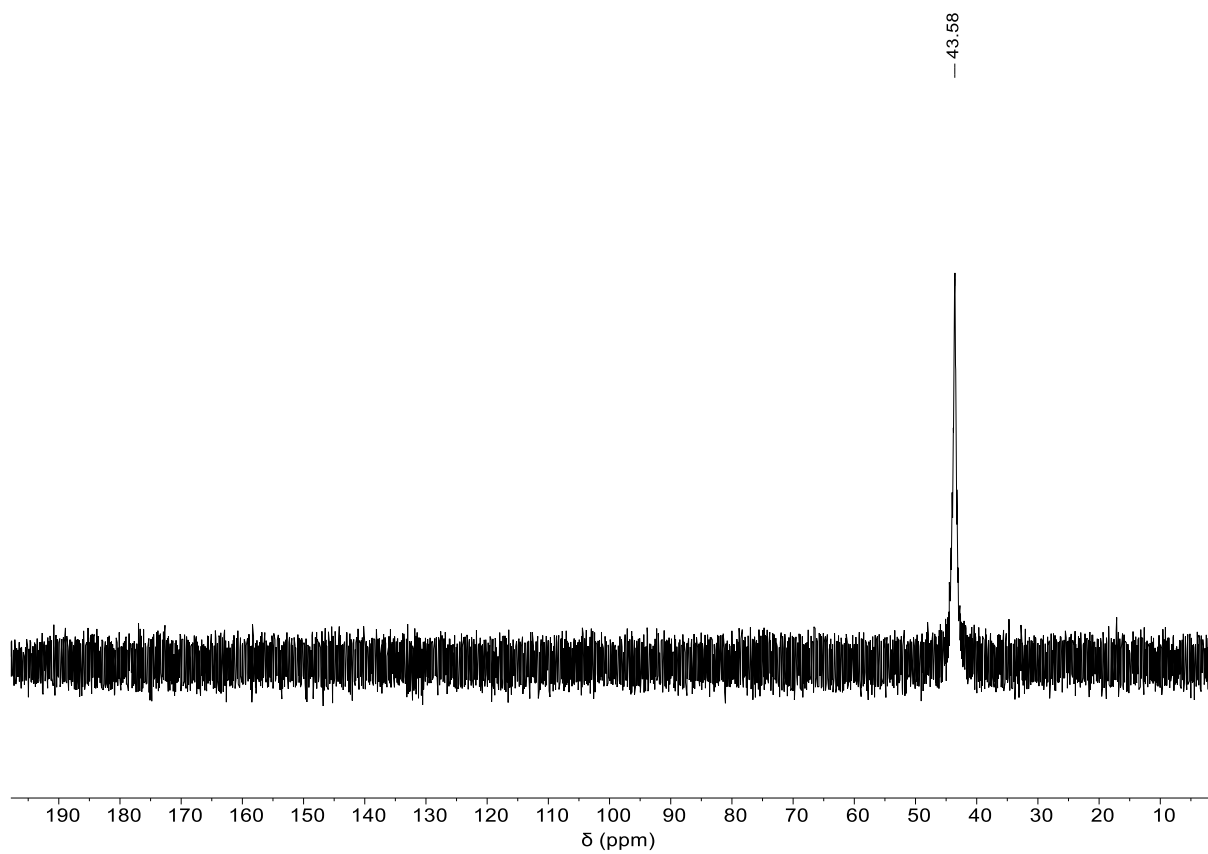
DOTA-SC084



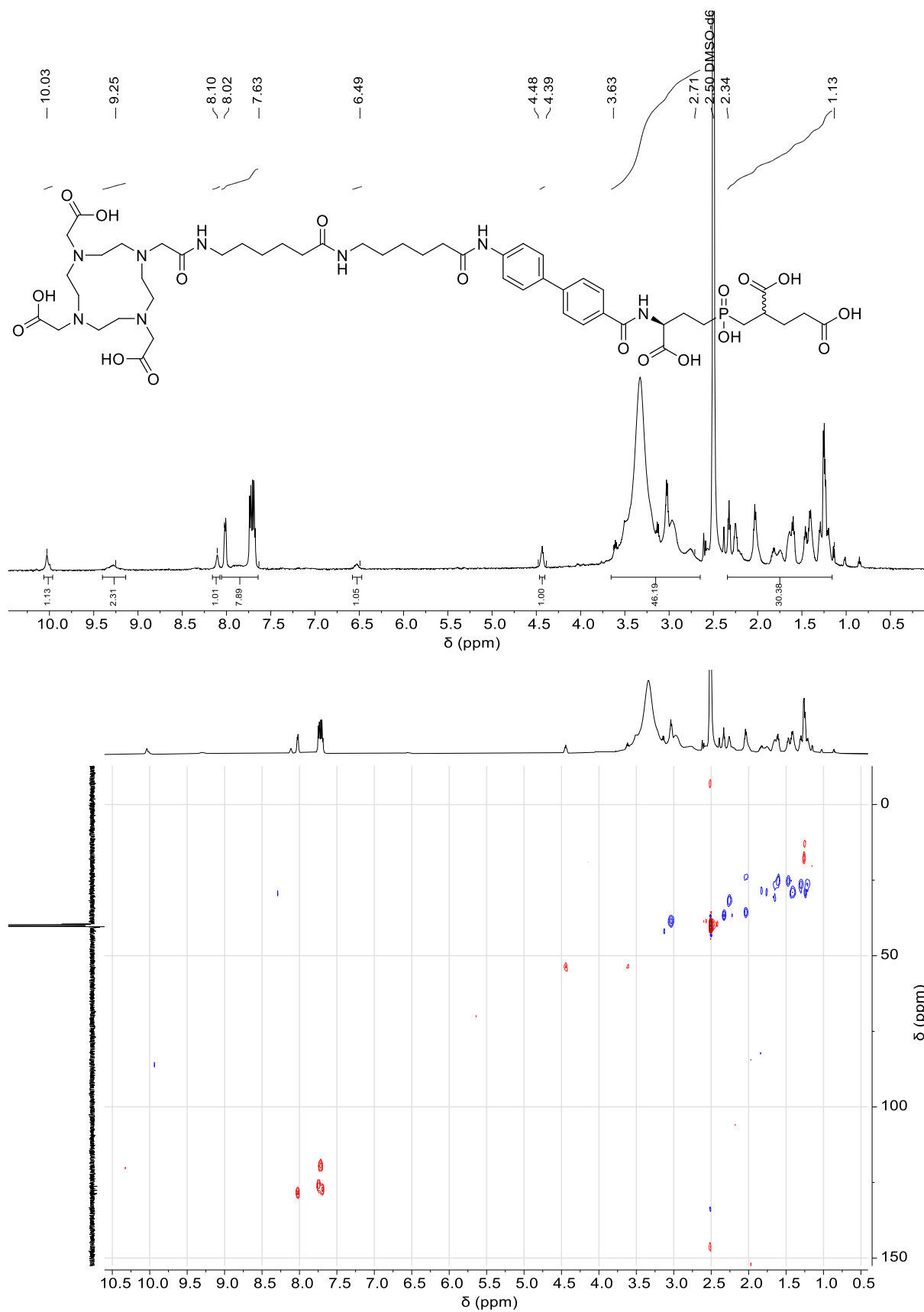
Anhang



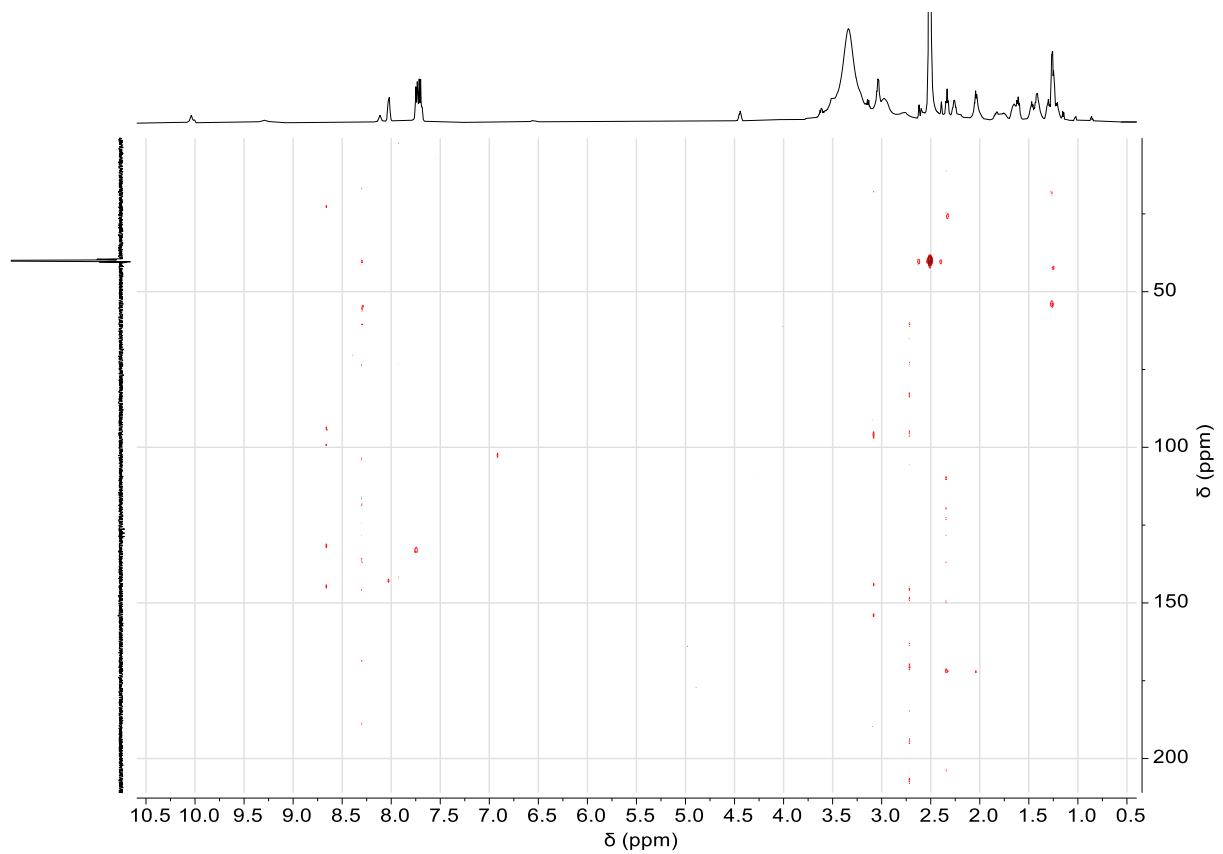
Anhang



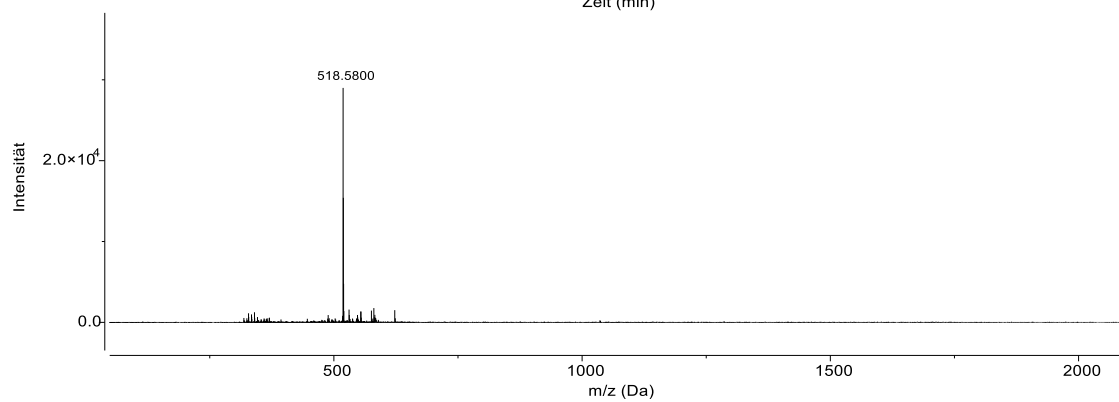
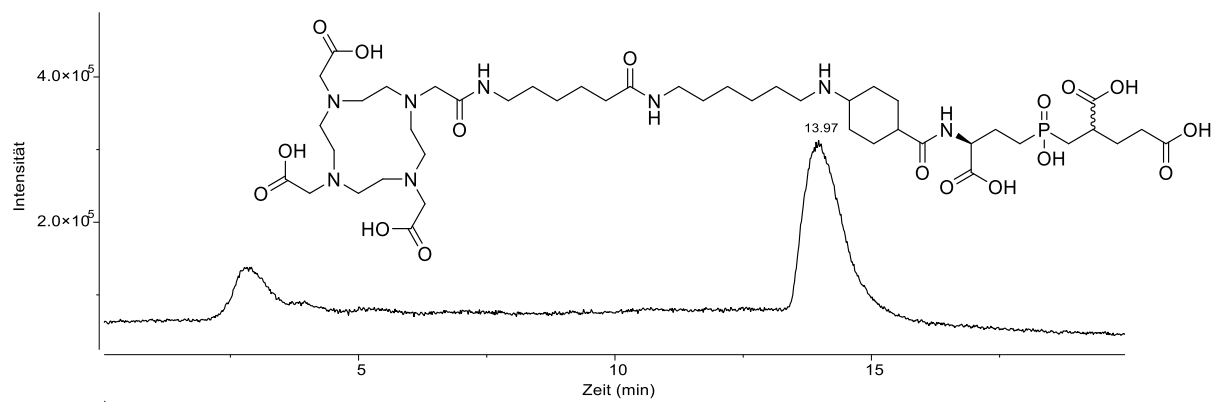
DOTA-SC125



