

# Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Carmen Wängler  
aus Bad Kreuznach

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2007



Synthese, Charakterisierung und  
Evaluierung von Antikörperkonjugaten mit Dendrimer-  
basierten Chelator- und Fluoreszenzfarbstoffmultimeren  
für die Krebsdiagnostik und Therapie

Gutachter: Prof. Dr. Michael Eisenhut  
Priv. Doz. Dr. Walter Mier



*für meine Familie*



## Abstraktum

Für eine Verbesserung der radiometallbasierten Diagnostik und Therapie sowie der Diagnostik mittels Fluoreszenzfarbstoffen wurden Chelatbildner- und Fluoreszenzfarbstoff-Multimere auf der Basis von PAMAM-Dendrimern hergestellt. Diese wurden in den EGF-Rezeptor bindenden Antikörper Matuzumab eingeführt und die synthetisierten Antikörper-Multimer-Konjugate hinsichtlich ihrer Immunreaktivität untersucht.

Für die Herstellung der Multimere musste zunächst die Synthese der PAMAM-Dendrimere optimiert werden, da mittels publizierter Methoden nur Dendrimere unzureichender Homogenität erhalten werden konnten. Hierdurch war es möglich, Dendrimere mit einer bis 128 Aminfunktionen in hoher Homogenität herzustellen. Die Dendrimere wurden auf einem Pentaethylglycol-Linker aufgebaut, der eine Thiol-Funktion für die Umsetzung mit Antikörpern trug.

Es wurde eine große Anzahl von Fluoreszenzfarbstoffen auf ihre Multimerisierbarkeit auf diesen Dendrimer-Cores untersucht. Allerdings wiesen nur Dansylchlorid, NBD-chlorid, Coumarin 343, 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylester und Sulforhodamin B2 Fluorid ausreichend hohe Reaktivitäten mit den Aminfunktionen der PAMAM-Dendrimere auf. Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der hergestellten Farbstoff-Multimere zeigte allerdings, dass sich für eine Multimerisierung zur Verstärkung von Fluoreszenzsignalen einzig Dansylchlorid eignet. Folglich wurden Dansyl-Multimere mit 1 bis 128 Dansylresten synthetisiert und mittels Größenausschlusschromatographie, HPLC, NMR und Massenspektroskopie charakterisiert. Die Dansyl-Multimere Dansyl<sub>8</sub>-SH, Dansyl<sub>16</sub>-SH, Dansyl<sub>32</sub>-SH und Dansyl<sub>64</sub>-SH wurden in den anti-EGFR Antikörper Matuzumab eingeführt, wobei sich zeigte, dass sich die größeren Dansyl-Multimere Dansyl<sub>32</sub>-SH und Dansyl<sub>64</sub>-SH nicht für eine Derivatisierung von Antikörpern eignen, da sie, wahrscheinlich aufgrund ihrer hohen Lipophilie, bei Einführung in das Protein zur Denaturierung des Antikörpers führten. Das Dansyl<sub>16</sub>-Antikörper-Konjugat war somit das größte herstellbare Konjugat, das isoliert und charakterisiert werden konnte. Diese Verbindung wurde an HT29-Zellen hinsichtlich ihrer Immunreaktivität untersucht und zeigte relativ zum underivatisierten Antikörper eine zu 54% erhaltene Immunreaktivität.

Für die Herstellung der Chelat-Multimere wurden zunächst die bekannten Syntheseprotokolle der als Synthon benötigten DOTA-Derivate Tris-*t*Bu-DOTA, Thiol-DOTA und Tris-benzyl-DOTA verbessert. Neben diesen Derivaten wurden weiterhin Tris-allyl-DOTA, DOTA-PFP-ester und DOTA-PNP-ester sowie ein neues Derivat, Tris-4-nitrobenzyl-DOTA, hergestellt und mit den Dendrimern umgesetzt. Einzig Thiol-DOTA ließ sich quantitativ in die Dendrimere einführen und ergab die gewünschten Chelat-Multimere mit 1 bis 128 DOTAs in hoher Homogenität, die nach ihrer vollständigen Charakterisierung in den Antikörper Matuzumab eingeführt wurden. Dabei wurde sowohl die Anzahl als auch die Größe der eingeführten Multimere variiert, um systematisch zu untersuchen, welchen Einfluss die Größe und die Anzahl der gekoppelten Dendrimere auf die Immunreaktivität der derivatisierten Antikörper haben. Es sollte herausgefunden werden, ob ein Optimum mit größtmöglicher Anzahl von Chelatbildnern und geringst möglicher Verschlechterung der Immunreaktivität erreicht werden kann. Die erhaltenen Antikörper-Multimer-Konjugate wurden hinsichtlich ihrer Immunreaktivität an HT29-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Größe des angekoppelten DOTA-Multimers über einen weiten Molekulargewichtsbereich nur einen geringen Einfluss auf die Immunreaktivität des Antikörper-Konjugates hat, dass jedoch die Anzahl der Derivatisierungsstellen pro Antikörper einen drastischen Einfluss auf die Immunreaktivität der Konjugate hat.



## Abstract

For an improved radiometal-based diagnosis and therapy and diagnosis by optical imaging, chelator- and fluorescent dye-multimers based on PAMAM-dendrimers were synthesised. These multimers were introduced into the anti-EGFR-antibody Matuzumab and the conjugates synthesised were investigated with regard to their immunoreactivities.

For the synthesis of the multimers on the PAMAM-dendrimer scaffolds, the PAMAM-dendrimer synthesis had to be optimised as the published protocols lead to highly heterogeneous dendritic structures. After optimisation of the synthesis procedures, homogeneous PAMAM-dendrimers containing 1 to 128 amino functions could be synthesised on a pentaethyleneglycol linker that provides an improved reactivity of the thiol for the antibody conjugation.

These dendrimers were used for multimerisation reactions with fluorescent dyes. A high number of fluorescent dyes was investigated with regard to their coupling efficiencies to the amino functions of the dendrimers. However, only dansyl chloride, NBD-chloride, Coumarin 343, 5(6)-carboxyfluorescein-pentafluorophenyl-ester and sulforhodamine B2 acid fluoride could be coupled with high efficiency leading to homogeneous products. The investigation of the fluorescence properties of the synthesised dye-multimers showed a strong self-quenching of fluorescence of the NBD-, Coumarin 343-, carboxyfluorescein- and sulforhodamine-multimers which can be attributed to the small Stokes-shift of the dyes. In contrast to this, the dansyl-multimers showed just a minor self-quenching of fluorescence which makes only dansyl chloride applicable for multimerisation reactions leading to higher fluorescence signals. Due to this, dye-multimers containing from 1 to 128 dansyl moieties were synthesised and characterised. The dansyl-multimers Dansyl<sub>8</sub>-SH, Dansyl<sub>16</sub>-SH, Dansyl<sub>32</sub>-SH and Dansyl<sub>64</sub>-SH were introduced into the antibody Matuzumab, however, it could be observed that the larger multimers containing 32 and 64 dansyl moieties led to the denaturation of the coupling products which is probably due to the high lipophilicity of the dye-multimers. The highest number of dansyl moieties that could be introduced into the antibody molecule was therefore 16. The Dansyl<sub>16</sub>-antibody-conjugate was isolated and characterised by size-exclusion chromatography, HPLC, NMR and mass spectrometry. Its immunoreactivity was determined using HT29-cells and found to be 54% of the underivatized antibody.

For the synthesis of the chelate-multimers, the synthesis protocols for the DOTA-derivatives tris-*t*Bu-DOTA, thiol-DOTA and tris-benzyl-DOTA had to be optimised. Besides these derivatives, tris-allyl-DOTA, DOTA-PFP-ester, DOTA-PNP-ester and a new compound, tris-4-nitrobenzyl-DOTA, were synthesised and reacted with the amino functions of the PAMAM-dendrimers. Of the studied derivatives, only thiol-DOTA could be quantitatively introduced into the dendrimers and yielded the highly homogeneous DOTA-multimers containing 1 to 128 DOTAs. These multimers were characterised and introduced into the antibody Matuzumab. To systematically investigate the influence of the number and the size of the introduced DOTA-multimers on the immunoreactivity of the antibody-multimer-conjugates, the number and the size of the DOTA-multimers coupled were varied. The conjugates were investigated with regard to their immunoreactivities using HT29-cells. The results showed that the size of the introduced DOTA-multimers has over a wide molecular weight range just a minor influence on the immunoreactivity of the conjugates whereas the number of derivatization sites has a crucial effect on the immunoreactivities of the conjugates.



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Zielgerichtete Tumorthherapie	1
1.2	Nuklearmedizinische Therapieformen	2
1.2.1	Geeignete Radionuklide für die Endoradiotherapie	4
1.2.2	Markierung mit therapeutischen Radionukliden	7
1.2.3	Beispiele für Endoradiotherapeutika	10
1.2.4	Neue Therapieoptionen	13
1.3	Nuklearmedizinische Krebsdiagnostik	15
1.3.1	Geeignete Radionuklide für die nuklearmedizinische Diagnostik	15
1.3.2	Markierung mit diagnostischen Radionukliden	16
1.3.3	Beispiele für radiomarkierte Tracer in der onkologischen Diagnostik	17
1.3.4	Verbesserung radiometallbasierter Diagnostik	18
1.4	Verbesserung der Krebs-Diagnostik mittels optischer Bildgebung	19
1.5	Dendrimere als Basis für Multimerisierungsreaktionen	20
1.6	Biokonjugationsreaktionen	24
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>29</b>
3.1	Optimierung der PAMAM-Dendrimer Synthese	29
3.2	Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-Multimere	34
3.3	Derivatisierung von Octreotid-Maleimidohexansäure mit den Dansyl-Multimeren	42
3.4	Antikörper-Derivatisierungen mit den Dansyl-Multimeren	43
3.5	Multimerisierung Caspase-spaltbarer Peptid-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate	47

3.6	Darstellung der DOTA-Dendrimere und Optimierung der Synthese verschiedener DOTA-Derivate	50
3.7	Antikörper-Derivatisierungen mit DOTA-Multimeren	63
<b>4</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>67</b>
4.1	Synthese der Dendrimere	67
4.2	Fluoreszenzfarbstoff-Synthesen und Synthese der Farbstoff-Dendrimere	74
4.2.1	Derivatisierung von Octreotid-Maleimidohexansäure mit Dansyl <sub>x</sub> -SH (x = 1 - 8)	96
4.3	Multimerisierung der Caspase-spaltbaren Peptidsequenzen	96
4.4	Synthese der DOTA-Derivate	97
4.5	Synthese der DOTA-Dendrimere	103
4.6	Antikörper-Derivatisierungen	111
4.6.1	Durchführung der Fluoreszenz-Zellexperimente mit hMAb425-Dansyl <sub>16</sub> und hMAb425-FITC	113
4.6.2	Bestimmung der Immunreaktivität der Matuzumab-Konjugate	113
4.7	Assays	114
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>119</b>
	<b>Anhang</b>	<b>132</b>
	Zusammenstellung der wichtigsten Tumortargeting-Vektoren	132
	Abkürzungen	135





# **1 Einleitung**

## **1.1 Zielgerichtete Tumortherapie**

Die Behandlung von Tumorerkrankungen beruht derzeit auf vier Therapieoptionen: Der Chirurgie, der Strahlentherapie, der Chemotherapie und neueren Behandlungsformen wie zum Beispiel der Immuntherapie. Dabei sind sowohl die Radiotherapie als auch die Chemotherapie Behandlungsformen, die sowohl entartetes als auch gesundes Gewebe schädigen. So wird bei der radiotherapeutischen Bestrahlung eines Tumors auch gesundes Gewebe im Strahlenfokus geschädigt. Die derzeit verwendeten Chemotherapeutika, die sich in Topoisomerase-Inhibitoren, antimetabolische, DNA-schädigende, antimetabolische Substanzen und Hormone einteilen lassen, beruhen zumeist auf der verstärkten Proliferation des Tumorgewebes und treffen folglich bei systemischer Applikation auch gesundes proliferierendes Gewebe. Die hierdurch verursachten Nebenwirkungen können entweder akuter und reversibler Art (z.B. Myelosuppression und Toxizität auf die verstoffwechselnden und ausscheidenden Organe wie Hepatotoxizität, Nephrotoxizität und Blasentoxizität) oder aber irreversible Toxizitäten sein (z.B. ZNS-Toxizität, Kardiotoxizität, Teratogenität und Zweitneoplasien). Diese teilweise gravierenden Nebenwirkungen können vermieden und eine wesentlich effektivere Therapie ermöglicht werden, wenn die eingesetzten Therapeutika eine Tumorselektivität aufweisen. Diese Selektivität kann durch eine Kopplung des eigentlichen Therapeutikums an einen Tumortargeting-Vektor erreicht werden, durch den das Pharmakon bei systemischer Applikation idealerweise nur im Tumorgewebe akkumuliert und somit auch nur dort seinen cytotoxischen Effekt entfaltet. Als Targeting-Vektoren sind dabei insbesondere Peptide oder Antikörper geeignet, die selektiv an Rezeptoren oder Oberflächenantigene, die auf Tumorzellen überexprimiert werden, binden. Des Weiteren können sie auch durch überexprimierte Transporter und Enzyme verstärkt eingeschleust oder aktiviert werden. Ferner können sich Tumorzellen auch durch veränderte physiologische Charakteristika wie Hypoxie, verändertes Redox-Potential oder pH-Wert von gesundem Gewebe unterscheiden, was ebenfalls ein Tumor-Targeting zulässt. Eine Übersicht von Targeting-Vektoren ist im Anhang zusammengestellt.

An diese Tumortargeting-Vektoren können Cytostatika verschiedener Art konjugiert werden und ermöglichen dann auch bei systemischer Applikation eine tumorselektive und damit nebenwirkungsarme Therapie. So wurden beispielsweise Konjugate von Antikörpern mit Doxorubicin [Kovár], Calicheamicin [Hamann] und Boratomen [Wu

(2003)] und Konjugate von Peptiden mit Methotrexat [Lindgren] und Doxorubicin [Lee] hergestellt, die verglichen mit den unkonjugierten cytostatischen Substanzen eine deutlich verbesserte Tumoranreicherung und damit Wirksamkeit zeigten.

Allerdings können manche Antikörper, die eine sehr hohe Spezifität gegen ihr auf Tumoren überexprimiertes Zielantigen aufweisen, auch einen direkten therapeutischen Effekt entfalten und müssen daher nicht mit einem Pharmakon kombiniert werden, um als Tumorthapeutika Anwendung zu finden. Beispiele für solche Antikörper, die für die Immunotherapie verwendet werden, sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Zugelassene Antikörper für die Immunotherapie von Krebserkrankungen.

Antikörper	Handelsname	Zielantigen	Anwendungsbereich
Rituximab	MabThera <sup>®</sup> , Rituxan <sup>®</sup>	CD20	Non-Hodgkin-Lymphome [McLaughlin]
Trastuzumab	Herceptin <sup>®</sup>	HER-2	Mammakarzinome [Pegram]
Gemtuzumab	Mylotarg <sup>®</sup>	CD33	akute myeloische Leukämie [Sievers]
Bevacizumab	Avastin <sup>®</sup>	EGFR	metastasiertes Kolonkarzinom [Venook]
Alemtuzumab	MabCampath <sup>®</sup>	CD52	fortgeschrittene chronisch-lymphatische Leukämie [Fiegl]
Cetuximab	Erbix <sup>®</sup>	EGFR	metastasiertes kolorektales Karzinom [Lenz]

Diese selektiv anreichernden Antikörper können auch mit Chemotherapeutika oder Strahlentherapie kombiniert werden und weisen dann zum einen erheblich weniger Nebenwirkungen als „klassische“ Chemotherapeutika als auch eine bessere Wirksamkeit der Behandlung auf [Curran, Herold].

## 1.2 Nuklearmedizinische Therapieformen

Die zielgerichtete Therapie lässt sich noch weiter verbessern, indem mit einem Tumortargeting-Vektor ein zur Therapie geeignetes Radionuklid verknüpft wird. Diese Therapieform wird als Endoradiotherapie bezeichnet. Die beim radioaktiven Zerfall emittierte Strahlung ist dabei nicht auf die Zelle beschränkt, an die der Targeting-Vektor bindet, sondern es werden auch umliegende Tumorzellen in Mitleidenschaft gezogen, was sich insbesondere bei großen Tumoren mit einer unzureichenden Perfusion, einem

erhöhten Gewebedruck innerhalb des Tumors, heterogener Antigen- oder Rezeptorexpression der Tumorzellen und kleinen Tumorzellarealen inmitten von nekrotischem Gewebe als großer Vorteil erweist. Tumorzellen, die nicht direkt vom Pharmakon erreicht werden, können so dennoch geschädigt werden und würden andernfalls zum Auftreten eines Rezidivs führen. Dieser Effekt der Schädigung umliegenden Tumorgewebes wird als Crossfire-Effekt bezeichnet (Abbildung 7).

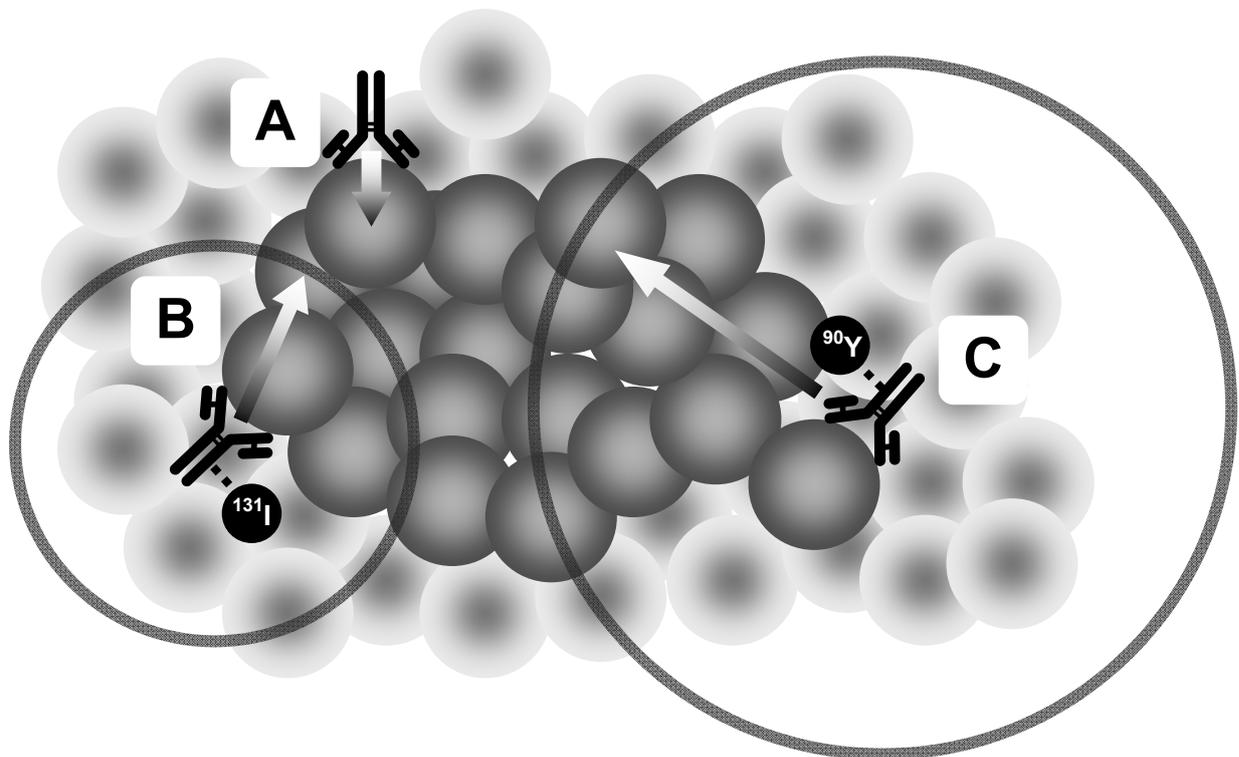


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Crossfire-Effekts. Der cytotoxische Effekt eines unmarkierten Antikörpers (A) ist auf die Tumorzelle (dunkel dargestellt), an die er bindet, beschränkt. Tumorzellen, die das entsprechende Oberflächenantigen nicht exprimieren oder nicht über den Blutkreislauf erreicht werden können, werden nicht geschädigt. Radiomarkierte Antikörper (B und C) üben auch auf umliegende Zellen einen cytotoxischen Effekt aus, wobei die Energie der durch das Radionuklid emittierten Strahlung über ihre Reichweite im Gewebe entscheidet. So emittiert zum Beispiel  $^{131}\text{I}$   $\beta^-$ -Strahlung geringerer Energie und somit geringerer Reichweite als beispielsweise  $^{90}\text{Y}$ .

Auf diese Weise ermöglicht zum Beispiel der  $^{90}\text{Y}$ -markierte Antikörper Zevalin<sup>®</sup> eine deutlich effizientere Therapie von non-Hodgkin-Lymphomen als der unmarkierte Antikörper Rituximab allein [Witzig]. Weitere Vorteile nuklearmedizinischer Verfahren gegenüber konventioneller Chemotherapie sind die äußerst geringen benötigten Substanzmengen, die kaum zu einer Rezeptorsättigung oder cytotoxischen Metabolisierungsprodukten führen können und die kontrollierbare Anreicherung, indem dasselbe Pharmakon mit einem diagnostischen anstelle eines therapeutischen Radionuklides markiert wird. Außerdem sind die Nebenwirkungen der Therapie meist auf

die verstoffwechselnden und ausscheidenden Organe beschränkt und damit weit weniger gravierend als bei der konventionellen Chemotherapie, wo statt einer selektiven Tumoranreicherung eine systemische Verteilung und Wirkung des Therapeutikums auftritt.

### 1.2.1 Geeignete Radionuklide für die Endoradiotherapie

Für eine erfolgreiche Endoradiotherapie spielt die Wahl eines geeigneten Radionuklides ebenso wie die eines geeigneten Targets und Targeting-Vektors eine entscheidende Rolle. Radionuklide produzieren Strahlung unterschiedlicher Art und Energie, was in ihren sehr unterschiedlichen Eigenschaften und Eignungen für die Endoradiotherapie resultiert. So sind sowohl die Halbwertszeit als auch die mit der Energie und dem linearen Energietransfer (LET) der Strahlung, der ein Maß für die Cytotoxizität derselben darstellt, verbundene mittlere Reichweite in Gewebe charakteristisch für jedes Radionuklid [Oriuchi].

Generell sollte die Halbwertszeit des zur Therapie verwendeten Nuklides so lang sein, dass eine ausreichende und homogene Akkumulation des Radiopharmakons aus dem Blut und seine Wirkung am Zielort gewährleistet sind, sollte allerdings kurz genug sein, um gesundes Gewebe nicht unnötig zu belasten. Weiterhin hängt die Wahl des für die Therapie geeigneten Radionuklides auch von der Größe des Tumors, seiner Vaskularisierung und Rezeptordichte ab. Radionuklide, die Strahlung hoher Energie und damit Reichweite im Gewebe produzieren, sind dabei besonders zur Behandlung von großen Tumorentitäten mit geringer Vaskularisierung und heterogener Rezeptordichten geeignet. Kleinere Tumoren wie zum Beispiel hämatologische Erkrankungen oder Metastasen bedingen dagegen die Verwendung von Nukliden, die Strahlung geringer Energie und Reichweite emittieren, um umliegendes gesundes Gewebe möglichst zu schonen. Für die Endoradiotherapie sind die in Tabelle 2 aufgelisteten Strahlungsarten anwendbar:

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Strahlungsarten und ihrer Anwendbarkeit in der Endoradiotherapie.

Strahlungsart	Reichweite in Gewebe	Anwendbarkeit
$\alpha$ (Heliumkerne)	50 – 100 $\mu\text{m}$	hämatologische Erkrankungen
$\beta^-$ (Elektronen)	0.1 – 10 mm	Standard für die Endoradiotherapie
Auger-Elektronen	1 – 50 nm	bisher nicht klinisch verwendet

$\alpha$ -Strahlung besitzt aufgrund ihrer hohen Ladung nur eine sehr geringe Reichweite in Gewebe von unter einem Zelldurchmesser, wobei das durchdrungene Gewebe durch die Ionisation stark geschädigt wird. Damit ist die Therapie mit  $\alpha$ -Strahlern auf die Behandlung hämatologischer Erkrankungen oder von Tumoren mit minimaler Zellzahl begrenzt [McDevitt]. Auch Auger-Elektronen besitzen in Gewebe nur eine geringe Reichweite von deutlich unter einem Zelldurchmesser und auch wenn eine Akkumulation von fünf Radionukliden pro Tumorzelle theoretisch ausreicht, um einen cytotoxischen Effekt auszuüben [Kampf], so bleibt die Anwendung von Auger-Elektron-Emittern auf die Behandlung von gut durchbluteten Tumoren mit homogener Rezeptorverteilung und einer möglichst langen Aufenthaltsdauer des Radiopharmakons im Kern beschränkt [Behr (2000), Kaltsas], weswegen sie bislang keine routinemäßige klinische Anwendung gefunden haben. Ein Vorteil der Auger-Elektron-Emitter ist allerdings die gleichzeitige Emission von  $\gamma$ -Strahlung, die eine Szintigraphie während der Behandlung erlaubt. Tabelle 3 listet die momentan gebräuchlichsten  $\alpha$ - und Auger-Elektron-Emitter auf.

Tabelle 3: Liste der gebräuchlichsten  $\alpha$ - und Auger-Elektron-Emitter.

Nuklid	Zerfallsart	Halbwertszeit	Partikel-Energie / mittlere Reichweite in Gewebe	Konjugation	Bemerkungen
$^{111}\text{In}$	Auger- $\beta^-$	2.8 d	0.1 – 10 keV / $\sim 0.1 \mu\text{m}$	komplex	Anreicherung im Kern erforderlich
$^{125}\text{I}$	Auger- $\beta^-$	60 d	0.1 – 10 keV / $\sim 0.1 \mu\text{m}$	kovalent	Anreicherung im Kern erforderlich
$^{211}\text{At}$	$\alpha$	0.3 d	6.8 MeV / 0.08 mm	kovalent	schwierig stabil einzuführen
$^{212}\text{Bi}$	$\alpha$	61 min	6.1 MeV / 0.07 mm	komplex	ungünstige Zerfallscharakteristik
$^{213}\text{Bi}$	$\alpha$	46 min	5.8 MeV / 0.07 mm	komplex	geeignet für kleine, gut vaskularisierte Tumoren

Aufgrund der begrenzten Reichweite der durch  $\alpha$ - und Auger-Elektron-Emitter produzierten Strahlung werden momentan größtenteils  $\beta^-$ -Emitter für die

Endoradiotherapie verwendet, deren Strahlung eine sehr viel größere Reichweite in Gewebe aufweist. Folgende  $\beta^-$ -Emitter werden hauptsächlich verwendet (Tabelle 4):

Tabelle 4: Liste der momentan in der Endoradiotherapie gebräuchlichen  $\beta^-$ -Emitter.

Nuklid	Halbwertszeit	Partikel-Energie / mittlere Reichweite in Gewebe	Konjugation	Bemerkungen
$^{90}\text{Y}$	2.7 d	2.27 MeV / 3.6 mm	Komplex	Besonders geeignet für große Tumoren
$^{131}\text{I}$	8.1 d	0.61 MeV / 0.8 mm	kovalent	Begrenzte <i>in vivo</i> Stabilität durch Deiodierung
$^{177}\text{Lu}$	6.7 d	0.50 MeV / 0.2 mm	Komplex	Besonders geeignet für kleine Tumoren und Metastasen
$^{186}\text{Re}$	3.7 d	1.07 MeV / 1.8 mm	Komplex	Analogon zum diagnostischen Nuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$
$^{188}\text{Re}$	0.7 d	2.12 MeV / 3.1 mm	Komplex	Analogon zum diagnostischen Nuklid $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Dabei emittieren  $^{131}\text{I}$  und  $^{177}\text{Lu}$  Elektronen geringer Energie und sind damit insbesondere für die Behandlung von kleinen Tumoren und Metastasen geeignet und verursachen eine geringe Dosisbelastung gesunden Gewebes.  $^{90}\text{Y}$  und  $^{188}\text{Re}$  sind hingegen mit ihrer hohen  $\beta^-$ -Energie und der damit verbundenen hohen Reichweite der Strahlung in Gewebe vor allem für die Behandlung großer Tumoren mit heterogener Antigen- oder Rezeptordichte und geringer Vaskularisierung geeignet. Allerdings steigt durch die hohe Reichweite der Strahlung auch die Dosisbelastung für gesundes Gewebe, weswegen beispielsweise im Falle des  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOCs die Nephrotoxizität der Dosis limitierende Faktor des Pharmakons ist [Otte]. Im Vergleich hierzu emittiert  $^{186}\text{Re}$  Elektronen mittlerer Energie und zeigt wie  $^{188}\text{Re}$  eine zusätzliche Emission von  $\gamma$ -Strahlung, die sowohl eine Dosimetrie als auch Szintigraphie während der Therapie erlaubt.

Für eine Verwendbarkeit von Radionukliden für die Endoradiotherapie spielen allerdings neben den physikalischen Eigenschaften auch die Verfügbarkeit des Nuklides und die *in vivo* Stabilität seiner Konjugate eine Rolle, weswegen einige andere Nuklide mit vorteilhaften physikalischen Eigenschaften keine klinische Anwendung finden. Ein Beispiel hierfür stellt  $^{67}\text{Cu}$  dar, das von keinem derzeit verfügbaren Chelator mit ausreichender *in vivo* Stabilität komplexiert werden kann.

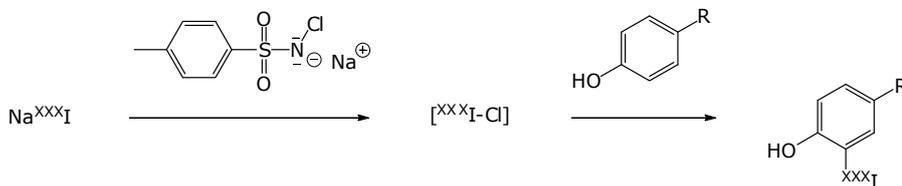
## 1.2.2 Markierung mit therapeutischen Radionukliden

Die Einführung eines Radionuklides in einen Tumortargeting-Vektor kann je nach Art des Nuklides entweder über die Ausbildung einer kovalenten Bindung oder aber durch Komplexierung des Nuklides erfolgen.

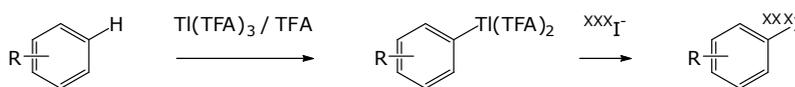
### Radioaktive Markierung durch kovalente Ankopplung des Radionuklides

Eine Markierung durch kovalente Einführung des Radionuklides kommt bei der Radiomarkierung mit Halogenen und insbesondere bei Iodisotopen in Betracht. Dabei wird das entsprechende Atom entweder unter oxidativen Bedingungen mittels elektrophiler aromatischer Substitution in Tyrosin-Reste des Peptides oder Proteins oder durch Dethallierung, Destannylierung, Dehalogenierung oder Deborierung in das Carrier-Molekül eingeführt. Allerdings kann nach der Internalisierung des Radiopharmakons in die Zelle eine enzymatische Dehalogenierung stattfinden und des weiteren können radioiodierte Aminosäuren eines abgebauten Peptides oder Proteins schnell aus der Zelle ausgeschieden werden, was zu einer Dosisbelastung gesunden Gewebes – insbesondere der Schilddrüse – führen kann und den größten Nachteil der Markierung mit Iodisotopen darstellt. In Abbildung 8 sind die wichtigsten Verfahren zur Radioiodierung zusammengestellt:

direkte elektrophile Radioiodierung von Aromaten



Radiodethallierung



Radiodestannylierung

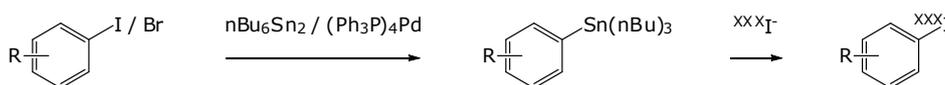


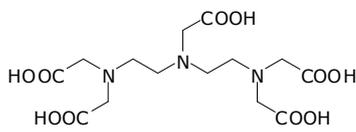
Abbildung 8: Zusammenstellung der wichtigsten Verfahren zur Radioiodierung.

### Radioaktive Markierung durch Komplexierung eines Radiometalls

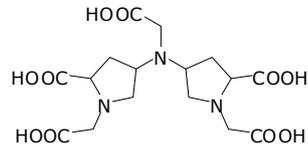
Im Gegensatz dazu verbleiben Aminosäuren, die mit einem Chelatbildner derivatisiert und einem Radiometall komplexiert sind, in der Zelle, da für diese Substanzen keine weiteren Abbaumechanismen und Externalisierungsmöglichkeiten bestehen, was die

Dosisbelastung für gesundes Gewebe limitiert. Für die Derivatisierung von Peptiden oder Proteinen für die Endoradiotherapie werden sowohl zyklische als auch azyklische bifunktionale Chelatoren verwendet (Abbildung 9).

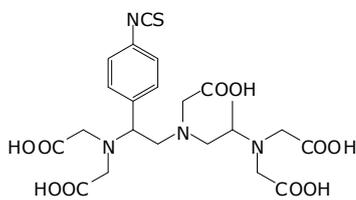
#### Azyklische bifunktionale Chelatoren



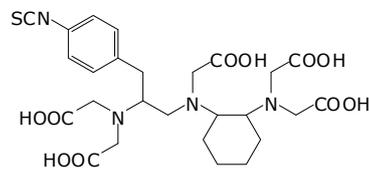
DTPA



4,4'-(Carboxymethylazanediyloxy)-bis(1-(carboxymethyl)pyrrolidine-2-carboxylic acid)

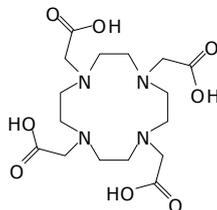


MX-A''-DTPA

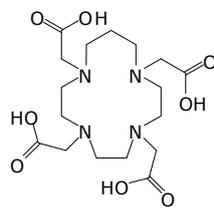


CHX-A''-DTPA

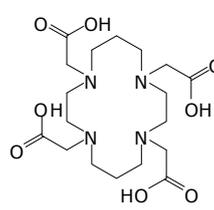
#### Zyklische bifunktionale Chelatoren



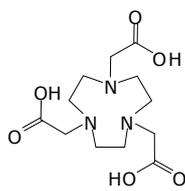
DOTA



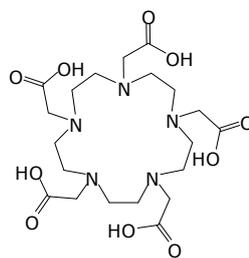
TRITA



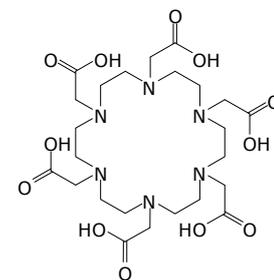
TETA



NOTA



PEPA



HEHA

Abbildung 9: Strukturen der wichtigsten zyklischen und azyklischen bifunktionalen Chelatoren.

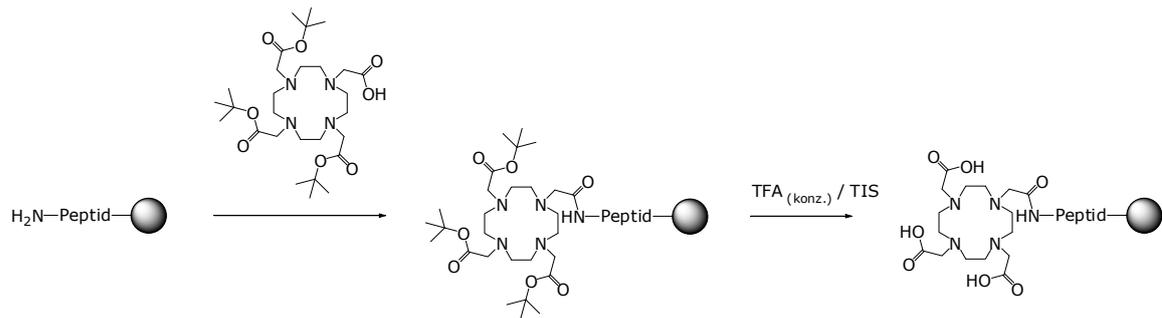
Trotz der vorteilhaften Komplexbildungseigenschaften der azyklischen Chelatoren wie zum Beispiel der niedrigen Temperatur und geringen Reaktionsdauer, die für eine Komplexbildung benötigt werden, finden diese jedoch aufgrund der verglichen mit den zyklischen Chelatoren geringeren *in vivo* Stabilität der gebildeten Komplexe kaum

Anwendung. So bildet beispielsweise unmodifiziertes DTPA nur mit  $^{111}\text{In}$  genügend stabile Komplexe für *in vivo* Applikationen. Um die Stabilität der gebildeten Komplexe zu erhöhen, wurden DTPA-Derivate entwickelt, die am Grundgerüst so modifiziert sind, dass eine Präkonformation der Carboxylgruppen erreicht wird, was die Entropie des Chelatbildners reduziert und damit die Komplexstabilität erhöht. Allerdings erhöht sich durch die starrere Konformation dieser Chelatbildner auch die Reaktionszeit für die Komplexbildung. Beispiele solcher DTPA-Derivate sind 4,4'-(Carboxymethylazanediy)-bis(1-(carboxymethyl)pyrrolidine-2-carbonsäure), MX-A"-DTPA und CHX-A"-DTPA.

Mit einigen wichtigen, klinisch relevanten Radiometallnukliden bildet der zyklische Chelatbildner DOTA ((1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetrayl)-tetraessigsäure) auch unter *in vivo* Bedingungen äußerst stabile Komplexe, allerdings läuft die Komplexbildung deutlich langsamer ab als bei den azyklischen Chelatbildnern. Eine Möglichkeit, diesen Nachteil auszugleichen ist die Vergrößerung des Ringgrundgerüsts des Chelatbildners. Beispiele für solche Entwicklungen sind PEPA ((1,4,7,10,13-Pentaazacyclopentadecan-1,4,7,10,13-pentayl)-pentaessigsäure) und HEHA ((1,4,7,10,13,16-Hexaazacyclooctadecan-1,4,7,10,13,16-hexayl)-hexaessigsäure), deren Komplexbildung zwar deutlich schneller abläuft, deren gebildete Komplexe allerdings nicht mehr so stabil sind wie die des DOTA. Weiterhin gab es Entwicklungen, zyklische bifunktionale Chelatbildner speziell für die Komplexierung einiger weniger Metallionen herzustellen. So zeigt zum Beispiel das NOTA ((1,4,7-Triazonan-1,4,7-triyl)-triessigsäure) exzellente Komplexstabilitäten für Komplexe mit  $\text{Ga}^{3+}$ , TRITA ((1,4,7,10-Tetraazacyclotridecan-1,4,7,10-tetrayl)-tetraessigsäure) wurde für eine verglichen mit DOTA beschleunigte Komplexierung von  $^{111}\text{In}$  entwickelt und TETA ((1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-tetrayl)-tetraessigsäure) zeigt extrem hohe Komplexstabilitäten mit  $\text{Cu}^{2+}$ . Trotz dieser teilweise verbesserten Komplexierungseigenschaften der von DOTA ausgehend entwickelten Chelatbildner ist DOTA der am häufigsten verwendete Chelator, da es mit sehr vielen Nebengruppen- und Übergangsmetallionen Komplexe extrem hoher Stabilität bildet und damit in seiner Anwendung nicht auf wenige Metallionen reduziert ist.

Für gewöhnlich wird der Chelatbildner vor der Komplexierung des Metalls in den Targeting-Vektor eingeführt, da die Ankopplung eines gebildeten Komplexes meist mit unzureichenden Ausbeuten verläuft. Dabei kann entweder ein geschützte Chelator unter Zugabe von zusätzlichen Kopplungsagenzien in das zu derivatisierende Molekül eingeführt werden, was sich insbesondere für die Derivatisierung von auf fester Phase aufgebauten Peptiden anbietet oder es kann eine Umsetzung des Targeting-Vektors mit einem Aktivester oder anderweitig aktivierten ungeschützten Chelator vorgenommen werden, was vor allem bei der Derivatisierung von Proteinen vorteilhaft ist, da die Entschützung der Chelate meist unter harschen Bedingungen durchgeführt wird, was zu einer Denaturierung des Proteins führen würde (Abbildung 10).

### Derivatisierung von Peptiden auf fester Phase



### Derivatisierung von Proteinen

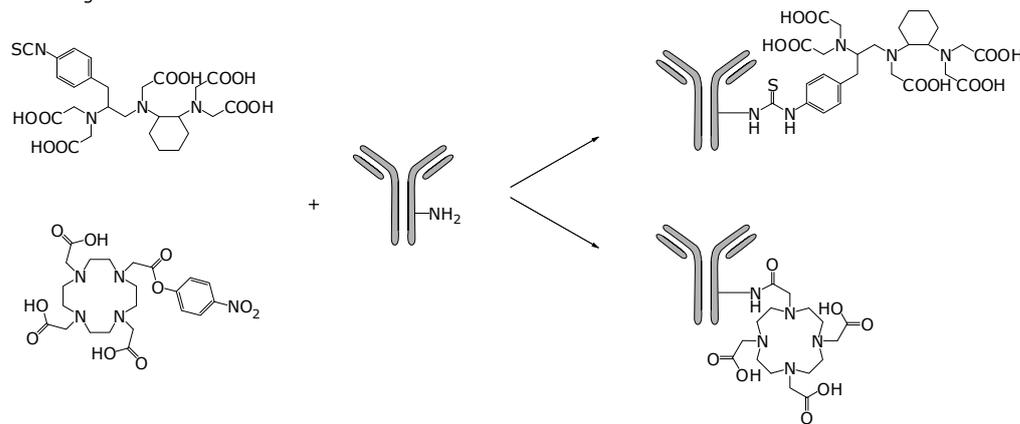


Abbildung 10: Derivatisierung von Peptiden und Proteinen mit Chelatbildnern.

## 1.2.3 Beispiele für Endoradiotherapeutika

Der überwiegende Teil der momentan verwendeten Endoradiotherapeutika basiert auf Antikörpern oder Peptiden als Vektoren für eine selektive Tumor-Anreicherung.

### *Antikörper als Tumortargeting-Vektoren*

Zugelassene und klinisch verwendete monoklonale Antikörper für die Radioimmuntherapie sind zum einen der  $^{90}\text{Y}$ -markierte Ibritumomab (Zevalin<sup>TM</sup>) und der  $^{131}\text{I}$ -markierte Tositumomab (Bexxar<sup>TM</sup>), die beide gegen das CD20-Antigen gerichtet sind und für die Therapie von hämatologischen Erkrankungen wie non-Hodgkin-Lymphomen und rezidiven folliculären Lymphomen verwendet werden.

Weiterhin können radiomarkierte Antikörper mit einer hohen Affinität zu hämatopoetischen Zellen auch zur Behandlung von akuter Leukämie oder zur myoablativen Vorbehandlung von Patienten mit nachfolgender Stammzelltransplantation verwendet werden. So binden beispielsweise die anti-CD33-Antikörper M195 und hM195 an myeloische Vorläuferzellen und maturaerte myeloische Zellen und werden  $^{131}\text{I}$ -,  $^{90}\text{Y}$ - und  $^{213}\text{Bi}$ -markiert für die Therapie von akuter myeloischer Leukämie eingesetzt. Für die myoablativ Vorbehandlung von Patienten mit nachfolgender Stammzelltransplantation

werden ferner die mit  $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$  oder  $^{90}\text{Y}$  markierten anti-CD45-Antikörper BC8 und YAML568, die an nahezu alle weißen Blutzellen binden, und mit  $^{188}\text{Re}$  und  $^{90}\text{Y}$  markierte anti-CD66c-Antikörper wie anti-Granulocyte<sup>®</sup> mit einer hohen Affinität zu granulopoetischen Zellen eingesetzt. Außerdem werden folgende humanisierte oder chimäre Antikörper zur Therapie solider Tumoren verwendet:  $^{90}\text{Y}$ - oder  $^{131}\text{I}$ -anti-CEA-Antikörper für die Therapie von Darmkrebs,  $^{90}\text{Y}$ - oder  $^{177}\text{Lu}$ -anti-PMSA-Antikörper bei Prostatakarzinomen,  $^{90}\text{Y}$ -anti-CEA-Antikörper,  $^{90}\text{Y}$ -anti-MUC-1-Antikörper,  $^{131}\text{I}$ -anti-L6-Antikörper und  $^{131}\text{I}$ -anti-TAG-72-Antikörper zur Behandlung von Mammakarzinomen und weiterhin  $^{90}\text{Y}$ -anti-MUC-1-Antikörper bei Eierstockkrebs [Wu (2005)].

Allerdings ist die Anwendbarkeit von intakten Antikörpern für die Radioimmuntherapie bei soliden Tumoren durch die unzureichende Tumor-Penetration und die dadurch verursachte inhomogene Gewebeverteilung limitiert. Sie werden daher vor allem in Fällen von sehr geringer TumorgroÙe, Mikrometastasen und bei adjuvanten Fragestellungen eingesetzt. Antikörperfragmente mit erhaltener Bindungsaffinität können hierbei aufgrund ihrer besseren Gewebe-Penetration und ihrer schnelleren Akkumulation vorteilhaft sein.

#### Peptide als Tumortargeting-Vektoren

Obwohl radiomarkierte Peptide einen breiteren Anwendungsbereich als Antikörper besitzen, ist bisher noch kein Radiopharmakon auf Peptid-Basis für die Endoradiotherapie zugelassen worden, jedoch werden einige in fortgeschrittenen klinischen Studien verwendet. Die vielversprechendste Gruppe von Peptiden für die Peptid-Rezeptor-medierte-Radionuklidtherapie (PRMRT) ist die der Somatostatin-Analoga (Abbildung 11).

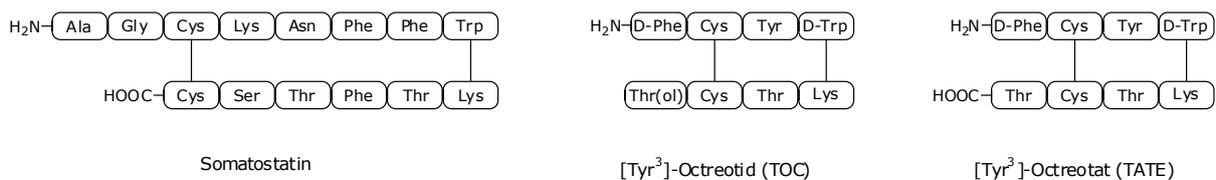


Abbildung 11: Strukturen von Somatostatin, Tyr<sup>3</sup>-Octreotid und Tyr<sup>3</sup>-Octreotate.

Rezeptoren für das Peptidhormon Somatostatin mit ihren Subtypen SSTR 1 – 5 sind auf einer Vielzahl von Tumoren wie zum Beispiel den meisten neuroendokrinen Tumoren, Lungen-, Mamma- und Hypophysentumoren, Tumoren des zentralen Nervensystems, differenzierten Schilddrüsentumoren und Lymphomen überexprimiert, wobei eine Subtypenspezifität für jede Histologie besteht [Kaltsas]. Verschiedene radiometallmarkierte Somatostatinanaloga wie beispielsweise  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotate ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATATE),  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotid ( $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC) und  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>-Octreotid ( $^{177}\text{Lu}$ -DOTATOC) werden derzeit erfolgreich bei Patienten mit inoperablen oder metastasierten neuroendokrinen Tumoren in fortgeschrittenen klinischen Studien

verwendet. Weiterhin könnten sie auch bei der Behandlung von progressiven differenzierten Schilddrüsenkarzinomen, die sich nicht mittels konventioneller Radioiodtherapie behandeln lassen, und bei Meningiomen, die in fast 100% aller Fälle Somatostatinrezeptoren überexprimieren [Teunissen], gute Ergebnisse erzielen. Abbildung 12 zeigt eine diagnostische Aufnahme eines Patienten mit Somatostatinrezeptor-positiven Metastasen eines neuroendokrinen Primärtumors mit  $^{68}\text{Ga}$ -markiertem DOTATOC.

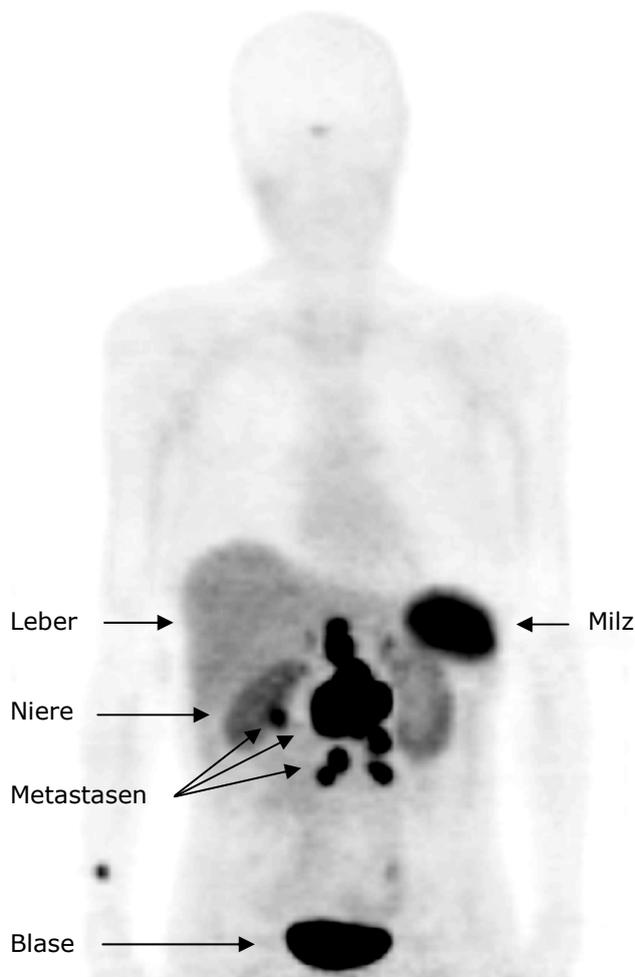


Abbildung 12: Diagnostische Aufnahme eines Patienten mit multiplen Lymphknoten-Metastasen eines neuroendokrinen Pankreastumors.

$^{90}\text{Y}$ -DOTA-Lanreotid, bei dem es sich ebenfalls um ein Analogon des Somatostatins handelt, zeigte im Vergleich zu  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC weniger gute Behandlungsergebnisse von neuroendokrinen Tumoren, Lymphomen und anderen Tumoren, wird allerdings dennoch in Phase II Studien untersucht [Weiner].

Außer den Somatostatin-Analoga gibt es noch einige weitere Peptide, die vielversprechende Ergebnisse in Therapieversuchen im Tier zeigten und die teilweise auch schon in klinischen Studien verwendet werden. Zu diesen gehören unter anderen:

- Minigastrin [Behr (2002)]: bindet an CCK<sub>2</sub>-Rezeptoren, die auf medullaren Schilddrüsenkarzinomen und vielen gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren überexprimiert sind,
- Bombesin [Smith]: bindet an Bombesin-Rezeptoren, die auf Darmtumoren, Glioblastomen, SCLC (small cell lung cancer) und insbesondere auf Prostatakarzinomen überexprimiert sind,
- Neurotensin [Reubi (2005)]: wird für die Therapie von exokrinem Pancreaskarzinom verwendet,
- VIP (vasoactive intestinal peptide) [Li (2005)]: zur Therapie von Primärtumoren und Metastasen von intestinalen Adenokarzinomen, Insulinomen und neuroendokrinen Tumoren,
- Substanz P [Reubi (2005)]: bindet an Rezeptoren, die vor allem auf Mammakarzinomen, medullaren Schilddrüsenkarzinomen SCLC und einigen Hirntumoren überexprimiert sind,
- GLP-1 (glucagon-like-peptide) [Reubi (2003)]: bindet an Rezeptoren, die von Insulinomen und anderen neuroendokrinen Tumoren überexprimiert werden,
- RGD Peptide [Meyer]: binden an  $\alpha_v\beta_3$  Integrin und sind vor allem für das Targeting von Melanomen, Mammakarzinomen, Osteosarkomen, Pankreastumoren und Eierstocktumoren geeignet,
- EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) [Edwin]: bindet an EGF-Rezeptoren, die vor allem von Mammakarzinomen überexprimiert werden und
- $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -Melanocyt-stimulierendes Hormon) [Eves]: bindet an die Melanocortin-Rezeptoren 1 – 5, die von Melanomen überexprimiert werden [Weiner, Gotthardt].

#### **1.2.4 Verbesserung der Endoradiotherapie**

Die Vorteile der Endoradiotherapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie wie beispielweise die selektive Tumoranreicherung des Pharmakons und der durch die Radionuklide ausgeübte cytotoxische Effekt, der je nach Wahl des Radionuklides nicht nur die Tumorzelle, an die das Pharmakon bindet, sondern auch umliegendes Tumorgewebe schädigt, können noch weiter optimiert werden.

Normalerweise wird bei Pharmaka für die Endoradiotherapie nur ein Radionuklid in einen Tumortargeting-Vektor eingeführt. Die dem Tumor applizierbare Radioaktivitätsdosis und damit auch die Effizienz der Therapie könnte allerdings deutlich verbessert werden, wenn die „Transport-Kapazität“ des Targeting-Vektors erhöht würde, wenn also durch Einführung mehr als eines Radionuklides pro Carrier seine spezifische Aktivität erhöht würde. Allerdings wurde am Beispiel von Antikörpern gezeigt, dass die statistische Einführung von mehreren Radionukliden – entweder durch Iodierung oder durch Einführung mehrerer Chelatbildner – die Bindungsaffinitäten der Konjugate deutlich

vermindert [Brechbiel, Nikula] und insbesondere bei Peptiden führt eine starke strukturelle Änderung des Moleküls durch Einführung vieler Chelate zu einer verminderten Bindungsaffinität, wie auch schon der Austausch einzelner Aminosäuren eines Peptides zu einer starken Beeinflussung seiner Bindungseigenschaften führen kann [Dean].

Eine Alternative zur statistischen Einführung mehrerer Nuklide stellt die Derivatisierung weniger Bindungsstellen des Carrier-Moleküls mit multivalenten Systemen, die mehrere Radionuklide oder Chelatbildner enthalten, dar (Abbildung 13).

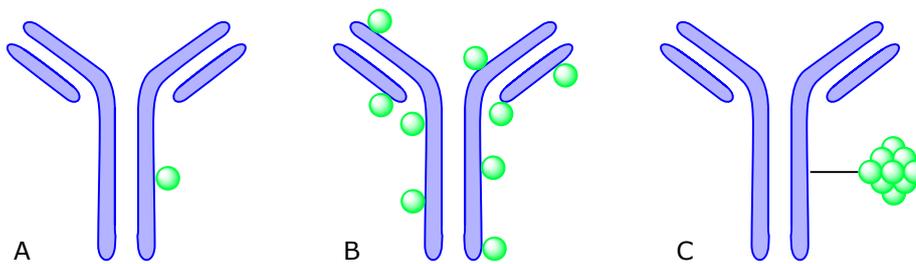


Abbildung 13: Schematische Darstellung unterschiedlicher Möglichkeiten der Peptid- oder Proteinderivatisierung am Beispiel eines Antikörpers. A: monovalente, B: dispers verteilte und C: konzentriert multivalente Derivatisierung.

Ein Vorteil dieses Ansatzes ist die Tatsache, dass die Konjugation einzelner großer Liganden zu erstaunlich geringen Veränderungen der Bindungseigenschaften führt, wie sich zum Beispiel an Avidin- oder Enzymgekoppelten Antikörpern oder PNA-Peptid-Konjugaten zeigt [Breitz, Grana, Mier (2003)]. Weiterhin zeigten Untersuchungen an Antikörper-Dendrimer-Konjugaten kürzlich, dass die Immunreaktivitäten der erhaltenen Antikörper weitgehend erhalten blieben [Thomas, Kobayashi, Wu (2004), Wu (1994)].

Allerdings wurde bisher noch nicht systematisch untersucht, welchen Einfluss die Größe und die Anzahl der gekoppelten Dendrimere auf die Immunreaktivität der derivatisierten Antikörper haben und ob ein „Optimum“ mit größtmöglicher Anzahl von Chelatbildnern und geringst möglicher Verschlechterung der Immunreaktivität erreicht werden kann.

Insbesondere könnte dieser Ansatz auch für die Therapie solcher Tumoren geeignet sein, die die entsprechenden Rezeptoren oder Oberflächenantigene nur in verhältnismäßig geringer Anzahl exprimieren oder bei deren Therapie große Mengen des eingesetzten Peptides oder Proteins zu erheblichen Nebenwirkungen führen und somit eine hohe spezifische Aktivität des Radiopharmakons erreicht werden muss.

### 1.3 Nuklearmedizinische Krebsdiagnostik

Die oben beschriebenen nuklearmedizinischen Verfahren erlauben nicht nur eine effektive und nebenwirkungsarme Therapie von Tumorerkrankungen, sondern bieten auch sehr vorteilhafte diagnostische Möglichkeiten. Dabei sind onkologische Fragestellungen zwar nur ein kleiner Teil des Anwendungsbereiches nuklearmedizinischer Diagnostik, es soll hier jedoch nur auf diese eingegangen werden.

