

Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

Dissertation

Design, Synthese und vergleichende Untersuchung von Mono- und Multimeren EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)-spezifischer Peptide hinsichtlich ihrer Eignung für die Bildgebung maligner Zellen

M.Sc. Benedikt Georg Florian Judmann

Mannheim, 2023

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Gesamtfakultät
für Mathematik, Ingenieur- und Naturwissenschaften
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
M.Sc. Benedikt Georg Florian Judmann
geb. in Forchheim

Tag der mündlichen Prüfung: . . . 2023

**Design, Synthese und vergleichende Untersuchung von
Mono- und Multimeren EGFR (Epidermal Growth Factor
Receptor)-spezifischer Peptide hinsichtlich ihrer Eignung
für die Bildgebung maligner Zellen**

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker
Prof. Dr. Carmen Wängler

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2020 bis März 2023 an der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg im Arbeitskreis Biomedizinische Chemie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Carmen Wängler in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gert Fricker, Leiter der Abteilung Pharmazeutische Technologie & Pharmakologie der Universität Heidelberg, angefertigt.

“The presence of those seeking the truth is infinitely to be preferred to the presence of those who think they've found it.”

— Terry Pratchett

Kurzdarstellung

Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein wichtiges Target für die Bildgebung und Therapie bei einer Vielzahl von malignen Veränderungen. Derzeit sind jedoch noch keine Bildgebungsagenzien auf der Basis von Peptiden für diesen Rezeptor vorhanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Multimere (Homodi- und Homotetramer) des literaturbekannten Peptidliganden GE11 hinsichtlich ihrer EGFR-spezifischen Interaktion hergestellt und überprüft. Da sie meist überlegene Bindungseigenschaften verglichen mit denen der jeweiligen Monomeren aufweisen und aufgrund unterschiedlicher Liganden an verschiedene Rezeptoren binden können, wurde zusätzlich ein Heterodimer bestehend aus $\alpha v\beta_3$ -spezifischem c(RGDfK) und GE11 synthetisiert und ebenfalls untersucht. Des Weiteren wurden die literaturbekannten Peptide CPP, D4, EGBP, GE11, P1, P2, Pep11 und QRH sowie drei neue Peptide, Teilsequenzen des hEGF, EGF₅₋₂₁, EGF₁₃₋₃₂, EGF₃₂₋₄₃, auf ihre Eignung als Basis für potentielle monomere Radiotracer für die PET/CT (Positronen-Emissions-Tomographie/Computer Tomographie) untersucht. Die Peptide wurden mit einem PEG₅-Linker und dem Chelator NODA-GA funktionalisiert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu garantieren, wonach die Substanzen mit [⁶⁸Ga]Ga³⁺ markiert und *in vitro* bezüglich ihrer Serumstabilität, ihres 1-Octanol/Wasser_{pH7.4}-Verteilungskoeffizienten ($\log_{D(7.4)}$), Internalisierung in und EGFR-Bindungsaffinität an EGFR-überexprimierenden humanen Epithelkarzinomzellen A431 charakterisiert wurden. Die Peptidsynthese erfolgte an fester Phase nach Fmoc-Strategie, wobei die Vorteile einer ultraschallunterstützten oder mechanischen Kupplung anhand der Synthese des Heterodimers überprüft wurden. Die Markierungen mit [⁶⁸Ga]Ga³⁺ wurden mittels analytischer Radio-HPLC verifiziert und ergaben nicht-optimierte molare Aktivitäten von 25 – 111 GBq/ μ mol mit radiochemische Reinheiten von $\geq 97\%$. Die radiomarkierten Peptide wiesen für die PET/CT geeignete $\log_{D(7.4)}$ -Werte zwischen -2.17 ± 0.21 und -4.01 ± 0.13 und Serumstabilitäten mit Halbwertszeiten von 62 bis zu 8078 min auf. In den *in vitro*-Evaluierungen an A431-Zellen konnte für keine der Substanzen eine EGFR-spezifische Internalisierung nachgewiesen werden. Ferner konnte in Konzentrationen bis zu 1 mM keine der Substanzen [¹²⁵I]-hEGF in kompetitiven Bindungsstudien von dem EGFR verdrängen. Unter den gleichen Bedingungen demonstrierten [¹²⁵I]-hEGF und hEGF eine hohe EGFR-spezifische Aufnahme in und Bindung an die A431-Zellen ($33.6 \pm 0.9\%$ nach 1 h, reduzierbar auf $1.9 \pm 0.2\%$ durch Blockierung) und Affinität an dieselbe Zelllinie (IC₅₀-Wert: 15.2 ± 3.3 nM). Die Ergebnisse zeigen, dass ⁶⁸Ga-markierte GE11-basierte Mono-, Homodi-, Homotetra- und Heterodimere wie auch ⁶⁸Ga-markierte Monomere basierend auf den aktuell literaturbekannten Liganden zur EGFR-spezifischen Bildgebung nicht aussichtsreich ist und eine Entwicklung oder Identifizierung besser geeigneter Peptide, welche eine ausreichend starke Interaktion mit dem EGFR demonstrieren, erfolgen muss.

Abstract

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is closely associated with tumor development and progression and thus an important target structure for imaging and therapy of various tumors. Currently, however, no peptide-based imaging agents are available for this receptor. In the present work, the published GE11 peptide was investigated in a multimeric (homodi- and homotetramer) form regarding its potential EGFR-targeting properties. Additionally, as they often exhibit superior properties compared to their monospecific counterparts and are able to simultaneously or complementarily address different receptor types, a heterodimer consisting of the $\alpha v \beta_3$ -specific c(RGDfK) and GE11 was synthesised and studied as well. Further, the EGFR targeting ability of published peptides CPP, D4, EGBP, GE11, P1, P2, Pep11 and QRH and three novel truncated hEGF ligands EGF₅₋₂₁, EGF₁₃₋₃₂, EGF₃₂₋₄₃ was investigated to determine possible alternative radiolabeled monomeric candidates for the imaging of human malignancies by means of PET/CT (Positron Emission Tomography/Computed Tomography). In order to evaluate the synthesised peptides, they were functionalised with a PEG₅ linker and NODA-GA chelator and subsequently radiolabeled with [⁶⁸Ga]Ga³⁺ and characterised *in vitro*, determining their stability in human serum, 1-octanol/ water_{pH7.4} partition coefficient ($\log_{D(7.4)}$), internalisation and binding affinity on EGFR overexpressing A431 epidermoid carcinoma cells. The peptides were synthesised on solid support according to standard Fmoc-strategy – also investigating the positive effects of ultrasonic-assisted compared to standard mechanical agitation-aided amino acid building block conjugation for the heterodimer. Subsequently, the developed ligands were successfully labeled with [⁶⁸Ga]Ga³⁺ giving the radiolabeled products in non-optimised molar activities of 25 – 111 GBq/ μ mol in $\geq 97\%$ radiochemical purity as determined by analytical radio-HPLC. The resulting radiotracers presented suitable $\log_{D(7.4)}$ values between -2.17 ± 0.21 and -4.01 ± 0.13 as well as a stability in human serum sufficient for PET with serum half-lives of 62 up to 8078 min. During *in vitro* evaluations on A431 cells the substances showed no significant difference in internalisation of the labeled radiopeptides when comparing blocked and unblocked probes. Further, none of the agents were able to displace [¹²⁵I]I-hEGF from the EGFR in competitive displacement assays in the same cell line in concentrations of up to 1 mM, whereas [¹²⁵I]I-hEGF and hEGF demonstrated the expected high EGFR-specific tumor cell uptake ($33.6 \pm 0.9\%$ after 1 h, being reduced to $1.9 \pm 0.2\%$ under blocking conditions) and affinity (IC₅₀ value of 15.2 ± 3.3 nM) under identical conditions. The results indicate that the development of ⁶⁸Ga-radiolabeled multimeric peptides based on GE11 and ⁶⁸Ga-radiolabeled monomeric peptides based on current published ligands seems to hold no promise for EGFR mediated uptake into cells, necessitating the development or identification of a new suitable peptidic receptor ligand that exhibits a sufficiently strong EGFR interaction profile.

Inhaltsverzeichnis

Kurzdarstellung	i
Abstract	ii
Inhaltsverzeichnis.....	iii
Eigene Veröffentlichungen.....	vi
Danksagung.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Maligne Tumorerkrankungen.....	1
1.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	3
1.2.1 Struktur, Bindungskonfiguration und Vorkommen des EGFR.....	3
1.2.2 Endogener Ligand und literaturbekannte Liganden des EGFR	5
1.3 Entdeckung neuer spezifischer Liganden eines Rezeptors.....	9
1.3.1 Phagen-Display (phage display)	9
1.3.2 Computerunterstütztes Arzneimittel Design (CADD, Computer-Aided Drug Design).....	10
1.3.3 Peptidische Teilsequenzen endogener Rezeptorliganden (truncated peptides)	12
1.4 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	13
1.4.1 Funktionsweise der PET und Aufbau eines Radiotracers.....	13
1.4.2 Verwendete Radionuklide in der PET	17
1.4.2.1 Verwendung von [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺ in der PET	18
1.4.3 Peptide in der PET-Bildgebung	21
1.5 Festphasenpeptidsynthese (SPPS, solid phase peptide synthesis)	22
1.6 Multivalente und Heterobivalente Peptide.....	26
2 Zielsetzung.....	31
2.1 Multivalente Peptide	31
2.1.1 Chemische Synthese des heterobivalenten Peptidliganden	33

2.2	Liganden für die Bildgebung von EGFR-überexprimierenden Läsionen	34
3	Ergebnisse und Diskussion	37
3.1	Synthese der multivalenten Peptide	37
3.2	Synthese der monovalenten Liganden für die Bildgebung von EGFR- überexprimierenden Läsionen.....	50
3.2.1	Peptidsynthese von <i>N</i> -terminal funktionalisierten Peptiden	50
3.2.2	Peptidsynthese von <i>C</i> -terminal funktionalisierten Peptiden	51
3.2.3	Peptidsynthese von Liganden mit Cystein-Brücken	52
3.3	Charakterisierung der Liganden	55
3.3.1	Radiomarkierungseigenschaften	55
3.3.2	Stabilität in humanem Serum.....	59
3.3.3	Lipophilie	61
3.3.4	Internalisierungsrate.....	63
3.3.5	Bindungsaffinität.....	65
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	72
4.1	Multivalente Peptide	72
4.1.1	Synthese von Peptidverbindungen auf Ultraschallbasis	74
4.2	Liganden für die Bildgebung von EGFR-überexprimierenden Läsionen	75
5	Experimentaltel.....	78
5.1	Verwendete Geräte	78
5.2	Verwendete Chemikalien, Lösemittel und Materialien zur chemischen Synthese, Radiomarkierung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung.....	80
5.2.1	<i>In vitro</i> -Charakterisierung.....	81
5.3	Chemische Synthese der EGFR-spezifischen Liganden	82
5.3.1	Synthese des GE11-Mono-, Homodi- und Homotetramers	83
5.3.1.1	Synthese des GE11-Monomers	83
5.3.1.2	Synthese der verzweigten Grundgerüste.....	84

5.3.1.3	Synthese der GE11-Einheit.....	86
5.3.1.4	Verknüpfung der Linker-modifizierten Peptide zu den Zielstrukturen	87
5.3.2	Synthese des Heterodimers und strukturell gescremelter Analoga.....	89
5.3.2.1	Synthese der Peptid-Einheiten	89
5.3.2.2	Verknüpfung der Peptid-Einheiten mit Linkerstrukturen	91
5.3.2.3	Verknüpfung der Linker-modifizierten Peptide zu den Zielstrukturen	92
5.3.3	Synthese der Monomere basierend auf literaturbekannten EGFR-spezifischen Peptiden	96
5.4	Radiomarkierung der NODA-GA-Konjugate	105
5.4.1	Radiomarkierung mit [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺	105
5.4.2	Radiomarkierung mit [⁶⁴ Cu]Cu ²⁺	106
5.5	Arbeiten mit Zellen und verwendete Zelllinien	106
5.5.1	Allgemeine Methoden bei Zellarbeiten.....	106
5.5.2	Zelllinie A431	107
5.5.3	Zelllinie U87MG.....	107
5.6	<i>In vitro</i> -Untersuchungen	108
5.6.1	Stabilitätsstudien in humanem Serum.....	108
5.6.2	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient-Bestimmung bei pH 7.4 (log _{D(7.4)})	108
5.6.3	Internalisierungsassays an A431-Zellen	109
5.6.4	Bindungsassays an A431- und U87MG-Zellen	109
6	Literaturverzeichnis	111
7	Abkürzungsverzeichnis	140
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	145

Eigene Veröffentlichungen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Veröffentlichungen bereits publiziert:

1. **Judmann B.**, Wängler B., Schirmmacher R., Fricker G., Wängler C. Towards Radiolabeled EGFR-Specific Peptides: Alternatives to GE11. *Pharmaceuticals* **2023**, 16(2), 273, DOI: 10.3390/ph16020273. *Originalarbeit*
2. Braun D.[⊥], **Judmann B.**[⊥], Cheng X., Wängler B., Schirmmacher R., Fricker G., Wängler C. Synthesis, Radiolabeling, and *in Vitro* and *in Vivo* Characterization of Heterobivalent Peptidic Agents for Bispecific EGFR and Integrin $\alpha_v\beta_3$ Targeting. *ACS Omega* **2023**, 8, 2, 2793-2807, DOI: 10.1021/acsomega.2c07484. *Originalarbeit*
3. **Judmann B.**[⊥], Braun D.[⊥], Schirmmacher R., Wängler B., Fricker G., Wängler C. Towards the development of GE11-based radioligands for imaging of EGFR-positive tumors. *ACS Omega* **2022**, 7, 31, 27690-27702, DOI: 10.1021/acsomega.2c03407. *Originalarbeit*
4. **Judmann B.**, Braun D., Wängler B., Schirmmacher R., Fricker G., Wängler C. Current State of Radiolabeled Heterobivalent Peptidic Ligands in Tumor Imaging and Therapy *Pharmaceuticals* **2020**, 13, 173, DOI: 10.3390/ph13080173. *Review*

[⊥] geteilte Erstautorenschaften

Weitere Veröffentlichungen, die im Laufe dieser Arbeit entstanden:

5. Damerow D., Hübner R., **Judmann B.**, Schirmmacher R., Wängler B., Fricker G., Wängler C. Side-by-side comparison of five chelators for ⁸⁹Zr-labeling of biomolecules: Investigation of chemical/radiochemical properties and complex stability. *Cancers* **2021**, 13(24): 6349, DOI: 10.3390/cancers13246349. *Originalarbeit*
6. Hübner R., Paretzki A., von Kiedrowski V., Maspero M., Cheng X., Davarci G., Braun D., Damerow H., **Judmann B.**, Filippou V., Dallanoce C., Schirmmacher R., Wängler B., Wängler C. PESIN Conjugates for Multimodal Imaging: Can Multimerization Compensate Charge Influences on Cell Binding Properties? A Case Study. *Pharmaceuticals* **2021**, 14, 531, DOI: 10.3390/ph14060531. *Originalarbeit*

Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Carmen Wängler für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Doktorarbeit in ihrem Arbeitskreis. Herzlichen Dank für das Überlassen des spannenden Themas, die Bereitschaft zu Gesprächen, Konsultation sowie für die umfängliche Unterstützung bei Problemen und inhaltlichen Korrekturen – sowohl bei Forschungsaspekten, als auch beim Verfassen von Publikationen. Es war mir eine Freude, im Bereich der Peptidchemie, Radiochemie und der Arbeit mit Zellen und Tieren so viele neue und wertvolle Erfahrungen machen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Gert Fricker möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens, jegliche Anregungen und die gewinnbringenden Diskussionen, die ich in meiner Zeit als Doktorand erhalten habe, ausdrücklich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Björn Wängler bedanke ich mich für die Möglichkeit der Beteiligung an der GMP-konformen Herstellung von Radiopharmaka und dass ich interessante Weiterbildungen in diesem Bereich wahrnehmen durfte.

Ich bedanke mich bei allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises: Nils Baier, Diana Braun, Xia Cheng, Helen Damerow, Güllü Davarci, Mika Donabauer, Carola Houpt, Dr. Valeska von Kiedrowski, Marco Maspero, Leoni Preusker, Dr. Laura Reffert, Dr. Henning Rudolf und Miriam Uhrig. Vielen Dank für eine entspannte Atmosphäre und gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Helen Damerow und Dr. Henning Rudolf für zahlreiche schöne Momente und hilfreiche Diskussionen/Gespräche.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Werner Spahl für die Aufnahme der HR-ESI-Spektren, sowie bei Viktoria Skude und Alexander Schlund für die Hilfe im Tierhaus.

Ebenso danke ich Helen Damerow, Nils Baier, Mika Donabauer, Dorothea Judmann und Johanna Hinckelmann für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen konstruktiven Anmerkungen, die zur Vollendung derselben sehr hilfreich waren.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung und Aufgeschlossenheit in jeder Situation.

1 Einleitung

1.1 Maligne Tumorerkrankungen

Die maligne Transformation von Zellen beschreibt den Übergang von normalen Zellen zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen, welcher durch Umweltfaktoren und durch Fehler bei der Replikation der DNA ausgelöst sowie durch vererbare Prädispositionen beeinflusst wird. Werden diese malignen Zellen nicht vom Immunsystem zerstört, entsteht Krebs.^[1]

Basierend auf den derzeitigen Erkrankungsraten und Lebenserwartungen prognostiziert das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD), dass mehr als zwei von fünf Frauen (43%) und jeder zweite Mann (51%) in Deutschland im Laufe des Lebens an Krebs erkranken werden.^[2]

Die Inzidenz an Krebs zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter und ist somit in Ländern mit einem hohen oder sehr hohen Index menschlicher Entwicklung (HDI, **H**uman **D**evelopment **I**ndex) höher als in Ländern, in welchen ein mittlerer oder niedriger HDI besteht. Die Abbildungen 1 und 2 zeigen die 15 prävalentesten Krebstypen von Frauen (**A**) und Männern (**B**) in Ländern mit einem hohen/sehr hohen HDI.^[3]

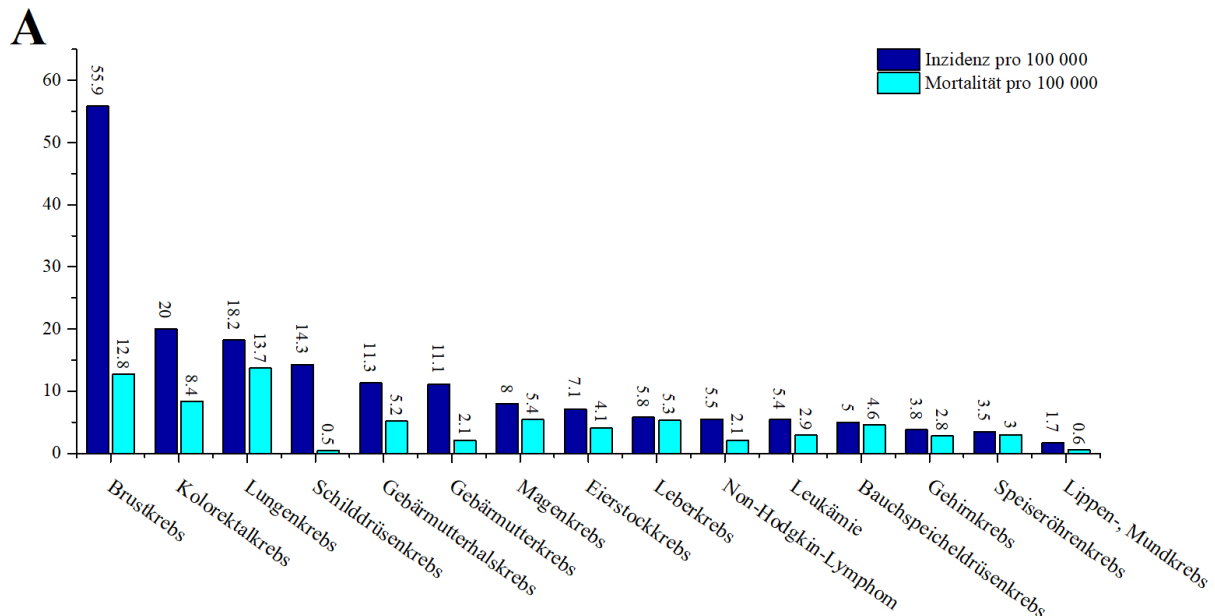


Abbildung 1: Inzidenz (Dunkelblau) und Sterblichkeitsrate (Hellblau) der 15 am stärksten verbreiteten Krebsarten in Ländern mit hohem/sehr hohem HDI von Frauen im Jahr 2020. Die Daten sind der globalen Krebsstatistik 2020 entnommen.^[3]

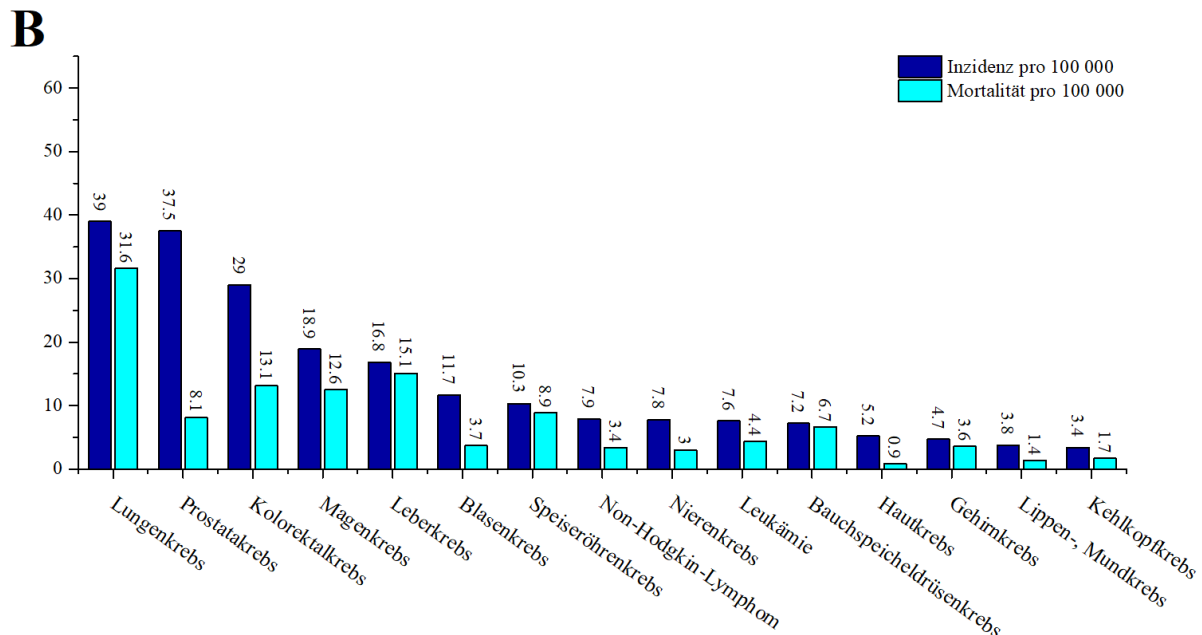


Abbildung 2: Inzidenz (Dunkelblau) und Sterblichkeitsrate (Hellblau) der 15 am stärksten verbreiteten Krebsarten in Ländern mit hohem/sehr hohem HDI von Männern im Jahr 2020. Die Daten sind der globalen Krebsstatistik 2020 entnommen.^[3]

Aufgrund der hohen Inzidenz befassen sich viele Forschungsbereiche mit der Beschreibung, der Differenzierung und mit den verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten der einzelnen Krebsarten. Ein mögliches Vorgehen zur Differenzierung etc. beruht auf den spezifischen Charakteristika von Krebszellen: Die maligne Transformation der Zellen führt u. a. zu einer Hochregulierung der Zellprozesse und der Überexprimierung von Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzelle. Diese Überexprimierung der Rezeptoren ist für die jeweiligen Krebsarten mit gewissen Wahrscheinlichkeiten spezifisch und wird mit Liganden, welche selektiv und hochspezifisch diese Rezeptoren adressieren, zur Bildgebung oder Behandlung genutzt.^[4]

Bei der Metastasierung trennen sich Krebszellen von dem ursprünglichen Tumor ab und werden über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem in andere Körperteile transportiert. Es gibt verschiedene Arten von Metastasen: Lokale, regionale und Fernmetastasen. Lokale Metastasen befinden sich in unmittelbarer Nähe des Tumors, regionale Metastasen in den Lymphknoten nahe dem Tumor, während bei Fernmetastasen ein Befall von anderen Organen auftritt. Eine Schwierigkeit bei der Behandlung von Fernmetastasen ist, dass Metastasen u. a. nicht zwangsläufig die gleichen Rezeptoren wie der Primärtumor überexprimieren.^[5-6] Ein Rezeptor, welcher auf den am häufigsten auftretenden Krebsarten, wie Brust-, Lungen- und auf

Prostatakrebs, überexprimiert wird, ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, epidermal growth factor receptor).^[7-8]

1.2 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

1.2.1 Struktur, Bindungskonfiguration und Vorkommen des EGFR

Der humane EGF-Rezeptor ist ein transmembranes Glykoprotein, welches aus 1186 Aminosäuren besteht und in vier Domäne, I-IV (L1, S1, L2 und S2), unterteilt ist.^[9-10] Die Domänen I, II und III sind in einer C-Form angeordnet. Der endogene Ligand, der humane epidermale Wachstumsfaktor (hEGF, human epidermal growth factor), bindet zwischen und an die Domänen I und III. Die Domäne III ist die Hauptbindungsstelle, während die Bindung an Domäne I einen untergeordneten Beitrag zur Gesamtbindungsstärke leistet. Zwei 1:1 hEGF•EGFR-Einheiten bilden einen 2:2 hEGF•EGFR-Komplex durch eine Rezeptor-Rezeptor Interaktion der β -Hairpin-Strukturen der beiden Domänen II. Die zwei Domänen II interagieren über Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen miteinander, während die Liganden, ohne Kontakt zueinander, jeweils nur einen der beteiligten Rezeptoren binden.^[11] Die von H. Ogiso et al.^[11] erstellte Kristallstruktur des 2:2 hEGF•EGFR-Komplexes mit Zuordnung der jeweiligen Domänen ist in folgender Abbildung dargestellt:

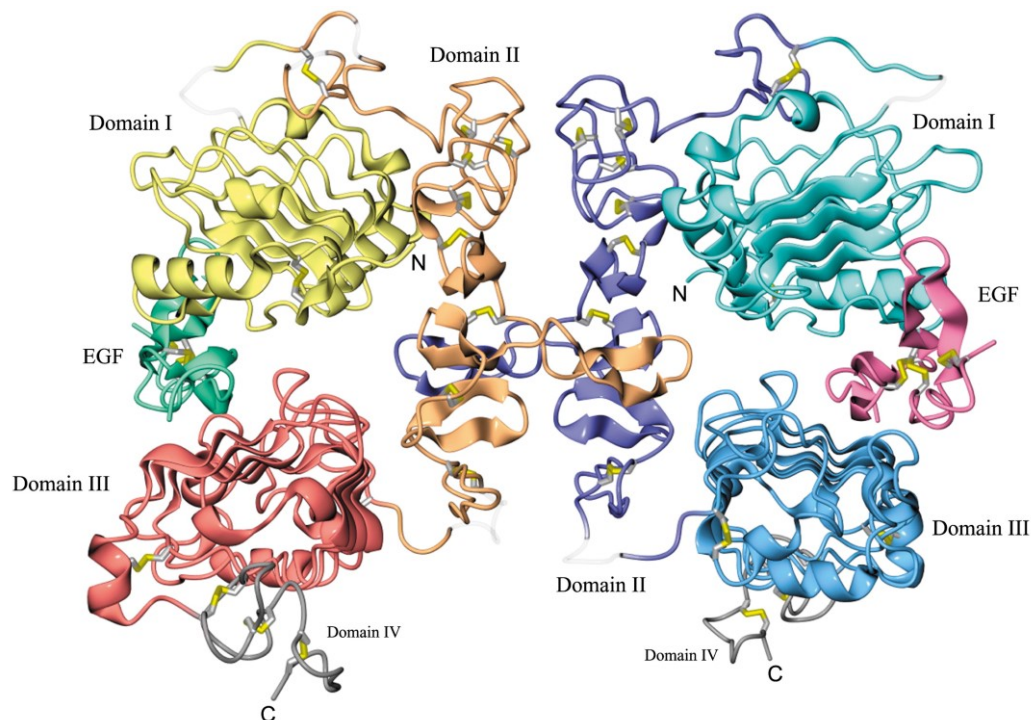


Abbildung 3: Kristallstruktur des 2:2 hEGF•EGFR-Komplexes mit Zuordnung der jeweiligen Domänen.^[11]

Im inaktiven Zustand befindet sich der EGFR in einer intramolekulargebundenen und autoinhibierten Konfiguration. Durch die Bindung von einem hEGF wird eine Konformationsänderung verursacht, der EGFR „streckt“ sich, wodurch die Domäne II freigelegt wird. Im „Ligand-induzierten Dimerisierungsmodell“ (Abbildung 4 **B**) erfolgt durch den gestreckten Zustand die Bindung der Domäne II des EGFR-Monomers an eine Domäne II eines weiteren EGFR-Monomers in räumlicher Nähe zur Bildung des EGFR•EGFR-Komplexes.^[12] Im Anschluss bindet ein weiterer hEGF an den zweiten, freien, Rezeptor, wonach eine Trans-autophosphorylierung des Rezeptor-Dimers die Signaltransduktion auslöst.^[13] Das „Rotationsmodell“ (Abbildung 4 **A**) postuliert hingegen, dass der EGFR bereits als Dimer vorliegt und durch die Bindung des hEGF und die daraus resultierende Freilegung der Domäne II die Bildung des EGFR•EGFR-Komplexes zustande kommt, was zur Rotation der intrazellulären Kinase-Domäne führt, sodass eine Trans-autophosphorylierung stattfinden kann.^[12] Es wurde gezeigt, dass der vorgebildete EGFR•EGFR-Komplex auch, in geringem Maß, schon auf der Zelloberfläche vorliegen kann, obgleich eine Bindung von hEGF für die Kreuzphosphorylierung und somit für die Signalweitergabe dennoch notwendig ist.^[14] Die Dimerisierung des EGFR wird zu >90% durch die Domäne II bedingt, wobei der gebundene Ligand einen zusätzlichen Anteil zur Dimerisierung beiträgt.^[15] Während eine Unterbindung der EGFR•EGFR-Komplexbildung in einer Inaktivierung der Signaltransduktion resultiert, kann eine Aktivierung des EGFR•EGFR-Komplexes teilweise zudem durch ein einzelnes Molekül an hEGF erfolgen.^[16-17]

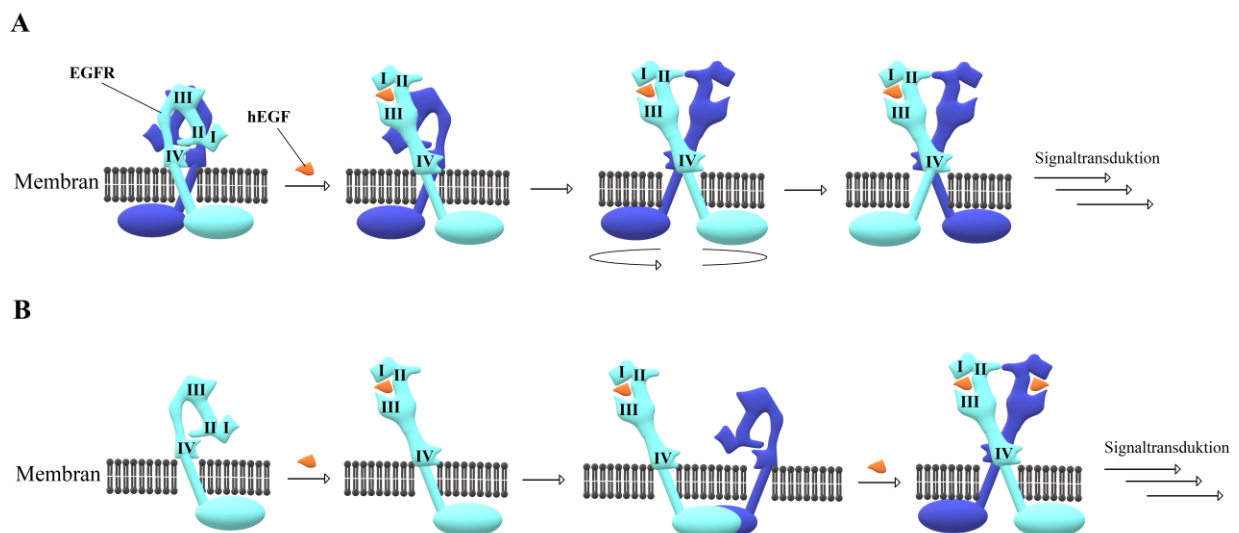


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung des EGFR durch hEGF nach dem Rotationsmodell (A) und dem Ligand-induzierten Dimerisierungsmodell (B). Grafik erstellt in Anlehnung an E.R. Purba et al.^[12].