Anhang

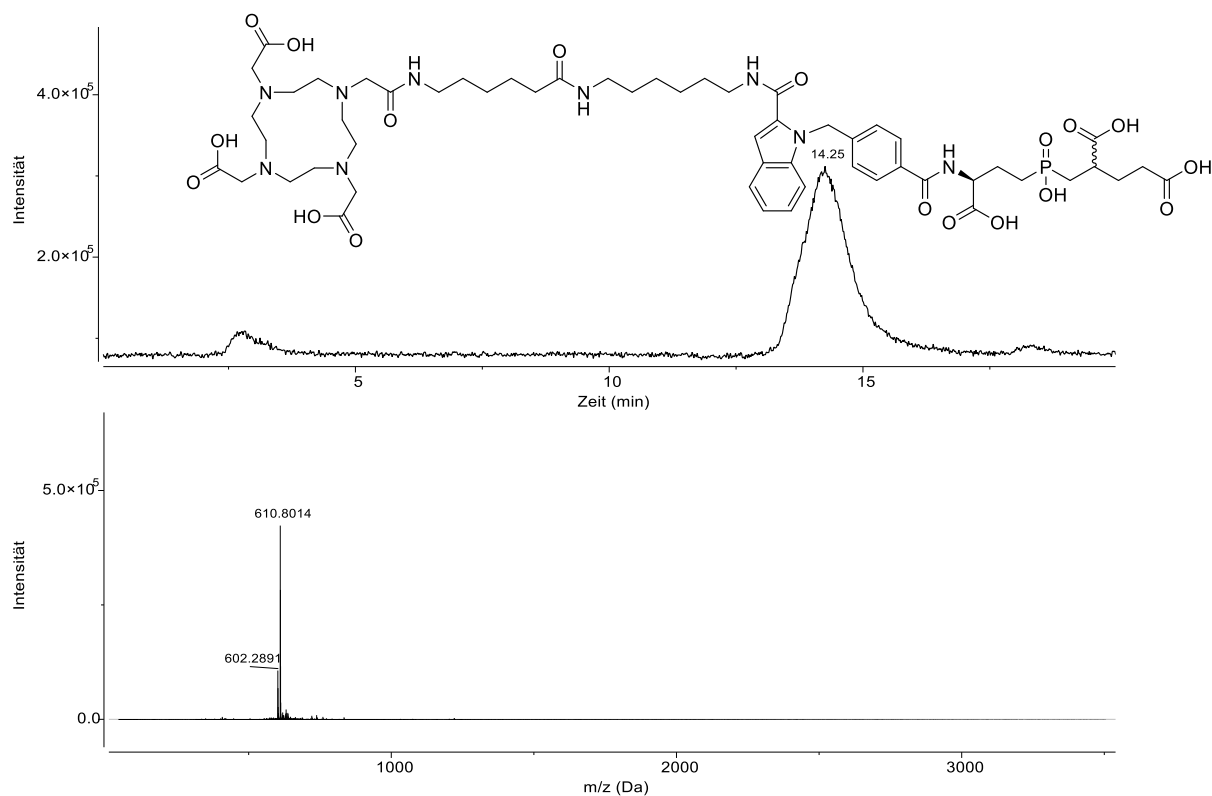


DOTA-NP337

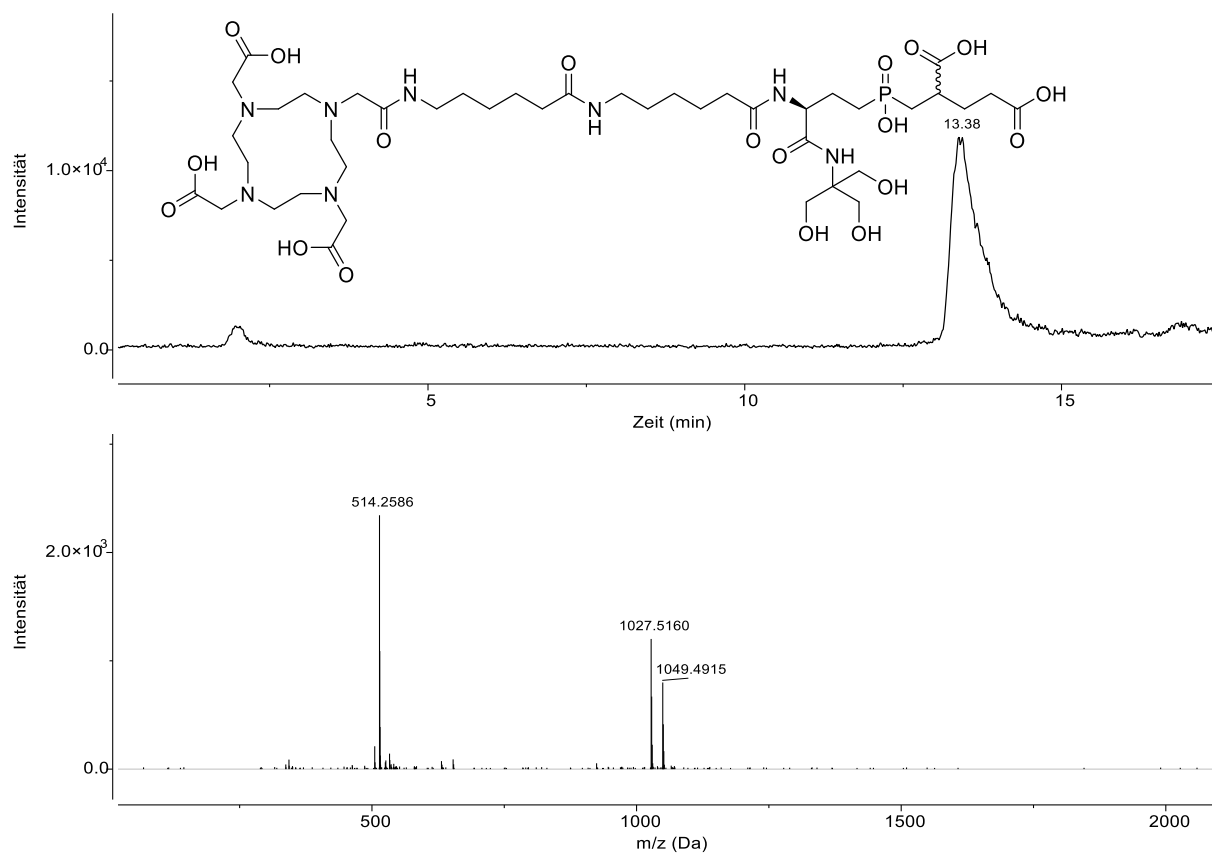


Anhang

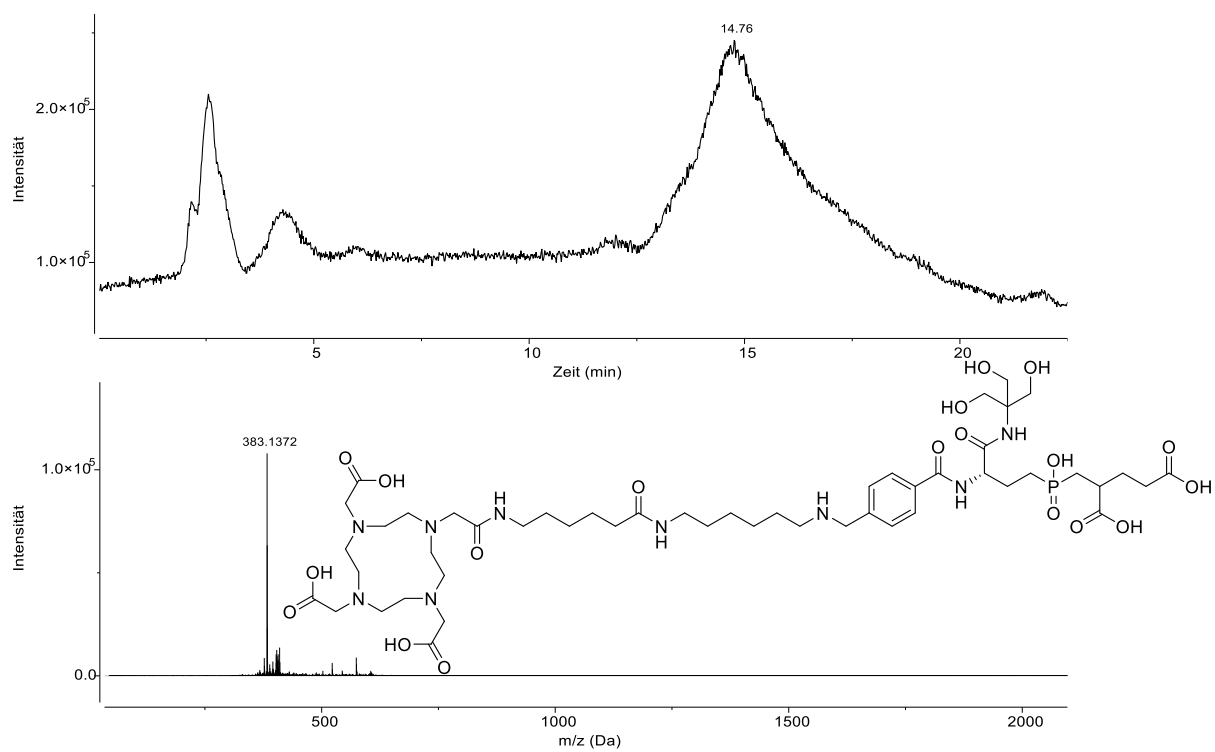
DOTA-SC170



DOTA-NP266

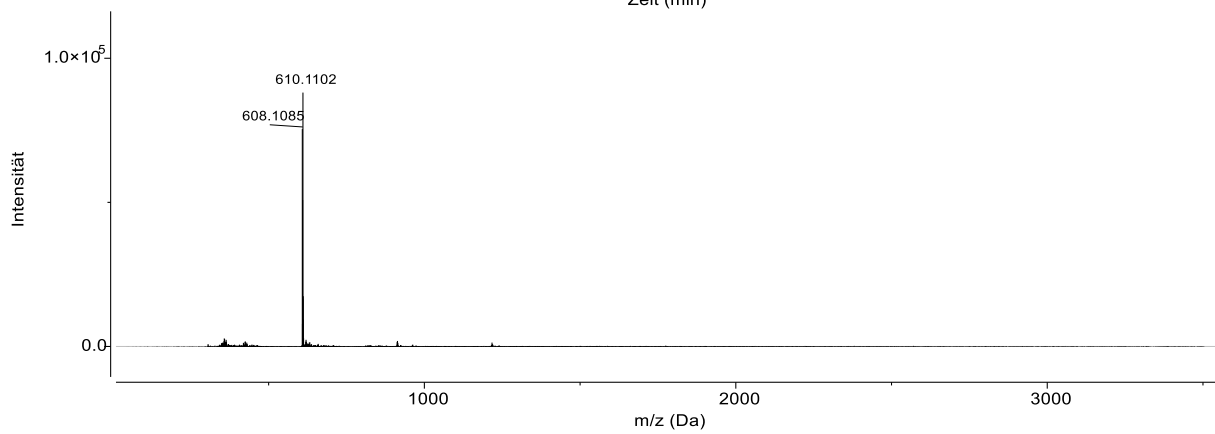
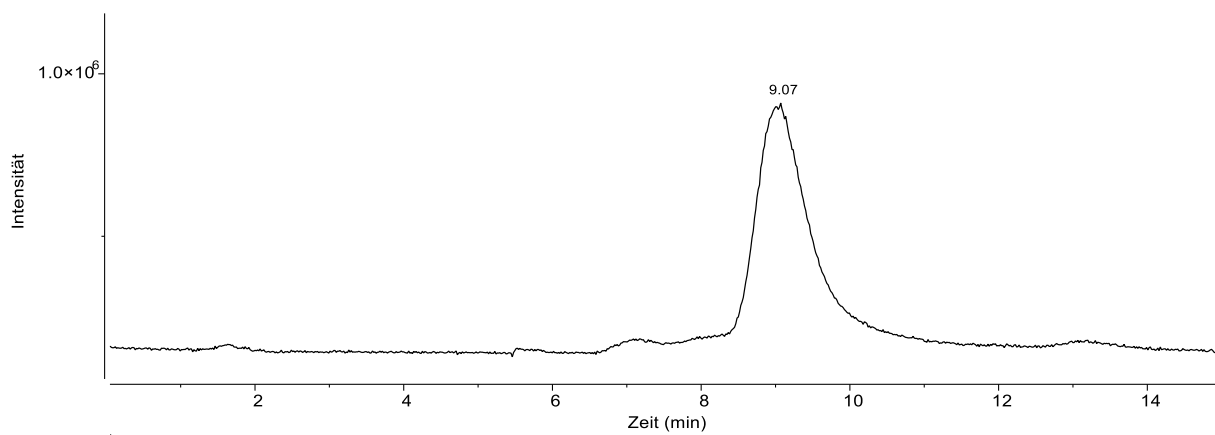
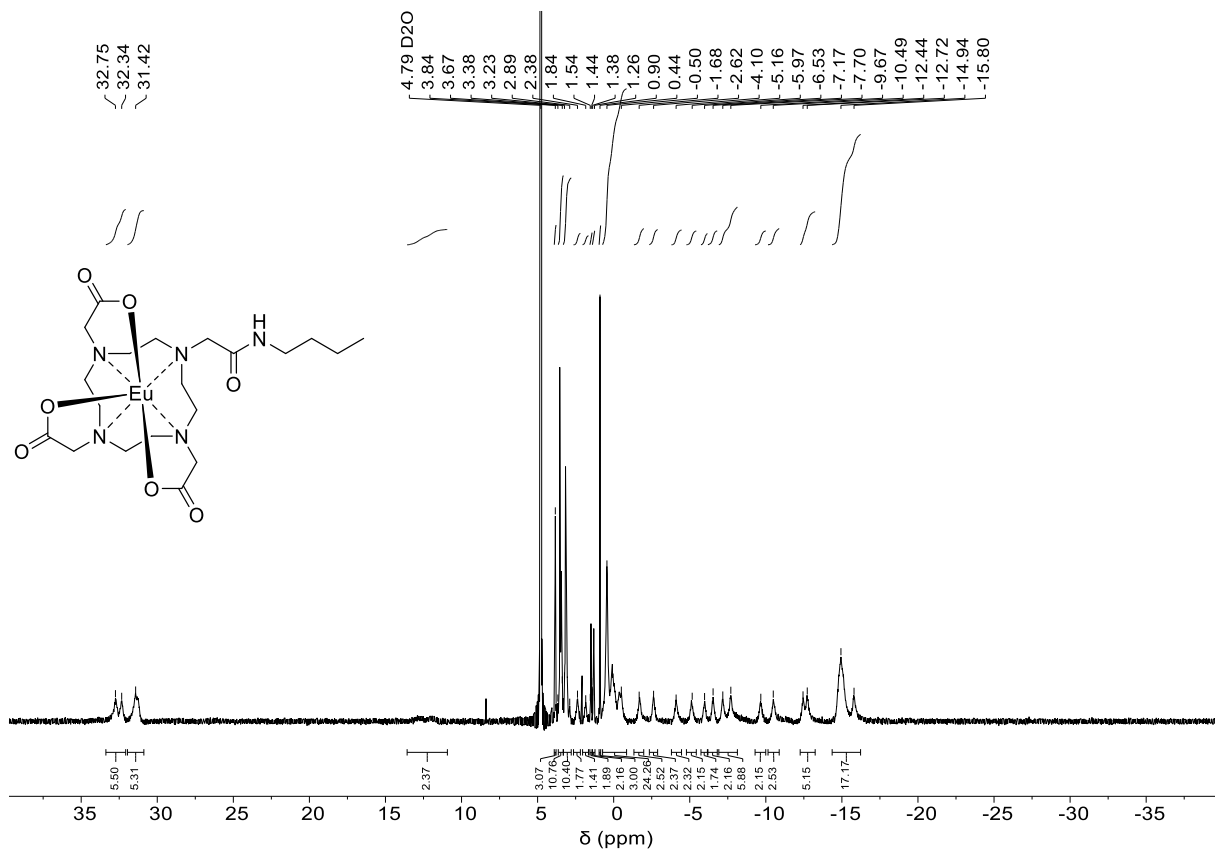