Die nuklearmedizinische Diagnostik besitzt durch die Verwendung von Radionukliden gegenüber radiologischen bildgebenden Verfahren wie der CT (Computer Tomographie) und der MRT (Magnet Resonanz Tomographie) den großen Vorteil der Visualisierung metabolischer Vorgänge, die Aussagen über pathogene Veränderungen von Gewebe zulassen (Abbildung 12).

#### 1.3.1 Geeignete Radionuklide für die nuklearmedizinische Diagnostik

Für die nuklearmedizinische Diagnostik stehen ebenso wie für die Endoradiotherapie Nuklide mit verschiedenen Zerfalls- und Konjugationseigenschaften und damit unterschiedlichen Anwendungsbereichen zur Verfügung. In Tabelle 5 sind die am häufigsten gebrauchten diagnostischen Radionuklide zusammengestellt:

Tabelle 5: Zusammenstellung der wichtigsten diagnostischen Radionuklide.

Nuklid	Zerfallsart	Halbwertszeit	Konjugation	Bildgebung mittels
<sup>11</sup> C	$\beta^+$	20.4 min	Kovalent	PET
<sup>13</sup> N	$\beta^+$	10.0 min	Kovalent	PET
<sup>15</sup> O	$\beta^+$	2.0 min	Kovalent	PET
<sup>18</sup> F	$\beta^+$	109.8 min	Kovalent	PET
<sup>64</sup> Cu	EC / $\beta^+$	12.9 h	Komplex	PET
<sup>67</sup> Ga	EC	3.3 d	Komplex	SPECT
<sup>68</sup> Ga	$\beta^+$	1.1 h	Komplex	PET
<sup>99m</sup> Tc	IT	6.0 h	Komplex	SPECT
<sup>111</sup> In	EC	2.8 d	Komplex	SPECT
<sup>123</sup> I	EC	13.2 h	Kovalent	SPECT
<sup>124</sup> I	EC / $\beta^+$	4.2 d	Kovalent	PET

Für ihre Anwendbarkeit spielt unter anderem die Halbwertszeit der Nuklide eine entscheidende Rolle, sodass beispielsweise  $^{13}\text{N}$  und  $^{15}\text{O}$  nicht für komplexe chemische Synthesen eingesetzt werden können. Weiterhin bedingt die kovalente Einführung von  $^{11}\text{C}$  und  $^{18}\text{F}$  in zu markierende Moleküle trotz der kurzen Halbwertszeit mehrstufige Synthesen, jedoch werden diese Nuklide häufig verwendet, da sie im Falle des  $^{11}\text{C}$  die Herstellung chemisch identischer und im Falle des  $^{18}\text{F}$  nur geringfügig veränderter Rezeptorbindender Moleküle erlauben. Im Gegensatz dazu kann die Einführung von Radiometallnukliden nur in größere Moleküle wie beispielsweise Peptide oder Proteine erfolgen, da die durch den Chelatbildner verursachte strukturelle Veränderung der ursprünglichen Substanz bei kleinen Molekülen zu einer stark verminderten Anreicherung führen kann. Zu beachten ist außerdem, dass sich die verschiedenen Nuklide je nach Zerfallsart entweder nur mittels PET (Positronen Emissions-Tomographie) oder SPECT (Einzelphotonen Emissions-Tomographie), die zwei unterschiedliche Verfahren darstellen und unterschiedlicher Hardware bedürfen, nachweisen lassen.

Für die Anwendbarkeit der Radionuklide spielt neben den Zerfalls- und Konjugationseigenschaften allerdings auch ihre Verfügbarkeit eine wichtige Rolle, da es sich nur bei  $^{68}\text{Ga}$  und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  um generatorproduzierte Nuklide handelt, wohingegen die übrigen mittels eines Zyklotrons hergestellt werden und anschließend unter Umständen weit transportiert werden müssen, was bei geringen Halbwertszeiten ein limitierender Faktor für die Verwendung eines Nuklides sein kann.

### **1.3.2 Markierung mit diagnostischen Radionukliden**

Diagnostische Iodisotope und Radiometalle werden, wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, durch Radioiodierung beziehungsweise durch Komplexierung mit einem der genannten Chelatbildner in zu markierende Moleküle eingeführt.

Bei den Nukliden  $^{11}\text{C}$  und  $^{18}\text{F}$  ist die Einführung in hochmolekulare Carriermoleküle allerdings etwas komplexer, da diese Nuklide in den meisten Fällen zunächst zu sogenannten sekundären Markierungsvorläufern umgesetzt werden müssen, bevor sie mit einem organischen Molekül reagieren können. Die Herstellung dieser sekundären Markierungsvorläufer und ihre anschließende Reaktion mit dem Carrier bedingen dabei mehrstufige Reaktionen, deren Dauer und Anzahl durch die geringe Halbwertszeit dieser Nuklide begrenzt wird. Wichtige sekundäre Markierungsvorläufer für  $^{11}\text{C}$  und  $^{18}\text{F}$  sind beispielsweise  $^{11}\text{C}$ -Methyliodid,  $^{11}\text{C}$ -Formaldehyd,  $^{11}\text{C}$ -Methanol,  $^{11}\text{C}$ -Methylithium,  $^{11}\text{C}$ -Methyltrifluormethansulfonat,  $^{11}\text{C}$ -Isocyanatomethan,  $^{18}\text{F}$ -Fluorethyltosylat,  $^{18}\text{F}$ -Fluorethylbromid,  $^{18}\text{F}$ -Benzyliodid,  $^{18}\text{F}$ -Benzoessäurechlorid,  $^{18}\text{F}$ -Benzaldehyd und  $^{18}\text{F}$ -Methyliodid.

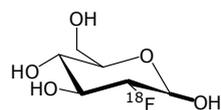
### 1.3.3 Beispiele für radiomarkierte Tracer in der onkologischen Diagnostik

Die Effizienz der meisten derzeit verwendeten radiomarkierten Substanzen für die onkologische Diagnostik basiert auf einer verstärkten Proliferation von Tumoren oder einer Überexpression von Rezeptoren auf der Tumoroberfläche.

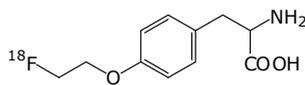
Daher kommen beispielsweise alle unter dem Punkt 1.2.3 aufgeführten Proteine und Peptide nicht nur als Pharmaka für die Endoradiotherapie, sondern auch für die Krebs-Diagnostik in Betracht. Hierfür können die Substanzen mit einem diagnostischen statt einem therapeutischen Nuklid markiert werden, worin auch ein weiterer Vorteil der nuklearmedizinischen bildgebenden Verfahren liegt: Ein radioaktiv markiertes Diagnostikum kann durch die Markierung mit einem therapeutischen Nuklid – sofern ein chemisch äquivalentes vorhanden ist – ebenfalls für die Therapie eingesetzt werden, wobei die selektive Anreicherung der Substanz im Tumorgewebe schon mit der Diagnostik gezeigt wurde und damit auch der Therapieerfolg abgeschätzt werden kann.

Einen weiten Anwendungsbereich in der Tumordiagnostik haben radiomarkierte Glucose, Aminosäuren und Nukleoside, da stark proliferierende Tumorzellen einen erhöhten Bedarf an Energie, Protein- und DNA-Bausteinen und damit eine erheblich erhöhte Aufnahme dieser Substanzen aufweisen, was sich für die Tumordiagnostik ausnutzen lässt.

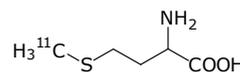
Die Strukturen der derzeit hauptsächlich in der klinischen Praxis verwendeten Radiotracer für die Diagnostik sind in Abbildung 14 zusammengefasst:



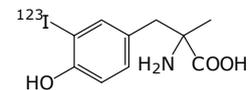
[<sup>18</sup>F]-Fluorodeoxyglucose



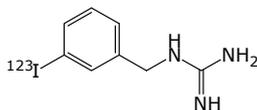
[<sup>18</sup>F]-Fluorethyltyrosin



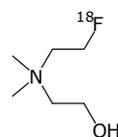
[<sup>11</sup>C-Methyl]-methionin



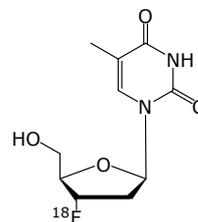
3-[<sup>123</sup>I]Iod- $\alpha$ -methyl-tyrosin



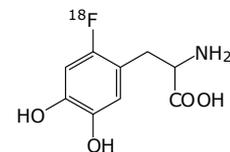
3-[<sup>123</sup>I]Iod-benzylguanidin



[<sup>18</sup>F]-Fluorethylchol in



[<sup>18</sup>F]-Fluorthymidin



[<sup>18</sup>F]-Fluor-DOPA

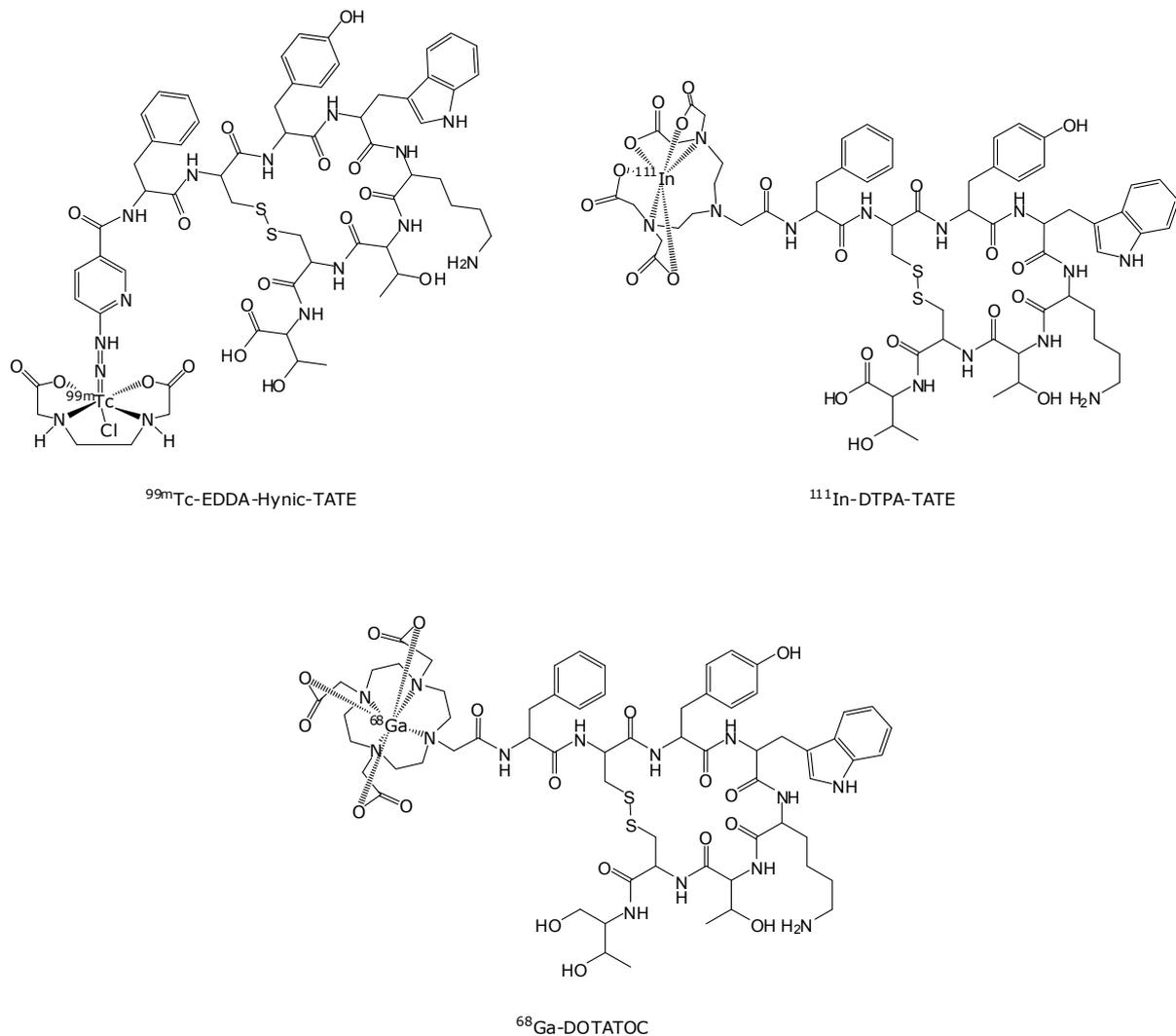


Abbildung 14: Strukturen der wichtigsten derzeit verwendeten nuklearmedizinischen Diagnostika: [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluorodeoxyglucose (FDG), [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluorethyltyrosin (FET), [ $^{11}\text{C}$ -Methyl]-methionin (MET), 3-[ $^{123}\text{I}$ ]Iodo- $\alpha$ -methyl-tyrosin (IMT), 3-[ $^{123}\text{I}$ ]Iod-benzylguanidin (mIGB), [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluorethylcholin (FECH), [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluorthymidin (FLT), [ $^{18}\text{F}$ ]-Fluor-DOPA,  $^{99m}\text{Tc-EDDA-Hynic-TATE}$ ,  $^{111}\text{In-DTPA-TATE}$  und  $^{68}\text{Ga-DOTATOC}$ .

### 1.3.4 Verbesserung radiometallbasierter Diagnostik

Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 diskutiert, könnte die Endoradiotherapie durch die Einführung vieler Chelatbildner pro Carrier-Molekül mittels Einführung weniger Chelat-Multimere stark verbessert werden. Dies gibt ebenso für die radiometallbasierte Krebs-Diagnostik, bei der sich durch eine Einführung vieler Radionuklide in das zu markierende Carrier-Molekül der bei den bildgebenden Verfahren erreichbare Kontrast stark erhöhen ließe, da die Menge des applizierten Carriers stark vermindert werden könnte. Dies würde die Entdeckung auch sehr kleiner Tumoren oder Metastasen erleichtern und könnte damit einen wertvollen Beitrag zur Verbesserung der Krebs-Diagnostik leisten. Weiterhin könnte

dieser Ansatz eine effiziente, sonst kaum mögliche Diagnostik auch solcher Tumoren, die nur eine geringe Anzahl von Rezeptoren oder Oberflächenantigenen exprimieren, erlauben und durch die hohe erreichbare spezifische Aktivität auch in solchen Fällen anwendbar sein, in denen eine Applikation von großen Mengen des Peptides oder Proteins zu erheblichen Nebenwirkungen führt.

## **1.4 Verbesserung der Krebs-Diagnostik mittels optischer Bildgebung**

Eine weitere Möglichkeit der Krebs-Diagnostik stellt die optische Bildgebung mit Fluoreszenzfarbstoffen dar. Dabei beschränkte sich die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen über lange Zeit auf *in vitro*-Anwendungen wie beispielsweise die Identifizierung von Mutationen [Tsourkas], die Bestimmung von Caspase-Aktivitäten für die Apoptose-Bildgebung [Hug, Imreh], die Bestimmung der Aktivität und Funktion von Tumor-Suppressorgenen [Yin, Zhang], der Malignität von Tumorgewebe [Fukuda], der Metastasierungsneigung von Tumoren [Lichtenfeld] und chromosomalen Abnormitäten [Hoovers] und die Identifizierung von Tumor-induzierter Angiogenese [Li].

Mittlerweile spielen auf onkologischem Gebiet allerdings auch die *in vivo*-Applikationen der optischen Bildgebung eine zunehmende Rolle. Solche Anwendungen sind beispielsweise die Abschätzung der Metastasierungsneigung von Tumoren [Naumov], die Darstellung von Tumor-assoziierten Enzymen [McIntyre], einzelnen Tumorzellen [Christian, Galanzha, Zaheer] und Angiogenese [Lawson]. Weiterhin kann die optische Bildgebung *in vivo* auch zur intraoperativen Untersuchung von Sentinel-Lymphknoten [Kim, Soltesz, Ohnishi] und für die Apoptose-Bildgebung eingesetzt werden [Ranji].

Die optische Bildgebung stellt allerdings trotz dieser vielfältigen Einsatzmöglichkeiten für die klinische Anwendung bislang keine Alternative zu Radioisotopen dar, was auf die Lichtstreu- und Absorptionseffekte des Fluoreszenzlichtes in Gewebe und die damit vergleichsweise geringe Empfindlichkeit zurückzuführen ist. Der Einsatz optischer Bildgebungsmodalitäten ist möglicherweise aber dennoch eine wertvolle Alternative zu nuklearmedizinischen bildgebenden Verfahren, da sie nicht mit einer Strahlenbelastung einhergehen.

Eine effektive optische Bildgebung ist wegen der geringen Nachweiswahrscheinlichkeit der Fluoreszenzphotonen abhängig von der Intensität des vom Diagnostikum ausgehenden Fluoreszenzsignals und der Erfolg optischer Bildgebungsverfahren hängt somit von der Entwicklung neuartiger Farbstoffe mit hohen Fluoreszenzintensitäten ab, die in der Lage sind, die Lichtstreu- und Absorptionseffekte des Fluoreszenzlichtes in Gewebe und die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit auszugleichen.

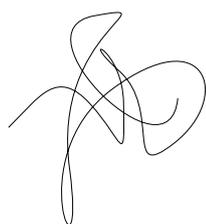
Die effektivste Verstärkung des Fluoreszenzsignals könnte durch eine Einführung vieler Fluoreszenzfarbstoffe pro Carrier-Molekül erreicht werden. Hierfür würden sich Farbstoff-Multimere eignen, die an eine Stelle des Targeting-Vektors eingeführt und nur zu einer geringen strukturellen Veränderung desselben führen würden. Die bislang synthetisierten Farbstoff-Multimere, die teilweise sehr hohe Fluoreszenzintensitäten ermöglichten, ergaben allerdings Produkte mit entweder sehr geringen Löslichkeiten in wässrigen Systemen, wodurch sie für eine Anwendung *in vivo* nicht geeignet sind oder erlaubten keine Einführung in beliebige Carrier-Moleküle [Langhals, Oesterling].

Somit wäre die Entwicklung in wässrigen Systemen löslicher und in beliebige Carrier-Moleküle einführbarer Fluoreszenzfarbstoff-Multimere für eine effizientere optische Bildgebung anzustreben.

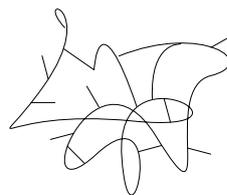
## 1.5 Dendrimere als Basis für Multimerisierungsreaktionen

Als Basis für die in den Abschnitten 1.2.4, 1.3.4 und 1.4 angesprochenen Chelat-beziehungsweise Fluoreszenzfarbstoff-Multimere sind verschiedene Polymere als Basis für die Multimerisierungsreaktionen denkbar. So unterscheidet man zunächst in klassische Polymere, zu denen die linearen, vernetzten und verzweigten Polymere gehören und die dendritischen Polymere, die sich in statistisch hyperverzweigte Polymere, Dendrigräfs und Dendrimere gliedern (Abbildung 15).

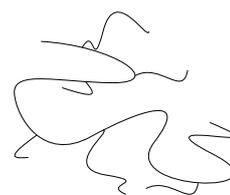
klassische Polymere:



lineares Polymer

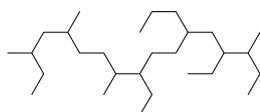


vernetztes Polymer

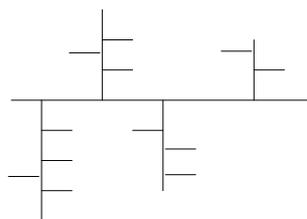


verzweigtes Polymer

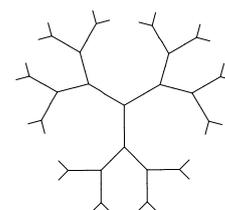
dendritische Polymere:



statistisch hyperverzweigtes Polymer



Dendrigraft



Dendrimer

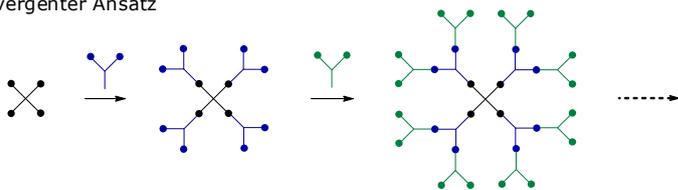
Abbildung 15: Gegenüberstellung von klassischen und dendritischen Polymeren.

Da es sich sowohl bei klassischen Polymeren als auch bei den dendritischen statistisch hypervverzweigten Polymeren um Makromoleküle mit schwer kontrollierbarer Größe und Molekülgeometrie und daher um polydisperse Verbindungen mit kaum vorhersagbaren Eigenschaften handelt, sind diese nicht für die Herstellung definierter Multimere geeignet. Hingegen lässt sich die Synthese der Dendrigräfts, zu denen beispielsweise Polyoxazoline und Polyethylenimine zählen, deutlich besser kontrollieren, wodurch Produkte höherer Homogenität erhalten werden.

Im Gegensatz hierzu stellen Dendrimere im Idealfall monodisperse Verbindungen mit vorhersagbarer Struktur, Größe und Geometrie dar und eignen sich daher besonders als Basis für die Herstellung multimerer Systeme. Weiterhin weisen diese Verbindungen eine mit steigender Molekülgröße exponentielle Vervielfältigung der terminalen Oberflächenfunktionalitäten auf, was sie den linearen Polymeren gegenüber ebenfalls als ideale Transportmoleküle erscheinen lässt.

Dendrimere können je nach Art des Dendrimers entweder durch divergente oder konvergente Synthese hergestellt werden (Abbildung 16).

divergenter Ansatz



konvergenter Ansatz

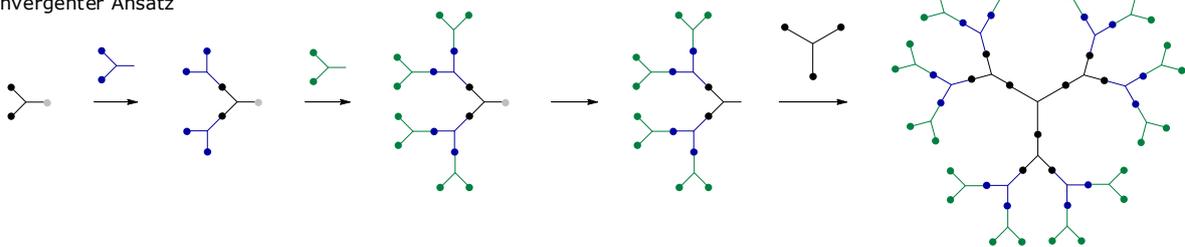
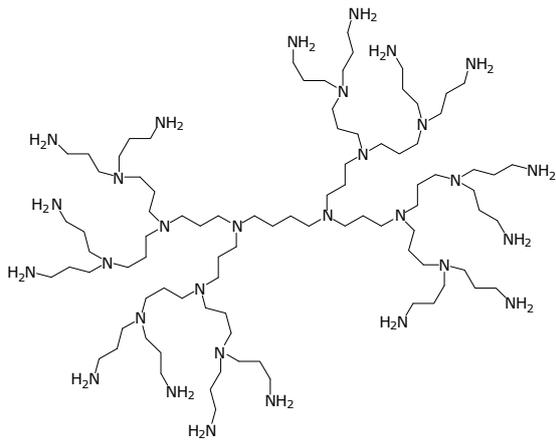


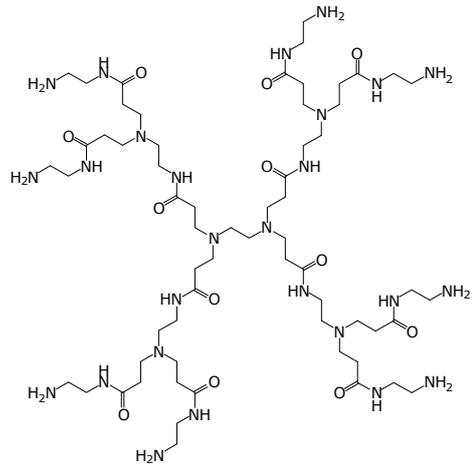
Abbildung 16: Gegenüberstellung des divergenten und des konvergenten Ansatzes zur Synthese von Dendrimeren.

Es sind viele verschiedene Arten von Dendrimeren bekannt; Abbildung 17 zeigt einige Beispiele dieser Verbindungsklasse. Dabei sind die kommerziell erhältlichen Polypropylenimin (PPI)-Dendrimere und vor allem die Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimere gleichzeitig auch die wichtigsten Dendrimere für biologische Anwendungen.

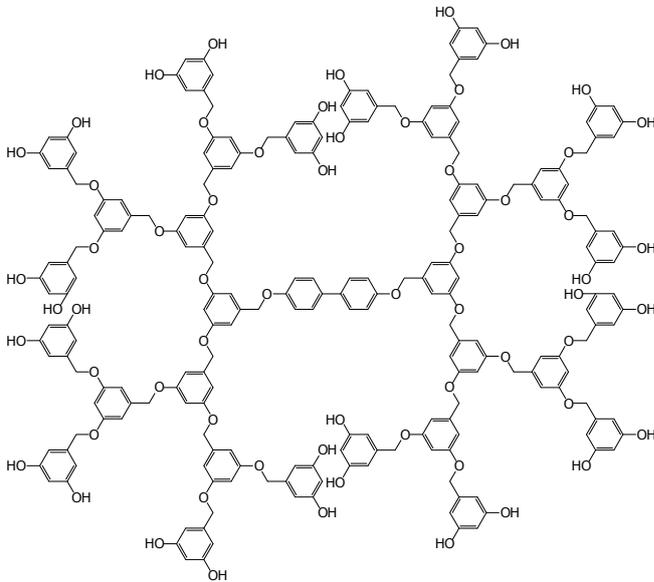
Polypropylenimin Dendrimer



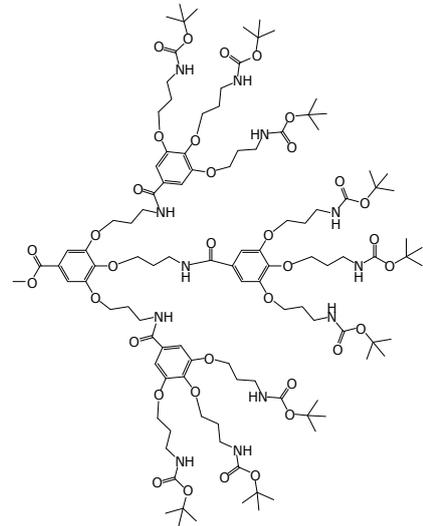
Polyamidoamin Dendrimer



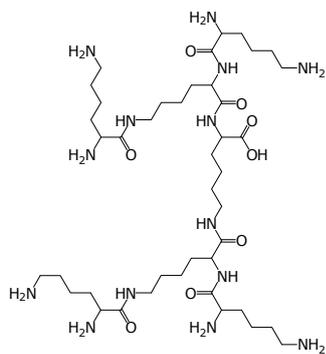
Polyarylether Dendrimer



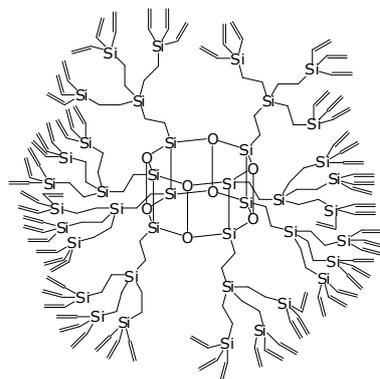
5-(2-Aminoethoxy)-isophthalsäure basiertes Dendrimer



Polylysin Dendrimer



silicumbasiertes Dendrimer



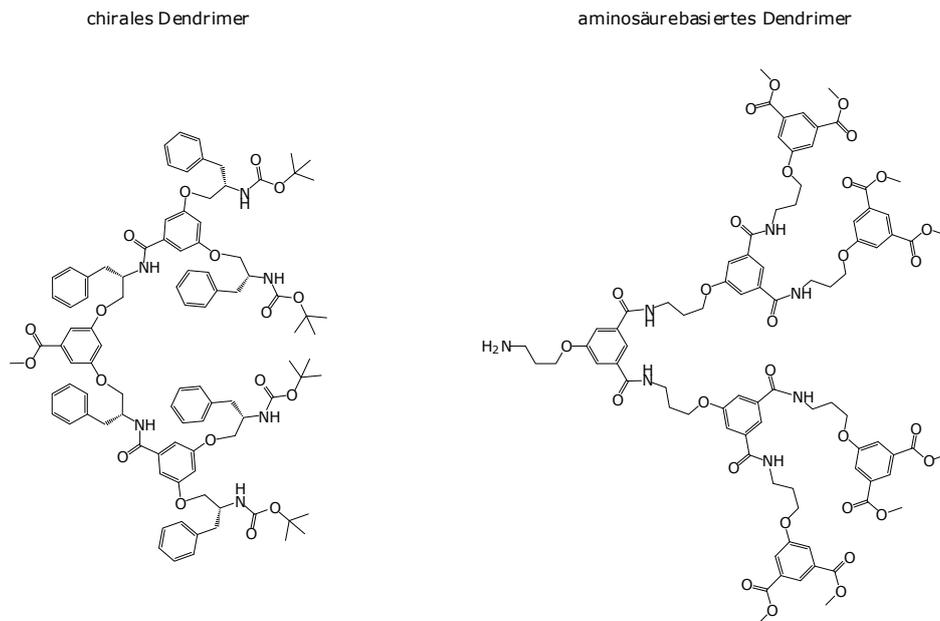


Abbildung 17: Beispiele verschiedener Dendrimerarten.

Die vorwiegende Verwendung von PAMAM-Dendrimeren für biologische Applikationen hängt dabei vor allem mit ihrer Biokompatibilität zusammen. So konnte gezeigt werden, dass der polyaminische und damit polykationische Charakter von unsubstituierten Dendrimeren aufgrund der Wechselwirkung mit den negativ geladenen Zellmembranen zu cytotoxischen Effekten führt [Rittner], wobei die Toxizität mit der Generation – also mit der Größe des Dendrimers – zunimmt [Roberts, Jevprasesphant, Fischer]. Eine besonders hohe Toxizität weisen Dendrimere mit polyaromatischer Struktur wegen ihrer hydrophoben Wechselwirkungen mit Zellmembranen auf [Malik]. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die PAMAM-Dendrimere noch vor den PPI- und Polylysin-Dendrimeren die am wenigsten toxischen Vertreter ihrer Klasse sind [Haensler]. Sie weisen auch eine geringere Toxizität als lineare Polymere auf [Boas] und sind damit am besten für eine biologische Applikation geeignet.

Die cytotoxischen Effekte der PAMAM-Dendrimere verringern sich noch weiter, wenn die Aminfunktionen auf der Oberfläche derivatisiert werden, da multimere Strukturen von sekundären und tertiären Aminen, die durch eine Derivatisierung der Oberflächenfunktionalitäten entstehen und auch im Kern des Dendrimers vorhanden sind, weit weniger zur Zelllyse führen als multimere primäre Amine [Fischer, Ferruti]. So zeigen beispielsweise Carboxylat-funktionalisierte PAMAM-Dendrimere über einen weiten Größenbereich kaum cytotoxische Effekte [Malik, Jevprasesphant]. Weiterhin sind PAMAM-Dendrimere im Gegensatz zu anderen dendritischen Strukturen nur schwach immunogen [Roberts, Rajanathanan].

Damit stellen PAMAM-Dendrimere die zu bevorzugenden polymeren Strukturen für Multimerisierungsreaktionen für biologische Applikationen dar und wurden daher bereits in eine Reihe von Anwendungen auch auf dem Gebiet der Tumorthherapie untersucht.

Dabei wurden sie als Carrier-Moleküle beispielsweise für Boratome für die Bor-Neutronen-Einfang-Therapie (BNCT) [Barth, Liu, Capala, Yang, Backer], 5-Fluor-Uracil [Zhou], die Photosensitizer 5-Aminolevulinsäure und Proporphyrin [Battah, Nishiyama], Methotrexat [Wu (2006)], Folsäure [Majoros], Taxol [Majoros], Methylprednisolon [Khandare] und Doxorubicin [Padilla De Jesus] verwendet. Weiterhin können sie in derivatisierter Form auch antiviral und antibakteriell wirken [Bourne, Gong, Witvrouw A+B, Landers, Nagahori, Sigal] und derivatisiert mit Gadolinium-Chelaten als verbesserte MRT-Kontrastmittel eingesetzt werden [Wiener, Bryant].

Sie stellen außerdem die Basis für einige zugelassene Pharmaka wie zum Beispiel das Mikrobicid Vivagel<sup>®</sup> [McCarthy] und das Herzdiagnostikum Stratus<sup>®</sup> [Couck] dar.

Daher sollten sich PAMAM-Dendrimere, insbesondere aufgrund ihrer geringen Toxizität und Immunogenität, für die oben angesprochene Multimerisierung von Chelatbildnern und Fluoreszenzfarbstoffen eignen, da sie die Herstellung definierter multimerer Systeme und deren Einführung in beliebige Carrier-Moleküle erlauben sollten.

## 1.6 Biokonjugationsreaktionen

Für die Einführung der oben angesprochenen dendritischen Systeme in Antikörper oder andere Biomoleküle stehen prinzipiell folgende Derivatisierungsreaktionen zur Verfügung:

- Reaktionen von Lysin- $\epsilon$ -Aminfunktionen des Proteins mit Isothiocyanaten, Aktivestern, Anhydriden, Sulfonaten oder Aldehydfunktionen des zu konjugierenden Moleküls,
- Reaktion von Carboxylfunktionen des Proteins mit Aminen des anzukoppelnden Moleküls,
- Erzeugung von Carbonylfunktionen und deren weitere Umsetzung mit Hydrazinen oder Aminen,
- Erzeugung von Thiol-Funktionen und deren weitere Umsetzung mit Maleinimiden, Iodacetylfunktionen oder Thiolen des zu konjugierenden Moleküls und
- Erzeugung von Maleinimiden, Iodacetylfunktionen und Thiolen und deren weitere Umsetzung mit Thiolen des zu konjugierenden Moleküls.

Für diese Kopplungsreaktionen kommt sowohl eine direkte Reaktionen zwischen dem zu derivatisierenden Biomolekül und dem anzukoppelnden System mit oder ohne Zusatz aktivierender Reagenzien in Frage als auch eine mehrstufige Reaktion, bei der zunächst einer oder beide Reaktionspartner mit einem Crosslinker reagiert, aufgereinigt und anschließend miteinander umgesetzt werden. Die letztgenannte Vorgehensweise bietet den Vorteil, dass keine polymeren Konjugate gebildet werden, die eine Aufreinigung des Reaktionsgemisches drastisch erschweren können.

Die Erzeugung von Thiolen beziehungsweise von Thiol-reaktiven Funktionen stellt den am häufigsten verwendeten Derivatisierungstyp für die Herstellung von Antikörper-Konjugaten dar, da diese Reaktionen die Einführung des anzukoppelnden Moleküls sehr selektiv erlauben und weiterhin schnell und ohne die Bildung von Nebenprodukten ablaufen. Die wichtigsten Crosslinker, die für die Einführung von Thiolen und Thiol-reaktiven Funktionen verwendet werden und bei Biokonjugationsreaktionen von Peptiden und Proteinen Anwendung finden, sind in Abbildung 18 zusammengestellt:

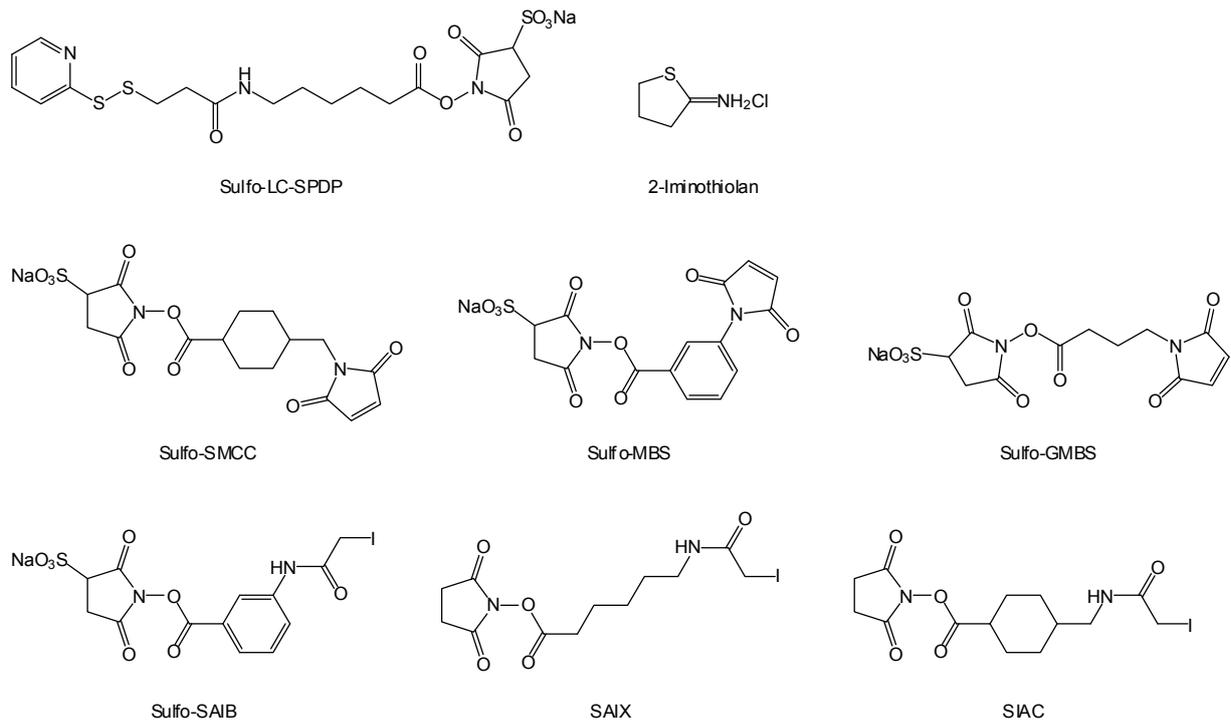


Abbildung 18: Zusammenstellung der wichtigsten Crosslinker zur Einführung von Thiolen und Thiol-reaktiven Funktionen.

Abbildung 19 zeigt beispielhaft den Ablauf einer Konjugationsreaktion eines Antikörpers mit einem beliebigen Molekül nach vorangegangener Derivatisierung mit Sulfo-SMCC beziehungsweise 2-Iminothiolan. Dabei wird in den Antikörper durch Derivatisierung der  $\epsilon$ -Aminfunktion eines Lysins zunächst ein Maleinimid eingeführt. Gleichzeitig wird eine Aminfunktion des anzukoppelnden Moleküls mit 2-Iminothioan umgesetzt, um ein reaktionsfähiges Thiol zu erhalten, das mit dem zuvor derivatisierten Antikörper zum Produkt umgesetzt werden kann.

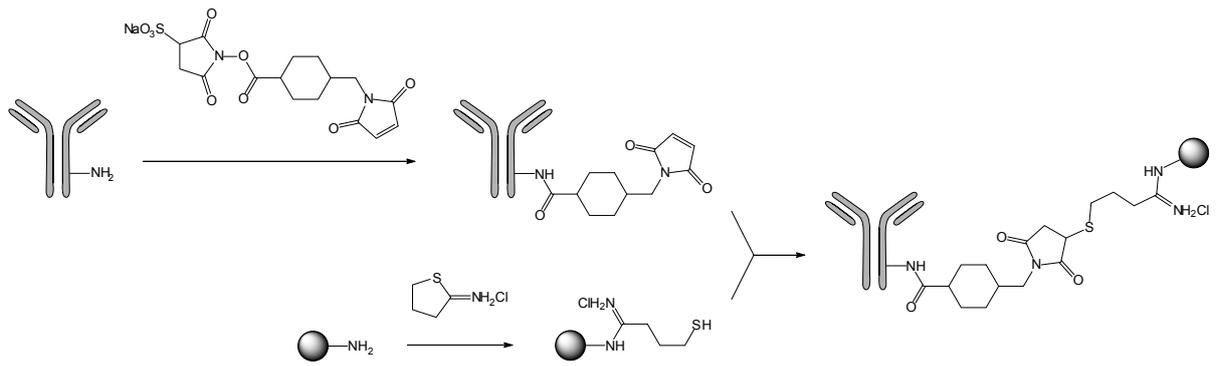


Abbildung 19: Derivatisierungsreaktion eines Antikörpers und eines beliebigen Amin-tragenden Moleküls mit Sulfo-SMCC beziehungsweise 2-Iminothiolan und anschließende Reaktion beider derivatisierter Strukturen zum Antikörper-Konjugat.

## 2 Problemstellung

Für die radiometallbasierte Diagnostik und Therapie sowie die Diagnostik mittels Fluoreszenzfarbstoffen sollten Chelat- und Fluoreszenzfarbstoff-Multimere auf der Basis von Dendrimern hergestellt und in eine Modellverbindung, den Anti-EGFR Antikörper Matuzumab, eingeführt werden. Weiterhin sollten die hergestellten Antikörper-Dendrimer-Konjugate auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht werden, um festzustellen, welchen Einfluss die Größe und die Anzahl der gekoppelten Dendrimere auf die Immunreaktivität der derivatisierten Antikörper haben.

Hierfür sollte zunächst ein definierter Polyethylenglycol-Linker hergestellt werden, auf dem das PAMAM-Dendrimer, das aufgrund seiner geringen Toxizität (vgl. Abschnitt 1.5) als Basis für die Multimerisierung gewählt wurde, aufgebaut werden sollte. Dieser Linker sollte neben der für den Aufbau der PAMAM-Dendrimere nötigen Aminfunktion auch eine Thiol-Funktion für eine spätere Ankopplung des dendritischen Systems an ein beliebiges Peptid oder Protein enthalten (Abbildung 20).

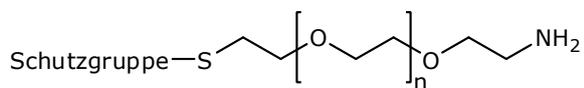


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Polyethylenglycol-Linkers.

Dieser Polyethylenglycol-Linker sollte vor allem die Reaktivität der räumlich anspruchsvollen dendritischen Systeme gegenüber den zu derivatisierenden Carrier-Molekülen verbessern.

Aufbauend auf diesem Linker sollten anschließend PAMAM-Dendrimere verschiedener Generationen und damit verschiedener Größe durch alternierende Reaktion mit Acrylsäuremethylester und Ethylendiamin hergestellt werden (Abbildung 21).

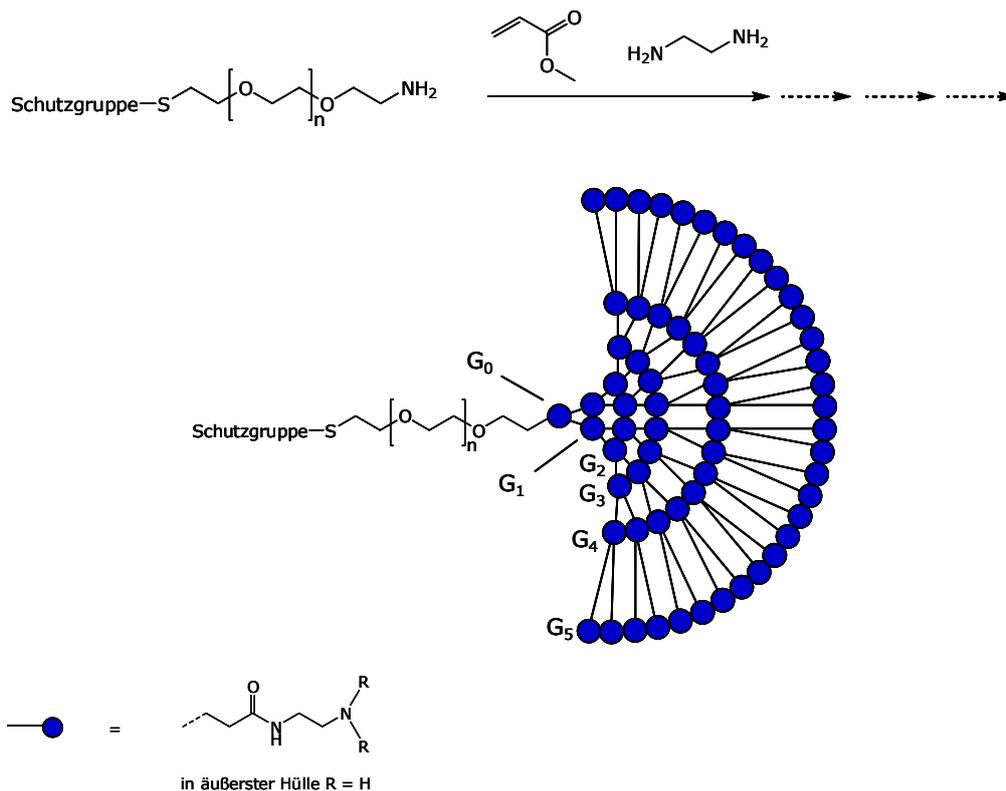


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Synthese der PAMAM-Dendrimere.

Die erhaltenen PAMAM-Dendrimere sollten dann mit DOTA, das wegen der hohen Komplexstabilitäten mit den meisten der für die Endoradiotherapie und Diagnostik verwendeten Radiometallnuklide ausgewählt wurde, beziehungsweise mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt werden, um Chelat- und Fluoreszenzfarbstoff-Multimere zu erhalten.

Die Fluoreszenzfarbstoff-Multimere sollten nach ihrer vollständigen Charakterisierung hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften untersucht und geeignete Multimere in den zuvor mit einem Maleinimid derivatisierten Modellantikörper Matuzumab eingeführt werden. Die Immunreaktivität der Antikörper-Farbstoff-Multimer-Konjugate sollte bestimmt und ihre Eignung für die optische Bildgebung untersucht werden.

Die Chelat-Multimere sollten nach ihrer vollständigen Charakterisierung ebenfalls in den Antikörper Matuzumab eingeführt werden. Dabei sollte sowohl die Anzahl als auch die Größe der eingeführten Dendrimere variiert werden, um systematisch zu untersuchen, welchen Einfluss die Größe und die Anzahl der gekoppelten Dendrimere auf die Immunreaktivität der derivatisierten Antikörper haben und ob ein Optimum mit größtmöglicher Anzahl von Chelatbildnern und geringst möglicher Verschlechterung der Immunreaktivität erreicht werden kann, um so die radiometallbasierte Krebs-Diagnostik und -Therapie mittels Antikörpern zu optimieren.

## **3 Ergebnisse und Diskussion**

### **3.1 Optimierung der PAMAM-Dendrimere Synthese**

PAMAM-Dendrimere haben sich für eine Reihe von Anwendungen als wertvolle Verbindungen für den Wirkstofftransport erwiesen [G. Wu, Majoros, Padilla De Jesus] und werden auch als Basis für zugelassene Pharmaka wie zum Beispiel das Microbicide Vivagel® [McCarthy] und den diagnostischen Herz-Marker Stratus® [Couck] verwendet.

Dies verdanken sie insbesondere ihrer verglichen mit linearen Polymeren geringen Toxizität, da gerade bei negativ geladenen Endgruppen über einen weiten Konzentrations- und Molekulargewichtsbereich nur sehr geringe Toxizitätseffekte auftreten [Malik].

Ein wesentlicher Vorteil von Dendrimeren gegenüber polymeren Substanzen ist ihre geringe Dispersität und die definierte Anzahl von Endgruppen.

Allerdings ließ sich bei kommerziell erhältlichen PAMAM-Dendrimeren eine starke Inhomogenität feststellen (Abbildung 22A und B), die diese Verbindungen für eine definierte Derivatisierung ungeeignet erscheinen lässt. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich für kommerziell erhältliche PAMAM-Dendrimere beschrieben, die mittels HPLC und MALDI-TOF Spektrometrie analysiert wurden und bei denen sich ebenfalls eine hohe Polydispersität der Verbindungen zeigte [Islam, Wang]. Diese käuflichen PAMAM-Dendrimere wurden daher nicht als Bausteine für die Farbstoff- und DOTA-Multimerisierung eingesetzt, da sich die angestrebten Multimere durch eine hohe Homogenität auszeichnen sollten.

Versuche, PAMAM-Dendrimere nach Literaturvorgaben zu synthetisieren [Fréchet, Tomalia, Peterson], führten zu Produkten höherer Qualität, die allerdings auch keine ausreichende Homogenität aufwiesen. Deshalb musste ein neues Syntheseprotokoll erarbeitet werden, um Produkte hoher Homogenität zu erhalten, die für Multimerisierungsreaktionen und die Einführung einer definierten Anzahl von Fluoreszenzfarbstoffen oder Chelatbildnern in ein Carrier-Molekül geeignet waren.

Die entscheidende Veränderung bestehender Synthesevorgaben lag dabei in der strikten Limitierung der Reaktionstemperaturen. Sowohl bei der Synthese der halben als auch der vollen Generationen der Dendrimere muss darauf geachtet werden, dass die Reaktionstemperatur nicht über 20 °C beziehungsweise 4 °C steigt, da es sonst zu starken Fragmentierungen der Produkte und zu internen Ringschlüssen kommt, die zu einer hohen Polydispersität der Produkte führen (Abbildung 23B, C und D).

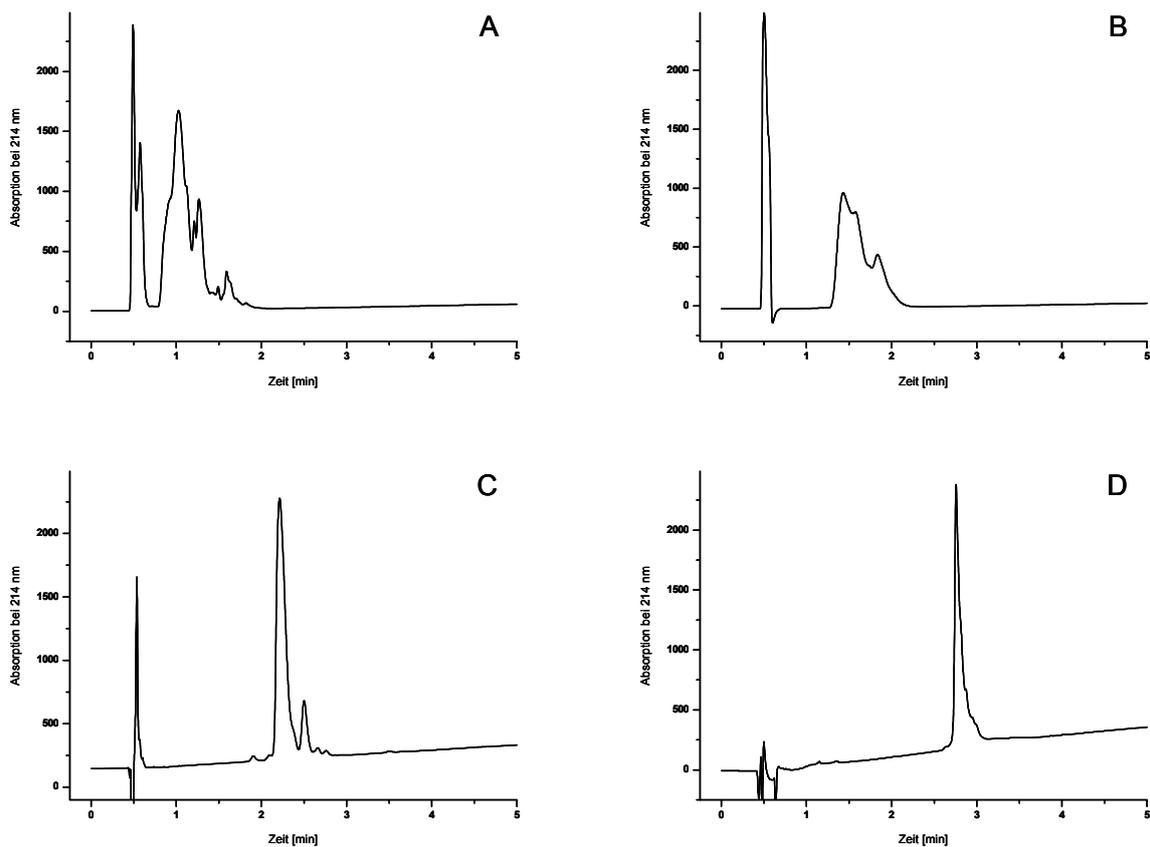


Abbildung 22: HPLC Chromatogramme von kommerziell erhältlichen PAMAM-Dendrimern mit 8 (A) und 16 (B) Aminfunktionen. C und D zeigen Chromatogramme von ebenfalls 8 und 16 Aminfunktionen enthaltenden dendritischen Strukturen, die gemäß den Vorschriften im experimentellen Teil dieser Arbeit synthetisiert wurden. Die Chromatogramme wurden mittels einer Chromolith Performance<sup>®</sup> Säule und einem Gradienten von Wasser/Acetonitril (+ 0.1% TFA) von 0 – 40% Acetonitril in 5 Minuten erhalten. Für C und D wurden Gradienten von 20 – 45% und 0 – 60% Acetonitril verwendet, da diese Verbindungen aufgrund der *S*-Trityl-Schutzgruppe einen im Vergleich zu reinen PAMAM-Dendrimern deutlich hydrophoberen Charakter aufwiesen.

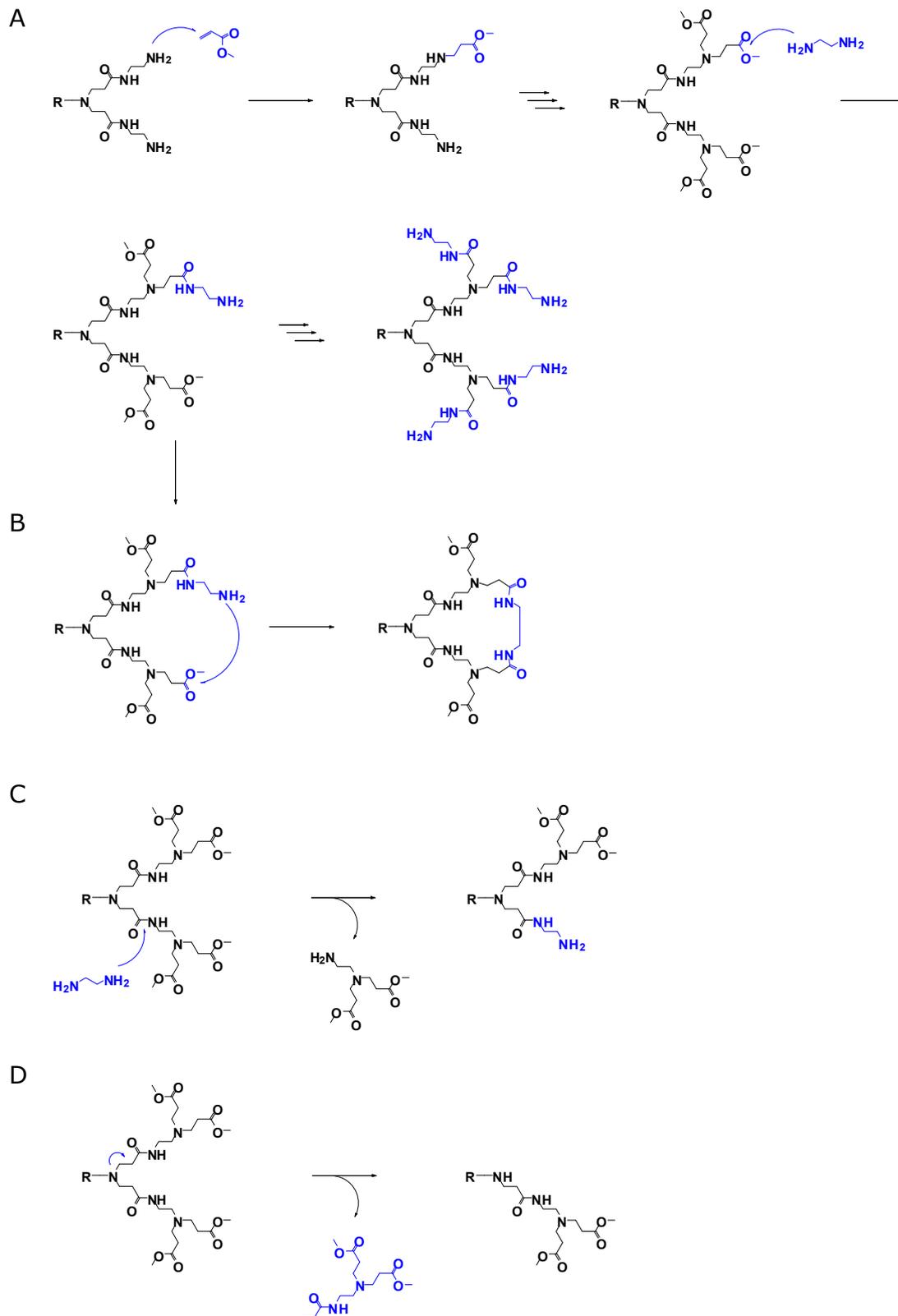


Abbildung 23: Schematische Darstellung der PAMAM-Dendrimer Synthese. A: angestrebter Reaktionsablauf. Michael-Addition der Aminfunktionen an Acrylsäuremethylester zur nächsten „halben“ Generation und anschließende Substitution mit Ethylendiamin zur nächsten „vollen“ Generation; B, C und D: Nebenreaktionen. B: Interner Ringschluss; C: Fragmentierung durch Substitution; D: Fragmentierung durch Eliminierung.