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor eignet sich als Zielstruktur für die Bildgebung und Therapie von Krebs, da eine Vielzahl maligner Tumore den EGFR auf ihrer Zelloberfläche überexprimieren.^[8] Hierbei wird der EGFR nicht nur auf den Primärtumoren, sondern zumeist auch auf den Metastasen überexprimiert, was für eine umfängliche Darstellung und Behandlung dieser Krebspatienten unabdingbar ist.^[18-20] Es liegt eine EGFR-Überexprimierung bei 13 der 15 häufigsten Krebserkrankungen mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 27\%$, bei 8 der 15 häufigsten Krebserkrankungen sogar mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 50\%$, vor.^[7] Eine Übersicht des prozentualen Anteils der Tumore, welche den EGFR überexprimieren, ist in der Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Maligne Tumore und ihre prozentualen Anteile, die den EGFR überexprimieren.

Maligne Transformation	EGFR- Überexprimierung [%]	Lit.
Prostatakarzinom	40 – 100	[21]
Kopf-Hals-Karzinom	90 – 95	[22]
Pankreaskarzinom	65 – 95	[23-24]
Nierenkarzinom	73 – 94	[25]
Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig	50 – 90	[26-27]
Mammakarzinom	27 – 90	[28-29]
Kolorektales Karzinom	80	[30]
Blasenkarzinom	70	[31]
Overialkarzinom	30 – 70	[32-33]
Leberkarzinom	68	[34-36]
Gebärmutterkarzinom	54	[37]
Speiseröhrenkarzinom	27 – 44	[38-39]
Glioblastom	40	[40]

1.2.2 Endogener Ligand und literaturbekannte Liganden des EGFR

Der endogene Ligand des EGFR ist der hEGF, ein Polypeptid aus 53 Aminosäuren (Abbildung 5 A). Als natürliches Protein besteht der tricyclische hEGF nur aus L-Aminosäuren, wovon sechs Cysteine sind, die über drei Disulfidbrücken den hEGF in einen A-, B- und C-Cyclus unterteilen. Dabei bilden die Aminosäuren 6 bis 20 den A-Cyclus, die Aminosäuren 14 bis 31 den B-Cyclus und die Aminosäuren 33 bis 42 den C-Cyclus. Der A- und B-Cyclus teilen sich die Aminosäuren 14 bis 20, weshalb teilweise dem A-Cyclus die Aminosäuren 6 bis 19

und dem B-Cyclus die Aminosäuren 20 bis 31 zugewiesen werden. Als Sekundärstrukturen bilden der A-Cyclus eine α -Helix, der B-Cyclus zwei antiparallele zweisträngige β -Faltblätter und der C-Cyclus ein antiparalleles β -Faltblatt aus (Abbildung 5 B).^[11,41-42]

Für den hEGF befinden sich eine Bindungsstelle in der Domäne I und zwei Bindungsstellen in der Domäne III in der extrazellulären Region des EGFR. Es interagieren Met21, Ile23 und Leu26 des B-Cyclus des hEGF hauptsächlich hydrophob mit der Domäne I, während Tyr13 und Leu15 des A-Cyclus hydrophob, Gln43 und Arg45 des C-Cyclus über Wasserstoffbrücken und Leu47 des C-Cylcus hydrophob mit den zwei Bindungsstellen von der Domäne III wechselwirken.^[11]

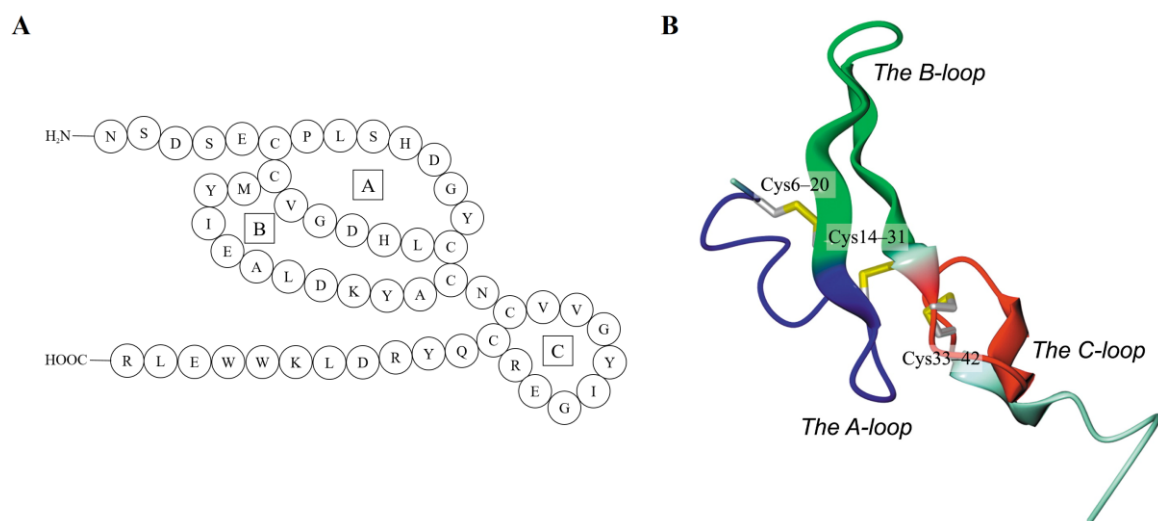


Abbildung 5: Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF, human epidermal growth factor): der endogene Ligand des EGFR. (A) hEGF Aminosäuresequenz. Abbildung erstellt nach Bavaro et al.^[42]; (B) hEGF Struktur. Der A-Cyclus ist in Blau, der B-Cyclus in Grün und der C-Cyclus in Rot dargestellt.^[11]

In der Literatur wurde schon eine Vielzahl möglicher Liganden als Inhibitoren für den EGFR untersucht. Die EGFR-Signalkaskade bedingt Proliferation, Viabilität, Motilität und Differenzierung der Zelle, weshalb durch eine Inhibierung fundamentale Zellfunktionen unterdrückt werden. In der Therapie kann mit EGFR-Inhibitoren Progression, Metastasierung usw. unterbunden werden, wodurch eine Ausbreitung der malignen Zellen verhindert wird. Im Besonderen wurden monoklonale Antikörper, small molecules und Peptide erforscht. Von den gefundenen Liganden sind bisher nur Substanzen aus der Klasse der monoklonalen Antikörper und small molecules zur Herstellung, für Vertrieb und Verwendung zugelassen. Als erste Generation small molecule Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wurden beispielsweise Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva) bereits seit dem Jahr 2003 bzw. 2004 als Krebsmedikamente zur Bekämpfung von Brust- und Lungenkrebs respektive Lungen- und

Bauchspeicheldrüsenkrebs von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA zugelassen. Der monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix) findet seit dem Jahr 2004 zur Bekämpfung von Darm- und Kopf-Hals-Krebs Anwendung. Cetuximab bindet extrazellulär an die Domäne III, wobei Gefitinib und Erlotinib intrazellulär an die Tyrosin-Kinase-Domäne des EGFR binden.^[43-49]

Da Peptide eine vorteilhafte Pharmakokinetik (geringe Immunogenität, geringe Toxizität, hohe Selektivität etc.) aufweisen^[50-51], erfolgt auch eine Entwicklung von Peptid-Liganden für den EGFR (Tabelle 2). Diese adressieren meist die Hauptbindestellen der Domäne III. Hierzu zählen die Liganden CPP, EBP, EGBP, GE11, P1, P2, P6, P9 und Pep11, für die in verschiedenen Publikationen eine Aufnahme in Zellen festgehalten wurde. Für P6 und P9 wurde zusätzlich zur Bindung an die Domäne III eine Bindung an die Domäne I *in silico* postuliert. Die Liganden CQT und QRH wurden für die Bindung an Domäne II konzipiert, während für die Domäne I der Ligand D4 mittels eines computerunterstützten, strukturbasierten Designs gefunden wurde.^[52-86]

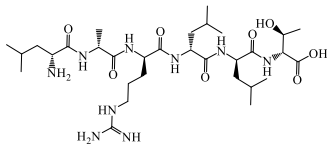
Tabelle 2: Literaturbekannte Peptid-Liganden und ihre gemessene Affinität.

Domäne	Ligand	Beste gemessene Affinität (K _D)	Zellen	Lit.
I	D4	181 ± 49 nM	A549	[52-59]
II	CQT	n.A.	n.A.	[60-62]
	QRH	50 nM	HT29	[63]
III	CPP	n.A.	n.A.	[64-65]
	EBP	n.A.	n.A.	[66]
	EGBP	n.A.	n.A.	[67]
	GE11	22.28 ± 0.4 nM	SMMC-7721	[68-80]
	P1	76.5 ± 15.8 nM	NCI-H460	[81-84]
	P2	n.A.	n.A.	[81]
	P6	n.A.	n.A.	[85]
P9	n.A.	n.A.	[85]	
	Pep11	252 nM	A431	[86]

Ein Überblick über die Strukturformeln der literaturbekannten Liganden aus der Tabelle 2 ist in der Abbildung 6 gegeben:

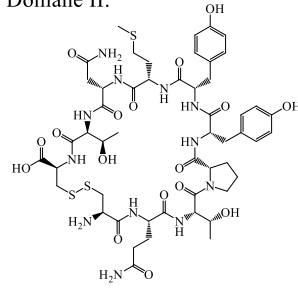
Einleitung

Domäne I:

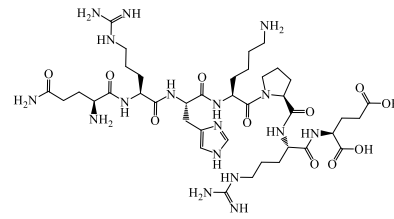


D4
LARLLT

Domäne II:

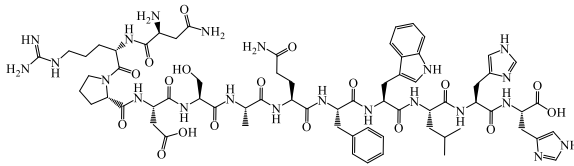


CQT
c(CQTPYYMNTC)

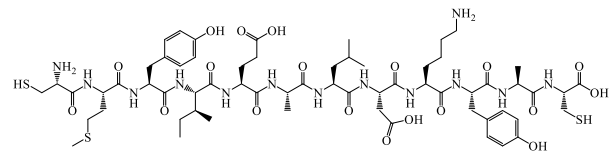


QRH
QRHKPRE

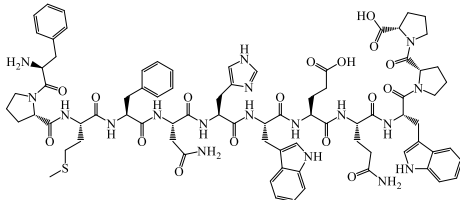
Domäne III:



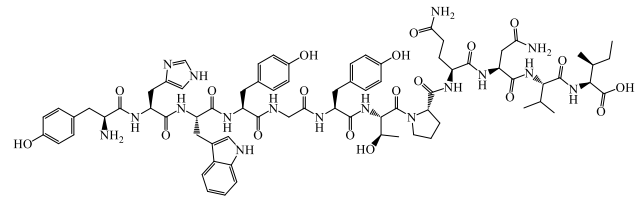
CPP
NRPDSAQFWLHH



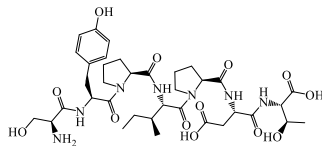
EBP
CMYIEALDKYAC



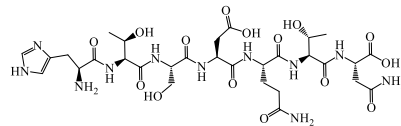
EGBP
FPMFNHWEQWPP



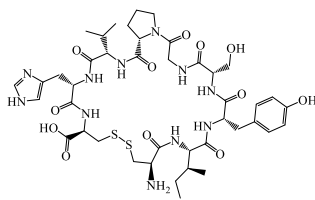
GE11
YHWYGYTPQNVI



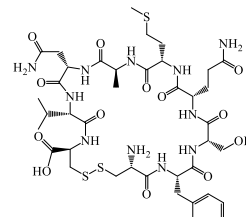
P1
SYPIPDT



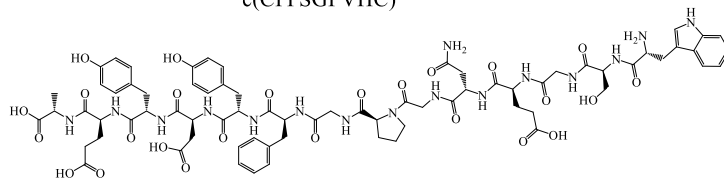
P2
HTSDQTN



P6
c(CIYSGPVHC)



P9
c(CYSQMANVC)



Pep11
WSGENGPFGFYDYEA

Abbildung 6: Literaturbekannte Liganden unterteilt nach der von ihnen jeweils adressierten Bindungsdomäne des EGFR.

1.3 Entdeckung neuer spezifischer Liganden eines Rezeptors

1.3.1 Phagen-Display (phage display)

Das Phagen-Display ist eine biotechnologische Methode, bei der Protein-codierende DNA in Bakteriophagen eingebracht wird, sodass die entsprechenden Proteine auf der Oberfläche der Phagen präsentiert werden, um spezifische Bindepartner dieser Proteine zu isolieren und zu identifizieren. Eine Bibliothek von codierender DNA wird eingesetzt um möglichst viele potentielle Bindepartner festzustellen, wobei Peptide, Antikörperfragmente oder komplette Proteine auf der Oberfläche präsentiert werden können.^[87] Die Abbildung 7 zeigt den Ablauf des Phagen-Displays.

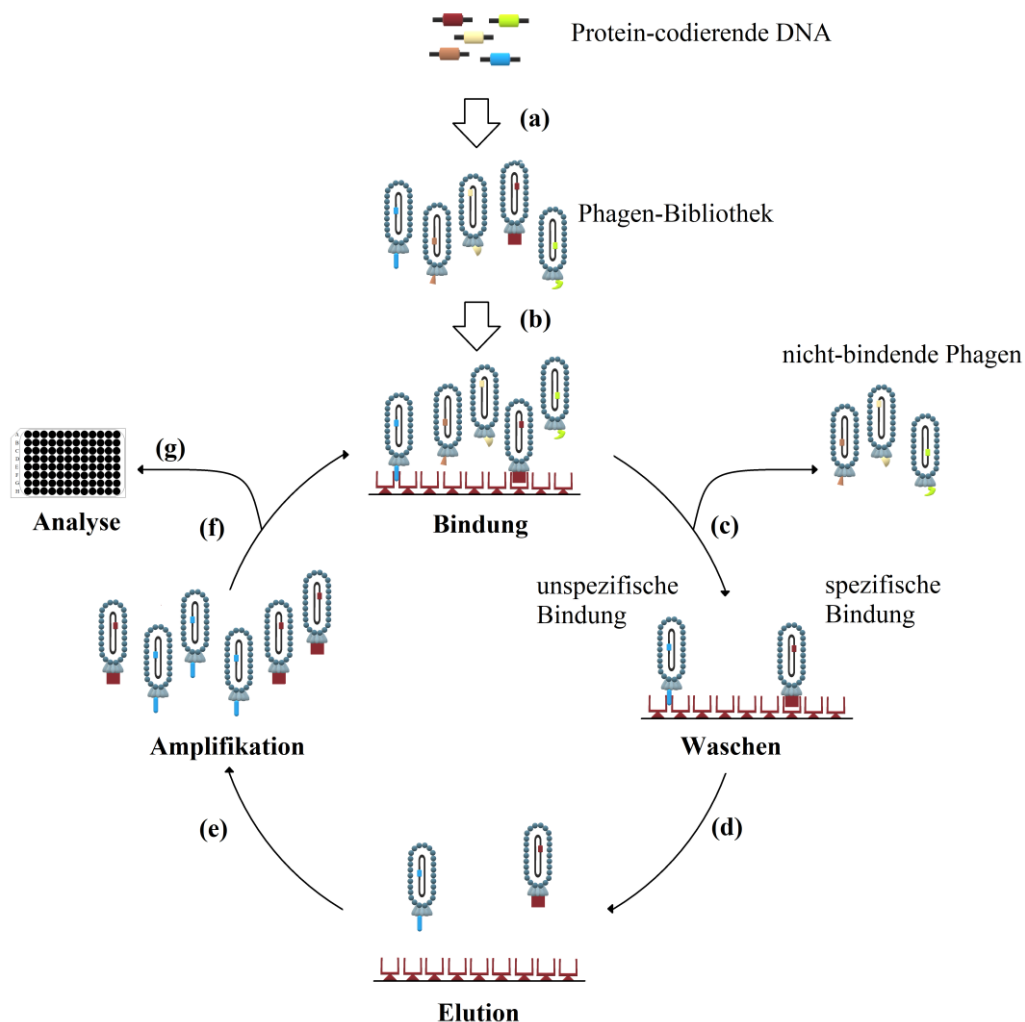


Abbildung 7: Ablauf des Phagen-Displays. Grafik erstellt in Anlehnung an W. Willats.^[88] (a) Die für das Phagen-Display selektierten Protein-codierenden DNAs werden in Phagen eingeführt, sodass die Phagen das gewünschte Protein auf ihrer Oberfläche präsentiert; (b) Die Phagen werden zu dem fixierten Target gegeben. Phagen, welche eine spezifische Affinität für das gewünschte Target-Molekül aufweisen, binden an das Target. Hierbei kann es auch zu unspezifischen Bindungen kommen; (c) Durch das Waschen der Platte werden ungebundene Phagen verworfen; (d) Gebundene Phagen werden von dem fixierten Target gelöst; (e) Die gelösten Phagen werden amplifiziert; (f) Die amplifizierten Phagen durchlaufen den Zyklus erneut, um die Wahrscheinlichkeit von Phagen mit unspezifischen Bindungen zu minimieren; (g) Nach 3 – 5 Cycles wird die Phagen-DNA extrahiert und sequenziert, um auf die bindende Proteinsequenz rückzuschließen.

Das Phagen-Display wurde im Jahr 1985 von G. P. Smith entdeckt, im Jahr 1994 zunächst von Winter et al. und im Jahr 1996 von Kay und Hoess weiterentwickelt.^[87,89-91] Verwendung findet die Methode insbesondere für *in vitro*-Protein-Engineering, die Entdeckung und Entwicklung neuer Arzneistoffe, Antikörper und Liganden, ebenso wie zum Auffinden von Leitstrukturen für die Bildgebung und Therapie von Tumoren.^[92-93]

Von den literaturbekannten EGFR-spezifischen Liganden wurden CPP, EGBP, GE11, P1, P2, P6, P9 und QRH via Phagen-Display gefunden.^[63,64,67,68,81,85]

1.3.2 Computerunterstütztes Arzneimittel Design (CADD, Computer-Aided Drug Design)

Computerunterstütztes Arzneimittel Design umfasst verschiedene am Computer durchgeführte Modelle und Methoden zur Entdeckung, Entwicklung und Analyse von Substanzen bezüglich ihrer Eignung als Arzneimittel. Es wird im virtuellen Screening, virtuellen Bibliothekdesign, in Leitstruktur-Optimierungen, im *de novo*-Design etc. genutzt. Das CADD soll vor allem Entdeckungsprozesse beschleunigen, helfen Kosten einzusparen und Optimierungsvorschläge erbringen. Es sollen unnötige Synthesen im Labor verhindert und nur noch vielversprechende Substanzen auf ihre Wirksamkeit an Zellen und Tieren überprüft werden.^[94]

Der Ligand D4 wurde aus einer virtuellen Peptid-Bibliothek mittels computergestützter Modelle als ein potentieller Ligand für den EGFR bestimmt. Dabei wurde die Kristallstruktur des EGFR als Basis genommen, ein Modell erstellt und mit dem Programm PSCAN 2.2.2 auf mögliche Bindungstaschen für kurzkettige Peptide hin untersucht. Anschließend wurde eine Peptid-Bibliothek aus 132 Peptiden erstellt, bevor mit dem Programm AutoDock3 mögliche Bindungsstärken für die gewählte Bindungstasche errechnet wurden (Abbildung 8).^[53]

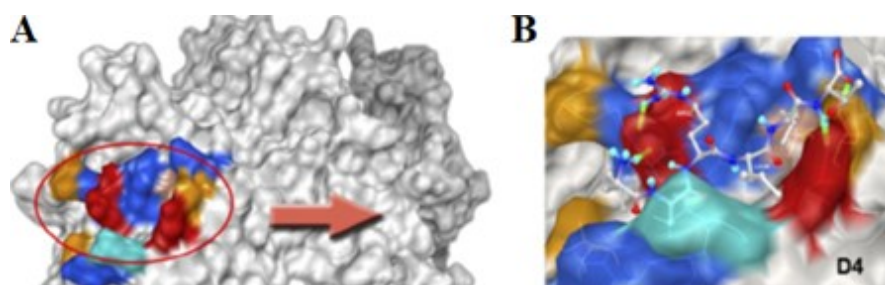


Abbildung 8: (A) Computergenerierte Darstellung der Bindungstasche des EGFR; (B) Computergenerierte Darstellung von D4 in der EGFR-Bindungstasche. Mögliche Wasserstoffbrücken sind in Hellgrün dargestellt.^[53]

Weiterhin wurde der Ligand Pep11 mittels CADD entwickelt. Hierfür wurde mit dem Programm UCSF Chimera die Kristallstruktur von Cetuximab, gebunden an den EGFR als Basis genommen, virtuell dargestellt und mit der Knob-Socket-Methode die einzelnen Bindungsstellen des Antikörpers an dem Rezeptor untersucht. Im Anschluss wurden mit einem In-House-Programm die wichtigsten Bindungsstellen und ihre zugehörigen Bindungsstärken kalkuliert, das Cetuximab aus dem erstellten Modell entfernt und aus einer Peptid-Bibliothek von 24 Peptiden mit dem Programm Molecular Operating Environment (MOE) das Peptid Pep11 als das mit den stärksten Bindungsenergien für die nun unbesetzte Domäne III bewertet.^[86]

Auch für bereits gefundene Liganden werden häufig mittels computergenerierten Modellen mögliche Bindungsstellen und interagierende Aminosäuren zugewiesen, sodass gezielt Aminosäuren identifiziert werden können, durch deren Austausch es zu einer Verbesserung der Bindungsaffinität kommt. Eine Überprüfung dieser Modelle mittels Röntgenstrukturanalyse von Einkristallen gestaltet sich, von noch nicht relevanten Liganden, in der Regel als zu zeitaufwendig und nicht praktikabel. In der Abbildung 9 sind die computergenerierten Bindungsmöglichkeiten des Liganden P1 an den EGFR dargestellt, welcher zuvor mittels Phagen-Display entdeckt wurde:

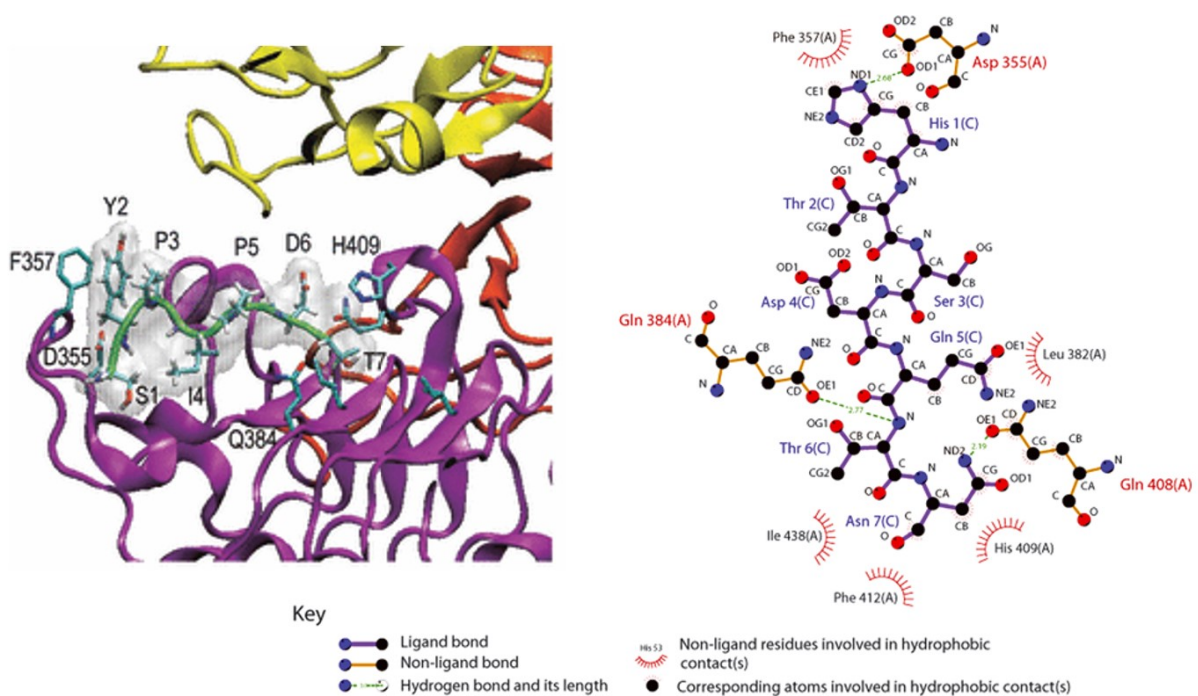


Abbildung 9: Computergenerierte Bindungsmöglichkeiten des Liganden P1 an dem EGFR.^[81]

1.3.3 Peptidische Teilsequenzen endogener Rezeptorliganden (truncated peptides)

Die Methode Teilsequenzen von endogenen Liganden zu synthetisieren, stellt eine brauchbare Alternative zu der Verwendung der ungekürzten endogenen Leitstrukturen dar. Die Teilsequenzen lassen sich meist unkompliziert synthetisieren, modifizieren und funktionalisieren, wobei die räumliche Struktur von dem endogenen Liganden zur verkürzten Version nicht zwingend konserviert wird. Es bleibt die spezifische Bindung an den Rezeptor meist mit verringerter Affinität erhalten. Auch weisen die Mehrheit an verkürzten Peptiden aufgrund der geringeren Angriffsfläche für Peptidasen eine erhöhte Stabilität *in vivo* auf.^[95]

Dass verkürzte Versionen von endogenen Liganden bereits funktionieren können, wurde mit dem von 14 auf 8 Aminosäuren gekürzten Bombesin BBN₇₋₁₄, dem von 29 auf 24 Aminosäuren gekürzten Glucagon GCG₆₋₂₉ und mit dem von 299 auf 24 Aminosäuren gekürzten p35 TFP5-Segment gezeigt.^[96-98]

Für den EGFR wurde der Ligand EBP (Abbildung 10 **B**) als eine verkürzte Sequenz aus dem B-Loop des hEGF (Abbildung 10 **A**) als eine die Domäne III-spezifisch-bindende Teilsequenz postuliert, nachdem bereits eine verkürzte Sequenz aus dem B-Loop des Maus-EGF eine schwache Bindung an den EGFR aufwies.^[99,66]

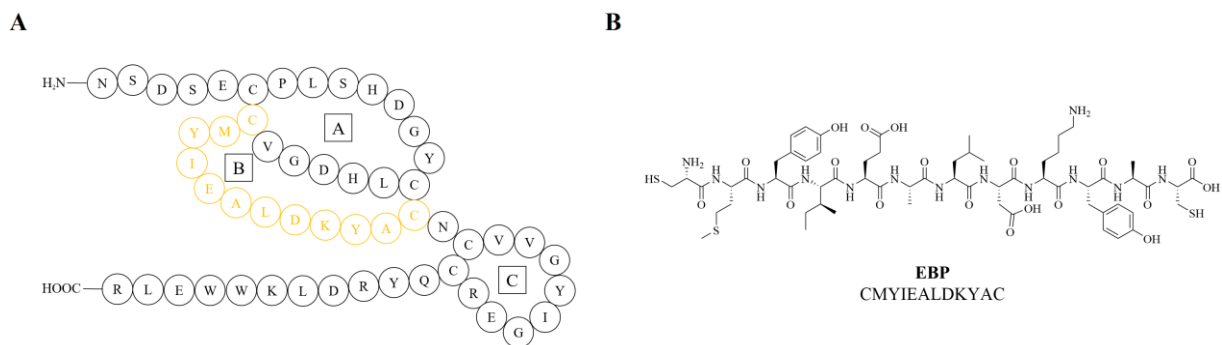


Abbildung 10: (A) Aminosäuresequenz von hEGF, mit der verkürzten EBP-Sequenz in Gelb; (B) Strukturformel der EBP-Sequenz.