DOTA-NP354

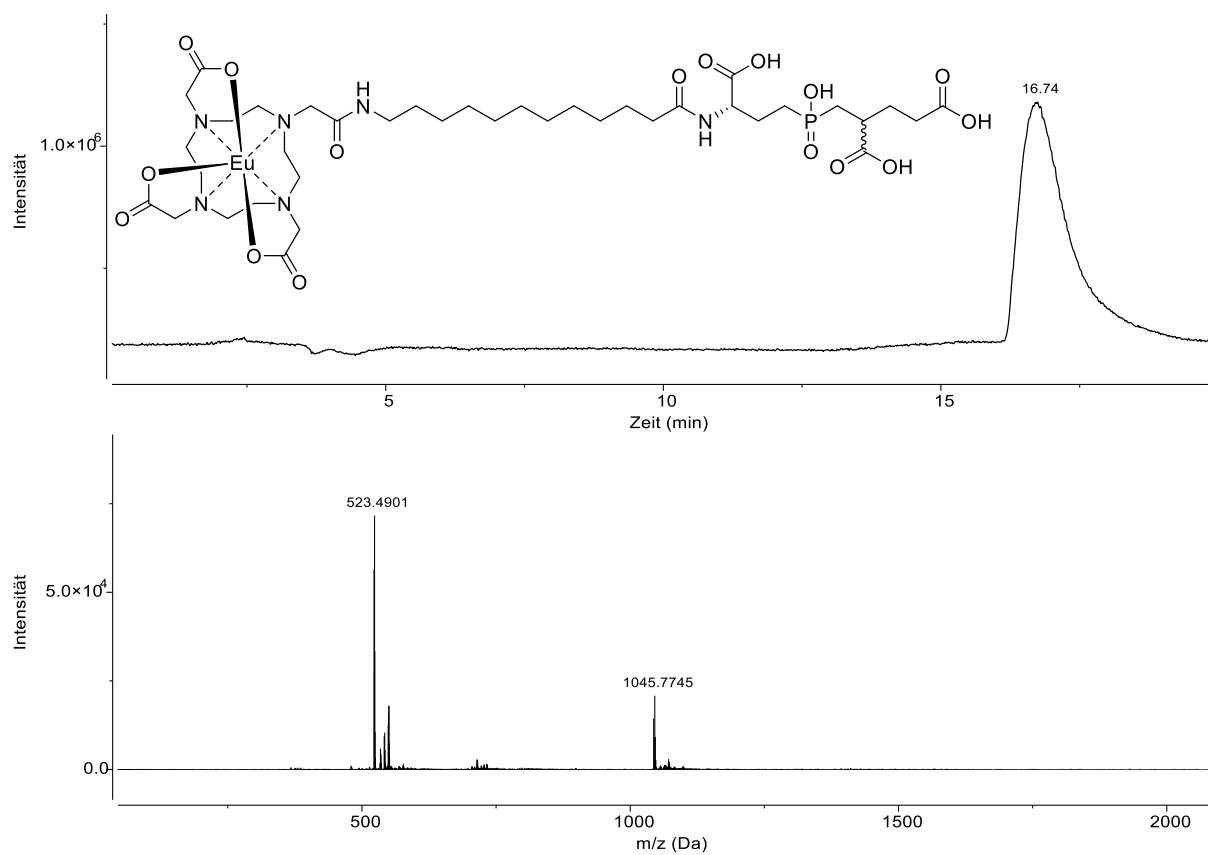


Anhang

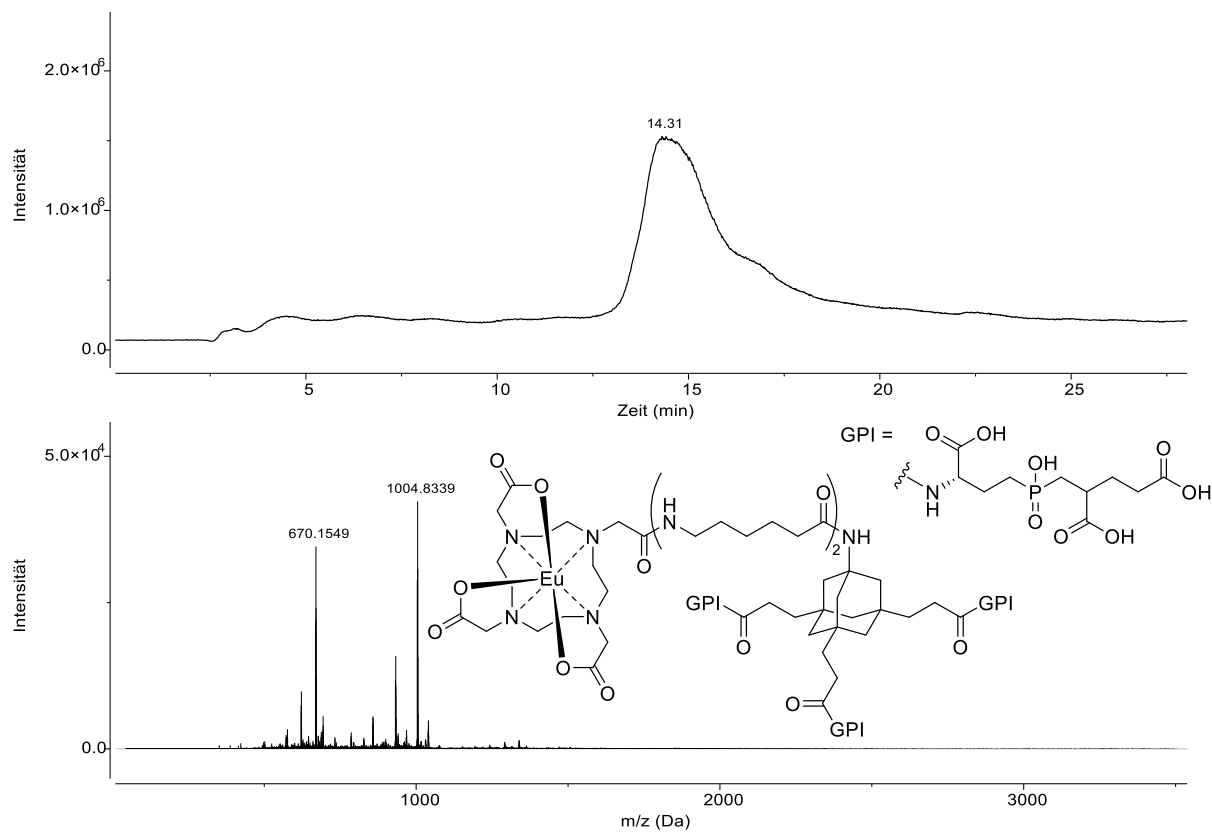
Eu-DOTA-*n*-Bu



Eu-DOTA-Ads-GPI



Eu-DOTA-Ahx2-GPI₃



7.6 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril		225- 302+312+332- 319	210-280- 305+351+338
Ameisensäure		226-302-314- 331	210-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338- 403+233
L-Äpfelsäure		315-319-335	261- 305+351+338
Benzylalkohol		302+332-319	261- 301+312+330- 304+340+312- 305+351+338
<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid		226-302-314	210-280- 301+312+330- 301+330+331- 303+361+353- 305+351+338
Boran (1 M in THF)		225-260-302- 315-318-335- 351	210-223- 231+232-261- 370+378-422
Bromacetyl bromid		314	280- 305+351+338- 310
Brombutan		225-412	210-233-240- 273-403+235
4-Brombutylsäureethylester		319-335-315	261-280- 302+352- 305+351+338

Anhang

2-Bromessigsäurebenzylester		315-319-335	264-270-271-280
2-Bromessigsäure- <i>tert</i> -butylester		226-315-319-335	210-280-305+351+338
<i>N</i> -Bromsuccinimid		302-314	280-305+351+338-310
<i>tert</i> -Butanol		225-319-332-335	210-261-305+351+338
<i>n</i> -Butylamin		225-302-311+331-314	210-233-240-280-301+330+331-302+352-305+351+338-308+310-403+235
Caesiumcarbonat		315-319-335	261-305+351+338
Chloroform		302-315-319-331-351-361d-372	302+352-304+340-305+351+338-308+310
Cyclen		302-312-314-410	273-280-305+351+338-310-501
Dichlormethan		351	281
Diethylether		224-302-336	210-261
Dimethoxypropan		225-319	210-305+351+338
Dimethylformamid		226-312-319-332-360D	201-280-305+351+338

Anhang

DIPEA		225-301-314-412	210-273-280-301+310-305+351+338-310
Ethanol		225	210
Ethylacetat		225-319-336	210-261-305+351+338
Ethylendiamintetraessigsäure		319-332-373	280-304+340-312-305+351+338-337+313
1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid		314	280-305+351+338-310
Gadolinium(III)-oxid		319	305+351+338
HOBt (Monohydrat)		228	210-EUH001-EUH044
HBTU		315-317-319-334-335	280-302+352-305+351+338
Kaliumcarbonat		315-319-335	302+352-305+351+338
Kupfer(I)Iodid		302-315-317-318-335-410	273-280-301+312+330-302+352-305+351+338-310
Lithiumhydroxid		301-314	280-301+310-305+351+338-310

Anhang

Methanol		225-301-311- 331-370	210-280-233- 302+352-309- 310
Methansulfonsäurechlorid		300+310+330- 314-335	260-264-280- 284-301+310- 302+350
N-Methylpyrrolidon		315-319-335- 360D	201-302+352- 305+351+338- 308+313
Natriumazid		300+310-410	273-280- 301+310- 302+352+310- 391-501
Natriumsulfid		290-301-314- 400	273-280- 301+310- 305+351+338- 310
Pentan		225-304-336- 411	210-273- 301+310+331
4-Pentinsäure		314	280- 305+351+338- 310
Pyridin		225- 302+312+332- 315-319	210-280- 301+312+330- 302+352+312- 304+340+312- 305+351+338
Salzsäure		315-335	261-280- 305+351+338- 310
Tetrahydrofuran		225-319-335	210-261- 305+351+338

Anhang

<i>p</i> -Toluolsulfonsäure		290-314-335	280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Triethylphosphit		302	301+312
Trifluormethan- sulfonsäureanhydrid		302-314	280- 305+351+338- 310
Triethylamin		225-302-312- 314-332	210-280- 305+351+338- 310
Trifluoressigsäure		314-332-412	273-280- 301+330+331- 303+361+353- 304+340+312
Trifluorethanol		226-301+331- 318-360F-373	201-210-280- 301+310+330- 304+340+311- 305+351+338 +310
Triisoproysilan		226	210
Triphenylphosphan		302-317-318- 372	280- 301+312+330- 305+351+338- 310-314
Wasserstoff		220-280	210-377-381- 410+403
Zirkonium(IV)-acetylacetonat		302+312+332- 315-319-335	301+312+330- 302+352+312- 304+340+312- 305+351+338

8. Literaturverzeichnis

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA-Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394-424.
2. World Health Organization, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (26.03.2020).
3. Statistisches Bundesamt, Sterbefälle 2017 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10. Gesundheit, Ed. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html, (26.03.2020).
4. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer Statistics, 2019. *CA-Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7-34.
5. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2020. *CA-Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7-30.
6. *Global Cancer Facts & Figures 4th Edition*; American Cancer Society: Atlanta, **2018**.
7. Omran, A. R., The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. *Milbank Q.* **2005**, *83*, 731-757.
8. Kocarnik, J., Cancer's Global Epidemiological Transition and Growth. *Lancet* **2020**, *395*, 757-758.
9. Society, A. C. *Cancer Prevention and Early Detection Facts-and Figures 2019-2020*; American Cancer Society: Atlanta, **2019**.
10. Han, M. A.; Zeraatkar, D.; Guyatt, G. H.; Vernooij, R. W. M.; El Dib, R.; Zhang, Y.; Algarni, A.; Leung, G.; Storman, D.; Valli, C.; Rabassa, M.; Rehman, N.; Parvizian, M. K.; Zworth, M.; Bartoszko, J. J.; Lopes, L. C.; Sit, D.; Bala, M. M.; Alonso-Coello, P.; Johnston, B. C., Reduction of Red and Processed Meat Intake and Cancer Mortality and Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis of Cohort Studies. *Ann. Intern. Med.* **2019**, *171*, 711-720.
11. Frangioni, J. V., New Technologies for Human Cancer Imaging. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4012-4021.
12. Gao, M.; Yu, F.; Lv, C.; Choo, J.; Chen, L., Fluorescent Chemical Probes for Accurate Tumor Diagnosis and Targeting Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2237-2271.
13. Norton, L.; Simon, R.; Brereton, H. D.; Bogden, A. E., Predicting the Course of Gompertzian growth. *Nature* **1976**, *264*, 542-545.
14. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

15. Chen, X.; Song, J.; Chen, X.; Yang, H., X-Ray-Activated Nanosystems for Theranostic Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 3073-3101.
16. Ens, S., Grundlagen der Computertomographie. In *Bewegungsdetektion und -korrektur in der Transmissions-Computertomographie*, Springer Fachmedien Wiesbaden: Wiesbaden, 2015; pp 7-23.
17. James, M. L.; Gambhir, S. S., A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897-965.
18. Jacques, V.; Desreux, J. F., New Classes of MRI Contrast Agents. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *221*, 123-164.
19. Wahsner, J.; Gale, E. M.; Rodríguez-Rodríguez, A.; Caravan, P., Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 957-1057.
20. Schick, F., Grundlagen der Magnetresonanztomographie. *Radiologe* **2007**, *47*, S7-S26.
21. Caravan, P., Strategies for Increasing the Sensitivity of Gadolinium Based MRI Contrast Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 512-523.
22. Hahn, E. L., Spin Echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580-594.
23. Angelovski, G., What We Can Really Do with Bioresponsive MRI Contrast Agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7038-7046.
24. Bryden, C. C.; Reilly, C. N.; Desreux, J. F., Multinuclear Nuclear Magnetic Resonance Study of Three Aqueous Lanthanide Shift Reagents: Complexes with EDTA and Axially Symmetric Macrocyclic Polyamino Polyacetate Ligands. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1418-1425.
25. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352.
26. Magerstädt, M.; Gansow, O. A.; Brechbiel, M. W.; Colcher, D.; Baltzer, L.; Knop, R. H.; Girton, M. E.; Naegele, M., Gd(DOTA): An Alternative to Gd(DTPA) as a $T_{1,2}$ Relaxation Agent for NMR Imaging or Spectroscopy. *Magnet. Reson. Med.* **1986**, *3*, 808-812.
27. Li, H.; Meade, T. J., Molecular Magnetic Resonance Imaging with Gd(III)-Based Contrast Agents: Challenges and Key Advances. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 17025-17041.