Die veränderten Reaktionsbedingungen führten zwar zu erheblich verlängerten Reaktionszeiten, aber auch zu deutlich homogeneren Produkten. Abbildung 24 zeigt den Effekt für Umsetzungen kleinerer Dendrimere, der sich bei größeren Dendrimern noch verstärkt. Die Bildung homogenerer Produkte ist insbesondere bei konvergenten Synthesen mit vielen aufeinander folgenden Reaktionsschritten wichtig, da sich andernfalls die Anzahl der Fehlstellen im Molekül potenziert.

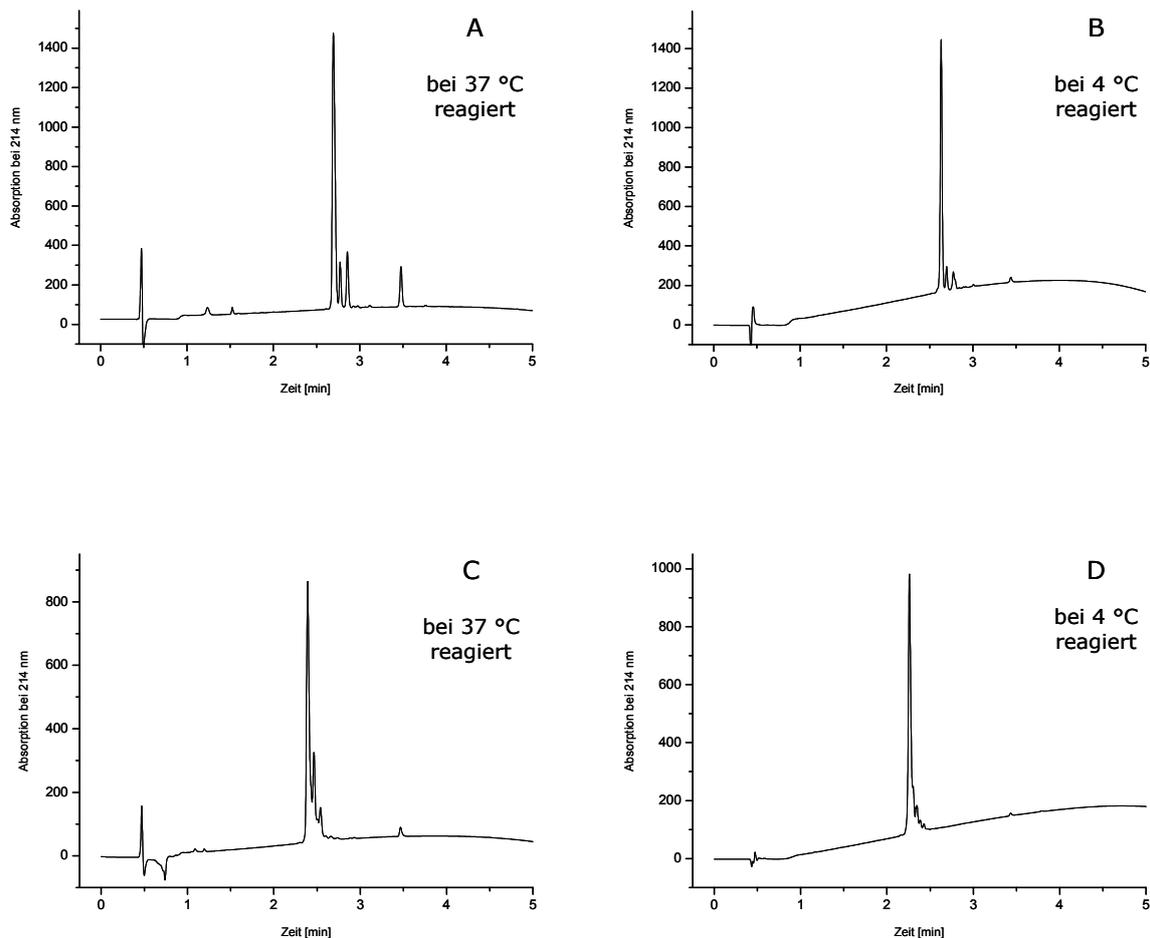


Abbildung 24: Vergleich der mit und ohne Begrenzung der Reaktionstemperaturen erhaltenen Dendrimere: A und B zeigen das 4 Aminfunktionen enthaltende  $G_2$  Dendrimer, C und D das 8 Aminfunktionen enthaltende  $G_3$  Dendrimer.

Die PAMAM-Dendrimere wurden auf einem Pentaethylglycol-Linker aufgebaut, der ein terminales geschütztes Thiol für eine spätere selektive Ankopplung enthielt. Dieser Linker wurde eingeführt, um die Zugänglichkeit des Thiols bei der späteren Ankopplung zu verbessern und damit eine effektive Kopplungsreaktion der dendritischen Systeme an beliebige Peptide und Proteine zu ermöglichen. Der Linker selbst wurde aus Tetraethylglycol-bistosylat [Maltose], *S*-Trityl-mercaptoethanolamin [Chen] und 2-(2-amino-ethoxy)-ethanol aufgebaut (Abbildung 25).

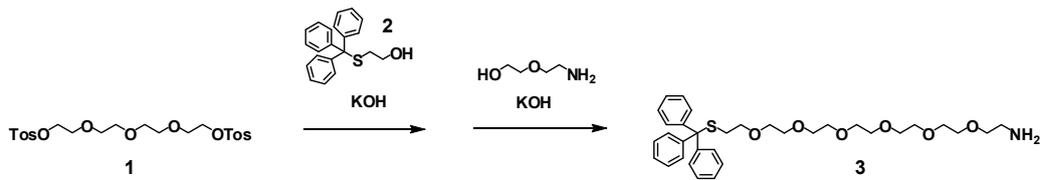


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Synthese des Pentaethylenglycol Linkers (**3**).

Anschließend wurden auf der Aminfunktion des Linkers die PAMAM-Dendrimere mit 2 bis 128 Aminfunktionen (**5**, **7**, **9**, **11**, **13**, **15** und **17**) durch alternierende Reaktion mit Acrylsäuremethylester (200 Äquivalente pro Aminfunktion) und Ethylendiamin (400 Äquivalente pro Ester) aufgebaut (Abbildung 23A und Abbildung 26).

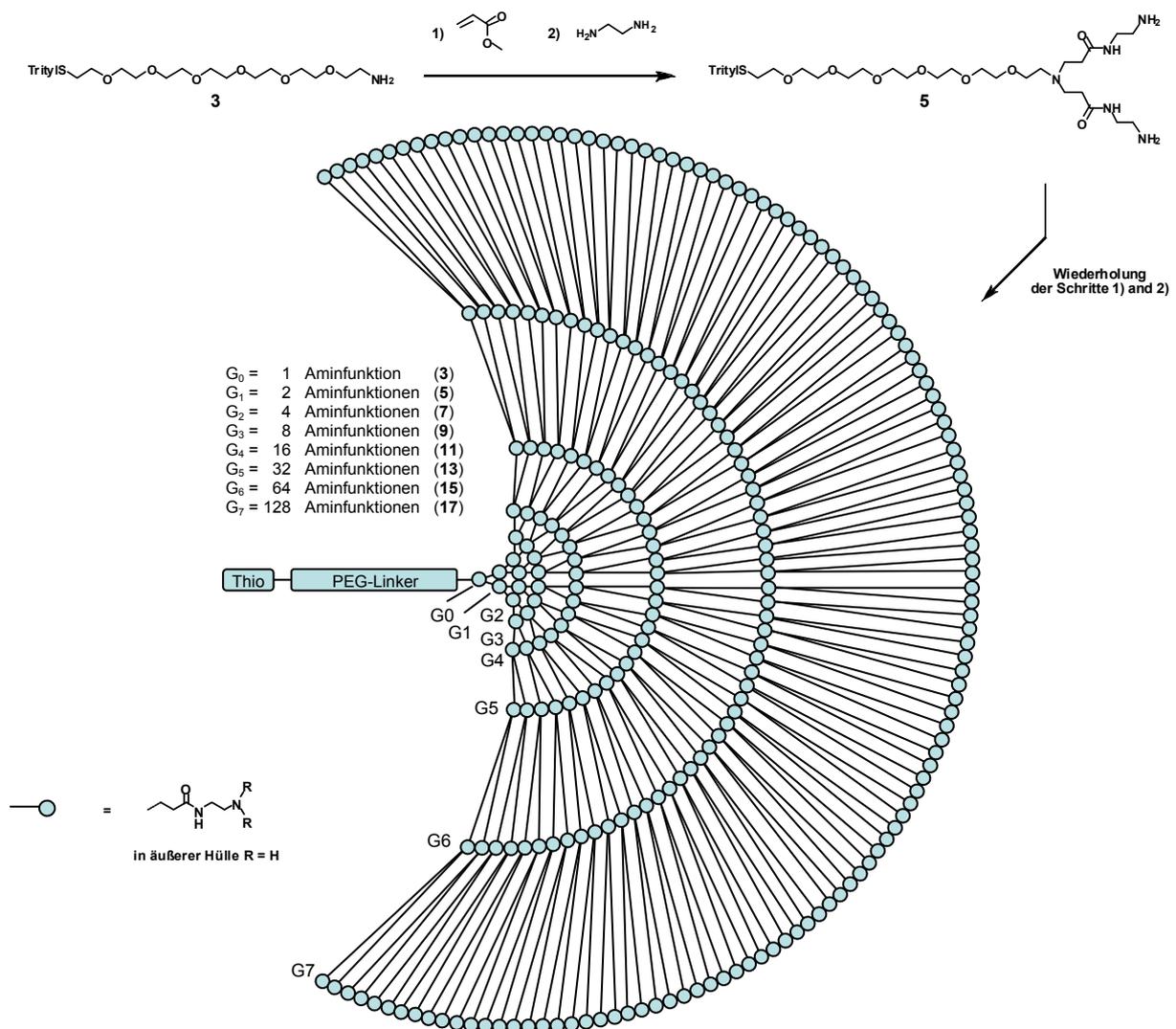


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Synthese der PAMAM-Dendrimere.

Mit den verbesserten Syntheseprotokollen war es möglich, bis zu 128 Aminfunktionen enthaltende Dendrimere auf einem Pentaethylenglycol-Linker aufzubauen, der zur selektiven Kopplung an beliebige Peptide und Proteine eine Thiol-Funktion enthält. Die

synthetisierten Dendrimere besaßen eine hohe Homogenität mit nur geringer Fragmentierung und waren damit für weitergehende Multimerisierungsreaktionen geeignet.

### 3.2 Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-Multimere

Da die Anwendbarkeit von Fluoreszenzfarbstoffen in der optischen Bildgebung direkt abhängig von der Intensität des emittierten Lichtes ist, wäre die Entwicklung neuer Fluoreszenzfarbstoffe, die starke Fluoreszenzsignale produzieren, vorteilhaft. Multichromophore Fluorophore auf der Basis von Dendrimeren wären für diesen Zweck besonders geeignet.

Es wurden diverse Fluoreszenzfarbstoffe hinsichtlich ihrer Multimerisierbarkeit auf der Basis von PAMAM-Dendrimeren untersucht. Hierfür wurden die im Abschnitt zuvor beschriebenen Dendrimere mit einer bis vier Aminfunktionen mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt und die Reaktivität der Farbstoffe überprüft.

Hierbei wurden folgende kommerziell verfügbare Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: Sulforhodamin Q4 Fluorid, Sulforhodamin Q5 Fluorid, Sulforhodamin B Chlorid, Rhodamin B Isothiocyanat, Rhodamin 101, Sulforhodamin B2 Fluorid, Fluorescein-isothiocyanat (FITC), 5-Carboxyfluorescein, Naphthofluorescein, Dansylchlorid, Coumarin 343 und NBD-chlorid (Abbildung 27).

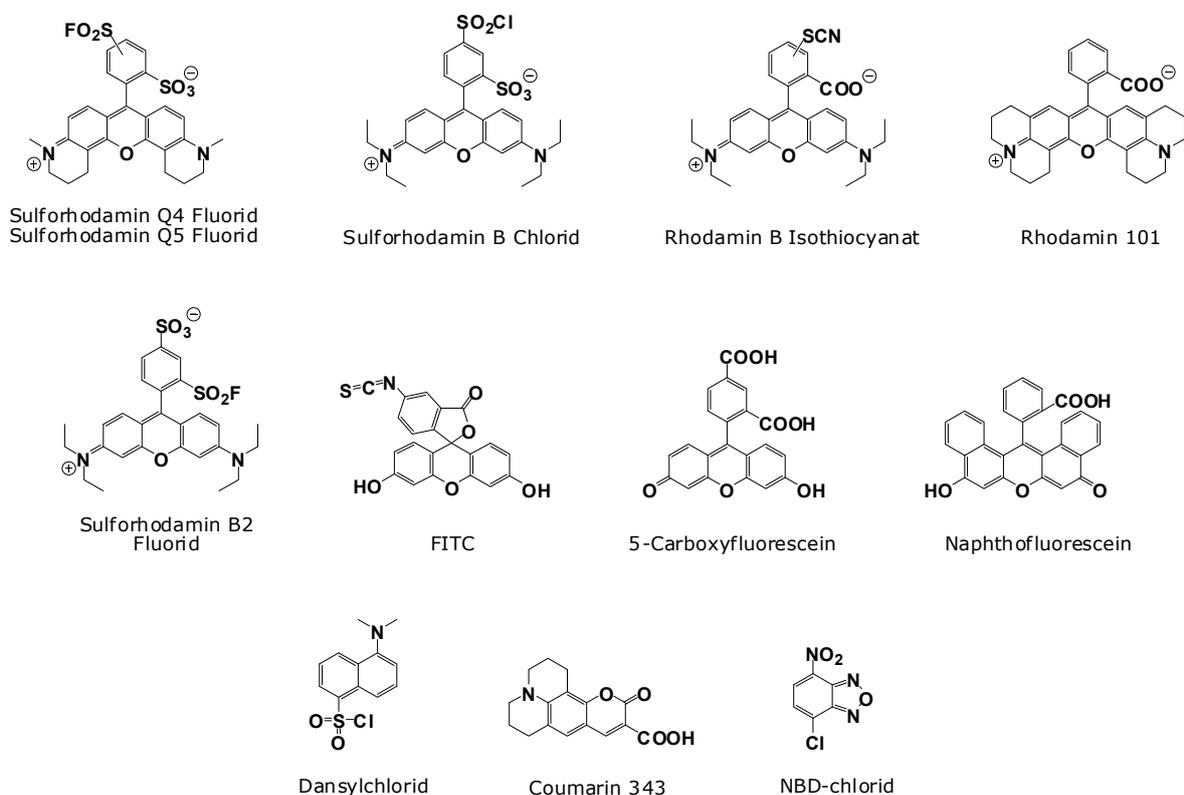


Abbildung 27: Strukturen der kommerziell erhältlichen Fluoreszenzfarbstoffe.

Weiterhin wurden einige Farbstoffe synthetisiert oder derivatisiert: Rhodamin 101-carbamido-hexansäure (**18**), 6-[Fluorescein-5(6)-carbamido]-hexansäure (**19**), 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylester (**20**), NIR 820 Chlorid [Pham] (**21**), NIR 820 Amin [Pham] (**22**), NIR 820 Isothiocyanat (**23**) [Lipowska], NIR 820-carbamido-hexansäure (**24**), NIR 820 Thiol I (**25**), NIR 820 Thiol II (**26**), NIR 797 Chlorid [Lipowska] (**28**), NIR 797-carbamido-hexansäure (**27**), Py-5 [Wetzel] (**29**) und Py-5-amino-hexansäure (**30**) (Abbildung 28), wobei die Substanzen NIR 820 Chlorid, NIR 820 Isothiocyanat und NIR 797 Chlorid von Dr. B. Beijer (Universitätsklinikum Heidelberg, Abteilung für Nuklearmedizin) erhalten wurden.

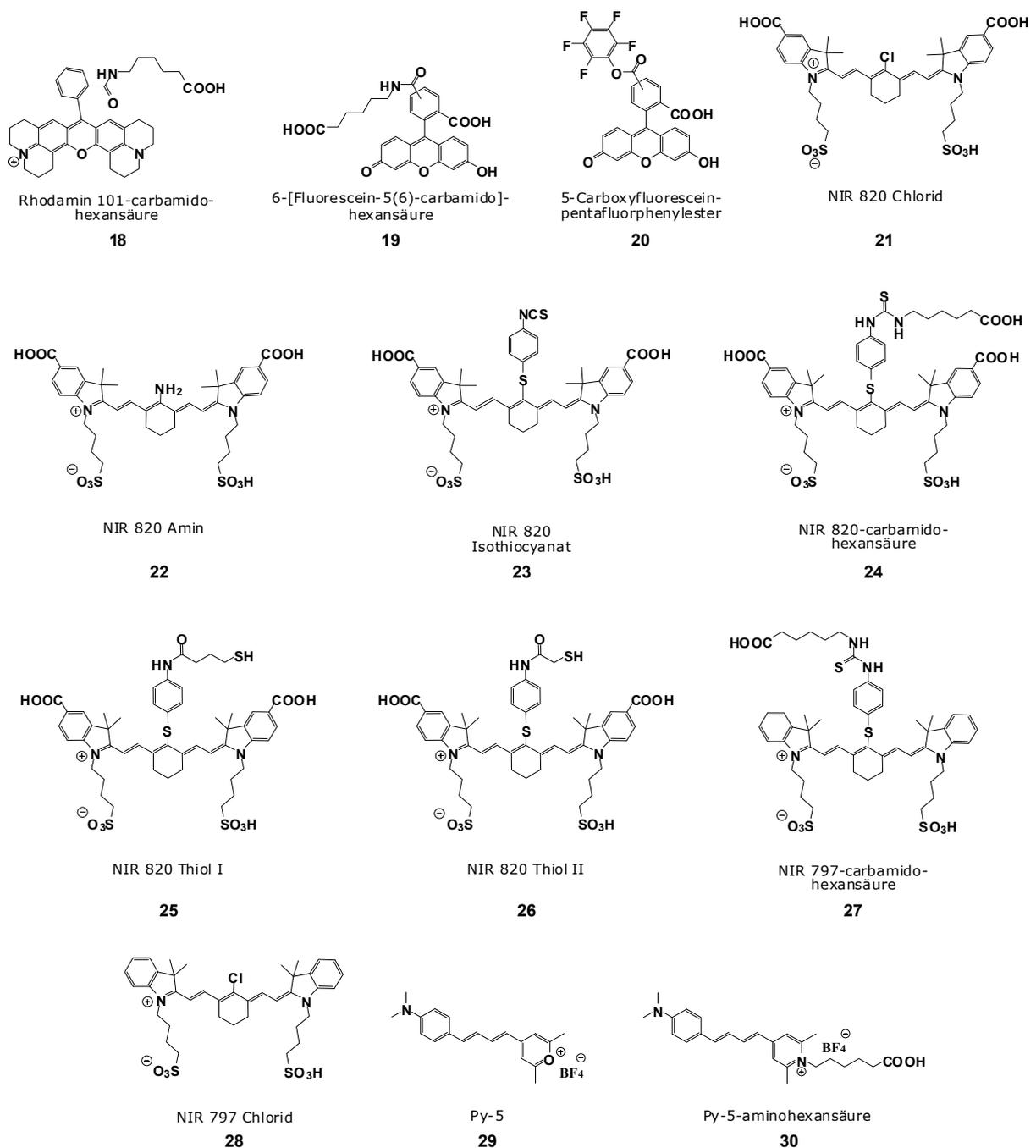


Abbildung 28: Strukturen der synthetisierten beziehungsweise erhaltenen Fluoreszenzfarbstoffe.

Bei der Verwendung von Sulforhodamin Q4 Fluorid, Sulforhodamin Q5 Fluorid, Sulforhodamin B Chlorid, Rhodamin B Isothiocyanat, Rhodamin 101, Rhodamin 101-carbamido-hexansäure, Fluorescein-isothiocyanat (FITC), 5-Carboxyfluorescein, Naphthofluorescein, 6-[Fluorescein-5(6)-carbamido]-hexansäure, NIR 820 Chlorid, NIR 820 Isothiocyanat, NIR 820-carbamido-hexansäure, NIR 820 Thiol I, NIR 820 Thiol II, NIR 797 Chlorid, NIR 797-carbamido-hexansäure, Py-5 und Py-5-aminohexansäure für die Kopplungsreaktionen zeigte sich, dass sich mit zunehmender Zahl der Aminfunktionen pro Dendrimer die Reaktionsausbeuten erheblich verminderten und sich viele der Farbstoffe nur ein- oder zweimal in das vier Aminfunktionen enthaltende Dendrimer einführen ließen (Tabelle 6). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich kleinere Farbstoffmoleküle mit deutlich besseren Ausbeuten als räumlich anspruchsvolle koppeln ließen, was auf sterische Hinderungen bei der Umsetzung hinweist. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass Farbstoffe, an die ein Aminohexansäurelinker als Spacer gekoppelt wurde, deutlich bessere Reaktivitäten zeigten als unmodifizierte.

Tabelle 6: Kopplungsausbeuten der verschiedenen Farbstoffe an ein, zwei und vier Aminfunktionen enthaltende Dendrimere.

Fluoreszenzfarbstoff	Kopplungsausbeuten in % für Dendrimere mit:		
	1 Aminfunktion	2 Aminfunktionen	4 Aminfunktionen
Sulforhodamin Q4 Fluorid	63	(45 einfach substituiert) 2	0
Sulforhodamin Q5 Fluorid	2	2	0
Sulforhodamin B Chlorid	15	3	0
Rhodamin B Isothiocyanat	45	(55 einfach substituiert) 2	0
Rhodamin 101	32	(39 einfach substituiert) 4	0
Rhodamin 101-carbamido-hexansäure	70	56	2
Fluorescein-isothiocyanat	68	(49 einfach substituiert) 3	0
5-Carboxyfluorescein	45	(60 einfach substituiert) 6	0
Naphthofluorescein	13	5	0
6-[Fluorescein-5(6)-carbamido]-hexansäure	73	(79 einfach substituiert) 52	27
NIR 820 Chlorid	42	(20 einfach substituiert) 3	0
NIR 820 Isothiocyanat	74	2	0
NIR 820-carbamido-hexansäure	65	1	0
NIR 820 Thiol I	12	8	0
NIR 797 Chlorid	12	5	0
NIR 797-carbamino-hexansäure	52	7	0

Py-5	39	(44 einfach substituiert) 56	4
Py-5-aminohexansäure	67	(26 einfach substituiert) 49	40
Dansylchlorid	63 <sup>1)</sup>	58 <sup>1)</sup>	40 <sup>1)</sup>
NBD-chlorid	43 <sup>1)</sup>	63 <sup>1)</sup>	46 <sup>1)</sup>
Coumarin-343	48 <sup>1)</sup>	54 <sup>1)</sup>	56 <sup>1)</sup>
5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylester	89 <sup>1)</sup>	89 <sup>1)</sup>	74 <sup>1)</sup>
Sulforhodamin B2 Fluorid	71 <sup>1)</sup>	76 <sup>1)</sup>	46 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Ausbeuten nach Aufreinigung

Da sich Py-5 als relativ kleiner Nahinfrarotfarbstoff zwar gut koppeln ließ, aber schwer aufzureinigende Reaktionsgemische lieferte, wurde versucht, einen Baustein für die PAMAM-Dendrimer Synthese herzustellen, der bereits mehrere dieser Farbstoffe enthält (Abbildung 29).

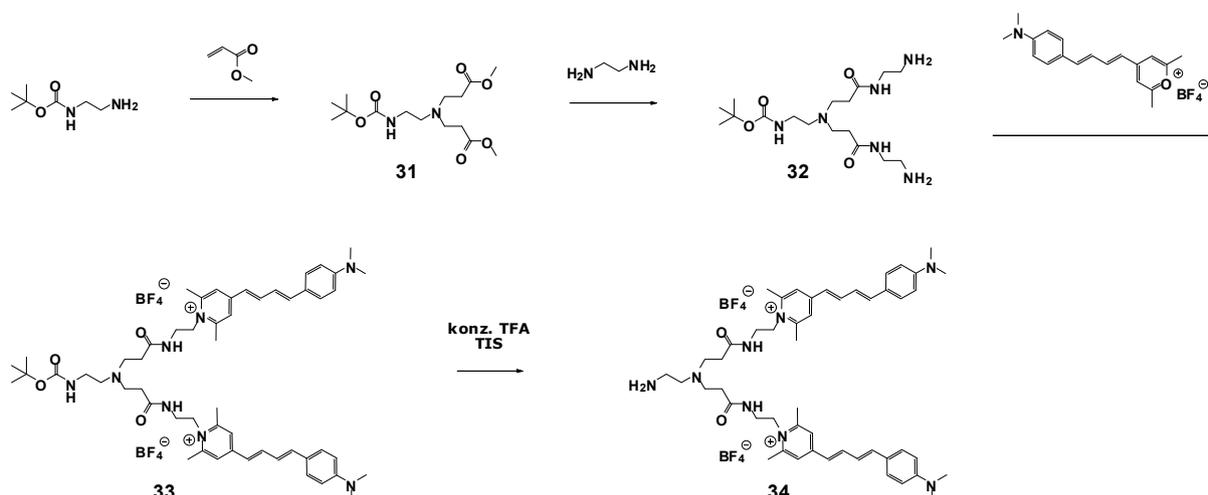


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Syntheseweges des zwei Moleküle Py-5 enthaltenden Aminbausteins.

Zwar gelangen die Synthese dieses Bausteines und seine Ankopplung an Acrylsäuremethylester, jedoch ließ er sich nur mit sehr schlechten Ausbeuten in PAMAM-Dendrimere einführen, was vermutlich durch den geringen einsetzbaren Überschuss des Bausteines relativ zum Dendrimer bedingt ist.

Fünf Fluoreszenzfarbstoffe: Dansylchlorid, NBD-chlorid, Coumarin 343, 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylester und Sulforhodamin B2 Fluorid zeigten auch mit den mehrere Aminfunktionen enthaltenden Dendrimern hohe Reaktivitäten und konnten mit guten Kopplungsausbeuten eingeführt werden. Die Produkte ließen sich zudem leicht isolieren und in guten Ausbeuten erhalten.

Die synthetisierten Farbstoff-Konjugate wurden anschließend auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht, wobei sich zeigte, dass sich die

Fluoreszenzintensitäten der mit 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylester (35 – 37), Sulforhodamin B2 Fluorid (38 – 40), NBD-chlorid (41 – 43) und Coumarin 343 (44 – 46) derivatisierten Dendrimere mit steigender Anzahl von Farbstoffmolekülen beträchtlich verminderten (Abbildung 30A, B, C und D).

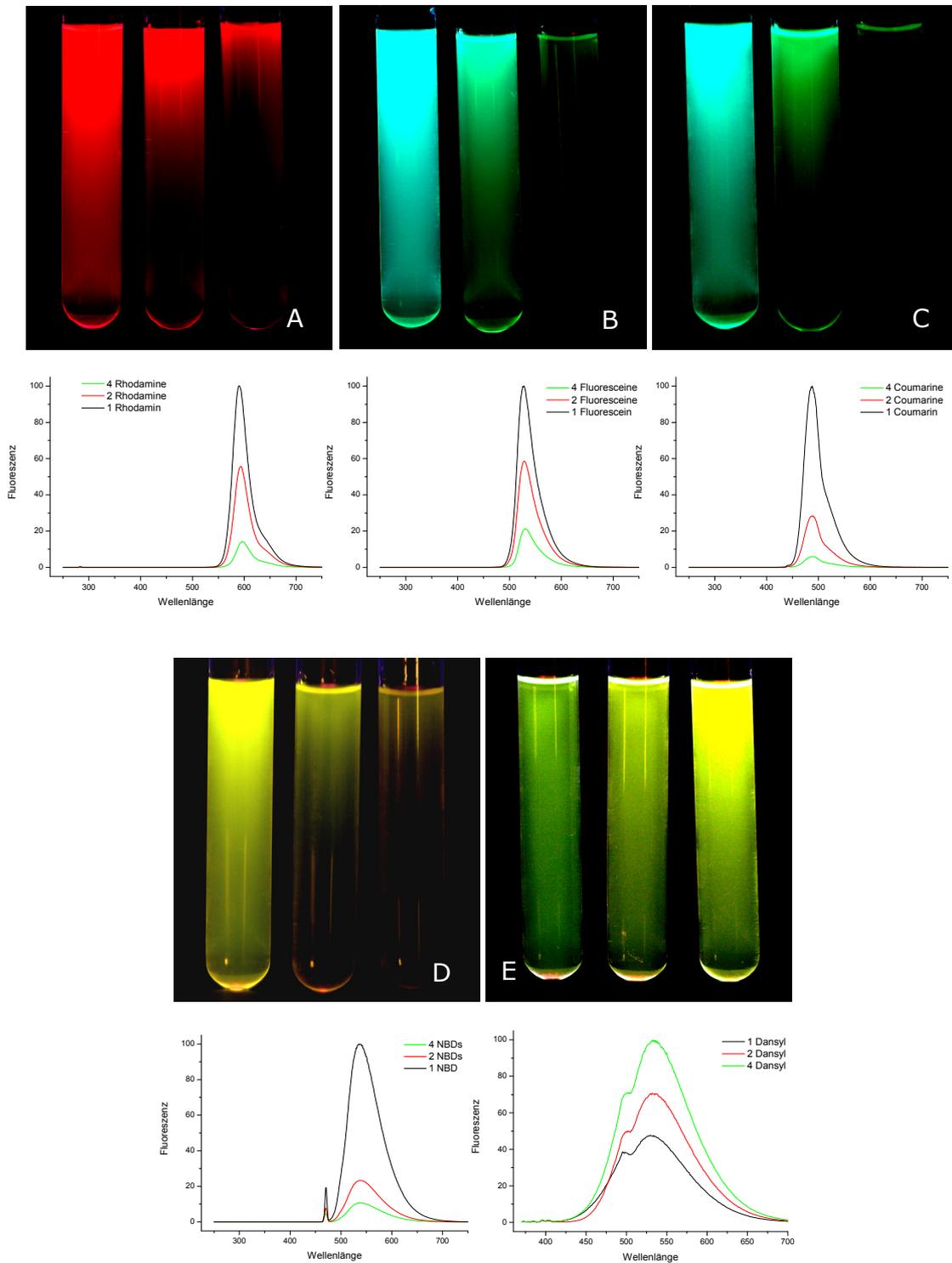


Abbildung 30: Fluoreszenz und Fluoreszenzspektren von Lösungen derselben Konzentration der ein, zwei und vier Aminfunktionen enthaltenden und mit Sulforhodamin B2 Fluorid (A), 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylester (B), Coumarin 343 (C), NBD-chlorid (D) und Dansylchlorid (E) derivatisierten Dendrimere.

Dies ist eine Folge der Fluoreszenzeigenlöschung aufgrund des geringen Stokes-Shifts der Farbstoffe und der damit einhergehenden starken Überlappung der Absorptions- und Emissionsspektren, wobei der geringe Farbstoffmolekülabstand einen Energieübertrag ermöglicht [Cuppoletti, Mahmood, Hahn].

Im Gegensatz dazu zeigten die mit Dansylchlorid derivatisierten Dendrimere (**47**, **49** und **51**) nur eine geringe Fluoreszenzeigenlöschung (Abbildung 30E), was auf den großen Stokes-Shift des gekoppelten Farbstoffes von etwa 195 nm zurückzuführen ist. Da nur die dansylierten Dendrimere zunehmende Fluoreszenzintensitäten bei steigender Anzahl von Fluoreszenzfarbstoffen zeigten, wurden die größeren Dendrimere mit 8 bis 128 Aminfunktionen nur mit Dansylchlorid derivatisiert. In Abbildung 31 sind die Fluoreszenzspektren der dansylierten Dendrimere (**47**, **49**, **51**, **53**, **55**, **57**, **59** und **61**) zusammengestellt, die Fluoreszenzintensität nimmt dabei linear mit der Zahl der gekoppelten Farbstoffmoleküle zu:

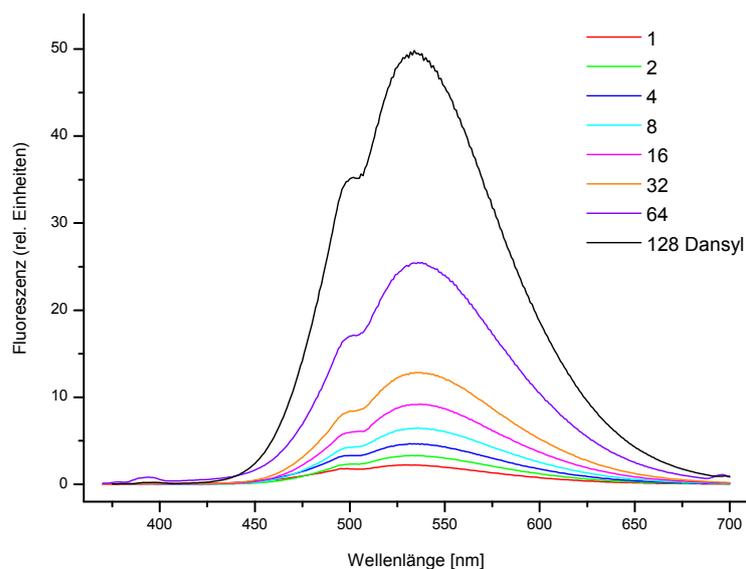


Abbildung 31: Fluoreszenzspektren der Dendrimere mit 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 Dansylresten.

Die Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Dendrimer wurde mittels MALDI-TOF Spektrometrie und NMR Spektroskopie (Beispiel in Abbildung 32) bestimmt, wobei die Analytik der Substanzen mit zunehmender Größe der Verbindungen erschwert wurde. Dies lag zum einen am polykationischen Charakter der Dansyl-Dendrimere, der eine Analytik mittels MALDI und ESI zunehmend erschwerte und zum anderen an der mit der Größe zunehmenden Heterogenität der Verbindungen, die zu sehr breiten Signalen im NMR führte und damit ebenfalls eine genaue Quantifizierung der Dansylreste behinderte, weswegen für das 128-mer keine Auswertung des NMR-Spektrums mehr möglich war. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

Tabelle 7: Zusammenstellung der Ergebnisse der Analysen der Dansyl-Dendrimere.

Substanz (Anzahl der Aminfunktionen)	Masse der dansylierten Dendrimere	Anzahl der Dansylreste bestimmt durch Massenspektrometrie	Anzahl der Dansylreste bestimmt durch NMR Spektroskopie
<b>47</b> (1)	816	1.0	1.0
<b>49</b> (2)	1278	2.0	2.0
<b>51</b> (4)	1958	4.0	3.9
<b>53</b> (8)	4048	8.0	7.8
<b>55</b> (16)	7736	14.9	15.9
<b>57</b> (32)	15111	28.4	31.2
<b>59</b> (64)	28967	-	59.7
<b>61</b> (128)	55733	-	-

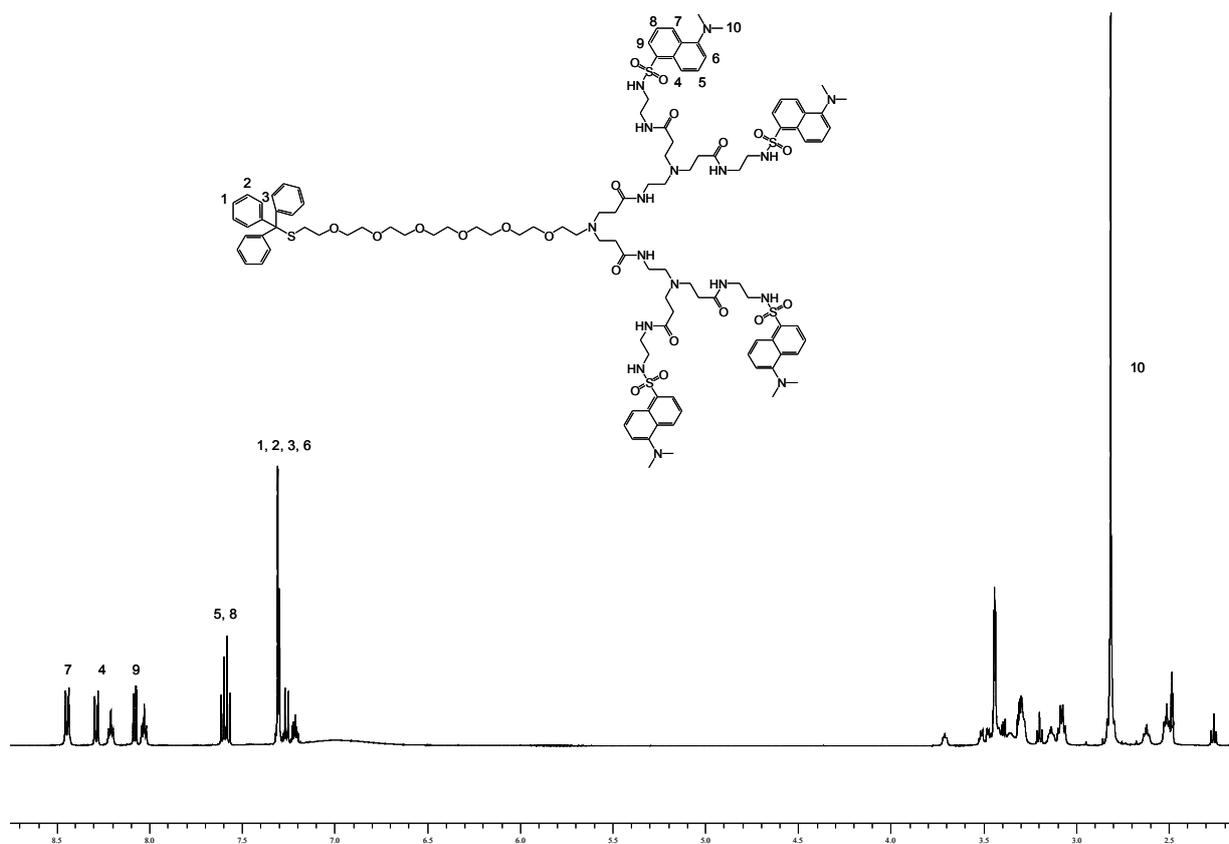


Abbildung 32: Exemplarisches NMR-Spektrum eines dansylierten Dendrimers (**51** mit 4 Dansylresten).

Weiterhin wurden auch die molaren Extinktionskoeffizienten der Verbindungen bestimmt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Molare Extinktionskoeffizienten der dansylierten Dendrimere.

Dansyl-Dendrimer	Molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]
Dansyl <sub>1</sub>	3093 ± 93
Dansyl <sub>2</sub>	5803 ± 47
Dansyl <sub>4</sub>	10571 ± 26
Dansyl <sub>8</sub>	19786 ± 280
Dansyl <sub>16</sub>	31875 ± 644
Dansyl <sub>32</sub>	78357 ± 172
Dansyl <sub>64</sub>	156580 ± 1670
Dansyl <sub>128</sub>	298635 ± 2358

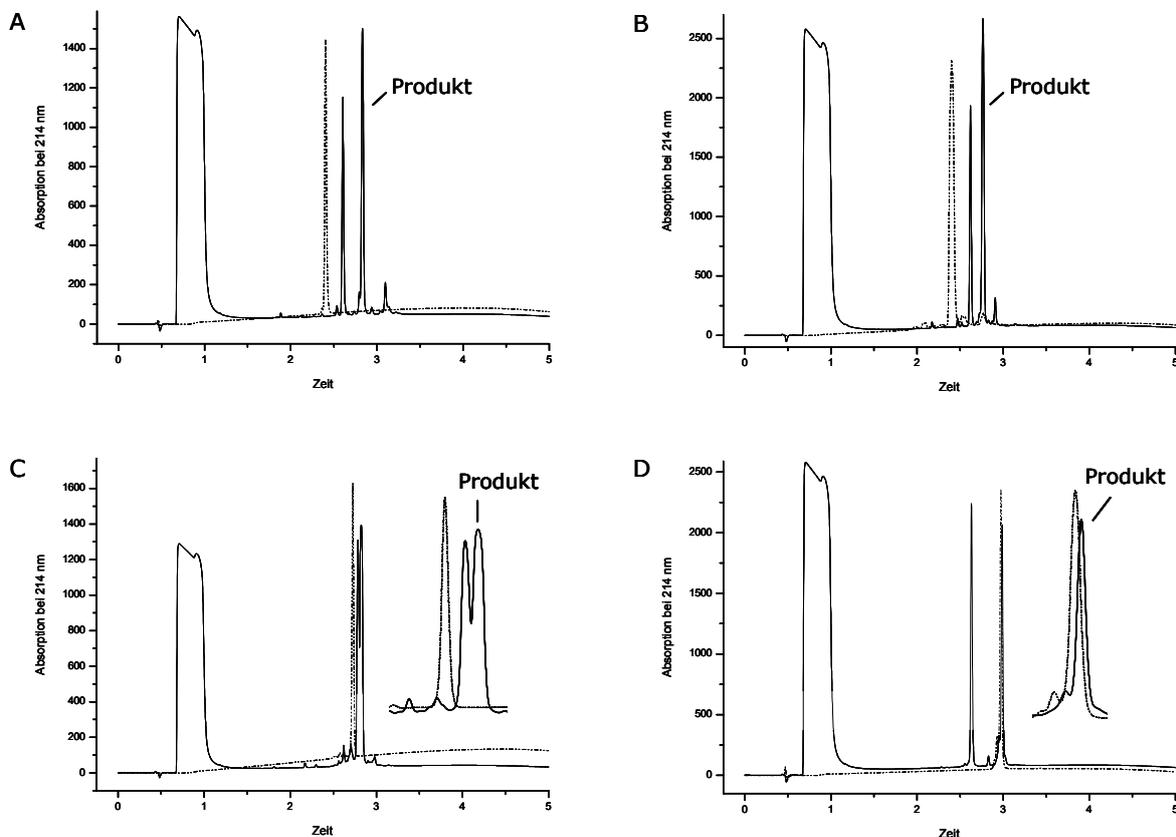
Im Vergleich zu den häufig gebrauchten Fluorescein- und Rhodamin-Farbstoffen (molare Extinktionskoeffizienten zwischen 30000 und 40000  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  und Quantenausbeuten zwischen 0.5 und 1) weist Dansyl mit 3100  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  einen geringen molaren Extinktionskoeffizienten und mit 0.35 eine geringe Quantenausbeute auf, was jedoch durch die Multimerisierung ausgeglichen werden kann. Allerdings wären andere Farbstoffe, die sowohl einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten, eine hohe Quantenausbeute, einen großen Stokes-Shift als auch eine hohe Reaktivität aufweisen und möglichst im nahinfraroten Bereich fluoreszieren sollten, die idealen Fluoreszenzfarbstoffe für diesen Multimerisierungsansatz.

Mit Dansylchlorid als Fluoreszenzfarbstoff konnten die zuvor synthetisierten PAMAM-Dendrimere quantitativ derivatisiert werden und die Produkte wurden in guten Ausbeuten erhalten. Die multidansylierten Systeme erzeugten bei nur mäßiger Eigenlöschung Fluoreszenzsignale, die linear mit der Anzahl der gekoppelten Farbstoffe zunahmen. Dansylchlorid ist damit trotz seines niedrigen molaren Extinktionskoeffizienten und seiner geringen Quantenausbeute der einzige hier getestete Fluoreszenzfarbstoff, der sich prinzipiell für eine Multimerisierung auf der Basis von Dendrimern eignet, da vor allem die derzeit bekannten Nahinfrarotfarbstoffe nur einen sehr geringen Stokes-Shift aufweisen und somit bei geringer räumlicher Nähe eine sehr große Fluoreszenzeigenlöschung aufweisen.

### 3.3 Derivatisierung von Octreotid-Maleimidohexansäure mit den Dansyl-Multimeren

Um die Kopplungsfähigkeit der dargestellten Dansyl-Multimere an Peptide zu zeigen, wurden sie exemplarisch an Octreotid-Maleimidohexansäure konjugiert. Octreotid ist ein Analogon des Peptidhormons Somatostatin, weist allerdings eine deutlich höhere Plasmastabilität als dieses auf und bindet an die Somatostatinrezeptoren des Subtyps 2, 3 und 5, die auf vielen neuroendokrinen Tumoren überexprimiert sind. Octreotid wird derzeit, mit den therapeutischen Radionukliden  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$  markiert, in fortgeschrittenen klinischen Studien zur Behandlung von inoperablen und metastasierten neuroendokrinen Tumoren untersucht [Kaltsas].

Die Synthese des Octreotids erfolgte, ebenso wie die anschließende Ankopplung der Maleimidohexansäure, analog der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise [Mier (2000)] und die Charakterisierung wurde mittels HPLC und MALDI-TOF Spektrometrie durchgeführt. Das erhaltene Peptid-Derivat wurde anschließend mit den verschiedenen Dansyl-Multimeren umgesetzt und die Produkte mittels Massenspektrometrie untersucht. Abbildung 33 zeigt die Reaktionsgemische der Umsetzungen der Dansyl-Multimere mit dem mit Maleinimid derivatisierten Octreotid:



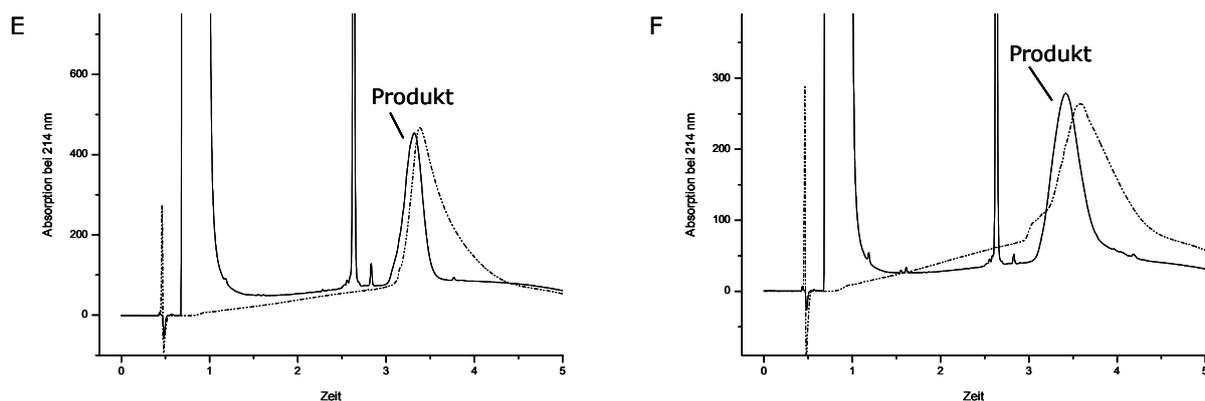


Abbildung 33: HPLC-Chromatogramme der Reaktionsgemische der Umsetzungen der Dansyl-Multimere Dansyl<sub>1</sub>-SH (A), Dansyl<sub>2</sub>-SH (B), Dansyl<sub>4</sub>-SH (C), Dansyl<sub>8</sub>-SH (D), Dansyl<sub>16</sub>-SH (E) und Dansyl<sub>32</sub>-SH (F) mit Octreotid-Maleimidohexansäure. Die Chromatogramme der Dansyl-Multimer-Edukte sind jeweils gestrichelt eingefügt.

Dabei zeigte sich, dass sich die Umsetzung der Dansyl-Multimere kleiner Generation noch gut mittels HPLC und massenspektrometrischer Methoden analysieren ließ, jedoch wurde mit zunehmender Größe der Multimere die Analyse der Substanzen schwieriger, da der polykationische Charakter der Zielmoleküle zunahm, was eine massenspektrometrische Untersuchung der Dansyl<sub>16</sub>- und Dansyl<sub>32</sub>-Konjugate verhinderte. Außerdem erschwerte die erhebliche Peakbreite der Dansyl<sub>16</sub>- und Dansyl<sub>32</sub>-Multimer-Signale eine eindeutige Aussage über den Ablauf der Reaktion mit dem Maleinimido-Octreotid.

Daher konnte die Derivatisierung von Octreotid-Maleimidohexansäure nur für die Dansyl-Multimere mit 1 bis 8 Dansylresten (**63** – **66**) mittels Massenspektrometrie gezeigt werden.

### 3.4 Antikörper-Derivatisierungen mit den Dansyl-Multimeren

Um die Einführbarkeit der synthetisierten Dansyl-Multimere in Proteine zu zeigen, wurden diese an hMAb425 als Modellantikörper gekoppelt. hMAb425, der von Merck lange unter dem Namen EMD 72.000 geführt wurde und nun als Matuzumab bezeichnet wird, ist gegen den EGF-Rezeptor gerichtet und wurde kürzlich in klinischen Studien in Patienten mit Ovarialkarzinomen, primären peritonealen Tumoren, fortgeschrittenem NSCLC und fortgeschrittenen Pancreaskarzinomen untersucht [Seiden, Kollmannsberger, Graeven].

Um die Dansyl-Multimere, die eine Thiol-Funktion zur selektiven Ankopplung besitzen, in ein Protein einführen zu können, muss dieses zunächst mit einem Maleinimid derivatisiert werden. Hierfür wurde im Fall der Antikörper-Derivatisierungen der heterobifunktionale Crosslinker Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat) verwendet, da das hierdurch eingeführte Maleinimid im Gegensatz zu durch

andere Reagenzien eingeführte Maleinimide eine hohe Stabilität auch über längere Zeiträume aufweist sollte [Hermanson].

Für die Derivatisierung des Proteins mit Sulfo-SMCC wurde eine Lösung des Antikörpers für eine Stunde bei pH 7.2 mit 7 Äquivalenten Sulfo-SMCC umgesetzt und anschließend mit Größenausschluss-Gelchromatographie aufgereinigt. Die Protein-Konzentration der erhaltenen Antikörper-Lösung wurde mittels Bradford Assay bestimmt und die Anzahl der Maleinimide pro Antikörper mittels Rücktitration ermittelt. Für die Rücktitration wurde ein Aliquot des Maleinimid-enthaltenden Antikörpers zunächst mit einem bekannten Überschuss von MESNA (2-Mercapto-ethansulfonsäure Natriumsalz) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 200  $\mu$ L) für 5 Minuten reagieren gelassen. Die Menge des nicht abreagierten residualen Thiols wurde anschließend mittels Ellman's Assay quantifiziert. Die Menge des abreagierten Thiols entspricht der Menge der in Lösung vorhandenen Maleinimide. Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen wurden pro Antikörper-Molekül 1.7 Maleinimide eingeführt. Der so derivatisierte Antikörper wurde anschließend mit Lösungen von Dansyl<sub>8</sub>-SH, Dansyl<sub>16</sub>-SH, Dansyl<sub>32</sub>-SH und Dansyl<sub>64</sub>-SH in DMSO für 5 Minuten bei pH 7.2 reagieren gelassen. Hierbei ließ sich feststellen, dass sich nur Dansyl<sub>8</sub>-SH und Dansyl<sub>16</sub>-SH für eine Ankopplung an Antikörper eignen, da die größeren Dansyl-Dendrimere, wohl aufgrund ihrer hohen Lipophilie, auch bei Zugabe von Detergenzien wie Tween 20 und Triton X 100 zur sofortigen Denaturierung und zum Ausfallen des Antikörpers führten.

Daher wurde einzig das hMAb425-Dansyl<sub>16</sub>-Konjugat isoliert und charakterisiert. Abbildung 34 zeigt das Reaktionsgemisch des mit Sulfo-SMCC derivatisierten Antikörpers mit Dansyl<sub>16</sub>-SH:

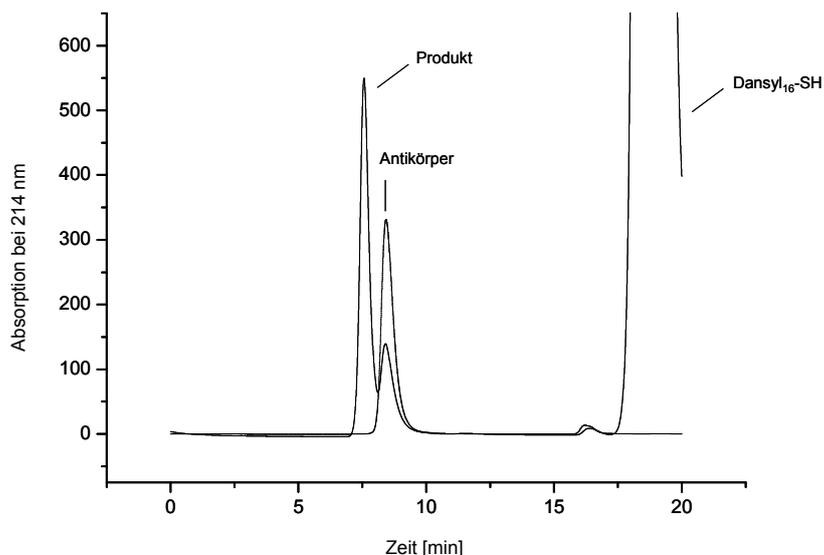


Abbildung 34: Größenausschluss-Chromatogramme des Reaktionsgemisches von mit Sulfo-SMCC derivatisiertem Antikörper mit Dansyl<sub>16</sub>-SH (durchgezogene Linie) und des derivatisierten Antikörpers allein (gestrichelte Linie).

Das hMAb425-Dansyl<sub>16</sub>-Konjugat konnte mittels Größenausschluss-Chromatographie isoliert und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (Abbildung 35) und Gel-Elektrophorese (Abbildung 36) gemeinsam mit Dipl.-Biol. E.-M. Knapp (Universitätsklinikum Heidelberg, Abteilung für Nuklearmedizin) charakterisiert werden. Weiterhin wurde die Immunreaktivität des derivatisierten Antikörpers von Dr. G. Moldenhauer (Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung für Tumorimmunologie) an der den EGF-Rezeptor überexprimierenden Adenokarzinomzelllinie HT29 bestimmt. Die Immunreaktivität des derivatisierten Antikörpers war zu 54% erhalten.

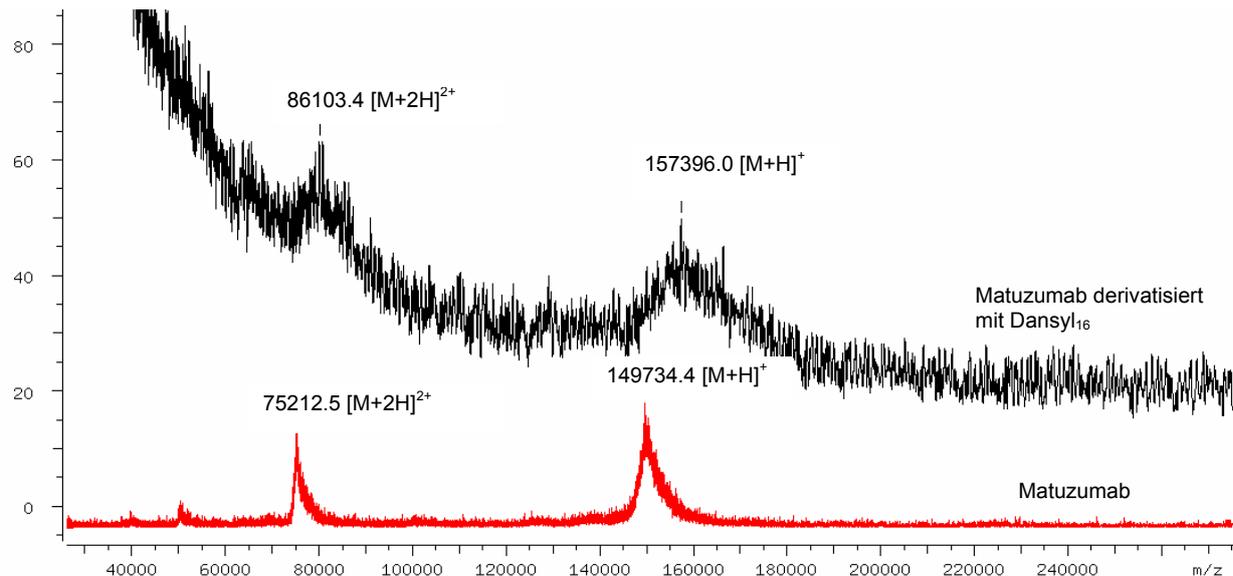


Abbildung 35: MALDI-TOF Massenspektrum des unterderivatisierten Antikörpers (rot) und des Dansyl<sub>16</sub>-Antikörper-Konjugates (schwarz). Der Massenunterschied von 7661.6 g/mol entspricht der Ankopplung eines Dansyl-Dendrimers pro Antikörper-Molekül.