Bei der Bindung des hEGF an den EGFR wird die Domäne II freigelegt. Der Ligand CQT startete als eine Teilsequenz der β -Hairpin-Struktur der Domäne II des EGFR, welcher im Laufe verschiedener Iterationen von c(CYNPTTYQMC) zu c(CQTPYYMNTC) optimiert wurde. Dieser sollte mittels Bindung an die freigelegte Domäne II eine Unterbindung der Dimerisierung des EGFR verursachen.^[60-62]

1.4 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

1.4.1 Funktionsweise der PET und Aufbau eines Radiotracers

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nicht-invasives Schnittbildverfahren zur Darstellung der Verteilung (Pharmakokinetik) einer radioaktiv markierten, intravasal applizierten Substanz (Radiotracer) und ist für die Ganzkörper-Bildgebung und Charakterisierung von malignen Transformationen auf funktioneller Ebene, der Planung des Therapiekonzeptes, zur Überwachung und Anpassung der laufenden Therapie und nachfolgenden Überwachung des Therapieerfolges unabdingbar. Neben der PET ist auch die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT, **s**ingle **p**hoton **e**mission **c**omputed **t**omography) eine Methode zur frühen Detektion von physiologischen als auch biochemischen Prozessen auf zellulärer und molekularer Ebene. Klassische Bildgebungsmethoden, wie beispielsweise Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglichen die Differenzierung zwischen malignem und normalem Gewebe erst deutlich später, da nur morphologische Änderungen detektiert werden können.^[100-101]

Die Kombination von funktioneller und morphologischer Bildgebung als PET/CT, PET/MRT oder SPECT/CT führt zu einer verbesserten Bestimmung pathologischer Veränderungen durch die genaue Zuordnung der Gewebefunktion zu den morphologischen Daten und findet eine breite Anwendung in der Nuklearmedizin zur Diagnose und Therapiekontrolle von neurologischen, kardiologischen und onkologischen Krankheiten.^[102-103]

Die SPECT erfolgt mit Photonenemittern (γ -Emitter) als Radionuklide, wobei einzelne Photonen gemessen werden. Die für SPECT genutzten Kollimatoren lassen nur Radioaktivität aus einer definierten Richtung durch und bedingen die räumliche Auflösung, wobei die Szintillationskristalle höhere Tot- und Abklingzeiten als die der verwendeten PET-Kristalle besitzen. SPECT-Aufnahmen können um bis zu ein zehnfaches günstiger als PET-Aufnahmen sein, da u. a. die Herstellungskosten für die Radiopharmaka bei der PET deutlich höher sind.^[104-105]

In der PET werden Positronen-emittierende (β^+ -Emitter) Radiopharmaka, auch Radiotracer genannt, intravenös appliziert. Die Anzahl an verschiedenen Radiotracern für die spezifische Adressierung von pathologischen funktionellen Änderungen hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Generell hat jede bioaktive Verbindung das Potential, durch die

Radiomarkierung mit einem passenden β^+ -Emitter als PET-Ligand genutzt zu werden. Bei der PET zerfällt das protonenreiche Radionuklid spontan, womit sich ein Proton in ein Neutron umwandelt, wodurch ein Positron und ein Elektron-Neutrino (ν_e) freigesetzt werden. Das Positron (Antiteilchen des Elektrons) interagiert, abhängig von seiner kinetischen Energie, innerhalb weniger Millimeter mit einem negativ geladenen Elektron in der Umgebung, sodass es zur Annihilation (Paarvernichtung) kommt. Es entstehen zwei γ -Photonen mit 511 keV, die annähernd in einem 180° -Winkel abgestrahlt werden und in einem Koinzidenzzeitintervall von 6 – 12 ns auf einander gegenüberliegende Szintillationskristalle treffen und dort Lichtblitze erzeugen, die durch Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt werden.^[104,106]

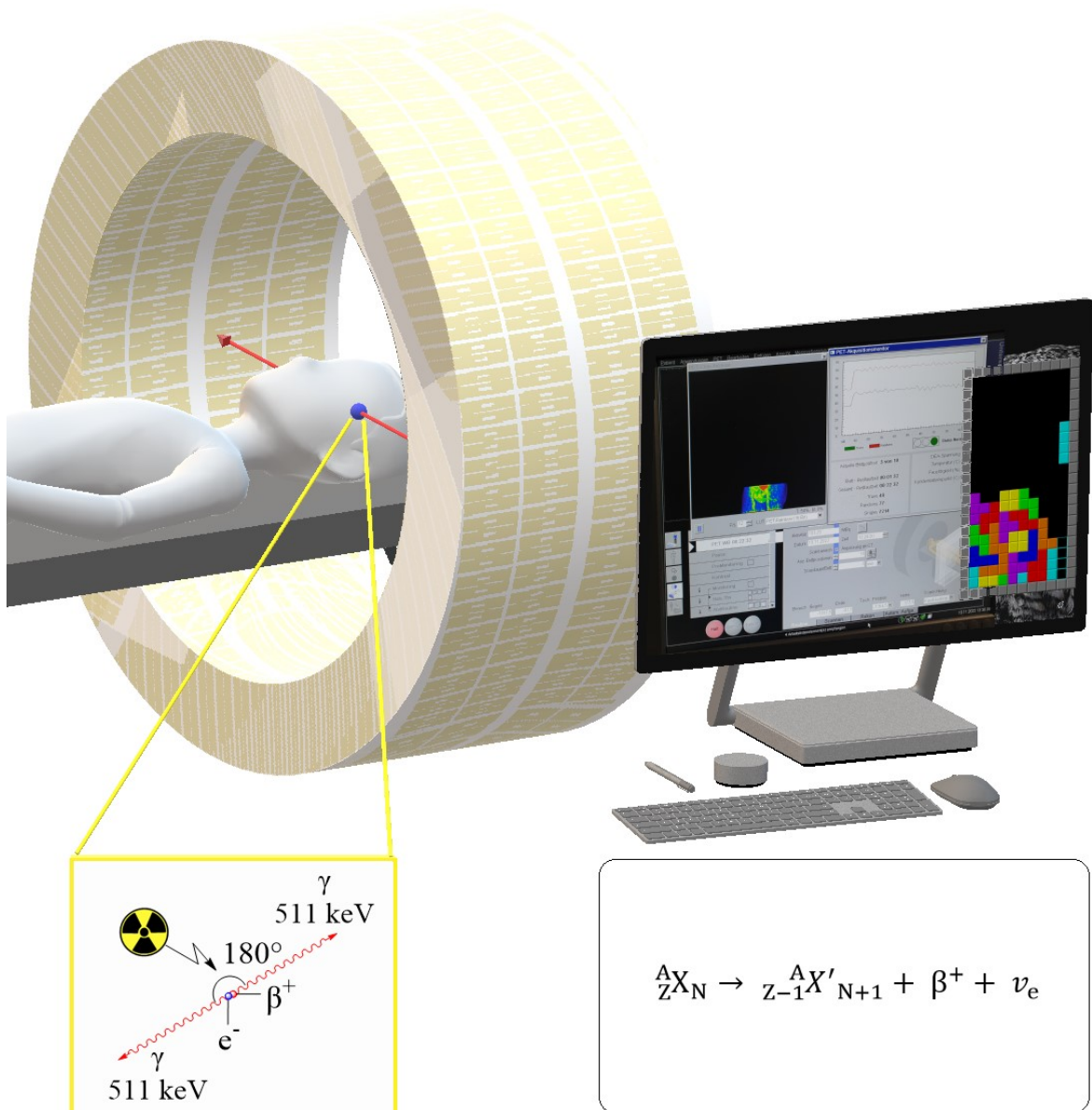


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Prozesse des Positronenzerfalls, der Annihilation des Positrons mit einem Elektron und die Detektion der Vernichtungsstrahlung mittels eines PET/CT-Scans.

Die Verbindungslinie zwischen den beiden Lichtblitzen wird Line of Response (LOR) genannt. Aufgrund der Anreicherung des Radiotracers in malignem Gewebe werden dort mehr LORs gemessen als in gesundem Gewebe, wobei die Ortsauflösung der PET durch die Bewegung der Positronen durch die Materie hindurch, die Größe der Detektoren, als auch den nicht perfekten 180°-Winkel limitiert wird. Ein PET-Scanner besteht aus 30 000 Kristallen in einem Detektorring, während in einer konventionellen Gammakamera höchstens drei Detektoren Anwendung finden. Die Ortsauflösung für klinisch genutzte Geräte beträgt 5 – 7 mm, Geräte, welche in der Präklinik eingesetzt werden, weisen eine Ortsauflösung von 1 – 2 mm auf.^[107] Ein Computer erstellt aus den einzelnen Schnittbildern ein dreidimensionales Bild, in dessen Zuge der Einfluss zufälliger Koinzidenzen (Randoms) und Streueignisse (Scatters) mittels Korrekturfaktoren minimiert werden kann. Neuere Geräte korrigieren zusätzlich noch nach der Flugzeit (TOF, time of flight), in welchem Rahmen die Differenz der Flugzeiten von jeweils zwei gegenüber eintreffenden γ -Photonen bestimmt wird, was eine genauere Lokalisation und Darstellung des Tumors erlaubt.^[108-110]

In der PET können das freie Radionuklid, beispielsweise als [¹⁸F]Natriumfluorid (Cisnaf) zur Bildgebung der Knochen, das Radionuklid direkt kovalent an einen Liganden gebunden, oder über einen Chelator komplexiert als Radiopharmaka eingesetzt werden. Der Chelator-Radionuklid-Komplex muss dabei nicht unbedingt an einen Liganden gebunden werden, sondern kann auch unfunktionalisiert, beispielsweise als [⁶⁸Ga]Ga-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) zur renalen Bildgebung, genutzt werden.^[111] Kovalent an den Liganden gebundene Radionuklide ermöglichen die Überwachung von Stoffwechselprozessen und werden meist in Metabolisierungsstudien verwendet. Die Abbildung 12 zeigt den Aufbau und die charakteristische Zusammensetzung eines typischen Radiometall-basierten Radiotracers aus einem Chelator, welcher das Radionuklid komplexiert, einem Linker, welcher den Liganden mit dem Chelator verbindet und dem Liganden, der mit einer hohen Affinität und Spezifität an verschiedene Zielstrukturen wie Rezeptoren, Antigene und Transporter bindet. Als Liganden kommen Peptide, Antikörper, Proteine, small molecules oder Nanopartikel zum Einsatz.^[108,112]

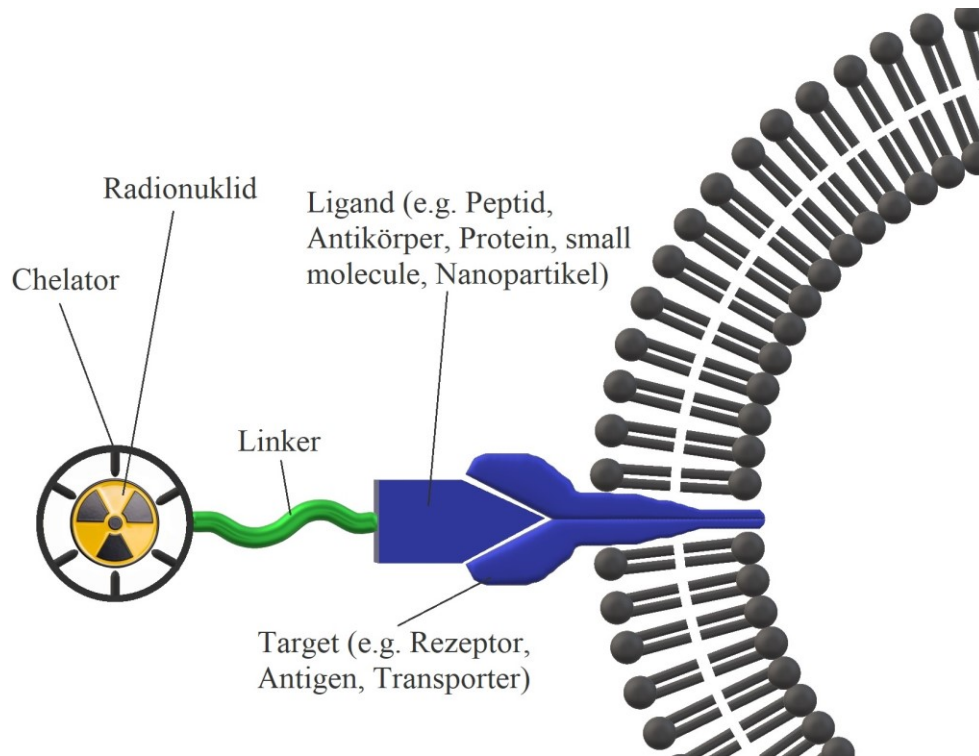


Abbildung 12: Typischer Aufbau eines Zielstruktur-spezifischen Radiometall-basierten Radiotracers für die PET.

Die Voraussetzung für die Verwendung von spezifischen Radiotracern in der PET besteht in der Kenntnis, welche Zielstrukturen der Tumor überexprimiert, da sonst keine Bildgebung durchführbar ist. Ist die Zielstruktur, welche adressiert werden soll, nicht bekannt, kann nach wie vor eine metabolische Bildgebung mit [^{18}F]-2-Fluor-2-desoxy-D-glucose ([^{18}F]FDG), einem Strukturanalogon der Glucose, durchgeführt werden.

Bei der Entwicklung neuer spezifischer Radiotracer sind folgende Punkte zu beachten:

- 1) Der gewählte Ligand muss mit hoher Affinität und Spezifität an das Zielgewebe binden.
- 2) Bei der Funktionalisierung des Liganden mit dem Linker/Chelator oder direkt mit dem Radionuklid darf seine Bindung an die Zielstruktur nicht beeinträchtigt werden.
- 3) Die Wahl des Linkers beeinflusst die Pharmakokinetik (Löslichkeit, Lipophilie, Ladung, Stabilität, Rigidität). Ein zu kurzer Linker kann die Bindung behindern, ein zu langer Linker geht mit einer hohen Entropie einher. Die passende Linkerlänge muss experimentell bestimmt werden und ist von Tumormodell zu Tumormodell verschieden.
- 4) Die Pharmakokinetik des Liganden bedingt das eingesetzte Radionuklid. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des Radionuklids muss zu der Pharmakokinetik des Liganden passen.

- 5) Der Chelator muss so gewählt werden, dass das eingesetzte Radionuklid gut in die Kavitätsgröße des Chelators komplexiert werden kann. Zudem beeinflusst der Chelator die Pharmakokinetik.
- 6) Der Radiotracer muss *in vivo* eine hohe Stabilität aufweisen, sodass genug Zeit gewährleistet wird, damit er sich am Zielgewebe anreichern kann. Ebenso sollte keine Freisetzung des Radionuklids erfolgen.

1.4.2 Verwendete Radionuklide in der PET

Die wichtigsten in der PET eingesetzten Isotope sind ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr und ^{124}I . Von diesen wird das Radionuklid ^{18}F am häufigsten klinisch eingesetzt und üblicherweise wie ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{64}Cu und ^{89}Zr mittels Zyklotron hergestellt. Während ^{124}I mit 4.2 d, ^{89}Zr mit 78.4 h, ^{86}Y mit 14.7 h und ^{64}Cu mit 12.7 h relativ hohe Halbwertszeiten haben, weisen die Isotope ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F und ^{68}Ga eine relativ kurze Halbwertszeit auf, wodurch diese vor allem in Kombination mit Liganden mit schneller Pharmakokinetik von Nutzen sind. Aufgrund seiner etwas längeren Halbwertszeit von 110 min kann ^{18}F allerdings kommerziell vertrieben werden. Der bekannteste metabolische PET-Tracer, das D-Glucose-Mimetikum [^{18}F]FDG ist der wichtigste klinisch eingesetzte Tracer in der PET/CT Bildgebung. [^{18}F]FDG reichert sich in Gewebe und Organen mit hohem Glucosebedarf an und wird hauptsächlich zur Bildgebung von Tumoren und in geringerem Maß zur Diagnose und Charakterisierung von Alzheimer, Parkinson, Epilepsie und Entzündungen sowie in der Kardiagnostik und der Perfusionsbildgebung angewendet.^[113-117]

Die Wahl des Nuklids hängt maßgeblich von der Verfügbarkeit, den radiochemischen Eigenschaften und der Bindung des Nuklids an den Liganden ab. So werden die Radionuklide ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F und ^{124}I zumeist direkt kovalent an den Liganden gebunden.^[118]

Bei der Nutzung von Radiometallen wird zusätzlich ein Chelator für die Komplexierung des Metalls benötigt. Der Chelator erlaubt die theranostische Verwendung, i. e. die Möglichkeit, sowohl Diagnostik als auch Therapie mit dem gleichen Liganden durchzuführen, wobei nur das Radionuklid ausgetauscht wird. Ein theranostisches Radionuklidpaar besteht jeweils aus einem γ - oder β^+ und einem α -, β^- oder Auger-Elektronen-Strahler. Bei Paaren vom gleichen chemischen Element handelt es sich um ein „True Pair“, bei solchen mit zwei unterschiedlichen

Elementen dagegen um ein „Matched Pair“. Beispielsweise werden zur Therapie ^{177}Lu statt ^{68}Ga (Matched Pair) und ^{90}Y statt ^{86}Y (True Pair) genutzt.^[119]

In der Tabelle 3 ist ein Überblick der Radionuklide mit ihrer jeweiligen Halbwertszeit, der Wahrscheinlichkeit des β^+ -Zerfalls und der mittleren β^+ -Energie zum Einsatz in der PET gegeben:

Tabelle 3: Klinisch eingesetzte Radionuklide in der PET.^[120-123]

Radionuklid	β^+ -Zerfall	Halbwertszeit	Mittlere β^+ -Energie
^{11}C	100%	20.4 min	385.6 keV
^{13}N	100%	10.0 min	491.8 keV
^{15}O	100%	2.0 min	735.3 keV
^{18}F	100%	109.8 min	249.8 keV
^{64}Cu	17.6%	12.7 h	278.2 keV
^{68}Ga	87.7%	67.7 min	836.0 keV
^{86}Y	11.9%	14.7 h	535 keV
^{89}Zr	22.7%	78.4 h	395.5 keV
^{124}I	11.7%; 10.7%	4.2 d	687.0 keV; 974.7 keV

1.4.2.1 Verwendung von $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}^{3+}]$ in der PET

Trotz der hohen mittleren Energie der Positronen (836.0 keV) und der dadurch bedingten niedrigen Ortsauflösung wird das Radiometall ^{68}Ga regelmäßig in PET-Tracern in der klinischen Routine eingesetzt.^[124] Während ^{18}F in einem Zyklotron hergestellt wird, kann ^{68}Ga mit einer Halbwertszeit von 67.7 min als $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}^{3+}]$ direkt in den Kliniken über die Elution eines $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator gewonnen werden, was einen geringeren logistischen Aufwand und Kostenersparnisse bedeutet. Im Generator befindet sich die radioaktive Muttersubstanz Germanium-68, welche mit einer Halbwertszeit von 270.95 d zu Gallium-68 zerfällt (Abbildung 13). Das produzierte Gallium wird mittels einer 0.1 M HCl-Lösung von dem Generator in ein Auffanggefäß als $^{68}\text{Ga}[\text{GaCl}_3]$ eluiert. Der erste Vorläufer eines $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators wurde im Jahr 1960 von G. I. Gleason entwickelt, der diesen als eine „Positronen Kuh“ umschrieb, weshalb das Eluieren des Tochternuklids auch „Melken“ genannt wird.^[125-127]

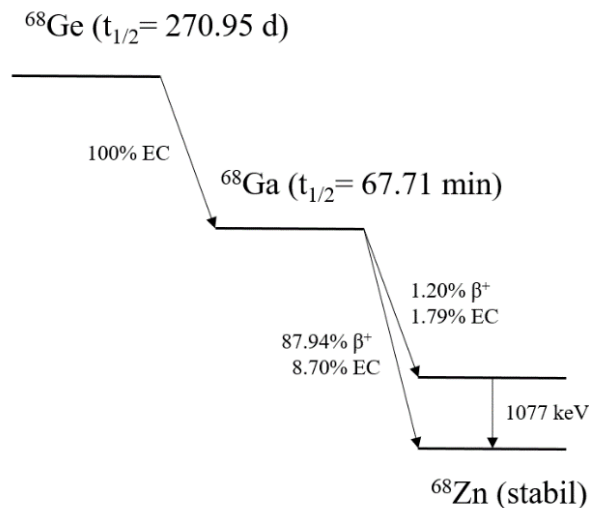


Abbildung 13: Zerfallsschema Germanium-68/Gallium-68 erstellt nach H.R. Maecke et al.^[259].

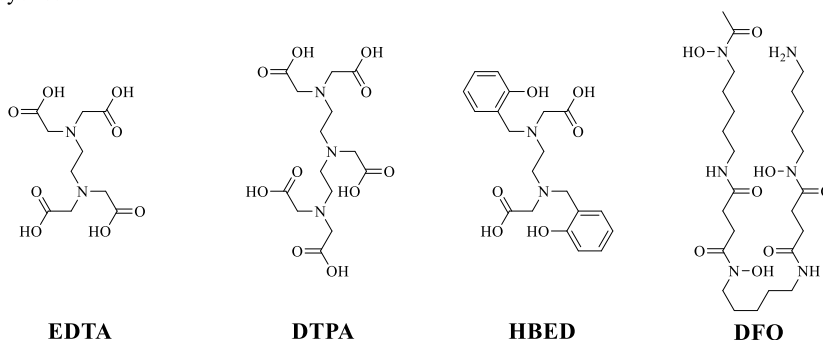
Auch für die Forschung liefert das Arbeiten mit einem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator Vorteile, weil ein sehr flexibler Zugang zu dem Radionuklid garantiert werden kann. Außerdem wird für die PET/CT-Untersuchung an Mäusen eine deutlich geringere Menge an Aktivität (ca. 5 MBq pro Maus) als bei einem normalgewichtigen menschlichen Patienten (70 kg, bis zu 350 MBq) benötigt, was eine lange Nutzungsdauer der Generatoren zulässt.^[128,129]

Der erste $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator wurde im Jahr 1964 eingesetzt und der eluierte [^{68}Ga]Ga-EDTA-Komplex direkt in der Klinik zur funktionellen Diagnose, insbesondere der Durchblutung des Gehirns angewendet. Ein Teil der nachfolgenden Generatoren lieferten [^{68}Ga]Ga³⁺ statt bereits komplexiertem ^{68}Ga , welches die Verwendung einer Vielzahl an verschiedenen Chelatoren erlaubt.^[130-131] Diese Generatoren werden kommerziell vertrieben, finden in vielen Kliniken Anwendung und ermöglichen die Verwendung weiterer acyclischer Chelatoren, aber auch cyclischer Chelatoren. Hierbei ist einer der am häufigsten eingesetzten Chelatoren das cyclische 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) oder seine um eine Carboxylatgruppe erweiterte Struktur 1,4,7,10-Tetraaza-cyclododecan-1-glutarsäure-4,7,10-tetraessigsäure (DOTA-GA).^[127]

Zugelassen von der FDA in den USA für die PET-Bildgebung sind die ^{68}Ga -Tracer [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE (2016), [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC (2019) und [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 (2020).^[132-133] Zur Komplexierung von [^{68}Ga]Ga³⁺ beinhalten [^{68}Ga]Ga-DOTA-TATE und [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC den Chelator DOTA, [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 nutzt unterdessen den Chelator *N,N'*-Bis-[2-hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl]ethylendiamin-*N,N'*-diessigsäure (HBED-CC).

Ein weiterer häufig gewählter Chelator zur Komplexierung von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ ist 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA). NOTA besitzt eine geringere Kavitätsgröße als DOTA und eignet sich entsprechend besser für die Komplexierung des kleinen $^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Ions, was sich auch in einer höheren Stabilitätskonstante und milderen Markierungsbedingungen widerspiegelt.^[134] Die Verwendung von NODA-GA, der Erweiterung von NOTA um eine Carboxylatgruppe, führt zu einer weiter signifikant erhöhten Stabilität des Komplexes.^[127] In Abbildung 14 sind die Strukturformeln der wichtigsten acyclischen und cyclischen Chelatoren für die Komplexierung mit Ga^{3+} dargestellt:

Acyclisch:



Cyclisch:

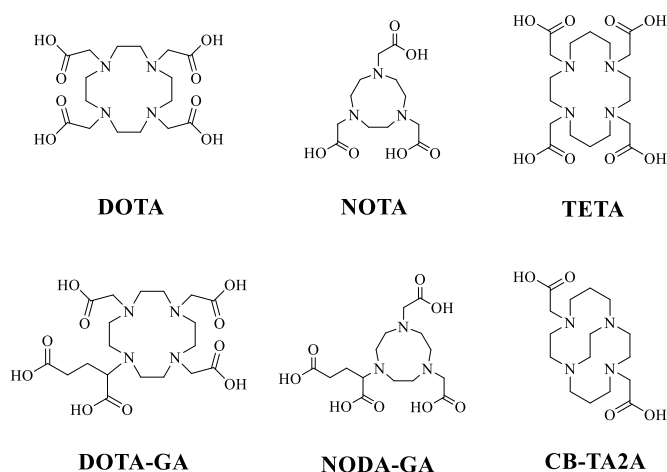


Abbildung 14: Strukturformeln der wichtigsten acyclischen und cyclischen Chelatoren für die Komplexierung mit Ga^{3+} .

Generell muss die Bindung des Radionuklids an den Liganden *in vivo* stabil sein, da sonst eine Freisetzung und Anreicherung der Radioaktivität in unerwünschten Regionen stattfindet. So muss der gebildete Radiometall-Chelator-Komplex kinetisch inert gegen Dekomplexierung durch z. B. die Anwesenheit von Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} etc. und insbesondere von Fe^{3+} sein. Beispielsweise sind die chemischen Eigenschaften von freiem Ga^{3+} mit einem Ionenradius von

62 pm ähnlich wie die von Fe^{3+} mit einem Ionenradius von 65 pm. Um somit die Transchelatierung auszuschließen, muss der eingesetzte Radiometall-Chelator-Komplex zusätzlich eine höhere kinetische Inertheit als der entsprechende Transferrin-Komplex aufweisen, da $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ sonst Transferrin-gebunden durch das Blut transportiert wird. Freies ${}^{68}\text{Ga}^{3+}$ reichert sich im Darm, Knochen und Magen an, während in den Nieren keine signifikante Menge Aktivität aufgenommen wird.^[135-136] Weiterhin bindet freies Ga^{3+} an Leukozyten-Lactoferrin, Siderophore, Inflammationsproteine und Zellmembranen in neutrophilen Granulozyten, wobei die Ausscheidung über den Gastrointestinaltrakt geschieht.^[137-139]

1.4.3 Peptide in der PET-Bildgebung

Während mit $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FDG}$ metabolische Prozesse abgebildet werden, bieten Peptide die Möglichkeit, durch spezifische Bindungen an Zielstrukturen wie Rezeptoren, Enzyme und Transporter eine hochauflösende funktionelle Bildgebung von selektierten Zielstrukturen durchzuführen. Generell weisen Peptide eine gute Pharmakokinetik, eine niedrige Toxizität und Immunogenität auf, sind leicht zu synthetisieren und gut zu funktionalisieren.^[140] Der Fokus für die PET liegt besonders auf der Clearance, Rezeptorbindungskinetik und Ausscheidungsrouten des Radiopeptids.^[141-144] Um ein starkes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu erhalten, sind eine kurze Aufenthaltsdauer im Blut und eine schnelle Ausscheidung des nichtaufgenommenen Radiotracers wichtig. Die Aufenthaltsdauer im Blut sollte jedoch lang genug sein, um eine hohe Aufnahme des Radiotracers im Zielgewebe zu gewährleisten. Die Ausscheidung von Peptiden verläuft üblicherweise über die Niere, was auch die Untersuchung der Leber mittels PET ermöglicht. Die Bildgebung mit $[\text{}^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ist für die Untersuchung von Leber und Gehirn erschwert, da Leber und Gehirn einen erhöhten Glucoseverbrauch aufweisen.^[145-146]

Um die vorteilhafte Pharmakokinetik und Eigenschaften der Peptide zu nutzen, werden peptidbasierte Radiopharmazeutika für eine spezifische molekulare Bildgebung oder Therapie erforscht. In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte bzgl. Diagnostik in der Onkologie, IGRT (image-guided radiation therapy), Behandlungsprognosen und Behandlungsmonitoring mit Peptiden erzielt. So befindet sich eine Vielzahl von Peptiden in der Entwicklung zu PET-Radiotracern. Eine Selektion von Peptiden, die bereits in klinischen PET-Bildgebungsstudien eingesetzt wurden und werden, ist in der Tabelle 4 aufgelistet:

Tabelle 4: Selektion von Peptiden in klinischen PET-Bildgebungsstudien.