28. Tei, L.; Baranyai, Z.; Gai, L.; Forgacs, A.; Vagner, A.; Botta, M., Thermodynamic Stability, Kinetic Inertness and Relaxometric Properties of Monoamide Derivatives of Lanthanide(III) DOTA Complexes. *Dalton Trans.* **2015**, 44, 5467-5478.
29. Dai, L.; Jones, C. M.; Chan, W. T. K.; Pham, T. A.; Ling, X.; Gale, E. M.; Rotile, N. J.; Tai, W. C.; Anderson, C. J.; Caravan, P.; Law, G. L., Chiral DOTA Chelators as an Improved Platform for Biomedical Imaging and Therapy Applications. *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1-14.
30. Clough, T. J.; Jiang, L. J.; Wong, K. L.; Long, N. J., Ligand Design Strategies to Increase Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Nat. Commun.* **2019**, 10, 1-14.
31. Werner, E. J.; Datta, A.; Jocher, C. J.; Raymond, K. N., High-Relaxivity MRI Contrast Agents: Where Coordination Chemistry Meets Medical Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8568-8580.
32. Caravan, P.; Farrar, C. T.; Frullano, L.; Uppal, R., Influence of Molecular Parameters and Increasing Magnetic Field Strength on Relaxivity of Gadolinium- and Manganese-Based T_1 Contrast Agents. *Contrast Med. Mol. Imaging* **2009**, 4, 89-100.
33. Solomon, I.; Bloembergen, N., Nuclear Magnetic Interactions in the HF Molecule. *J. Phys. Chem.* **1956**, 25, 261-266.
34. Bloembergen, N.; Morgan, L. O., Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *J. Phys. Chem.* **1961**, 34, 842-850.
35. Frank, J., Bildrekonstruktion bei der Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT). In *Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) des Gehirns*, Wieler, H. J., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1995; pp 3-10.
36. Hazari, P. P.; Pandey, A.; Chaturvedi, S.; Mishra, A. K., New Trends and Current Status of Positron-Emission Tomography and Single-Photon-Emission Computerized Tomography Radioligands for Neuronal Serotonin Receptors and Serotonin Transporter. *Bioconjugate Chem.* **2017**, 28, 2647-2672.
37. Henzlova, M. J., SPECT: Workhorse of State of the Art Nuclear Cardiology. *J. Nucl. Cardiol.* **2018**, 25, 195-197.
38. Slomka, P. J.; Miller, R. J. H.; Hu, L.-H.; Germano, G.; Berman, D. S., Solid-State Detector SPECT Myocardial Perfusion Imaging. *J. Nucl. Med.* **2019**, 60, 1194-1204.
39. Verel, I.; Visser, G. W. M.; van Dongen, G. A., The Promise of Immuno-PET in Radioimmunotherapy. *J. Nucl. Med.* **2005**, 46, 164S-171S.

40. Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Tircsó, G.; Hermann, P.; Tóth, É.; Lukeš, I., Gallium(III) Complexes of DOTA and DOTA–Monoamide: Kinetic and Thermodynamic Studies. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10960-10969.
41. Yankeelov, T. E.; Abramson, R. G.; Quarles, C. C., Quantitative Multimodality Imaging in Cancer Research and Therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2014**, *11*, 670-680.
42. Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J., Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858-2902.
43. Notni, J.; Wester, H.-J., ⁶⁸Ga-Radiopharmaka: Methode oder Episode? *Nuklearmedizin* **2018**, *41*, 335-347.
44. Fonti, R.; Conson, M.; Del Vecchio, S., PET/CT in Radiation Oncology. *Semin. Oncol.* **2019**, *46*, 202-209.
45. Pichler, V.; Berroterán-Infante, N.; Philippe, C.; Vraka, C.; Klebermass, E.-M.; Balber, T.; Pfaff, S.; Nics, L.; Mitterhauser, M.; Wadsak, W., An Overview of PET Radiochemistry, Part 1: The Covalent Labels ¹⁸F, ¹¹C, and ¹³N. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1350-1354.
46. Hofman, M. S.; Hicks, R. J., How We Read Oncologic FDG PET/CT. *Cancer Imaging* **2016**, *16*, 35.
47. Petroni, D.; Menichetti, L.; Poli, M., Historical and Radiopharmaceutical Relevance of [¹⁸F]FDG. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2020**, *323*, 1017-1031.
48. Ido, T.; Wan, C.-N.; Casella, V.; Fowler, J. S.; Wolf, A. P.; Reivich, M.; Kuhl, D. E., Labeled 2-Deoxy-D-glucose Analogs. ¹⁸F-Labeled 2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-Deoxy-2-fluoro-D-mannose and ¹⁴C-2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1978**, *14*, 175-183.
49. Fowler, J. S.; Ido, T., Initial and Subsequent Approach for the Synthesis of ¹⁸FDG. *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32*, 6-12.
50. Schicha, H.; Schober, O., *Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung ; mit 66 Tabellen und 101 Kasuistiken*. Schattauer: 2007.
51. Hamacher, K.; Coenen, H. H.; Stöcklin, G., Efficient Stereospecific Synthesis of No-Carrier-Added 2-[¹⁸F]-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose Using Aminopolyether Supported Nucleophilic Substitution. *J. Nucl. Med.* **1986**, *27*, 235-238.
52. Brandt, M.; Cardinale, J.; Aulsebrook, M. L.; Gasser, G.; Mindt, T. L., An Overview of PET Radiochemistry, Part 2: Radiometals. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1500-1506.

53. Price, E. W.; Orvig, C., Matching Chelators to Radiometals for Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 260-290.
54. Hofmann, M.; Maecke, H.; Börner, A.; Weckesser, E.; Schöffski, P.; Oei, M.; Schumacher, J.; Henze, M.; Heppeler, A.; Meyer, G.; Knapp, W., Biokinetics and Imaging with the Somatostatin Receptor PET Radioligand ^{68}Ga -DOTATOC: Preliminary Data. *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 1751-1757.
55. Notni, J.; Wester, H. J., Re-Thinking the Role of Radiometal Isotopes: Towards a Future Concept for Theranostic Radiopharmaceuticals. *J. Labelled Comp. Rad.* **2018**, *61*, 141-153.
56. Rangger, C.; Haubner, R., Radiolabelled Peptides for Positron Emission Tomography and Endoradiotherapy in Oncology. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 1-38.
57. Baranyai, Z.; Tircsó, G.; Rösch, F., The Use of the Macrocyclic Chelator DOTA in Radiochemical Separations. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2020**, *2020*, 36-56.
58. Amoroso, A. J.; Pope, S. J. A., Using Lanthanide Ions in Molecular Bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4723-4742.
59. Liu, P. F.; Mu, X. Y.; Zhang, X. D.; Ming, D., The Near-Infrared-II Fluorophores and Advanced Microscopy Technologies Development and Application in Bioimaging. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 260-275.
60. Berezin, M. Y.; Achilefu, S., Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641-2684.
61. Altinoğlu, E. İ.; Adair, J. H., Near Infrared Imaging with Nanoparticles. *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 461-477.
62. Cai, Y.; Wei, Z.; Song, C.; Tang, C.; Han, W.; Dong, X., Optical Nano-Agents in the Second Near-Infrared Window for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 22-37.
63. Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J., Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4496-4539.
64. Parker, D.; Bretonniere, Y. In *Luminescent Lanthanide Complexes as Sensors and Imaging Probes*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; pp 123-146.
65. Biju, V.; Hamada, M.; Ono, K.; Sugino, S.; Ohnishi, T.; Shibu, E. S.; Yamamura, S.; Sawada, M.; Nakanishi, S.; Shigeri, Y.; Wakida, S.-i., Nanoparticles Speckled by Ready-to-conjugate Lanthanide Complexes for Multimodal Imaging. *Nanoscale* **2015**, *7*, 14829-14837.

66. Ntziachristos, V.; Ripoll, J.; Wang, L. V.; Weissleder, R., Looking and Listening to Light: the Evolution of Whole-Body Photonic Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 313-320.
67. Graves, E. E.; Ripoll, J.; Weissleder, R.; Ntziachristos, V., A Submillimeter Resolution Fluorescence Molecular Imaging System for Small Animal Imaging. *Med. Phys.* **2003**, *30*, 901-911.
68. Zheng, Y.; Yang, H.; Wang, H.; Kang, K.; Zhang, W.; Ma, G.; Du, S., Fluorescence-Guided Surgery in Cancer Treatment: Current Status and Future Perspectives. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, S6-S6.
69. Nagaya, T.; Nakamura, Y. A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Fluorescence-Guided Surgery. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 1-16.
70. Sim, N.; Parker, D., Critical Design Issues in the Targeted Molecular Imaging of Cell Surface Receptors. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2122-2134.
71. Kostelnik, T. I.; Orvig, C., Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 902-956.
72. Allen, T. M., Ligand-Targeted Therapeutics in Anticancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 750-763.
73. Rezazadeh, F.; Sadeghzadeh, N., Tumor Targeting with ^{99m}Tc Radiolabeled Peptides: Clinical Application and Recent Development. *Chem. Biol. Drug Des.* **2019**, *93*, 205-221.
74. Küchenthal, C.-H.; Maison, W., Antibody Recruiting Small Molecules: A New Option for Prostate Tumor Therapy by PSMA Targeting. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1052-1054.
75. Collins, I.; Workman, P., New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 689-700.
76. Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G., Drug Targeting to Tumors: Principles, Pitfalls and (Pre-) Clinical Progress. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 175-187.
77. Silver, D. A.; Pellicer, I.; Fair, W. R.; Heston, W. D.; Cordon-Cardo, C., Prostate-Specific Membrane Antigen Expression in Normal and Malignant Human Tissues. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 81-85.
78. Danhier, F.; Le Breton, A.; Pr  at, V., RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 2961-2973.

79. Maison, W.; Frangioni, J. V., Improved Chemical Strategies for the Targeted Therapy of Cancer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4726-4728.
80. Donnelly, D. J., Small Molecule PET Tracers in Drug Discovery. *Semin. Nucl. Med.* **2017**, *47*, 454-460.
81. Li, Y.; Han, Z.; Roelle, S.; DeSanto, A.; Sabatelle, R.; Schur, R.; Lu, Z.-R., Synthesis and Assessment of Peptide Gd-DOTA Conjugates Targeting Extradomain B Fibronectin for Magnetic Resonance Molecular Imaging of Prostate Cancer. *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14*, 3906-3915.
82. Liu, S., Radiolabeled Cyclic RGD Peptide Bioconjugates as Radiotracers Targeting Multiple Integrins. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1413-1438.
83. Farzin, L.; Shamsipur, M.; Moassesi, M. E.; Sheibani, S., Clinical Aspects of Radiolabeled Aptamers in Diagnostic Nuclear Medicine: A New Class of Targeted Radiopharmaceuticals. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 2282-2291.
84. Meyer, C.; Hahn, U.; Rentmeister, A., Cell-Specific Aptamers as Emerging Therapeutics. *J. Nucleic Acids* **2011**, *2011*, 904750.
85. Bensch, F.; van der Veen, E. L.; Lub-de Hooge, M. N.; Jorritsma-Smit, A.; Boellaard, R.; Kok, I. C.; Oosting, S. F.; Schroder, C. P.; Hiltermann, T. J. N.; van der Wekken, A. J.; Groen, H. J. M.; Kwee, T. C.; Elias, S. G.; Gietema, J. A.; Bohorquez, S. S.; de Crespigny, A.; Williams, S. P.; Mancao, C.; Brouwers, A. H.; Fine, B. M.; de Vries, E. G. E., ⁸⁹Zr-Atezolizumab Imaging as a Non-Invasive Approach to Assess Clinical Response to PD-L1 Blockade in Cancer. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1852-1858.
86. Lorusso, M.; Scolozzi, V.; Taralli, S.; Caldarella, C.; Altini, C.; Rubini, G.; Calcagni, M. L., Radiolabelled Trastuzumab PET/CT Imaging: a Promising Non-Invasive Tool for the *In Vivo* Assessment of HER2 Status in Breast Cancer Patients. *Clin. Transl. Imaging* **2020**, *8*, 95-105.
87. Yoon, S.; Rossi, J. J., Targeted Molecular Imaging Using Aptamers in Cancer. *Pharmaceutics* **2018**, *11*, 1-16.
88. Bander, N. H., Technology Insight: Monoclonal Antibody Imaging of Prostate Cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2006**, *3*, 216-225.
89. Maltsev, O. V.; Marelli, U. K.; Kapp, T. G.; Di Leva, F. S.; Di Maro, S.; Nieberler, M.; Reuning, U.; Schwaiger, M.; Novellino, E.; Marinelli, L.; Kessler, H., Stable Peptides Instead of Stapled Peptides: Highly Potent $\alpha v \beta 6$ -Selective Integrin Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1535-1539.