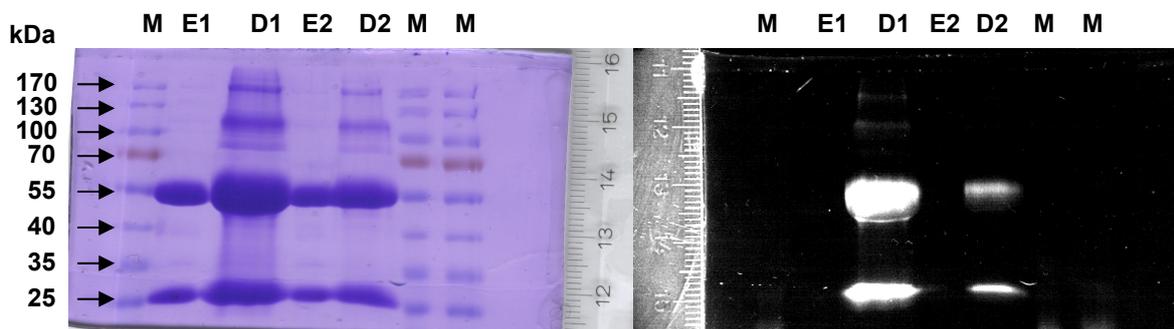
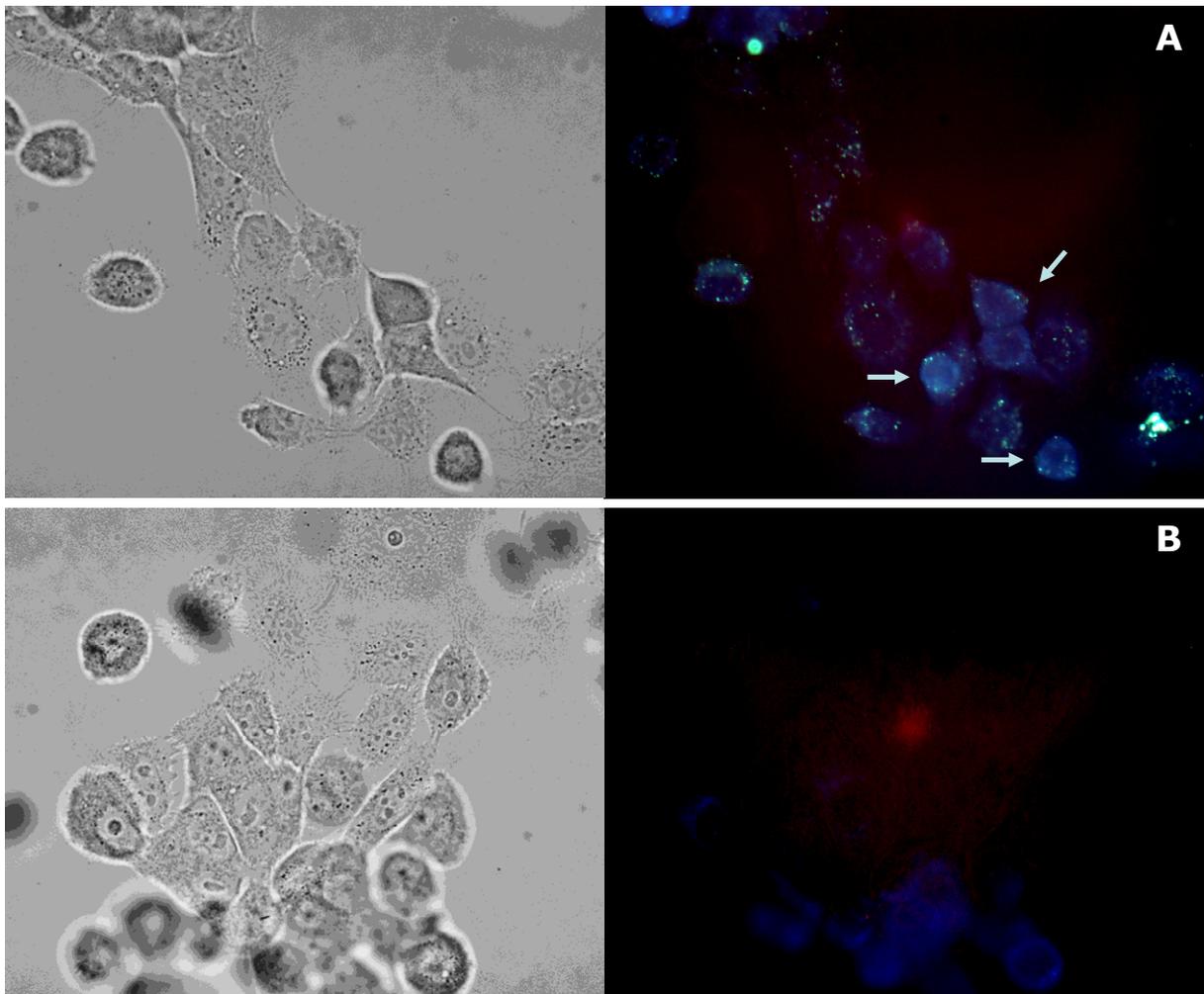


Abbildung 36: 10% Acrylamid-Gelelektrophorese des unterderivatisierten Antikörpers (E1: 50 µg, E2: 20 µg) und des Dansyl<sub>16</sub>-Antikörper-Konjugates (D1: 100 µg, D2: 30 µg) nach Reduktion mit Mercaptoethanol. Die Anfärbung erfolgte mittels Commassie Blue (links). Spur M enthält einen Protein-Molekulargewichtsmarker. In der rechten Abbildung ist dasselbe Gel unter 254 nm UV-Licht zu sehen. Die hellen Banden zeigen die durch die Reduktion entstandenen fluoreszenzmarkierten Antikörperfragmente bei 55.000 g/mol und 25.000 g/mol.

Weiterhin wurde der erhaltene 16-fach dansylierte Antikörper im Vergleich mit underivatisiertem hMAb425, FITC-markiertem hMAb425 und hMAb425-Dansyl<sub>1</sub> fluoreszenzmikroskopisch mit Dr. R. Saffrich (Universitätsklinikum Heidelberg, Abteilung für Innere Medizin) an der den EGF-Rezeptor überexprimierenden humanen epidermalen Karzinomzelllinie A431, deren Kultur Frau U. Bauder-Wüst (Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung für Radiopharmazeutische Chemie) durchführte, untersucht. Ein multivalent dispers mit 16 Dansylresten derivatisierter Antikörper, der zum Vergleich hergestellt und untersucht werden sollte, konnte nicht erhalten werden, da das Protein bei der Konjugation denaturierte und ausfiel. Abbildung 37 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Bilder dieses Experimentes. Die Bilder, die mit hMAb425-Dansyl<sub>1</sub> erhalten wurden, sind nicht gezeigt, da keine sichtbare Fluoreszenz zu beobachten war.



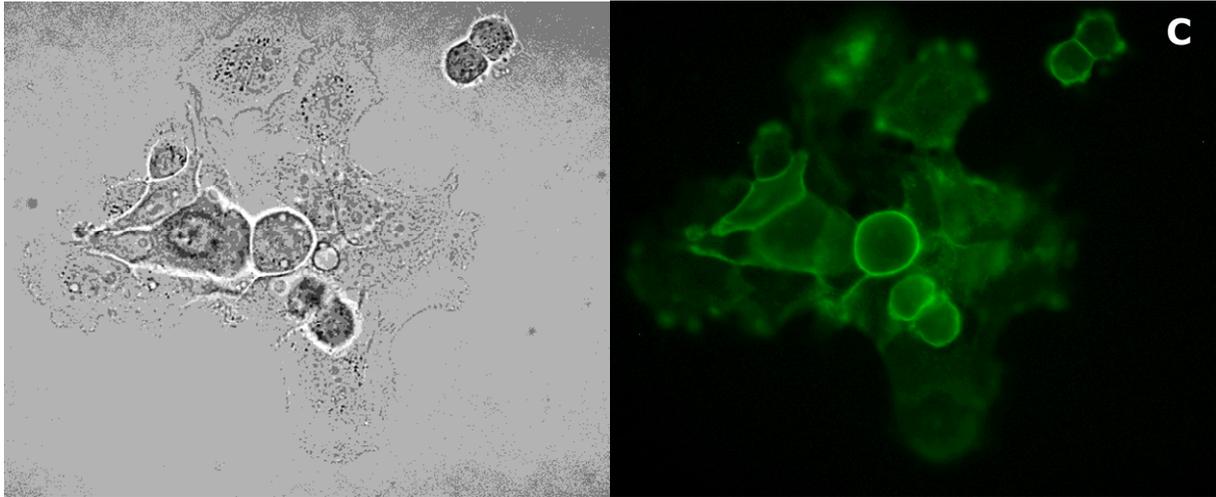


Abbildung 37: Fluoreszenzbilder der mit Dansyl<sub>16</sub>-hMAb425 (A), underivatisiertem hMAb425 (B) und FITC-markiertem hMAb425 (C) inkubierten A431-Zellen.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, zeigt der Dansyl<sub>16</sub>-modifizierte Antikörper (A) im Vergleich zum FITC-markierten Antikörper (C) nur relativ geringe Fluoreszenzintensitäten. Die deutlichste Fluoreszenz ist bei den durch die Pfeile gekennzeichneten Zellen zu sehen. Bild B zeigt die Autofluoreszenz der Zellen. Neben der geringen Fluoreszenzintensität des dansylierten Systems ist das schnelle Ausbleichen des Farbstoffes ein weiterer Nachteil, der eine Anwendung der Dansyl-Multimere erschwert.

### 3.5 Multimerisierung Caspase-spaltbarer Peptid-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate

Da fast alle der hier untersuchten Farbstoffe nur einen geringen Stokes-Shift aufwiesen und damit bei der Multimerisierung eine starke Fluoreszenzeigenlöschung mit zunehmender Anzahl von Farbstoffmolekülen zeigten, waren die Multimere dieser Farbstoffe nicht für die direkte optische Bildgebung geeignet.

Allerdings kann dieser Effekt der Fluoreszenzlöschung für andere Anwendungen genutzt werden. So wurden beispielsweise einige Protease-spaltbare Peptide, die mindestens zwei sich gegenseitig löschende Fluoreszenzfarbstoffe und ein Carrier-Molekül für eine selektive Anreicherung enthielten, für die Untersuchung verschiedener Pathologien verwendet [Mahmood, Stefflova]. Allerdings war die Anzahl der eingeführten Farbstoffe begrenzt oder undefiniert, was zu geringen beziehungsweise variierenden Fluoreszenzsignalen führte.

Diese Nachteile könnten mittels dendritischer Systeme überwunden werden, indem fluoreszenzfarbstoffmarkierte – zum Beispiel Caspase-spaltbare – Peptide in vielfacher und definierter Anzahl in ein Dendrimer eingeführt werden könnten. Das erhaltene

nichtfluoreszente dendritische System könnte dann weiterhin in ein beliebiges Carrier-Molekül eingeführt werden, um eine spezifische Anreicherung im Zielgewebe zu erreichen (Abbildung 38).

Am Zielort würde dann die Peptidsequenz durch dort vorhandene Enzyme gespalten und die Farbstoffmoleküle freigesetzt werden, was zu einer Aufhebung der Fluoreszenzlöschung und damit zu einem starken Fluoreszenzsignal führen würde (Abbildung 39).

Ein gutes Target für diesen Ansatz wäre zum Beispiel die Caspase-3, deren Expression in apoptotischen Zellen hochreguliert ist, weswegen der Anstieg des Caspase-3-Niveaus in einer Zelle auf apoptotisches Gewebe schließen lässt. Eine Visualisierung von Apoptose wäre beispielsweise in der Krebstherapie von Vorteil, um die durch eine Therapie geschädigten Gewebe lokalisieren und den Therapieerfolg abschätzen zu können.

Daher wurden zunächst Caspase-3-spaltbare, fluoreszenzfarbstoffmarkierte Peptide mit den Sequenzen G[5(6)-Carboxy-fluorescein]-DEVDC und CDEVDC-K(Sulforhodamin) mittels Standard-Festphasenpeptidsynthese [Mier (2000)] hergestellt (Abbildung 40).

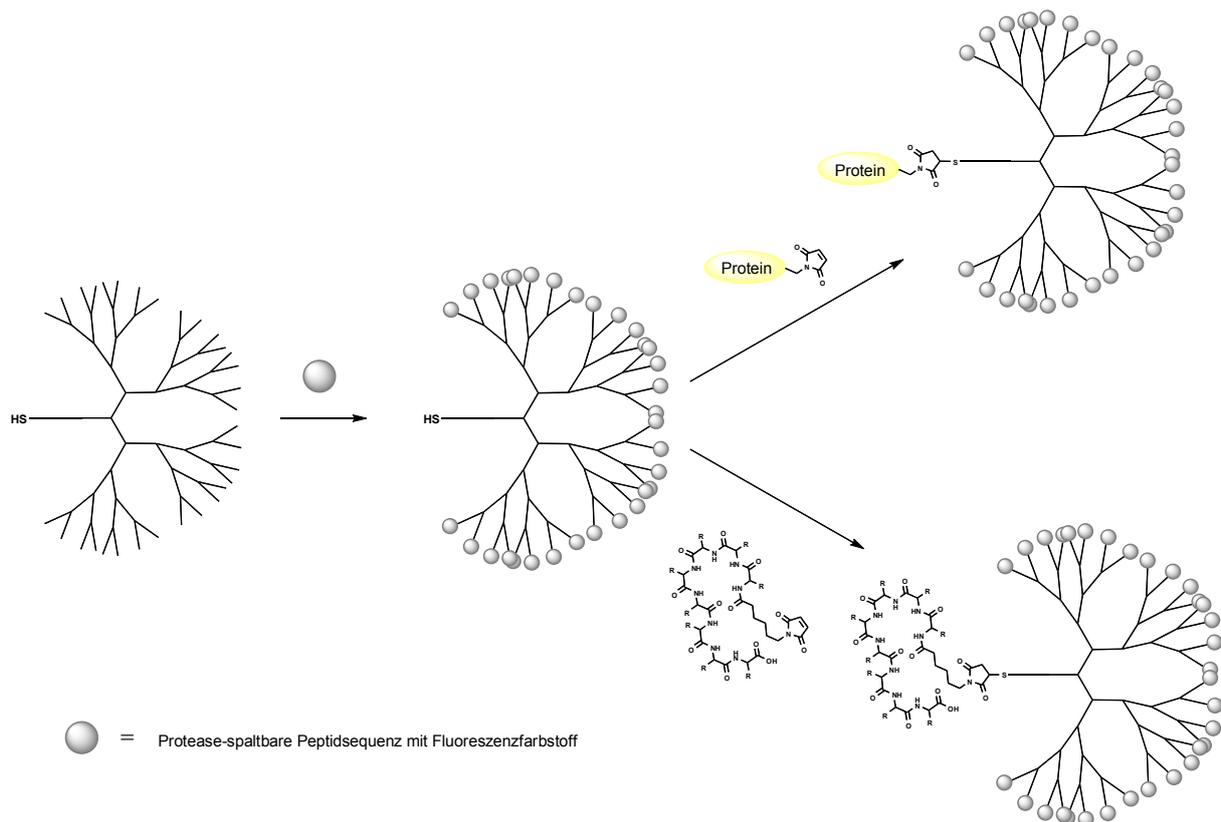


Abbildung 38: Aufbau der poly-Fluoreszenzfarbstoff-markierten dendritischen Systeme mit Protease-spaltbaren und Fluoreszenzfarbstoff-markierten Peptiden.

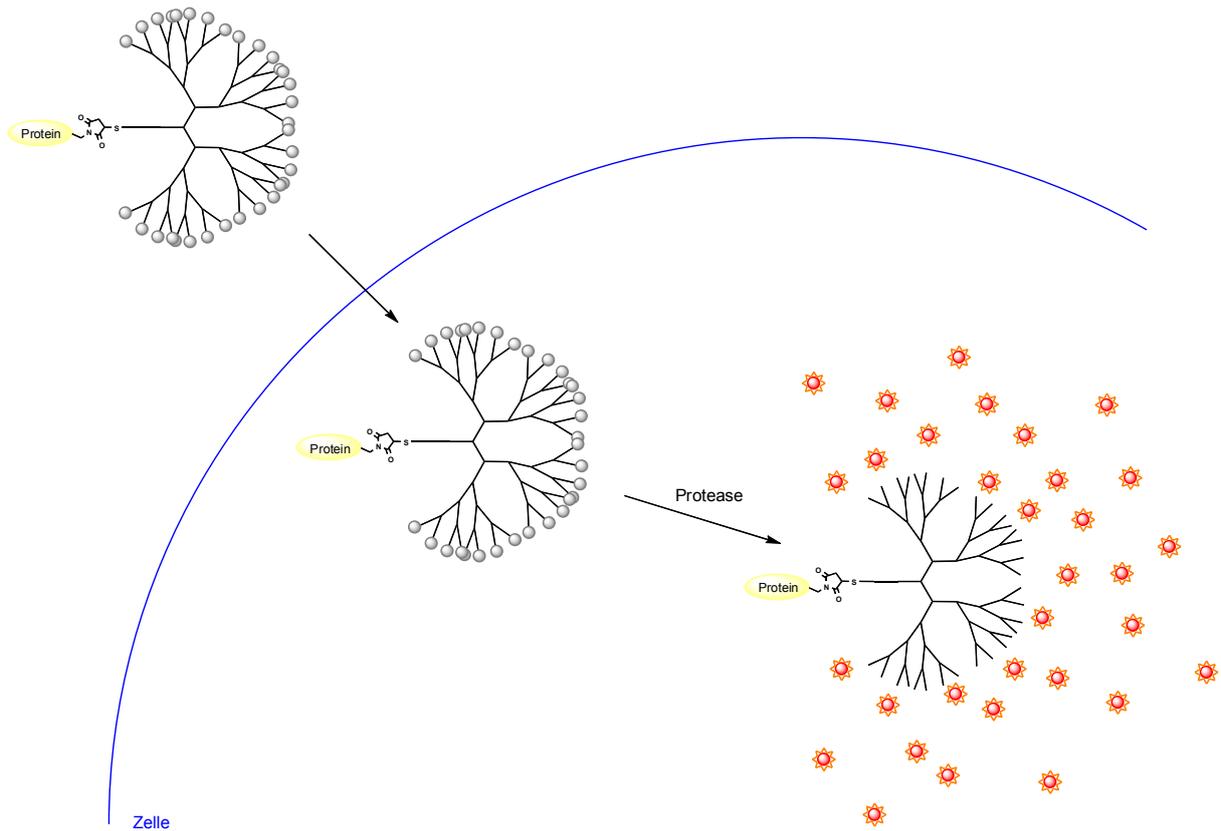


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Spaltung der Protease-spaltbaren Peptide in der Targetzelle und der damit verbundenen Freisetzung der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle. Die Freisetzung hebt die gegenseitige Fluoreszenzlösung der Farbstoffe auf, da die emittierte Strahlung nicht mehr durch benachbarte Farbstoffmoleküle gequenchet wird.

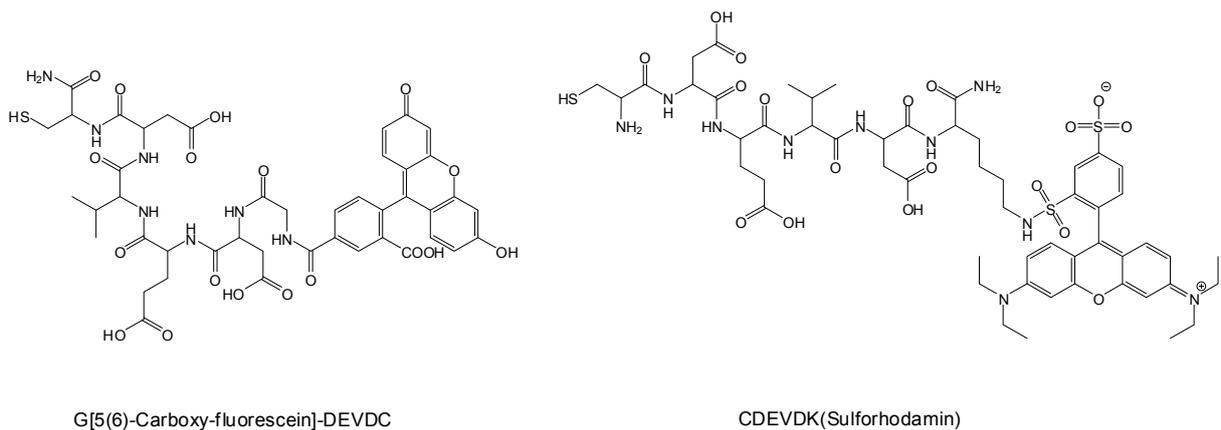


Abbildung 40: Strukturen der dargestellten Fluoreszenzfarbstoff-markierten Peptide G[5(6)-Carboxy-fluorescein]-DEVDC und CDEVDK(Sulforhodamin).

Diese wurden anschließend mit Maleimidohexansäure derivatisierten PAMAM-Dendrimern umgesetzt. Beide Peptide konnten in ein 4 Maleinimide enthaltendes

Dendrimere eingeführt und die Produkte (**67** und **68**) massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Weiterhin wurde das Fluorescein-markierte Peptid mit 16, 32 und 64 Maleinimide enthaltenden Dendrimeren umgesetzt (**69 – 71**). Die hierbei erhaltenen Produkte wurden massenspektrometrisch untersucht, wobei allerdings keine Aussagen über die Identitäten der Verbindungen erhalten werden konnten, weswegen dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

### **3.6 Darstellung der DOTA-Dendrimere und Optimierung der Synthese verschiedener DOTA-Derivate**

DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) ist einer der wichtigsten Chelatbildner in der Radiochemie, da es mit einer Vielzahl von Hauptgruppen- und Übergangsmetallionen Komplexe mit extrem hohen Stabilitätskonstanten bildet. Daher ist DOTA der am häufigsten genutzte Chelatbildner für *in vivo*-Applikationen in der radiologischen und nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie. Hierfür wird es in Carrier-Biomoleküle wie zum Beispiel Peptide oder Antikörper eingeführt und mit Radionukliden markiert oder mit Gadolinium komplexiert. Dabei werden abhängig von den physikalischen Eigenschaften des komplexierten Radionuklides Therapeutika oder Diagnostika, im Falle von Gadolinium MRT (Magnet Resonanz Tomographie)-Kontrastmittel erhalten.

Könnte man die spezifische Aktivität beziehungsweise den Gadolinium-Gehalt dieser Verbindungen erhöhen, so könnte das Potential dieser Pharmaka weiter verbessert werden. Dies würde durch eine verstärkte Anreicherung von Radioaktivität oder Gadolinium, die konzentriert am Zielort vorläge, einen besseren Kontrast für diagnostische Anwendungen und eine erhöhte radioaktive Dosis im Tumor für therapeutische Fragestellungen bedeuten. Die spezifische Aktivität eines Carrier-Biomoleküls kann zum einen über die Einführung mehrerer statistisch verteilter Chelatbildner pro Carrier erhöht werden, was allerdings insbesondere bei Antikörpern, aber auch bei anderen Proteinen und Peptiden zu einer stark verminderten biologischen Aktivität des Moleküls führt. Deshalb müssen andere Konzepte zur Einführung mehrerer Chelatbildner in ein Biomolekül gefunden werden. Kürzlich wurden einige Versuche unternommen, Chelat-Multimere auf der Basis von dendritischen Systemen in Antikörper einzuführen. Die synthetisierten Antikörper-Dendrimer-Konjugate zeigten dabei eine größtenteils erhaltene Immunreaktivität und hohe spezifische Aktivitäten [C. Wu, Kobayashi]. Allerdings wurde bisher der Einfluss der Größe und der Zahl der eingeführten dendritischen Strukturen auf die biologische Aktivität des Carrier-Moleküls nicht systematisch erforscht.

Um diesen Einfluss systematisch zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen PAMAM-Dendrimere mit verschiedenen DOTA-Derivaten umgesetzt, um für eine Ankopplung an Biomoleküle geeignete DOTA-Multimere zu erhalten. Dafür mussten jedoch zunächst die Syntheseprotokolle für verschiedene DOTA-Derivate verbessert werden, da viele der publizierten Vorschriften komplex sind, nur für geringe Substanzmengen geeignet sind oder die Produkte nur in geringen Ausbeuten ergeben.

Speziell für das tris-*t*Bu-DOTA (**74**) (Abbildung 41), das eines der am häufigsten benutzten DOTA-Derivate darstellt, gibt es mehrere Synthesevorschriften [Heppeler, Mukai, Oliver], die jedoch entweder nicht für große Substanzmengen geeignet sind oder aber die kritischen Punkte der Synthese nicht betonen, wodurch es zu geringen Reaktionsausbeuten kommt. So muss insbesondere bei der ersten Stufe der Synthese zum (1,4,7,10-Tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (**72**) darauf geachtet werden, dass die Temperatur während der Reaktion und der Aufreinigung der Substanz höchstens 20 °C beträgt, da es sonst sehr schnell zu einer Zyklisierung des Moleküls kommt.

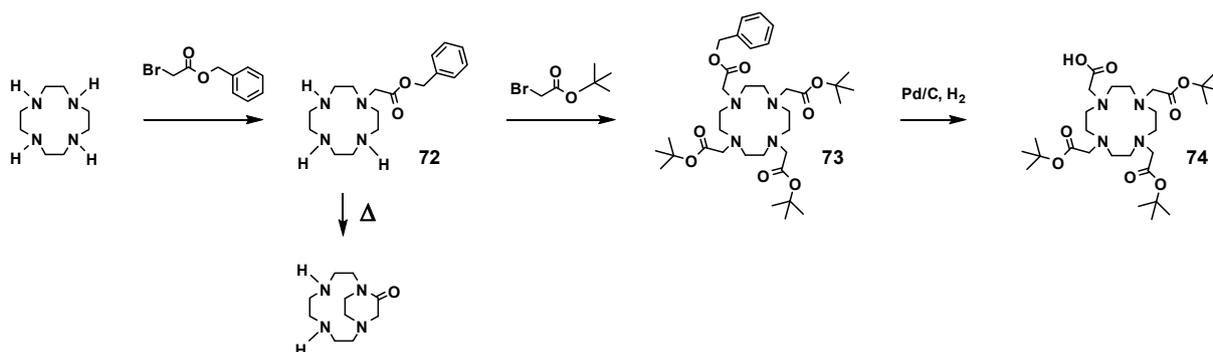


Abbildung 41: Synthese von tris-*t*Bu-DOTA.

Bei der Aufarbeitung der zweiten und dritten Stufe der Synthese ist weiterhin darauf zu achten, dass die säulenchromatographische Aufreinigung der Substanzen schnell erfolgen muss, da es sonst zu Zersetzungsreaktionen kommt, die die Ausbeuten der Reaktionen erheblich vermindern können.

Thiol-DOTA (**76**) wird in der Literatur ausgehend von tris-*t*Bu-DOTA hergestellt [Mattila] (Abbildung 42):

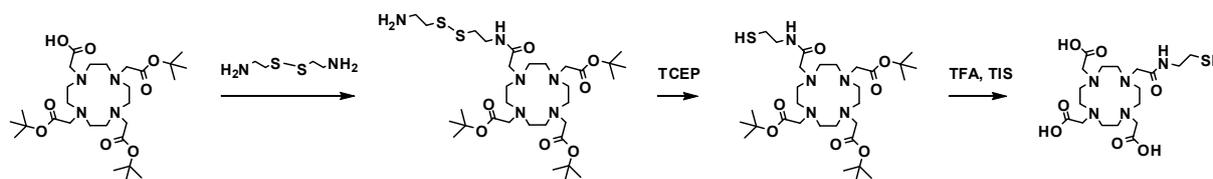


Abbildung 42: Synthese von Thiol-DOTA laut Literatur.

Diese Verbindung ist kommerziell verfügbar, ihre Beschaffung aber mit hohen Kosten verbunden oder sie muss in einer dreistufigen Synthese wie oben beschrieben dargestellt werden. Außerdem führt die Entschützung der *tert*-butyl-Gruppen mit konzentrierter TFA zu unerwünschten Fragmentierungen, da die Abspaltung der Schutzgruppen schwer zu kontrollieren ist und damit zu verminderten Reaktionsausbeuten führt (Abbildung 43).

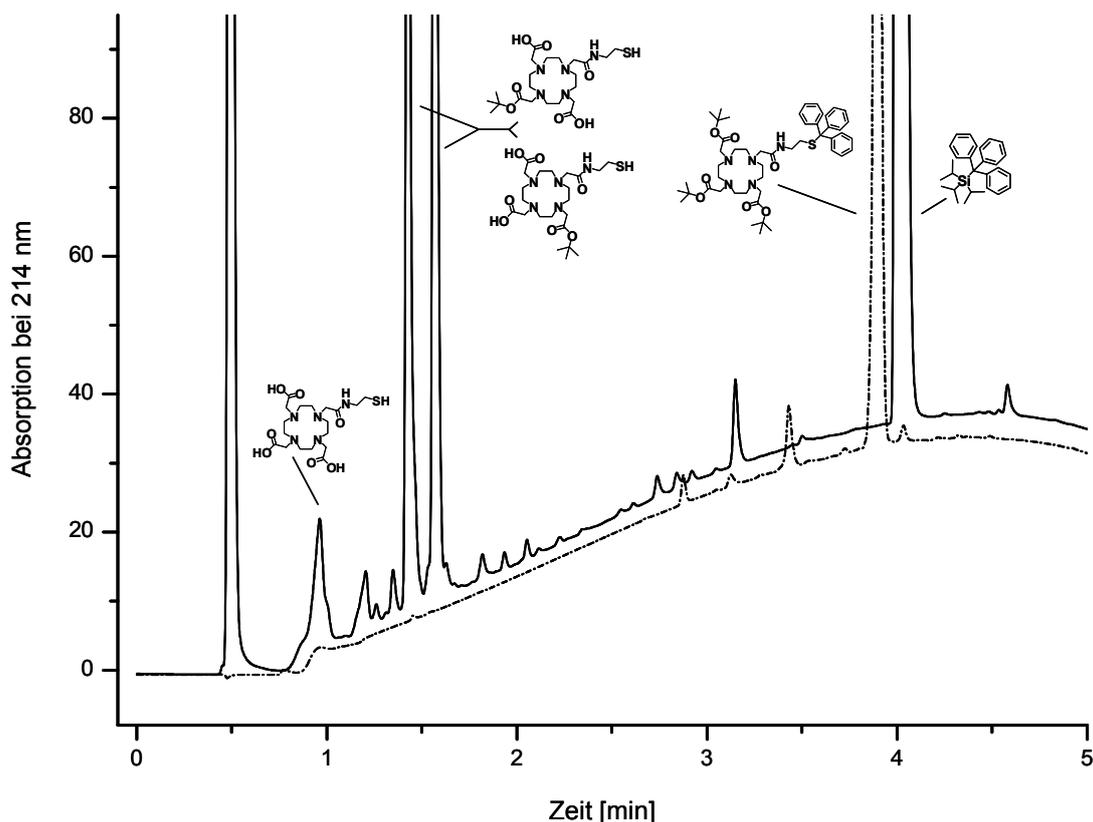


Abbildung 43: HPLC-Chromatogramme der Entschützensreaktion von S-Trityl-mercapto-tris-*t*Bu-DOTA mit konzentrierter TFA nach 16 Stunden (durchgezogene Linie) und des Eduktes (gestrichelte Linie).

Die Synthese kann allerdings stark vereinfacht werden, indem statt tris-*t*Bu-DOTA freies DOTA als Ausgangssubstanz verwendet wird, das zunächst mit S-Trityl-mercaptoethanol [Maltese] umgesetzt und anschließend innerhalb weniger Minuten mit konzentrierter TFA entschützt wird (Abbildung 44). Durch die kurze Einwirkzeit der konzentrierten TFA entstehen kaum Fragmentierungsprodukte (Abbildung 45) und die Aufreinigung des Endproduktes wird stark vereinfacht.

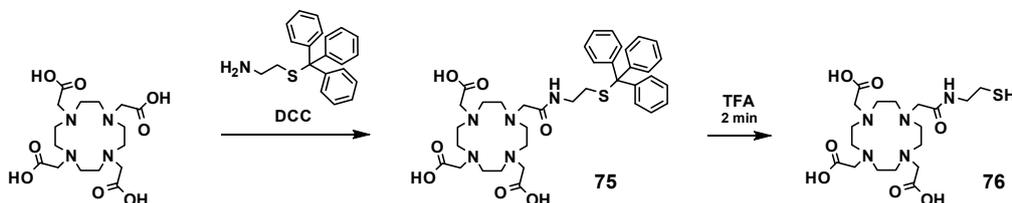


Abbildung 44: Synthese von Thiol-DOTA (**76**) ausgehend von DOTA.

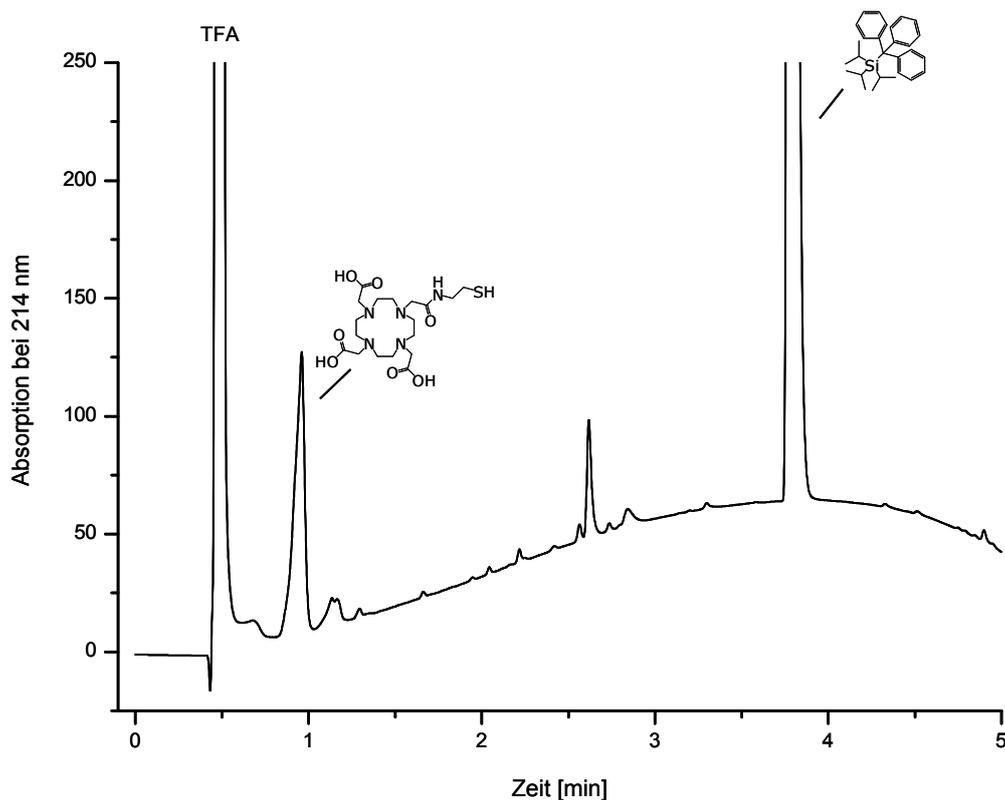


Abbildung 45: HPLC-Chromatogramm der Entschützungsreaktion von S-Trityl-thiol-DOTA mit konzentrierter TFA nach etwa 2 Minuten.

Tris-benzyl-DOTA (**79**) stellt insbesondere bei säurelabilen zu derivatisierenden Molekülen ein wertvolles DOTA-Derivat dar, da es im Anschluss an die Kopplung unter sehr milden Bedingungen mit Pd auf Aktivkohle unter  $H_2$ -Atmosphäre entschützt werden kann. Die Darstellung dieser Verbindung [Anelli] kann allerdings beträchtlich vereinfacht werden, wenn anstatt des Bromessigsäure-*tert*-butyl-esters in der ersten Stufe der Synthese ein Chloressigsäure-allylester verwendet wird, da die allyl-Schutzgruppe sehr schonend durch Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium als Katalysator entfernt werden kann (Abbildung 46 und Abbildung 47).

Dies ist vorteilhaft, da die Abspaltung der laut Literatur zu verwendenden *tert*-butyl-Schutzgruppe unter recht harschen Bedingungen mit 12N HCl:Dioxan 1:1 für 12 Stunden durchgeführt wird, die zu einer starken Fragmentierung des Tris-benzyl-DOTAs und damit zu geringen Reaktionsausbeuten und einer komplexen Aufreinigung führen (Abbildung 48).

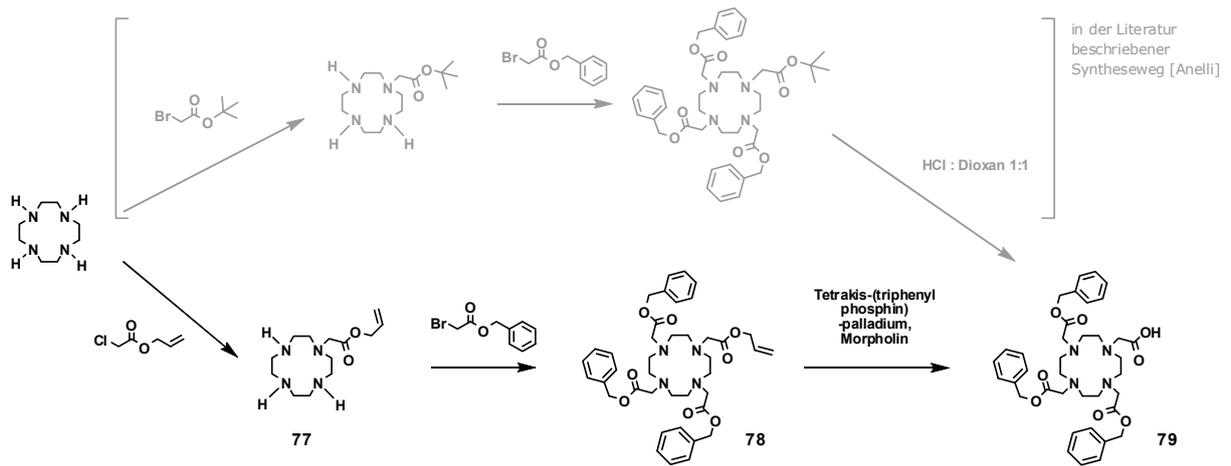


Abbildung 46: Synthese von Tris-benzyl-DOTA (**79**).

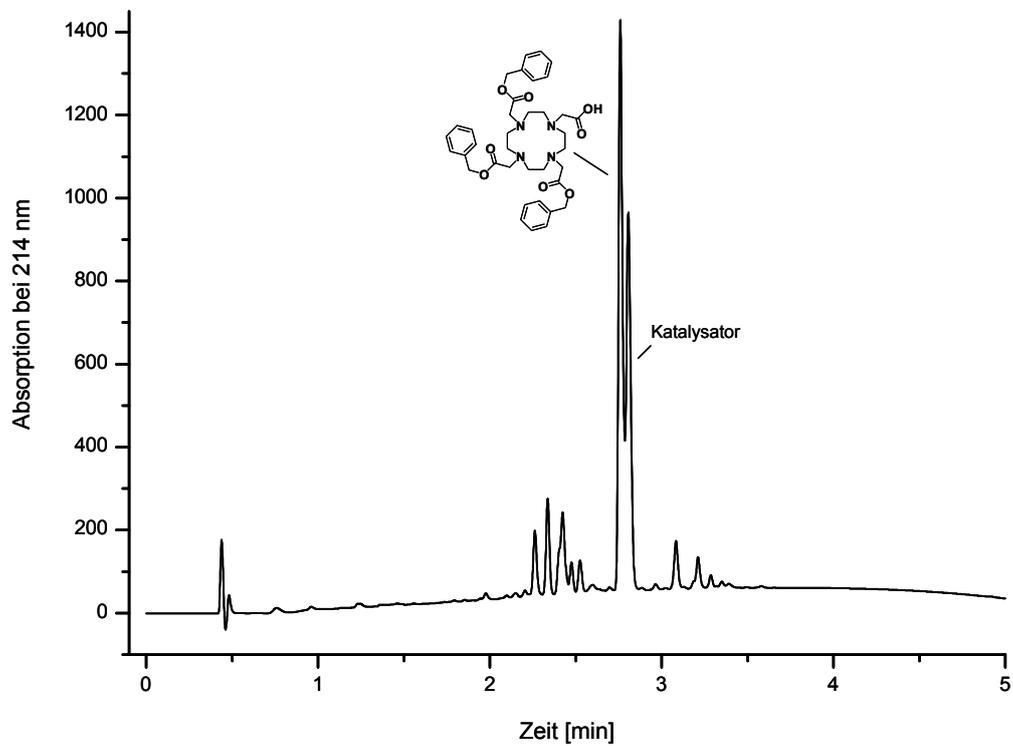


Abbildung 47: HPLC-Chromatogramm der Entschützung von (4-Allyloxycarbonylmethyl-7,10-bis-benzyl-oxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (**78**) mit Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium.

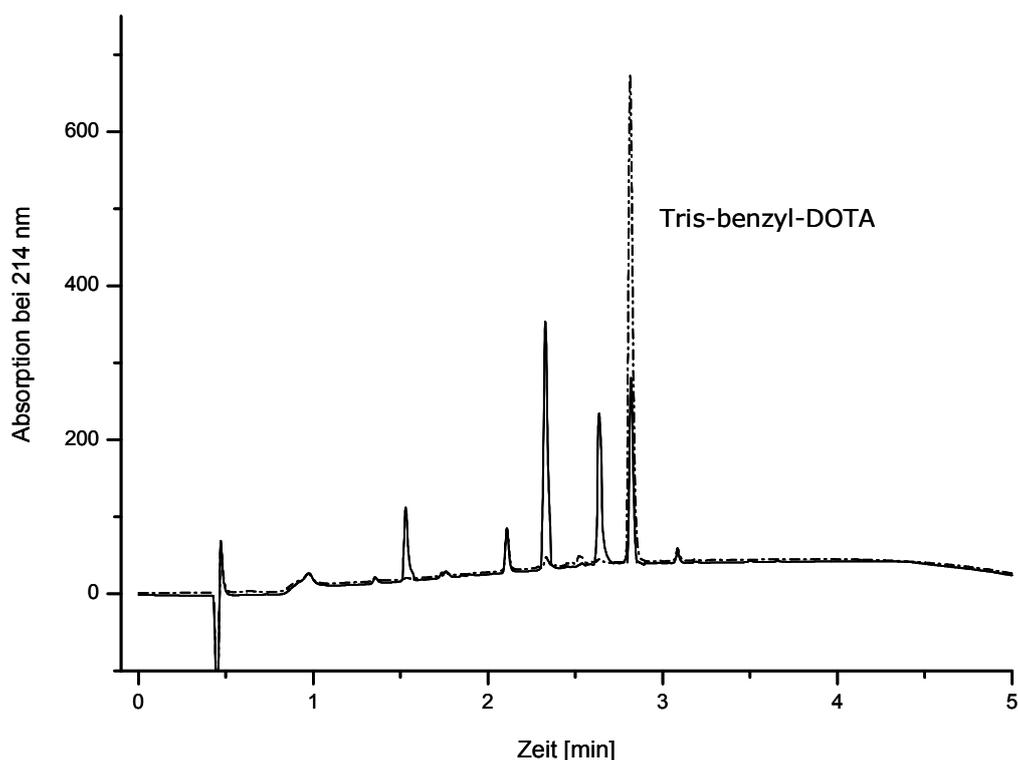


Abbildung 48: HPLC-Chromatogramme der Zersetzung von Tris-benzyl-DOTA in 12N HCl:Dioxan 1:1 nach 10 Minuten (gestrichelte Linie) und nach 12 Stunden (durchgezogene Linie).

Des Weiteren wurde ein neues DOTA-Derivat, das Tris-4-nitro-benzyl-DOTA synthetisiert (Abbildung 49), das sich auch für die Derivatisierung sehr zersetzlicher Moleküle eignen sollte, da es sich nach der Ankopplung unter sehr milden Bedingungen mit TBAF in organischen Lösungsmitteln entschützen lässt [Kocieński].

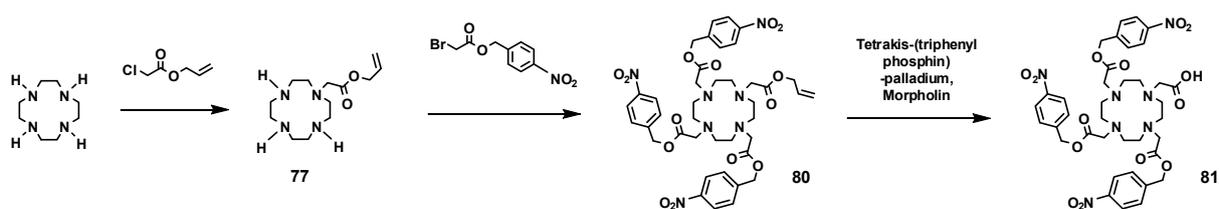


Abbildung 49: Synthese von Tris-4-nitro-benzyl-DOTA (**81**).

Allerdings erwies sich das Produkt als höchst zersetzlich und konnte daher nur schwer isoliert werden. Aufgrund dieser unvorteilhaften Eigenschaften waren weitere Umsetzungen dieses DOTA-Derivates nicht erfolgreich.

Darüber hinaus wurde auch versucht, mehrere neue säurelabile DOTA-Derivate wie Tris-4-methoxybenzyl-DOTA, Tris-diphenylmethyl-DOTA, Tris-trityl-DOTA und Tris-trimethylsilyl-DOTA herzustellen (Abbildung 50), was allerdings nicht gelang. Dies ist auf

die hohe Reaktivität der Verbindungen, durch die interne Zyclisierungen oder Fragmentierungen stattfanden, zurückzuführen.

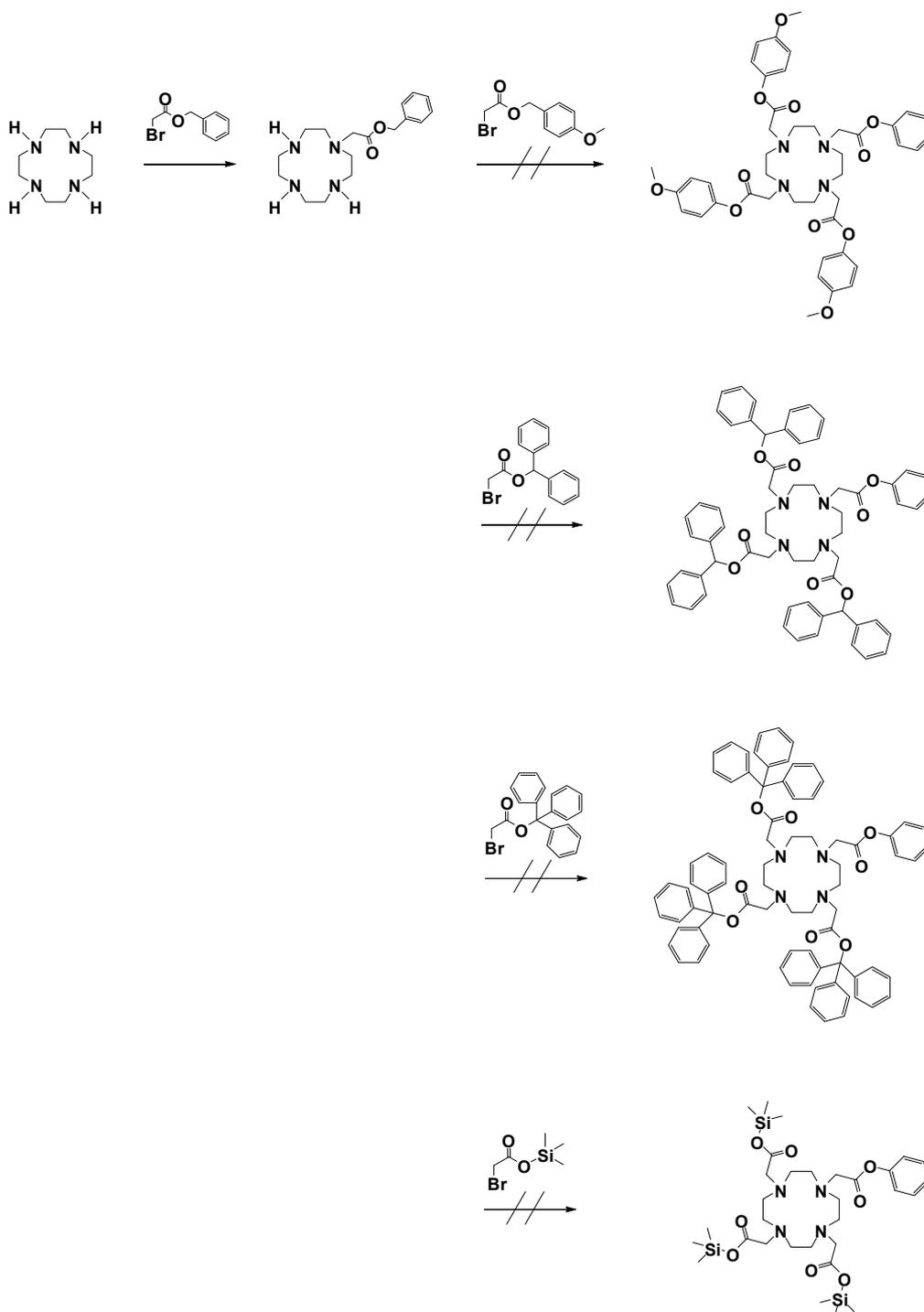


Abbildung 50: Angestrebter Syntheseweg von Tris-4-methoxybenzyl-DOTA, Tris-diphenylmethyl-DOTA, Tris-trityl-DOTA und Tris-trimethylsilyl-DOTA.

Folgende DOTA-Derivate wurden synthetisiert und auf ihre Multimerisierbarkeit auf der Basis der zuvor dargestellten PAMAM-Dendrimere untersucht: tris-*t*Bu-DOTA (**74**), Thiol-DOTA (**76**), Tris-benzyl-DOTA (**79**), Tris-4-nitrobenzyl-DOTA (**81**), Tris-allyl-DOTA

[Wängler], DOTA-PFP-ester [Mier (2005)] und DOTA-PNP-ester [Mier (2005)] (Abbildung 51).

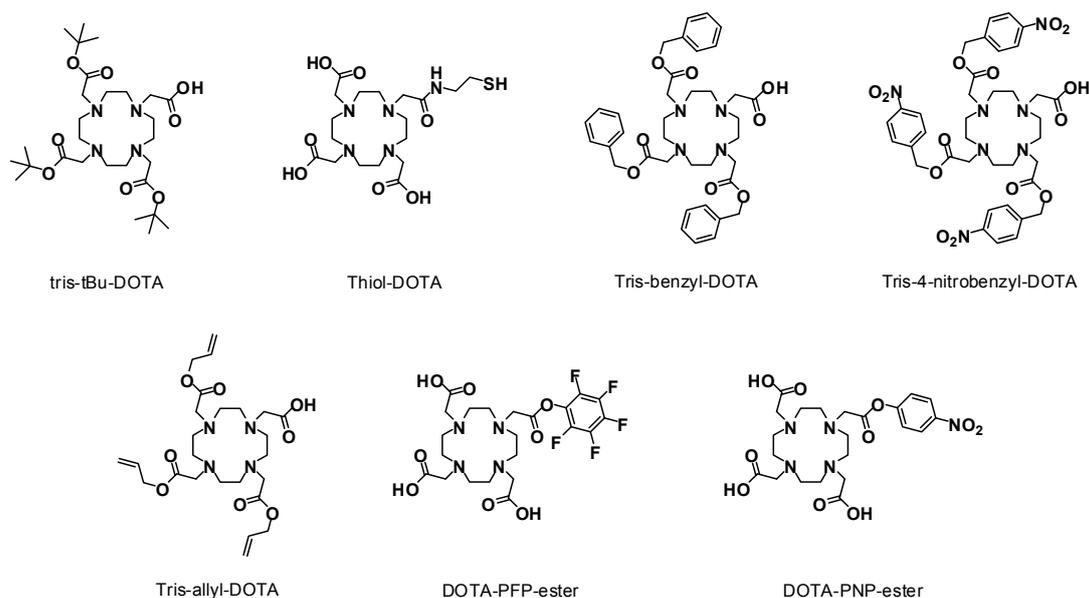


Abbildung 51: Strukturen der untersuchten DOTA-Derivate.

Dabei zeigten tris-*t*Bu-DOTA und auch tris-allyl-DOTA hohe Reaktivitäten mit den Aminfunktionen der Dendrimere. Beide Derivate ließen sich daher mit guten Ausbeuten in Dendrimere verschiedener Größe einführen, wobei homogene Produkte erhalten wurden (Tabelle 9). Allerdings gestaltete sich die anschließende Entschützung der DOTA-Multimere als problematisch, da im Falle des tris-*t*Bu-DOTA die saure Esterspaltung der Schutzgruppen mit konzentrierter TFA mit einer Abspaltung des letzten Gliedes des Pentaethylenglycol-Linkers einherging. Zwar ließen sich beide Produkte im Falle der kleinen Dendrimere noch voneinander trennen, jedoch wurde die Auftrennung mit steigender Größe der Dendrimere problematischer, bis sie schließlich beim 8 DOTAs tragenden Dendrimer nicht mehr möglich war (Abbildung 52). Weiterhin lässt sich aus der Abbildung erkennen, dass die Entschützung der *tert*-butyl-Gruppen auch nach längerer Reaktionszeit von 6 Stunden noch unvollständig war, wodurch es zur Bildung inhomogener Produkte kam.

Im Fall der mit tris-allyl-DOTA funktionalisierten Dendrimere ergaben sich zwar laut Massenspektroskopie vollständig entschützte Produkte, jedoch ließen sich diese nicht mittels HPLC isolieren, da der zur Entschützung verwendete Katalysator Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium extrem hohe UV-Signale ergab und somit die Aufreinigung der Produkte stark erschwerte. Die alternative Aufreinigung mittels Säulenchromatographie blieb aufgrund der geringen Substanzmengen ebenfalls erfolglos.

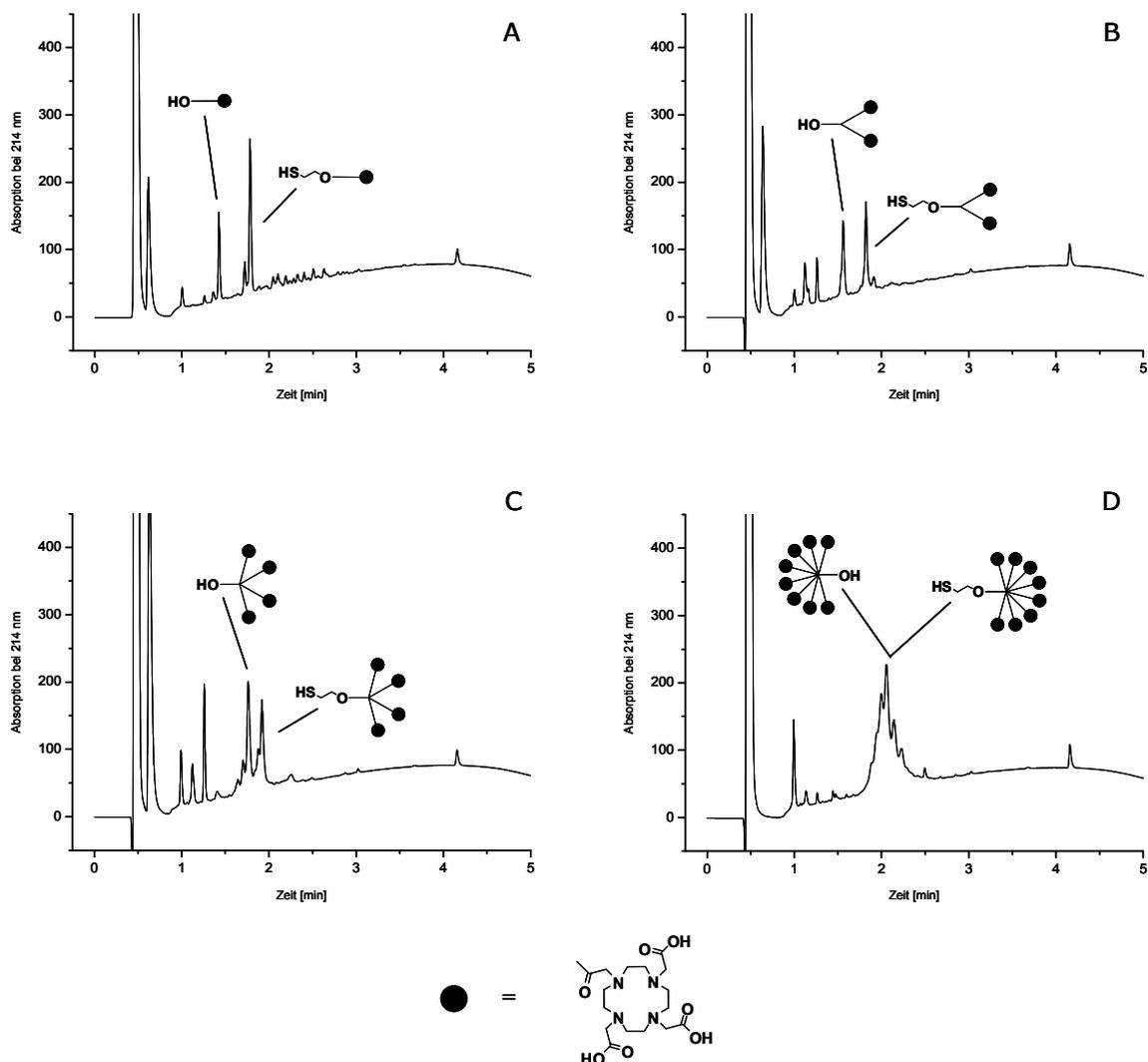


Abbildung 52: HPLC-Chromatogramme der Entschützungsreaktionen der 1 (A), 2 (B), 4 (C) und 8 (D) tris-*t*Bu-DOTAs enthaltenden Dendrimere mit konzentrierter TFA nach 6 Stunden Reaktionszeit.