Rezeptor	Erkrankung	Radionuklid	Ligand	Status	Lit.
PSMA	Prostatakarzinom	^{18}F	DCFPyL	Phase II/III	[147]
	Prostatakarzinom	^{68}Ga	Glu-NH-CO-NH-Lys-(Ahx)	Phase II/III	[148]
GRPR	Prostata Adenokarzinom	^{68}Ga	BAY86-7548	Phase II/III	[149]
	Gastrointestinale Stromatumoren (GIST)	^{68}Ga	BZH3	Phase II	[150]
	Prostatakarzinom	^{64}Cu	AR06	Phase I	[151]
Somatostatin Rezeptoren	Neuroendokrine Tumoren	^{68}Ga	TATE	Phase II	[152]
	Neuroendokrine Tumoren	^{68}Ga	TOC	Phase II	[152]
	Neuroendokrine Tumoren	^{68}Ga	NOC	Phase II	[152]
Integrin $\alpha_v\beta_{3/5}$	Kopf-Hals-Tumoren	^{18}F	RGDfK	Phase II	[153]
	Glioblastom, Brust-, Lungen-, Gebärmutterhals-, Eierstockkrebs	^{18}F	RGDyK	Phase II	[154]
	Melanome und Nierentumore	^{18}F	Fluciclatide	Phase II	[155]
CXCR4	Glioblastom	^{68}Ga	Pentixafor	Phase II	[156]

1.5 Festphasenpeptidsynthese (SPPS, solid phase peptide synthesis)

Die Synthese von Peptiden ist ein relevanter Bereich industrieller chemischer Synthesen.^[157] Eine besondere Rolle nimmt die Synthese an fester Phase (SPPS, **s**olid **p**hase **p**eptide **s**ynthesis) ein, welche im Jahr 1963 von Merrifield entwickelt wurde.^[158] Es vereint die komplette Peptid-Synthese, sowohl die Kupplung der Aminosäuren als auch die Abspaltung der Schutzgruppen (SG), in einem Reaktionsgefäß. Dabei entfallen die aufwendigen Aufreinigungsschritte zwischen jeder Kupplung und die feste Phase kann einfach mit Lösungsmitteln von unreaktiertem Edukt freigewaschen werden. Seit ihren Anfängen hat sich die SPPS deutlich weiterentwickelt, bezüglich der Methode als auch hinsichtlich der Materialien. So sind

vollständig automatische Peptidsynthesizer mittlerweile industrieller Standard in der Herstellung von Peptiden.^[159]

Die SPPS verläuft in einem Cylcus aus Entschützung, Aktivierung, Kupplung und der Abspaltung als Abbruchreaktion (Abbildung 15). Bei einer klassischen SPPS ist die erste Aminosäure über ihre Carboxyl-Gruppe an die feste Phase gebunden, wobei es eine Vielzahl an verschiedenen Harzen (4-Methylbenzhydrylamin- (MBHA), Wang-, 2-Chlorotrylchlorid (CTC), Merrifield-Harze etc.) gibt, welche jeweils für die beabsichtigte Anwendung optimiert sind. Während der Entschützung wird die Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe durch die Zugabe von Piperidin in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) entfernt. Die Kupplung erfolgt mit mechanischem Schütteln, im Ultraschallbad oder im mikrowellengestützten automatischen Peptidsynthesizer, wobei die Menge gekuppelter Aminosäure nach der Entschützung über spektrophotometrische Messung von Dibenzfulven, dem Abspaltprodukt von Fmoc, quantifiziert werden kann.^[160] Reaktive funktionelle Seitenketten der Aminosäuren werden durch geeignete Schutzgruppen temporär blockiert um Nebenreaktionen zu vermeiden. Schlussendlich wird mittels einer Abspaltungslösung z. B. bestehend aus Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIS) als Radikalfänger^[161] und Wasser, das Peptid global entschützt und vom Harz abgespalten.

Die Reagenzien, Aminosäuren *N*-terminal geschützt und *C*-terminal aktiviert, Anhydride, Aktivester, Chelator etc. werden im Überschuss eingesetzt und nach der Kupplung durch Waschen des Harzes mit Lösungsmittel entfernt.^[162] Abbildung 15 zeigt eine beispielhafte Peptidsynthese an fester Phase nach der Fmoc-Strategie:

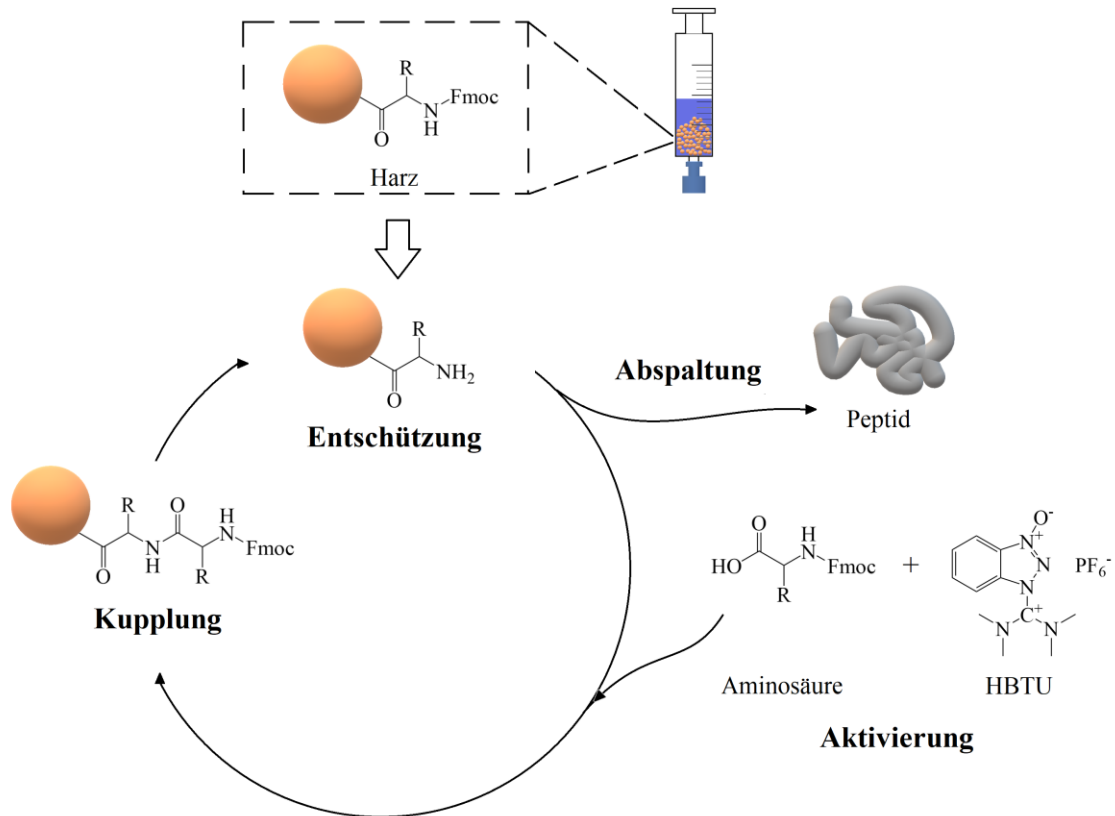


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Peptidsynthese an fester Phase nach Fmoc-Strategie.

Die maximale Ausbeute der SPPS ist dadurch limitiert, dass jede Kupplung einer Aminosäure nur zu einem gewissen Maß erfolgreich umgesetzt werden kann (Abbildung 16 A). Hierdurch begrenzt sich die Anzahl der Aminosäuren, welche mit guten Ausbeuten an ein Harz gebunden werden kann, statistisch wie sterisch. Für die Umgehung dieser Probleme existieren chemoselektive Ligationsreaktionen (Abbildung 16 B), wodurch zwei Peptide in Lösung miteinander verknüpft werden können: 1) Die NCL (eng. native chemical ligation), bei welcher *N*-terminales Cystein mit einem *C*-terminalen Thioester in einer Thiotransesterifikation reagiert, gefolgt von einer Umlagerung, welche in einer Amid-Bindung resultiert. 2) Die KAHA Ligation (eng. α -keto acid hydroxylamine), bei welcher eine *N*-terminale Hydroxylamin-Gruppe mit einer *C*-terminalen α -Ketosäure zu einer Amid-Bindung reagiert. 3) Die Ser/Thr Ligation, bei welcher ein *N*-terminales Serin/Threonin mit einem *C*-terminalen *O*-Salicylaldehydester zu einer Amid-Bindung reagiert.^[163]

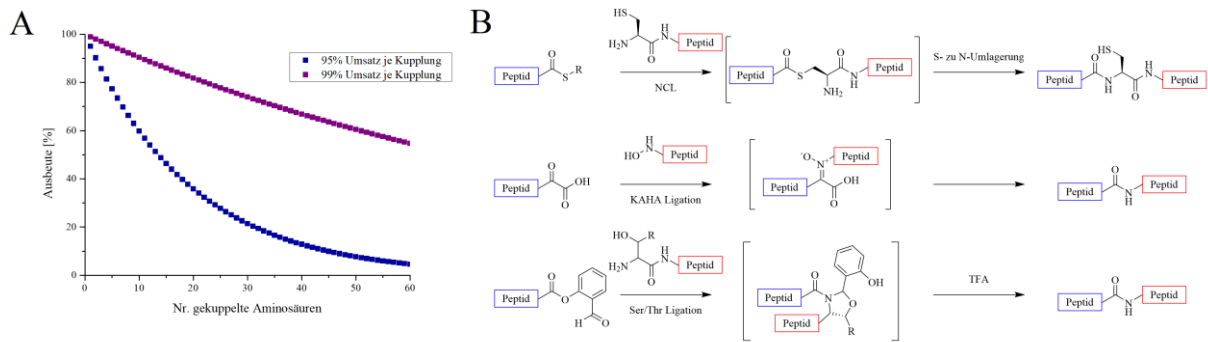


Abbildung 16: (A) Maximale Ausbeute von SPPS, bei 95% Umsatz (Blau) bzw. 99% Umsatz (Violett) je Kupplung; (B) Ligationsreaktionen NCL, KAHA und Ser/Thr.

Die SPPS wird in der Industrie in bis zu 100 L Glasgefäßen durchgeführt, während in Labormaßstäben meist Spritzen mit Polyethylen-Filtern hoher Dichte (HDPE, **H**igh **D**ensity **P**olyethylene) versehen und mit dem gewünschten Harz befüllt werden. Dadurch lassen sich Reaktions- und Waschlösungen einfach aufziehen und anschließend verwerfen, ohne dass das Harz das Reaktionsgefäß verlassen muss. Abseits der Synthese der Peptide nach Fmoc-Standardprotokoll^[164], bei welcher die Harze während der Kupplung und Abspaltung vom Harz und der Entschützung der Seitengruppen mechanisch geschüttelt werden, kann die gesamte SPPS auch in einem Ultraschallbad oder in einer Mikrowelle durchgeführt werden. Für die mikrowellenunterstützten Kupplungen wurden schon automatische Peptidsynthesizer konzipiert, die eine 14-fache kürzere Kupplungszeit und eine erhöhte Reinheit des Rohprodukts aufweisen. Des Weiteren wurde eine Zeitersparnis bei der Entschützung der Seitengruppen, als auch bei der Abspaltung vom Harz gefunden.^[165] Es existiert ein großes Sortiment an kommerziell erhältlichen Synthesizern mit diversen Nutzungsmöglichkeiten, verschiedener Software und variierenden Synthesekapazitäten.

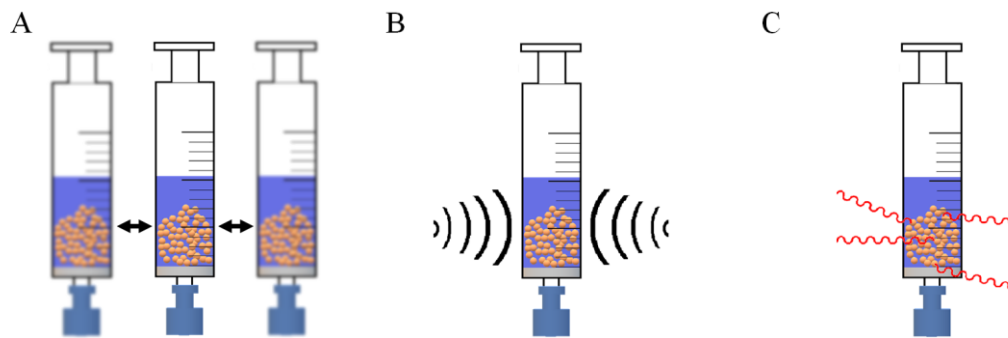


Abbildung 17: SPPS-Kupplungsmöglichkeiten: (A) Mechanisches Schütteln; (B) Ultraschall; (C) Mikrowellen.

Dass auch Ultraschall zur Unterstützung von SPPS funktioniert, wurde bereits im Jahr 1974 von Takahashi et al. postuliert^[166], wobei die Menge an Versuchen und Literatur neuer und begrenzter als bei der mikrowellengestützten SPPS ist. Generell konnte auch bei der Verwendung von Ultraschall eine 10-fach kürzere Kupplungszeit, eine schnellere Abspaltung vom Harz und ebenfalls schnellere Entschützung von Seitengruppen sowie erhöhte Reinheit der Rohprodukte gemessen werden. Dazu wurden ausschließlich handelsübliche Ultraschallbäder eingesetzt, welche fester Bestandteil der Standardausstattung chemischer Labore sind.^[167-169] Während für Kupplungsreaktionen und die Abspaltung von Schutzgruppen Ultraschallstudien vorliegen, wurde für die Verwendung von Ultraschall in Ligationsreaktionen und Kupplungen in Lösungen noch keine Untersuchung durchgeführt.

1.6 Multivalente und Heterobivalente Peptide

Die Visualisierung von Tumoren mittels monovalenten Peptiden ist auf die Überexprimierung eines einzelnen Rezeptors angewiesen. Die Adressierung dieses Rezeptors muss somit mit einer möglichst hohen Sensitivität als auch Spezifität geschehen. Um dies zu verbessern, wurden multivalente Peptide entwickelt, die mehrere Kopien desselben Rezeptor-spezifischen Peptides tragen. In diesem Rahmen werden die Peptide über eine Verzweigungseinheit und einen Linker mit einem Chelator verbunden. Durch mehrere Bindeeinheiten kann das Multimer gleichzeitig an mehreren Rezeptoren der selben Sorte binden und verursacht so eine stärkere Gesamtbindung und eine höhere Avidität (Affinität einer multivalenten Substanz, welche mit mehr als einem Strukturelement Zielrezeptoren binden kann) des Radiotracers an die Zelle. Des Weiteren wird eine Dissoziation des Radiotracers unwahrscheinlicher, da, selbst wenn sich eine

Peptideinheit von seinem Rezeptor löst, eine andere Verknüpfung bestehen bleibt. Durch die Bindung eines Liganden werden die anderen freien Liganden zusätzlich in die räumliche Nähe anderer Rezeptoren auf der Zelloberfläche gezwungen (forced proximity), was die Bindungswahrscheinlichkeit der ungebundenen Liganden erhöht. Dies gilt auch für den Aspekt des erneuten Bindens eines Liganden, nachdem dieser bereits dissoziiert ist (Rebinding), was durch die Nähe des dissoziierten Liganden zu der Zelloberfläche erhöht ist. Hierbei ist die Ausprägung des Effekts auch von der Länge des Linkers abhängig. Zusätzlich weisen peptidische Multimere eine höhere metabolische Stabilität gegen Peptidasenabbau als ihre Monomer-Analoga auf. Durch diese Aspekte kommt es zu einer längeren Retention an dem Tumor und somit zu höheren Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnissen.^[170-171] Abbildung 18 zeigt den typischen Aufbau eines homobivalenten Peptids, bestehend aus Chelator, Linker, Verzweigungseinheit, Interpeptidlinker und rezeptorspezifischem Peptid:

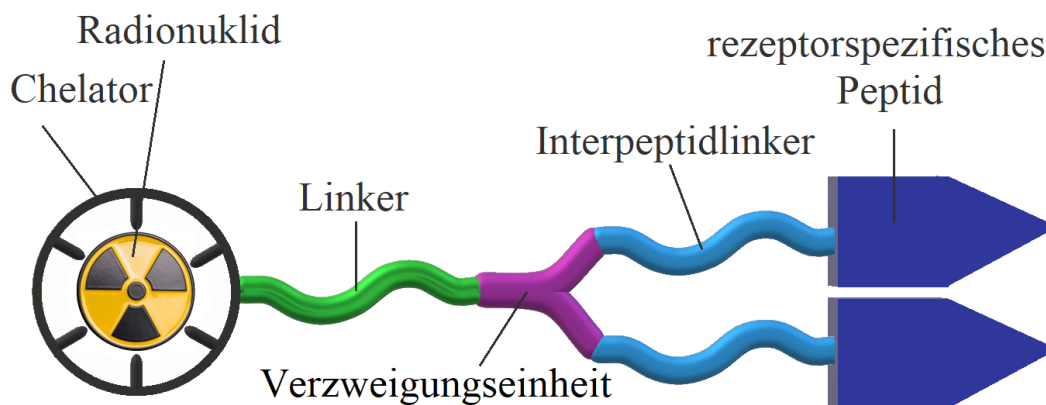


Abbildung 18: Typischer Aufbau eines homobivalenten Peptids.

Nicht alle Tumore derselben Art überexprimieren homogen einen Rezeptor; sogar eine homogene Expression innerhalb eines Individuum ist nicht immer gegeben. So werden immer nur prozentuale Wahrscheinlichkeiten angegeben, wie wahrscheinlich ein Rezeptor bei der jeweiligen Tumorart überexprimiert wird.^[5-6,172-173] Darüber hinaus kann sich der Rezeptorstatus im Verlauf der Krankheit ändern, sowohl durch normales Fortschreiten des Tumorwachstums, bei der Metastasierung^[174-175] als auch durch den Einfluss der Therapie^[257-258, 260].

Heterovalente Liganden können, trotz dieser entstehenden Diversifizierung des Rezeptorstatus, akkurat zwischen Tumoren und normalen Zellen differenzieren.^[176] So können auch Metastasen und der Primärtumor mit derselben Substanz behandelt werden, selbst wenn die Metastasen ein anderes Rezeptor-Überexprimierungsprofil als der Primärtumor aufweisen. Der Aufbau eines heterovalenten Peptids ähnelt dabei dem Aufbau eines homovalenten (Abbildung 19); durch die verschiedenen verknüpften Liganden können aber zusätzlich unterschiedliche Zielstrukturen auf der Zelloberfläche angesprochen werden.

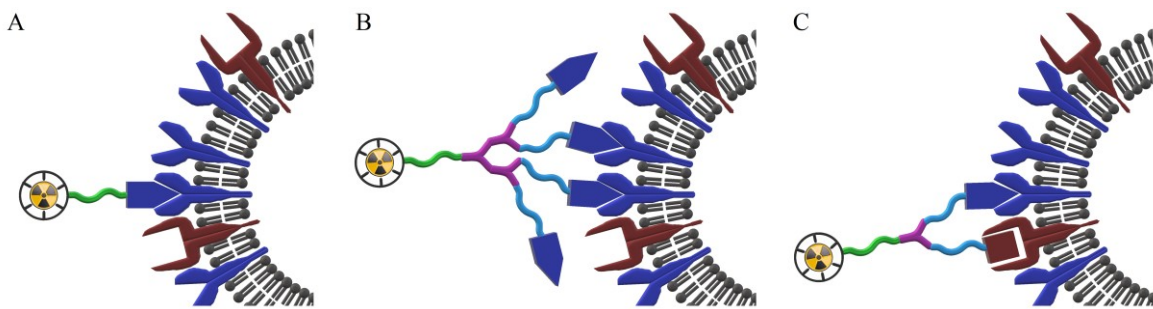


Abbildung 19: Bindung an die Rezeptoren auf der Oberfläche einer Zelle (A) Monomer; (B) Homotetramer; (C) Heterodimer.

Es kommen die selben positiven Eigenschaften, welche multivalente Peptide gegenüber den monovalenten Peptiden aufweisen, und zwar höhere metabolische Stabilität, stärkere Bindung, forced proximity, weniger vollständige Dissoziation und mehr Rebinding zur Geltung.^[177-178] Sollte einer der Zielrezeptoren nicht überexprimiert werden, binden heterovalente Peptide trotzdem mit einer erhöhten Avidität verglichen mit den monomeren Analoga. Im Vergleich zur parallelen oder sequenziellen Applikation zweier unterschiedlicher Rezeptor-spezifischer Radiotracer führt die Anwendung eines heterobivalenten bispezifischen Tracers weiterhin zu einer verringerten Dosisbelastung.

Da Heterobivalenz zusätzlich eine hohe Sensitivität als auch Spezifität verspricht, befindet sich eine Vielzahl an heterobivalenten Peptiden in der Entwicklung für die Anwendung in der PET, einige bereits in klinischen Studien, welche die analogen monomeren Radiotracer teils deutlich übertreffen.^[173,176,179] Eine Übersicht der heterobivalenten Peptide in der Entwicklung für die PET-Bildgebung ist in Tabelle 5 gegeben:

Einleitung

Tabelle 5: Heterobivalente Peptide in der Entwicklung für die PET-Bildgebung.

Rezeptoren	Radionuklid	Ligand	<i>in vitro</i> -Affinität	<i>in vivo</i> -Beurteilung	Lit.	
GRPR & PSMA	⁶⁴ Cu	BBN ₇₋₁₄ DUPA (Glu-urea-Glu)	IC ₅₀ (GRPR): 11.1±0.5 nM, IC ₅₀ (PSMA): 1.2±1.4 nM	PC3/AR42J und LNCaP Mäuse	[180]	
	⁶⁸ Ga	BZH3 Glu-urea-Lys	IC ₅₀ (GRPR): 9.0±1.8 nM, IC ₅₀ (PSMA): 25.0±5.4 nM	PC3/AR42J und LNCaP Mäuse	[181]	
	⁶⁸ Ga	BZH3 Glu-urea-Lys	IC ₅₀ (GRPR): 7.3 nM, IC ₅₀ (PSMA): 17.4 nM	PC3 und LNCaP Mäuse	[182]	
	⁶⁸ Ga	BZH3 Glu-urea-Lys	IC ₅₀ (GRPR): 4.4 nM, IC ₅₀ (PSMA): 25.2 nM			
	⁶⁸ Ga	BZH3 Glu-urea-Lys	IC ₅₀ (GRPR): 7.1 nM, IC ₅₀ (PSMA): 42.4 nM			
	⁶⁸ Ga und ¹⁷⁷ Lu	Lys ³ -bombesin Glu-urea-Lys-Nal	[⁶⁸ Ga]: K _d (GRPR): 43.7±3.8 nM, K _d (PSMA): 4.4±2.3 nM [¹⁷⁷ Lu]: IC ₅₀ (GRPR): 3.5±0.4 nM, IC ₅₀ (PSMA): 5.6±1.5 nM	PC3 und LNCaP Mäuse	[183]	
	⁶⁸ Ga	RM26 DUPA	IC ₅₀ (GRPR): 4±1 nM, IC ₅₀ (PSMA): 824±230 nM	PC3-PIP Mäuse	[184]	
GRPR & α _v β ₃	¹⁸ F	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 32.0±1.9 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 282±34 nM	PC3 Mäuse	[185]	
	¹⁸ F	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 73.3±1.6 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 13.8±1.8 nM	PC3 Mäuse	[186]	
	¹⁸ F	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 167±1 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 553±1 nM	PC3 Mäuse	[187]	
	⁶⁸ Ga und ⁶⁴ Cu	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 92.8±3.5 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 16.2±2.8 nM	T47D und MDA-MB- 435 Mäuse	[188]	
	⁶⁸ Ga	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 55.9±4.2 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 22.6±6.7 nM	PC3 Mäuse	[189]	
	⁶⁸ Ga	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	-	Pc Patienten	[177]	
	⁶⁴ Cu	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 4.0±0.4 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): keine Affinität	PC3 Mäuse	[190]	
	⁶⁴ Cu	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 85.8±2.1 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 21.6±2.2 nM	PC3 Mäuse	[191]	
	¹⁷⁷ Lu	BBN ₇₋₁₄ c(RGDyK)	-	PC3 Mäuse	[192]	
	⁶⁴ Cu	RM2 c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 3.1±0.3 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 518±38 nM	PC3 Mäuse	[193]	
	⁸⁶ Y	RM2 c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 5.7±0 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 346±5 nM	PC3 Mäuse	[194]	
	⁶⁴ Cu	BBN ₇₋₁₄ 2x c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 24.3±10.9 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 165.3±105.4 nM	PC3 Mäuse	[195]	
	⁶⁴ Cu	BBN ₇₋₁₄ 2x c(RGDyK)	IC ₅₀ (GRPR): 100.4±73.2 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 101.2±57.4 nM	PC3 Mäuse	[196]	
	GRPR & VPAC ₁ R	⁶⁸ Ga	BBN ₇₋₁₄ PACAP-27	Zellaufnahmestudien, keine Affinität	-	[197]
		⁶⁸ Ga	PESIN PACAP-27	-	SRG OncoRatten	[198]
GRPR & NPY(Y ₁)R	⁶⁸ Ga	BBN ₇₋₁₄ [Lys ⁴ , Trp ⁵ , Nle ⁷]BVD ₁₅	-	T47D Mäuse	[199]	
α _v β ₃ & NRP-1	¹⁸ F	c(RGDyK) ATWLPPR-1	IC ₅₀ (NRP-1): 60.1±6.5 nM, IC ₅₀ (α _v β ₃): 43.8±4.8	U87MG Mäuse	[200]	

Einleitung

	^{18}F	c(RGDyK) ATWLPPR-1	IC _{50(NRP-1)} : 23.7 nM, IC _{50($\alpha_v\beta_3$)} : 21.7 nM	U87MG Mäuse	[201]
	^{18}F	C(RGDyK) ATWLPPR-2	IC _{50(U87MG)} : 44.2 nM	U87MG Mäuse	[202]
$\alpha_v\beta_3$ & VEGFR	^{89}Zr	iRGD A7R	Zellaufnahmestudien, keine Affinität	U87MG und MCF-7 Mäuse	[203]
$\alpha_v\beta_3$ & CXCR4		c(RGDyK) c(DTyr-N-Me-DLys- Arg-2-Nal-Gly)	Zellaufnahmestudien, keine Affinität	BxPC3 und MX-1 Mäuse	[204]

Die Entwicklung eines multivalenten Peptidliganden erfolgt immer nach dem Schema^[162,205-208].

- 1) Identifizierung der Zielrezeptoren und Quantifizierung ihrer Expressionsmenge auf Tumorzellen.
- 2) Ermittlung von Peptidliganden mittels Phagen-Display, CADD oder Teilsequenzen des endogenen Liganden, die den Zielrezeptor spezifisch binden.
- 3) Chemische Synthese der Peptid-Bausteine und Konjugation über einen Linker miteinander und an einen Chelator.
- 4) Bestimmung der *in vitro*-Eigenschaften der Peptide zu dem jeweiligen Zielrezeptor (Radio-Markierungsbedingungen, molare Aktivität, Lipophilie, Stabilität in humanem Serum gegen Peptidasen, Internalisierungsrate und Bindungsaffinitäten).
- 5) Bestimmung der *in vivo*-Eigenschaften (Pharmakokinetik, Ausscheidung, Tumoraufnahme und Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse) in Tiermodellen.

2 Zielsetzung

Der EGFR ist eine geeignete Zielstruktur für Radiopharmaka zur Bildgebung und Therapie, weil dieser auf der Zelloberfläche einer Vielzahl maligner Tumore überexprimiert wird.^[8] Hierbei wird der EGFR nicht nur auf den Primärtumoren, sondern meist auch auf den Metastasen überexprimiert, was für eine umfängliche Diagnostik und Behandlung von Krebs unabdingbar ist.^[18-20] Für die Therapie EGFR-positiver Tumoren wurden bisher ausschließlich Substanzen aus der Klasse der monoklonalen Antikörper und small molecules für die Behandlung von Bauchspeicheldrüsen-, Brust-, Darm- und Lungenkrebs zugelassen. Die Adressierung des EGFRs erfolgt dabei entweder intrazellulär über die Tyrosin-Kinase-Domäne des EGFR oder extrazellulär über die Domäne III.^[43-49]

Da Peptide eine vorteilhafte Pharmakokinetik sowie eine geringe Immunogenität, geringe Toxizität, schnelle Ausscheidung, gute Tumoraufnahme durch hohe Selektivität etc. aufweisen, leicht zu synthetisieren und zu funktionalisieren sind^[50-51,140], wurde in den letzten Jahren eine Reihe neuer EGFR-adressierender Peptide mit dem Ziel einer Anwendung in der Diagnostik und oder Therapie EGFR-positiver Tumoren entwickelt. Allerdings konnten mehreren Peptiden *in vivo* nur eine unzureichende Affinität gegenüber dem EGFR nachgewiesen werden. Diese interagieren meist mit der Hauptbindestellen der Domäne III, wobei auch Peptide für die Domänen I und II untersucht wurden.^[52-86] Gleichzeitig existieren keine Vergleichsstudien der entwickelten Peptid-Liganden untereinander, sodass keine klare Beurteilung, welches der Peptide sich am ehesten für den Einsatz in der humanen PET eignet, getroffen werden kann.