90. Wei, W.; Rosenkrans, Z. T.; Liu, J.; Huang, G.; Luo, Q. Y.; Cai, W., ImmunoPET: Concept, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 3787-3851.
91. Farokhzad, O. C.; Cheng, J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kantoff, P. W.; Richie, J. P.; Langer, R., Targeted Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates for Cancer Chemotherapy *In Vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 6315-6320.
92. Rosenfeld, L.; Sananes, A.; Zur, Y.; Cohen, S.; Dhara, K.; Gelkop, S.; Ben Zeev, E.; Shahar, A.; Lobel, L.; Akabayov, B.; Arbely, E.; Papo, N., Nanobodies Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for the Imaging and Therapy of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **2020**.
93. Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A., Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9-22.
94. Raab-Westphal, S.; Marshall, J. F.; Goodman, S. L., Integrins as Therapeutic Targets: Successes and Cancers. *Cancers* **2017**, *9*, 1-28.
95. Ley, K.; Rivera-Nieves, J.; Sandborn, W. J.; Shattil, S., Integrin-Based Therapeutics: Biological Basis, Clinical Use and New Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 173-183.
96. Sökeland, G.; Schumacher, U., The Functional Role of Integrins During Intra- and Extravasation within the Metastatic Cascade. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 1-19.
97. Hynes, R. O., Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **2002**, *110*, 673-687.
98. Hamidi, H.; Pietilä, M.; Ivaska, J., The Complexity of Integrins in Cancer and New Scopes for Therapeutic Targeting. *Br. J. Canc.* **2016**, *115*, 1017-1023.
99. Avraamides, C. J.; Garmy-Susini, B.; Varner, J. A., Integrins in Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604-617.
100. Humphries, J. D.; Byron, A.; Humphries, M. J., Integrin Ligands at a Glance. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3901-3903.
101. Hamidi, H.; Ivaska, J., Every Step of the Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533-548.
102. Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M., New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins. *Science* **1987**, *238*, 491-497.
103. Marinelli, L.; Lavecchia, A.; Gottschalk, K.-E.; Novellino, E.; Kessler, H., Docking Studies on $\alpha v \beta 3$ Integrin Ligands: Pharmacophore Refinement and Implications for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4393-4404.

104. Bogdanowich-Knipp, S. J.; Chakrabarti, S.; Siahaan, T. J.; Williams, T. D.; Dillman, R. K., Solution Stability of Linear vs. Cyclic RGD Peptides. *J. Pep. Res.* **1999**, *53*, 530-541.
105. Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H., Nanomolar Small Molecule Inhibitors for $\alpha\text{v}\beta 6$, $\alpha\text{v}\beta 5$, and $\alpha\text{v}\beta 3$ Integrins. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-1051.
106. Temming, K.; Schiffelers, R. M.; Molema, G.; Kok, R. J., RGD-Based Strategies for Selective Delivery of Therapeutics and Imaging Agents to the Tumour Vasculature. *Drug Resist. Updat.* **2005**, *8*, 381-402.
107. Dijkgraaf, I.; Rijnders, A. Y.; Soede, A.; Dechesne, A. C.; van Esse, G. W.; Brouwer, A. J.; Corstens, F. H. M.; Boerman, O. C.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J., Synthesis of DOTA-Conjugated Multivalent Cyclic-RGD Peptide Dendrimers *via* 1,3-Dipolar Cycloaddition and their Biological Evaluation: Implications for Tumor Targeting and Tumor Imaging Purposes. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 935-944.
108. Schottelius, M.; Laufer, B.; Kessler, H.; Wester, H.-J., Ligands for Mapping $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin Expression *In Vivo*. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 969-980.
109. Schwarzenboeck, S. M.; Rauscher, I.; Bluemel, C.; Fendler, W. P.; Rowe, S. P.; Pomper, M. G.; Asfhar-Oromieh, A.; Herrmann, K.; Eiber, M., PSMA Ligands for PET Imaging of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 1545-1552.
110. Gourni, E.; Henriksen, G., Metal-Based PSMA Radioligands. *Molecules* **2017**, *22*, 1-34.
111. O'Keefe, D. S.; Bacich, D. J.; Huang, S. S.; Heston, W. D. W., A Perspective on the Evolving Story of PSMA Biology, PSMA-Based Imaging, and Endoradiotherapeutic Strategies. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1007-1013.
112. Horoszewicz, J. S.; Leong, S. S.; Kawinski, E.; Karr, J. P.; Rosenthal, H.; Chu, T. M.; Mirand, E. A.; Murphy, G. P., LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 1809-1818.
113. Heston, W. D. W., Characterization and Glutamyl Preferring Carboxypeptidase Function of Prostate Specific Membrane Antigen: A Novel Folate Hydrolase. *Urology* **1997**, *49*, 104-112.
114. Wu, X.; Gong, S.; Roy-Burman, P.; Lee, P.; Culig, Z., Current Mouse and Cell Models in Prostate Cancer Research. *Endocr.-Relat. Cancer* **2013**, *20*, R155-R170.
115. Cunningham, D.; You, Z., *In Vitro* and *In Vivo* Model Systems Used in Prostate Cancer Research. *J. Biol. Methods* **2015**, *2*, e17.

116. Mesters, J. R.; Barinka, C.; Li, W.; Tsukamoto, T.; Majer, P.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J.; Hilgenfeld, R., Structure of Glutamate Carboxypeptidase II, a Drug Target in Neuronal Damage and Prostate Cancer. *EMBO J.* **2006**, *25*, 1375-1384.
117. Anderson, M. O.; Wu, L. Y.; Santiago, N. M.; Moser, J. M.; Rowley, J. A.; Bolstad, E. S. D.; Berkman, C. E., Substrate Specificity of Prostate-Specific Membrane Antigen. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6678-6686.
118. Majer, P.; Jackson, P. F.; Delahanty, G.; Grella, B. S.; Ko, Y.-S.; Li, W.; Liu, Q.; Maclin, K. M.; Poláková, J.; Shaffer, K. A.; Stoermer, D.; Vitharana, D.; Wang, E. Y.; Zakrzewski, A.; Rojas, C.; Slusher, B. S.; Wozniak, K. M.; Burak, E.; Limsakun, T.; Tsukamoto, T., Synthesis and Biological Evaluation of Thiol-Based Inhibitors of Glutamate Carboxypeptidase II: Discovery of an Orally Active GCP II Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1989-1996.
119. Dannoon, S.; Ganguly, T.; Cahaya, H.; Geruntho, J. J.; Galliher, M. S.; Beyer, S. K.; Choy, C. J.; Hopkins, M. R.; Regan, M.; Blecha, J. E.; Skultetyova, L.; Drake, C. R.; Jivan, S.; Barinka, C.; Jones, E. F.; Berkman, C. E.; VanBrocklin, H. F., Structure–Activity Relationship of 18F-Labeled Phosphoramidate Peptidomimetic Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted Inhibitor Analogues for PET Imaging of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5684-5694.
120. Liu, T.; Wu, L. Y.; Kazak, M.; Berkman, C. E., Cell-Surface Labeling and Internalization by a Fluorescent Inhibitor of Prostate-Specific Membrane Antigen. *Prostate* **2008**, *68*, 955-964.
121. Valiaeva, N.; Bartley, D.; Konno, T.; Coward, J. K., Phosphinic Acid Pseudopeptides Analogous to Glutamyl- γ -glutamate: Synthesis and Coupling to Pteroyl Azides Leads to Potent Inhibitors of Folylpoly- γ -glutamate Synthetase. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5146-5154.
122. Humblet, V.; Misra, P.; Bhushan, K. R.; Nasr, K.; Ko, Y.-S.; Tsukamoto, T.; Pannier, N.; Frangioni, J. V.; Maison, W., Multivalent Scaffolds for Affinity Maturation of Small Molecule Cell Surface Binders and their Application to Prostate Tumor Targeting. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 544-550.
123. Maung, J.; Mallari, J. P.; Girtsman, T. A.; Wu, L. Y.; Rowley, J. A.; Santiago, N. M.; Brunelle, A. N.; Berkman, C. E., Probing for a Hydrophobic a Binding Register in Prostate-Specific Membrane Antigen with Phenylalkylphosphonamidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4969-4979.

124. Kozikowski, A. P.; Zhang, J.; Nan, F.; Petukhov, P. A.; Grajkowska, E.; Wroblewski, J. T.; Yamamoto, T.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H., Synthesis of Urea-Based Inhibitors as Active Site Probes of Glutamate Carboxypeptidase II: Efficacy as Analgesic Agents. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1729-1738.
125. Barinka, C.; Byun, Y.; Dusich, C. L.; Banerjee, S. R.; Chen, Y.; Castanares, M.; Kozikowski, A. P.; Mease, R. C.; Pomper, M. G.; Lubkowski, J., Interactions Between Human Glutamate Carboxypeptidase II and Urea-Based Inhibitors: Structural Characterization. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7737-7743.
126. Umbricht, C. A.; Benešová, M.; Schibli, R.; Müller, C., Preclinical Development of Novel PSMA-Targeting Radioligands: Modulation of Albumin-Binding Properties To Improve Prostate Cancer Therapy. *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15*, 2297-2306.
127. Wüstemann, T.; Haberkorn, U.; Babich, J.; Mier, W., Targeting Prostate Cancer: Prostate-Specific Membrane Antigen Based Diagnosis and Therapy. *Med. Res. Rev* **2019**, *39*, 40-69.
128. Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Schäfer, M.; Klika, K. D.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M., Linker Modification Strategies to Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1761-1775.
129. Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M., Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 914-920.
130. Derlin, T.; Kreipe, H.-H.; Schumacher, U.; Soudah, B., PSMA Expression in Tumor Neovasculature Endothelial Cells of Follicular Thyroid Adenoma as Identified by Molecular Imaging Using ^{68}Ga -PSMA Ligand PET/CT. *Clin. Nucl. Med.* **2017**, *42*, e173-e174.
131. Meyer, J.-P.; Adumeau, P.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M., Click Chemistry and Radiochemistry: The First 10 Years. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 2791-2807.
132. Mindt, T. L.; Müller, C.; Stuker, F.; Salazar, J.-F.; Hohn, A.; Mueggler, T.; Rudin, M.; Schibli, R., A "Click Chemistry" Approach to the Efficient Synthesis of Multiple Imaging Probes Derived from a Single Precursor. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1940-1949.
133. Ramogida, C. F.; Orvig, C., Tumour Targeting with Radiometals for Diagnosis and Therapy. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4720-4739.

134. Pickens, C. J.; Johnson, S. N.; Pressnall, M. M.; Leon, M. A.; Berkland, C. J., Practical Considerations, Challenges, and Limitations of Bioconjugation *via* Azide–Alkyne Cycloaddition. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 686-701.
135. El-Faham, A.; Albericio, F., Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.
136. Ogawa, K.; Yu, J.; Ishizaki, A.; Yokokawa, M.; Kitamura, M.; Kitamura, Y.; Shiba, K.; Odani, A., Radiogallium Complex-Conjugated Bifunctional Peptides for Detecting Primary Cancer and Bone Metastases Simultaneously. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1561-1570.
137. Tang, W.; Becker, M. L., “Click” Reactions: A Versatile Toolbox for the Synthesis of Peptide-Conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7013-7039.
138. Mascarin, A.; Valverde, I. E.; Vomstein, S.; Mindt, T. L., 1,2,3-Triazole Stabilized Neurotensin-Based Radiopeptidomimetics for Improved Tumor Targeting. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2143-2152.
139. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, *40*, 2004-2021.
140. Dai, C.; Cheng, Y.; Cui, J.; Wang, B., Click Reactions and Boronic Acids: Applications, Issues, and Potential Solutions. *Molecules* **2010**, *15*, 5768-5781.
141. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
142. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
143. Huisgen, R., 1,3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 604-637.
144. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V., Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340*, 457-460.
145. Hein, J. E.; Fokin, V. V., Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC) and Beyond: New Reactivity of Copper(I) Acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315.
146. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H., CuI-Catalyzed Alkyne–Azide “Click” Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 51-68.

147. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855.
148. Haldon, E.; Nicasio, M. C.; Perez, P. J., Copper-Catalysed Azide-Alkyne Cycloadditions (CuAAC): An Update. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9528-9550.
149. Lehmann, J.; Wright, M. H.; Sieber, S. A., Making a Long Journey Short: Alkyne Functionalization of Natural Product Scaffolds. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 4666-4678.
150. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
151. Colombo, M.; Bianchi, A., Click Chemistry for the Synthesis of RGD-Containing Integrin Ligands. *Molecules* **2010**, *15*, 178.
152. Meng, G.; Guo, T.; Ma, T.; Zhang, J.; Shen, Y.; Sharpless, K. B.; Dong, J., Modular Click Chemistry Libraries for Functional Screens Using a Diazotizing Reagent. *Nature* **2019**, *574*, 86-89.
153. Feng, L.; Xie, R.; Wang, C.; Gai, S.; He, F.; Yang, D.; Yang, P.; Lin, J., Magnetic Targeting, Tumor Microenvironment-Responsive Intelligent Nanocatalysts for Enhanced Tumor Ablation. *ACS Nano* **2018**, *12*, 11000-11012.
154. Mutas, M.; Strelow, C.; Kipp, T.; Mews, A., Specific Binding and Internalization: An Investigation of Fluorescent Aptamer-Gold Nanoclusters and Cells with Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *Nanoscale* **2018**, *10*, 20453-20461.
155. Jackson, J. A.; Hungnes, I. N.; Ma, M. T.; Rivas, C., Bioconjugates of Chelators with Peptides and Proteins in Nuclear Medicine: Historical Importance, Current Innovations, and Future Challenges. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 483-491.
156. Heskamp, S.; Raavé, R.; Boerman, O.; Rijpkema, M.; Goncalves, V.; Denat, F., ^{89}Zr -Immuno-Positron Emission Tomography in Oncology: State-of-the-Art ^{89}Zr Radiochemistry. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 2211-2223.
157. Stasiuk, G. J.; Long, N. J., The ubiquitous DOTA and its Derivatives: The Impact of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic Acid on Biomedical Imaging. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2732-2746.
158. Stetter, H.; Frank, W., Komplexbildung mit Tetraazacycloalkan- N,N',N'',N''' -tetraessigsäuren in Abhängigkeit von der Ringgröße. *Angew. Chem.* **1976**, *88*, 760-760.
159. Stetter, H.; Frank, W., Complex-Formation with Tetraazacycloalkane- N,N',N'',N''' -Tetraacetic Acids as a Function of Ring Size. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1976**, *15*, 686-686.