Die DOTA-Aktivester DOTA-PFP-ester und DOTA-PNP-ester sollten aufgrund ihrer Eigenschaften ideal für Multimerisierungsreaktionen geeignet sein, da sie zum einen direkt und ohne zusätzliche Kopplungsagenzien, die eine nachfolgende Aufreinigung erschweren könnten, koppelbar sind und die entstehenden Produkte zum anderen nicht in einer nachfolgenden Reaktion entschützt werden müssen. Bei der Umsetzung der Aktivester mit den Dendrimern mit 1 bis 8 Aminfunktionen zeigte sich allerdings nur eine sehr geringe Reaktivität der Aktivester mit den zu derivatisierenden Dendrimern (Tabelle 9), was zu unvollständig derivatisierten Substanzen führte, selbst wenn die Aktivester bei langen Reaktionszeiten von bis zu 20 Stunden in Überschüssen von bis zu 5 Äquivalenten pro Aminfunktion eingesetzt wurden. Allerdings konnte beobachtet werden, dass der DOTA-PFP-ester eine deutlich höhere Reaktivität aufwies als der DOTA-PNP-ester.

Tris-benzyl-DOTA, das aufgrund seiner milden Entschützungsreaktion ebenfalls gut für eine Derivatisierung der Dendrimere geeignet sein sollte, wies ähnliche Kopplungseigenschaften wie die DOTA-Aktivester auf (Tabelle 9). Allerdings zeigte sich bei Reaktionen dieses Derivates, dass mit keinem dendritischen Reaktionspartner ein zweifach substituiertes Produkt erhalten werden konnte, was auf eine sterische Hinderung der Reaktion, wie sie auch schon bei großen Farbstoffmolekülen beobachtet werden konnte, schließen lässt.

Im Gegensatz hierzu wies Thiol-DOTA eine sehr hohe Reaktivität gegenüber den zuvor mit Maleimidohexansäure derivatisierten Dendrimern (**82**, **85**, **88**, **91**, **94**, **97**, **100** und **103**) auf. Zwar bedeutet die Umsetzung der Dendrimere mit Maleimidohexansäure einen zusätzlichen Reaktionsschritt, allerdings verliefen diese Reaktionen glatt und quantitativ (Abbildung 53).

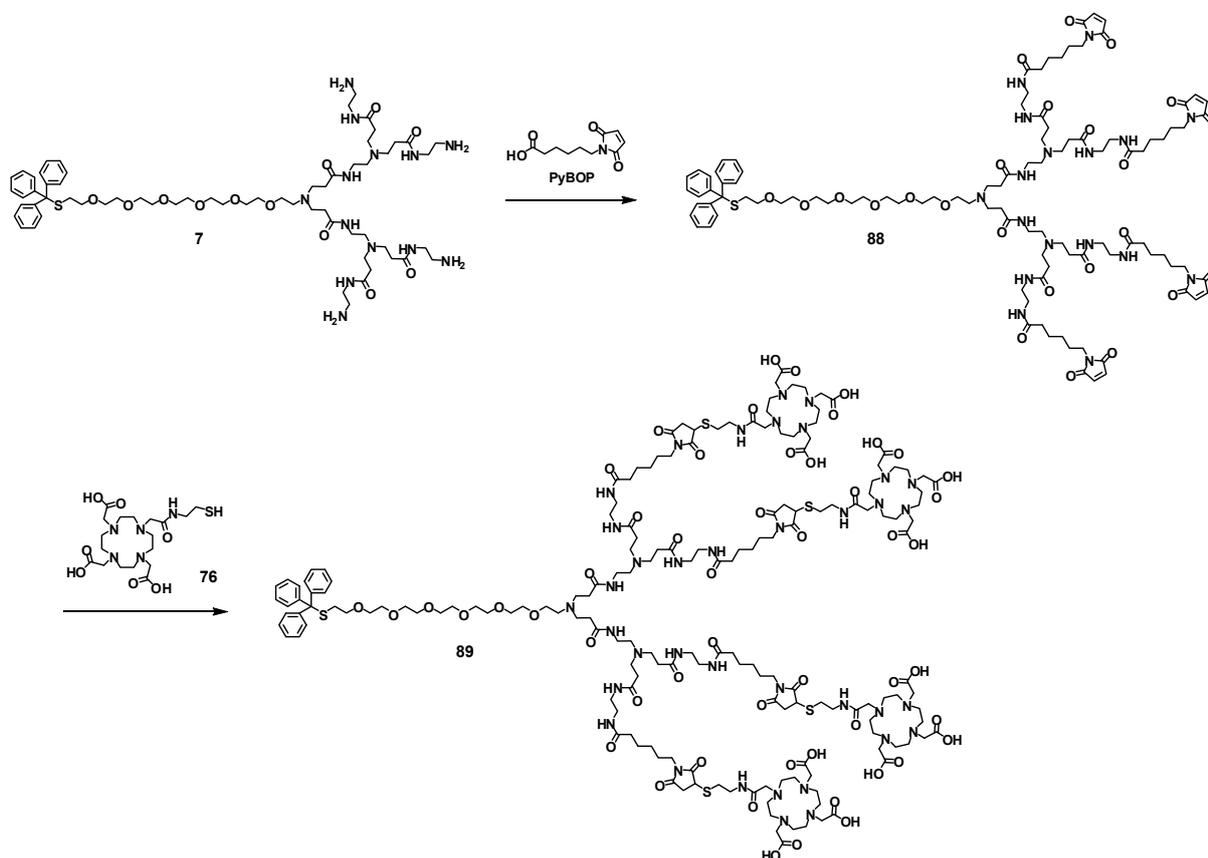


Abbildung 53: Reaktion der Dendrimere mit Maleimidohexansäure und Thiol-DOTA am Beispiel des G<sub>2</sub> Dendrimers mit 4 Aminfunktionen (**7**).

Die nachfolgende Reaktion mit Thiol-DOTA verlief ebenfalls quantitativ und führte zu sehr homogenen Produkten (**83**, **86**, **89**, **92**, **95**, **98**, **101** und **104**) (Tabelle 9). Darüber hinaus war die Reaktion innerhalb von 5 Minuten ohne die Bildung unerwünschter Nebenprodukte abgeschlossen und die erhaltenen Produkte mussten nicht mehr

entschützt werden. Dies lässt Thiol-DOTA als geeignetes Derivat auch zur Derivatisierung sehr empfindlicher Moleküle erscheinen.

Tabelle 9: Kopplungsausbeuten der verschiedenen DOTA-Derivate an Dendrimere mit unterschiedlicher Anzahl von Aminfunktionen.

DOTA-Derivat	Kopplungsausbeuten in % mit $n$ Aminfunktionen pro Dendrimer:							
	$n = 1$	$n = 2$	$n = 4$	$n = 8$	$n = 16$	$n = 32$	$n = 64$	$n = 128$
tris- <i>t</i> Bu-DOTA	100 (83) <sup>a)</sup>	100 (89) <sup>a)</sup>	100 (73) <sup>a)</sup>	95 (70) <sup>a)</sup>	-	-	-	-
Thiol-DOTA	100 (91) <sup>a)</sup>	100 (79) <sup>a)</sup>	100 (83) <sup>a)</sup>	100 (89) <sup>a)</sup>	100 (73) <sup>a)</sup>	100 (85) <sup>a)</sup>	100 (70) <sup>a)</sup>	100 (65) <sup>a)</sup>
Tris-benzyl-DOTA	60	0	0	0	-	-	-	-
Tris-allyl-DOTA	100 (79) <sup>a)</sup>	100 (76) <sup>a)</sup>	100 (84) <sup>a)</sup>	93	-	-	-	-
DOTA-PFP-ester	56	43	28	10	-	-	-	-
DOTA-PNP-ester	60	40	6	0	-	-	-	-

<sup>a)</sup> Ausbeuten nach Aufreinigung

Somit wurden die zuvor hergestellten PAMAM-Dendrimere zunächst mit Maleimidohexansäure derivatisiert und anschließend mit Thiol-DOTA zu den entsprechenden DOTA-Multimeren umgesetzt. Leider zeigte sich bei der Aufreinigung der Produkte mittels semipräparativer HPLC, dass diese mit zunehmender Größe auf der Chromatographiesäule festgehalten wurden und sich deswegen die Ausbeuten stark verminderten, obwohl die Reaktion der Maleinimide mit Thiol-DOTA quantitativ ablief.

Die Anzahl der Maleinimide pro Dendrimer wurde für die Systeme höherer Generation mittels Rücktitration, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, bestimmt, da massenspektrometrische Untersuchungen nur für die kleineren Dendrimere geeignet waren und NMR-spektroskopische Untersuchungen im Falle der größeren Dendrimer-Generationen keine aussagekräftigen Ergebnisse erbrachten. Durch die Quantifizierung der Maleinimide mittels Rücktitration ließ sich die quantitative Reaktion der Dendrimere mit Maleimidohexansäure nachweisen (Tabelle 10).

Nach der Derivatisierung der Maleinimide mit Thiol-DOTA wurde die Anzahl der aktiven Chelate pro Dendrimer für Generationen höherer Ordnung mittels Isotopenverdünnungstitration [Mier (2005)] bestimmt, da massenspektrometrische Untersuchungen nur für die kleineren Dendrimer-Generationen möglich waren, die NMR-Spektroskopie nur unzureichende Informationen ergab und eine Komplexierung mit

Gadolinium für eine Untersuchung mittels ICPMS Produkte ergab, die sich nicht mittels HPLC aufreinigen oder charakterisieren ließen, da sie auf den Chromatographiesäulen festgehalten wurden. Weiterhin wurde versucht, Indium- und Eisenkomplexe der Verbindungen für die ICPMS beziehungsweise für eine Quantifizierung der DOTAs über die Absorptionsspektren der Eisenkomplexe herzustellen. Dies scheiterte allerdings an der geringen Löslichkeit der gebildeten Komplexe. Dies verhielt sich ebenso für Europium- und Terbium-Komplexe der DOTA-Multimere, die über ihre Fluoreszenzspektren charakterisiert werden sollten, jedoch nur schwer aufzureinigen und anschließend nicht mehr löslich waren. Außerdem wurde versucht, mittels einer Komplexierung mit einem Überschuss von Zink und einem kommerziell erhältlichen Zink-Quantifizierungs-Kit (von Macherey-Nagel: Nanocolor Zink) die Menge überschüssig eingesetzten Metalls zu bestimmen und damit die Anzahl der aktiven Chelate indirekt zu bestimmen. Allerdings erwies sich dieses Verfahren als zu ungenau.

Für die Isotopenverdünnungstitration wurden Indium-Lösungen mit den Konzentrationen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $7.5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $2.5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $7.5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $2.5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  mol/mL in Natriumacetat-Puffer (0.4 M, pH 5) hergestellt und jeweils mit wenigen MBq  $^{111}\text{In}$  versetzt. Von den DOTA-Multimeren wurden Lösungen mit der Konzentration  $10^{-7}$  mol/mL (bezogen auf DOTA) in Natriumacetat-Puffer (0.4 M, pH 5) hergestellt. Gleiche Volumina der DOTA-Multimer- und Indium-Lösungen wurden gemischt und für 20 Minuten bei 60 °C reagieren gelassen. Anschließend wurden hierzu noch einige Microliter einer konzentrierten EDTA-Lösung zugegeben und nochmals 20 Minuten bei 60 °C reagieren gelassen. Die erhaltenen Lösungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie mit Natriumacetat-Puffer (0.4 M, pH 5) als mobiler Phase analysiert und das Verhältnis von freier ( $R_f \approx 0.8$ ) zu über DOTA-Multimere komplexierter ( $R_f = 0$ ) Radioaktivität wurde mittels  $\gamma$ -Counter bestimmt. Durch Auftragung des Anteils der komplexierten Aktivität gegen die Konzentration der Indium-Lösungen konnte die DOTA-Konzentration in der Ausgangslösung und somit die Anzahl der aktiven Chelate pro Dendrimer bestimmt werden (Abbildung 54 und Tabelle 10).

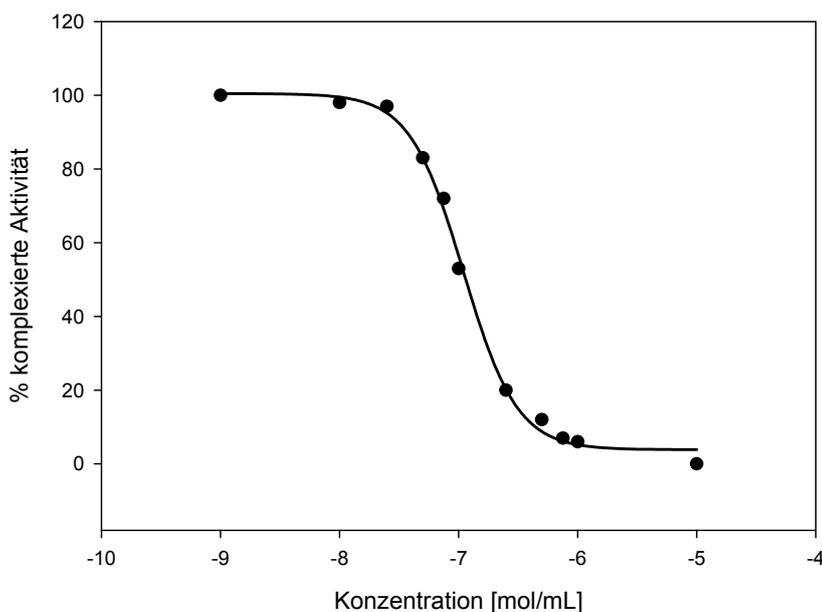


Abbildung 54: Typischer Graph zur Bestimmung der aktiven Chelate pro Dendrimer am Beispiel des DOTA<sub>16</sub>-STrityl.

Tabelle 10: Ergebnisse der Charakterisierung der Maleinimid- und DOTA-Multimere.

DOTA-Dendrimer (Anzahl der Aminfunktionen) / Molekulargewicht	Anzahl der Maleinimide der Vorstufe, bestimmt durch Massenspektrometrie / Rücktitration	Anzahl der aktiven Chelate bestimmt durch Massenspektrometrie / Isotopenverdünnungstitration
<b>83</b> (1) / 998 g/mol	1 / -	1 / -
<b>86</b> (2) / 1883 g/mol	2 / -	2 / -
<b>89</b> (4) / 3653 g/mol	4 / -	4 / -
<b>92</b> (8) / 7187 g/mol	8 / -	8 / 9.9 ± 2.8
<b>95</b> (16) / 14261 g/mol	16 / -	- / 17.2 ± 0.4
<b>98</b> (32) / 28405 g/mol	- / 33.1 ± 3.9	- / 32.2 ± 0.3
<b>101</b> (64) / 55733 g/mol	- / 62.9 ± 6.8	- / 69.1 ± 6.7
<b>104</b> (128) / 112309 g/mol	- / 120.2 ± 10.5	- / 155.1 ± 33.7

Mittels Derivatisierung der Dendrimere mit Maleimidohexansäure und Thiol-DOTA konnten somit DOTA-Multimere hoher Homogenität erhalten und auch charakterisiert werden. Die schnell ablaufenden Derivatisierungsreaktionen verliefen quantitativ und es war keine zusätzliche Entschützung der Produkte nötig. Abbildung 55 zeigt die Größenausschluss-Chromatogramme der hergestellten DOTA-Multimere:

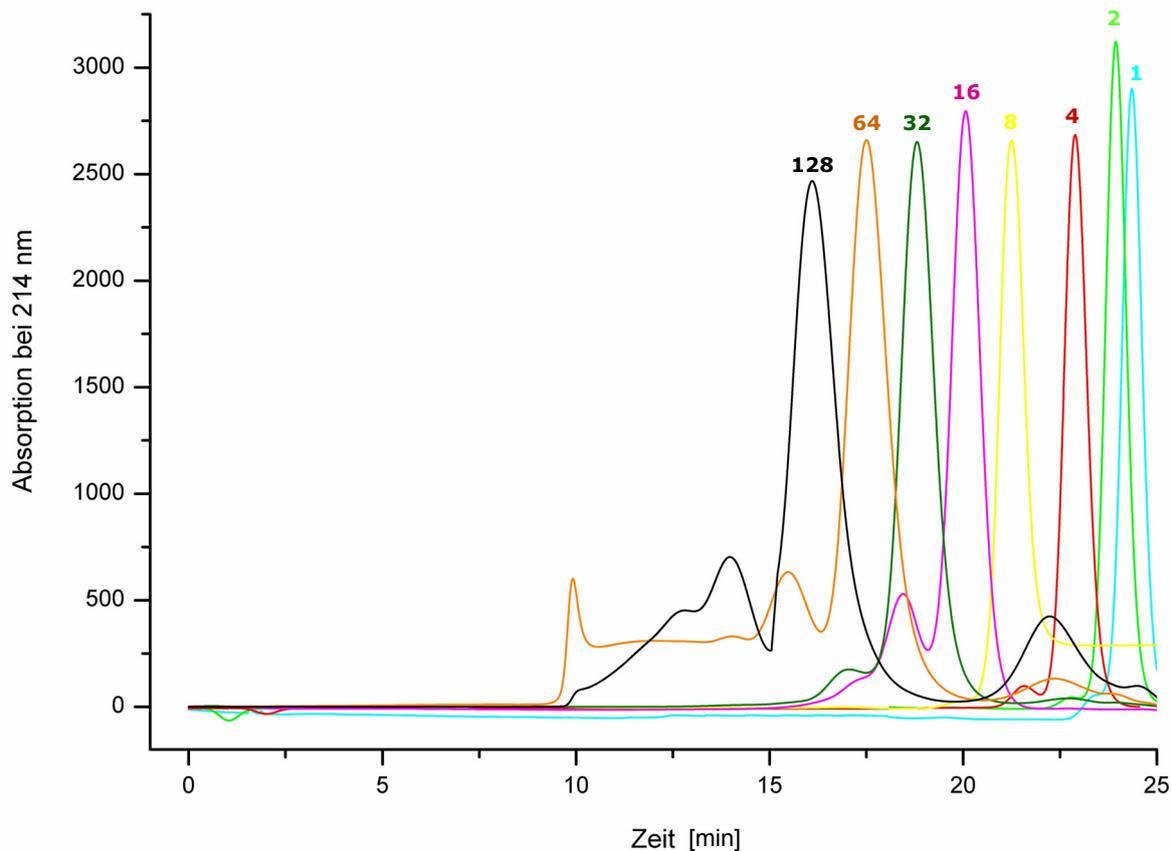


Abbildung 55: Größenausschluss-Chromatogramme der DOTA-Multimere DOTA<sub>1</sub>-SH (**84**) (türkis), DOTA<sub>2</sub>-SH (**87**) (hellgrün), DOTA<sub>4</sub>-SH (**90**) (rot), DOTA<sub>8</sub>-SH (**93**) (gelb), DOTA<sub>16</sub>-SH (**96**) (violett), DOTA<sub>32</sub>-SH (**99**) (dunkelgrün), DOTA<sub>64</sub>-SH (**102**) (orange) und DOTA<sub>128</sub>-SH (**105**) (schwarz).

### 3.7 Antikörper-Derivatisierungen mit DOTA-Multimeren

Um den Einfluss der Konjugation der DOTA-Multimere auf die biologische Aktivität von Antikörpern zu untersuchen, wurde der Modellantikörper hMAb425 wie im Abschnitt 3.4 beschrieben zunächst mit Sulfo-SMCC derivatisiert und anschließend mit den DOTA-Multimeren umgesetzt.

Für die Untersuchung des Einflusses der Anzahl und Größe der dendritischen Strukturen auf Immunreaktivität des Antikörpers wurden verschiedene Mengen von Maleinimiden eingeführt und die so derivatisierten Antikörper mit den verschiedenen großen DOTA-Multimeren umgesetzt. Hierfür wurden Lösungen des Antikörpers zunächst mit einem Überschuss von 7, 12, 22 oder 45 Äquivalenten Sulfo-SMCC für eine Stunde bei pH 7.2 reagieren gelassen und anschließend die derivatisierten Antikörper mittels Größenausschluss-Gelchromatographie aufgereinigt und in hohen Ausbeuten von 95-98% erhalten. Die Protein-Konzentrationen der erhaltenen Antikörper-Lösungen wurden mittels Bradford Assay bestimmt und die Anzahl der Maleinimide pro Antikörper wurde mittels Rücktitration mit MESNA wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben

ermittelt. Die Zahl der Maleinimide pro Antikörper wurde dabei bei 7, 12, 22 und 45 Äquivalenten Sulfo-SMCC zu 1.7, 2.8, 5.3 und 10.0 bestimmt. Die Maleinimid-derivatisierten Antikörper wurden dann mit den verschiedenen DOTA-Multimeren für 5 Minuten bei pH 7.2 umgesetzt (Abbildung 56 und Tabelle 11) und die so hergestellten Antikörper-Dendrimer-Konjugate von Dr. G. Moldenhauer (Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung für Tumorimmunologie) auf ihre Immunreaktivität hin untersucht. Für diese Untersuchungen wurde die den EGF-Rezeptor überexprimierende Adenokarzinomzelllinie HT29 verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in Tabelle 12.

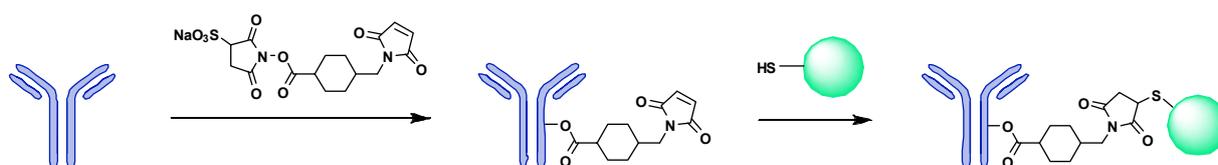


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Antikörper-Derivatisierung mit Sulfo-SMCC und der sich anschließenden Umsetzung mit den dendritischen Strukturen.

Tabelle 11: Zusammenstellung der Derivatisierungsbedingungen des Antikörpers mit Sulfo-SMCC und den DOTA-Multimeren.

Äquivalente Sulfo-SMCC pro Antikörper	Anzahl der in den Antikörper eingeführten Maleinimide	Überschuss der DOTA-Multimere pro Antikörper
7 Äquivalente	1.7	10 Äquivalente
12 Äquivalente	2.8	12.5 Äquivalente
22 Äquivalente	5.3	15 Äquivalente
45 Äquivalente	10.0	25 Äquivalente

Die Anzahl der DOTA-Multimere pro Antikörper wurde bestimmt, indem in einer weiteren Umsetzung die DOTA-Dendrimere zunächst mit <sup>111</sup>In in Natriumacetat-Puffer (0.4 M, pH 5) bei 60 °C für 20 Minuten markiert wurden, bevor sie unter gleichen Bedingungen wie in den vorangegangenen Versuchen mit den Maleinimid-derivatisierten Antikörpern umgesetzt wurden. Die entstandenen Antikörper-Dendrimer-Konjugate wurden dann mittels Größenausschluss-Chromatographie untersucht und der Anteil an gekoppeltem Dendrimer wurde ermittelt, indem die Radioaktivitätsmengen in den Protein- und den Dendrimer-Fractionen bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in Tabelle 12 und Abbildung 57.

Tabelle 12: Ergebnisse der Derivatisierungsreaktionen der Antikörper mit den DOTA-Multimeren und der Untersuchung der Immunreaktivität der Antikörper-Multimer-Konjugate.

<b>Antikörper-Dendrimer-Konjugat</b>	<b>Erhaltene Immunreaktivität (Anzahl der Dendrimere pro Antikörper)</b>			
	1.7 Maleinimide pro Antikörper	2.8 Maleinimide pro Antikörper	5.3 Maleinimide pro Antikörper	10.0 Maleinimide pro Antikörper
hMAb425-DOTA <sub>1</sub>	60.3% (0.4)	66.3% (0.5)	35.7% (1.0)	30.0% (1.9)
hMAb425-DOTA <sub>2</sub>	68.4% (0.5)	64.3% (0.6)	31.3% (0.9)	24.4% (1.9)
hMAb425-DOTA <sub>4</sub>	66.2% (0.5)	64.7% (0.6)	28.5% (1.1)	17.6% (2.1)
hMAb425-DOTA <sub>8</sub>	57.8% (1.0)	55.3% (1.2)	26.7% (2.7)	13.0% (6.9)
hMAb425-DOTA <sub>16</sub>	63.2% (0.8)	49.0% (1.5)	21.6% (2.5)	12.6% (5.8)
hMAb425-DOTA <sub>32</sub>	60.6% (0.8)	40.8% (1.1)	27.9% (1.5)	14.2% (2.7)
hMAb425-DOTA <sub>64</sub>	58.2% (1.7)	46.6% (2.6)	23.3% (3.6)	8.4% (7.3)
hMAb425-DOTA <sub>128</sub>	63.9% (1.0)	56.1% (1.9)	28.5% (2.5)	16.4% (4.4)
Mittlere erhaltene Immunreaktivität	62.3% (0.8)	55.4% (1.3)	27.9% (2.0)	17.1% (4.1)

Die Ergebnisse in Tabelle 12 und Abbildung 57 zeigen, dass die Größe des angekoppelten DOTA-Multimers die Immunreaktivität des Antikörpers über einen weiten

Molekulargewichtsbereich nicht wesentlich beeinflusst, wie an der mittleren erhaltenen Immunreaktivität der mit verschiedenen großen Dendrimern, aber gleichbleibender Anzahl von Derivatisierungsstellen veränderten Antikörper deutlich zu sehen ist. Im Gegensatz hierzu spielt die Anzahl der Derivatisierungsstellen pro Antikörper eine entscheidende Rolle. So sind bei 1.7 Derivatisierungsstellen pro Antikörper im Mittel noch 62.3% der Immunreaktivität erhalten, bei 2.8 Derivatisierungsstellen 55.4%, bei 5.3 Derivatisierungsstellen 27.9% und bei 10.0 Derivatisierungsstellen nur noch 17.1%.

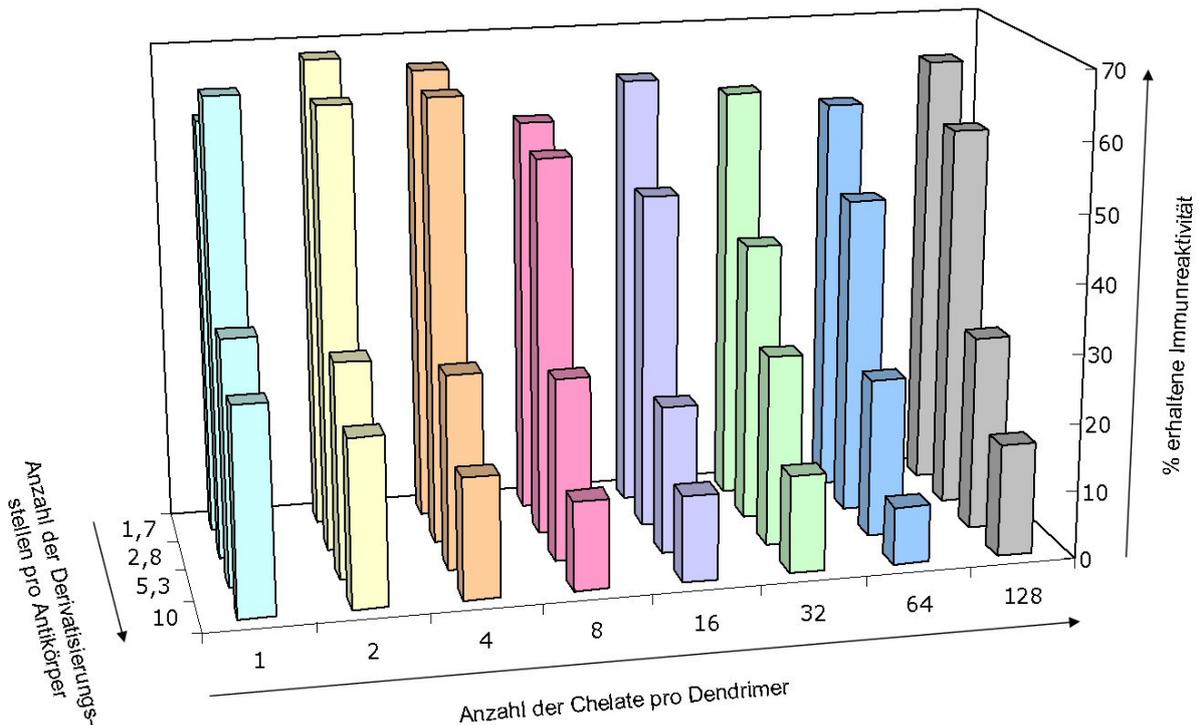


Abbildung 57: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Bestimmung der Immunreaktivitäten der hergestellten Antikörper-Dendrimer-Konjugate.

So zeigt beispielsweise ein mit  $1.9 \times 128$  (= 243) DOTAs derivatisierter Antikörper mit 2.8 Derivatisierungsstellen eine deutlich höhere Immunreaktivität als ein mit  $1.9 \times 1$  DOTA modifizierter Antikörper mit 10.0 Derivatisierungsstellen, was darauf schließen lässt, dass schon geringste strukturelle Änderungen der Antikörperstruktur einen Immunreaktivitätsverlust verursachen können, dass allerdings die Größe des eingeführten Systems keinen Einfluss auf die Immunreaktivität des Konjugates hat.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Derivatisierung von Antikörpern mit den hier dargestellten DOTA-Multimeren leicht möglich ist und dass die Größe des dabei eingesetzten DOTA-Multimers über einen weiten Molekulargewichtsbereich nur einen geringen Einfluss auf die Immunreaktivität des Konjugates hat.

## 4 Experimenteller Teil

### Allgemeines

Alle kommerziell erhältlichen Chemikalien waren von *p.a.*-Qualität und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Das verwendete analytische HPLC-System war ein Agilent 1100<sup>®</sup> System in Kombination mit einer Chromolith<sup>®</sup> Performance (RP-18e, 100-4.6 mm, Merck, Deutschland) Säule. Semipräparative HPLC-Aufreinigungen wurden mittels eines Gyncotech P-580 Systems (Germering, Deutschland) zusammen mit einem variablen SPD 6-A UV Detektor und einem C-R5A Integrator (beide Shimadzu, Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Die verwendete semipräparative HPLC-Säule war eine Chromolith<sup>®</sup> (RP-18e, 100-10 mm, Merck, Deutschland).

Die MALDI-TOF Spektroskopie wurde mit einem Kratos Analytical Compact Maldi III System oder einem Bruker-Daltonik Reflex II time-of-flight instrument (Bremen, Germany) durchgeführt. ESI Spektren wurden mittels eines Triple-Quadrupole-mass spectrometer TSQ 7000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen) erhalten.

NMR spektroskopische Untersuchungen wurden entweder mit einem Varian Mercury Plus 300 MHz oder einem Varian NMR System 500 MHz durchgeführt.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mittels Polygram<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> TLC-plates (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt.

Größenausschluss-Chromatographie wurde entweder mit NAP-5 Säulen (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) oder mittels einer Superdex<sup>™</sup> 200 10/30 GL Säule (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden) ausgeführt.

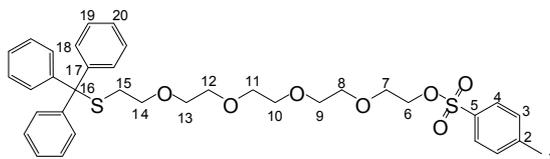
Die Fluoreszenzspektren wurden mittels eines AMINCO-Bowman<sup>®</sup> Series 2 Luminescence Spectrometer (Thermo Electron Corporation) und Absorptionsspektren mittels eines Perkin Elmer 554 UV/VIS Spectrophotometer erhalten.

### 4.1 Synthese der Dendrimere

#### S-Trityl-mercaptoethyl-tetraethylenglycol-tosylat:

Zu einer Lösung von Tetraethylenglycol-bistosylat (22 g, 45 mmol), S-Trityl-mercaptoethanol (10 g, 31 mmol) und TBAB (1.5 g, 4.5 mmol) in Toluol (200 mL) wurde in mehreren Portionen pulverförmiges KOH (~3 g) gegeben. Nach zwei Stunden Reaktionszeit wurde filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das zurückbleibende Öl wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit n-Hexan:Aceton 2:1 als Eluent

aufgereinigt ( $R_f = 0.4$ ). Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten (11 g, 17 mmol, 55%).



$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.80-7.75 (m, 2H, H-4); 7.49-7.44 (m, 2H, H-3); 7.33-7.20 (m, 15, H-18 – H-20); 4.12-4.08 (m, 2H, H-6); 3.57-3.53 (m, 2H, H-7); 3.45 (bs, 4H, H-10+H-11); 3.42 (bs, 4H, H-8+H-9); 3.35-3.26 (m, 4H, H-12+H-13); 3.23 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-14); 2.40 (s, 3H, H-1); 2.28 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-15).

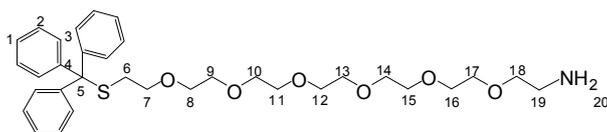
$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

150.37 C-2; 138.09 C-5; 135.64 C-3; 134.67 C-19; 133.53 C-4; 133.12 C-18; 132.25 C-17; 75.94, 75.48, 75.31, 75.28, 75.20, 75.12, 75.06, 74.13, 73.44, 71.63 C-6 – C-14; 36.97 C-15; 26.62 C-1.

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 650.2 (651.2).

### S-Trityl-mercaptoethyl-pentaethylglycol-ethylamin ( $\text{G}_0$ PAMAM) (3):

Zu einer Lösung von S-Trityl-mercaptoethyl-tetraethylglycol-tosylat (28.5 g, 59 mmol) und 2-(2-aminoethoxy)ethanol (31 g, 296 mmol) in Toluol (100 mL) und DMF (10 mL) wurde in mehreren Portionen pulverförmiges KOH ( $\sim 5$  g) gegeben. Nach 5 Stunden Reaktion unter Rühren wurde das Gemisch filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das zurückbleibende Öl wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CHCl}_3$ :Ethanol 5:2 als Eluent aufgereinigt ( $R_f = 0.37$ ). Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten (15.5 g, 27 mmol, 45%).



$^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.32 (d, 12H,  $J^3=4,4$ ; H-2,3); 7.24 (m, 3H, H-1); 3.49-3.32 (m, 24H, H-8 - H-18+H-20); 3.22 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.69 (t, 2H,  $J^3=5.7$ , H-19); 2.27 (t, 2H,  $J^3=6.5$ , H-6).

$^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

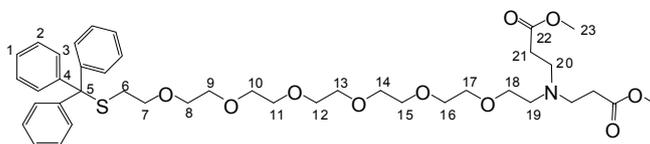
145.13 C-4; 129.76 C-2; 128.66 C-3; 127.35 C-1; 70.47, 70.44, 70.31, 70.29, 70.19, 69.38, 69.24, 66.73 C-7 – C-18; 41.49 C-19; 32.08 C-6.

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 583.8 (584.3).

### $\text{G}_{0.5}$ PAMAM (4):

Eine Lösung des  $\text{G}_0$  Dendrimers (14.5 g, 25 mmol) in Methanol (20 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (450 mL, 5.0 mol) gegeben und drei Tage bei Raumtemperatur

reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit n-Hexan:Aceton 4:5 als Eluent aufgereinigt ( $R_f = 0.55$ ). Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten (12 g, 16 mmol, 64%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.33-7.30 (m, 12H, H-2+H-3); 7.27-7.21 (m, 3H, H-1); 3.55 (s, 6H, H-23); 3.48-3.31 (m, 22H, H-8 – H18); 3.22 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.69 (t, 4H,  $J^3=6.9$ , H-20); 2.54 (t, 2H,  $J^3=6.1$ , H-19); 2.38 (t, 4H,  $J^3=6.9$ , H-21); 2.27 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

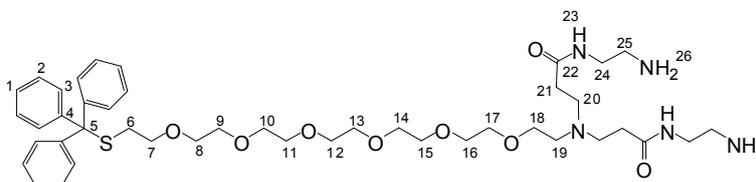
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

172.20 C-22; 145.10 C-4; 129.75 C-2; 128.68 C-3; 127.34 C-1; 70.48, 70.45, 70.31, 70.16, 69.38, 69.17 C-7 – C-18; 52.17 C-20; 50.97 C-23; 36.50 C-19; 33.14 C-21; 32.12 C-6.

ESI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 756.4 (756.4).

### G<sub>1</sub> PAMAM (5):

Eine Lösung des G<sub>0.5</sub> Dendrimers (13 g, 17.2 mmol) in Methanol (20 mL) wurde tropfenweise zu gut gekühltem Ethylendiamin (918 mL, 13.8 mol) über einen Zeitraum von einer halben Stunde zugetropft und anschließend für 5 Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Das Ethylendiamin wurde am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Das erhaltene Produkt war rein genug für weitere Umsetzungen und wurde als gelbes Öl erhalten (13.9 g, 17.2 mmol, 100%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.31 (m, 12H, H-2+H-3); 7.24 (m, 3H, H-1); 3.47-3.33 (m, 24H, H-7 – H-18); 3.21 (t, 4H,  $J^3=6.7$ , H-20); 3.03 (q, 4H,  $J^3=6.1$ , H-19); 2.64 (t, 4H,  $J^3=7.2$ , H-23); 2.54 (m, 10H, H-21, H-23, H-26); 2.27 (t, 2H,  $J^3=6.7$ , H-6); 2.17 (t, 4H,  $J^3=7.2$ , H-25).

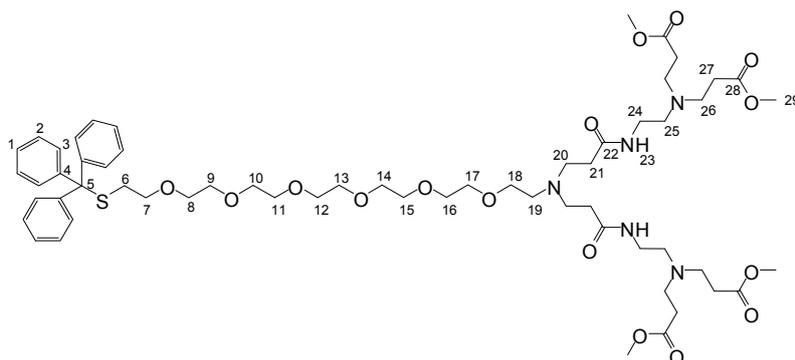
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

172.30 C-22; 144.34 C-4; 129.06 C-2; 127.89 C-3; 126.59 C-1; 69.69, 69.66, 69.64, 69.53, 69.50, 69.37, 68.60, 68.44, 65.91 C-7 – C-18; 52.20 C-20; 48.80 C-24; 48.56 C-25; 36.51 C-19; 33.13 C-21; 31.25 C-6.

MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 811.8 (812.5).

### G<sub>1.5</sub> PAMAM (6):

Eine Lösung des G<sub>1</sub> Dendrimers (12.5 g, 15.4 mmol) in Methanol (30 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (280 mL, 3.1 mol) gegeben und für drei Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Ethanol:Aceton 5:6 als Eluent ( $R_f = 0.4$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde als hellgelbes Öl erhalten (6.5 g, 5.6 mmol, 37%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

7.33-7.31 (m, 12H, H-2+H-3); 7.26-7.21 (m, 3H, H-1); 3.56 (s, 12H, H-29); 3.48-3.39 (m, 22H, H-8 – H-18); 3.21 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 3.07-3.01 (q, 4H,  $J^3=6.3$ , H-24); 2.69-2.62 (m, 16H, H-20+H-25+H-26); 2.54 (t, 2H,  $J^3=6.1$ , H-19); 2.43-2.36 (m, 12H, H-21+H-27); 2.27 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

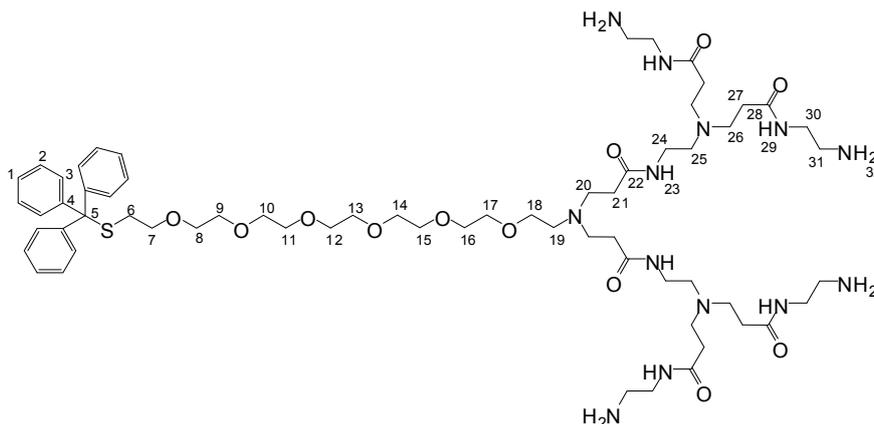
<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

172.35 C-22; 171.02 C-28; 144.37 C-4; 129.08 C-2; 127.91 C-3; 126.61 C-1; 69.70, 69.68, 69.65, 69.59, 69.52, 69.40, 68.61, 68.45, 65.95 C-7 – C-18; 55.93 C-25; 52.21 C-20; 51.09 C-29; 49.85 C-26; 48.80 C-24; 36.53 C-19; 33.16 C-21; 31.93 C-27; 31.28 C-6.

ESI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1156.8 (1156.6).

### G<sub>2</sub> PAMAM (7):

Eine Lösung des G<sub>1.5</sub> Dendrimers (6.5 g, 5.6 mmol) in Methanol (20 mL) wurde über eine halbe Stunde tropfenweise zu gut gekühltem Ethylendiamin (600 mL, 9 mol) gegeben und für 5 Tage bei 4 °C reagieren gelassen. Anschließend wurde das Ethylendiamin am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Das erhaltene Produkt war rein genug für weitere Umsetzungen und wurde als gelbes Öl erhalten (6.7 g, 5.3 mmol, 95%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.33-7.31 (m, 12H, H-2+3); 7.26-7.21 (m, 3H, H-1); 3.47-3.39 (m, 22H, H-8 – H-18); 3.34-3.31 (m, 2H, H-7); 3.21 (t, 2H,  $J^3=6.7$ , H-23); 3.10-3.00 (m, 12H, H-21+27); 2.70-2.50 (m, 36H, H-20+26+29+30+32); 2.41 (t, 4H,  $J^3=6.7$ , H-24); 2.27 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 2.18 (t, 12H,  $J^3=6.9$ , H-25+31).

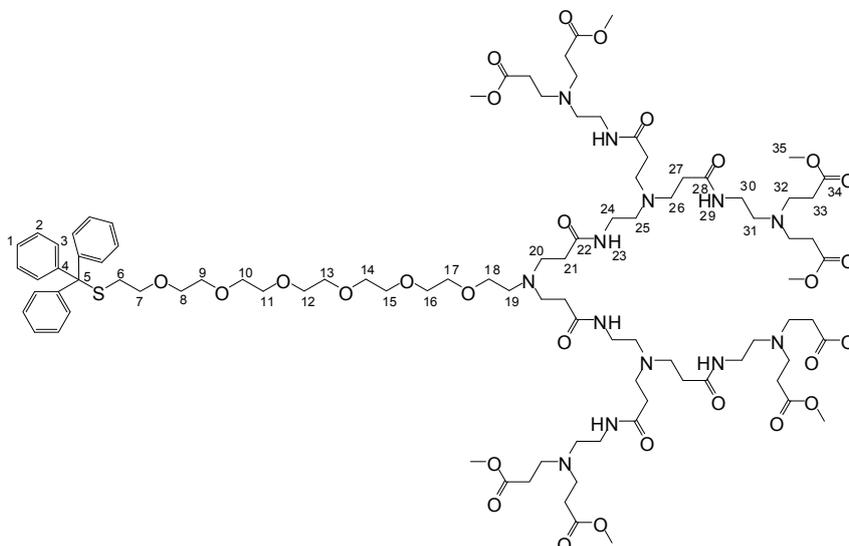
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

171.33 C-27; 171.08 C-22; 144.36 C-4; 128.98 C-2; 127.89 C-3; 126.60 C-1; 69.67, 69.58, 69.52, 69.39, 68.65, 68.45 C-7 – C-18; 52.17 C-5; 49.89 C-30; 49.60 C-31; 44.35 C-26; 42.05 C-19; 41.18 C-25; 36.79 C-21+27; 33.23 C-6.

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1267.6 (1268.8).

### G<sub>2.5</sub> PAMAM (8):

Eine Lösung des G<sub>2</sub> Dendrimers (6.7 g, 5.3 mmol) in Methanol (30 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (95 mL, 1.1 mol) gegeben und für 5 Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Ethanol:Aceton 5:2, gefolgt von 20% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> als Eluent ( $R_f = 0.2$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde als oranges Öl erhalten (3.1 g, 1.6 mmol, 30%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.33-7.30 (m, 12H, H-2+H-3); 7.27-7.19 (m, 3H, H-1); 3.65 (s, 24H, H-33); 3.60-3.24 (m, 30H, H-7 – H18+H-24+H-29); 2.80 (bt, 8H,  $J^3=6.7$ , H-26); 2.73 (t, 16H,  $J^3=6.7$ , H-31); 2.61-2.51 (m, 16H, H-20+H-25+H-30); 2.43-2.33 (m, 28H, H-21+H-27+H-32); 2.26 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

173.01 C-22+C-28; 172.26 C-33; 144.78 C-4; 129.54 C-2; 127.80 C-3; 126.54 C-1; 70.50, 70.46, 70.37, 70.26, 70.08, 69.54 C-7 – C-18; 53.79 C-25; 52.90 C-30; 52.53 C-20; 51.60 C-34; 50.16 C-31; 49.86 C-26; 49.21 C-24+C-29; 37.41 C-32; 37.15 C-19; 33.74 C-21; 32.64 C-27; 31.28 C-6.

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1957.1 (1957.1).

### **G<sub>3</sub> PAMAM (9):**

Eine Lösung des G<sub>2.5</sub> Dendrimers (3.1 g, 1.6 mmol) in Methanol (15 mL) wurde über einen Zeitraum von einer halben Stunde tropfenweise zu gut gekühltem Ethylendiamin (340 mL, 5.1 mol) gegeben und für 9 Tage bei 4 °C reagieren gelassen. Anschließend wurde das Ethylendiamin am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Das erhaltene Produkt war rein genug für weitere Umsetzungen und wurde als gelbes Öl erhalten (3.5 g, 1.6 mmol, 99%).

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 2182.2 (2181.4).

### **G<sub>3.5</sub> PAMAM (10):**

Eine Lösung des G<sub>3</sub> Dendrimers (3.5 g, 1.6 mmol) in Methanol (15 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (462 mL, 5.1 mol) gegeben und für 7 Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit 55% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA) als Eluent ( $R_f = 0.25$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als oranges Öl erhalten (4.8 g, 1.3 mmol, 83%).

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 3559.7 (3558.0).

### **G<sub>4</sub> PAMAM (11):**

Eine Lösung des G<sub>3.5</sub> Dendrimers (4.8 g, 1.3 mmol) in Methanol (15 mL) wurde über einen Zeitraum von einer halben Stunde tropfenweise zu gut gekühltem Ethylendiamin (570 mL, 8.5 mol) gegeben und es wurde 13 Tage bei 4 °C reagieren gelassen. Anschließend wurde das Ethylendiamin am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Das erhaltene Produkt war rein genug für weitere Umsetzungen und wurde als gelbes Öl erhalten (5.2 g, 1.3 mmol, 97%).

ESI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 4007.4 (4006.7).

**G<sub>4,5</sub> PAMAM (12):**

Eine Lösung des G<sub>4</sub> Dendrimers (5.5 g, 1.1 mmol) in Methanol (15 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (1.3 L, 14.4 mol) gegeben und für 17 Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit MeCN (+ 0.1% TFA), gefolgt von 75% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA) und 50% MeCN in Wasser (+ 0.1% TFA) als Eluent ( $R_f = 0.1$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als dunkelgelbes Öl erhalten (3.8 g, 568  $\mu$ mol, 52%).

**G<sub>5</sub> PAMAM (13):**

Eine Lösung des G<sub>4,5</sub> Dendrimers (3.8 g, 568  $\mu$ mol) in Methanol (15 mL) wurde über einen Zeitraum von einer halben Stunde zu gut gekühltem Ethylendiamin (485 mL, 7.3 mol) gegeben und 16 Tage bei 4 °C reagieren gelassen. Anschließend wurde das Ethylendiamin am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Das erhaltene Produkt war rein genug für weitere Umsetzungen und wurde als dunkelgelbes Öl erhalten (4.0 g, 522  $\mu$ mol, 92%).

**G<sub>5,5</sub> PAMAM (14):**

Eine Lösung des G<sub>5</sub> Dendrimers (4 g, 522  $\mu$ mol) in Methanol (15 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (602 mL, 6.7 mol) gegeben und 24 Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.6$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als oranges Öl erhalten (3.2 g, 263  $\mu$ mol, 50%).

**G<sub>6</sub> PAMAM (15):**

Eine Lösung des G<sub>5,5</sub> Dendrimers (2.6 g, 214  $\mu$ mol) in Methanol (15 mL) wurde über einen Zeitraum von einer halben Stunde zu gut gekühltem Ethylendiamin (365 mL, 5.5 mol) zugegeben und 34 Tage bei 4 °C reagieren gelassen. Anschließend wurde das Ethylendiamin am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.1$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als oranges Öl erhalten (2.1 g, 150  $\mu$ mol, 70%).

**G<sub>6,5</sub> PAMAM (16):**

Eine Lösung des G<sub>6</sub> Dendrimers (2 g, 143  $\mu$ mol) in Methanol (50 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (330 mL, 3.66 mol) gegeben und 31 Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 10-50% MeCN + 0.1% TFA in 6 min als

Gradient ( $R_t = 3.9$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als oranges Öl erhalten (2.5 g, 100  $\mu$ mol, 70%).

#### **G<sub>7</sub> PAMAM (17):**

Eine Lösung des G<sub>6,5</sub> Dendrimers (2.5 g, 100  $\mu$ mol) in Methanol (50 mL) wurde über einen Zeitraum von einer halben Stunde tropfenweise zu gut gekühltem Ethylendiamin (341 mL, 5.12 mol) gegeben und für 41 Tage bei 4 °C reagieren gelassen. Anschließend wurde das Ethylendiamin am Rotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 1.9$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als oranges Öl erhalten (2.1 g, 73  $\mu$ mol, 73%).

## **4.2 Fluoreszenzfarbstoff-Synthesen und Synthese der Farbstoff-Dendrimere**

#### **Rhodamin 101-carbamido-hexansäure (18):**

2-Chlor-tritylharz (Belegung: 1.14 mmol/g, 224 mg, 255  $\mu$ mol) wurde für eine Stunde in DCM quellen gelassen und anschließend mit einer Lösung von Fmoc-6-aminohexansäure (180 mg, 511  $\mu$ mol) und DIPEA (150  $\mu$ L) in DMF (2 mL) versetzt und für eine Stunde reagieren gelassen. Das Harz wurde gewaschen, die Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin:DMF 1:1 abgespalten, das Harz nochmals gewaschen und anschließend mit einer für 2 Minuten vorinkubierten Lösung von Rhodamin 101 (501 mg, 1.01 mmol), PyBOP (517 mg, 995  $\mu$ mol) und DIPEA (200  $\mu$ L) versetzt. Nach 2 Stunden Reaktionszeit wurde das Harz gewaschen und das Produkt mit 5% TFA in DCM innerhalb von 10 Minuten vom Harz gespalten. Das Produkt wurde sauber als roter Feststoff erhalten (62 mg, 103  $\mu$ mol, 40%).

MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 603.3 (605.3).

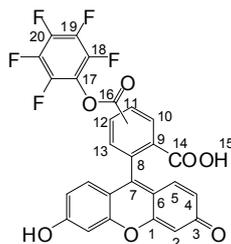
#### **6-[Fluorescein-5(6)-carbamido]-hexansäure (19):**

Zu einer Lösung von 5(6)-Carboxyfluorescein (1 g, 2.66 mmol) in DMF (5 mL) wurden eine Lösung von HBTU (958 mg, 2.53 mmol) in DMF (1 mL) und DIPEA (500  $\mu$ L) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Hierzu wurde 6-Aminohexansäure (3.5 g, 27 mmol) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Die überschüssige 6-Aminohexansäure und das Lösungsmittel wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit CHCl<sub>3</sub>:Ethanol 5:2 als Eluent aufgereinigt. Das Produkt wurde als dunkelgelbes Öl erhalten (1.1 g, 2.25 mmol, 85%).

MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 490.5 (490.1).

### 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylester (20):

Zu einer Lösung von 5(6)-Carboxyfluorescein (1 g, 2.66 mmol) und Pentafluorphenol (538 mg, 2.93 mmol) in DMF (10 mL) wurde eine Lösung von DCC (603 mg, 2.93 mmol) in Pyridin (5 mL) über einen Zeitraum von 10 Minuten zugetropft und anschließend für eine Stunde reagieren gelassen. Nach Entfernen des Harnstoffes und des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Wasser:MeCN 1:1 + 0.1% TFA als Eluent ( $R_f = 0.45+0.55$  (Isomere)) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als oranges Pulver erhalten (977 mg, 1.8 mmol, 68%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

10.05 (bs, 0.7H, H-15); 8.64-8.63 (m, 0.5H, H-10); 8.49 (dd, 0.5H,  $J^3=8.1$ ,  $J^4=1.6$ , H-12); 8.44 (dd, 0.3H,  $J^3=8.0$ ,  $J^4=1.4$ , H-11); 8.23 (d, 0.5H,  $J^3=8.1$ , H-12); 7.98 (m, 0.3H, H-11); 7.54 (d, 0.5H,  $J^3=8.1$ Hz, H-13); 6.70-6.65 (m, 4H, H-4+H-5); 6.58-6.50 (m, 2H, H-2).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

168.53 C-3; 168.50 C-16; 167.91 C-14; 166.69 C-1; 161.79 C-3; 160.50 C-18; 160.36 C-18; 158.70 C-1; 156.73 C-20; 153.35 C-8; 152.57 C-19; 152.52 C-19; 152.49 C-7; 137.96 C-12; 137.58 C-5; 133.53 C-11; 131.54 C-4; 130.09 C-10; 129.88 C-10; 129.84 C-12; 128.61 C-9; 128.17 C-6; 127.74 C-11; 127.48 C-6; 126.20 C-5; 125.26 C-13; 125.09 C-13; 113.37 C-4; 109.66 C-17; 102.96 C-2.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 542.5 (543.1).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 543.1 (543.1).

### NIR 820 Amin (22):

Zu einer Lösung von NIR 820 chlorid (250 mg, 310  $\mu\text{mol}$ ) in Methanol (30 mL) wurde eine Lösung von 4-Mercapto-anilin (230 mg, 1.84 mmol) in DMF (1.5 mL) gegeben und für 30 Minuten reagieren gelassen. Der Methanol wurde entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  zu Methanol (100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  nach 25%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als bläulich-grüner Feststoff erhalten (251 mg, 278  $\mu\text{mol}$ , 90%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 904.0 (904.3).

**NIR 820-carbamido-hexansäure (24):**

Zu einer Lösung von NIR 820 chlorid (21 mg, 25.8  $\mu\text{mol}$ ) in DMF:DMSO 1:1 (2 mL) wurden 6-Aminohexansäure (3.5 mg, 26.7  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (10  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für 4 Stunden reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit einem Gradienten von 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 Min aufgereinigt ( $R_f = 3.7$ ). Das Produkt wurde nach Lyophilisation als grün-blauer Feststoff erhalten (2.9 mg, 3.1  $\mu\text{mol}$ , 12%).

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1075.9 (1077.4).

**NIR 820 Thiol I (25):**

Zu einer Lösung von NIR 820 amin (55 mg, 61  $\mu\text{mol}$ ) in PP (0.05 M, pH 8, 1 mL) wurde eine Lösung von 2-Iminothiolan-hydrochlorid (75 mg, 543  $\mu\text{mol}$ ) in Wasser (200  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für 20 Minuten reagieren gelassen. Anschließend wurde mittels semipräparativer HPLC mit einem Gradienten von 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 Min aufgereinigt ( $R_f = 4.8$ ). Das Produkt wurde nach Lyophilisation als grüner Feststoff erhalten (29 mg, 29  $\mu\text{mol}$ , 48%).

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1005.6 (1006.3).

**NIR 820 Thiol (II) (26):**

Zu einer Lösung von NIR 820 amin (20 mg, 22  $\mu\text{mol}$ ) in PP (0.05 M, pH 7.5, 800  $\mu\text{L}$ ) wurde eine Lösung von S-Acetyl-2-mercapto-essigsäure-pentafluorphenylester (27 mg, 89  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (200  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für 5 Stunden reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit einem Gradienten von 10 - 100% MeCN + 0.1% TFA in 10 Min aufgereinigt ( $R_t = 4.7$ ) und das Produkt wurde nach Lyophilisation als grüner Feststoff erhalten (9 mg, 8.8  $\mu\text{mol}$ , 40%).

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1018.7 (1019.3).