2.1 Multivalente Peptide

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob durch Multivalenz eine Verbesserung der Bindungsaffinität des vielpublizierten, EGFR-spezifischen peptidischen Liganden GE11 an Tumorzellen erreicht werden kann und ob die Multimere als Radiotracer für die PET/CT potentiell geeignet sind. Es sollte beurteilt werden, ob die Eigenschaften auftreten, welche multivalente Peptide typischerweise gegenüber den monovalenten Peptiden aufweisen – eine höhere metabolische Stabilität, stärkere Bindung, forced proximity, weniger vollständige Dissoziation und vermehrtes Rebinding.^[177-178]

Als multivalente Zielstrukturen wurden ein Homodi-, als auch ein Homotetramer gewählt, die mit dem monovalenten Liganden verglichen werden sollten. Zusätzlich sollte ein Heterodimer mit c(RGDfK), welches den Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor mit hoher Affinität adressiert^[209-211], als zweite bindende Einheit synthetisiert und mit den jeweiligen monomeren Analoga verglichen werden. Der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor wird auf Zellen des Haut-, Gehirn-, Brust-, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs überexprimiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Neoangiogenese, dem Tumorwachstum, als auch bei der Krankheitsprogression und Metastasen.^[212-214] Dieses Heterodimer sollte daher ein breites Spektrum an verschiedenen Tumorzellen binden, wobei Tumore, welche beide Rezeptoren überexprimieren sehr gut visualisiert werden sollten. Die Strukturformeln der multivalenten Zielstrukturen sind in Abbildung 20 dargestellt:

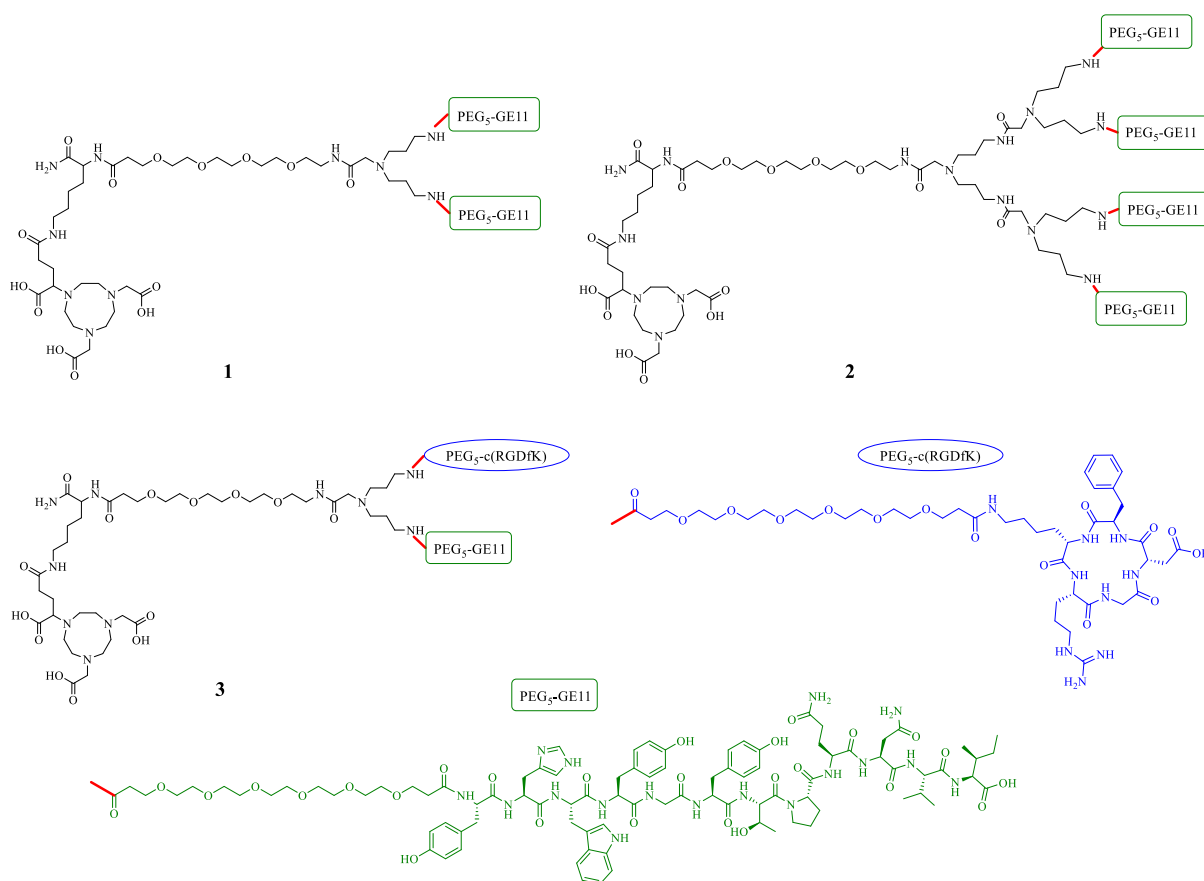


Abbildung 20: Multivalente Zielstrukturen dieser Arbeit: Homodi- **1**, Homotetra- **2**, Heterodimer **3** mit GE11- (Grün) und c(RGDfK)-Einheit (Blau).

Die postulierten Multimere Homodimer **1**, Homotetramer **2** und Heterodimer **3** sollten eine höhere Bindungsstärke als die einzelnen Monomere gegenüber EGFR-überexprimierenden

Zellen zeigen, da durch die gewählten PEG₅-Linker eine ungehinderte simultane Bindung der einzelnen Liganden möglich sein sollte. Außerdem können die PEG-Linker einen positiven Einfluss auf die Pharmakokinetik haben. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Retentionszeit des Radiopharmakons im Blut erhöht und die Immunogenität verringert werden kann. Die Veränderungen können je nach Substanz unterschiedlich ausfallen und müssen deswegen experimentell bestimmt werden.^[215-218] Für den Einsatz als Radioliganden in der PET und zur Bestimmung der *in vitro*-Eigenschaften – Lipophilie und Stabilität in humanem Serum – sollten die Substanzen mit [⁶⁸Ga]Ga³⁺ radiomarkiert werden, weshalb NODA-GA als Chelator eingesetzt werden sollte.^[127]

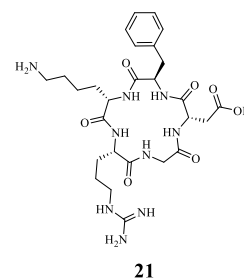
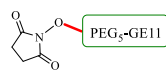
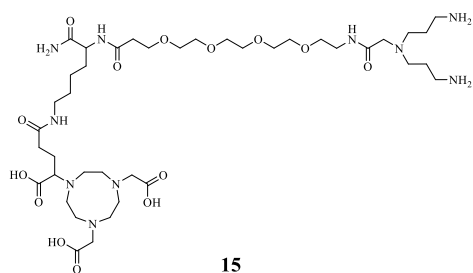
Mit kompetitiven Verdrängungsstudien sollten weiterhin die Bindungsaffinitäten an A431-Zellen und für das Heterodimer zusätzlich an U87MG-Zellen bestimmt werden. A431 ist eine humane Plattenepithelkarzinomzelllinie, die den EGFR-Rezeptor überexprimiert und daher häufig als Modellzelllinie zur Beurteilung von EGFR-Inhibitoren, wie Cetuximab etc., Anwendung findet.^[219-220] U87MG ist eine humane Glioblastomzelllinie, welche den $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor überexprimiert, und eine der am meisten eingesetzten Zelllinien in der Krebsforschung.^[221-222]

2.1.1 Chemische Synthese des heterobivalenten Peptidliganden

Ein Teilziel bei der Synthese des Heterodimers **3** war die Untersuchung, ob die positiven Auswirkungen von Ultraschall sich nur auf Kupplungen von Aminosäuren am Harz beschränken. Hierzu sollte das Heterodimer sowohl vollständig im Ultraschallbad als auch mit mechanischem Schütteln synthetisiert und die Eignung besonders nach den Kriterien der Ausbeute, benötigten Eduktmenge und Reaktionsdauer beurteilt werden. Die postulierten Vorteile von der Nutzung von Ultraschall zur Kupplung von Aminosäuren am Harz sollten auf diesem Weg genauso überprüft, wie die bisher nicht-untersuchten möglichen Vorteile bei einer Kupplung in Lösung betrachtet werden. Für die Synthese von **3** sollten dabei zunächst verschiedene Molekülbausteine synthetisiert und anschließend zu **3** verknüpft werden (Abbildung 21): Das NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15**, der NHS-PEG₅-GE11-ester **17** und das c(RGDfK) **21** sollten nach Fmoc-Standardprotokoll am Harz synthetisiert werden, während die Verknüpfung zum NHS-PEG₅-c(RGDfK) **23**, zum Intermediat **25** und zum Heterodimer **3** in Lösung durchgeführt werden sollte.

Zielsetzung

Am Harz:



In Lösung:

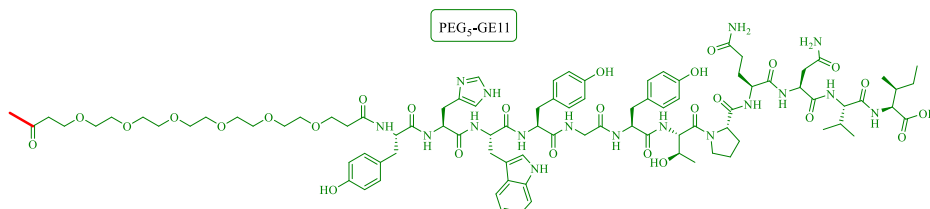
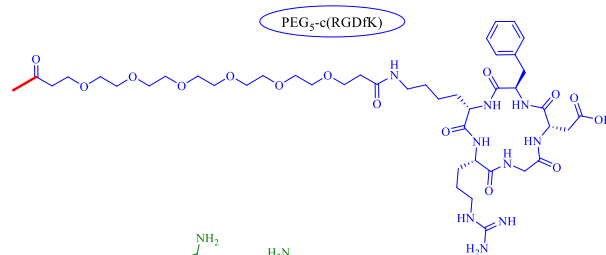
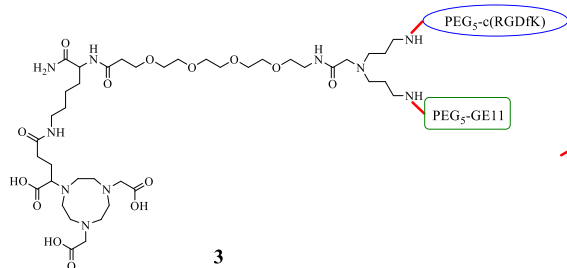
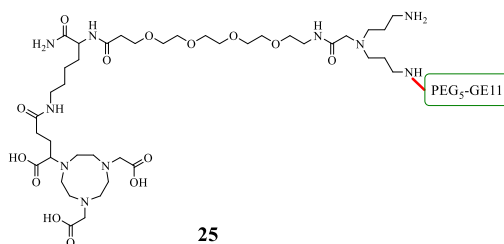
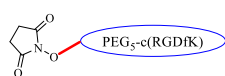


Abbildung 21: Strukturen der für die Synthese von **3** notwendigen Molekülbausteine **15**, **17**, **21**, **23**, **25** und das Heterodimer **3** mit GE11- (Grün) und c(RGDfK)-Einheit (Blau).

2.2 Liganden für die Bildgebung von EGFR-überexprimierenden Läsionen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Dissertation war und ist die vergleichende Untersuchung von literaturbekannten EGFR-spezifischen Peptid-Liganden auf ihre Eignung als Radiotracer für die PET/CT. In diesem Rahmen sollten die acht literaturbekannten Liganden CPP, D4, EGBP, GE11, P1, P2, QRH und Pep11 synthetisiert, für die Verwendung in der PET entsprechend

funktionalisiert und *in vitro* untersucht werden. Alle Peptide sollten, analog zu 2.1, mit einem PEG₅-Linker und dem Chelator NODA-GA funktionalisiert werden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu garantieren. Weiterhin wurde anhand der in der Literatur beschriebenen Modifikationen entschieden, ob C- oder N-terminal funktionalisiert werden sollte, um mögliche negative Effekte auf die Bindungseigenschaften zu minimieren. Dementsprechend sollten die Liganden GE11, D4, P1 und P2 N-terminal funktionalisiert werden (Abbildung 22).

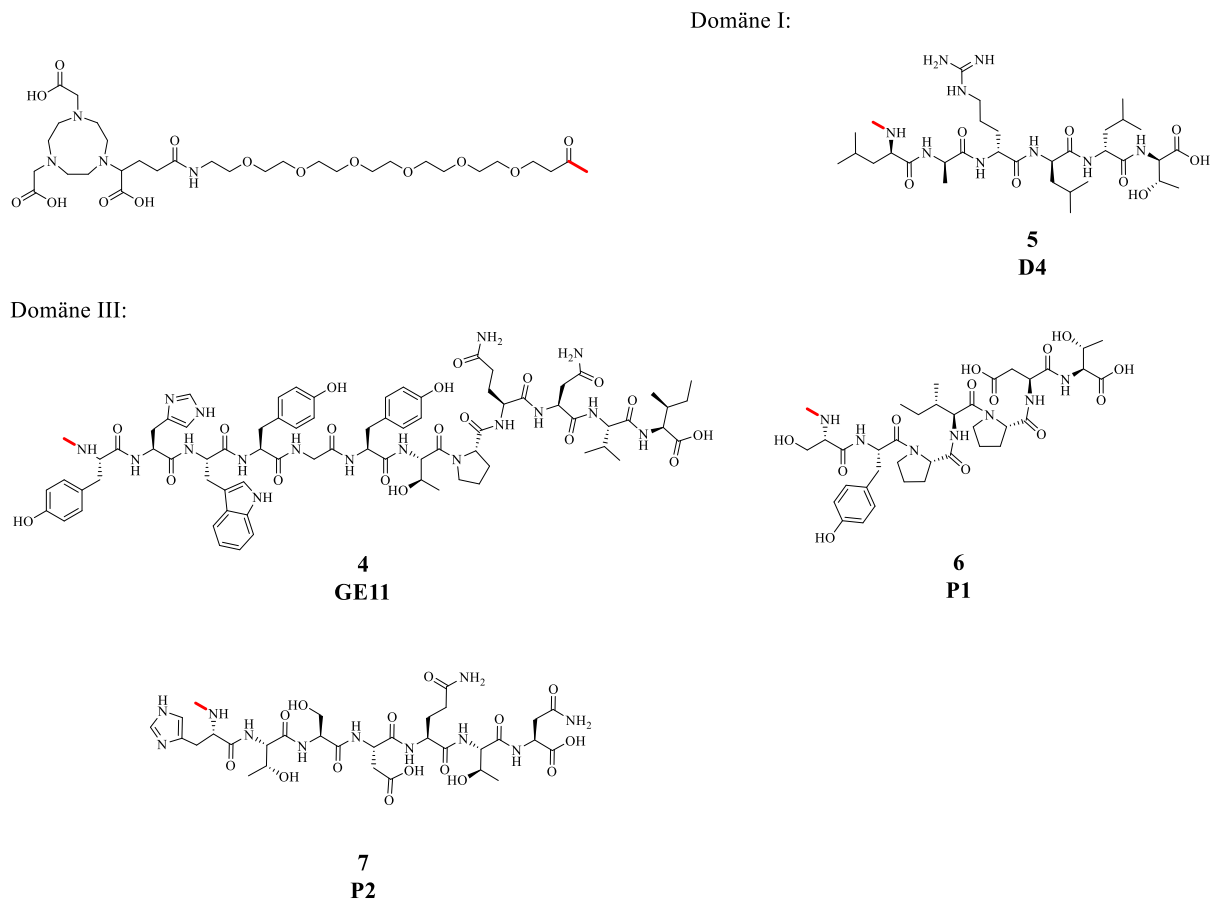


Abbildung 22: Darstellung der zu vergleichenden N-terminal funktionalisierten Peptide mit Angabe ihrer jeweiligen Zielbindungsdomäne des EGFR.

Ferner wurden im Zuge der Doktorarbeit die drei neuartigen Liganden EGF₅₋₂₁, EGF₁₃₋₃₂ und EGF₃₂₋₄₃ konzipiert. Diese Liganden sind jeweils eine Teilsequenz des endogenen Liganden des EGFRs (hEGF), wobei EGF₅₋₂₁ (Aminosäuren 5-21) den A-Cyclus, EGF₁₃₋₃₂ (Aminosäuren 13-32) den B-Cyclus und EGF₃₂₋₄₃ (Aminosäuren 32-43) den C-Cyclus beinhalten. Auch diese Liganden sollten hergestellt, C-terminal funktionalisiert, radiomarkiert und in *in vitro*-Bindungsstudien untersucht werden (Abbildung 23). Die literaturbekannten Liganden QRH, CPP, EGBP und Pep11 sollten ebenfalls C-terminal funktionalisiert werden (Abbildung 23).

Zielsetzung

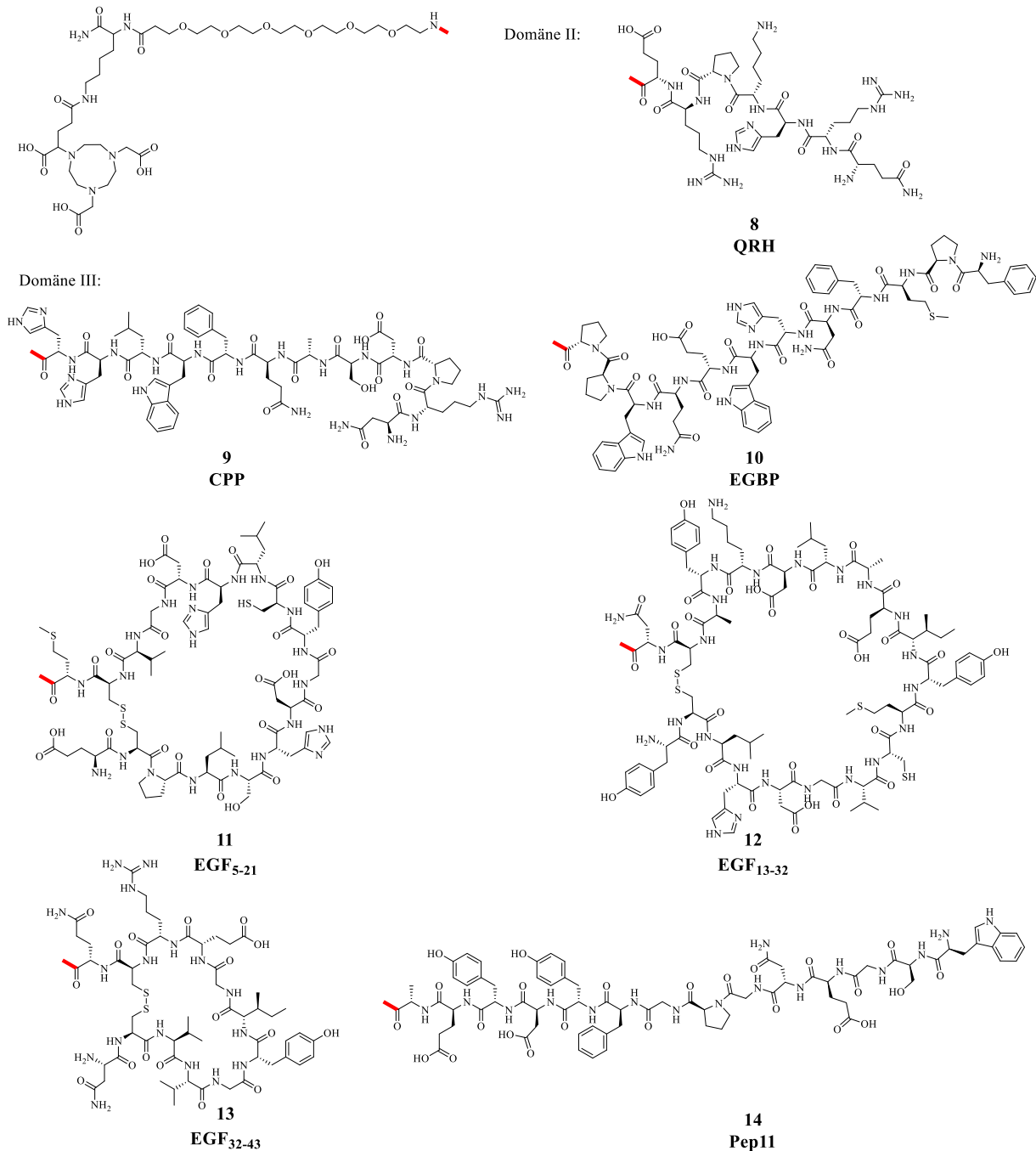


Abbildung 23: Darstellung der zu vergleichenden C-terminal funktionalisierten Peptide mit Angabe ihrer jeweiligen Zielbindungsdomäne des EGFR.

Anschließend sollten die Liganden **4 – 14** mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ radiomarkiert und deren *in vitro*-Eigenschaften (Lipophilie und Stabilität in humanem Serum etc.) ermittelt werden. Mit Internalisierungs- und kompetitiven Verdrängungsstudien sollten die Internalisierungsraten und die Bindungsaffinitäten an A431-Zellen bestimmt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

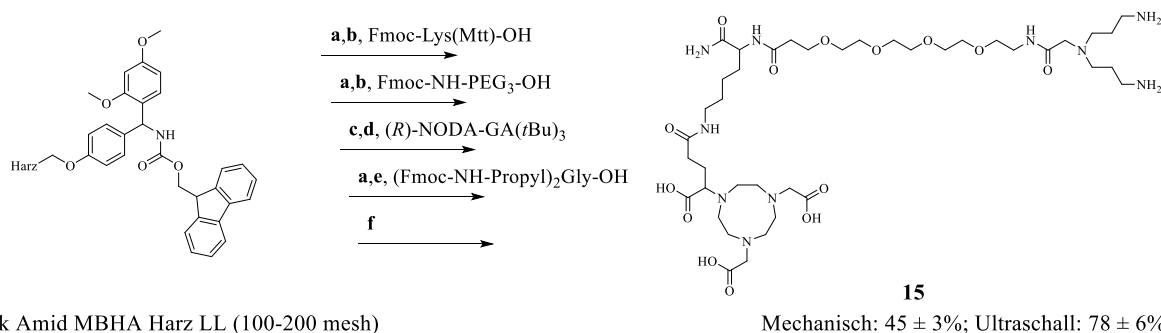
In Kapitel 3 werden die durchgeführten Synthesen der Substanzen und deren Charakterisierung beschrieben. Die Synthese beinhaltet sowohl chemische Darstellung wie auch die Radiomarkierung, die Charakterisierung umfasst die Bestimmung der Lipophilie und der Stabilität in humanem Serum sowie die Ermittlung von Internalisierungsraten und Bindungsaffinitäten.

3.1 Synthese der multivalenten Peptide

Die Synthese der Bausteine der multivalenten Peptide wurde an fester Phase nach Fmoc-Standardprotokoll^[164] durchgeführt, während die Verknüpfung der Bausteine in Lösung erfolgte. Die Synthese des Heterodimers **3** und seiner Bausteine wurde sowohl im Ultraschallbad als auch mit mechanischem Schütteln durchgeführt.

Hierzu wurde zuerst die verknüpfende Einheit der Dimere, das NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15**, an einem Rink Amid MBHA Harz LL synthetisiert (Schema 1). Die Kupplungen der Aminosäure (AS) und des Polyethylenglycol-Linkers (PEG-Linker) erfolgten dabei in DMF entweder im Ultraschallbad für 15 min pro Kupplung oder für 1 h auf einem mechanischen Schüttler mit 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) als Kupplungsreagenz und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) als Base. Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppen wurde Piperidin in DMF (1:1, *v/v*) eingesetzt. Die 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe (Mmt) am ϵ -Amin des Lysins wurde mit 1% TFA in Dichlormethan DCM (*v/v*) innerhalb von 45 min entfernt und der Chelator 4-(4,7-*Bis*(2-(*t*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazacyclononan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxo-pentansäure ((*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃) mit dem Kupplungsreagenz Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) und DIPEA als Base mit verlängerter Reaktionszeit von 2.5 h / 30 min (mechanisch / Ultraschall) an das ϵ -Amin gekuppelt. Anschließend wurde (Fmoc-*NH*-propyl)₂Gly-OH \times KHSO₄ auch mit verlängerter Reaktionszeit von 2.5 h / 30 min (mechanisch / Ultraschall) an das Amin des PEG₃-Linkers gekuppelt.

Die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen und die Abspaltung vom Harz wurde mit TFA, TIS als Radikalfänger^[161] und Wasser (H₂O) (95/2.5/2.5, v/v/v) für 3 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Abschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt in 1:1 MeCN/H₂O + 0.1% TFA (v/v) gelöst, mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, **high-performance liquid chromatography**) aufgereinigt und schließlich lyophilisiert.



Rink Amid MBHA Harz LL (100-200 mesh)

Schema 1: Synthese von **15**. Reaktionsbedingungen: **(a)** Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; **(b)** Aktivierung der Aminosäure und Kupplung. Mechanisch: 4.0 Äq. Aminosäure, 4.0 Äq. DIPEA, 3.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 60 min Kupplung; Ultraschall: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 15 min Kupplung; **(c)** Entfernung der Mtt-SG: 1% TFA in DCM (v/v), 3×15 min; **(d)** Aktivierung und Kupplung von (R)-NODA-GA(*t*Bu)₃. Mechanisch: 2.0 Äq. NODA-GA(*t*Bu)₃, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. PyBOP in DMF, 2 min Aktivierung, 2.5 h Kupplung; Ultraschall: 2.0 Äq. NODA-GA(*t*Bu)₃, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. PyBOP in DMF, 2 min Aktivierung, 30 min Kupplung; **(e)** Aktivierung der Aminosäure und Kupplung. Mechanisch: 4.0 Äq. Aminosäure, 4.0 Äq. DIPEA, 3.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 2.5 h Kupplung; Ultraschall: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 30 min Kupplung; **(f)** Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h.

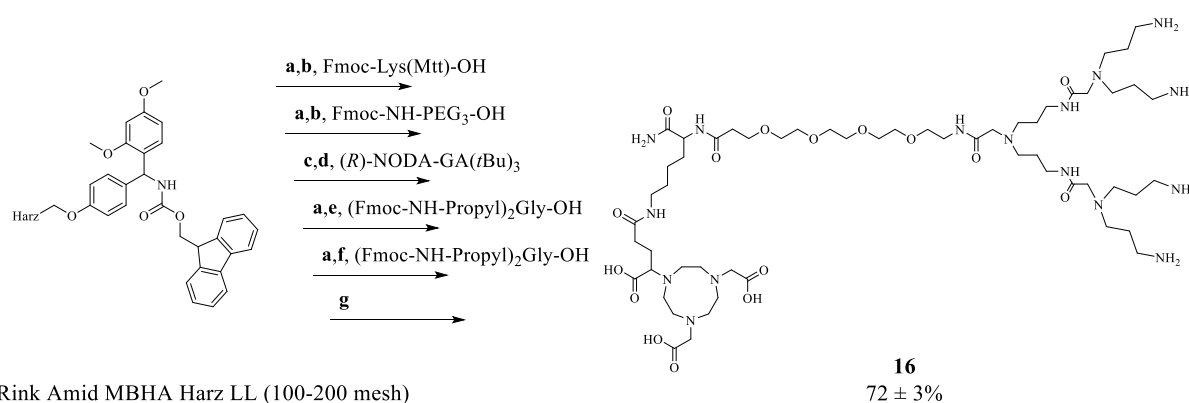
Der Syntheseverlauf und die Reaktionsbedingungen in dem Schema 1 wurden erarbeitet, indem, ausgehend von der Literatur^[198] (Ausbeute Lit.: 33%), die Reaktion auf ihre Ausbeute optimiert wurde. Zur Beurteilung wurden das Harz, dessen Beladung, der Überschuss an Reagenzien und der Reaktionsweg variiert. Unter Nutzung verschiedener Harze konnten bei der klassischen Peptidsynthese auf einem mechanischen Schüttler moderate Ausbeuten von 25 ± 9% – 45 ± 3% erzielt werden; die ultraschallgestützten Synthesen konnten unterdessen mit Ausbeuten von bis zu 78 ± 6% durchgeführt werden. Hierbei konnte der Reagenzienüberschuss von Aminosäure wie Kupplungsreagenz bei der ultraschallgestützten Methode von 4.0 bzw. 3.9 Äquivalenten auf 2.0 bzw. 1.9 Äquivalente reduziert werden, wobei eine weitere Verringerung der Äquivalente mit einer stark verminderten Ausbeute einherging. Zusätzlich konnte die Reaktionszeit der einzelnen Kupplungen mindestens um den Faktor vier verkürzt werden. Bei Versuchen unter Verwendung des gleichen Harzes, jedoch einer höheren Harzbeladung wurden

niedrigere Ausbeuten erhalten. Somit erfolgte die ertragreichste Reaktion an einem Rink-Amid MBHA Harz mit niedriger Beladungsdichte (LL, low loading) und mit einem Reagenzüberschuss von zwei Äquivalenten pro Kupplungsschritt im Ultraschallbad. In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Optimierungsaspekte zusammengefasst:

Tabelle 6: Vergleich der Reaktionsbedingungen für **15** bei mechanischen und ultraschallgestützten Kupplungen. Die Synthesen wurden mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die Angabe der Ausbeute erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

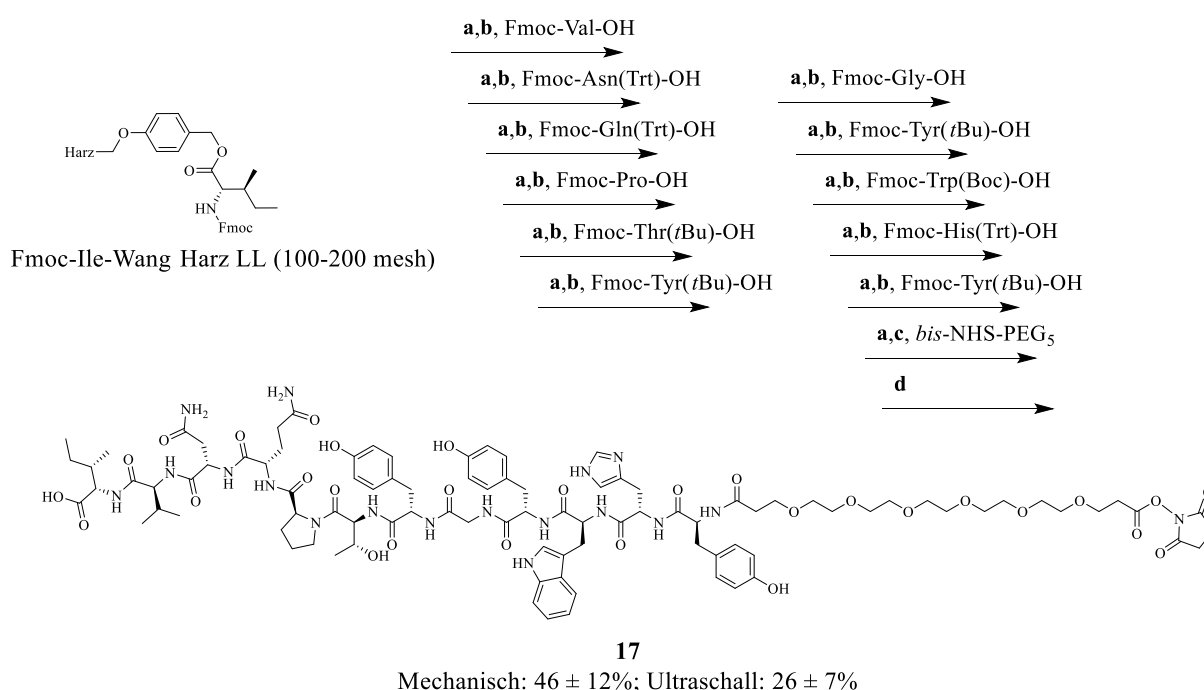
Harz	Beladung [mmol/g]	Reaktionsweg	Reagenzüberschuss pro Kupplungsschritt [Äq.]	Ausbeute [%]
NovaPEG Rink-Amid Harz LL	0.20	Mechanisch	4	25 \pm 9
		Ultraschall	2	33 \pm 6
Rink-Amid AM Harz LL	0.33	Mechanisch	4	25 \pm 5
		Ultraschall	2	65 \pm 4
Rink-Amid MBHA Harz LL	0.36	Mechanisch	4	45 \pm 3
		Ultraschall	2	78 \pm 6
		Ultraschall	1.5	40 \pm 5
Rink-Amid MBHA Harz	0.65	Ultraschall	1	28 \pm 6
		Ultraschall	2	15 \pm 2

Die verknüpfende Einheit des Homotetramers, das NODA-GA-*tetra*-amino-dendron **16**, wurde analog zu **15** hergestellt, wobei (Fmoc-NH-propyl)₂Gly-OH \times KHSO₄ zweimal, statt nur einmal gekuppelt wurde (Schema 2). Die optimierten Reaktionsbedingungen (Rink-Amid MBHA Harz LL, Reagenzüberschuss von 2 Äquivalenten pro Kupplungsschritt, Ultraschallbad) der Synthese von **15** wurden übernommen, wodurch für **16** Ausbeuten von 72 \pm 3% erreicht werden konnte.