160. Caille, J. N.; Kien, P.; Allard, M.; Bonnemain, B., A New Contrast Agent for Use in Neuroradiological MRI, DOTA Gadolinium. *Am. J. Neuroradiol.* **1986**, *7*, 540-540.
161. Aime, S.; Botta, M.; Ermondi, G., NMR Study of Solution Structures and Dynamics of Lanthanide(III) Complexes of DOTA. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4291-4299.
162. Geraldes, C. F.; Sherry, A. D.; Brown, R. D., 3rd; Koenig, S. H., Magnetic Field Dependence of Solvent Proton Relaxation Rates Induced by Gd^{3+} and Mn^{2+} Complexes of Various Polyaza Macrocyclic Ligands: Implications for NMR Imaging. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *3*, 242-250.
163. Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W., Macrocyclic Effect on the Stability of Copper(II) Tetramine Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6540-6541.
164. Deshpande, S. V.; DeNardo, S. J.; Kukis, D. L.; Moi, M. K.; McCall, M. J.; DeNardo, G. L.; Meares, C. F., Yttrium-90-Labeled Monoclonal Antibody for Therapy: Labeling by a New Macrocyclic Bifunctional Chelating Agent. *J. Nucl. Med.* **1990**, *31*, 473-479.
165. Jones-Wilson, T. M.; Deal, K. A.; Anderson, C. J.; McCarthy, D. W.; Kovacs, Z.; Motekaitis, R. J.; Sherry, A. D.; Martell, A. E.; Welch, M. J., The *In Vivo* Behavior of Copper-64-Labeled Azamacrocyclic Complexes. *Nucl. Med. Biol.* **1998**, *25*, 523-530.
166. Wu, A. M.; Yazaki, P. J.; Tsai, S.-w.; Nguyen, K.; Anderson, A.-L.; McCarthy, D. W.; Welch, M. J.; Shively, J. E.; Williams, L. E.; Raubitschek, A. A.; Wong, J. Y. C.; Toyokuni, T.; Phelps, M. E.; Gambhir, S. S., High-Resolution MicroPET Imaging of Carcinoembryonic Antigen-Positive Xenografts by Using a Copper-64-Labeled Engineered Antibody Fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 8495-8500.
167. Kriemen, E.; Ruf, E.; Behrens, U.; Maison, W., Synthesis of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetra-azidoethylacetic Acid (DOTAZA) and Related "Clickable" DOTA Derivatives. *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 2197-2204.
168. Nielsen, L. G.; Junker, A. K. R.; Sørensen, T. J., Composed in the F-Block: Solution Structure and Function of Kinetically Inert Lanthanide(III) Complexes. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 10360-10376.
169. Dilworth, J. R.; Pascu, S. I., The Chemistry of PET Imaging with Zirconium-89. *Chem. Soc. Rev.* **2018**.
170. Aime, S.; Botta, M.; Garda, Z.; Kucera, B. E.; Tircso, G.; Young, V. G.; Woods, M., Properties, Solution State Behavior, and Crystal Structures of Chelates of DOTMA. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 7955-7965.

171. Ranganathan, R. S.; Pillai, R. K.; Raju, N.; Fan, H.; Nguyen, H.; Tweedle, M. F.; Desreux, J. F.; Jacques, V., Polymethylated DOTA Ligands. 1. Synthesis of Rigidified Ligands and Studies on the Effects of Alkyl Substitution on Acid–Base Properties and Conformational Mobility. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 6846-6855.
172. Kriemen, E.; Holzapfel, M.; Ruf, E.; Rehbein, J.; Maison, W., Synthesis and Structural Analysis of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10--tetraazidoethylacetic Acid (DOTAZA) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 5368-5378.
173. Hermann, P.; Kotek, J.; Kubicek, V.; Lukes, I., Gadolinium(III) Complexes as MRI Contrast Agents: Ligand Design and Properties of the Complexes. *Dalton Trans.* **2008**, 3027-3047.
174. Woods, M.; Payne, K. M.; Valente, E. J.; Kucera, B. E.; Young Jr., V. G., Crystal Structures of DOTMA Chelates from Ce^{3+} to Yb^{3+} : Evidence for a Continuum of Metal Ion Hydration States. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 9997-10005.
175. Opina, A. C.; Strickland, M.; Lee, Y. S.; Tjandra, N.; Andrew Byrd, R.; Swenson, R. E.; Vasalatiy, O., Analysis of the Isomer Ratios of Polymethylated-DOTA Complexes and the Implications on Protein Structural Studies. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 4673-4687.
176. Brittain, H. G.; Desreux, J. F., Luminescence and NMR-Studies of the Conformational Isomers of Lanthanide Complexes with an Optically-Active Polyaza Polycarboxylic Macrocycle. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 4459-4466.
177. Wiener, E. C.; Abadjian, M.-C.; Sengar, R.; Vander Elst, L.; Van Niekerk, C.; Grotjahn, D. B.; Leung, P. Y.; Schulte, C.; Moore, C. E.; Rheingold, A. L., Bifunctional Chelates Optimized for Molecular MRI. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 6554-6568.
178. Fulton, D. A.; Elemento, E. M.; Aime, S.; Chaabane, L.; Botta, M.; Parker, D., Glycoconjugates of Gadolinium Complexes for MRI Applications. *Chem. Commun.* **2006**, 1064-1066.
179. Liu, S., Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2199-2213.
180. Liu, S., Radiolabeled Multimeric Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Targeted Radiotracers for Tumor Imaging. *Mol. Pharmaceutics* **2006**, *3*, 472-487.
181. Singh, A. N.; Liu, W.; Hao, G.; Kumar, A.; Gupta, A.; Öz, O. K.; Hsieh, J.-T.; Sun, X., Multivalent Bifunctional Chelator Scaffolds for Gallium-68 Based Positron Emission Tomography Imaging Probe Design: Signal Amplification via Multivalency. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1650-1662.

182. Notni, J.; Reich, D.; Maltsev, O. V.; Kapp, T. G.; Steiger, K.; Hoffmann, F.; Esposito, I.; Weichert, W.; Kessler, H.; Wester, H.-J., *In Vivo* PET Imaging of the Cancer Integrin $\alpha v \beta 6$ Using ^{68}Ga -Labeled Cyclic RGD Nonapeptides. *J. Nucl. Med.* **2017**, *58*, 671-677.
183. Baranyai, Z.; Reich, D.; Vágner, A.; Weineisen, M.; Tóth, I.; Wester, H.-J.; Notni, J., A Shortcut to High-Affinity Ga-68 and Cu-64 Radiopharmaceuticals: One-Pot Click Chemistry Trimerisation on the TRAP Platform. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 11137-11146.
184. Kriemen, E., Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **2015**.
185. Shao, Q.; Jiang, S., Molecular Understanding and Design of Zwitterionic Materials. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 15-26.
186. Choi, H. S.; Gibbs, S. L.; Lee, J. H.; Kim, S. H.; Ashitate, Y.; Liu, F.; Hyun, H.; Park, G.; Xie, Y.; Bae, S.; Henary, M.; Frangioni, J. V., Targeted Zwitterionic Near-Infrared Fluorophores for Improved Optical Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 148-153.
187. Choi, H. S.; Nasr, K.; Alyabyev, S.; Feith, D.; Lee, J. H.; Kim, S. H.; Ashitate, Y.; Hyun, H.; Patonay, G.; Streckowski, L.; Henary, M.; Frangioni, J. V., Synthesis and *In Vivo* Fate of Zwitterionic Near-Infrared Fluorophores. *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 6382-6387.
188. Choi, H. S.; Nasr, K.; Alyabyev, S.; Feith, D.; Lee, J. H.; Kim, S. H.; Ashitate, Y.; Hyun, H.; Patonay, G.; Streckowski, L.; Henary, M.; Frangioni, J. V., Synthesis and *In Vivo* Fate of Zwitterionic Near-Infrared Fluorophores. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6258-6263.
189. Milne, M.; Chicas, K.; Li, A.; Bartha, R.; Hudson, R. H. E., ParaCEST MRI Contrast Agents Capable of Derivatization via "Click" Chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 287-292.
190. Opina, A. C. L.; Strickland, M.; Lee, Y. S.; Tjandra, N.; Swenson, R. E.; Vasalatiy, O., Comparison of Solution Properties of Polymethylated DOTA-like Lanthanide Complexes with Opposite Chirality of the Pendant Arms. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 15788-15800.
191. Nielsen, L. G.; Sørensen, T. J., Including and Declaring Structural Fluctuations in the Study of Lanthanide(III) Coordination Chemistry in Solution. *Inorg. Chem.* **2020**, *29*, 94-105.
192. Shi, J.; Wang, F.; Liu, S., Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Radiotracers for Tumor Imaging. *Biophys. Rep.* **2016**, *2*, 1-20.

193. Wängler, C.; Maschauer, S.; Prante, O.; Schäfer, M.; Schirmacher, R.; Bartenstein, P.; Eisenhut, M.; Wängler, B., Multimerization of cRGD Peptides by Click Chemistry: Synthetic Strategies, Chemical Limitations, and Influence on Biological Properties. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2168-2181.
194. Delli Castelli, D.; Caligara, M. C.; Botta, M.; Terreno, E.; Aime, S., Combined High Resolution NMR and ^1H and ^{17}O Relaxometric Study Sheds Light on the Solution Structure and Dynamics of the Lanthanide(III) Complexes of HPDO3A. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 7130-7138.
195. Tircso, G.; Webber, B. C.; Kucera, B. E.; Young, V. G.; Woods, M., Analysis of the Conformational Behavior and Stability of the SAP and TSAP Isomers of Lanthanide(III) NB-DOTA-Type Chelates. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 7966-7979.
196. Webber, B. C.; Woods, M., Structural Analysis of Isomeric Europium(III) Chelates of NB-DOTMA. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51*, 8576-8582.
197. Dunand, F. A.; Dickins, R. S.; Parker, D.; Merbach, A. E., Towards Rational Design of Fast Water-Exchanging Gd(DOTA-Like) Contrast Agents? Importance of the M/m Ratio. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5160-5167.
198. Woods, M.; Botta, M.; Avedano, S.; Wang, J.; Sherry, A. D., Towards the Rational Design of MRI Contrast Agents: A Practical Approach to the Synthesis of Gadolinium Complexes that Exhibit Optimal Water Exchange. *Dalton Trans.* **2005**, 3829-3837.
199. Aime, S.; Botta, M.; Fasano, M.; Marques, M. P. M.; Geraldes, C. F. G. C.; Pubanz, D.; Merbach, A. E., Conformational and Coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by ^1H -NMR Spectroscopy. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 2059-2068.
200. Woods, M.; Aime, S.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Moloney, J. M.; Navet, M.; Parker, D.; Port, M.; Rousseaux, O., Correlation of Water Exchange Rate with Isomeric Composition in Diastereoisomeric Gadolinium Complexes of Tetra(carboxyethyl)dota and Related Macrocyclic Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9781-9792.
201. Chang, C. A.; Francesconi, L. C.; Malley, M. F.; Kumar, K.; Gougoutas, J. Z.; Tweedle, M. F.; Lee, D. W.; Wilson, L. J., Synthesis, Characterization, and Crystal Structures of M(DO3A) (M = Iron, Gadolinium) and Na[M(DOTA)] (M = Fe, Yttrium, Gd). *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3501-3508.
202. Jahn, H. A.; Teller, E.; Donnan, F. G., Stability of Polyatomic Molecules in Degenerate Electronic States - I-Orbital Degeneracy. *Proc. R. Soc. Lond. A* **1937**, *161*, 220-235.

203. Benetollo, F.; Bombieri, G.; Calabi, L.; Aime, S.; Botta, M., Structural Variations Across the Lanthanide Series of Macrocyclic DOTA Complexes: Insights into the Design of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 148-157.
204. Aime, S.; Barge, A.; Bruce, J. I.; Botta, M.; Howard, J. A. K.; Moloney, J. M.; Parker, D.; de Sousa, A. S.; Woods, M., NMR, Relaxometric, and Structural Studies of the Hydration and Exchange Dynamics of Cationic Lanthanide Complexes of Macrocyclic Tetraamide Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5762-5771.
205. Avedano, S.; Botta, M.; Haigh, J. S.; L. Longo, D.; Woods, M., Coupling Fast Water Exchange to Slow Molecular Tumbling in Gd^{3+} Chelates: Why Faster Is Not Always Better. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8436-8450.
206. Livramento, J. B.; Weidensteiner, C.; Prata, M. I.; Allegrini, P. R.; Geraldies, C. F.; Helm, L.; Kneuer, R.; Merbach, A. E.; Santos, A. C.; Schmidt, P.; Toth, E., First *In Vivo* MRI Assessment of a Self-Assembled Metallostar Compound Endowed with a Remarkable High Field Relaxivity. *Contrast Med. Mol. Imaging* **2006**, *1*, 30-39.
207. Seri, S.; Hashiguchi, Y.; Kubomura, K.; Abe, Y.; Iguchi, T.; Iwai, K.; Watanabe, T., A Basic Research of Gadolinium Hydrogen $\alpha, \alpha', \alpha'', \alpha'''$ -Tetramethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate with High Complex Stability as a Contrast Agent for MRI. *Nippon Kagaku Kaishi* **1993**, *5*, 528-533.
208. Effenberger, F.; Burkard, U.; Willfahrt, J., Aminosäuren, 4. Enantioselektive Synthese *N*-Substituierter α -Aminocarbonsäuren aus α -Hydroxycarbonsäuren. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *1986*, 314-333.
209. Karfeld, L. S.; Bull, S. R.; Davis, N. E.; Meade, T. J.; Barron, A. E., Use of a Genetically Engineered Protein for the Design of a Multivalent MRI Contrast Agent. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1697-1700.
210. Kahnt, M.; Hoenke, S.; Fischer, L.; Al-Harrasi, A.; Csuk, R., Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of DOTA-Conjugates of Ursolic Acid. *Molecules* **2019**, *24*, 1-19.
211. Nakatani, S.; Ikura, M.; Yamamoto, S.; Nishita, Y.; Itadani, S.; Habashita, H.; Sugiura, T.; Ogawa, K.; Ohno, H.; Takahashi, K.; Nakai, H.; Toda, M., Design and Synthesis of Novel Metalloproteinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5402-5422.
212. Li, C.; Wong, W.-T., A Selective One-Step Synthesis of Tris *N*-Alkylated Cyclens. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5595-5601.