Eine Lösung dieses Zwischenproduktes (9 mg, 8.8  $\mu\text{mol}$ ) in PP (0.05, pH 7.5, 500  $\mu\text{L}$ ) wurde mit einer Lösung von Hydroxylamin in Wasser (17 mg/mL, 200  $\mu\text{L}$ ) versetzt und für eine halbe Stunde reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit einem Gradienten von 10 - 100% MeCN + 0.1% TFA in 10 Min aufgereinigt ( $R_t = 4.6$ ) und das Produkt wurde als grün-blauer Feststoff erhalten (4 mg, 4.1  $\mu\text{mol}$ , 47%).

MALDI-MS (m/z) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 978.1 (978.3).

**NIR 797-carbamido-hexansäure (27):**

Zu einer Lösung von NIR 797 chlorid (80 mg, 93  $\mu\text{mol}$ ) in DMF:DMSO 1:1 (2 mL) wurden 6-Aminohexansäure (12 mg, 93  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (20  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für 4 Stunden reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit einem Gradienten von 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 Min aufgereinigt ( $R_f = 4.4$ ). Das

Produkt wurde nach Lyophilisation als grün-blauer Feststoff erhalten (73 mg, 74  $\mu$ mol, 79%).

ESI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 989.5 (989.4).

#### **Py-5-aminohexansäure (30):**

Zu einer Lösung von Py-5 (500 mg, 1.36 mmol) in Acetonitril (30 mL) wurden 6-Aminohexansäure (1.78 g, 13.6 mmol) und DIPEA (230  $\mu$ L) gegeben und für 30 Minuten reagieren gelassen. Die überschüssige 6-Aminohexansäure und das Lösungsmittel wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Wasser:MeCN 1:1 als Eluent aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als roter Feststoff erhalten (250 mg, 521  $\mu$ mol, 38%).

MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 392.9 (394.3).

#### **Dimethyl-3,3'-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethylazanediyl)-dipropanoat (31):**

Eine Lösung von *tert*-butyl-2-Aminoethylcarbammat (1 g, 6.25 mmol) in Methanol (5 mL) wurde zu Acrylsäuremethylester (120 mL, 1.25 mol) zugetropft und für 6 Tage bei 60 °C reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie mit Aceton als Eluent aufgereinigt ( $R_f = 0.8$ ). Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten (461 mg, 1.39 mmol, 22%).

MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 332.7 (333.2).

#### ***tert*-Butyl-2-(bis(3-(2-aminoethylamino)-3-oxopropyl)amino)-ethylcarbammat (32):**

Eine Lösung von Dimethyl-3,3'-(2-(*tert*-butoxycarbonylamino)ethylazanediyl)-dipropanoat (461, 1.39 mmol) in Methanol (5 mL) wurde tropfenweise zu gut gekühltem Ethylendiamin (75 mL, 1.1 mol) zugegeben und für 4 Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Produkt rein genug für weitere Reaktionen als farbloses Öl erhalten (533 mg, 1.37 mmol, 99%).

MALDI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 389.0 (389.3).

#### **Py-5-Dimer (33):**

Zu einer Lösung von *tert*-butyl-2-(bis(3-(2-aminoethylamino)-3-oxopropyl)amino)-ethylcarbammat (20 mg, 52  $\mu$ mol) in DMSO (100  $\mu$ L) wurden eine Lösung von Py-5 (76 mg, 206  $\mu$ mol) in Acetonitril (200  $\mu$ L) und DIPEA (100  $\mu$ L) gegeben und für 2 Stunden reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie mit Wasser:MeCN 1:1 + 0.1 % TFA als Eluent aufgereinigt ( $R_f = 0.8$ ). Das Produkt wurde nach Lyophilisation als rotes Öl erhalten (43 mg, 39.6  $\mu$ mol, 76%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 913.1 (913.6).

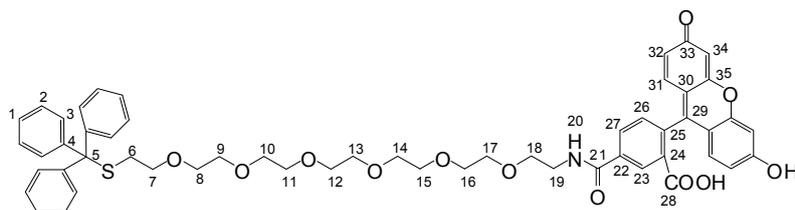
### Py-5-Dimer-NH<sub>2</sub> (34):

Das Py-5-Dimer (43 mg, 39.6  $\mu$ mol) wurde in einem Gemisch aus TIS (50  $\mu$ L) und TFA (500  $\mu$ L) gelöst und für etwa 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und der Rückstand mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.8$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als roter Feststoff erhalten (21 mg, 21.3  $\mu$ mol, 54%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 813.4 (813.6).

### G<sub>0</sub> 5(6)-Carboxyfluorescein-1 (35):

Eine Lösung des G<sub>0</sub>-Dendrimers (20 mg, 34  $\mu$ mol) in DMF (200  $\mu$ L) wurde zu einer Lösung des 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylesters (37 mg, 69  $\mu$ mol) in DMF (200  $\mu$ L) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Dazu wurden 1 molare NaOH (300  $\mu$ L) and MeCN (1 mL) gegeben und nach 5 Minuten wurden die Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 3.3$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (28 mg, 30  $\mu$ mol, 88%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

8.88 (t, 0.5H,  $J^3=5.3$ , H-26); 8.73 (t, 0.5H,  $J^3=5.4$ , H-26); 8.46 (bs, 0.5H, H-23); 8.23 (dd, 0.5H,  $J^3=8.1$ ,  $J^4=1.5$ , H-27); 8.16 (dd, 0.5H,  $J^3=8.0$ ,  $J^4=1.4$ , H-27); 7.68 (bs, 0.5H, H-23); 7.36-7.28 (m, 12H, H-2+H-3); 7.25-7.18 (m, 3H, H-1); 6.69 (t, 2H,  $J^4=1.8$ , H-34); 6.59-6.51 (m, 4H, H-31+H-32); 3.58-3.29 (m, 24H, H-8 – H-19); 3.19 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

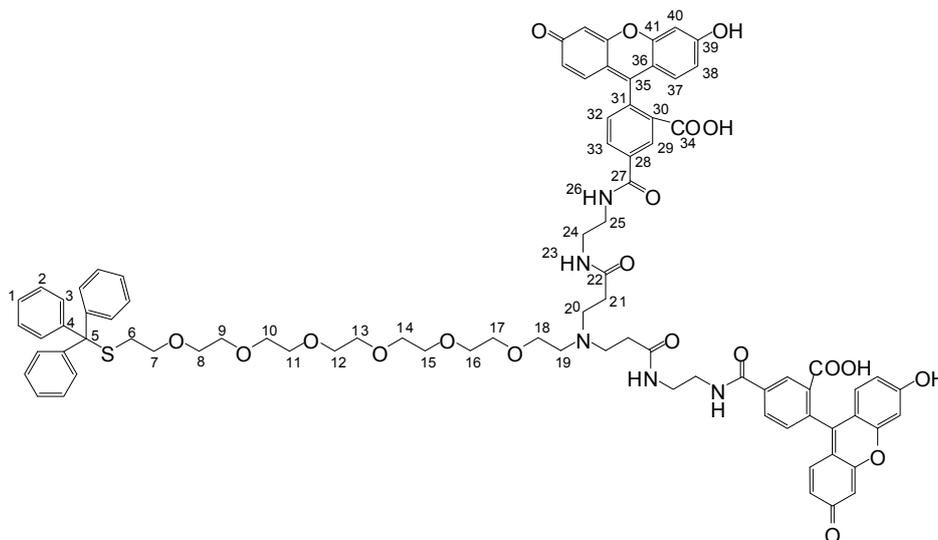
<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

168.84 C-28; 168.72 C-21; 165.38 C-33; 165.26 C-33; 160.35 C-35; 155.25 C-35; 153.28 C-30; 152.54 C-30; 145.12 C-4; 141.24 C-25; 136.85 C-25; 135.30 C-31; 130.09 C-27; 129.90 C-32; 129.78 C-23; 128.66 C-23; 127.37 C-31; 125.53 C-22; 124.89 C-26; 124.02 C-26; 122.99 C-32; 113.39 C-34; 109.86 C-29; 109.80 C-24; 102.92 C-34; 70.42, 70.28, 70.21, 70.16, 69.43, 69.30, 69.22, 66.72 C-7 – C-18; 32.05 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 942.2 (942.3).

### G<sub>1</sub> 5(6)-Carboxyfluorescein-2 (36):

Eine Lösung des G<sub>1</sub>-Dendrimers (20 mg, 25 μmol) in DMF (200 μL) wurde zu einer Lösung des 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylesters (67 mg, 124 μmol) in DMF (200 μL) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Zu diesem Gemisch wurden 1 molare NaOH (300 μL) und MeCN (1 mL) gegeben und nach 5 Minuten wurden die Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 2.3$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (34 mg, 22 μmol, 89%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

8.86 (t, 1H,  $J^3=5.1$ , H-32); 8.72 (t, 1H,  $J^3=5.0$ , H-32); 8.44 (bs, 1H, H-29); 8.24-8.20 (m, 1H, H-33); 8.16-8.13 (m, 1H, H-33); 7.64 (bs, 1H, H-29); 7.37-7.28 (m, 12H, H-2+H-3); 7.25-7.18 (m, 3H, H-1); 6.69-6.68 (m, 4H, H-40); 6.59-6.51 (m, 8H, H-37+H-38); 3.73-3.17 (m, 42H, H-7 – H-21+H-24+H-25); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

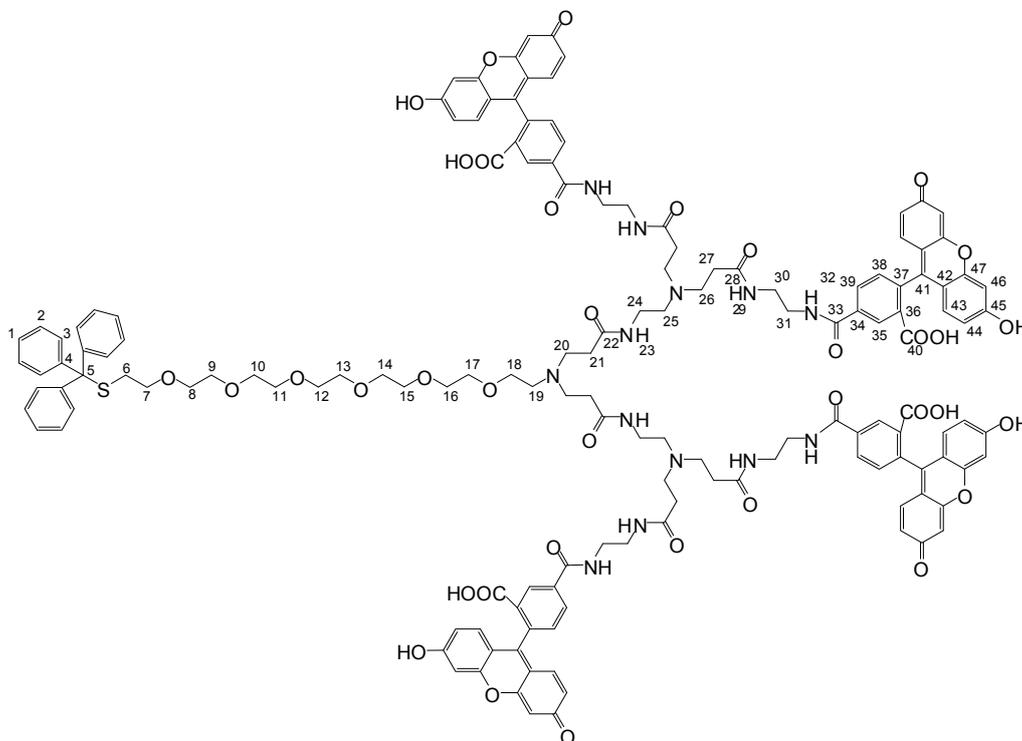
170.25 C-22; 168.87 C-34; 168.72 C-27; 165.61 C-39; 165.50 C-39; 160.35 C-41; 155.37 C-41; 153.40 C-36; 152.50 C-36; 145.12 C-4; 141.33 C-31; 136.94 C-31; 135.36 C-38; 130.05 C-33; 129.90 C-38; 129.77 C-29; 128.67 C-29; 127.37 C-37; 125.54 C-28; 124.89 C-32; 124.01 C-32; 122.93 C-38; 113.42 C-40; 109.77 C-35; 109.71 C-30; 102.93 C-40; 70.42, 70.36, 70.26, 70.13, 69.21, 66.72, 64.91 C-7 – C-18; 52.67 C-5; 50.16 C-20; 32.05 C-6.

ESI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1528.6 (1528.6).

### G<sub>2</sub> 5(6)-Carboxyfluorescein-4 (37):

Eine Lösung des G<sub>2</sub>-Dendrimers (20 mg, 16 μmol) in DMF (200 μL) wurde zu einer Lösung des 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenylesters (85 mg, 158 μmol) in DMF (200 μL) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Zu diesem Gemisch wurden 1 molare NaOH (300 μL) und MeCN (1 mL) gegeben und nach 5 Minuten wurden die

Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 2.0$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (35 mg, 13  $\mu$ mol, 81%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.89 (t, 2H,  $J^3=4.8$ , H-38); 8.74 (t, 2H,  $J^3=4.8$ , H-38); 8.44 (bs, 2H, H-35); 8.24-7.96 (m, 4H, H-39); 7.65 (bs, 2H, H-39); 7.38-7.29 (m, 12H, H-2+H-3); 7.25-7.18 (m, 3H, H-1); 6.70 (bs, 8H, H-46); 6.60-6.51 (m, 16H, H-43+H-44); 3.73 (bs, 2H, H-23); 3.52-2.52 (m, 74H, H-7 – H-21+H-24 – H-27+H-30+H-31); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

170.75 C-22; 170.21 C-28; 168.87 C-40; 168.73 C-33; 165.66 C-45; 165.53 C-45; 160.37 C-47; 155.39 C-47; 152.51 C-42; 145.11 C-4; 141.30 C-37; 136.92 C-37; 135.33 C-44; 130.03 C-39; 129.88 C-44; 129.78 C-35; 128.66 C-35; 127.36 C-43; 125.51 C-34; 124.89 C-38; 124.05 C-38; 113.38 C-46; 109.75 C-41; 109.62 C-36; 102.97 C-46; 70.38, 70.24, 70.13, 69.21, 66.72, 64.89 C-7 – C-18; 49.97 C-20; 32.05 C-6.

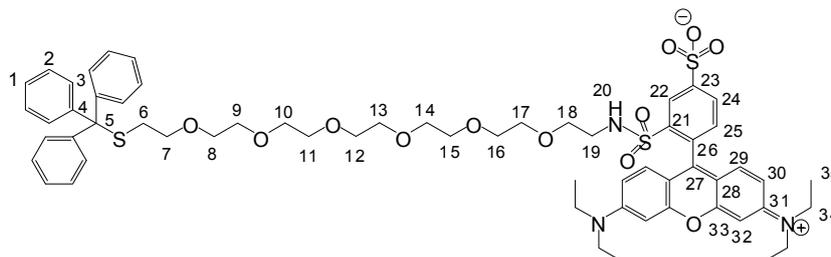
MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 2704.2 (2701.0).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 2701.0 (2701.0).

### **G<sub>0</sub> Sulforhodamin B2 Fluorid-1 (38):**

Eine Lösung des G<sub>0</sub>-Dendrimers (20 mg, 34  $\mu$ mol) in DMF (200  $\mu$ L) wurde zu einer Lösung von Sulforhodamin B2 Fluorid (58 mg, 103  $\mu$ mol) und DIPEA (10  $\mu$ L) in DMF (200  $\mu$ L) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 7.1$

min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als violettes Öl erhalten (27 mg, 24  $\mu$ mol, 71%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.41 (d, 1H,  $J^4=1.5$ , H-22); 8.00 (dd, 1H,  $J^3=7.9$ ,  $J^4=1.6$ , H-24); 7.42 (d, 1H,  $J^3=7.9$ , H-25); 7.31-7.28 (m, 12H, H-2+H-3); 7.25-7.18 (m, 3H, H-1); 7.07-6.99 (m, 4H, H-29+H-30); 6.93 (d, 2H,  $J^4=2.0$ , H-32); 3.62 (q, 8H,  $J^3=7.0$ , H-34); 3.43-3.25 (m, 22H, H-8 – H-18); 3.19 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.78 (m, 2H, H-19); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 1.18 (t, 12H,  $J^3=7.0$ , H-35).

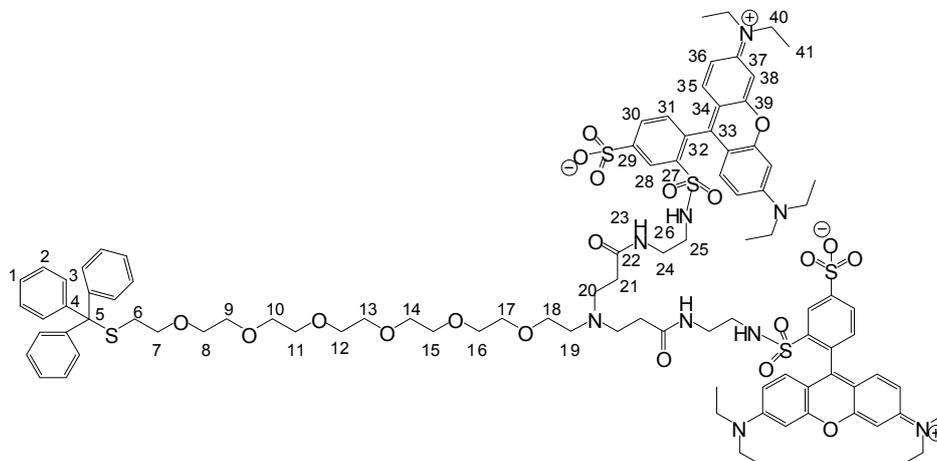
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

157.85 C-26; 155.96 C-31; 155.82 C-33; 151.08 C-23; 145.11 C-4; 140.81 C-21; 132.41 C-29; 131.57 C-25; 131.00 C-27; 129.75 C-2; 128.68 C-3; 127.38 C-1; 126.42 C-24; 114.87 C-30; 114.22 C-28; 96.35 C-32; 70.40, 70.27, 70.20, 70.16, 69.75, 69.20, 66.72 C-7 – C-18; 46.01 C-34; 42.84 C-19; 32.06 C-6; 13.12 C-35.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1124.4 (1124.4).

### G<sub>1</sub> Sulforhodamin B2 Fluorid-2 (39):

Eine Lösung des G<sub>1</sub>-Dendrimers (20 mg, 25  $\mu$ mol) in DMF (200  $\mu$ L) wurde zu einer Lösung von Sulforhodamin B2 Fluorid (83 mg, 148  $\mu$ mol) und DIPEA (20  $\mu$ L) in DMF (200  $\mu$ L) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 4.0$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als violetter Feststoff erhalten (36 mg, 19  $\mu$ mol, 76%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.39 (d, 2H,  $J^4=1.4$ , H-28); 8.01 (dd, 2H,  $J^3=7.9$ ,  $J^4=1.4$ , H-30); 7.45 (d, 2H,  $J^3=7.9$ , H-31); 7.31-7.28 (m, 12H, H-2+H-3); 7.26-7.18 (m, 3H, H-1); 7.08-6.94 (m, 12H, H-35,H-36,H-38); 3.72 (t, 2H,  $J^3=4.7$ , H-26); 3.62 (q, 16H,  $J^3=7.0$ , H-40); 3.54-3.29 (m, 30H, H-8 – H-18+H-20+H-21); 3.19 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 3.01 (q, 4H,  $J^3=5.7$ , H-25); 2.76 (q, 4H,  $J^3=5.8$ , H-24); 2.57 (t, 2H,  $J^3=6.3$ , H-19); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 1.19 (t, 24H,  $J^3=7.0$ , H-41).

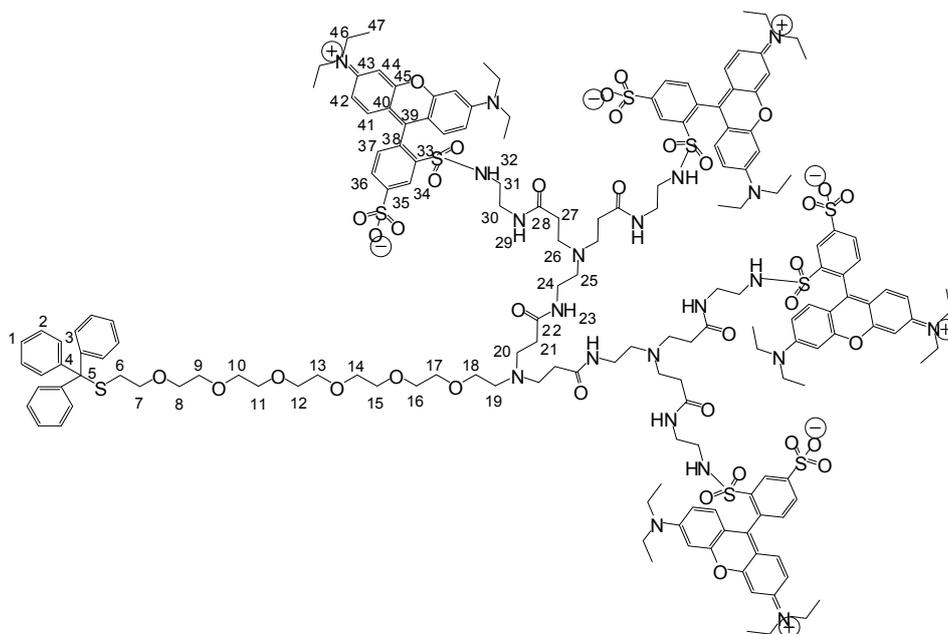
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

170.12 C-22; 157.82 C-32; 155.84 C-37; 155.67 C-39; 150.97 C-29; 145.11 C-4; 140.51 C-27; 132.31 C-35; 131.89 C-31; 131.24 C-33; 130.03 C-28; 129.76 C-2; 128.69 C-3; 127.40 C-1; 126.10 C-30; 114.98 C-36; 114.17 C-34; 96.41 C-38; 70.42, 70.27, 70.16, 69.21, 66.72, 64.92 C-7 – C-18; 52.73 C-5; 50.03 C-20; 46.04 C-40; 42.44 C-19; 32.06 C-6; 13.12 C-41.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1893.8 (1892.7).

### G<sub>2</sub> Sulforhodamin B2 Fluorid-4 (40):

Eine Lösung des G<sub>2</sub>-Dendrimers (20 mg, 16  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von Sulforhodamin B2 Fluorid (88 mg, 158  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (20  $\mu\text{L}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 3.8$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als violetter Feststoff erhalten (25 mg, 7.3  $\mu\text{mol}$ , 46%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.38 (d, 4H,  $J^4=1.2$ , H-34); 8.02 (dd, 4H,  $J^3=7.9$ ,  $J^4=1.3$ , H-36); 7.46 (d, 4H,  $J^3=7.9$ , H-37); 7.31-7.27 (m, 12H, H-2+H-3); 7.24-7.19 (m, 3H, H-1); 7.07-6.94 (m, 24H, H-41,H-42,H-44); 3.75 (bs, 2H, H-23); 3.62 (q, 32H,  $J^3=6.5$ , H-46); 3.56-2.60 (m, 72H, H-

8 – H-21+H-24 – H-27+H-30+H-31); 2.24 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 1.18 (t, 48H,  $J^3=6.7$ , H-47).

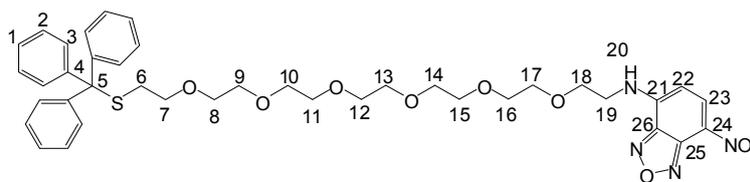
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

170.16 C-22+C-28; 157.82 C-38; 155.84 C-43; 155.54 C-45; 150.63 C-35; 145.10 C-4; 140.55 C-33; 132.30 C-41; 131.99 C-37; 131.39 C-39; 129.76 C-2; 128.69 C-3; 127.39 C-1; 126.09 C-36; 114.96 C-42; 114.15 C-40; 96.43 C-44; 70.41, 70.26, 70.15, 69.21 C-7 – C-18; 46.04 C-47; 13.12 C-48.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 3430.3 (3429.3).

### **G<sub>0</sub> NBD-1 (41):**

Eine Lösung von G<sub>0</sub>-Dendrimer (20 mg, 34  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (250  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von NBD-chlorid (17 mg, 86  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (100  $\mu\text{L}$ ) in DMF (250  $\mu\text{L}$ ) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 3.9$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (11 mg, 15  $\mu\text{mol}$ , 43%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.48 (d, 1H,  $J^3=8.9$ , H-23); 7.34-7.19 (m, 15H, H-1 – H-3); 6.46 (d, 1H,  $J^3=9.0$ , H-22); 3.56-3.30 (m, 24H, H-8 – H-18); 3.20 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

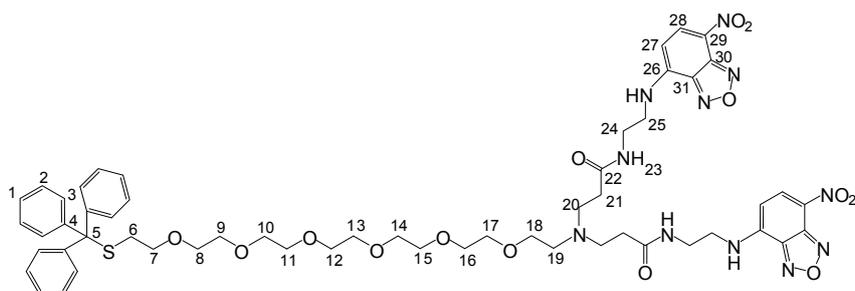
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

145.11 C-4; 129.77 C-2; 128.68 C-3; 127.38 C-1; 70.53, 70.42, 70.28, 70.16, 69.21, 68.56, 66.72 C7 – C18; 44.10 C-19; 32.05 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 747.3 (747.3).

### **G<sub>1</sub> NBD-2 (42):**

Eine Lösung von G<sub>1</sub>-Dendrimer (20 mg, 25  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (250  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von NBD-chlorid (20 mg, 99  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (100  $\mu\text{L}$ ) in DMF (250  $\mu\text{L}$ ) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 3.7$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (18 mg, 16  $\mu\text{mol}$ , 63%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.48 (d, 2H,  $J^3=8.9$ , H-28); 7.32-7.29 (m, 12H, H-2 – H-3); 7.26-7.21 (m, 3H, H-1); 6.40 (d, 2H,  $J^3=8.9$ , H-27), 3.57-3.13 (m, 38H, H-8 – H-18+H-20+H-21+H-24+H-25); 3.21 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.59 (t, 2H,  $J^3=6.9$ , H-19); 2.26 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

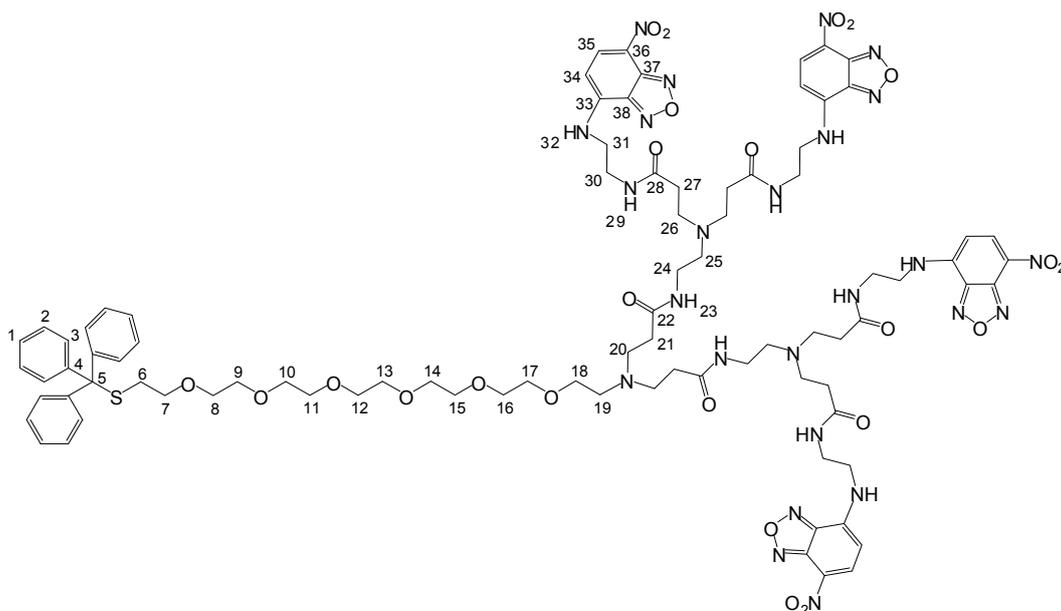
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

168.91 C-22; 149.77 C-30; 144.36 C-4; 129.01 C-2; 127.92 C-3; 126.62 C-1; 69.65, 69.51, 69.40, 68.46, 67.86, 64.13 C-7 – C-18; 31.29 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1138.7 (1138.5).

#### **G<sub>2</sub> NBD-4 (43):**

Eine Lösung von G<sub>2</sub>-Dendrimer (20 mg, 16  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (250  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von NBD-chlorid (38 mg, 190  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (100  $\mu\text{L}$ ) in DMF (250  $\mu\text{L}$ ) gegeben und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 40-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 3.4$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (14 mg, 7.3  $\mu\text{mol}$ , 46%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.49-8.44 (m, 4H, H-35); 7.32-7.28 (m, 12H, H-2 – H-3); 7.25-7.20 (m, 3H, H-1); 6.38 (d, 4H,  $J^3=8.9$ ; H-34); 3.74 (bt, 2H,  $J^3=4.7$ , H-20); 3.55-3.30 (m, 62H, H-8 – H-18+H-

20+H-21+H-24 – H-27+H-30); 3.20 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.64 (t, 2H,  $J^3=6.8$ , H-19); 2.59 (t, 8H,  $J^3=6.6$ ; H-31); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

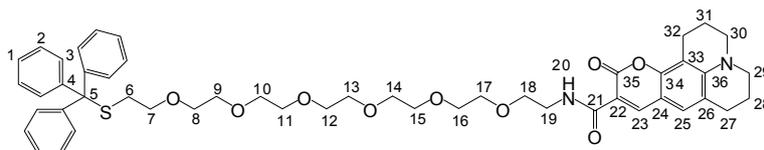
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

169.73 C-22+C-28; 144.34 C-4; 129.00 C-2; 127.91 C-3; 126.62 C-1; 69.63, 69.48, 69.37, 68.44, 65.95, 64.17 C-7 – C-18, 51.09 C-31; 49.20 C-20+C-26; 48.80 C-5; 33.52 C-27; 31.27 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1921.8 (1920.8).

### G<sub>0</sub> Coumarin 343-1 (44):

Zu einer Lösung von Coumarin 343 (30 mg, 103  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (200  $\mu\text{L}$ ) wurden eine Lösung von PyBOP (51 mg, 98  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (200  $\mu\text{L}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach 2 Minuten wurde eine Lösung des G<sub>0</sub>-Dendrimers (30 mg, 51  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (250  $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 8.1$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (21 mg, 25  $\mu\text{mol}$ , 48%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.78 (t, 1H,  $J^4=5.4$ , H-25); 8.48 (s, 1H, H-23); 7.31-7.28 (m, 12H, H-2 – H-3); 7.24 – 7.20 (m, 3H, H-1); 3.51-3.27 (m, 32H, H-8 – H-19+H-29+H-30); 3.19 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-7); 2.68 (q, 4H,  $J^3=6.6$ , H-27+H-32); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 1.84 (dt, 4H,  $J^3=5.9$ , H-28+H-31).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

162.39 C-21; 161.77 C-35; 151.99 C-34; 147.89 C-36; 147.39 C-23; 144.37 C-4; 129.01 C-2; 127.91 C-3; 127.04 C-1; 126.62 C-25; 119.33 C-22; 107.68 C-26; 107.27 C-24; 105.94 C-33; 69.74, 69.68, 69.61, 69.53, 69.40, 68.99, 68.46, 65.96 C-7 – C-18; 49.44 C-19; 48.91 C-5; 31.29 C-6; 26.70 C-29+C-30; 20.43 C-28+C-31; 19.48 C-27+C-32.

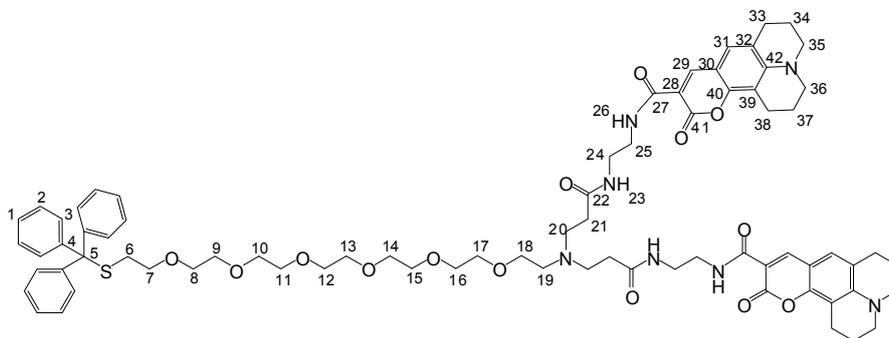
MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 849.4 (851.4).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 851.4 (851.4).

### G<sub>1</sub> Coumarin 343-2 (45):

Zu einer Lösung von Coumarin 343 (56 mg, 197  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (200  $\mu\text{L}$ ) wurden eine Lösung von PyBOP (92 mg, 178  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (200  $\mu\text{L}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach 2 Minuten Reaktionszeit wurde eine Lösung von G<sub>1</sub>-Dendrimmer (40 mg, 50  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (250  $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde

mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 7.6$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (27 mg, 20  $\mu$ mol, 39%).



$^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.73 (t, 2H,  $J^4=5.8$ , H-31); 8.44 (s, 2H, H-29); 7.32-7.29 (m, 12H, H-2 – H-3); 7.25 – 7.21 (m, 3H, H-1); 3.75 (t, 2H,  $J^3=4.7$ , H-23); 3.56-3.18 (m, 48H, H-7 – H-18+H-21+H-22+H-24+H-25+H-35+H-36); 2.69-2.60 (m, 10H, H-19+H-33+H-38); 2.26 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 1.89-1.82 (m, 8H, H-34+H-37).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

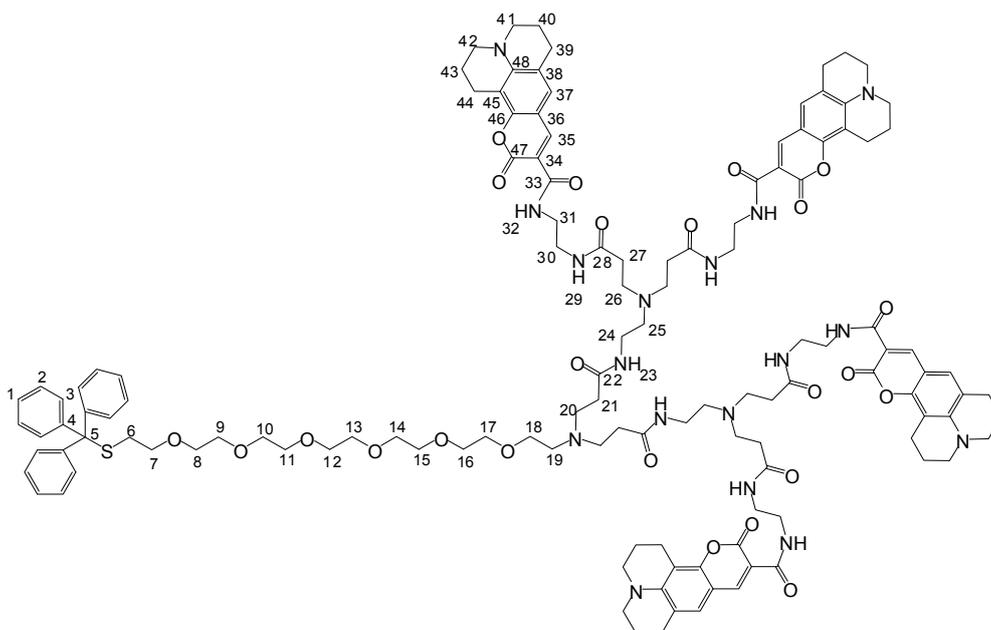
169.54 C-27; 162.80 C-22; 161.72 C-41; 151.97 C-40; 147.90 C-42; 147.31 C-29; 144.39 C-4; 129.02 C-2; 127.91 C-3; 127.02 C-1; 126.65 C-31; 119.33 C-28; 107.72 C-32; 107.27 C-30; 104.50 C-39; 69.68, 69.53, 69.45, 69.42, 68.48, 65.99, 64.19 C-7 – C-18; 49.49 C-19; 48.93 C-5; 31.31 C-6; 26.71 C-35+C-36; 20.44 C-34+C-37; 19.49 C-33+C-38.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1347.6 (1346.6).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1346.9 (1346.6).

### **G<sub>2</sub> Coumarin 343-4 (46):**

Zu einer Lösung von Coumarin 343 (36 mg, 126  $\mu$ mol) in DMSO (200  $\mu$ L) wurden eine Lösung von PyBOP (62 mg, 120  $\mu$ mol) in DMSO (200  $\mu$ L) und DIPEA (50  $\mu$ L) gegeben. Nach 2 Minuten Reaktionszeit wurde eine Lösung von G<sub>2</sub>-Dendrimer (20 mg, 16  $\mu$ mol) in DMSO (250  $\mu$ L) zugegeben und über Nacht reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 6.3$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als brauner Feststoff erhalten (21 mg, 9  $\mu$ mol, 56%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.73 (t, 4H,  $J^4=5.6$ , H-37); 8.41 (s, 4H, H-35); 7.32-7.30 (m, 12H, H-2+H-3); 7.26-7.21 (m, 3H, H-1); 3.54-3.18 (m, 88H, H-7 – H-18+H-20+H-21+H-24 – H-27+H-30+H-31+H-41+H-42); 2.68-2.60 (m, 28H, H-19+H-39+H-44); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 1.89-1.79 (m, 16H, H-40+H-43).

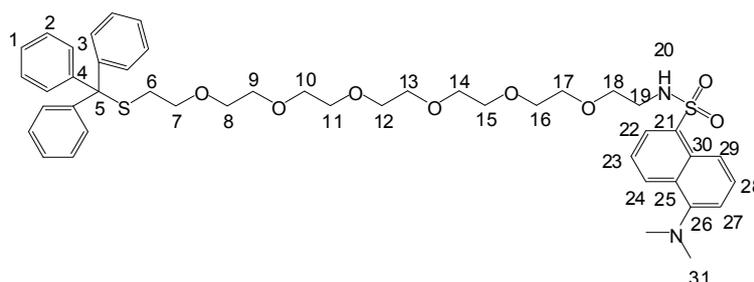
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

169.57 C-33; 162.77 C-22+C-28; 161.67 C-47; 151.91 C-46; 147.84 C-48; 147.25 C-35; 144.34 C-4; 129.00 C-2; 127.91 C-3; 126.98 C-1; 126.63 C-37; 119.26 C-34; 107.63 C-38; 107.24 C-36; 104.44 C-45; 69.63, 69.49, 69.39, 68.46 C-7 – C-18; 49.45 C-19; 48.89 C-5; 26.70 C-41+C-42; 20.43 C-40+C-43; 19.48 C-39+C-44.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 2339.9 (2337.1)

### **G<sub>0</sub> Dansyl-1 (47):**

Eine Lösung von G<sub>0</sub>-Dendrimmer (30 mg, 51  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) in MeCN (200  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von Dansylchlorid (56 mg, 206  $\mu\text{mol}$ ) in MeCN (300  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 6.8$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelbes Öl erhalten (26 mg, 32  $\mu\text{mol}$ , 63%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.45 (d, 1H,  $J^3=8.5$ , H-24); 8.32 (d, 1H,  $J^3=8.7$ , H-29); 8.11 (m, 1H, H-22); 7.59 (m, 2H, H-23+H-28); 7.30 (d, 12H,  $J^3=4,2$ ; H-2+H-3); 7.22 (m, 4H, H-1+H-27); 3.44-3.17 (m, 25H, H-7 – H-18+H-20); 2.93 (q, 2H,  $J^3=5.9$ , H-19); 2.84 (s, 6H, H-31); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

151.00 C-26; 145.12 C-4; 137.11 C-21; 129.76 C-2; 129.45 C-25+C-30; 128.77 C-24+C-28; 128.68 C-3; 128.40 C-22; 127.39 C-1; 124.45 C-23; 120.55 C-29; 116.13 C-27; 70.43, 70.40, 70.28, 70.20, 70.16, 69.64, 69.21, 66.72 C-7 – C-18; 45.86 C-31; 42.92 C-19; 32.06 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 817.4 (817.4).

### Entschützung von $\text{G}_0$ Dansyl-1 zu Dansyl $_1$ -SH (48):

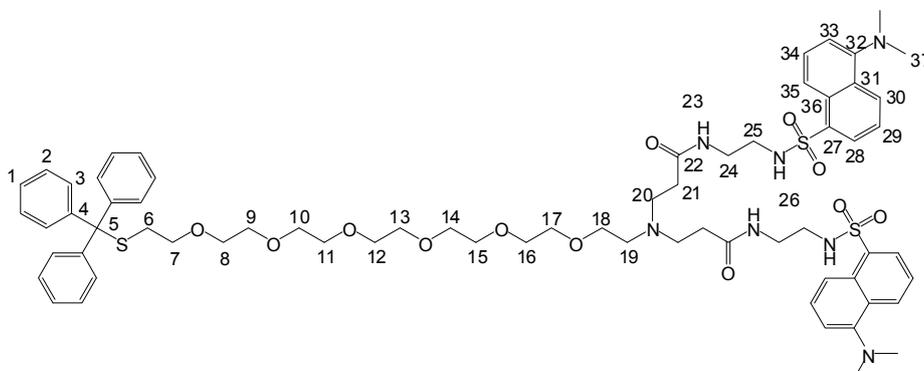
$\text{G}_0$  Dansyl-1 (33 mg, 40.4  $\mu\text{mol}$ ) wurde in TIS (100  $\mu\text{L}$ ) und TFA (1 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 2.7$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelbes Öl erhalten (22.7 mg, 39.5  $\mu\text{mol}$ , 98%).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 575.4 (575.3).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 574.6 (575.3).

### $\text{G}_1$ Dansyl-2 (49):

Eine Lösung von  $\text{G}_1$ -Dendrimer (25 mg, 31  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) in MeCN (200  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von Dansylchlorid (67 mg, 247  $\mu\text{mol}$ ) in MeCN (300  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 5.8$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (23 mg, 18  $\mu\text{mol}$ , 58%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.44 (d, 2H,  $J^3=8.5$ , H-30); 8.27 (d, 2H,  $J^3=8.7$ , H-35); 8.16-8.01 (m, 2H, H-28); 7.59 (m, 4H, H-29+34); 7.30 (d, 12H,  $J^3=4,3$ ; H-2+H-3); 7.23 (m, 5H, H-1+H-33); 3.68 (t,

2H,  $J^3=4.5$ , H-26); 3.50-3.22 (m, 24H, H-7 – H-18); 3.19 (t, 4H,  $J^3=6.6$ , H-20); 3.06 (q, 4H,  $J^3=6.4$ , H-19); 2.81 (s, 12H, H-37); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

170.10 C-22; 151.57 C-32; 145.11 C-4; 136.47 C-27; 130.03 C-30; 129.77 C-2; 129.60 C-31+C-36; 128.92 C-34; 128.68 C-3; 128.57 C-28; 127.37 C-1; 124.35 C-29; 119.91 C-35; 116.01 C-33; 70.38, 70.25, 70.14, 69.20, 66.72, 64.83 C-7 – C-18; 52.72 C-5; 45.71 C-37; 42.27 C-19; 32.05 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1278.7 (1278.6).

### Entschützung von $G_1$ Dansyl-2 zu Dansyl $_2$ -SH (50):

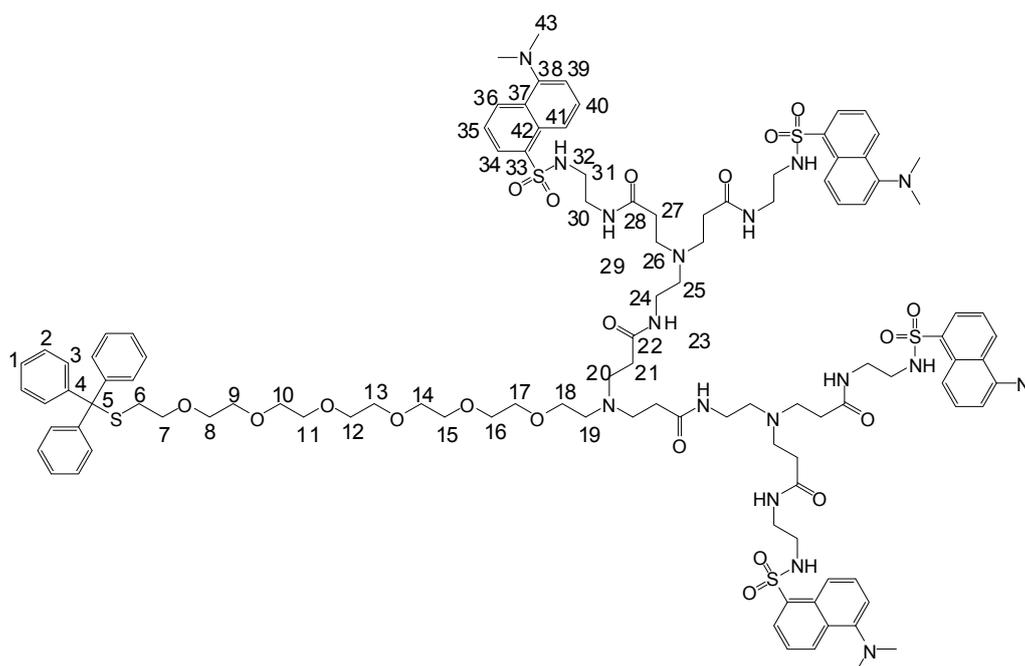
$G_1$  Dansyl-2 (42 mg, 32.8  $\mu\text{mol}$ ) wurde in TIS (100  $\mu\text{L}$ ) und TFA (1 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 1.94$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelbes Öl erhalten (24 mg, 23.1  $\mu\text{mol}$ , 70%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1035.9 (1036.2).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1036.5 (1036.2).

### $G_2$ Dansyl-4 (51):

Eine Lösung von  $G_2$ -Dendrimer (30 mg, 24  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) in MeCN (200  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von Dansylchlorid (102 mg, 379  $\mu\text{mol}$ ) in MeCN (300  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 30-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 3.4$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (21 mg, 9.5  $\mu\text{mol}$ , 40%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.43 (d, 4H,  $J^3=8.5$ , H-36); 8.26 (d, 4H,  $J^3=8.7$ , H-41); 8.19-8.01 (m, 4H, H-34); 7.58 (m, 8H, H-35+40); 7.30 (d, 12H,  $J^3=4,1$ ; H-2+H-3); 7.24 (m, 6H, H-1+H-39); 3.70 (bs, 4H, H-32); 3.51-2.91 (m, 52H, H-7 – H-18+H-20+H-21+H-23 – H27+H-30+H-31); 2.80 (s, 23H, H-42); 2.61 (t, 2H,  $J^3=7.1$ , H-19); 2.25 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

170.67 C-22; 169.98 C-28; 151.81 C-38; 145.11 C-4; 136.47 C-33; 130.11 C-36; 129.74 C-2; 129.67 C-37+C-42; 128.84 C-40; 128.68 C-3; 128.58 C-34; 127.30 C-1; 124.28 C-35; 119.79 C-41; 115.91 C-39; 70.38, 70.24, 70.13, 69.20, 66.72, 64.88 C-7 – C-18; 52.67 C-5; 51.82, 49.95, 49.67 C20+C24-C26+C30+C31; 45.72 C-43; 42.29 C-19; 32.05 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 2202.5 (2201.0).

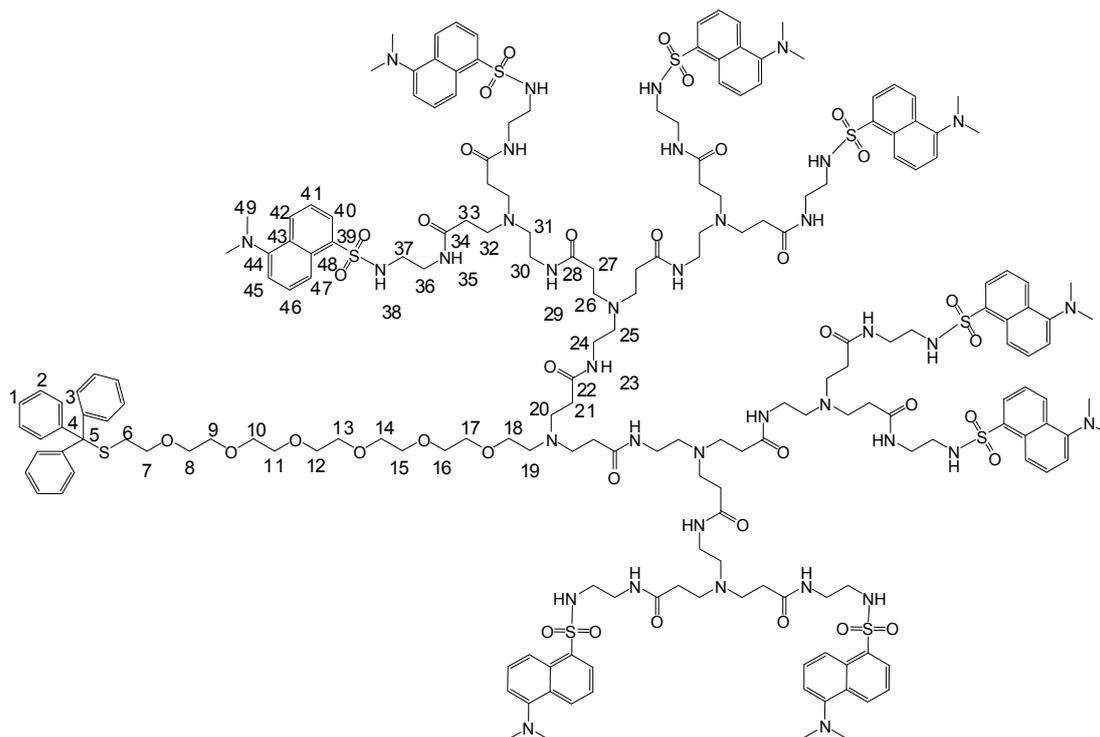
### **Entschützung von G<sub>2</sub> Dansyl-4 zu Dansyl<sub>4</sub>-SH (52):**

G<sub>2</sub> Dansyl-4 (11.5 mg, 5.23  $\mu\text{mol}$ ) wurde in TIS (100  $\mu\text{L}$ ) und TFA (1 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 4.6$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (10.0 mg, 5.11  $\mu\text{mol}$ , 98%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1959.6 (1958.9).

### **G<sub>3</sub> Dansyl-8 (53):**

Eine Lösung von G<sub>3</sub>-Dendrimer (20 mg, 9.2  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von Dansylchlorid (50 mg, 183  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 6.0$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (22 mg, 5.4  $\mu\text{mol}$ , 59%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.47-8.42 (m, 8H, H-42); 8.28-8.18 (m, 9H, H-47); 8.08-8.00 (m, 9H, H-40); 7.61-7.54 (m, 15H, H-41+H-46); 7.30-7.26 (m, 12H, H2+H-3); 7.24-7.19 (m, 8H, H-1+H-45); 3.52-3.04 (m, 64H, H-7 – H-18+H-20+H-21+H-24 – H-27+H-30 – H-33+H-36+H-37); 2.80 (s, 47H, H-49); 2.67-2.51 (m, 2H, H-19); 2.24 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

170.38 C-22; 169.92 C-28; 151.74 C-44; 145.10 C-4; 136.46 C-39; 130.08 C-42; 129.77 C-2; 129.65 C-43+C-48; 128.87 C-46; 128.67 C-3; 128.56 C-40; 127.37 C-1; 124.29 C-41; 119.84 C-47; 115.94 C-45; 70.36, 70.23, 70.12, 69.20 C-7 – C-18; 51.80 C-5; 49.60, 49.56, 49.46 C20+C24-C26+C30 – C-32+C-36+C-37; 45.72 C-49; 42.28 C-19; 32.04 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 4048.0 (4045.8).

### Entschützung von $\text{G}_3$ Dansyl-8 zu Dansyl $_8$ -SH (54):

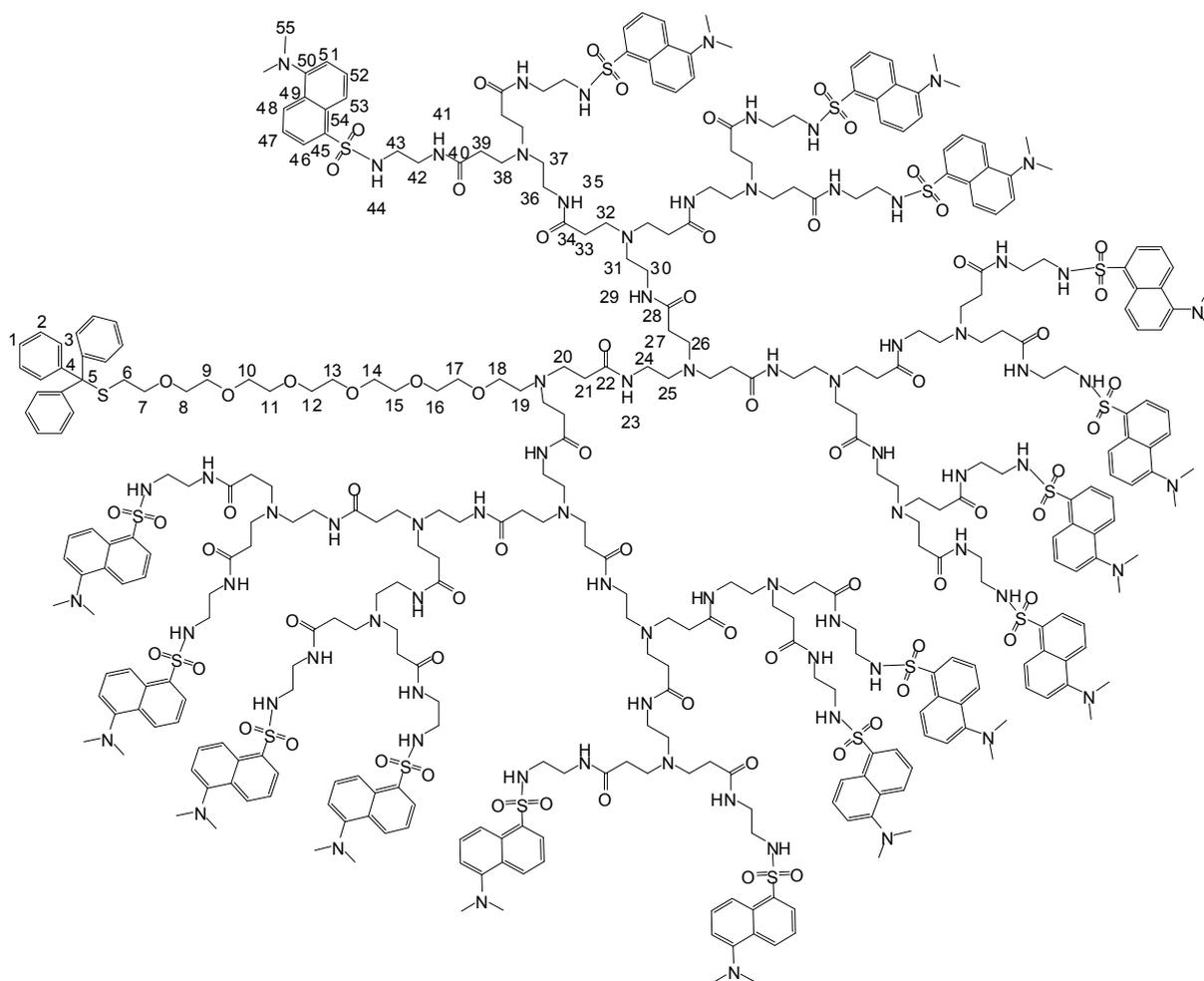
$\text{G}_3$  Dansyl-8 (22 mg, 5.43  $\mu\text{mol}$ ) wurde in TIS (100  $\mu\text{L}$ ) und TFA (1 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 30-100% MeCN + 0.1% TFA in 5 min als Gradient ( $R_t = 1.8$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als hellbrauner Feststoff erhalten (19.7 mg, 5.18  $\mu\text{mol}$ , 95%).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 3804.3 (3803.7).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 3809.5 (3803.7).