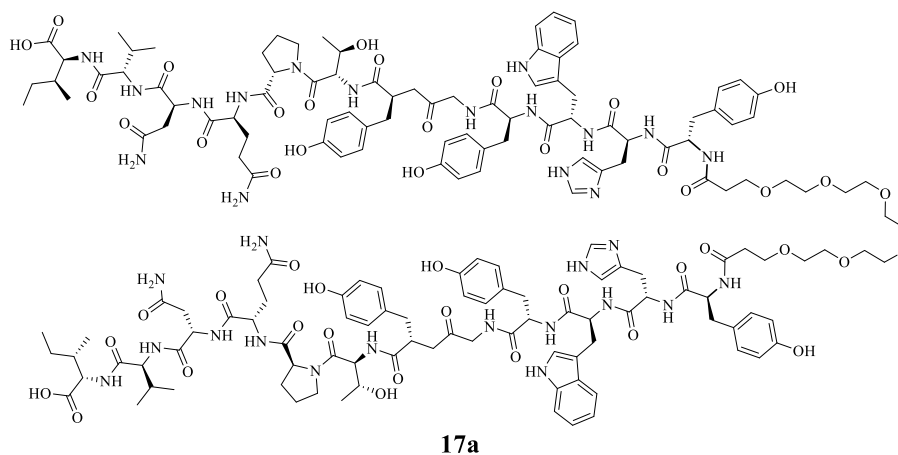
Schema 2: Ultraschallgestützte Synthese von **16**. Reaktionsbedingungen: (a) Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; (b) Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 15 min Kupplung; (c) Entfernung der Mtt-SG: 1% TFA in DCM (v/v), 3 \times 15 min; (d) Aktivierung und Kupplung von (R)-NODA-GA(*t*Bu)₃: 2.0 Äq., 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. PyBOP in DMF, 2 min Aktivierung, 30 min Kupplung; (e) Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: 4.0 Äq. Aminosäure, 4.0 Äq. DIPEA, 3.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 30 min Kupplung; (f) Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: 6.0 Äq. Aminosäure, 6.0 Äq. DIPEA, 5.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 30 min Kupplung; (g) Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h.

Die EGFR-bindende GE11-Einheit des Homodi-, Homotetra- und Heterodimers wurde als NHS-PEG₅-GE11-ester **17** nach Fmoc-Standardprotokoll auf dem mechanischen Schüttler und ebenso im Ultraschallbad an einem Fmoc-Ile-Wang LL Harz mit Standard *N*_α-Fmoc Aminosäuren, *bis*-NHS-PEG₅ und HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert (Schema 3). Die Kupplung des *bis*-NHS-PEG₅ wurde ohne HBTU, aber mit DIPEA für eine Stunde mechanisch geschüttelt oder 15 Minuten ultraschallgestützt umgesetzt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff mit 46 ± 12% (mechanisch) bzw. 26 ± 7% (Ultraschall) Ausbeute erhalten.



Schema 3: Synthese von **17**. Reaktionsbedingungen: **(a)** Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; **(b)** Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: Mechanisch: 4.0 Äq. Aminosäure, 4.0 Äq. DIPEA, 3.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 60 min Kupplung auf einem Schüttler; Ultraschallgestützt: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 15 min Kupplung im Ultraschallbad; **(c)** Kupplung des PEG-Linkers. Mechanisch: 8.0 Äq. *bis*-NHS-PEG₅, 4.0 Äq. DIPEA in 1.8 mL DMF, 60 min auf einem Schüttler; Ultraschallgestützt: 5.0 Äq. *bis*-NHS-PEG₅, 4.0 Äq. DIPEA in 1.8 mL DMF, 15 min im Ultraschallbad; **(d)** Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h.

Hierbei wurden Rink Amid Harze mit niedriger Belegungsichte genutzt, um möglichst intermolekulare Kupplungen zu vermeiden. Trotzdem kam es bei der Synthese mit Ultraschall zu einer erhöhten Menge an Querverknüpfung am Harz. Bei der Synthese von **17** mit mechanischem Schütteln wurde das Dimer **17a** (Abbildung 24) zu 15 ± 5% erhalten, während bei der ultraschallgestützten Synthese bis zu 42 ± 7% Dimer **17a** erhalten wurde.



Mechanisch: $15 \pm 5\%$; Ultraschall: $42 \pm 7\%$

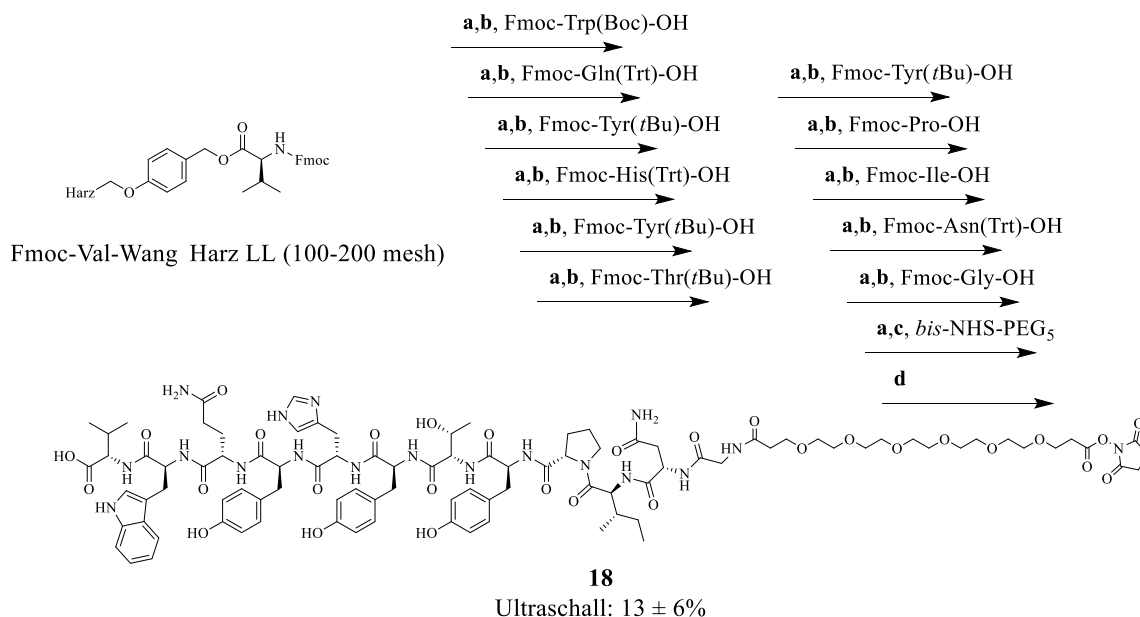
Abbildung 24: Dimer **17a**, das bei der Reaktion des GE11 mit *bis*-NHS-PEG₅ an fester Phase als Nebenprodukt erhalten wurde.

Durch den höheren Einsatz an *bis*-NHS-PEG₅ konnte die Menge an Dimerbildung bei mechanischen Kupplungen reduziert werden, während ein höherer Reagenzüberschuss pro Kupplung bei ultraschallgestützten Kupplungen zwar eine Erhöhung der Ausbeute verursachte, das Dimer jedoch im selben Verhältnis zum Produkt gebildet wurde (Tabelle 7):

Tabelle 7: Vergleich des Reagenzüberschusses für die Synthese von **17** bei mechanischen und ultraschallgestützten Kupplungen. Die Synthesen wurden mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die Angabe der Ausbeute erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

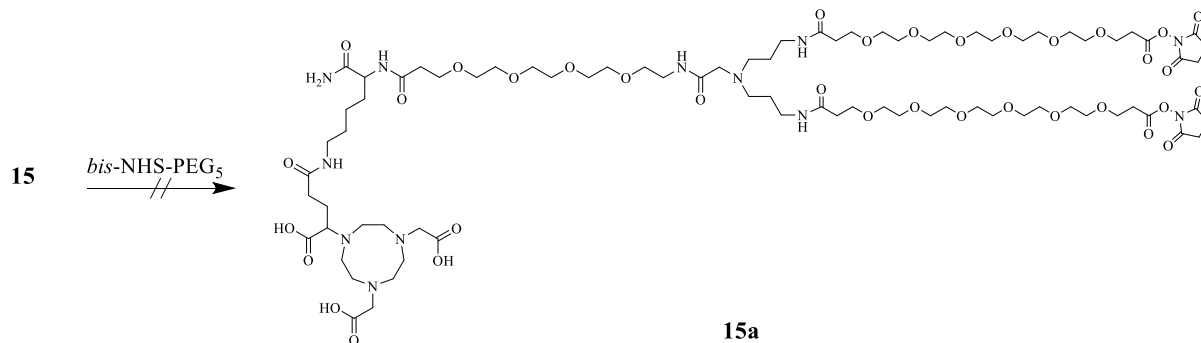
Produkt	Reaktionsweg	Reagenzüberschuss pro Kupplungsschritt [Äq.]	Ausbeute [%]	Ausbeute Dimer [%]
17	Mechanisch	4	22 ± 7	22 ± 5
	Mechanisch	8	46 ± 12	15 ± 5
	Ultraschall	2	14 ± 3	27 ± 4
	Ultraschall	5	26 ± 7	42 ± 7

Die Synthese des NHS-PEG₅-scr[GE11]-ester **18**, ein Analoga von **17** mit einer veränderten Aminosäuresequenz bei gleichbleibenden Aminosäuren (scr, scramble), erfolgte unter den gleichen Bedingungen im Ultraschallbad, wobei für **18** Ausbeuten von $13 \pm 6\%$ erreicht wurden (Schema 4). Gescrambelte Peptide sind insbesondere für *in vivo*-Evaluierungen wertvolle Vergleichssubstanzen, da sie die gleiche Pharmakokinetik wie die spezifisch bindenden Analoga aufweisen, aber selbst keine Target-Spezifität aufweisen. Sie eignen sich daher, um die unspezifische Anreicherung zu ermitteln und die Spezifität des eigentlichen Liganden nachzuweisen und wurden deswegen als Vergleichssubstanzen dargestellt.

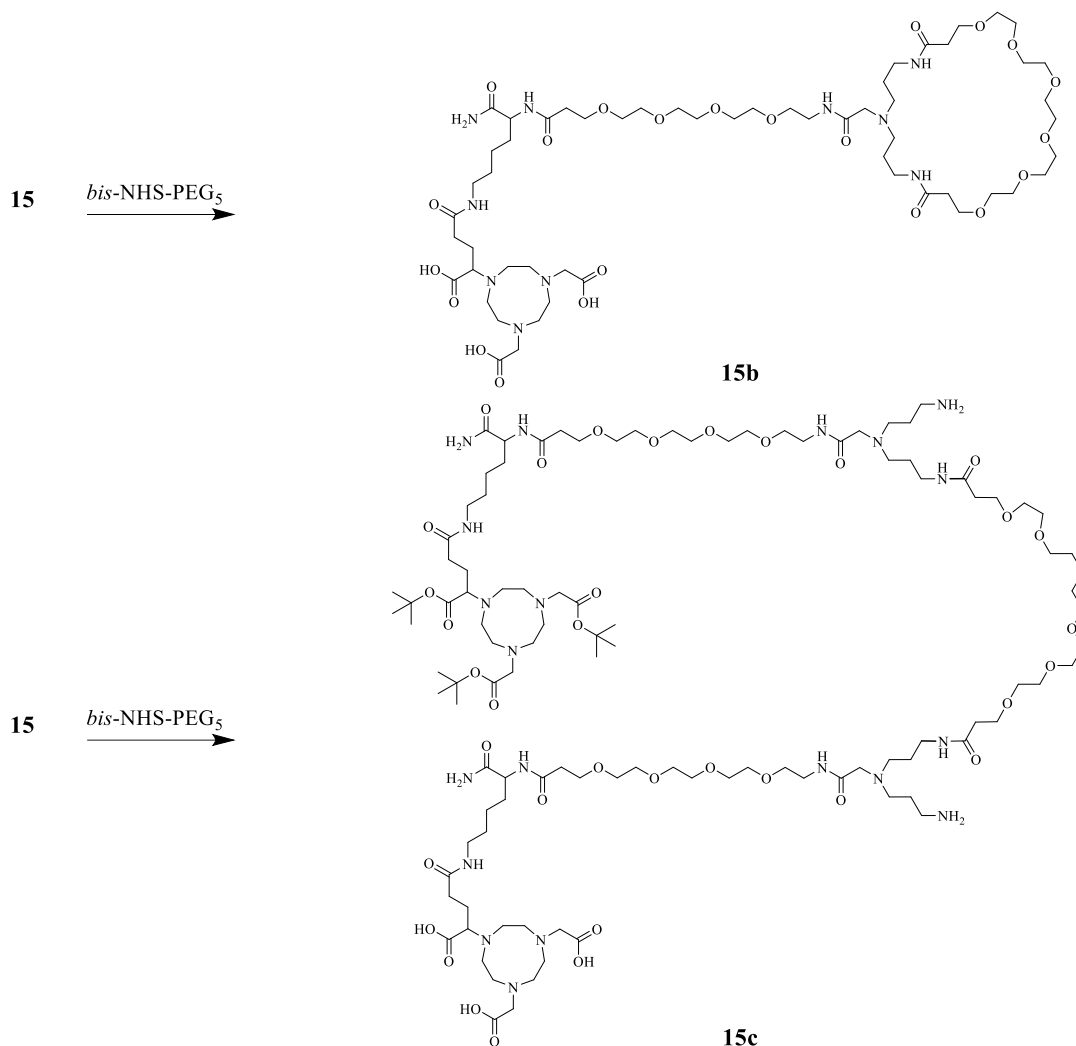


Schema 4: Synthese von **18**, dem gescamblen Analog zu **17**. Reaktionsbedingungen: (a) Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; (b) Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 15 min Kupplung im Ultraschallbad; (c) Kupplung des PEG-Linkers: 5.0 Äq. *bis*-NHS-PEG₅, 4.0 Äq. DIPEA in 1.8 mL DMF, 15 min im Ultraschallbad; (d) Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h.

Die Verknüpfung des NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** mit dem *bis*-NHS-PEG₅-Linker führte jeweils, am Harz sowie in Lösung, nicht zur Bildung des gewünschten Produktes **15a** (Schema 5), sondern zusätzlich zu der intramolekularen Verbrückung **15b**, zu intermolekularen Verknüpfungen **15c** (Schema 6). Auch die Verknüpfung des NODA-GA-*tetra*-amino-dendron **16** mit dem *bis*-NHS-PEG₅-Linker resultierte nur in den intramolekular- und intermolekularverbrückten Produkten. Somit musste die die GE11-Einheit funktionalisiert werden.



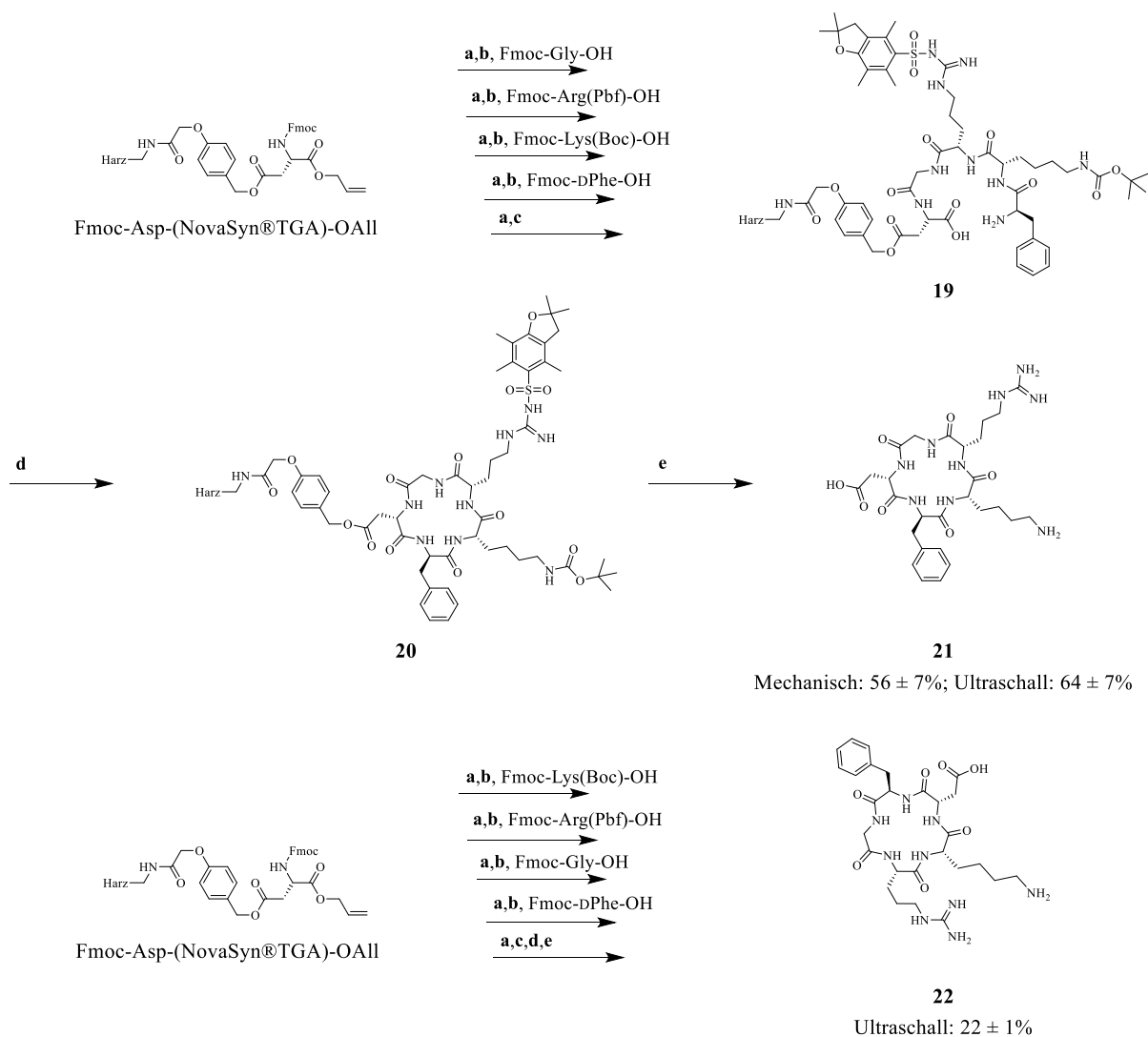
Schema 5: Versuchte Verknüpfung des NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** mit dem *bis*-NHS-PEG₅-Linker.



Schema 6: Intra- und intermolekulare Verknüpfung **15b** und **15c** am Beispiel des NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15**.

Die Integrin $\alpha_v\beta_3$ -bindende c(RGDfK)-Einheit **21** des Heterodimers wurde nach Fmoc-Standardprotokoll auf dem mechanischen Schüttler und im Ultraschallbad an einem Asp(NovaSynTGA)-OAll Harz mit Standard N_α -Fmoc Aminosäuren und HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert (Schema 7). In Anlehnung an die Literatur^[223], wurde nach der Kupplung der Aminosäuren Glycin, Arginin, Lysin und D-Phenylalanin an das Harz, die Allylschutzgruppe mit 0.25 Äq. Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) und 24 Äq. Phenylsilan in Dichlormethan (DCM) abgespalten. Die Cyclisierung wurde am Harz mit HBTU als Kupplungsreagenz und DIPEA als Base durchgeführt, wonach nach globaler Entschützung und gleichzeitiger Abspaltung vom Harz, Aufreinigung und Lyophilisation das Produkt **21** als farbloser Feststoff in Ausbeuten von $56 \pm 7\%$ (mechanisch) bzw. $64 \pm 7\%$ (Ultraschall) erhalten wurde.

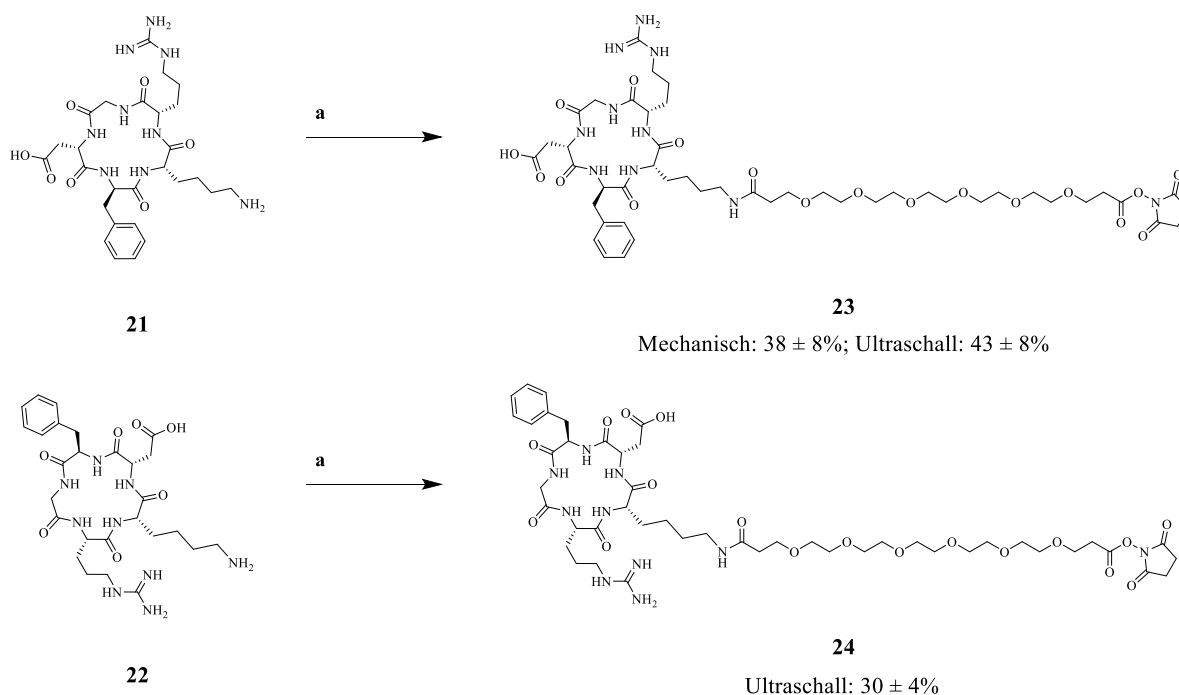
Die Synthese von scr[c(RGDfK)] **22**, das gescramblete Analoga von **21** mit der geänderten Aminosäuresequenz R-K-D-f-G, lieferte $22 \pm 1\%$ Produkt unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Methoden im Ultraschallbad.



Schema 7: Synthese von **21** und dem gescamblen Analoga **22**. Reaktionsbedingungen: **(a)** Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; **(b)** Aktivierung der Aminosäure und Kupplung. Mechanisch: 4.0 Äq. Aminosäure, 4.0 Äq. DIPEA, 3.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 60 min Kupplung; Ultraschall: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min, 15 min Kupplung; **(c)** Entfernung der Allyl-SG: 0.25 Äq. Pd(PPh₃)₄, 24 Äq. Phenylsilan in 5 mL DCM, 3 × 15 min; **(d)** Cyclisierung: 1.0 Äq. HBTU, 1.0 Äq. DIPEA in 3 mL DMF, 16 h; **(e)** Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h.

Um c(RGDfK) **21** mit dem NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** zu verknüpfen, bestand der nächste Schritt zuerst in der Funktionalisierung des c(RGDfK)s mit einem *bis*-NHS-PEG₅-ester (Schema 8, oben). Ein vollständiger Umsatz der Edukte konnte nach 60 / 15 min (mechanisch

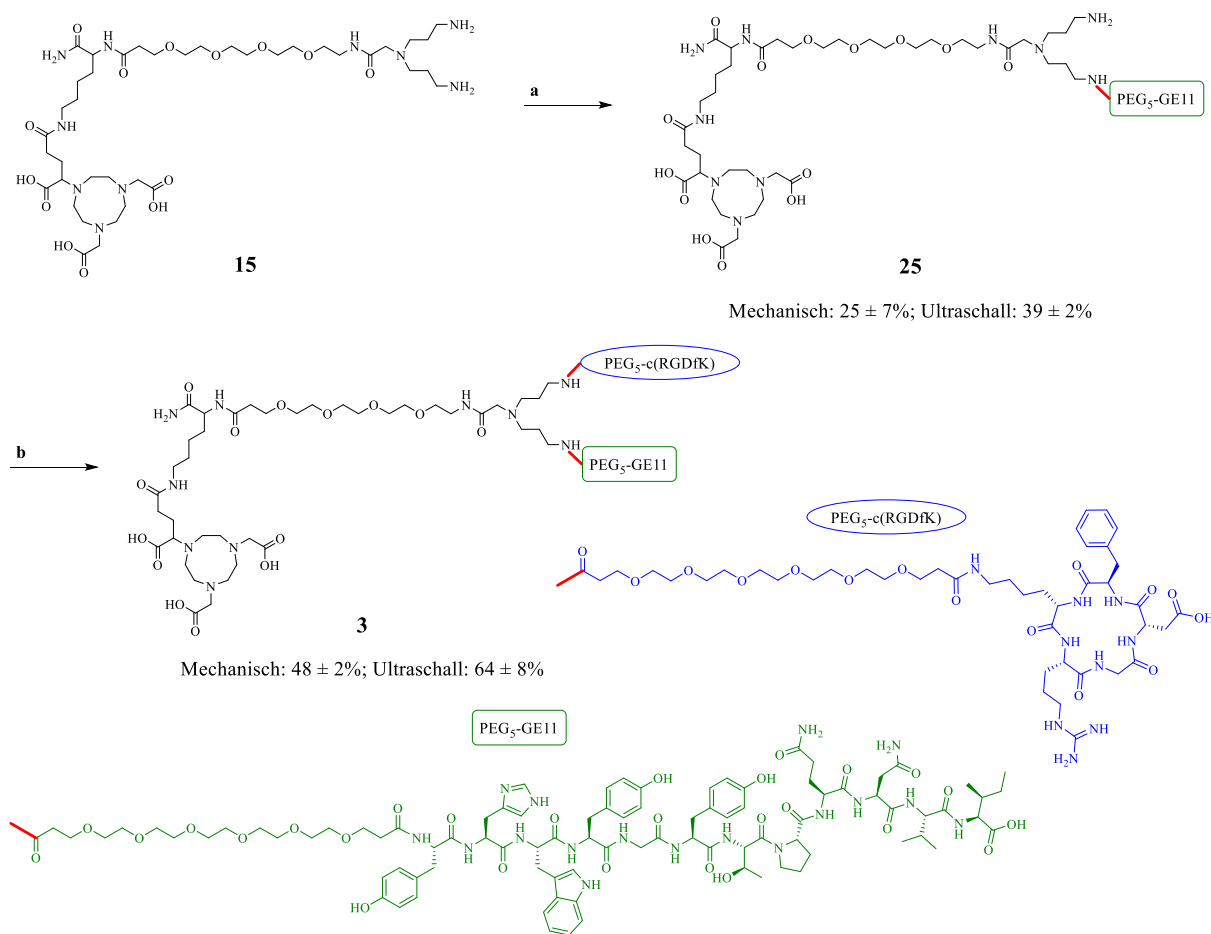
/Ultraschall) mittels analytischer HPLC beobachtet werden. Wider Erwarten musste nicht stark verdünnt gearbeitet werden, um eine Dimerisierung zu vermeiden; der NHS-PEG₅-c(RGDfK)-ester **23** konnte mittels semipräparativer HPLC isoliert und nach der Lyophilisation als farbloser Feststoff in Ausbeuten von 38 ± 8% / 43 ± 8% (mechanisch / Ultraschall) erhalten werden. Die Verknüpfung von scr[c(RGDfK)] **22** mit dem *bis*-NHS-PEG₅-ester erfolgte analog zu der ultraschallgestützten Verknüpfung von c(RGDfK) **21** mit *bis*-NHS-PEG₅-ester, wodurch der NHS-PEG₅-scr[c(RGDfK)]-ester **24** in Ausbeuten von 30 ± 4% isoliert wurde (Schema 8, unten).



Schema 8: Synthese von **23** und dem gescamblen Analog **24**. Reaktionsbedingungen: (a) Kupplung des PEG-Linkers. Mechanisch: 1.3 Äq. *bis*-NHS-PEG₅, 3.5 Äq. DIPEA in 0.5 mL DMF, 60 min; Ultraschall: 1.3 Äq. *bis*-NHS-PEG₅, 3.5 Äq. DIPEA in 0.5 mL DMF, 15 min.