213. Piersanti, G.; Varrese, M. A.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Zappia, G., Short and Straightforward Synthesis of 1,7-Dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3436-3438.
214. Kovacs, Z.; Sherry, A. D., A General Synthesis of 1,7-Disubstituted 1,4,7,10-tetraazacyclododecanes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 185-186.
215. De León-Rodríguez, L. M.; Kovacs, Z.; Esqueda-Oliva, A. C.; Miranda-Olvera, A. D., Highly regioselective *N-trans* Symmetrical Diprotection of Cyclen. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6937-6940.
216. Fuge, F.; Weiler, M.; Gätjens, J.; Lammers, T.; Kiessling, F., Comparison and Systematic Optimization of Synthetic Protocols for DOTA-Hydrazide Generation. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 918-920.
217. Spirlet, M. R.; Rebizant, J.; Desreux, J. F.; Loncin, M. F., Crystal and Molecular Structure of Sodium Aqua(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetato)europate(III) Tetrahydrate $\text{Na}^+(\text{EuDOTA}\cdot\text{H}_2\text{O})\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and its Relevance to NMR Studies of the Conformational Behavior of the Lanthanide Complexes Formed by the Macrocyclic Ligand DOTA. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 359-363.
218. A. K. Howard, J.; M. Kenwright, A.; M. Moloney, J.; Parker, D.; Woods, M.; A. K. Howard, J.; Port, M.; Navet, M.; Rousseau, O., Structure and Dynamics of All of the Stereoisomers of Europium Complexes of Tetra(carboxyethyl) Derivatives of DOTA: Ring Inversion is Decoupled from Cooperative Arm Rotation in the *RRRR* and *RRRS* Isomers. *Chem. Commun.* **1998**, 1381-1382.
219. Blahut, J.; Hermann, P.; Tosner, Z.; Platas-Iglesias, C., A Combined NMR and DFT Study of Conformational Dynamics in Lanthanide Complexes of Macrocyclic DOTA-Like Ligands. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 26662-26671.
220. S. Dickins, R.; Parker, D.; I. Bruce, J.; J. Tozer, D., Correlation of Optical and NMR Spectral Information with Coordination Variation for Axially Symmetric Macrocyclic Eu(III) and Yb(III) Complexes: Axial Donor Polarisability Determines Ligand Field and Cation Donor Preference. *Dalton Trans.* **2003**, 1264-1271.
221. Desreux, J. F., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Lanthanide Complexes with a Tetraacetic Tetraaza Macrocycle. Unusual Conformation Properties. *Inorg. Chem. Commun.* **1979**, *19*, 1319-1324.
222. Miller, K. J.; Saherwala, A. A.; Webber, B. C.; Wu, Y.; Sherry, A. D.; Woods, M., The Population of SAP and TSAP Isomers in Cyclen-Based Lanthanide(III) Chelates Is Substantially Affected by Solvent. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 8662-8664.

223. Kimura, T.; Nagaishi, R.; Kato, Y.; Yoshida, Z., Luminescence study on Preferential Solvation of Europium(III) in Water/Non-Aqueous Solvent Mixtures. *J. Alloys Compd.* **2001**, 323-324, 164-168.
224. Di Bernardo, P.; Melchior, A.; Tolazzi, M.; Zanonato, P. L., Thermodynamics of Lanthanide(III) Complexation in Non-Aqueous Solvents. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 328-351.
225. Parker, D.; Puschmann, H.; Batsanov, A. S.; Senanayake, K., Structural Analysis of Nine-Coordinate Lanthanide Complexes: Steric Control of the Metal–Water Distance Across the Series. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 8646-8651.
226. Williams, T. J.; Kershaw, A. D.; Li, V.; Wu, X., An Inversion Recovery NMR Kinetics Experiment. *J. Chem. Educ.* **2011**, 88, 665-669.
227. Rohrer, M.; Bauer, H.; Mintorovitch, J.; Requardt, M.; Weinmann, H.-J., Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media Solutions at Different Magnetic Field Strengths. *Invest. Radiol.* **2005**, 40, 715-724.
228. Helm, L.; Morrow, J. R.; Bond, C. J.; Carniato, F.; Botta, M.; Braun, M.; Baranyai, Z.; Pujales-Paradela, R.; Regueiro-Figueroa, M.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Scholl, T. J., Chapter 2 Gadolinium-based Contrast Agents. In *Contrast Agents for MRI: Experimental Methods*, The Royal Society of Chemistry: 2018; pp 121-242.
229. Bhatt, N.; Pandya, D.; Wadas, T., Recent Advances in Zirconium-89 Chelator Development. *Molecules* **2018**, 23, 1-24.
230. Pandya, D. N.; Bhatt, N.; Yuan, H.; Day, C. S.; Ehrmann, B. M.; Wright, M.; Bierbach, U.; Wadas, T. J., Zirconium Tetraazamacrocyclic Complexes Display Extraordinary Stability and Provide a New Strategy for Zirconium-89-Based Radiopharmaceutical Development. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 2309-2314.
231. Geninatti, C.; Cabella, C.; Barge, A.; Belfiore, S.; Ghirelli, C.; Lattuada, L.; Lanzardo, S.; Mortillaro, A.; Tei, L.; Visigalli, M.; Forni, G.; Aime, S., *In Vitro* and *in Vivo* Magnetic Resonance Detection of Tumor Cells by Targeting Glutamine Transporters with Gd-Based Probes. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4926-4936.
232. Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P., The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin. *IUBMB Life* **2005**, 57, 787-796.
233. Holzapfel, M. Synthesis and Characterization of Diverse DOTAZA Derivatives. University Hamburg, Hamburg, 2015.

234. Förster, T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, 437, 55-75.
235. Bünzli, J.-C. G., Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2729-2755.
236. Härmä, H.; Soukka, T.; Shavel, A.; Gaponik, N.; Weller, H., Luminescent Energy Transfer Between Cadmium Telluride Nanoparticle and Lanthanide(III) Chelate in Competitive Bioaffinity Assays of Biotin and Estradiol. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 604, 177-183.
237. Hildebrandt, N.; Spillmann, C. M.; Algar, W. R.; Pons, T.; Stewart, M. H.; Oh, E.; Susumu, K.; Díaz, S. A.; Delehanty, J. B.; Medintz, I. L., Energy Transfer with Semiconductor Quantum Dot Bioconjugates: A Versatile Platform for Biosensing, Energy Harvesting, and Other Developing Applications. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 536-711.
238. Charbonnière, L. J.; Hildebrandt, N.; Ziessel, R. F.; Löhmannsröben, H.-G., Lanthanides to Quantum Dots Resonance Energy Transfer in Time-Resolved Fluoro-Immunoassays and Luminescence Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12800-12809.
239. Montgomery, C. P.; Murray, B. S.; New, E. J.; Pal, R.; Parker, D., Cell-Penetrating Metal Complex Optical Probes: Targeted and Responsive Systems Based on Lanthanide Luminescence. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 925-937.
240. Morgner, F.; Stufler, S.; Geißler, D.; Medintz, I. L.; Algar, W. R.; Susumu, K.; Stewart, M. H.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Hildebrandt, N., Terbium to Quantum Dot FRET Bioconjugates for Clinical Diagnostics: Influence of Human Plasma on Optical and Assembly Properties. *Sensors* **2011**, 11, 9667.
241. Förster, T., Experimentelle und theoretische Untersuchung des Zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Z. Naturforsch.* **1949**, 4, 321.
242. Boles, M. A.; Ling, D.; Hyeon, T.; Talapin, D. V., The Surface Science of Nanocrystals. *Nat. Mater.* **2016**, 15, 141-153.
243. Hotchkiss, P. J.; Jones, S. C.; Paniagua, S. A.; Sharma, A.; Kippelen, B.; Armstrong, N. R.; Marder, S. R., The Modification of Indium Tin Oxide with Phosphonic Acids: Mechanism of Binding, Tuning of Surface Properties, and Potential for Use in Organic Electronic Applications. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45, 337-346.
244. Queffelec, C.; Petit, M.; Janvier, P.; Knight, D. A.; Bujoli, B., Surface Modification Using Phosphonic Acids and Esters. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 3777-3807.

245. Gao, W.; Dickinson, L.; Grozinger, C.; Morin, F. G.; Reven, L., Self-Assembled Monolayers of Alkylphosphonic Acids on Metal Oxides. *Langmuir* **1996**, *12*, 6429-6435.
246. Pawsey, S.; Yach, K.; Reven, L., Self-Assembly of Carboxyalkylphosphonic Acids on Metal Oxide Powders. *Langmuir* **2002**, *18*, 5205-5212.
247. Andrews, B.; Almahdali, S.; James, K.; Ly, S.; Crowder, K. N., Copper Oxide Surfaces Modified by Alkylphosphonic Acids with Terminal Pyridyl-Based Ligands as a Platform for Supported Catalysis. *Polyhedron* **2016**, *114*, 360-369.
248. Najjar, M.; Suebsuwong, C.; Ray, S. S.; Thapa, R. J.; Maki, J. L.; Nogusa, S.; Shah, S.; Saleh, D.; Gough, P. J.; Bertin, J.; Yuan, J.; Balachandran, S.; Cuny, G. D.; Degterev, A., Structure Guided Design of Potent and Selective Ponatinib-Based Hybrid Inhibitors for RIPK1. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 1850-1860.
249. Appel, R., Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801-811.
250. Wanat, P.; Walczak, S.; Wojtczak, B. A.; Nowakowska, M.; Jemielity, J.; Kowalska, J., Ethynyl, 2-Propynyl, and 3-Butynyl C-Phosphonate Analogues of Nucleoside Di- and Triphosphates: Synthesis and Reactivity in CuAAC. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3062-3065.
251. Michaelis, A.; Kaehne, R., Ueber das Verhalten der Jodalkyle gegen die sogen. Phosphorigsäureester oder O-Phosphine. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *31*, 1048-1055.
252. Bhattacharya, A. K.; Thyagarajan, G., Michaelis-Arbuzov rearrangement. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 415-430.
253. Pasini, D., The Click Reaction as an Efficient Tool for the Construction of Macrocyclic Structures. *Molecules* **2013**, *18*, 9512-9530.
254. Artyushin, O. I.; Sharova, E. V.; Yarkevich, A. N.; Genkina, G. K.; Vinogradova, N. V.; Brel, V. K., Design of Phosphonate Analogs of Short Peptides by “Click” Chemistry. *Russ. Chem. Bull.* **2015**, *64*, 2172-2177.
255. Krishna, H.; Caruthers, M. H., Alkynyl Phosphonate DNA: A Versatile “Click”able Backbone for DNA-Based Biological Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11618-11631.

256. Matthiesen, R. A.; Varney, M. L.; Xu, P. C.; Rier, A. S.; Wiemer, D. F.; Holstein, S. A., α -Methylation Enhances the Potency of Isoprenoid Triazole Bisphosphonates as Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 376-385.
257. Delain-Bioton, L.; Villemin, D.; Lohier, J.-F.; Sopkova, J.; Jaffrès, P.-A., Synthesis of Triazolyl-alkylphosphonate Starting from ω -Azidoalkylphosphonates or ω -Alkynylphosphonates. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9677-9684.
258. Chruściński, L.; Młynarz, P.; Malinowska, K.; Ochocki, J.; Boduszek, B.; Kozłowski, H., Methylphosphonate, Hydroxymethylphosphonate and Aminomethylphosphonate Ligands Containing Pyridine, Pyrazole or Imidazole Side Chains: The Coordination Abilities Towards Cu(II) Ions. *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *303*, 47-53.
259. Serim, S.; Mayer, S. V.; Verhelst, S. H. L., Tuning Activity-Based Probe Selectivity for Serine Proteases by On-Resin 'Click' Construction of Peptide Diphenyl Phosphonates. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5714-5721.
260. Pérez-Saavedra, B.; Vázquez-Galiñanes, N.; Saá, C.; Fañanás-Mastral, M., Copper(I)-Catalyzed Tandem Carboarylation/Cyclization of Alkynyl Phosphonates with Diaryliodonium Salts. *ACS Catalysis* **2017**, *7*, 6104-6109.
261. Matthiesen, R. A.; Wills, V. S.; Metzger, J. I.; Holstein, S. A.; Wiemer, D. F., Stereoselective Synthesis of Homoneryl and Homogeranyl Triazole Bisphosphonates. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9438-9442.
262. Burt, D. W.; Simpson, P., Synthesis of Ethynylphosphonate Esters. A Novel Organosilicon Rearrangement. *J. Chem. Soc. C. Organic* **1969**, 2273-2276.
263. Wisniewska, H. M.; Swift, E. C.; Jarvo, E. R., Functional Group Tolerant Nickel-Catalyzed Cross-Coupling Reaction for Enantioselective Construction of 3⁰ Methyl-Bearing Stereocenters. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9083-9090.
264. Guerrero, G.; Mutin, P. H.; Vioux, A., Anchoring of Phosphonate and Phosphinate Coupling Molecules on Titania Particles. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 4367-4373.
265. Guerrero, G.; Alauzun, J. G.; Granier, M.; Laurencin, D.; Mutin, P. H., Phosphonate Coupling Molecules for the Control of Surface/Interface Properties and the Synthesis of Nanomaterials. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 12569-12585.
266. Wölfel, E. R., *Theorie und Praxis der Röntgenstrukturanalyse*. Vieweg+Teubner Verlag: Wiesbaden, 1987; Vol. 3, p 327.
267. Bethge, H.; Heydenreich, J., *Elektronenmikroskopie in der Festkörperphysik*. Springer-Verlag: Berlin, 1982; Vol. 1, p 564.