#### G<sub>4</sub> Dansyl-16 (55):

Eine Lösung des G<sub>4</sub>-Dendrimers (15 mg, 3.7 μmol) und DIPEA (50 μL) in DMF (200 μL) wurde zu eine Lösung von Dansylchlorid (49 mg, 180 μmol) in DMF (300 μL) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient (R<sub>t</sub> = 5.7 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelber Feststoff erhalten (14 mg, 1.9 μmol, 51%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ, ppm; *J*, Hz):

8.55-8.41 (m, 17H, H-48); 8.28-8.19 (m, 16H, H-53); 8.08-8.01 (m, 18H, H-46); 7.61-7.54 (m, 32H, H-47+H-52); 7.30-7.27 (m, 12H, H-2+H-3); 7.23-7.18 (m, 19H, H-1+H-51); 3.50-3.03 (m, 133H, H-7 - H-18+H-20+H-21+H-24 - H-27+H-30 - H-33+H-36 - H-39+H-42+H-43); 2.79 (s, 95H, H-55); 2.69-2.51 (m, 2H, H-19); 2.24 (t, 2H, *J*<sup>3</sup>=6.6, H-6).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ, ppm; *J*, Hz):

170.34 C-22; 169.91 C-28; 151.68 C-50; 145.09 C-4; 136.46 C-45; 130.06 C-48; 129.76 C-2; 129.65 C-49+C-54; 128.89 C-52; 128.64 C-3; 128.56 C-46; 127.36 C-1; 124.28 C-47; 119.87 C-53; 115.95 C-51; 70.35, 70.21, 70.10 C-7 - C-18; 51.79 C-5;

49.59, 49.54, 49.42 C20+C24-C26+C30 – C-32+C-36 – C-38+C42+C-43; 45.70 C-55;  
42.28 C-19; 32.04 C-6.

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 7741.0 (7741.8).

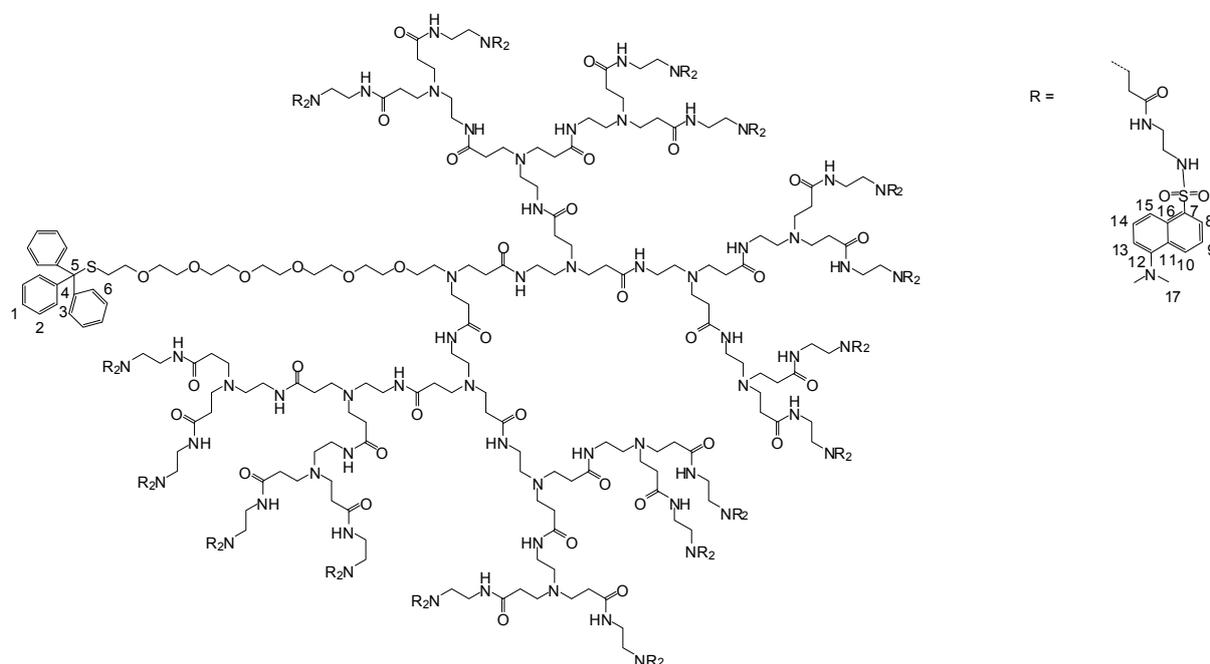
### Entschützung von G<sub>4</sub> Dansyl-16 zu Dansyl<sub>16</sub>-SH (56):

G<sub>4</sub> Dansyl-16 (41 mg, 5.3 μmol) wurde in TIS (200 μL) und TFA (2 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.7$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als hellbrauner Feststoff erhalten (39 mg, 5.2 μmol, 98%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 7390.4 (7495.2).

### G<sub>5</sub> Dansyl-32 (57):

Eine Lösung des G<sub>5</sub>-Dendrimers (30 mg, 3.9 μmol) und DIPEA (50 μL) in DMF (200 μL) wurde zu einer Lösung von Dansylchlorid (85 mg, 314 μmol) in DMF (300 μL) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde 1M NaOH (200 μL) hinzugefügt und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 5.0$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als brauner Feststoff erhalten (17 mg, 1.1 μmol, 29%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

8.55-8.40 (m, 25H, H-10); 8.26-8.18 (m, 29H, H-15); 8.06-8.00 (m, 33H, H-8); 7.59-7.52 (m, 62H, H-9+H-14); 7.31-7.20 (m, 47H, H-1 – H-3+H-13); 3.52-2.99 (m, 139H); 2.79 (s, 187H, H-17); 2.68-2.51 (m, 2H); 2.22 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

169.88; 151.92 C-12; 136.43 C-7; 130.05 C-10; 129.76 C-2; 129.53 C-11+C-16;  
128.85 C-14; 128.63 C-3; 128.56 C-8; 124.22 C-9; 119.70 C-15; 115.83 C-13; 70.33;  
51.74 C-5; 50.21, 49.55, 49.52, 49.31; 45.67 C-17; 42.28.

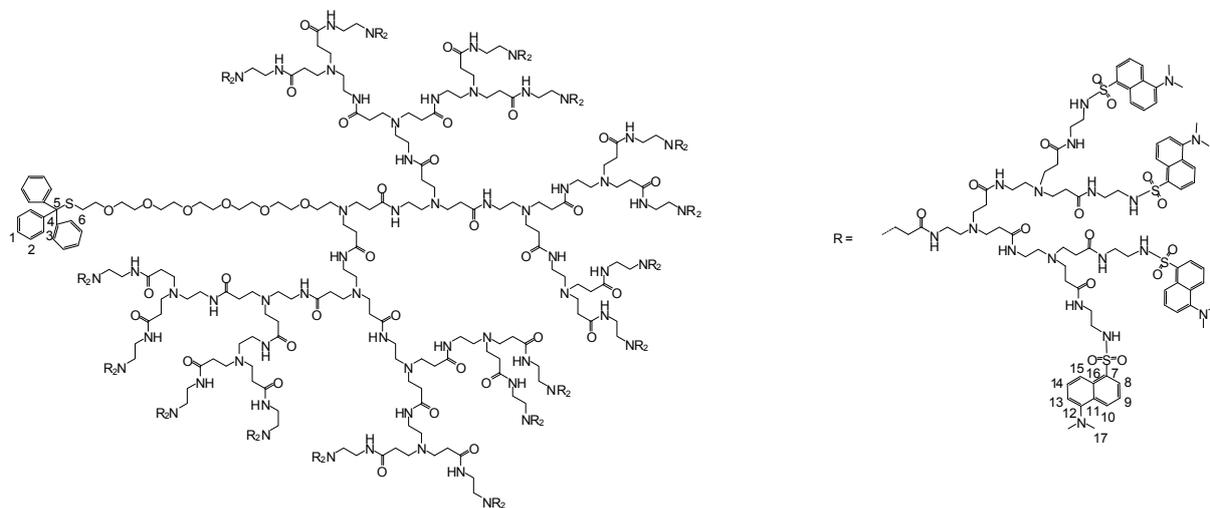
MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet):  $\sim 13950$  (15112.4).

### Entschützung von $\text{G}_5$ Dansyl-32 zu Dansyl $_{32}$ -SH (58):

$\text{G}_5$  Dansyl-32 (17 mg, 1.1  $\mu\text{mol}$ ) wurde in TIS (200  $\mu\text{L}$ ) und TFA (2 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 3.7$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als dunkelbrauner Feststoff erhalten (14.6 mg, 1.0  $\mu\text{mol}$ , 87%).

### $\text{G}_6$ Dansyl-64 (59):

Eine Lösung von  $\text{G}_6$ -Dendrimer (48 mg, 3.4  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von Dansylchlorid (119 mg, 439  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde 1M NaOH (200  $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 25-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 4.1$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als brauner Feststoff erhalten (30 mg, 1.0  $\mu\text{mol}$ , 30%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.55-8.39 (m, 60H, H-10); 8.27-8.18 (m, 61H, H-15); 8.06-8.00 (m, 63H, H-8); 7.58-7.52 (m, 125H, H-9+H-14); 7.26-7.16 (m, 79H, H-1 - H-3+H-13); 3.48-2.93 (m, 207H); 2.79 (s, 359H, H-17); 2.61 (bs, 12H).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

170.31; 169.88; 151.78 C-12; 136.44 C-7; 130.20 C-10; 129.66 C-2; 128.87 C-14;  
128.54 C-3; 124.22 C-9; 119.79 C-15; 115.87 C-13; 51.79 C-5; 49.53; 45.65 C-17;  
42.28 C-19.

#### **Entschützung von G<sub>6</sub> Dansyl-64 zu Dansyl<sub>64</sub>-SH (60):**

G<sub>6</sub> Dansyl-64 (67 mg, 2.3  $\mu\text{mol}$ ) wurde in TIS (200  $\mu\text{L}$ ) und TFA (2 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 5.0$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als dunkelbrauner Feststoff erhalten (27.2 mg, 0.9  $\mu\text{mol}$ , 41%).

#### **G<sub>7</sub> Dansyl-128 (61):**

Eine Lösung von G<sub>7</sub>-Dendrimer (30 mg, 1.05  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (100  $\mu\text{L}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) wurde zu einer Lösung von Dansylchlorid (110 mg, 403  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) gegeben. Nach einer halben Stunde Reaktionszeit wurde 1M NaOH (200  $\mu\text{L}$ ) hinzugefügt und das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 5.3$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als brauner Feststoff erhalten (21 mg, 0.36  $\mu\text{mol}$ , 34%).

#### **Entschützung von G<sub>7</sub> Dansyl-128 zu Dansyl<sub>128</sub>-SH (62):**

G<sub>7</sub> Dansyl-64 (21 mg, 0.36  $\mu\text{mol}$ ) wurde in TIS (200  $\mu\text{L}$ ) und TFA (2 mL) gelöst. Nach 5 Minuten Reaktionszeit wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 5.2$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als dunkelbrauner Feststoff erhalten (17 mg, 0.29  $\mu\text{mol}$ , 81%).

#### **Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten der Dansyl-Multimere:**

Von den Dansyl-Multimeren wurden Lösungen in Natriumacetatpuffer (0.5 M, pH 4):MeCN 1:1 der folgenden Konzentrationen hergestellt:  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$ ;  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M. Die Absorption bei 335 nm dieser Lösungen wurde mittels UV/VIS Spektrometer bestimmt. Aus den erhaltenen Werten wurden Graphen erstellt und lineare Regressionen durchgeführt. Die Steigung der Regressionsgeraden entspricht dabei aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $E = \epsilon \times c \times d$ ) dem molaren Extinktionskoeffizienten der Verbindungen.

#### **4.2.1 Derivatisierung von Octreotid-Maleimidohexan-säure mit Dansyl<sub>x</sub>-SH (x = 1 – 8)**

Zu einer Lösung von Octreotid-Maleimidohexansäure (3 mg, 2.44 µmol) in PP (0.5 M, pH 7, 300 µL) wurde eine Lösung des jeweiligen Dansyl-Multimers (jeweils 4.88 µmol pro Maleinimid) in DMF (300 µL) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die Reaktionsgemische wurden mittels HPLC und MALDI-TOF Spektrometrie analysiert.

Octreotid-Dansyl<sub>1</sub> (**63**):

MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1801.9 (1802.8).

Octreotid-Dansyl<sub>2</sub> (**64**):

MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 2263.5 (2263.7).

Octreotid-Dansyl<sub>4</sub> (**65**):

MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 3186.3 (3186.4).

Octreotid-Dansyl<sub>8</sub> (**66**):

MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 5029.5 (5031.2).

#### **4.3 Multimerisierung der Caspase-spaltbaren Peptidsequenzen**

##### **Umsetzung der Caspase-spaltbaren Peptidsequenz CDEVDK(Sulforhodamin) mit G<sub>2</sub> Maleinimid (**67**):**

Zu einer Lösung von G<sub>2</sub> Maleinimid (3 mg, 1.5 µmol) in PP (0.5 M, pH 7):MeCN 1:1 (250 µL) wurde eine Lösung des fluoreszenzfarbstoffmarkierten Peptides (15 mg, 11.8 µmol) in PP (0.5 M, pH 7):MeCN 1:1 (250 µL) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC und MALDI-TOF Spektrometrie analysiert.

MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 7020.1 (7026.7).

##### **Umsetzung der Caspase-spaltbaren Peptidsequenz G(Carboxyfluorescein)-DEVDC mit G<sub>2</sub> Maleinimid, G<sub>4</sub> Maleinimid, G<sub>5</sub> Maleinimid und G<sub>6</sub> Maleinimid (**68, 69, 70 und 71**):**

Zu einer Lösung von G<sub>2</sub> Maleinimid (3 mg, 1.5 µmol) in PP (0.5 M, pH 7):MeCN 1:1 (250 µL) wurde eine Lösung des fluoreszenzfarbstoffmarkierten Peptides (12 mg, 11.8 µmol) in PP (0.5 M, pH 7):MeCN 1:1 (250 µL) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC und MALDI-TOF Spektrometrie analysiert.

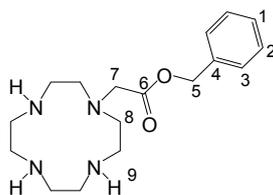
MALDI-MS (m/z) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 6008.6 (6014.3).

Die Umsetzungen des Peptides mit den Maleinimiden höherer Generation wurden analog durchgeführt.

## 4.4 Synthese der DOTA-Derivate

### (1,4,7,10-Tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (72):

Zu einer Lösung von Cyclen (3 g, 17.4 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (20 mL) wurde über einen Zeitraum von einer Stunde tropfenweise eine Lösung von Bromessigsäurebenzylester (2 g, 8.7 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (5 mL) zugegeben und für 2 Stunden reagieren gelassen. Das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{konz.})}$  8:9:4 als Eluent ( $R_f = 0.6$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Eindampfen des Lösungsmittels bei Raumtemperatur als farbloses Öl erhalten (2.38 g, 7.44 mmol, 86%).



$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.41 (s, 5H, H-1 – H-3); 5.21 (s, 2H, H-5); 3.51-3.43 (m, 2H, H-7); 2.64-2.38 (m, 16H, H-8).

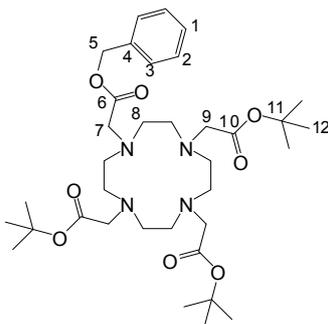
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

175.8 C-6; 145.1 C-4; 130.1 C-2; 129.3 C-1; 127.5 C-3; 75.6 C-5; 57.8 C-7; 54.9+53.1+53.0+49.2 C-8.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 320.6 (321.4).

### (4,7,10-Tris-*tert*-butoxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (73):

Zu einer Lösung von (1,4,7,10-Tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (2.38 g, 7.44 mmol) und  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4.27 g, 30.5 mmol) in MeCN wurde eine Lösung von Bromessigsäure-*tert*-butylester (5.8 g, 29.76 mmol) in MeCN (10 mL) zugegeben und für 2 Stunden reagieren gelassen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand schnell mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit zunächst  $\text{CHCl}_3$  und anschließend  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  9:1 als Eluent ( $R_f = 0.5$ ) aufgereinigt, da es bei einer Verweildauer des Produktes von über 2 Stunden auf dem Säulenmaterial zu einer merklichen Zersetzung kam. Das Produkt wurde als farbloser aushärtender Schaum erhalten (3.29 g, 4.97 mmol, 67%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.35 (s, 5H, H-1 – H-3); 5.13 (s, 2H, H-5); 3.46-3.39 (m, 2H, H-7); 3.31 (s, 2H, H-9); 3.29-2.71 (bs, 7H, H-8); 2.43-1.94 (bs, 6H, H-8); 1.44 (s, 9H, H-12); 1.40 (bs, 18H, H-12).

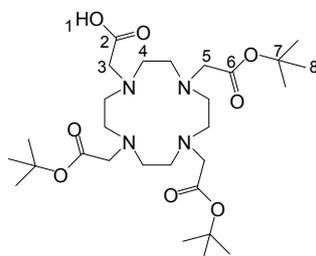
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

174.3 C-6; 172.9 C-10; 144.7 C-4; 129.8 C-2; 128.7 C-1; 127.3 C-3; 85.7 C-11; 75.3 C-5; 58.3 C-9; 57.1 C-7; 53.8+52.6+52.3+50.5 C-8; 31.2 C-12.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 662.8 (663.4).

**(4,7,10-Tris-*tert*-butoxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäure (Tris-*t*Bu-DOTA) (74):**

In einer Wasserstoffatmosphäre wurde zu einer Lösung von (4,7,10-Tris-*tert*-butoxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (830 mg, 1.25 mmol) in THF:MeOH 1:1 (40 mL) Palladium auf Kohlenstoff (10% Pd, 114 mg) gegeben und für 4 Stunden reagieren gelassen. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand schnell mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Gradienten von Wasser:MeCN + 0.1% TFA beginnend mit MeCN ( $R_f$  = 0.5 mit Wasser:MeCN 1:1 + 0.1% TFA) aufgereinigt, da es bei einer Verweildauer des Produktes von über 1.5 Stunden auf dem Säulenmaterial zu einer merklichen Zersetzung kam. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten (507 mg, 0.89 mmol, 71%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

3.46 (m, 2H, H-3); 3.36 (s, 6H, H-5); 3.33 (bs, 4H, H-4); 2.87 (bs, 4H, H-4); 2.72 (bs, 4H, H-4); 2.64 (bs, 4H, H-4); 1.41 (s, 18H, H-8); 1.40 (s, 9H, H-8).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

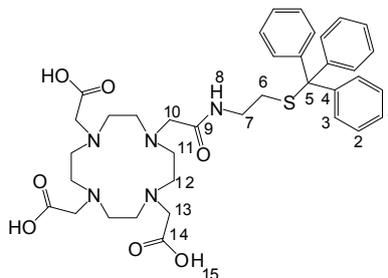
179.63 C-2; 179.30 C-6; 89.53 C-7; 65.63 C-3; 64.61 C-5; 61.88+60.78+58.59+56.09 C-4; 36.88+36.83 C-8.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 572.6 (573.4).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 573.4 (573.4).

### **S-Trityl-mercaptoethylamino-DOTA (S-Trityl-thiol-DOTA) (75):**

Zu einer Lösung von S-Trityl-mercaptoethanolammonium trifluoracetat (2.54 g; 5.9 mmol) und DOTA (3g; 586 mmol) in Wasser:MeCN 1:1 (40 mL) wurde tropfenweise eine Lösung von DCC (1.21 g; 586 mmol) in Pyridin (5 mL) zugegeben und über Nacht reagieren gelassen. Die Lösungsmittel wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Wasser:MeCN 1:1 + 0.1% TFA als Eluent ( $R_f = 0.8$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als hellgelber Feststoff erhalten (952 mg, 1.4 mmol, 23%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.35-7.21 (m, 15H, H-1 – H-3); 3.96-3.04 (m, 18H, H-7+H-11+H-12); 3.02-2.97 (m, 8H, H-10+H-13); 2.24 (t, 2H,  $J^3=6.7$ , H-6).

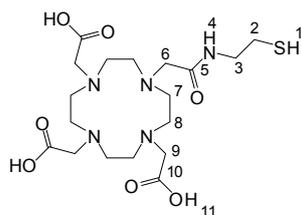
$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

158.87 C-14; 158.45 C-9; 145.00 C-4; 129.71 C-2; 128.74 C-3; 127.45 C-1; 66.73 C-5; 45.54 C-7; 26.62 C-6.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 706.1 (706.3).

### **Mercaptoethylamino-DOTA (thiol-DOTA) (76):**

S-Trityl-thiol-DOTA (952 mg, 1.4 mmol) wurde in einem Gemisch aus TIS (200  $\mu\text{L}$ ) und TFA (5 mL) gelöst und 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-20% MeCN + 0.1% TFA in 3 min als Gradient ( $R_t = 1.1$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als gelbes Öl erhalten (363 mg, 0.78  $\mu\text{mol}$ , 56%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

3.98 (bs, 2H, H-3); 3.84 (bs, 2H, H-6); 3.59 (bs, 6H, H-9); 3.37-3.09 (m, 16H, H-7+H-8); 2.54 (q, 2H,  $J^3=7.5$ , H-2); 2.41 (t, 1H,  $J^3=7.6$ , H-1).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

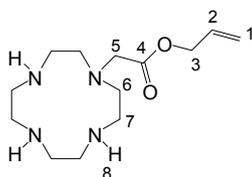
158.93 C-10; 158.51 C-5; 54.61 C-9; 53.47 C-6; 51.22+51.07+49.29+48.99 C-7+C-8; 42.96 C-3; 23.97 C-2.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 463.9 (464.1).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 464.2 (464.1).

### **(1,4,7,10-Tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäureallylester (77):**

Zu einer gekühlten Lösung von Cyclen (560 mg, 3.26 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (40 mL) wurde über einen Zeitraum von einer Stunde tropfenweise eine Lösung von Chloressigsäureallylester (190  $\mu\text{L}$ , 1.63 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL) zugegeben. Nach 6 Stunden Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{NH}_4\text{OH}_{(\text{konz.})}$  8:9:4 as Eluent ( $R_f = 0.5$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten (290 mg, 1.07 mmol, 66%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

5.97-5.84 (m, 1H, H-2); 5.33-5.17 (m, 2H, H-1); 4.55-4.53 (m, 2H, H-3); 3.38 (s, 2H, H-5); 2.64-2.38 (m, 16H, H-7+H-8).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

171.46 C-4; 133.30 C-2; 118.47 C-1; 64.95 C-3; 55.93 C-5; 51.83 C-6; 47.42+46.45+45.51 C-7.

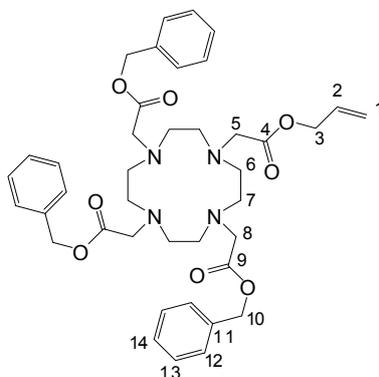
MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 270.0 (271.2).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 271.2 (271.2).

### **(4-Allyloxycarbonylmethyl-7,10-bis-benzyloxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (78):**

Zu einer Lösung von (1,4,7,10-Tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäureallylester (290 mg, 1.07 mmol) in MeCN (40 mL) wurden  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (600 mg, 4.28 mmol) als Feststoff und eine

Lösung von Bromessigsäurebenzylester (671  $\mu\text{L}$ , 4.28 mmol) in MeCN (10 mL) zugegeben und über Nacht reagieren gelassen. Die Suspension wurde filtriert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  9:1 als Eluent ( $R_f = 0.2$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser aushärtender Schaum erhalten (340 mg, 0.48 mmol, 44%).



$^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.41-7.29 (m, 15H, H-12 – H-14); 6.00-5.85 (m, 1H, H-2); 5.38-5.22 (m, 2H, H-1); 5.17-5.07 (m, 6H, H-10); 4.62-4.57 (m, 2H, H-3); 3.97-3.94 (m, 5H, H-5+H-8); 3.49-2.54 (m, 16H, H-6+H-7).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

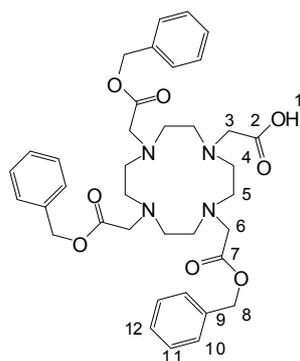
174.04 C-4; 173.81 C-9; 136.45 C-11; 132.97 C-2; 129.09 C-13; 128.85 C-14; 128.66 C-12; 118.76 C-1; 66.67 C-10; 66.57 C-3; 65.78 C-8; 65.44 C-5; 55.51+55.40+53.21+49.12 C-6+C-7.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 714.6 (715.4).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 715.3 (715.4).

### **(4,7,10-Tris-benzyloxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäure (Tris-benzyl-DOTA) (79):**

Zu einer Lösung von (4-Allyloxycarbonylmethyl-7,10-bis-benzyloxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäurebenzylester (340 mg, 0.48 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) wurden Morpholin (827 mg, 9.5 mmol) und Tetrakis-(triphenylphosphin)-palladium (165 mg, 0.14 mmol) zugegeben und 3 Stunden reagieren gelassen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Wasser:MeCN 45:55 + 0.1% TFA als Eluent ( $R_f = 0.5$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser aushärtender Schaum erhalten (230 mg, 0.34 mmol, 71%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

7.37-7.30 (m, 15H, H-10 – H-12); 5.14-5.09 (m, 6H, H-8); 4.11-4.02 (m, 2H, H-3); 3.80-3.74 (m, 6H, H-6); 3.42-3.07 (m, 16H, H-4+H-5).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

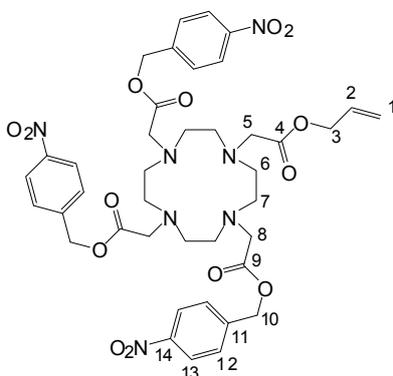
170.80 C-2; 169.72 C-7; 136.22 C-9; 129.12 C-11; 128.84 C-12; 128.75 C-10; 66.70 C-3; 63.92 C-6; 54.29+53.65+51.48+49.17 C-4+C-5.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 673.9 (675.3).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 675.3 (675.3).

**(4-Allyloxycarbonylmethyl-7,10-bis-4-nitro-benzyloxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäure-4-nitrobenzylester (80):**

Zu einer Lösung von (1,4,7,10-Tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäureallylester (291 mg, 1.08 mmol) in MeCN (40 mL) wurden  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (604 mg, 4.31 mmol) als Feststoff und eine Lösung von Bromessigsäure-4-nitrobenzylester (1.18 g, 4.31 mmol) in MeCN (10 mL) zugegeben und für 2 Stunden reagieren gelassen. Die Suspension wurde filtriert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  9:1 als Eluent ( $R_f = 0.1$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser aushärtender Schaum erhalten (720 mg, 0.87 mmol, 78%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.23 (d, 6H,  $J^3=8.8$ , H-13); 7.69 (d, 6H,  $J^3=8.8$ , H-12); 5.98-5.85 (m, 1H, H-2); 5.39-5.21 (m, 8H, H-1+H-10); 4.61-4.58 (m, 2H, H-3); 4.05 (s, 6H, H-8); 3.96 (s, 2H, H-5); 3.24 (s, 16H, H-6+H-7).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

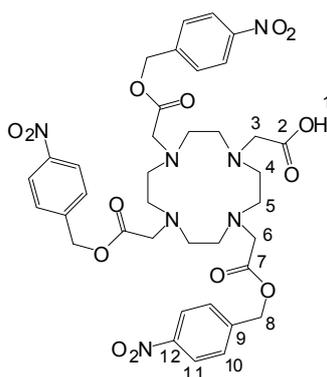
169.06 C-9; 168.41 C-4; 147.85 C-14; 144.07 C-11; 132.85 C-2; 129.39 C-12; 124.23 C-13; 118.99 C-1; 65.51+65.34 C-3+C-5+C-8+C-10; 53.74+53.21+49.15 C-6+C-7.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 850.2 (850.3).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 850.4 (850.3).

### **(4,7,10-Tris-4-nitro-benzyloxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäure (Tris-4-nitro-benzyl-DOTA) (81):**

Zu einer Lösung von (4-Allyloxycarbonylmethyl-7,10-bis-4-nitro-benzyloxycarbonylmethyl-1,4,7,10-tetraaza-cyclododec-1-yl)-essigsäure-4-nitrobenzylester (720 mg, 0.87 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) wurden Morpholin (1.47 g, 17 mmol) und Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (294 mg, 0.25 mmol) zugegeben und für eine Stunde reagieren gelassen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Wasser:MeCN 1:1 + 0.1% TFA als Eluent ( $R_f = 0.5$ ) aufgereinigt. Das Produkt wurde als farbloser aushärtender Schaum erhalten (190 mg, 0.23 mmol, 27%).



$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

8.23 (d, 6H,  $J^3=8.8$ , H-11); 7.69 (d, 6H,  $J^3=8.8$ , H-10); 5.37-5.24 (m, 6H, H-8); 4.12-4.04 (m, 2H, H-3); 4.03 (s, 6H, H-6); 3.21 (s, 16H, H-4+H-5).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ) ( $\delta$ , ppm;  $J$ , Hz):

168.96 C-7; 168.21 C-2; 147.63 C-12; 144.01 C-9; 129.28 C-10; 124.18 C-11; 66.84 C-3; 65.49+65.30 C-6+C-8; 53.69+53.19+49.11 C-4+C-5.

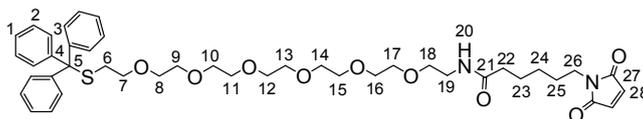
MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 809.7 (810.3).

## **4.5 Synthese der DOTA-Dendrimere**

### **G<sub>0</sub> Maleinimid (82):**

Eine Lösung von PyBOP (109 mg; 210  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) wurde zu Maleimidohexansäure (45 mg; 214  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und für 2 Minuten reagieren

gelassen. Anschließend wurde diese Mischung zu einer Lösung des G<sub>0</sub>-Dendrimers (50 mg; 86 μmol) in DMF (200 μL) gegeben und eine Stunde reagieren gelassen. Hierzu wurden 1M NaOH (300 μL) und MeCN (1 mL) gegeben und anschließend wurden die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 12 min als Gradient (R<sub>t</sub> = 4.3 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als farbloses Öl erhalten (33 mg, 43 μmol, 49%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ, ppm; *J*, Hz):

7.41-7.16 (m, 15H, H-1 – H-3); 6.66 (s, 2H, H-28); 3.63-3.42 (m, 26H, H-8 – H19+H-26); 3.29 (t, 2H, *J*<sup>3</sup>=6.9, H-7); 2.41 (t, 2H, *J*<sup>3</sup>=6.9, H-6); 2.18 (t, 2H, *J*<sup>3</sup>=7.4, H-22); 1.69-1.53 (m, 4H, H-23+H-25); 1.34-1.24 (m, 2H, H-24).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) (δ, ppm; *J*, Hz):

173.63 C-21; 170.76 C-27; 144.75 C-4; 133.99 C-28; 129.55 C-2; 127.80 C-3; 126.59 C-1; 70.41+70.35+70.11+70.06+69.76+69.55+66.56 C-7 – C-18; 39.32 C-19; 37.58 C-26; 36.12 C-22; 31.59 C-6; 28.21 C-25; 26.29 C-24; 25.12 C-23.

MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 777.8 (777.4).

### STriyl-G<sub>0</sub> DOTA<sub>1</sub> (83):

Zu einer Lösung des G<sub>0</sub> Maleinimides (20 mg, 25.8 μmol) in MeCN (200 μL) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (48 mg; 103 μmol) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250 μL) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient (R<sub>t</sub> = 3.5 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als weißer Feststoff erhalten (31 mg, 25 μmol, 96%).

MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1240.0 (1239.6).

ESI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 1239.7 (1239.6).

### SH-G<sub>0</sub> DOTA<sub>1</sub> (84):

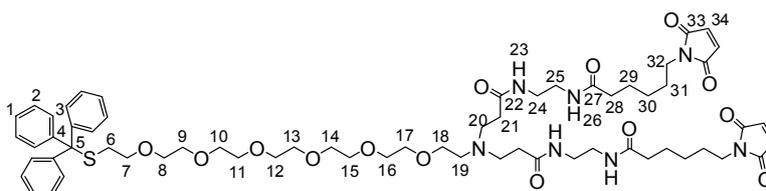
DOTA<sub>1</sub>-STriyl (31 mg, 25 μmol) wurde in einem Gemisch aus TIS (200 μL) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient (R<sub>t</sub> = 2.7 min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als farbloses Öl erhalten (21 mg, 21 μmol, 84%).

MALDI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 997.4 (998.4).

ESI-MS (*m/z*) für [M + H]<sup>+</sup> (berechnet): 998.5 (998.4).

### G<sub>1</sub> Maleinimid (85):

Eine Lösung von PyBOP (157 mg; 302  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (50  $\mu\text{L}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) wurde zu Maleimido-hexansäure (65 mg; 308  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Anschließend wurde dieses Gemisch zu einer Lösung des G<sub>1</sub>-Dendrimers (50 mg; 62  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) gegeben und eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurden 1M NaOH (300  $\mu\text{L}$ ) und MeCN (1 mL) zugegeben und die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 12 min als Gradient ( $R_t = 3.8$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als farbloses Öl erhalten (62 mg, 52  $\mu\text{mol}$ , 84%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

7.39-7.17 (m, 15H, H-1 – H-3); 6.66 (s, 4H, H-34); 3.63-3.27 (m, 44H, H-7 – H21+H-24+H-25+H-32); 2.41 (t, 2H,  $J^3=6.6$ , H-6); 2.18 (bt, 4H,  $J^3=7.0$ , H-28); 1.63-1.52 (m, 8H, H-29+H-31); 1.32-1.21 (m, 4H, H-30).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

170.30 C-33; 166.39+166.16 C-22+C-27; 140.16 C-4; 129.52 C-34; 125.03 C-2; 123.38 C-3; 122.20 C-1; 65.74+65.64+65.38+65.04+62.14+59.98 C-7 – C-18; 46.59 C-20; 35.14 C-19; 34.53 C-21; 33.03 C-31; 31.43 C-6; 27.15 C-28; 23.63 C-32; 21.68 C-30; 20.58 C-29.

MALDI-MS (*m/z*) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 1199.8 (1198.6).

### STrityl-G<sub>1</sub> DOTA<sub>2</sub> (86):

Zu einer Lösung des G<sub>1</sub> Maleinimides (20 mg, 16.7  $\mu\text{mol}$ ) in MeCN (200  $\mu\text{L}$ ) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (62 mg; 134  $\mu\text{mol}$ ) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 2.7$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als weißer Feststoff erhalten (31 mg, 14.6  $\mu\text{mol}$ , 87%).

MALDI-MS (*m/z*) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 2126.8 (2125.0).

ESI-MS (*m/z*) für  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (berechnet): 2125.2 (2125.0).

### SH-G<sub>1</sub> DOTA<sub>2</sub> (87):

DOTA<sub>2</sub>-STrityl (31 mg, 14.6  $\mu\text{mol}$ ) wurde in einem Gemisch aus TIS (200  $\mu\text{L}$ ) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC

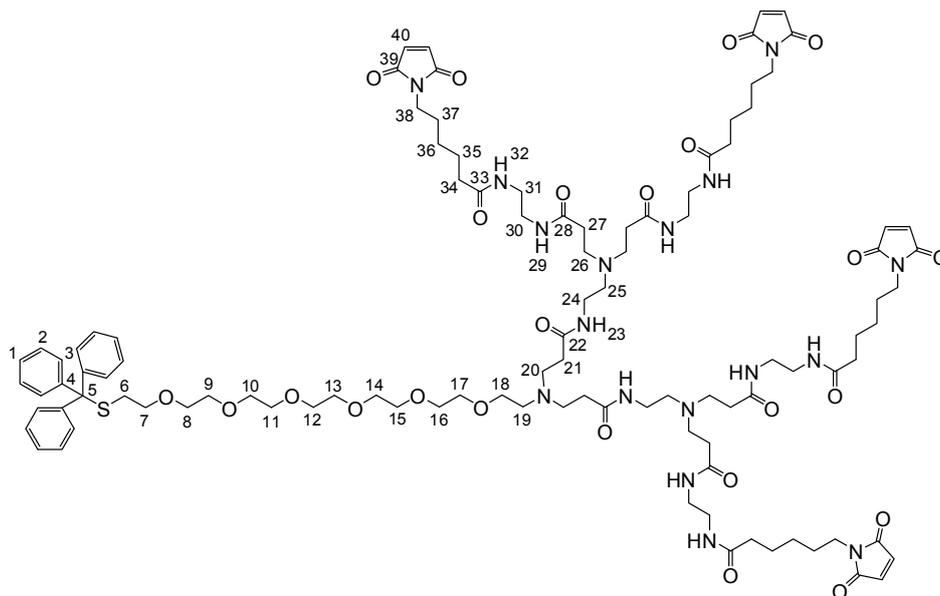
mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.6$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als farbloses Öl erhalten (26 mg, 13.8  $\mu$ mol, 95%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1883.6 (1881.9).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 1882.0 (1881.9).

### G<sub>2</sub> Maleinimid (88):

Eine Lösung von PyBOP (201 mg; 386  $\mu$ mol) und DIPEA (100  $\mu$ L) in DMF (300  $\mu$ L) wurde zu Maleimidohexansäure (83 mg; 394  $\mu$ mol) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung von G<sub>2</sub>-Dendrimer (50 mg; 39  $\mu$ mol) in DMF (200  $\mu$ L) gegeben und für eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurden 1M NaOH (300  $\mu$ L) und MeCN (1 mL) zugegeben und die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 5.2$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als hellgelbes Öl erhalten (58 mg, 28  $\mu$ mol, 73%).



<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

7.39-7.16 (m, 15H, H-1 – H-3); 6.68 (s, 8H, H-40); 3.68-3.18 (m, 76H, H-7 – H<sub>21</sub>+H-24 – H-27+H-30+H-31+H-38); 2.40 (t, 2H,  $J^3=6.7$ , H-6); 2.18 (bs, 8H, H-34); 1.62-1.48 (m, 16H, H-35+H-37); 1.32-1.19 (m, 8H, H-36).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ( $\delta$ , ppm; *J*, Hz):

169.84 C-39; 166.48+166.18+166.08 C-22+C-28+C-33; 140.21 C-4; 129.59 C-40; 125.04 C-2; 123.35 C-3; 122.17 C-1; 65.79+65.68+65.43+65.00+64.65+62.10 C-7 – C-18; 34.96 C-21; 33.02 C-37; 31.47 C-6; 27.13 C-34; 23.63 C-38; 21.67 C-36; 20.56 C-35.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 2042.3 (2041.1).

**STrityl-G<sub>2</sub> DOTA<sub>4</sub> (89):**

Zu einer Lösung des G<sub>2</sub> Maleinimides (20 mg, 9.8 µmol) in MeCN (200 µL) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (73 mg; 157 µmol) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250 µL) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 20-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 2.3$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als weißer Feststoff erhalten (31 mg, 8.0 µmol, 81%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3895.1 (3894.9).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3895.4 (3894.9).

**SH-G<sub>2</sub> DOTA<sub>4</sub> (90):**

DOTA<sub>4</sub>-STrityl (31 mg, 8.0 µmol) wurde in einem Gemisch aus TIS (200 µL) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.6$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als farbloses Öl erhalten (25 mg, 6.8 µmol, 70%).

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3654.6 (3652.8).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3652.8 (3652.8).

**G<sub>3</sub> Maleinimid (91):**

Eine Lösung von PyBOP (111 mg; 213 µmol) und DIPEA (40 µL) in DMF (300 µL) wurde zu Maleimidohexansäure (46 mg; 220 µmol) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung von G<sub>3</sub>-Dendrimer (20 mg; 9.2 µmol) in DMF (200 µL) gegeben und eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurden 1M NaOH (200 µL) und MeCN (1 mL) zugegeben und die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 10-100% MeCN + 0.1% TFA in 10 min als Gradient ( $R_t = 4.3$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbenes Öl erhalten (28 mg, 7.5 µmol, 82%).

ESI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 3728.0 (3727.2).

**STrityl-G<sub>3</sub> DOTA<sub>8</sub> (92):**

Zu einer Lösung des G<sub>3</sub> Maleinimides (28 mg, 7.5 µmol) in MeCN (200 µL) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (111 mg; 241 µmol) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250 µL) zugegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 3.6$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (49 mg, 6.6 µmol, 89%).

Die Anzahl der funktionellen Chelate pro Dendrimer wurde mittels Isotopenverdünnungstitration zu  $9.9 \pm 2.8$  bestimmt.

**SH-G<sub>3</sub> DOTA<sub>8</sub> (93):**

DOTA<sub>8</sub>-STrityl (32 mg, 4.3 μmol) wurde in einem Gemisch aus TIS (200 μL) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und der Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 3.5$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (30 mg, 4.2 μmol, 98%).

ESI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 7191.3 (7192.5).

**G<sub>4</sub> Maleinimid (94):**

Eine Lösung von (120 mg; 232 μmol) und DIPEA (50 μL) in DMF (300 μL) wurde zu Maleimidohexansäure (51 mg; 240 μmol) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung von G<sub>4</sub>-Dendrimer (20 mg; 5 μmol) in DMF (200 μL) gegeben und eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurden 1M NaOH (200 μL) und MeCN (1 mL) zugegeben und die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC mit 10-100% MeCN + 0.1% TFA in 12 min als Gradient ( $R_t = 4.3$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten.

ESI-MS (m/z) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 7099.9 (7099.0).

**STrityl-G<sub>4</sub> DOTA<sub>16</sub> (95):**

Zu einer Lösung von G<sub>4</sub> Maleinimid (29 mg, 4.1 μmol) in MeCN (200 μL) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (121 mg; 262 μmol) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250 μL) zugegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 3.2$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (46 mg, 3.2 μmol, 77%).

Die Anzahl der funktionellen Chelate pro Dendrimer wurde mittels Isotopenverdünnungstitration zu  $17.2 \pm 0.4$  bestimmt.

**SH G<sub>4</sub> DOTA<sub>16</sub> (96):**

DOTA<sub>16</sub>-STrityl (46 mg, 3.2 μmol) wurde in einem Gemisch aus TIS (200 μL) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.4$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (44 mg, 3.1 μmol, 96%).

**G<sub>5</sub> Maleinimid (97):**

Eine Lösung von PyBOP (151 mg; 291  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (75  $\mu\text{L}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) wurde zu Maleimidohexansäure (64 mg; 301  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung von G<sub>5</sub>-Dendrimer (24 mg; 3.1  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurden 1M NaOH (200  $\mu\text{L}$ ) und MeCN (1 mL) zugegeben und die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC mit 25-100% MeCN + 0.1% TFA in 9 min als Gradient ( $R_t = 2.7$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (20 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ , 46%).

Die Anzahl der Maleinimide pro Dendrimer wurde mittels Rücktitration mit MESNA und Ellman's Assay zu  $33.1 \pm 3.9$  bestimmt.

**STrityl-G<sub>5</sub> DOTA<sub>32</sub> (98):**

Zu einer Lösung des G<sub>5</sub> Maleinimides (20 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ ) in MeCN (200  $\mu\text{L}$ ) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (86 mg; 185  $\mu\text{mol}$ ) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.9$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (28 mg, 0.98  $\mu\text{mol}$ , 67%).

Die Anzahl der funktionellen Chelate pro Dendrimer wurde mittels Isotopenverdünnungstitration zu  $32.3 \pm 0.3$  bestimmt.

**SH-G<sub>5</sub> DOTA<sub>32</sub> (99):**

DOTA<sub>32</sub>-STrityl (28 mg, 0.98  $\mu\text{mol}$ ) wurde in einem Gemisch aus TIS (200  $\mu\text{L}$ ) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 3.2$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (24 mg, 0.85  $\mu\text{mol}$ , 86%).

**G<sub>6</sub> Maleinimid (100):**

Eine Lösung von PyBOP (175 mg; 336  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (100  $\mu\text{L}$ ) in DMF (300  $\mu\text{L}$ ) wurde zu Maleimidohexansäure (72 mg; 343  $\mu\text{mol}$ ) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung des G<sub>6</sub>-Dendrimers (30 mg; 2.1  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (200  $\mu\text{L}$ ) gegeben und für eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurden 1M NaOH (200  $\mu\text{L}$ ) und MeCN (1 mL) hinzugegeben und die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 13 min als Gradient ( $R_t = 6.7$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (29 mg, 1.1  $\mu\text{mol}$ , 52%).

Die Anzahl der Maleinimide pro Dendrimer wurde mittels Rücktitration mit MESNA und Ellman's Assay zu  $62.9 \pm 6.8$  bestimmt.

#### **STrityl-G<sub>6</sub> DOTA<sub>64</sub> (101):**

Zu einer Lösung von G<sub>6</sub> Maleinimid (29 mg, 1.1 μmol) in MeCN (200 μL) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (130 mg; 282 μmol) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250 μL) gegeben und für 10 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 3.2$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (31 mg, 0.56 μmol, 51%).

Die Anzahl der funktionellen Chelate pro Dendrimer wurde mittels Isotopenverdünnungstitration zu  $68.1 \pm 6.7$  bestimmt.

#### **SH-G<sub>6</sub> DOTA<sub>64</sub> (102):**

DOTA<sub>64</sub>-STrityl (31 mg, 0.56 μmol) wurde in einem Gemisch aus TIS (200 μL) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 7 min als Gradient ( $R_t = 2.3$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (21.8 mg, 0.39 μmol, 70%).

#### **G<sub>7</sub> Maleinimid (103):**

Eine Lösung von PyBOP (136 mg; 262 μmol) und DIPEA (50 μL) in DMF (300 μL) wurde zu Maleimidohexansäure (57 mg; 269 μmol) gegeben und für 2 Minuten reagieren gelassen. Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung von G<sub>7</sub>-Dendrimer (30 mg; 1.1 μmol) in DMF (200 μL) gegeben und für eine Stunde reagieren gelassen. Anschließend wurden 1M NaOH (200 μL) und MeCN (1 mL) zugegeben und die flüchtigen Komponenten des Gemisches entfernt. Der Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 14 min als Gradient ( $R_t = 7.4$  min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als braunes Öl erhalten (16 mg, 0.3 μmol, 29%).

Die Anzahl der Maleinimide pro Dendrimer wurde mittels Rücktitration mit MESNA und Ellman's Assay zu  $120.2 \pm 10.5$  bestimmt.

#### **STrityl-G<sub>7</sub> DOTA<sub>128</sub> (104):**

Zu einer Lösung von G<sub>7</sub> Maleinimid (16 mg; 0.3 μmol) in MeCN (200 μL) wurde eine Lösung von Thiol-DOTA (72 mg; 154 μmol) in PBS (0.05 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 250 μL) gegeben und für 10 Minuten reagieren gelassen. Das Rohprodukt wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 3.1$

min) aufgereinigt und das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (22.5 mg, 0.20  $\mu$ mol, 65%).

Die Anzahl der funktionellen Chelate pro Dendrimer wurde mittels Isotopenverdünnungstitration zu  $155.1 \pm 23.7$  bestimmt.

#### **SH-G<sub>7</sub> DOTA<sub>128</sub> (105):**

DOTA<sub>128</sub>-STrityl (18 mg, 0.16  $\mu$ mol) wurde in einem Gemisch aus TIS (200  $\mu$ L) und TFA (2 mL) gelöst und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die flüchtigen Komponenten des Gemisches wurden entfernt und der Rückstand wurde mittels semipräparativer HPLC mit 0-100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min als Gradient ( $R_t = 3.1$  min) aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation als ockerfarbener Feststoff erhalten (12.5 mg, 0.11  $\mu$ mol, 69%).

## **4.6 Antikörper-Derivatisierungen**

#### **Derivatisierung von hMAb425 (Matuzumab) mit Sulfo-SMCC:**

Eine frisch angesetzte Lösung von Sulfo-SMCC (7 eq., 42  $\mu$ g,  $9.7 \times 10^{-8}$  mol) in DMF:Wasser 1:1 (10  $\mu$ L) wurde zu einer Lösung des Antikörpers (2 mg,  $1.39 \times 10^{-8}$  mol) in PBS (0.1 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 500  $\mu$ L) gegeben und eine Stunde reagieren gelassen. Der derivatisierte Antikörper wurde mittels NAP-5 Größenausschluss-Gelsäulen (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala) isoliert und in hohen Ausbeuten zwischen 95 und 98% erhalten. Die Zahl der Maleimide pro Antikörper wurde wie oben beschrieben mittels Rücktitration und Ellman's Assay bestimmt. Die Zahl der Maleimide betrug zwischen 1.4 und 1.7 pro Antikörper.

Reaktionen mit größeren Überschüssen von Sulfo-SMCC wurden analog durchgeführt.

#### **hMAb425-Dansyl<sub>1</sub>:**

Zu einer Lösung des mit Sulfo-SMCC derivatisierten Antikörpers (1.6 mg,  $1.11 \times 10^{-8}$  mol) in PBS (0.1 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 1 mL) wurde eine frisch angesetzte Lösung von Dansyl<sub>1</sub>-SH (0.16 mg,  $2.78 \times 10^{-7}$  mol) in DMSO (100  $\mu$ L) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Produkt wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex™ 200 10/30 GL Säule aufgereinigt ( $R_t = 7.6$  min) und mittels NAP-5 Größenausschluss-Gelsäule entsalzt. Das Produkt wurde in moderaten Ausbeuten von 34 – 39% erhalten.

#### **hMAb425-Dansyl<sub>16</sub>:**

Zu einer Lösung des mit Sulfo-SMCC derivatisierten Antikörpers (1.6 mg,  $1.11 \times 10^{-8}$  mol) in PBS (0.1 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 1 mL) wurde eine frisch angesetzte Lösung von

Dansyl<sub>16</sub>-SH (4.0 mg,  $2.78 \times 10^{-7}$  mol) in DMSO (100  $\mu$ L) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Das Produkt wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex™ 200 10/30 GL Säule aufgereinigt ( $R_t = 7.6$  min) und mittels NAP-5 Größenausschluss-Gelsäule entsalzt. Das Produkt wurde in moderaten Ausbeuten von 23 – 31% erhalten und mittels MALDI-TOF Spektrometrie und Gelelektrophorese charakterisiert.

MALDI-MS ( $m/z$ ) für  $[M + H]^+$  (berechnet): 157396.0 (157449.6).

#### **hMAb425-DOTA<sub>x</sub>-Dendrimere:**

Zu einer Lösung des mit Sulfo-SMCC derivatisierten Antikörpers (1.6 mg,  $1.11 \times 10^{-8}$  mol) in PBS (0.1 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 500  $\mu$ L) wurde eine frisch angesetzte Lösung des jeweiligen DOTA-Multimers (25 eq.,  $2.78 \times 10^{-7}$  mol) in PBS (0.1 M, 0.15 M NaCl, pH 7.2, 100  $\mu$ L) gegeben und für 5 Minuten reagieren gelassen. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex™ 200 10/30 GL Säule analysiert ( $R_t$  der Produkte zwischen 13.7 and 16.1 min).

Die Umsetzungen mit geringeren Überschüssen der DOTA-Multimere wurden analog durchgeführt.

#### **Derivatisierung von hMAb425 mit FITC:**

Zu einer Lösung des Antikörpers (2 mg,  $1.39 \times 10^{-8}$  mol) in Carbonatpuffer (0.1 M, pH 9.5, 1 mL) wurde eine Lösung von FITC (0.4 mg,  $1.03 \times 10^{-6}$  mol) in Carbonatpuffer (0.1 M, pH 9.5, 100  $\mu$ L) gegeben und für 4 Stunden unter Lichtausschluss reagieren gelassen. Der derivatisierte Antikörper wurde mittels NAP-25 Größenausschluss-Gelsäulen isoliert und in hohen Ausbeuten zwischen 95 und 98% erhalten. Die Anzahl der pro Antikörper gekoppelten FITC-Moleküle wurde folgendermaßen bestimmt:

Eine Lösung von FITC (10 mg,  $2.57 \times 10^{-5}$  mol) in Carbonatpuffer (0.1 M, pH 9.5, 1 mL) wurde so verdünnt, dass Lösungen mit den Konzentrationen  $2.57 \times 10^{-9}$  mol,  $7.71 \times 10^{-9}$  mol,  $1.29 \times 10^{-8}$  mol,  $1.80 \times 10^{-8}$  mol,  $2.31 \times 10^{-8}$  mol und  $2.57 \times 10^{-8}$  mol erhalten wurden. Von diesen Lösungen wurden mittels eines UV/VIS Spektrometers Absorptionsspektren aufgenommen und die Flächen unter den Absorptionskurven bestimmt. Mittels dieser Werte wurde eine Eichgerade erstellt. Anschließend wurde von dem FITC-markierten Antikörper ebenfalls ein Absorptionsspektrum aufgenommen und die Fläche unter der Kurve und damit der FITC-Gehalt der Lösung bestimmt. Die Anzahl der gekoppelten FITC-Moleküle pro Antikörper lag bei 1.8.

#### **4.6.1 Durchführung der Fluoreszenz-Zellexperimente mit hMAb425-Dansyl<sub>16</sub> und hMAb425-FITC**

A431-Zellen wurden auf runden Mikroskop-Deckgläschen ( $d = 12 \text{ mm}$ ) ausplattiert (jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen). Zellen auf den Deckgläschen wurden mit Paraformaldehyd (4% in PBS, 20 Minuten bei Raumtemperatur) oder Methanol (30 Minuten bei  $-20^\circ\text{C}$ ) fixiert. Fixierte Zellen wurden mit den verschiedenen Antikörper-Konjugaten (hMAb425-FITC, hMAb425-Dansyl<sub>1</sub>, hMAb425-Dansyl<sub>16</sub>) oder unkonjugiertem Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (Ausgangskonzentration der Antikörper 0.8 mg/ml). Die Verdünnung der Antikörperlösungen betrug 1:10 und 1:20. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS für 5 min gewaschen.

Lebende Zellen wurden in gleicher Weise mit den vier verschiedenen Antikörpern (Verdünnung 1:10) über 30 min inkubiert, gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd (4%) 15 min lang fixiert.

Im Anschluss an die Antikörperfärbung wurden die Zellen auf den Deckgläschen für die Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 Konzentration  $1 \mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ ) für 10 min inkubiert und erneut 3x mit PBS für je 5 min gewaschen. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Deckgläschen mit den Zellen auf Mikroskopobjektträger mit Fluoromount G (Southern Biotech) eingedeckt und nach einer Trocknungsphase von mindestens 12 Stunden mikroskopiert.

#### **4.6.2 Bestimmung der Immunreaktivität der Matuzumab-Konjugate**

##### **Zellen:**

Die humane, in den EGF-Rezeptor überexprimierende, Adenokarzinomzelllinie HT29 wurde in RPMI 1640 Medium, ergänzt mit 2 mM L-Glutamin, 1 mM Pyruvat and 10% inaktiviertem fötalem Kalb-Serum, kultiviert. Vor der Verwendung wurden die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche unter Verwendung von 0.25% Trypsin und 0.25% EDTA in PBS abgelöst und gezählt.

##### **Durchflusszytometrie:**

Lösungen verschiedener Konzentration der Matuzumab-Konjugate wurden hinsichtlich ihrer Bindung an HT29-Zellen mit unmodifiziertem Matuzumab verglichen. Hierfür wurden Lösungen mit Antikörperkonzentrationen von  $5 \mu\text{g/mL}$  bis  $1 \text{ ng/mL}$  in FACS-Puffer (Dulbecco's PBS mit 2% fötalem Kälber-Serum und 0.1 % Natriumazid) verwendet. Die Färbung wurde in einer 96-well Microtiterplatte (U-bottom) durchgeführt. Hierfür wurden pro well  $100 \mu\text{L}$  der jeweiligen Antikörper-Lösung mit  $50 \mu\text{L}$  einer Zellsuspension, die

$5 \times 10^5$  HT-29 Zellen enthielt, für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit einem F(ab)<sub>2</sub> Ziegen-anti-human IgG (H+L)-FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA; 1:100 in FACS-Puffer verdünnt; 100 µL pro well) für eine Stunde unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zweimal gewaschen. Tote Zellen wurden mittels Propidiumiodid-Färbung identifiziert. Die Analyse der Proben wurde mit einem FACScan Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) mit CELLQUEST Software durchgeführt. Für den unmodifizierten Antikörper und die Antikörper-Dendrimer-Konjugate wurden durch Auftragen der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) gegen die jeweilige Antikörperkonzentration Bindungskurven erhalten. Aus diesen ließen sich die veränderten Immunreaktivitäten der Antikörper-Dendrimer-Konjugate im Verhältnis zum unmodifizierten Antikörper erhalten.

## 4.7 Assays

### **Ellman´s Assay:**

Eine 2 mM Lösung eines langsam oxidierenden Thiols (beispielsweise MESNA (2-Mercapto-ethansulfonsäure Natriumsalz)) in PP (0.1 M, pH 8) wurde so verdünnt, dass Lösungen der folgenden Konzentrationen erhalten wurden: 125 µM, 64 µM, 32 µM, 16 µM, 8 µM, 4 µM und 2 µM. Zu je 1 mL dieser Lösungen wurden 200 µL einer Lösung von Ellman´s Reagenz (5,5´-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), 4 mg/mL in PB (0.1M, pH 8)) gegeben und etwa 1 Minute reagieren gelassen. Die erhaltenen Lösungen wurden mittels eines UV/VIS Spektrometers bei 412 nm vermessen und eine Eichgerade erstellt.