Bei dem Versuch das NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** zuerst mit NHS-PEG₅-c(RGDfK) **23** zu verknüpfen konnte kein Produkt erhalten werden. So wurde zunächst der NHS-PEG₅-GE11-ester **17** mit dem NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** in absolutem DMF verknüpft (Schema 9), wobei der NHS-PEG₅-GE11-ester **17** im Unterschuss eingesetzt wurde, um eine zweifache Verknüpfung zu vermeiden (0.6 Äquivalente). Trotzdem kam es in sehr geringem Maß zur Bildung des Homodimers **3**, bei mechanischer Kupplung zu 3 ± 1% und bei ultraschallgestützter Kupplung zu 4 ± 1%. Hierbei zeigten die Reaktionkontrollen mittels analytischer HPLC einen

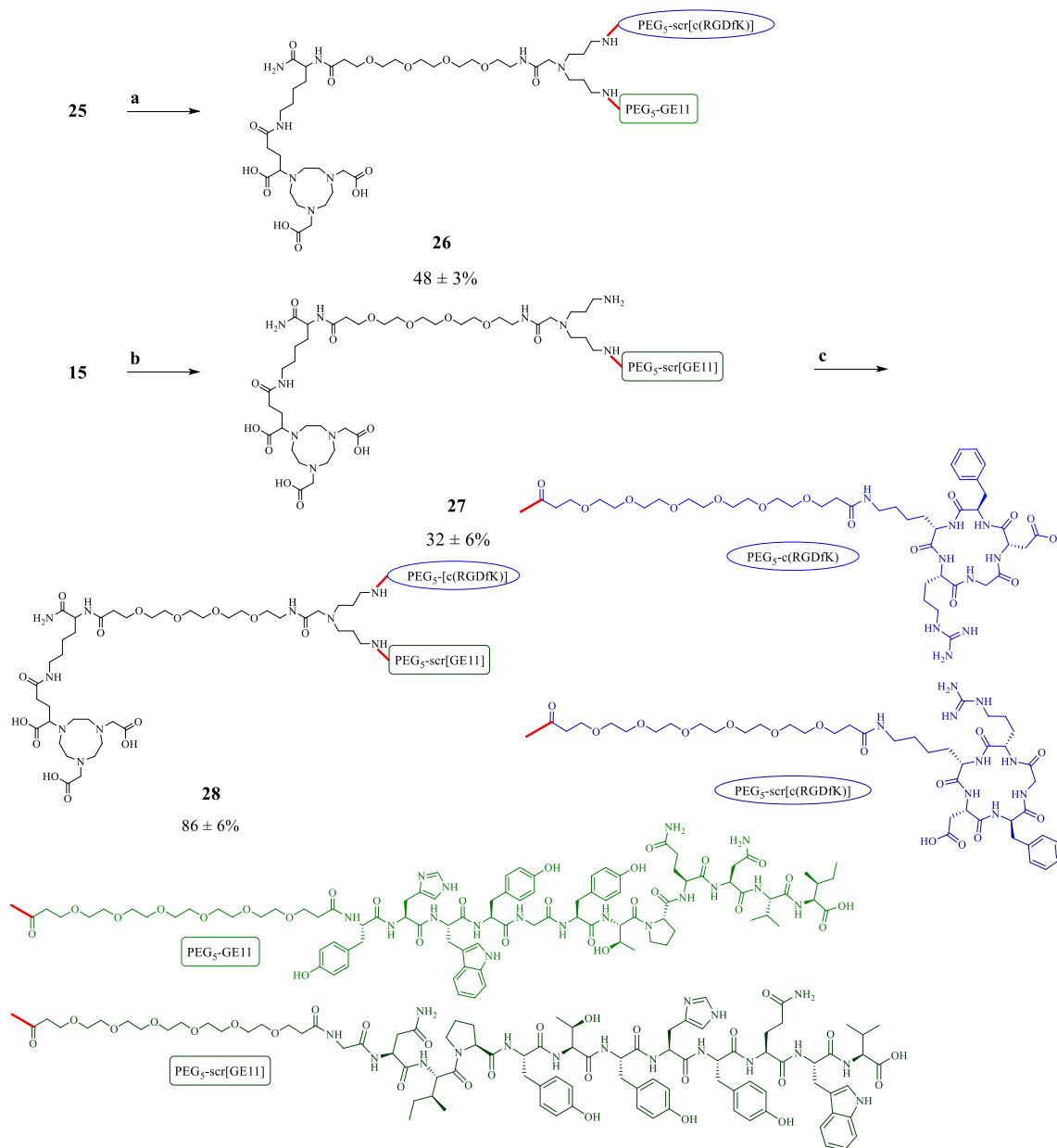
vollständigen Umsatz nach 90 bzw. 30 min (mechanisch / Ultraschall), wonach DMF und DIPEA unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und das Produkt **25** in Ausbeuten von $25 \pm 7\%$ / $39 \pm 2\%$ (mechanisch / Ultraschall) erhalten wurde. Das isolierte Intermediat **25** wurde in absolutem DMF und mit zwei Äquivalenten NHS-PEG₅-c(RGDfK)-ester **23** auf dem Schüttler oder im Ultraschallbad umgesetzt (Schema 9). Die Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC zeigten nach 90 / 60 min (mechanisch / Ultraschall) einen vollständigen Umsatz, das Heterodimer **3** wurde mit einer Ausbeute von $48 \pm 2\%$ / $64 \pm 8\%$ (mechanisch / Ultraschall) isoliert.



Schema 9: Synthese von **3**. Reaktionsbedingungen: (a) Kupplung zum Intermediat **25**. Mechanisch: 0.6 Äq. NHS-PEG₅-GE11-ester **17**, 4.0 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 90 min; Ultraschall: 0.6 Äq. NHS-PEG₅-GE11-ester **17**, 4.0 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 30 min; (b) Kupplung zum HBPL **3**. Mechanisch: 4.0 Äq. PEG₅-c(RGDfK)-ester **21**, 10.6 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 90 min; Ultraschall: 2.0 Äq. PEG₅-c(RGDfK)-ester **21**, 4.0 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 60 min.

Nach dem selben Schema wurden die jeweilig gescrambleten Analoga hergestellt (Schema 10). Das Heterodimer mit der scr[c(RGDfK)]-Einheit **26** wurde aus dem Intermediat **25** mit zwei Äquivalenten an NHS-PEG₅-scr[c(RGDfK)]-ester **24** in absolutem DMF innerhalb von 60 min

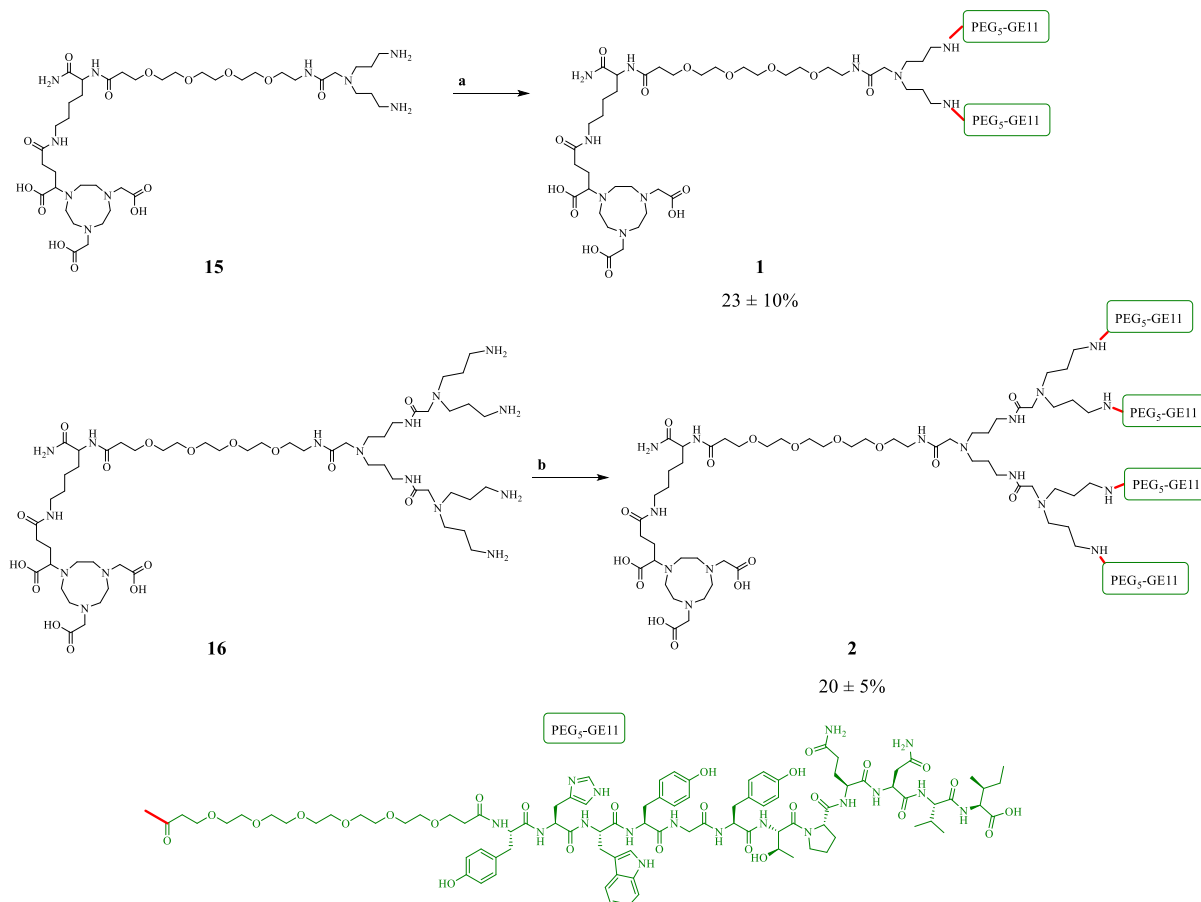
im Ultraschallbad mit einer Ausbeute von $48 \pm 3\%$ erhalten. Für das Heterodimer mit gescrambelter GE11-Einheit **28** musste als Erstes das Heterodimerintermediat **27** durch den Umsatz des NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** in absolutem DMF mit einem Unterschuss des NHS-PEG₅-scr[GE11]-ester **18** innerhalb von 30 min im Ultraschallbad synthetisiert werden (Ausbeute: $32 \pm 6\%$). Anschließend wurde das Heterodimerintermediat mit gescrambelter GE11-Einheit **27** in absolutem DMF mit einem Überschuss des NHS-PEG₅-c(RGDfK)-ester **23** innerhalb von 60 min im Ultraschallbad mit Ausbeuten von $86 \pm 6\%$ zum Heterodimer mit gestrambelter GE11-Einheit **28** umgesetzt.



Schema 10: Ultraschallgestützte Synthese von **26** und **28**. Reaktionsbedingungen: (a) 2.0 Äq. PEG₅-scr[c(RGDfK)]-ester **24**, 4.0 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 60 min; (b) 0.6 Äq. NHS-PEG₅-scr[GE11]-ester **18**, 4.0 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 30 min; (c) 2.0 Äq. PEG₅-c(RGDfK)-ester **23**, 4.0 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 60 min.

Die Synthese des Homodimers **1** wurde analog zur ultraschallgestützten Bildung des Intermediats **25** durchgeführt, wobei 2.6 statt 0.6 Äquivalente NHS-PEG₅-GE11-ester **17** mit dem NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** umgesetzt wurden (Schema 11, oben). Dennoch kam es bei der ultraschallgestützten Kupplung in geringem Maß von $12 \pm 1\%$ zur Bildung des Intermediats **25**. Die Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC zeigten einen vollständigen Umsatz nach 15 min, woraufhin DMF und DIPEA unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und für das Produkt **1** Ausbeuten von $23 \pm 10\%$ erreicht wurden.

Für die Synthese des Homotetramers **2** wurden 4.6 Äquivalente NHS-PEG₅-GE11-ester **17** mit dem NODA-GA-*tetra*-amino-dendron **16** umgesetzt (Schema 11, unten). Die Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC zeigten einen vollständigen Umsatz nach 60 min, wonach DMF und DIPEA unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und das Produkt **2** in Ausbeuten von $20 \pm 5\%$ erhalten wurde.



Schema 11: Ultraschallgestützte Synthese von Homodi- und Homotetramer **1** und **2**. Reaktionsbedingungen: (a) 2.6 Äq. NHS-PEG₅-GE11-ester **17**, 14.6 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 15 min; (b) 4.6 Äq. NHS-PEG₅-GE11-ester **17**, 14.6 Äq. DIPEA in 1 mL DMF, 60 min.

Die Synthesen von **1** – **3** konnten erfolgreich unter Verwendung von Ultraschall, für **3** zusätzlich mit der Verwendung von mechanischem Schütteln durchgeführt werden. Dabei benötigten ultraschallgestützte Synthesen am Harz einen geringeren Reagenzüberschuss, gingen mit einer mindestens dreifach verringerten Reaktionsdauer und einer Verbesserung der Ausbeute einher. Es wurden bereits noch stärkere Verkürzungen der Reaktionszeit einzelner Kupplungen bei der SPPS – bis zu einem Faktor von 7 – bei gleichbleibender Ausbeute postuliert.^[167]

Der NHS-Ester **17** ist an dieser Stelle die einzige Ausnahme, da es beim Einsatz von Ultraschall zu einer erhöhten Menge an intermolekularer Querverknüpfung am Harz kam. Es kam zur Bildung von $42 \pm 7\%$ Dimer **17a** bei nur $26 \pm 7\%$ Produkt **17**, bei mechanischem Schütteln wurde hingegen $15 \pm 5\%$ Dimer **17a** und $46 \pm 12\%$ Produkt **17** isoliert. Da bei der analogen Synthese von **21** in Lösung mittels ultraschallgestützter Synthese nur $7 \pm 2\%$ Dimer und $43 \pm 8\%$ Produkt erhalten wurden, kann die vermehrte Bildung des Dimers bei **17** der, durch das Harz erzwungenen, räumlichen Nähe der Moleküle untereinander zugeschrieben werden. Generell wurde für den Verlauf der Synthesen von **3**, **21** und **22** in Lösung eine Verminderung der Reaktionszeit zum vollständigen Umsatz der Edukte um den Faktor 1.5 mittels analytischer HPLC beobachtet und eine Verbesserung der Ausbeute erzielt. Es konnte nur der Reagenzüberschuss bei der Kupplung zum Heterodimer **3** verringert werden, während die Reaktionen in Lösung zu **23** und **25** mit weniger Reagenz mit einer starken Reduzierung der Ausbeute einhergingen.

Sowohl die Kupplungen am Harz (**15**, **17** und **20**), die Verknüpfung in Lösung (**3**, **21** und **22**), als auch die Cyclisierungen (**20**) konnten im Ultraschallbad durchgeführt werden. Diese Ergebnisse reihen sich mit der Erkenntnis ein, dass Ultraschall auch bei der Abspaltung von Schutzgruppen und vom Harz die Reaktionszeit merklich verringern kann.^[168] Somit begrenzt sich die Nutzung von Ultraschall nicht rein auf Peptidsynthese, sondern kann vielseitig zur Verbesserung der Reaktionszeit, der benötigten Menge an Reagenzien und der Ausbeute beitragen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefasst:

Tabelle 8: Vergleich der Reaktionsbedingungen und erhaltenen Produkte für die vollständige Synthese von **3** bei mechanischen und ultraschallgestützten Kupplungen und Cyclisierungen in Lösung oder am Harz. Die Synthesen wurden mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die Angabe der Ausbeute erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

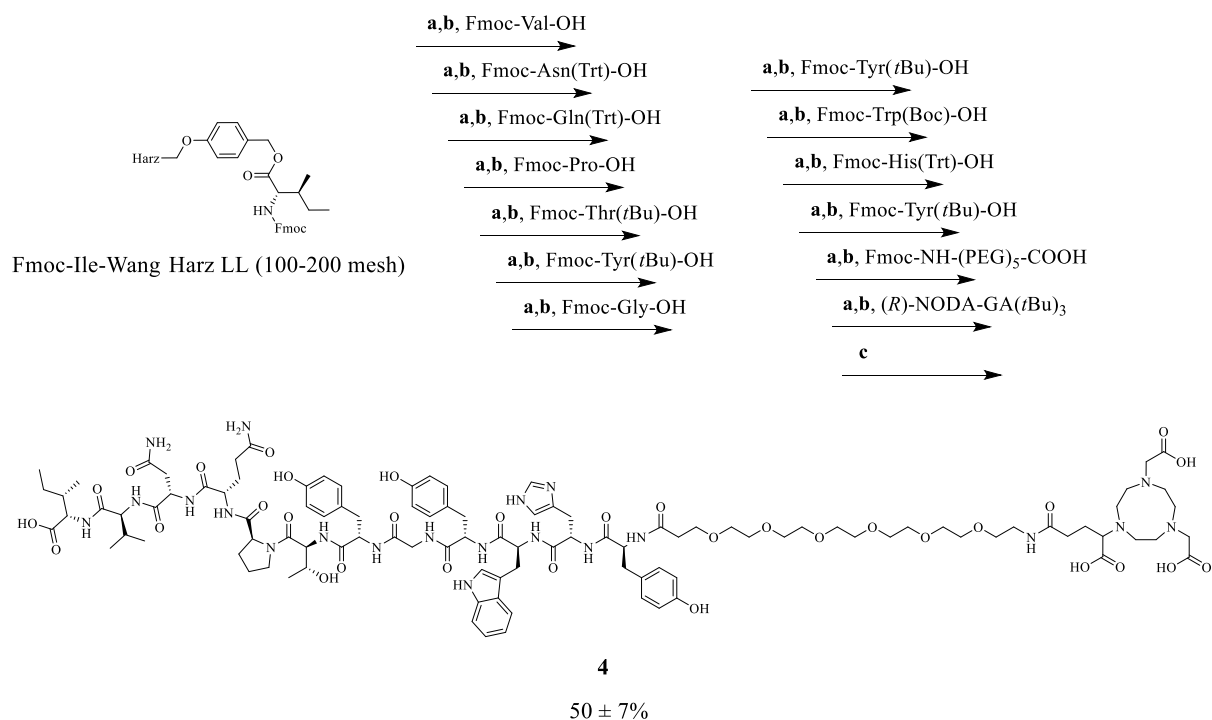
Produkt	Reaktionsweg	Reagenzüberschuss pro Kupplungsschritt [Äq.]	Summe der Reaktionszeit der Kupplungen [min]	Ausbeute [%]
15	Mechanisch	4	330	45 ± 3
15	Ultraschall	2	90	78 ± 6

17	Mechanisch	4 (8 für <i>bis</i> -NHS-PEG ₅)	720	46 ± 12
17	Ultraschall	2 (5 für <i>bis</i> -NHS-PEG ₅)	180	26 ± 7
20	Mechanisch	4	240 (+ 960 min Cyclisierung)	56 ± 7
20	Ultraschall	2	60 (+ 60 min Cyclisierung)	64 ± 7
21	Mechanisch	1.3	60	38 ± 8
21	Ultraschall	1.3	15	43 ± 8
22	Mechanisch	0.6	90	25 ± 7
22	Ultraschall	0.6	30	39 ± 2
3	Mechanisch	4	90	48 ± 2
3	Ultraschall	2	60	64 ± 8

3.2 Synthese der monovalenten Liganden für die Bildgebung von EGFR-überexprimierenden Läsionen

3.2.1 Peptidsynthese von *N*-terminal funktionalisierten Peptiden

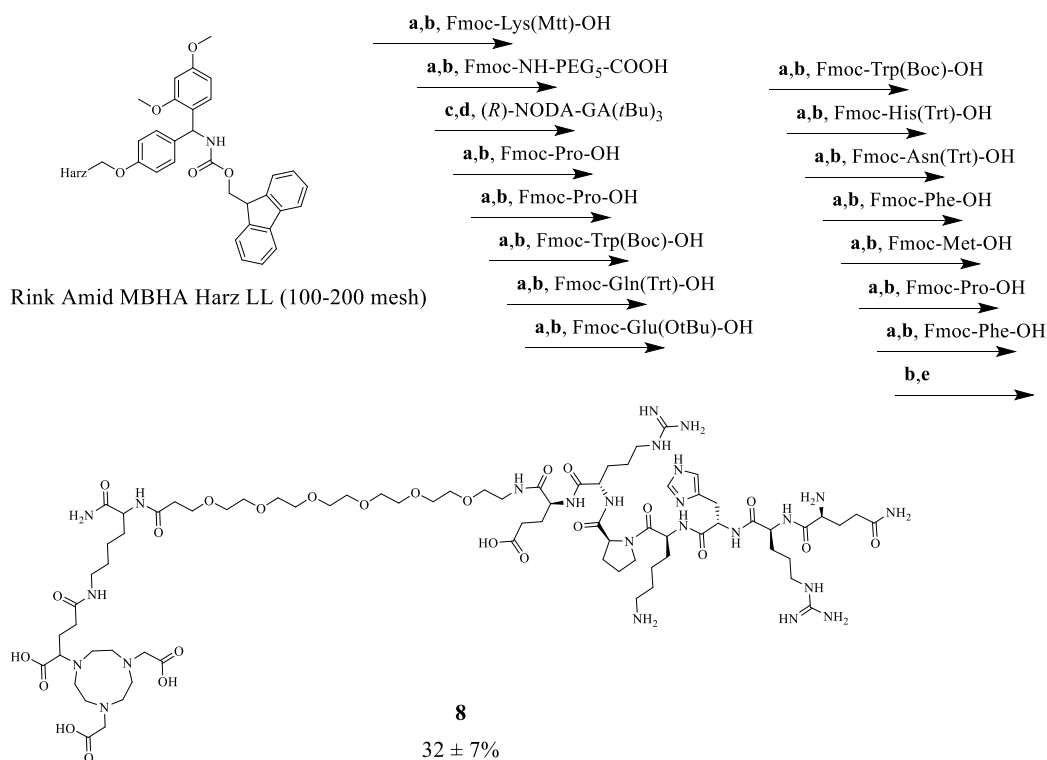
Die Synthese der Liganden **4** – **7** erfolgte nach Fmoc-Standardprotokoll, wobei für **4** Fmoc-Ile-Wang Harz LL, **5** und **6** Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz und **7** Fmoc-Asn(Trt)-2-Cl-Trt Harz benutzt wurde (Schema 12). Es wurden Standard *N*_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH und (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ mit HBTU als Kupplungsreagenz und DIPEA als Base jeweils innerhalb von 15 min im Ultraschallbad pro Kupplung eingesetzt. Für **5** – **7** wurde (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ mit PyBOP statt HBTU als Kupplungsreagenz innerhalb von 30 min statt 15 min gekuppelt. Die globale Entschützung und Abspaltung vom Harz erfolgte jeweils mit TFA, TIS und H₂O (95/2.5/2.5, *v/v/v*) für 3 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, das Produkt in 1:1 MeCN/H₂O + 0.1% TFA (*v/v*) gelöst und mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt. Nach der Lyophilisation wurden die Substanzen in Ausbeuten von 50 ± 7% (**4**), 74% (**5**), 59% (**6**) und 21% (**7**) isoliert.



Schema 12: Ultraschallgestützte Synthese von **4** als Beispiel eines der linearen monomeren Liganden **4** – **7**. Reaktionsbedingungen: (a) Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; (b) Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min Aktivierung, 15 min Kupplung im Ultraschallbad; (c) Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h.

3.2.2 Peptidsynthese von C-terminal funktionalisierten Peptiden

Für die Synthese der C-terminal-funktionalisierten Peptide **8** – **10** und **14** wurden ein niedrig beladenes Rink-Amid MBHA Harz, Standard *N*_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-NH-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz und DIPEA als Base eingesetzt (Schema 13). Die Kupplungen wurden jeweils innerhalb von 15 min im Ultraschallbad durchgeführt. Die Mtt-Entschützung des ε-Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-NH-PEG₅-COOH an das α-Amin des Lysins, mit 1% TFA in DCM (v/v). (R)-NODA-GA(*t*Bu)₃ wurde mit PyBOP statt HBTU als Kupplungsreagenz innerhalb von 30 min an das ε-Amin gekuppelt. Die globale Entschützung und Abspaltung vom Harz erfolgte mit TFA, TIS und H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) für 3 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt in 1:1 MeCN/H₂O + 0.1% TFA (v/v) gelöst, mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und anschließend lyophilisiert. Die Substanzen wurden in Ausbeuten von 50% (**8**), 49% (**9**), 32 ± 7% (**10**) und 54% (**14**) erhalten.

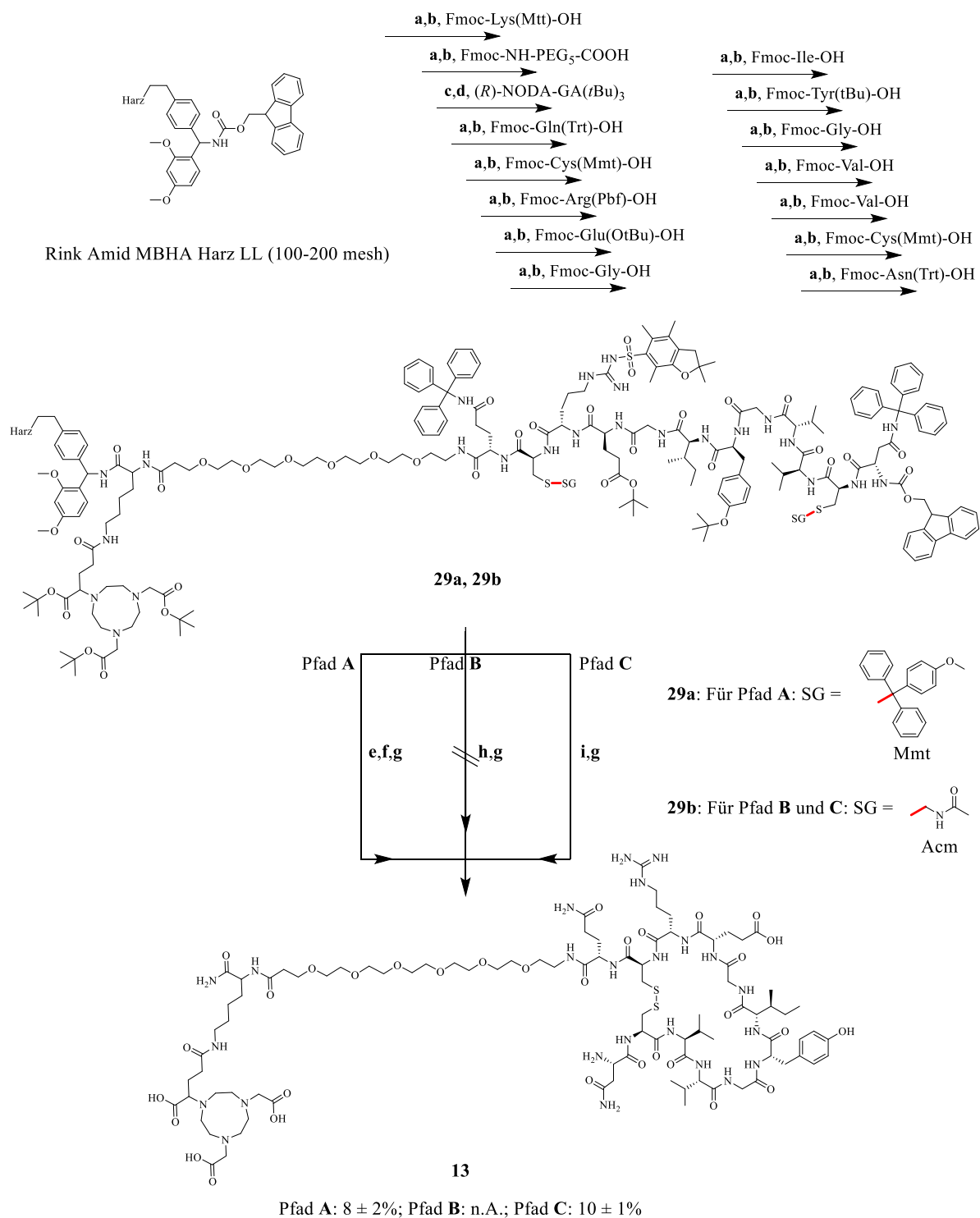


Schema 13: Ultraschallgestützte Synthese von **8** als Beispiel eines der linearen monomeren Liganden **8** – **10** und **14**. Reaktionsbedingungen: (a) Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; (b) Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min, 15 min Kupplung im Ultraschallbad; (c) Entfernung der Mtt-SG: 1% TFA in DCM (v/v), 3×15 min; (d) Aktivierung und Kupplung von (R)-NODA-GA(*t*Bu)₃: 2.0 Äq., 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. PyBOP in 1.8 mL DMF, 2 min, 30 min; (e) Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h.

3.2.3 Peptidsynthese von Liganden mit Cystein-Brücken

Die Synthese der Substanzen **11** – **13** wurde nach Fmoc-Standardprotokoll am Rink-Amid-MBHA Harz LL mit Standard *N*_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-NH-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz durchgeführt. (R)-NODA-GA(*t*Bu)₃ wurde mit PyBOP als Kupplungsreagenz innerhalb von 30 min an das ε-Amin gekuppelt. Die Synthesen erforderten schlussendlich die Knüpfung einer Disulfidbrücke der Thiolgruppen der Cysteine. Dazu wurde bei der Synthese des EGF₃₂₋₄₃-PEG₅-NODA-GA **13** zuerst eine Cyclisierung in Lösung versucht, wobei aber nur das lineare Produkt erhalten wurde. Aufgrund dessen wurden verschiedene Reagenzien zur Optimierung der Disulfidkupplung evaluiert. Hierfür musste Cystein mit unterschiedlichen Schutzgruppen, abhängig von der beabsichtigten Kupplungsmethode, genutzt werden – wobei nur Cyclisierungen am Harz getestet wurden (Schema 14).