268. Masson, J. F.; Bundalo-Perc, S., Solventless Fingerprinting of Bituminous Materials: A High-Resolution Thermogravimetric Method. *Thermochim. Acta* **2005**, *436*, 35-42.
269. Chen, X.; Hou, Y.; Tohme, M.; Park, R.; Khankaldyyan, V.; Gonzales-Gomez, I.; Bading, J. R.; Laug, W. E.; Conti, P. S., Pegylated Arg-Gly-Asp Peptide: ^{64}Cu Labeling and PET Imaging of Brain Tumor $\alpha\beta 3$ -Integrin Expression. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45*, 1776-1783.
270. Roxin, Á.; Zhang, C.; Huh, S.; Lepage, M.; Zhang, Z.; Lin, K.-S.; Bénard, F.; Perrin, D. M., A Metal-Free DOTA-Conjugated ^{18}F -Labeled Radiotracer: [^{18}F]DOTA-AMBF3-LLP2A for Imaging VLA-4 Over-Expression in Murine Melanoma with Improved Tumor Uptake and Greatly Enhanced Renal Clearance. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 1210-1219.
271. Zhang, Y.; Zhao, J.; Cai, J.; Ye, J.-C.; Xiao, Y.-T.; Mei, Y.; Zeng, M.-S.; Xie, C.-M.; Jiang, Y.; Feng, G.-K., Integrin $\alpha 6$ -Targeted Magnetic Resonance Imaging of Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Mol. Imaging Biol.* **2019**.
272. T. Kapp, F. R., S. Neubauer, O. Maltsev, E. Cavalcanti-Adam, R. Zarka, U. Reuning, A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci. Rep.* **2016**, *7*, 1-13.
273. Simecek, J.; Notni, J.; Kapp, T. G.; Kessler, H.; Wester, H. J., Benefits of NOPO as chelator in gallium-68 peptides, exemplified by preclinical characterization of ^{68}Ga -NOPO-c(RGDfK). *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 1687-1695.
274. Brooks, P. C.; Montgomery, A. M. P.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Cheresh, D. A., Integrin $\alpha\beta 3$ Antagonists Promote Tumor Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood Vessels. *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.
275. Chen, X.; Park, R.; Shahinian, A. H.; Bading, J. R.; Conti, P. S., Pharmacokinetics and Tumor Retention of ^{125}I -labeled RGD Peptide are Improved by PEGylation. *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31*, 11-19.
276. Dai, X.; Su, Z.; Liu, J. O., An Improved Synthesis of a Selective $\alpha\beta 3$ -Integrin Antagonist Cyclo(-RGDfK-). *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6295-6298.
277. Quéléver, G.; Kachidian, P.; Melon, C.; Garino, C.; Laras, Y.; Pietrancosta, N.; Sheha, M.; Louis Kraus, J., Enhanced Delivery of γ -Secretase Inhibitor DAPT into the Brain via an Ascorbic Acid Mediated Strategy. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2450-2457.
278. Srinivasan, B.; Huang, X., Functionalization of Magnetic Nanoparticles with Organic Molecules: Loading Level Determination and Evaluation of Linker Length Effect on Immobilization. *Chirality* **2008**, *20*, 265-277.

279. Jonczyk, A.; Goodman, S.; Diefenbach, B.; Sutter, A.; Kessler, H. Preparation of Cyclopeptides as Integrin Inhibitors. DE19538741A1, **1997**.
280. Notni, J.; Wester, H.-J., A Practical Guide on the Synthesis of Metal Chelates for Molecular Imaging and Therapy by Means of Click Chemistry. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11500-11508.
281. Gryder, B. E.; Akbashev, M. J.; Rood, M. K.; Raftery, E. D.; Meyers, W. M.; Dillard, P.; Khan, S.; Oyelere, A. K., Selectively Targeting Prostate Cancer with Antiandrogen Equipped Histone Deacetylase Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2550-2560.
282. Blanck, I. Synthese DOTA-Basierter Metallchelatoren für Zielgerichtete Tumordiagnostik. Universität Hamburg, **2019**.
283. Bejot, R.; Goggi, J.; Moonshi, S. S.; Robins, E. G., A Practical Synthesis of [¹⁸F]FtRGD: An Angiogenesis Biomarker for PET. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*, 42-49.
284. Park, Y. D.; Park, S. H.; Min, J. J.; Heo, M. G. Squalene Derivative, and Near-Infrared or Photoacoustic Imaging Composition for Tumor Diagnosis. KR2018103364A, **2018**.
285. Solène Passemard, D. S., Lucia Učňová, Guillaume Stéphane Schneiter, Phally Kong, Luigi Bonacina, Lucienne Juillerat-Jeanneret, Sandrine Gerber-Lemaire, Convenient Synthesis of Heterobifunctional Poly(ethylene glycol) Suitable for the Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5006-5010.
286. Pal, K.; Koner, A. L., Rationally Designed Solvatochromic Fluorescent Indoline Derivatives for Probing Mitochondrial Environment. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 8610-8614.
287. Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H., Multimeric Cyclic RGD Peptides as Potential Tools for Tumor Targeting: Solid-Phase Peptide Synthesis and Chemoselective Oxime Ligation. *Chemistry* **2003**, *9*, 2717-2725.
288. Georgiadis, D.; Dive, V., Phosphinic Peptides as Potent Inhibitors of Zinc-Metalloproteases. In *Phosphorus Chemistry I: Asymmetric Synthesis and Bioactive Compounds*, Montchamp, J.-L., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 1-38.
289. Navratil, M.; Ptacek, J.; Sacha, P.; Starkova, J.; Lubkowski, J.; Barinka, C.; Konvalinka, J., Structural and Biochemical Characterization of the Folyl-Poly-Gamma-L-Glutamate Hydrolyzing Activity of Human Glutamate Carboxypeptidase II. *FEBS J.* **2014**, *281*, 3228-3242.

290. Peric, N., Dissertation, Universität Hamburg, **2019**.
291. Chandralingam, S., Unveröffentlichte Arbeit, Universität Hamburg, **2020**.
292. Rüping, F., Dissertation, Universität Hamburg, **2017**.
293. Kinberger, G. A.; Prakash, T. P.; Yu, J.; Vasquez, G.; Low, A.; Chappell, A.; Schmidt, K.; Murray, H. M.; Gaus, H.; Swayze, E. E.; Seth, P. P., Conjugation of Mono and di-GalNAc Sugars Enhances the Potency of Antisense Oligonucleotides *via* ASGR Mediated Delivery to Hepatocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3690-3693.
294. Hartwig, J. F., Transition Metal Catalyzed Synthesis of Arylamines and Aryl Ethers from Aryl Halides and Triflates: Scope and Mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2046-2067.
295. Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F., Palladium-Catalyzed Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. Reaction Intermediates and Catalyst Improvements in the Hetero Cross-Coupling of Aryl Halides and Tin Amides. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5969-5970.
296. Guram, A. S.; Buchwald, S. L., Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with *in situ* Generated Aminostannanes. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7901-7902.
297. Fleck, C.; Franzmann, E.; Claes, D.; Rickert, A.; Maison, W., Synthesis of Functionalized Adamantane Derivatives: (3+1)-Scaffolds for Applications in Medicinal and Material Chemistry. *Synthesis* **2013**, *45*, 1452-1461.
298. Holzapfel, M.; Mutas, M.; Chandralingam, S.; von Salisch, C.; Peric, N.; Segelke, T.; Fischer, M.; Chakraborty, I.; Parak, W. J.; Frangioni, J. V.; Maison, W., Nonradioactive Cell Assay for the Evaluation of Modular Prostate-Specific Membrane Antigen Targeting Ligands via Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10912-10918.
299. Liberio, M. S.; Sadowski, M. C.; Soekmadji, C.; Davis, R. A.; Nelson, C. C., Differential Effects of Tissue Culture Coating Substrates on Prostate Cancer Cell Adherence, Morphology and Behavior. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e112122.
300. Arantes de Carvalho, G. G.; Oliveira, P. V.; Yang, L., Determination of Europium Isotope Ratios in Natural Waters by MC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2017**, *32*, 987-995.

301. Banerjee, S. R.; Ngen, E. J.; Rotz, M. W.; Kakkad, S.; Lisok, A.; Pracitto, R.; Pullambhatla, M.; Chen, Z.; Shah, T.; Artemov, D.; Meade, T. J.; Bhujwalla, Z. M.; Pomper, M. G., Synthesis and Evaluation of Gd^{III}-Based Magnetic Resonance Contrast Agents for Molecular Imaging of Prostate-Specific Membrane Antigen. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10778-10782.
302. Nold, P.; Hartmann, R.; Feliu, N.; Kantner, K.; Gamal, M.; Pelaz, B.; Hühn, J.; Sun, X.; Jungebluth, P.; del Pino, P.; Hackstein, H.; Macchiarini, P.; Parak, W. J.; Brendel, C., Optimizing Conditions for Labeling of Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) with Gold Nanoparticles: a Prerequisite for *In Vivo* Tracking of MSCs. *J. Nanobiotechnol.* **2017**, *15*, 24.
303. Pu, F.; Salarian, M.; Xue, S.; Qiao, J.; Feng, J.; Tan, S.; Patel, A.; Li, X.; Mamouni, K.; Hekmatyar, K.; Zou, J.; Wu, D.; Yang, J. J., Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Protein Contrast Agents for Molecular Imaging of Prostate Cancer by MRI. *Nanoscale* **2016**, *8*, 12668-12682.
304. Sun, X.; Gamal, M.; Nold, P.; Said, A.; Chakraborty, I.; Pelaz, B.; Schmied, F.; von Pückler, K.; Figiel, J.; Zhao, Y.; Brendel, C.; Hassan, M.; Parak, W. J.; Feliu, N., Tracking Stem Cells and Macrophages with Gold and Iron Oxide Nanoparticles – The Choice of the Best Suited Particles. *Appl. Mater. Today* **2019**, *15*, 267-279.
305. Wang, X.; Ma, D.; Olson, W. C.; Heston, W. D., *In Vitro* and *In Vivo* Responses of Advanced Prostate Tumors to PSMA ADC, an Auristatin-Conjugated Antibody to Prostate-Specific Membrane Antigen. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1728-1739.
306. Lichte, F. E.; Meier, A. L.; Crock, J. G., Determination of the Rare-Earth Elements in Geological Materials by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1150-1157.
307. Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L.; Taylor, C. E., Inductively Coupled Argon Plasma as an Ion Source for Mass Spectrometric determination of Trace Elements. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2283-2289.
308. Tóth, É.; Brücher, E., Stability Constants of the Lanthanide(III)-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tetraacetate Complexes. *Inorg. Chim. Acta* **1994**, *221*, 165-167.
309. Zhang, S.; Kovacs, Z.; Burgess, S.; Aime, S.; Terreno, E. and Sherry, A., {DOTA-bis(amide)}lanthanide Complexes: NMR Evidence for Differences in Water-Molecule Exchange Rates for Coordination Isomers. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*: 288-296.

310. Dam, J. H.; Olsen, B. B.; Baun, C.; Høilund-Carlsen, P. F.; Thisgaard, H., A PSMA Ligand Labeled with Cobalt-55 for PET Imaging of Prostate Cancer. *Mol. Imaging Biol.* **2017**, *19*, 915-922.
311. Gourni, E.; Canovas, C.; Goncalves, V.; Denat, F.; Meyer, P. T.; Maecke, H. R., (R)-NODAGA-PSMA: A Versatile Precursor for Radiometal Labeling and Nuclear Imaging of PSMA-Positive Tumors. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0145755.
312. Deri, M. A.; Zeglis, B. M.; Francesconi, L. C.; Lewis, J. S., PET Imaging with ^{89}Zr : from Radiochemistry to the Clinic. *Nucl. Med. Biol.* **2013**, *40*, 3-14.
313. Solnes, L. B.; Werner, R. A.; Jones, K. M.; Sadaghiani, M. S.; Bailey, C. R.; Lapa, C.; Pomper, M. G.; Rowe, S. P., Theranostics: Leveraging Molecular Imaging and Therapy to Impact Patient Management and Secure the Future of Nuclear Medicine. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61*, 311-318.
314. Williams, D. B. G.; Lawton, M., Drying of Organic Solvents: Quantitative Evaluation of the Efficiency of Several Desiccants. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351-8354.
315. Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I., NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Malte Holzapfel
Geburtstag/-ort 30.07.1989, Hamburg

Ausbildung

05/2015 - 08/2020 Promotion in Pharmazeutischer und Medizinischer Chemie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfgang Maison: „Synthese und Anwendung makrocyclischer Chelatoren für metallbasierte Diagnostik“
Universität Hamburg, Hamburg

04/2013 - 05/2015 Masterstudium der Chemie an der Universität Hamburg
05/2015 Masterarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfgang Maison, Institut für Pharmazeutischer und Medizinischer Chemie: „Synthese und Charakterisierung verschiedener DOTAZA-Derivate“

10/2009 - 03/2013 Bachelorstudium der Chemie an der Universität Hamburg
03/2013 Bachelorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Maison, Institut für Pharmazeutischer und Medizinischer Chemie: „Synthese divalenter Derivate der Phenylboronsäure“

06/2009 Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium Rissen

Publikationen

1. Holzapfel, M.; Mutas, M.; Chandralingam, S.; von Salisch, C.; Peric, N.; Segelke, T.; Fischer, M.; Chakraborty, I.; Parak, W. J.; Frangioni, J. V.; Maison, W., Nonradioactive Cell Assay for the Evaluation of Modular Prostate-Specific Membrane Antigen Targeting Ligands via Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10912-10918.
2. Kriemen, E.; Holzapfel, M.; Ruf, E.; Rehbein, J.; Maison, W., Synthesis and Structural Analysis of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10--tetraazidoethylacetic Acid (DOTAZA) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 5368-5378.
3. Claes, D.; Memmel, E.; Holzapfel, M.; Seibel, J.; Maison, W., High-Affinity Carbohydrate Binding by Trimeric Benzoboroxoles Measured on Carbohydrate Arrays. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2450-2457.
4. Claes, D.; Holzapfel, M.; Clausen, N.; Maison, W., Synthesis of Adamantane-Based Trimeric Benzoboroxoles. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 6361-6371.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde

Hamburg, den 09.02.2021