Der Thiol-Gehalt von Proben wurde ermittelt, indem zu 1 mL der zu analysierenden Lösung 200 µL der Ellman´s Reagenz-Lösung gegeben wurden. Die erhaltene Mischung wurde bei 412 nm im UV/VIS Spektrometer vermessen und der Thiol-Gehalt aus der Eichgerade ermittelt.

### **Bradford Assay:**

Eine Lösung von Matuzumab in Wasser (20 mg/mL) wurde so verdünnt, dass Lösungen der folgenden Konzentrationen erhalten wurden: 1 mg/mL, 0.9 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.3 mg/mL und 0.1 mg/mL. Je 50 µL dieser Lösungen wurden zu je 1 mL einer kommerziell erhältlichen und auf Raumtemperatur erwärmten Bradford Reagenz-Lösung (Sigma-Aldrich) gegeben und für genau 10 Minuten reagieren gelassen. Die erhaltenen Lösungen wurden mittels eines UV/VIS Spektrometers bei 595 nm vermessen und eine Eichgerade erstellt.

Der Protein-Gehalt von Proben wurde ermittelt, indem zu 1 mL der Bradford Reagenz-Lösung 50 µL der Proben-Lösung gegeben wurden. Die erhaltene Lösung wurde nach

genau 10 Minuten bei 595 nm im UV/VIS Spektrometer vermessen und der Protein-Gehalt aus der Eichgerade ermittelt.

### **Isotopenverdünnungstitration:**

Aus Indium(III)-chlorid Hexaquokomplex wurden Lösungen der Konzentrationen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $7.5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $2.5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $7.5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $2.5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  mol/mL in Natriumacetat-Puffer (0.4 M, pH 5) hergestellt und jeweils mit wenigen MBq  $^{111}\text{In}$  versetzt. Von den DOTA-Multimeren wurden Lösungen mit der Konzentration  $10^{-7}$  mol/mL (bezogen auf DOTA) in Natriumacetat-Puffer (0.4 M, pH 5) hergestellt. Jeweils 50  $\mu\text{L}$  der DOTA-Multimer- und Indium-Lösungen wurden gemischt und für 20 Minuten bei 60 °C reagieren gelassen. Anschließend wurde konzentrierte EDTA-Lösung (50  $\mu\text{L}$ ) zugegeben und nochmals 20 Minuten bei 60 °C reagieren gelassen. Die erhaltenen Lösungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie mit Natriumacetat-Puffer (0.4 M, pH 5) als mobiler Phase analysiert und das Verhältnis von freier ( $R_f \approx 0.8$ ) zu über DOTA-Multimere komplexierter ( $R_f = 0$ ) Radioaktivität wurde mittels  $\gamma$ -Counter bestimmt. Durch Auftragung des Anteils der komplexierten Aktivität gegen die Konzentration der Indium-Lösungen konnte die DOTA-Konzentration in der Ausgangslösung und somit die Anzahl der aktiven Chelate pro Dendrimer bestimmt werden.

## **5 Zusammenfassung**

Für eine Verbesserung der radiometallbasierten Diagnostik und Therapie sowie der Diagnostik mittels Fluoreszenzfarbstoffen sollten Chelat- und Fluoreszenzfarbstoff-Multimere auf der Basis von Dendrimeren hergestellt werden. Diese sollten in den gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Antikörper Matuzumab eingeführt und die hergestellten Antikörper-Dendrimer-Konjugate auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht werden.

### **Synthese der PAMAM-Dendrimere als Basis für die Multimerisierung**

Hierfür wurde zunächst ein Pentaethylenglycol-Linker synthetisiert, der eine verbesserte Zugänglichkeit des für die Ankopplung vorgesehenen Thiols während der Einführung in beliebige Carrier-Moleküle ermöglichen sollte. Auf diesem Linker wurden die PAMAM-Dendrimere verschiedener Generationen und damit Größe aufgebaut. Hierfür musste allerdings zunächst die PAMAM-Dendrimer-Synthese optimiert werden, da mittels der publizierten Syntheseprotokolle nur Dendrimere unzureichender Homogenität erhalten werden konnten. Mit den optimierten Syntheseprotokollen war es möglich, bis zu 128 Aminfunktionen enthaltende Dendrimere in hoher Homogenität mit nur geringer Fragmentierung auf dem Pentaethylenglycol-Linker zu synthetisieren. Die erhaltenen Dendrimere waren damit für weitergehende Multimerisierungsreaktionen geeignet.

### **Darstellung der Fluoreszenzfarbstoff-Multimere**

Die hergestellten Dendrimere sollten mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt und die Fluoreszenzeigenschaften der so dargestellten Fluoreszenzfarbstoff-Multimere untersucht werden, um für die optische Bildgebung geeignete Multimere zu identifizieren. Es wurde eine große Anzahl von Fluoreszenzfarbstoffen auf ihre Multimerisierbarkeit hin untersucht, allerdings zeigten bereits mit den PAMAM-Dendrimeren niedriger Generationen mit ein bis vier Aminfunktionen nur Dansylchlorid, NBD-chlorid, Coumarin 343, 5(6)-Carboxyfluorescein-pentafluorphenyl-ester und Sulforhodamin B2 säurefluorid ausreichend hohe Reaktivitäten. Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der hergestellten Farbstoff-Multimere zeigte allerdings eine aufgrund des geringen Stokes-Shifts und des geringen Abstandes der Farbstoffe zueinander auftretende starke Fluoreszenzeigenlöschung des Fluoreszenzsignals der NBD-, Coumarin 343-, Carboxyfluorescein- und Sulforhodamin-Multimere. Hingegen zeigten die multidansylierten Systeme nur eine mäßige Fluoreszenzeigenlöschung der Fluoreszenzsignale, die linear mit der Anzahl der gekoppelten Farbstoffe zunahmen. Dansylchlorid war damit der einzige hier getestete Fluoreszenzfarbstoff, der sich prinzipiell für eine Multimerisierung auf der Basis von Dendrimeren eignet und eine nur

geringe durch die Multimerisierung verursachte Löschung des Fluoreszenzsignals zeigt. Es gelang, Farbstoff-Multimere mit 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 Dansylresten in hoher Homogenität zu erhalten und zu charakterisieren.

### **Antikörper-Derivatisierungen mit Fluoreszenzfarbstoff-Multimeren**

Die Dansyl-Multimere Dansyl<sub>8</sub>-SH, Dansyl<sub>16</sub>-SH, Dansyl<sub>32</sub>-SH und Dansyl<sub>64</sub>-SH wurden weiterhin auch mit dem Anti-EGFR Antikörper Matuzumab umgesetzt, in den zuvor mit Sulfo-SMCC Maleinimide eingeführt wurden. Hierbei zeigte sich, dass sich die größeren Dansyl-Multimere Dansyl<sub>32</sub>-SH und Dansyl<sub>64</sub>-SH nicht für eine Derivatisierung von Antikörpern eignen, da sie wahrscheinlich aufgrund ihrer hohen Lipophilie zur sofortigen Denaturierung des Antikörpers führten. Allerdings konnten die Dansyl-Multimere Dansyl<sub>8</sub>-SH und Dansyl<sub>16</sub>-SH in den Antikörper eingebracht werden, aber nur das Dansyl<sub>16</sub>-Antikörper-Konjugat ließ sich mittels Größenausschluss-Chromatographie aufreinigen und anschließend charakterisieren. Das Konjugat wurde hinsichtlich seiner Immunreaktivität relativ zum underivatisierten Antikörper untersucht und zeigte eine zu 54% erhaltene Immunreaktivität. Das Konjugat wurde außerdem fluoreszenzmikroskopisch an A431-Zellen untersucht, es konnten allerdings nur geringe Fluoreszenzsignale beobachtet werden.

Somit stellt also die Herstellung von Fluoreszenzfarbstoff-Multimeren einen vielversprechenden und chemisch durchführbaren Ansatz für eine Verbesserung der Fluoreszenzmarkierung von Carrier-Molekülen durch die Verstärkung von Fluoreszenzsignalen dar. Die Umsetzung dieses Ansatzes scheitert allerdings an den derzeit verfügbaren Farbstoffen, die nicht für einen solchen Multimerisierungsansatz geeignet sind, da sie entweder eine zu geringe Reaktivität für Multimerisierungsreaktionen oder die Multimere eine starke Fluoreszenzeigenlöschung aufweisen oder aber die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe selbst wie im Falle des Dansyls nicht ideal für die optische Bildgebung sind.

### **Darstellung der DOTA-Dendrimere, Optimierung der Synthese verschiedener DOTA-Derivate und Synthese eines neuen DOTA-Derivates**

Für eine Verbesserung der radiometallbasierten Diagnostik und Therapie sollten neben den Fluoreszenzfarbstoff-Multimeren auch in beliebige Carrier-Moleküle einführbare Chelat-Multimere hergestellt werden. Hierfür wurden die PAMAM-Dendrimere mit verschiedenen DOTA-Derivaten umgesetzt.

Zu diesem Zweck mussten allerdings zunächst die bekannten Syntheseprotokolle für Tris-*t*Bu-DOTA, Thiol-DOTA und Tris-benzyl-DOTA verbessert werden, da viele der publizierten Vorschriften komplex sind, nur für geringe Substanzmengen geeignet sind oder die Produkte nur in geringen Ausbeuten ergeben. Weiterhin wurde versucht, einige neue DOTA-Derivate mit säurelabilen Schutzgruppen wie beispielsweise Tris-4-

methoxybenzyl-DOTA, Tris-diphenylmethyl-DOTA, Tris-trityl-DOTA und Tris-trimethylsilyl-DOTA herzustellen, was jedoch aufgrund der hohen Reaktivität der Verbindungen nicht gelang. Außerdem wurde ein neues DOTA-Derivat, das Tris-4-nitrobenzyl-DOTA synthetisiert.

Nach der erfolgreichen Synthese der DOTA-Derivate Tris-*t*Bu-DOTA, Thiol-DOTA, Tris-benzyl-DOTA, Tris-4-nitrobenzyl-DOTA, Tris-allyl-DOTA, DOTA-PFP-ester und DOTA-PNP-ester folgte deren Umsetzung mit den PAMAM-Dendrimern und gegebenenfalls die Entschützung der Kopplungsprodukte. Dabei wurde festgestellt, dass sich Tris-*t*Bu-DOTA und Tris-allyl-DOTA zwar mit guten Ausbeuten koppeln ließen, dass ihre Entschützung allerdings problematisch war. Tris-4-nitrobenzyl-DOTA ließ sich nicht, Tris-benzyl-DOTA, DOTA-PFP-ester und DOTA-PNP-ester nur mit unzureichenden Ausbeuten, in die dendritischen Systeme einführen. Einzig Thiol-DOTA ließ sich nach vorangegangener Derivatisierung der Aminfunktionen mit Maleimidohexansäure quantitativ in die Dendrimere einführen und ergab die gewünschten Chelat-Multimere hoher Homogenität.

### **Antikörper-Derivatisierungen mit DOTA-Multimeren**

Die hergestellten Chelat-Multimere sollten nach ihrer vollständigen Charakterisierung ebenfalls in den Antikörper Matuzumab eingeführt werden. Dabei sollte sowohl die Anzahl als auch die Größe der eingeführten Dendrimere variiert werden, um systematisch zu untersuchen, welchen Einfluss die Größe und die Anzahl der gekoppelten Dendrimere auf die Immunreaktivität der derivatisierten Antikörper haben und ob ein Optimum mit größtmöglicher Anzahl von Chelatbildnern und geringst möglicher Verschlechterung der Immunreaktivität erreicht werden kann.

Dafür wurde der Antikörper zunächst so derivatisiert, dass 1.7, 2.8, 5.3 und 10.0 Maleinimide eingeführt wurden, die anschließend mit den Chelat-Multimeren mit 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 DOTAs umgesetzt wurden. Die erhaltenen Antikörper-DOTA-Multimer-Konjugate wurden hinsichtlich ihrer Immunreaktivität an HT29-Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass die Größe des angekoppelten DOTA-Multimers über einen weiten Molekulargewichtsbereich nur einen geringen Einfluss auf die Immunreaktivität des Antikörper-Dendrimer-Konjugates hat, dass jedoch die Anzahl der Derivatisierungsstellen pro Antikörper eine drastische Veränderung der Immunreaktivität bedingt.

Damit erscheint eine Antikörper-Derivatisierung mit möglichst wenigen, aber möglichst großen dendritischen Systemen am vorteilhaftesten für eine Verbesserung der antikörpergestützten radiometallbasierten Diagnostik und Therapie.

## 6 Literatur

- Ahmed, F.E. (2005) Molecular markers that predict response to colon cancer therapy. *Expert Rev. Mol Diagn.* 5(3), 353-375.
- Anelli, P.L., Lattuada, L., Gabellini, M., and Recanati, P. (2001) DOTA Tris(phenylmethyl) Ester: A New Useful Synthone for the Synthesis of DOTA Monoamides Containing Acid-Labile Bonds. *Bioconjugate Chem.* 12, 1081-1084.
- Asano, S., Kameyama, M., Oura, A., Morisato, A., Sakai, H., Tabuchi, Y., Chairoungdua, A., Endou, H., Kanai, Y. (2007) L-type amino acid transporter-1 expressed in human astrocytomas, U343MGa. *Biol. Pharm. Bull.* 30(3), 415-422.
- Backer, M.V., Gaynutdinov, T.I., Patel, V., Bandyopadhyaya, A.K., Thirumamagal, B.T., Tjarks, W., Barth, R.F., Claffey, K., Backer, J.M. (2005) Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature. *Mol. Cancer Ther.* 4(9), 1423-1429.
- Ball, E.D., Selvaggi, K., Hurd, D., Herzig, R., Clark, L., Malley, V., Persichetti, J., deMagelhaus-Silverman, M. (1995) Phase I clinical trial of serotherapy in patients with acute myeloid leukemia with an immunoglobulin M monoclonal antibody to CD15. *Clin. Cancer Res.* 1, 965-972.
- Barth, R.F., Adams, D.M., Soloway, A.H., Alam, F., Darby, M.V. (1994) Boronated starburst dendrimer-monoclonal antibody immunoconjugates: evaluation as a potential delivery system for neutron capture therapy. *Bioconjug. Chem.* 5, 58-66.
- Battah, S.H., Chee, C.E., Nakanishi, H., Gerscher, S., MacRobert, A.J., Edwards, C. (2001) Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem.* 12, 980-988.
- Behr, T.M., Behe, M., Lohr, M., Sgouros, G., Angerstein, C., Wehrmann, E., Nebendahl, K., Becker, W. (2000) Therapeutic advantages of Auger electron- over beta-emitting radiometals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies. *Eur. J. Nucl. Med.* 27(7), 753-765.
- Behr, T.M., Behe, M.P. (2002) Cholecystokinin-B/Gastrin receptor-targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor-expressing malignancies. *Semin. Nucl. Med.* 32(2), 97-109.
- Blumenthal, R.D. (2004) Technology evaluation: cT84.66, City of Hope. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 6, 90-95.
- Bourne, N., Stanberry, L.R., Kern, E.R., Holan, G., Matthews, B., Bernstein, D.I. (2000) Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2471-2474.

- Boas, U., Heegaard, P.M.H. (2004) Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* 33, 43-63.
- Brechbiel, M.W., Gansow, O.A., Atcher, R.W., Schlom, J., Esteban, J., Simpson, D.E., and Colcher, D. (1986) Synthesis of 1 - (*p*-1isothiocyanatobenzyl) Derivatives of DTPA and EDTA. Antibody Labeling and Tumor-Imaging Studies. *Inorg. Chem.* 25, 2112-2181.
- Breitz, H.B., Weiden, P.L., Beaumier, P.L., Axworthy, D.B., Seiler, S., Su, F.-M., Graves, S., Bryan, K., Reno, J.M. (2000) Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and <sup>90</sup>Y-DOTA-biotin. *J. Nucl. Med.* 41, 131-140.
- Brooks, D., Taylor, C., Dos, S.B. (1995) Phase Ia trial of murine immunoglobulin Aantitransferrin receptor antibody 42/6. *Clin. Cancer Res.* 1, 1259-1265.
- Bryant, L.H., Brechbiel, M.W., Wu, C., Bulte, J.W.M., Herynek, V. & Frank, J.A. (1999) Synthesis and relaxometry of high-generation (G = 5, 7, 9, and 10) PAMAM dendrimer-DOTA-gadolinium chelates. *J. Magn. Reson. Imaging* 9, 348-352.
- Capala, J., Barth, R.F., Bendayan, M., Lauzon, M., Adams, D.M., Soloway, A.H., Fenstermaker, R.A., Carlsson, J. (1996) Boronated epidermal growth factor as a potential targeting agent for boron neutron capture therapy of brain tumors. *Bioconjug. Chem.* 7, 7-15.
- Chapman, T.M., Keating, G.M. (2003) Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation. *Drugs* 63, 2803-2835.
- Chen, Y., Baker, G.L. (1999) Synthesis and Properties of ABA Amphiphiles. *J. Org. Chem.* 64, 6870-6873.
- Christian, N.A., Milone, M.C., Ranka, S.S., Li, G., Frail, P.R., Davis, K.P., Bates, F.S., Therien, M.J., Ghoroghchian, P.P., June, C.H., Hammer, D.A. (2007) Tat-Functionalized Near-Infrared Emissive Polymersomes for Dendritic Cell Labeling. *Bioconj. Chem.* 18(1), 31-40.
- Coleman, M., Goldenberg, D.M., Siegel, A.B., Ketas, J.C., Ashe, M., Fiore, J.M., Leonard, J.P. (2003) Epratuzumab: targeting B-cell malignancies through CD22. *Clin. Cancer Res.* 9, 3991-3994S.
- Couck, P., Claeys, R., Vanderstraeten, E., Gorus, F.K. (2005) Evaluation of the Stratus CS fluorometer for the determination of plasma myoglobin. *Acta Clin. Belg.* 60(2), 75-78.
- Cuppoletti, A., Cho, Y., Park, J.-S., Strässler, C., Kool, E.T. (2005) Oligomeric fluorescent labels for DNA. *Bioconjugate Chem.* 16, 528-534.
- Curran, D., Giralt, J., Harari, P.M., Ang, K.K., Cohen, R.B., Kies, M.S., Jassem, J., Baselga, J., Rowinsky, E.K., Amellal, N., Comte, S., Bonner, J.A. (2007) Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 25(16), 2191-2197.

- Dean T., Khatri A., Potetinova Z., Willick G.E., Gardella T.J. (2006) Role of amino acid side chains in region 17-31 of parathyroid hormone (PTH) in binding to the PTH receptor. *J. Biol. Chem.* 281(43), 32485-32495.
- de Jonge-Peeters, S.D., Kuipers, F., de Vries, E.G., Vellenga, E. (2007) ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62(3), 214-226.
- Ducreux, M., Boige, V., Malka, D. (2007) Treatment of advanced pancreatic cancer. *Semin. Oncol.* 34, S25-S30.
- Edwin, F., Wiepz, G.J., Singh, R., Peet, C.R., Chaturvedi, D., Bertics, P.J., Patel, T.B. (2006) A historical perspective of the EGF receptor and related systems. *Methods Mol. Biol.* 327, 1-24.
- Eves, P.C., MacNeil, S., Haycock, J.W. (2006) Alpha-Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma. *Peptides* 27(2), 444-452.
- Ferretti, G., Felici, A., Papaldo, P., Fabi, A., Cognetti, F. (2007) HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 19(1), 56-62.
- Ferruti, P., Knobloch, S., Ranucci, E., Gianasi, E., Duncan, R. (1997) *Proc. Int. Symp. Controlled Rel. Bioact. Mater.* 45-46.
- Fiegl, M., Falkner, A., Hopfinger, G., Brugger, S., Zabernigg, A., Bauer, F., Haslbauer, F., Demirtas, D., Grossschmidt, P., Tatzreiter, G., Gastl, G., Greil, R. (2006) Routine clinical use of alemtuzumab in patients with heavily pretreated B-cell chronic lymphocytic leukemia: a nation-wide retrospective study in Austria. *Cancer* 107(10), 2408-2416.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T. (2003) In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24, 1121-1131.
- Fishman, W.H., Anlyan, A.J. (1947) The Presence of High  $\beta$ -Glucuronidase Activity in Cancer Tissue. *J. Biol. Chem.* 169, 449-450.
- Flier, J.S., Mueckler, M.M., Usher, P., Lodish, H.F. (1987) Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* 235, 1492-1945.
- Fréchet, J.M.J., Tomalia, D.A. (2001) Dendrimers and other dendritic polymers. Wiley Series in Polymer Science
- Fukuda, M., Sun, A. (2005) The DNA-instability test as a specific marker of malignancy and its application to detect cancer clones in borderline malignancy. *Eur. J. Histochem.* 49(1), 11-26.
- Galanzha, E.I., Tuchin, V.V., Zharov, V.P. (2007) Advances in small animal mesentery models for in vivo flow cytometry, dynamic microscopy, and drug screening. *World J. Gastroenterol.* 13(2), 192-218.

- Gong, Y., Matthews, B., Cheung, D., Tam, T., Gadawski, I., Leung, D., Holan, G., Raff, J., Sacks, S. (2002) Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.* 55, 319–329.
- Gotthardt, M., Boermann, O.C., Behr T.H., Béhé M.P., Oyen W.J.G. (2004) Development and clinical application of peptide-based radiopharmaceuticals. *Curr. Pharm. Des.* 10, 2951-2963.
- Graeven, U., Kremer, B., Südhoff, Th., Killing, B., Rojo, F., Weber, D., Tillner, J., Ünal, C., Schmiegel, W. (2006) Phase I study of the humanised anti-EGFR monoclonal antibody matuzumab (EMD 72000) combined with gemcitabine in advanced pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 94, 1293 – 1299.
- Grana, C., Chinol, M., Robertson, C., Mazzetta, C., Bartolomei, M., De Cicco, C., Fiorenza, M., Gatti, M., Calicetti, P., Paganelli, G. (2002) Pretargeted adjuvant radioimmunotherapy with yttrium-90-biotin in malignant glioma patients: a pilot study. *Br. J. Cancer* 86, 207-212.
- Griffiths, T.D., Rees, A., Witton, C., Shakir, R.A., Henning, G.B., Green, G.G. (1996) Evidence for a sound movement area in the human cerebral cortex. *Nature* 383, 425-427.
- Grossbard, M.L., Multani, P.S., Freedman, A.S., O'Day, S., Gribben, J.G., Rhuda, C., Neuberger, D., Nadler, L.M. (1999) A Phase II study of adjuvant therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 5, 2392-2398.
- Hahn, U., Gorka, M., Vögtle, F., Vicinelli, V., Ceroni, P., Maestri, M., Balzani, V. (2002) Light-Harvesting Dendrimers: Efficient Intra- and Intermolecular Energy-Transfer Processes in a Species Containing 65 Chromophoric Groups of Four Different Types. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41(19), 3595 – 3598.
- Hait, W.N., Yang, J.M. (2005) Clinical management of recurrent breast cancer: development of multidrug resistance (MDR) and strategies to circumvent it. *Semin Oncol.* 32, S16-S21.
- Haensler, J., Szoka Jr., F.C. (1993) Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem.* 4, 372–379.
- Hamann, P.R., Hinman, L.M., Beyer, C.F., Greenberger, L.M., Lin, C., Lindh, D., Menendez, A.T., Wallace, R., Durr, F.E., Upešlaciš, J. (2005) An anti-MUC1 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of solid tumors. Choice of linker and overcoming drug resistance. *Bioconjug. Chem.* 16(2), 346-353.
- He, Y.F., Wei, W., Sun, Z.M., Ji, C.S., Wang, G., Chen, M.P., Hu, C.L., Hu, B. (2007) Fatal lactic acidosis and hypoglycemia in a patient with relapsed natural killer/T-cell lymphoma. *Adv Ther.* 2007 24(3), 505-509.
- Heppeler, A., Froidevaux, S., Mäcke, H.R., Jermann, E., Béhé, M., Powell, P., and Hennig,

- M. (1999) Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatised Somatostatin Analogue with Superb Tumour-Targeting Properties and Potential for Receptor-Mediated Internal Radiotherapy. *Chem. Eur. J.* 5(7), 1974-1981.
- Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, 439-441.
- Herold, M., Haas, A., Srock, S., Naser, S., Al-Ali, K.H., Neubauer, A., Dölken, G., Naumann, R., Knauf, W., Freund, M., Rohrberg, R., Höffken, K., Franke, A., Ittel, T., Kettner, E., Haak, U., Mey, U., Klinkenstein, C., Assmann, M., von Grünhagen, U. (2007) Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J. Clin. Oncol.* 25(15), 1986-1992.
- Hessenius, C., Bäder, M., Meinhold, H., Böhmig, M., Faiss, S., Reubi, J.C., Wiedenmann, B. (2000) Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas or neuroendocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med.* 27(11), 1684-1693.
- Hoovers, J.M., Mellink, C.H., Leschot, N.J. (1999) Fluorescence in situ hybridization in the study of chromosomal abnormalities. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 143(45), 2265-2268.
- Hu, X.F., Xing, P.X. (2003) Discovery and validation of new molecular targets for ovarian cancer. *Curr Opin Mol Ther.* 5(6), 625-30.
- Huang, C.L., Yokomise, H., Fukushima, M., Kinoshita, M. (2006) Tailor-made chemotherapy for non-small cell lung cancer patients. *Future Oncol.* 2(2), 289-99.
- Hug, H., Los, M., Hirt, W., Debatin, K.M. (1999) Rhodamine 110-linked amino acids and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells. *Biochemistry* 38(42), 13906-13911.
- Imreh, G., Beckman, M., Iverfeldt, K., Hallberg, E. (1998) Noninvasive monitoring of apoptosis versus necrosis in a neuroblastoma cell line expressing a nuclear pore protein tagged with the green fluorescent protein. *Exp. Cell. Res.* 238(2), 371-376.
- Islam, M.T., Shi, X., Balogh, L., Baker, J.R. Jr. (2005) HPLC Separation of Different Generations of Poly(amidoamine) Dendrimers Modified with Various Terminal Groups. *Anal. Chem.* 77, 2063-2070.
- Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N.B., D'Emanuele, A. (2003) The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 252, 263-266.
- Johnston, J.B., Navaratnam, S., Pitz, M.W., Maniate, J.M., Wiechec, E., Baust, H., Gingerich, J., Skliris, G.P., Murphy, L.C., Los, M. (2006) Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* 13(29), 3483-3492.
- Kaltsas, G.A., Papadogias, D., Makras, P., Grossman, A.B. (2005) Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues.

*Endocrine-Related Cancer* 12, 683–699.

- Kampf, G. (1990) Steps towards cancer therapy with radionuclides--a review including radiation biophysical aspects. *Radiobiol. Radiother. (Berl.)* 31(3), 215-229.
- Keating, M., Coutre, S., Rai, K., Osterborg, A., Faderl, S., Kennedy, B., Kipps, T., Bodey, G., Byrd, J.C., Rosen, S., Dearden, C., Dyer, M.J., Hillmen, P. (2004) Management guidelines for use of alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Lymphoma* 4, 220-227.
- Khandare, J., Kolhe, P., Pillai, O., Kannan, S., Lieh-Lai, M., Kannan, R.M. (2005) Synthesis, cellular transport, and activity of polyamidoamine dendrimer-methylprednisolone conjugates. *Bioc. Chem.* 16(2), 330-337.
- Kim, S., Lim, Y.T., Soltesz, E.G., De Grand, A.M., Lee, J., Nakayama, A., Parker, J.A., Mihaljevic, T., Laurence, R.G., Dor, D.M., Cohn, L.H., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V. (2004) Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat. Biotechnol.* 22, 93–7.
- Klajnert, B., Bryszewska, M. (2001) Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochim. Pol.* 48(1), 199-208.
- Kobayashi, H., Sato, N., Saga, T., Nakamoto, Y., Ishimori, T., Toyama, S., Togashi, K., Konishi, J., Brechbiel, M.W. (2000) Monoclonal antibody-dendrimer conjugates enable radiolabeling of antibody with markedly high specific activity with minimal loss of immunoreactivity. *Eur. J. Nucl. Med.* 27 (9), 1334–1339.
- Kocieński, P. (1994) Protecting Groups, Thieme (Stuttgart), 138.
- Kollmannsberger, C., Schittenhelm, M., Honecker, F., Tillner, J., Weber, D., Oechsle, K., Kanz, L., Bokemeyer, C. (2006) A phase I study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with paclitaxel in patients with EGFR-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology* 17, 1007–1013.
- Kovář, M., Strohalm, J., Etrych, T., Ulbrich, K., Říhová B. (2002) Star structure of antibody-targeted HPMA copolymer-bound doxorubicin: a novel type of polymeric conjugate for targeted drug delivery with potent antitumor effect. *Bioconjug. Chem.* 13(2), 206-215.
- Landers, J.J., Cao, Z., Lee, I., Piehler, L.T., Myc, P.P., Myc, A., Hamouda, T., Galecki, A.T., Baker Jr., J.R. (2002) Prevention of influenza pneumonitis by sialic Acid-conjugated dendritic polymers. *J. Infect. Dis.* 186, 1222–1230.
- Langhals, H., Jona, W. (1998) Intensiv-Farbstoffe durch Chromophor- Chromophor- Wechselwirkungen: di- und trifluorophore Perylen-3,4:9,10-bis(dicarboximide) *Angew. Chem.* 110(7), 998-1001.
- Lawson, N.D., Weinstein, B.M. (2002) In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* 248, 307–318.
- Lee, G.Y., Park, K., Kim, S.Y., Byun, Y. (2007) MMPs-specific PEGylated peptide-DOX

- conjugate micelles that can contain free doxorubicin. *Eur. J. Pharm Biopharm. Apr* 2; [Epub ahead of print].
- Lenz, H.J., Van Cutsem, E., Khambata-Ford, S., Mayer, R.J., Gold, P., Stella, P., Mirtsching, B., Cohn, A.L., Pippas, A.W., Azarnia, N., Tsuchihashi, Z., Mauro, D.J., Rowinsky, E.K. (2006) Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J. Clin. Oncol.* 24(30), 4914-4921.
- Li, C.Y., Shan, S., Huang, Q., Braun, R.D., Lanzen, J., Hu, K., Lin, P., Dewhirst, M.W. (2000) Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J. Natl. Cancer Inst.* 92(2), 143-147.
- Li, S., Beheshti, M. (2005) The radionuclide molecular imaging and therapy of neuroendocrine tumors. *Curr. Cancer Drug Targets* 5(2), 139-148.
- Li, Y., Cozzi, P.J. (2007) MUC1 is a promising therapeutic target for prostate cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 7(3), 259-271.
- Lichtenbeld, H.C., Yuan, F., Michel, C.C., Jain, R.K. (1996) Perfusion of single tumor microvessels: application to vascular permeability measurement. *Microcirculation* 3(4), 349-357.
- Lindgren, M., Rosenthal-Aizman, K., Saar, K., Eiríksdóttir, E., Jiang, Y., Sassian, M., Ostlund, P., Hällbrink, M., Langel, U. (2006) Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem. Pharmacol.* 71(4), 416-425.
- Lipowska, M., Patonay, G., Strekowski, L. (1993) New Near-Infrared Cyanine Dyes for Labelling of Proteins. *Synth. Comm.* 23(21), 3087-3094.
- Liu, L., Barth, R.F., Adams, D.M., Soloway, A.H., Reisfeld, R.A. (1995) Bispecific antibodies as targeting agents for boron neutron capture therapy of brain tumors. *J. Hematotherapy* 4, 477-483.
- Lo-Coco, F., Cimino, G., Breccia, M. (2004) Gentuzumab ozogamicin ("mylotarg") as a single agent for molecularly relapsed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 104, 1995-1999.
- Mahadevan, D., Von Hoff, D.D. (2007) Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 6(4), 1186-1197.
- Mahmood, U., Weissleder, R. (2003) Near-Infrared Optical Imaging of Proteases in Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 2, 489-496.
- Majoros, I.J., Myc, A., Thomas, T., Mehta, C.B., Baker, J.R. Jr. (2006) PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules* 7(2), 572-579.
- Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W., Duncana, R. (2002) Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, 125 and preliminary studies on the

- biodistribution of I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of Controlled Release* 65, 133-148.
- Maltese, M. (2001) Reductive demercuration in deprotection of trityl thioethers, trityl amines, and trityl ethers. *J. Org. Chem.* 66, 7615-7625.
- Mattila, K., Siltainsuu, J., Balaspiri, L., Ora, M., and Lönnberg, H. (2005) Derivatization of phosphopeptides with mercapto- and amino-functionalized conjugate groups by phosphate elimination and subsequent Michael addition. *Org. Biomol. Chem.* 3, 3039-3044.
- McCarthy, T.D., Karellas, P., Henderson, S.A., Giannis, M., O'Keefe, D.F., Heery, G., Paull, J.R.A., Matthews, B.R., Holan, G. (2005) Dendrimers as Drugs: Discovery and Preclinical and Clinical Development of Dendrimer-Based Microbicides for HIV and STI Prevention. *Molecular Pharmaceutics* 2(4), 312-318.
- McDevitt, M.R., Sgouros, G., Finn, R.D., Humm, J.L., Jurcic, J.G., Larson, S.M., Scheinberg, D.A. (1998) Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur. J. Nucl. Med.* 25(9), 1341-1351.
- McIntyre, J.O., Fingleton, B., Wells, K.S., Piston, D.W., Lynch, C.C., Gautam, S., Matrisian, L.M. (2004) Development of a novel fluorogenic proteolytic beacon for in vivo detection and imaging of tumour-associated matrix metalloproteinase-7 activity. *Biochem. J.* 377, 617-628.
- McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K. (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* 16(8), 2825-2833.
- Meyer, A., Auernheimer, J., Modlinger, A., Kessler, H. (2006) Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr. Pharm. Des.* 12(22), 2723-2747.
- Mier, W., Eritja, R., Mohammed, A., Haberkorn, U., Eisenhut, M. (2000) Preparation and Evaluation of Tumor-Targeting Peptide-Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem.* 11, 855-860.
- Mier W., Eritja R., Mohammed A., Haberkorn U., Eisenhut M. (2003) Peptide-PNA conjugates: targeted transport of antisense therapeutics into tumors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42(17), 1968-1971.
- Mier, W., Hoffend, J., Krämer, S., Schuhmacher, J., Hull, W.E., Eisenhut, M., Haberkorn, U. (2005) Conjugation of DOTA Using Isolated Phenolic Active Esters: The Labeling and Biodistribution of Albumin as Blood Pool Marker. *Bioconjugate Chem.* 16, 237-240.
- Mukai, T., Namba, S., Arano, Y., Ono, M., Fujioka, Y., Uehara, T., Ogawa, K., Konishi, J., and Hideo Saji (2002) Synthesis and evaluation of a monoreactive DOTA derivative for indium-111-based residualizing label to estimate protein pharmacokinetics. *J. Pharmacy and Pharmacology* 54(8), 1073-1081.

- Mulders, S.J.E, Brouwer, A.J., Liskamp, R.M.J. (**1997**) Molecular Diversity of Novel Amino Acid Based Dendrimers *Tetrahedron Letters* 38(17), 3085-3088.
- Nagahori, N., Lee, R.T., Nishimura, S., Page, D., Roy, R., Lee, Y.C. (**2002**) Inhibition of adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli to highly mannosylated ligands. *Chembiochem* 3, 836–844.
- Naumov, G.N., Wilson, S.M., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Morris, V.L., Groom, A.C., Hoffman, R.M., Chambers, A.F. (**1999**) Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy, to monitor steps in tumor metastasis. *J. Cell Sci.* 112, 1835-1842.
- Nikula, T.K., Boccia, M., Curcio, M.J., Sgouros, G., Ma, Y., Finn, R.D., and Scheinberg, D.A. (**1995**) Impact Of The High Tyrosine Fraction In Complementary Determining Regions: Measured And Predicted Effects Of Radioiodination On IgG Immunoreactivity. *Molecular Immunology* 32, 865-872.
- Nishiyama, N., Stapert, H.R., Zhang, G.D., Takasu, D., Jiang, D.L., Nagano, T., Aida, T., Kataoka, K. (**2003**) Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem.* 14, 58–66.
- Ochiai, H., Higa, K., Hishiyama, N., Hisamatsu, S., Fujise, H. (**2006**) Characterization of several amino acid transports and glutamine metabolism in MOLT4 human T4 leukemia cells. *Clin. Lab. Haematol.* 28(6), 399-404.
- Ohnishi, S., Lomnes, S.J., Laurence, R.G., Gogbashian, A., Mariani, G., Frangioni, J.V. (**2005**) Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping. *Mol. Imaging* 4, 172–181.
- Oliver, M., Jorgensen, M.R., Miller, A.D. (**2004**) Solid-Phase Assisted N-1 Functionalization of Azamacrocycles. *Synlett* 3, 453–456.
- Oesterling, I., Müllen, K. (**2007**) Multichromophoric polyphenylene dendrimers: toward brilliant light emitters with an increased number of fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 4595-4605.
- Oriuchi, N., Higuchi, T., Hanaoka, H., Iido, Y., Endo, K. (**2005**) Current status of cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibody. *Annals of Nucl. Med.* 19(5), 355-365.
- Otte, A., Herrmann, R., Heppeler, A., Behe, M., Jermann, E., Powell, P., Maecke, H.R., Muller, J. (**1999**) Yttrium-90 DOTATOC: first clinical results. *Eur. J. Nucl. Med.* 26(11), 1439-1447.
- Padilla De Jesus, O.L., Ihre, H.R., Gagne, L., Frechet, J.M., Szoka, F.C. Jr. (**2002**) Polyester dendritic systems for drug delivery applications: in vitro and in vivo evaluation. *Bioconjug Chem.* 13(3), 453-61.
- Pegram, M.D., Lipton, A., Hayes, D.F. (**1998**) Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/ neuoverexpressing metastatic breast

- cancer refractory to chemotherapy treatment. *J. Clin. Oncol.* 16(8), 2659-2671.
- Peterson, J., Ebber, A., Allikmaa, V., Lopp, M. (2001) Synthesis and cze analysis of PAMAM Dendrimers with an ethylenediamine core. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* 50(3), 156-166.
- Pham, W., Lai, W.-F., Weissleder, R., Tung, C.-H. (2003) High efficiency synthesis of a bioconjugatable near-infrared fluorochrome. *Bioconjugate Chem. Bioconjugate Chem.* 14, 1048-1051
- Rajananthanan, P., Attard, G.S., Sheikh, N.A., Morrow, W.J. (1999) Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. *Vaccine* 17, 715-730.
- Ranji, M., Kanemoto, S., Matsubara, M., Grosso, M.A., Gorman, J.H., Gorman, R.C., Jaggard, D.L., Chance, B. (2006) Fluorescence spectroscopy and imaging of myocardial apoptosis. *J. Biomed. Opt.* 11(6), 064036.
- Rastetter, W., Molina, A., White, C.A. (2004) Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases. *Annu. Rev. Med.* 55, 477-503.
- Ratnam, M., Hao, H., Zheng, X., Wang, H., Qi, H., Lee, R., Pan, X. (2003) Receptor induction and targeted drug delivery: a new antileukaemia strategy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3(4), 563-574.
- Reubi, J.C., Schaer, J.C., Waser, B. (1997) Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res.* 57(7), 1377-1386.
- Reubi, J.C., Waser, B., Schaer, J.C., Laissue, J.A. (1999) Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. *Int. J. Cancer* 82(2), 213-218.
- Reubi, J.C., Waser, B. (2003) Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 30(5), 781-793.
- Reubi, J.C., Mäcke, H.R., Krenning, E.P. (2005) Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. *J. Nucl. Med.* 46 Suppl 1, 67S-75S.
- Rittner, K., Benavente, A., Bompard, S., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R., Jacobs, E. (2002) New Basic Membrane-Destabilizing Peptides for Plasmid-Based Gene Delivery *in Vitro* and *in Vivo* *Mol. Therapy* 5, 104-114.
- Roberts, J.C., Bhalgat, M.K., Zera, R.T. (1996) Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* 30, 53-65.
- Rockwell S. (1992) Use of hypoxia-directed drugs in the therapy of solid tumors. *Semin Oncol.* 19(4), 29-40.
- Schally, A.V., Comaru-Schally, A.M., Plonowski, A., Nagy, A., Halmos, G., Rekasi, Z. (2000) Peptide analogs in the therapy of prostate cancer. *Prostate* 45(2), 158-166.
- Seiden, M.V., Burris, H.A., Matulonis, U., Hall, J.B., Armstrong, D.K., Speyer, J., Weber, J.D.A., Muggia, F. (2007) A phase II trial of EMD72000 (matuzumab), a humanized

- anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum-resistant ovarian and primary peritoneal malignancies. *Gynecologic Oncology* 104, 727–731.
- Sievers, E.L., Larson, R.A., Stadtmauer, E.A. (2001) Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J. Clin. Oncol.* 19(13), 3244-3254.
- Sigal, G.B., Mammen, M., Dahmann, G., Whitesides, G.M. (1996) Polyacrylamides Bearing Pendant  $\alpha$ -Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza Virus: The Strong Inhibition Reflects Enhanced Binding through Cooperative Polyvalent Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 3789–3800.
- Smith, C.J., Volkert, W.A., Hoffman, T.J. (2005) Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes. *Nucl. Med. Biol.* 32(7), 733-740.
- Soltesz, E.G., Kim, S., Laurence, R.G., DeGrand, A.M., Parungo, C.P., Dor, D.M., Cohn, L.H., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V., Mihaljevic, T. (2005) Intraoperative sentinel lymph node mapping of the lung using near-infrared fluorescent quantum dots. *Ann. Thorac. Surg.* 79, 269–277.
- Sontheimer, H. (2004) Ion channels and amino acid transporters support the growth and invasion of primary brain tumors. *Mol. Neurobiol.* 29(1), 61-71.
- Stallings-Mann, M., Radisky, D. (2007) Matrix metalloproteinase-induced malignancy in mammary epithelial cells. *Cells Tissues Organs* 185(1-3), 104-10.
- Stefflova, K., Chen, J., Li, H., Zheng, G. (2006) Targeted Photodynamic Therapy Agent with a Built-In Apoptosis Sensor for In Vivo Near-Infrared Imaging of Tumor Apoptosis Triggered by Its Photosensitization In Situ. *Molecular Imaging* 5(4), 520–532.
- Teunissen, J.J.M., Kwekkeboom, D.J., Krenning, E.P. (2006) Staging and treatment of differentiated thyroid carcinoma with radiolabeled somatostatin analogs. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 19-25.
- Thomas, T.P., Patri, A.K., Myc, A., Myaing, M.T., Ye, J.Y., Norris, T.B., and Baker Jr., J.R. (2004) In Vitro Targeting of Synthesized Antibody-Conjugated Dendrimer Nanoparticles. *Biomacromolecules* 5, 2269-2274.
- Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., Smith, P. (1986) Dendritic macromolecules: Synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 19, 2466-2468.
- Tsourkas, A., Bao, G. (2003) Shedding light on health and disease using molecular beacons. *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 1(4), 372-384.
- Valera, E.T., Scrideli, C.A., Queiroz, R.G., Mori, B.M., Tone, L.G. (2004) Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med. J.* 122(4), 166-171.

- Venook, A.P., Blanke, C.D., Niedzwiecki, D., Lenz, H.J., Taylor, J.R., Hollis, D.R., Sutherland, S., Goldberg, R.M. (2007) Revisiting the Cancer and Leukemia Group B/Southwest Oncology Group 80405 Trial: a phase III trial of chemotherapy and biologic agents for patients with untreated advanced colorectal adenocarcinoma. *Clin. Colorectal Cancer* 6(7), 536-538.
- Voit, B.I., Wolf, D. (1997) Perfectly branched polyamide dendrons based on 5-(2-aminoethoxy)-isophthalic acid. *Tetrahedron* 53(45), 15535-15551.
- Wang, X., Inapagolla, R., Kannan, S., Lieh-Lai, M., Kannan, R.M. (2007) Synthesis, Characterization, and in Vitro Activity of Dendrimer-Streptokinase Conjugates. *Bioconjugate Chem.* 18, 791-799.
- Wängler, B., Beck, C., Wagner-Utermann, U., Schirmmayer, E., Bauer, C., Rösch, F., Schirmmayer R., Eisenhut, M. (2006) Application of tris-allyl-DOTA in the preparation of DOTA-peptide conjugates. *Tet. Lett.* 47, 5985-5988.
- Wetzel, B.K., Yarmoluk, S.M., Craig, D.B., Wolfbeis, O.S. (2004) Chameleon labels for staining and quantifying proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43(40), 5400-2.
- Weiner, R.E., Thakur, M.L. (2005) Radiolabeled peptides in oncology: role in diagnosis and treatment. *Biodrugs* 19, 145-163.
- Wiener, E.C., Auteri, F.P., Chen, J.W., Brechbiel, M.W., Gansow, O.A., Schneider, D.S., Belford, R.L., Clarkson, R.B., Lauterbur, P.C. (1996) Molecular Dynamics of Ion-Chelate Complexes Attached to Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7774-7782.
- Wiland, A.M., Philosophe, B. (2004) Daclizumab induction in solid organ transplantation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4, 729-740.
- Witvrouw, M., Fikkert, V., Pluymers, W., Matthews, B., Mardel, K., Schols, D., Raff, J., Debyser, Z., De Clercq, E., Holan, G., Pannecouque, C. (2000) Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol. Pharmacol.* 58, 1100-1108. A
- Witvrouw, M., Weigold, H., Pannecouque, C., Schols, D., DeClercq, E., Holan, G. (2000) Potent anti-HIV (type 1 and type 2) activity of polyoxometalates: structure-activity relationship and mechanism of action. *J. Med. Chem.* 43, 778-783. B
- Witzig, T.E., Gordon, L.I., Cabanillas, F., Czuczman, M.S., Emmanouilides, C., Joyce, R., Pohlman, B.L., Bartlett, N.L., Wiseman, G.A., Padre, N., Grillo-López, A.J., Multani, P., White, C.A. (2002) Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 20(10), 2453-2463.
- Wu, A.M., Senter, P.D. (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.* 23, 1137-1146.

- Wu, C., Brechbiel, M.W., Kozak, R.W., Gansow, G.A. (1994) Metal-Chelate-Dendrimer-Antibody Constructs For Use in Radioimmunotherapy and Imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4(3), 449-454.
- Wu, G., Barth, R.F., Yang, W., Chatterjee, M., Tjarks, W., Ciesielski, M.J., and Fenstermaker, R.A. (2003) Site-Specific Conjugation of Boron-Containing Dendrimers to Anti-EGF Receptor Monoclonal Antibody Cetuximab (IMC-C225) and Its Evaluation as a Potential Delivery Agent for Neutron Capture Therapy. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15, 185-194.
- Wu, G., Barth, R.F., Yang, W., Kawabata, S., Zhang, L., Green-Church, K. (2006) Targeted delivery of methotrexate to epidermal growth factor receptor-positive brain tumors by means of cetuximab (IMC-C225) dendrimer bioconjugates. *Mol. Cancer Ther.* 5(1), 52-9.
- Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., Yamada, Y., Inoue, K., Manabe, T., Imura, H. (1990) Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170(1), 223-230.
- Yang, W., Barth, R.F., Wu, G., Kawabata, S., Sferra, T.J., Bandyopadhyaya, A.K., Tjarks, W., Ferketich, A.K., Moeschberger, M.L., Binns, P.J., Riley, K.J., Coderre, J.A., Ciesielski, M.J., Fenstermaker, R.A., Wikstrand, C.J. (2006) Molecular Targeting and Treatment of EGFRvIII-Positive Gliomas Using Boronated Monoclonal Antibody L8A4. *Clin. Cancer Res.* 12(12), 3792-3802.
- Yang, E., Hu, X.F., Xing, P.X. (2007) Advances of MUC1 as a target for breast cancer immunotherapy. *Histol. Histopathol.* 22(8), 905-922.
- Yin, Y., Tainsky, M.A., Bischoff, F.Z., Strong, L.C., Wahl, G.M. (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70(6), 937-948.
- Zaheer, A., Wheat, T.E., Frangioni, J.V. (2002) IRDye78 conjugates for near-infrared fluorescence imaging. *Mol Imaging* 1, 354-364.
- Zhang, W.W., Labrecque, S., Azoulay, E., Dudley, R., Matlashewski, G. (2001) Development of a p53 responsive GFP reporter; identification of live cells with p53 activity. *J. Biotechnol.* 84(1), 79-86.
- Zhuo, R.X., Du, B., Lu, Z.R. (1999) In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer *J. Controlled Release* 57, 249-257.

## Anhang

### Zusammenstellung der wichtigsten Tumortargeting-Vektoren:

#### I. Antikörper gegen auf Tumorzellen überexprimierte Oberflächenantigenen:

Oberflächenantigen	Tumoren, auf denen das Antigen überexprimiert wird
HER-2/neu (CD340)	Mammakarzinome, LC und akute lymphoblastische Leukämie [Ferretti, Johnston]
MUC1 (CD227)	Mammakarzinome, Prostatakarzinome und Ovarialkarzinome [Li (2007), Yang (2007)]
CD20	Lymphome [Rastetter]
CD19	Lymphome [Grossbard]
CD22	Lymphome [Coleman]
CD52	Lymphome, chronisch-lymphatische Leukämie [Keating]
CD25	Leukämie, Lymphome [Chapman, Wiland]
CD33	akute myeloische Leukämie [Lo-Coco]
CD15	akute myeloische Leukämie [Ball]
Transferin Rezeptor (CD71)	multiple Myelome, Lymphome [Brooks]
CD66e	Kolonkarzinom, Epithelialkarzinome [Blumenthal]

#### II. Peptide, die an auf der Tumoroberfläche überexprimierte Rezeptoren binden:

Rezeptor	Tumoren, auf denen der Rezeptor überexprimiert wird
VIP (vasoactive intestinal peptide) Rezeptoren	neuroendokrine Tumoren, intestinalen Adenokarzinome, Lymphome, Astrocytome, Glioblastome, Meningiome, Insulinome, neuroendokrine Tumoren, SCLC (small cell lung cancer) [Hessenius]

Gastrin Rezeptoren / CCK <sub>2</sub> -Rezeptoren	medulläre Schilddrüsenkarzinome, Ovarialkarzinome, SCLC, Astrocytome, Adenokarzinome, gastrointestinale neuroendokrine Tumoren [Reubi (1997)]
GRP (gastrin releasing poly-peptide) Rezeptoren	Prostatakarzinome [Schally]
Neurotensin Rezeptoren	Ewing Sarkome, Meningiome, Astrocytome, exokrine Pankreastumoren [Reubi (1999)]
Somatostatin Rezeptoren	neuroendokrine Tumoren, Prostatatumoren, Mammakarzinome, SCLC, Melanome, non-Hodgkin Lymphome [Kaltsas]
Bombesin Rezeptoren	Kolonkarzinome, Glioblastome, SCLC, Prostatakarzinome [Smith]
GLP-1 (glucagon-like-peptide) Rezeptoren	Insulinome, neuroendokrine Tumoren [Reubi (2003)]
$\alpha_v\beta_3$ Integrin	Melanome, Mammakarzinome, Osteosarkome, Pankreastumoren, Ovarialkarkarzinome [Meyer]
EGF (epidermal growth factor) Rezeptoren	Mammakarzinome [Edwin]
Melanocortin-Rezeptoren 1 - 5	Melanome [Weiner, Gotthardt]

III. Enzyme, die von Tumoren vermehrt sekretiert werden:

Enzym	Tumoren, die das Enzym vermehrt sekretieren
Ribonukleotid synthetisierende Enzyme	NSCLC, Retinoblastoma, Pankreaskarzinome [Ducreux, Huang]
Proteasen (Cathepsine, Caspasen, Matrix Metalloproteinasen)	Mammakarzinome, Adenokarzinome, Kolonkarzinome [Stallings-Mann, Mahadevan]
$\beta$ -Glucuronidase	viele verschiedene Tumoren [Fishman]

IV. Transporter, die auf Tumorzellen überexprimiert werden:

Transporter	Tumoren, auf denen der Transporter überexprimiert wird
Glucose-Transporter	Viele verschiedene Tumoren [Flier, Yamamoto]
MDRs (Multidrug Resistance Proteins) und MRPs (Multidrug Resistance Related Proteins)	Mammakarzinome, Kolonkarzinome, Leukämien und andere [Ahmed, Hait, Valera]
Aminosäure-Transporter	Gliome, Astrocytome, Leukämien [Sontheimer, Asano, Ochiai]
Folat-Transporter	Ovarialkarzinome, Leukämien [Hu, Ratnam]
Steroid-Transporter	Mammakarzinome, Ovarialkarzinome, Prostatakarzinome, Leukämien [de Jonge-Peeters]

V. Veränderte physiologische Charakteristiken von Tumorzellen gegenüber gesundem Gewebe wie pH-Wert, Hypoxie oder Redox-Potential:

Veränderung	Tumoren mit veränderten physiologischen Charakteristika
pH-Wert	Lymphome [He, Griffiths]
Hypoxie / Redox-Potential	große solide Tumoren [Rockwell]

## Abkürzungen:

DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetrayl)-tetraessigsäure
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-hexafluorophosphat
ICPMS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MRT	Magnetresonanztomographie
PAMAM	Polyaminoamin
PP	Phosphatpuffer
PPS	Phosphatpuffer mit NaCl
PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TFA	Trifluoressigsäure

## Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Eisenhut und Herrn PD Dr. W. Mier für die interessante Themenstellung, die kompetente fachliche Betreuung, den großen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. U. Haberkorn und Prof. Dr. M. Eisenhut möchte ich mich vielmals für das außerordentlich gute Arbeitsklima, die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und die fachliche und freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. U. Haberkorn möchte ich für seine Unterstützung dieser Arbeit danken.

Bei Frau E.-M. Knapp möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Charakterisierung der Farbstoffmarkierten Antikörper bedanken und bei Frau Dr. B. Beijer für die zur Verfügung gestellten Nahinfrarotfarbstoffe.

Herrn Dr. G. Moldenhauer danke ich für die Durchführung der Immunreaktivitätsuntersuchungen der Antikörper-Konjugate.

Herrn Dr. R. Saffrich danke ich für die Durchführung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Frau Bauder-Wüst für die Kultur der A431-Zellen.

Herrn T. Timmermann möchte ich für seine Unterstützung in allen Belangen der NMR Spektroskopie danken.

Mein größter Dank gilt allerdings meinem Mann und meinen Eltern, die mich immer unterstützt und damit diese Arbeit ermöglicht haben.



## Publikationsliste

- **Wängler C**, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier, W (2007) Applicability of different DOTA building blocks for multiply derivatized scaffolds. Angenommen bei: Bioorganic Medicinal Chemistry.
- **Wängler C**, Moldenhauer G, Knapp E-M, Beijer B, Schnölzer M, Wängler B, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W (2007) PAMAM dendrimer-based multifunctional fluorescent conjugates for improved fluorescent labelling of macromolecules. Eingereicht bei: Chemistry - A European Journal.
- **Wängler C**, Moldenhauer G, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W (2007) Synthesis, Characterization and Immunoreactivity Studies of Antibody-Dendrimer Conjugates. Eingereicht bei: Bioconjugate Chemistry.
- Schirmacher R, **Wängler C**, Schirmacher E (2007) Recent developments and trends in <sup>18</sup>F-radiochemistry: Syntheses and Applications. Mini-Reviews in Organic Chemistry 4, 317-329.
- **Wängler C**, Buchmann I, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W (2007) Radiolabeled Peptides and Proteins in Cancer Therapy. Protein & Peptide Letters 14, 273-279.
- Wängler B, **Beck C**, Wagner-Utermann U, Schirmacher E, Bauer C, Rösch F, Schirmacher R, Eisenhut M. (2006) Application of tris-allyl-DOTA in the preparation of DOTA peptide conjugates. Tet. Lett. 47, 5985-5988.
- Schirmacher E, **Beck C**, Brueckner B, Schmitges F, Siedlecki P, Bartenstein P, Lyko F, Schirmacher R (2006) Synthesis and in Vitro Evaluation of Biotinylated RG108: A High Affinity Compound for Studying Binding Interactions with Human DNA Methyltransferases. Bioconjugate Chem. 17, 261-266.
- Askoxylakis V, Mier W, Zitzmann S, Ehemann V, Zhang J, Krämer S, **Beck C**, Schwab M, Eisenhut M, Haberkorn U (2006) Characterization and Development of a Peptide (p160) with Affinity for Neuroblastoma Cells. J. Nucl. Med. 47, 981-988.
- Wängler B, **Beck C**, Shiue CY, Schneider S, Schwanstecher C, Schwanstecher M, Feilen PJ, Alavi A, Rösch F, Schirmacher R (2004) Synthesis and in vitro evaluation of (S)-2-([<sup>11</sup>C]methoxy)-4-[3-methyl-1-(2-piperidine-1-yl-phenyl)-butyl-carbamoyl]-benzoic acid ([<sup>11</sup>C]methoxy-repaglinide): a potential  $\beta$ -cell imaging agent. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 5205-5209.

- Schirmacher E, Schirmacher R, **Beck C**, Mier W, Trautmann N, Rösch F (2003) Synthesis of a Tyr<sup>3</sup>-octreotate conjugated *closo*-carborane [HC<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub>]: a potential compound for boron neutron capture therapy. Tet. Let. 44, 9143–9145.