Bei Pfad **A** wurden die Cysteine mit 4-Methoxyltrityl (Mmt) geschützt, welches sich durch wiederholte 1%ige TFA-Behandlung in DCM (*v/v*) entfernen ließ. Die Cyclisierung erfolgte mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS) in DMF, das die Thiolgruppen zur Disulfidbrücke oxidiert.^[225] Nach der Abspaltung vom Harz und globaler Entschützung der Seitengruppen mit TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, *v/v/v*) innerhalb von 3 h konnte das EGF₃₂₋₄₃-PEG₅-NODA-GA **13** in Ausbeuten von $8 \pm 2\%$ isoliert werden. In Pfad **B** konnte unter Verwendung der Acetyl-Schutzgruppe der Cysteine (EGF₃₃ und EGF₄₂) und Cyclisierung für 30 min mit Iod in Methanol (MeOH) kein cyclisiertes Produkt nachgewiesen werden.^[226] Bei Pfad **C** verlief die Entfernung der Acetaminomethyl (Acetyl)-Schutzgruppen der Cysteine (EGF₃₃ und EGF₄₂) mit Thallium(III)-Trifluoracetat simultan zur Oxidierung der Thiolgruppen zur Disulfidbrücke.^[227] Die Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen erfolgte mit TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, *v/v/v*) innerhalb von 3 h. Hierdurch konnte die Ausbeute des EGF₃₂₋₄₃-PEG₅-NODA-GA **13** leicht auf $10 \pm 1\%$ erhöht werden, wobei weitere Optimierungsmöglichkeiten bestehen. So bietet die organische Chemie eine Vielzahl an Schutzgruppen für Cystein – Ad (1-Adamantyl), Bzl (Benzyl), DMB (3,4-Dimethylbenzyl), Dpm (Diphenylmethyl), Mob (4-Methoxybenzyl), 5-Npys (5-Nitro-2-pyridinsulphenyl), *St*Bu (tert-Butylsulphenyl), STmp (2,4,6-Trimethoxyphenylthio), *t*Bu (*tert*-Butyl), Thp (Tetrahydropyranyl) und Trt (Triphenylmethyl) etc.^[228] – zur potentiellen Begünstigung einer Disulfidbrückenbildung. Weiter kann auch eine Variation des Harzes oder der Abspaltungslösung bereits zu einer deutlichen Verbesserung der Ausbeute führen.^[229] Bei gescheiterten Versuchen wurde das lineare Produkt in Ausbeuten von bis zu 62% erhalten, weshalb der Cyclisierungsschritt und nicht die einzelnen Kupplungsschritte der Aminosäuren als Ursache der geringen Ausbeute identifiziert wurde. Damit würde ein anderes Kupplungsreagenz (PyBOP oder HATU) oder eine Erhöhung der Äquivalente der Aminosäuren nicht zu einer Verbesserung der Ausbeute führen.

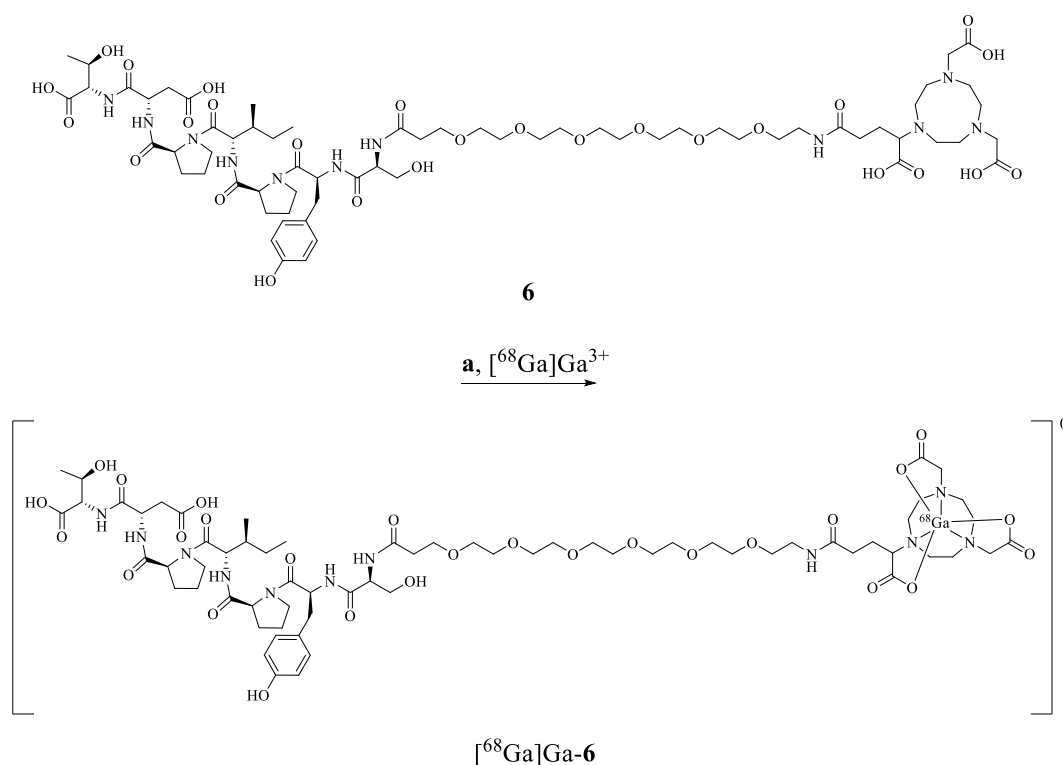


Schema 14: Ultraschallgestützte Synthese von **13** als Beispiel eines der cyclischen Liganden **11–13**. Reaktionsbedingungen: (a) Entfernung der Fmoc-SG: Piperidin in DMF (1/1, v/v), 2 + 5 min; (b) Aktivierung der Aminosäure und Kupplung: 2.0 Äq. Aminosäure, 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. HBTU in 1.8 mL DMF, 2 min, 15 min Kupplung im Ultraschallbad; (c) Entfernung der Mtt-SG: 1% TFA in DCM (v/v), 3×15 min; (d) Aktivierung und Kupplung von (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃: 2.0 Äq., 2.0 Äq. DIPEA, 1.9 Äq. PyBOP in 1.8 mL DMF, 2 min, 30 min; (e) Mmt-SG-Entschützung: 5 mL 1% TFA in DCM (v/v), 5 × 5 min; (f) Cyclisierung mit *N*-Chlorsuccinimid (NCS): 1.05 Äq. NCS in 5 mL DMF, 15 min, RT; (g) Abspaltung vom Harz und globale Entschützung der Seitengruppen: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v), 5-15 mL, 3 h (h) Entfernung der Acn-SG und Cyclisierung mit Iod: 5 mL 0.06 M Iod in MeOH, 30 min, RT. 3 × mit 1 M Ascorbinsäure waschen. (i) Entfernung der Acn-SG und Cyclisierung mit Thallium(III)-Trifluoacetat: 4.0 Äq. Thallium(III)-Trifluoacetat in 5 mL DMF, 45 min, RT.

3.3 Charakterisierung der Liganden

3.3.1 Radiomarkierungseigenschaften

Die synthetisierten Präkursoren **1** – **14** wurden nach erfolgreicher Herstellung radiomarkiert (Schema 15). Das für die Radiomarkierung verwendete $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ wurde als $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ durch Elution eines $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystems mit 0.1 M Salzsäure (HCl) erhalten. 1 – 20 nmol des jeweiligen Präkursors wurden jeweils zu 50 – 250 MBq $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ hinzugegeben, es wurde der pH auf 3.5 – 4.0 eingestellt, die Lösung auf 45°C erwärmt und die Reaktionsdauer und die radiochemische Reinheit wurden anschließend mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt.



Schema 15: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ -Radiomarkierung der NODA-GA-Konjugate **1** – **14** am Beispiel von **6**. Reaktionsbedingungen: (a) 50 – 250 MBq $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ (0.5 mL – 1 mL) in NaOAc-Puffer (pH 4.6, 1.25 M, 100 – 250 μL), pH 3.5 – 4.0, 10 min schütteln, 45°C, >97% radiochemische Reinheit.

Die Reaktionsdauer wurde mittels analytischer Radio-HPLC überprüft. Hierzu wurde zu den Zeitpunkten 0, 2, 6, 8 und 10 min je eine Probe entnommen, die mittels einer analytischen Radio-HPLC auf freies $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ (Retentionszeit: 0.6 min) untersucht wurde. In der Abbildung 25 ist der Verlauf der Radiomarkierung beispielhaft für $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ dargestellt; für alle Verbindungen lag eine ^{68}Ga -Inkorporation von > 97% nach 10 Minuten vor.

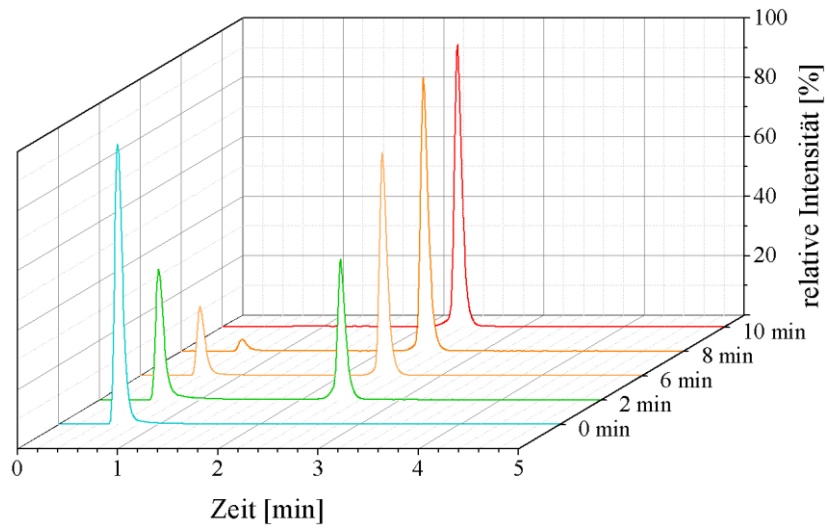


Abbildung 25: Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ nach 0, 2, 6, 8 und 10 min Reaktionszeit. Freies $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ mit einer Retentionszeit von 0.6 min, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ mit einer Retentionszeit von 2.4 min.

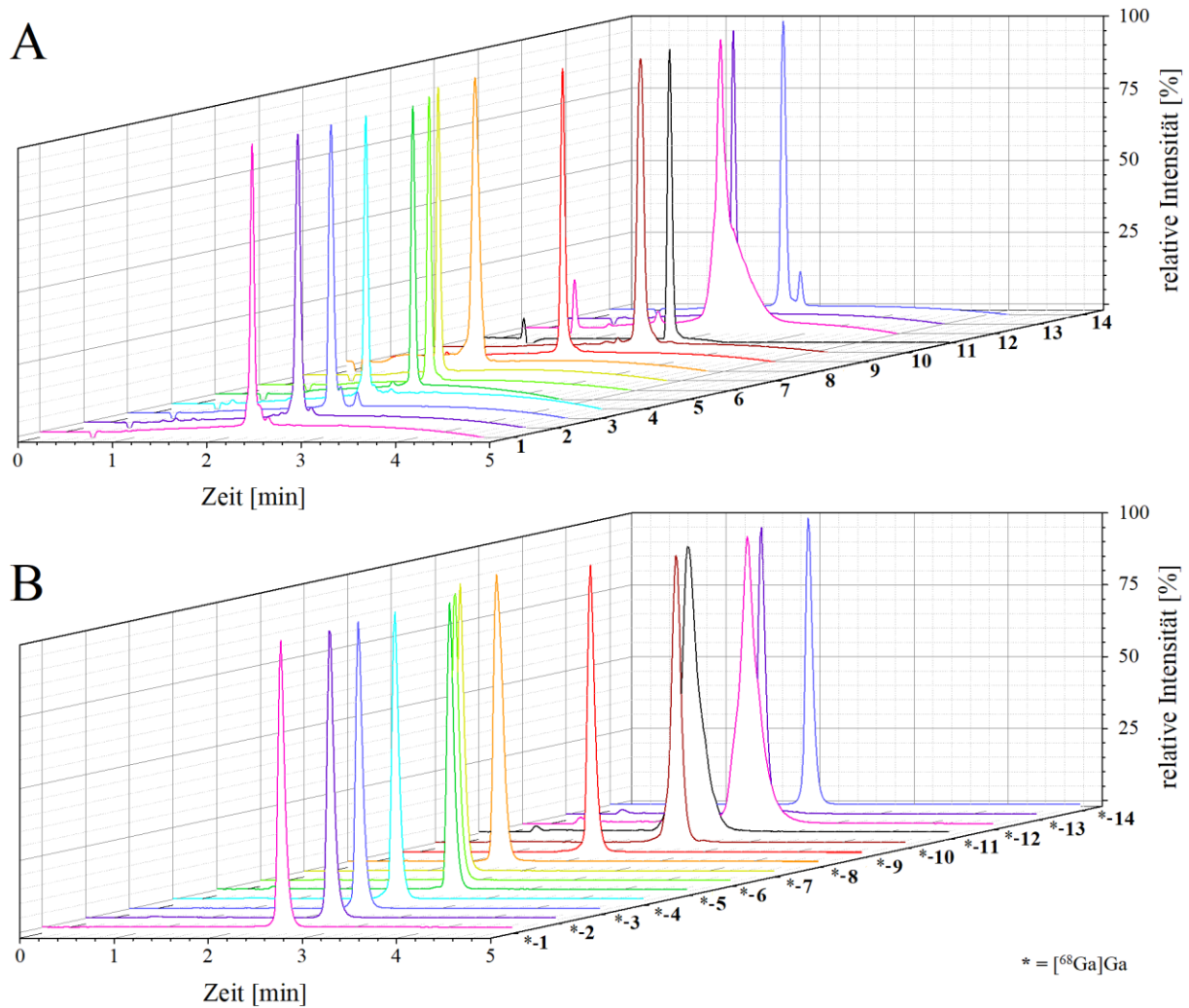


Abbildung 26: (A) Analytische HPLC-Chromatogramme der Präkursoren **1** – **14** und (B) Analytische Radio-HPLC Chromatogramme von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$ nach der erfolgreichen Radiomarkierung mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$.

Die analytischen Radio-HPLC-Chromatogramme (Abbildung 26 (B)) zeigten für $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-10}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$ eine hohe radiochemische Reinheit, während $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-11}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-12}$ ein heterogenes Markierungsprodukt lieferten. Durch eine Anpassung der Markierungsbedingungen konnte keine Verbesserung der radiochemischen Reinheit von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-11}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-12}$ bewirkt werden. Die Interaktion mit dem Radiometall muss hierbei ausschlaggebend für die Bildung der heterogenen Produkte sein, da die analytischen Chromatogramme der Präkursoren **11** und **12** (Abbildung 26 (A)) eine hohe chemische Reinheit unter denselben Bedingungen aufwiesen (bis auf Peak-Tailing bei **12**). Eine mögliche Erklärung kann der Aufbau der Substanz sein – so weist hEGF als radiomarkiertes $[^{111}\text{In}]\text{In-DTPA-hEGF}$ auch ein heterogenes Markierungsprodukt im HPLC-Chromatogramm auf. Es wurde von R. M. Reilly postuliert, dass das heterogene Markierungsprodukt aufgrund monomerer und dimerisierter $[^{111}\text{In}]\text{In-DTPA-hEGF}$ -Anteile entstehen kann.^[230] Allerdings wurden keine HPLC-Chromatogramme weiterer radiomarkierter hEGF-Derivate veröffentlicht und, ob bei $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-11}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-12}$ eine Dimerisierung o.Ä. stattgefunden hat, wurde weder verifiziert noch falsifiziert.

Durch die Bildung mehrerer Radiomarkierungsprodukte wird eine weitere Überprüfung von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-11}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-12}$ für die Eignung als PET-Radiotracer erschwert, dennoch wurden beide Substanzen, sofern möglich, in den folgenden Experimenten der Vollständigkeit halber auch berücksichtigt.

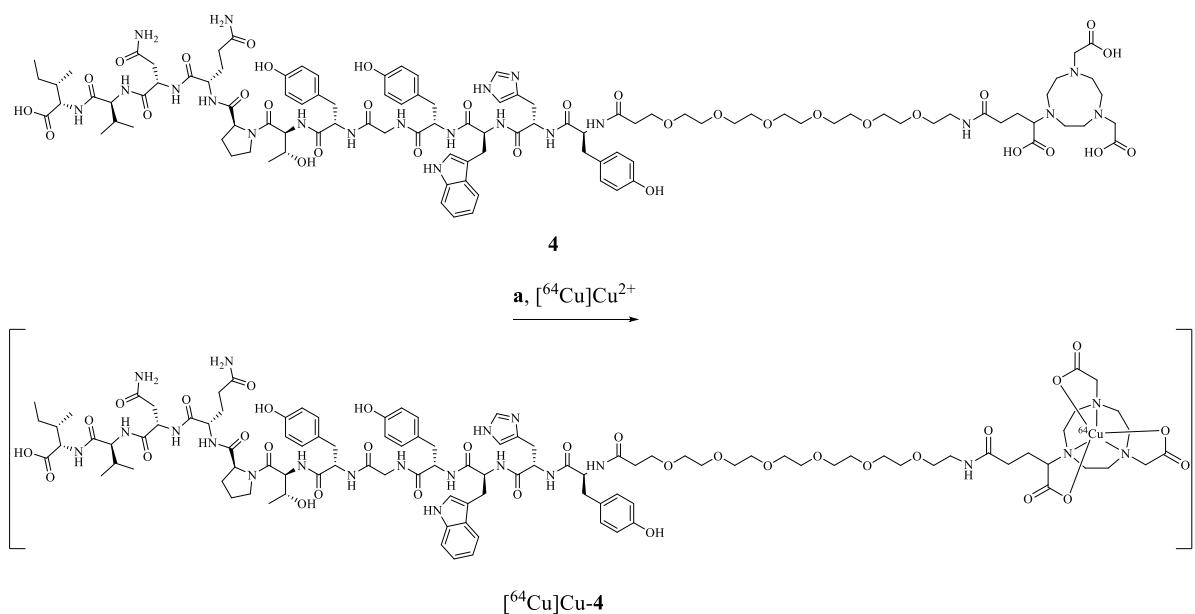
Generell konnten alle Substanzen **1** – **14** mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ erfolgreich markiert und in nicht-optimierten molaren Aktivitäten von 25 – 111 GBq/ μmol erhalten werden. Die erreichten molaren Aktivitäten und radiochemischen Reinheiten sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Übersicht radiochemischer Reinheiten und nicht-optimierter molarer Aktivitäten von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-26}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-28}$.

Produkt	Radiochemische Reinheit [%]	Molare Aktivität [GBq/ μmol]
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$	98	81
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$	97	111
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-3}$	99	104
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$	98	88
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$	99	41
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$	100	25
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$	100	28
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-8}$	100	48
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-9}$	100	42
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-10}$	100	69
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-11}$	n.A.	54
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-12}$	n.A.	32

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$	99	36
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$	100	30
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-26}$	100	66
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-28}$	100	28

Die synthetisierten Präkursoren **1** – **4** wurden zusätzlich mit $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ markiert, um die erwartete Variabilität des Chelator NODA-GA zu bestätigen (Schema 16). Hierzu wurden 0.5 – 5 nmol des Präkursors zu 5 – 10 MBq $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ hinzugegeben, der pH auf 4.8 – 5.0 eingestellt und innerhalb von 10 min bei 25°C markiert. Die Reaktionsdauer und die radiochemische Reinheit wurden wieder mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt. Generell konnten **1** – **4** erfolgreich mit $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ markiert und in nicht-optimierten molaren Aktivitäten von 7 GBq/ μmol erhalten werden. Die erreichten molaren Aktivitäten und radiochemischen Reinheiten sind in der Tabelle 10 aufgelistet.



Schema 16: $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ -Radiomarkierung der NODA-GA-Konjugate **1** – **4** am Beispiel von **4**. Reaktionsbedingungen: (a) 5 – 10 MBq $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ (5 μL – 20 μL) in NaOAc-Puffer (pH 5.0, 0.25 M, 125 – 150 μL), pH 4.8 – 5.0, 10 min schütteln, 25°C, >96% radiochemische Reinheit.

Tabelle 10: Übersicht radiochemischer Reinheit und nicht-optimierter molarer Aktivitäten von $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-1}$ – $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-4}$.

Produkt	Radiochemische Reinheit [%]	Molare Aktivität [GBq/ μmol]
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-1}$	99	7
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-2}$	96	7
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-3}$	99	7
$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-4}$	100	7

3.3.2 Stabilität in humanem Serum

Radiopharmaka müssen unter physiologischen Bedingungen möglichst stabil sein, sodass ihre spezifische Bindung an die Zielstruktur erfolgen kann, bevor es zum Abbau der Bindestruktur oder zum Verlust des Radionuklids durch Transchelatierung oder Freisetzung kommt. Bei Peptiden, die intravenös appliziert werden, erfolgt der Abbau meist durch Serumpeptidasen, wobei auch eine Zersetzung des Radiotracers durch die Strahlung des Radionuklids (Radiolyse) erfolgen kann.^[231-234]

Um die Freisetzung des Radionuklids, eine Transchelatierung durch Serumproteine (z. B. Transferrin) und die Menge an Zersetzung durch Radiolyse/Peptidase zu beurteilen, wurde die Stabilität der Substanzen in humanem Serum bestimmt. Hierfür wurden die radiomarkierten Verbindungen $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$ bei 37°C in humanem Serum inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten – 0, 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min – wurde immer eine Probe entnommen, die Serumproteine gefällt und der Überstand mittels analytischer Radio-HPLC im Hinblick auf die Intaktheit des Radiotracers, dessen radiolyse- und peptidase-bedingte Zersetzung und die Freisetzung von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ untersucht. Die Abbildung 27 zeigt beispielhaft die Radio-HPLC-Chromatogramme der Serumstabilitätsuntersuchungen von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$.

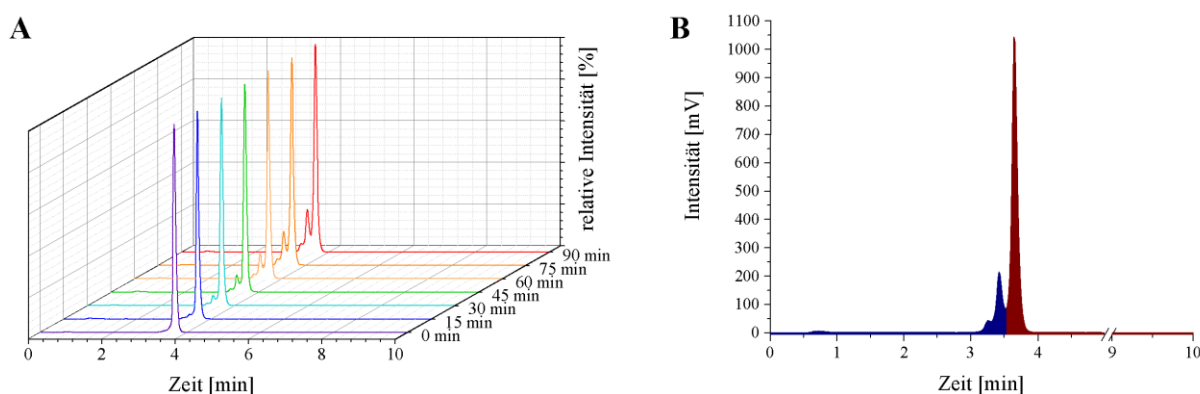


Abbildung 27: Beurteilung der Menge an radiolyse/peptidase-bedingter Zersetzung: (A) Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme des Radiomarkierungsproduktes $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ nach 0, 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min Inkubationszeit in humanem Serum; (B) $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ nach 90 min Inkubationszeit in humanem Serum mit freiem ^{68}Ga /Radiolyseprodukt/Peptidaseprodukt (Blau) und intaktem Radiotracer (Rot).

Da freigesetztes $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ durch seine chemische Ähnlichkeit zu Fe^{3+} auch transferringebunden mit den Serumproteinen gefällt werden kann, wurde zusätzlich die

Aktivität des Niederschlags und des Überstandes bei jeder Probenentnahme bestimmt. Hierbei konnte über die Zeitspanne von 90 min bei keiner markierten Substanz eine prozentuale Zunahme der Aktivität im Niederschlag, verglichen mit dem Überstand festgestellt werden. Des Weiteren konnte bei keiner Substanz eine Freisetzung des Radionuklids im Überstand beobachtet werden. Somit zeigt NODA-GA in allen Substanzen eine hohe kinetische Inertheit in humanem Serum gegen eine mögliche Transchelatierung oder Freisetzung des gebundenen Radiometalls. Ein Abbau der Bindungseinheit oder der Verlust des Radionuklids würde zu einer höheren Hintergrundaktivität führen, verbunden mit einer geringeren Anreicherung in der Zielstruktur/im Tumor.

In der Abbildung 28 und der Tabelle 11 sind die Stabilitäten der Radiotracer bzw. der Anteil an intaktem Radiotracer nach 90 min und die errechneten Halbwertszeiten zusammengefasst:

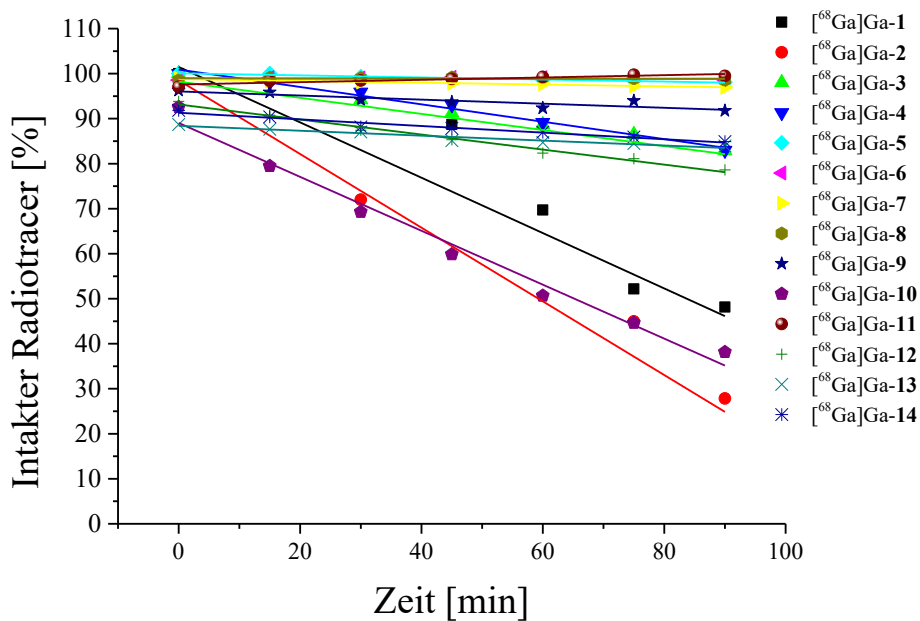


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Serumstabilität von [68Ga]Ga-1 – [68Ga]Ga-14 im humanen Serum über 90 min.

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der Serumstabilität von [68Ga]Ga-1 – [68Ga]Ga-14 im humanem Serum nach 90 min und die daraus errechnete Halbwertszeit.

Produkt	Intakter Radiotracer nach 90 min [%]	Errechnete Halbwertszeit [min]
[68Ga]Ga-1	48.7 ± 2.4	83.5 ± 3.7
[68Ga]Ga-2	28.8 ± 6.4	62.4 ± 7.1
[68Ga]Ga-3	80.5 ± 0.7	237.4 ± 0.9
[68Ga]Ga-4	83.0 ± 0.8	295.7 ± 2.7
[68Ga]Ga-5	98.1 ± 1.2	2089.2 ± 52.3

$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$	98.5 ± 3.2	8077.7 ± 307.2
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$	97.0 ± 2.4	2427.2 ± 38.7
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-8}$	98.5 ± 0.6	n.A. ^a
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-9}$	91.8 ± 3.3	1064.1 ± 43.0
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-10}$	38.2 ± 1.7	66.4 ± 3.0
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-11}$	n.A.	n.A.
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-12}$	n.A.	n.A.
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$	83.9 ± 1.2	702.2 ± 42.2
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$	84.9 ± 0.9	562.0 ± 6.9

^a: Die Halbwertszeit konnte nicht berechnet werden, da kein Abbau durch Serumpeptidasen o. Ä. beobachtet werden konnte.

Generell wiesen die Substanzen $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$ eine unterschiedliche Stabilität gegenüber Radiolyse/Peptidasenangriffen etc. auf. Während $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-10}$ mit einer Halbwertszeit von 62.4 ± 7.1 bzw. 66.4 ± 3.0 min eine vergleichsweise schlechte Stabilität aufwiesen, wurden für $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-9}$ Halbwertszeiten $>1\ 000$ min berechnet. Da eine Erhöhung der Valenz von Monomer zu Multimeren mit einer verbesserten Stabilität einhergeht^[170-171], verhalten sich die gemessenen Serumstabilitäten von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ zueinander nicht wie erwartet. So wiesen Homodimer **1**, Homotetramer **2** als auch das Heterodimer **3** eine geringere Serumstabilität als das Monomer **4** auf, wobei die Stabilität mit zunehmender Anzahl GE11-Einheiten abnahm. Folglich könnte die Verringerung der Serumstabilität möglicherweise daran liegen, dass das Homodi- und das Homotetramer mehr potentielle Angriffsstellen für Peptidasen liefern, wobei keine sterische Abschirmung durch die Liganden erfolgt.

Insgesamt zeigten $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-3}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-9}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$ eine ausreichende Serumstabilität für die potentielle Anwendung als ^{68}Ga -markierte Radiopharmaka in der PET/CT.

3.3.3 Lipophilie

Die Lipophilie von Substanzen beeinflusst u. a. die Bioverfügbarkeit und die Bioverteilung innerhalb des Metabolismus, so werden etwa lipophile Pharmaka hauptsächlich über die Metabolisierung in der Leber, hydrophile Substanzen vorwiegend renal ausgeschieden.^[235-239] Aufgrund ihrer hohen Hydrophilie werden beispielsweise die zugelassenen $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -Radiopharmaka, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TOC}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ renal ausgeschieden.^[240-242] Das Hydrophilie/Lipophilie-Profil der Radioliganden erlaubt somit

erste Rückschlüsse auf den potentiellen Aufnahme- und Ausscheidungsweg und sollte daher auch für die hier entwickelten Verbindungen untersucht werden.

Zur Bestimmung der Lipophilie wurde das jeweilige radiomarkierte Peptid zu einem Gemisch aus 1-Octanol und Phosphat-Puffer hinzugegeben (1:1, v/v), die Lösung geschüttelt und anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die Radioaktivität der jeweiligen organischen und wässrigen Phasen wurden im Gammazähler gemessen. Der $\log_{D(7.4)}$ -Wert wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\log_{D(7.4)} = \log \left[\frac{\text{cpm}_{1\text{-Octanol}}}{\text{cpm}_{\text{Phosphat-Puffer}_{7.4}}} \right] \quad (1)$$

$\text{cpm}_{1\text{-Octanol}}$ = Aktivitätsmenge der 1-Octanol-Phase in *counts per minute* [cpm]

$\text{cpm}_{\text{Phosphat-Puffer}_{7.4}}$ = Aktivitätsmenge der Phosphat-Puffer-Phase in *counts per minute* [cpm]

Tabelle 12: Gefundene $\log_{D(7.4)}$ -Werte der radiomarkieren Substanzen $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$

Verbindung	$\log_{D(7.4)}$
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$	-2.52 ± 0.03
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$	-2.17 ± 0.21
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-3}$	-3.79 ± 0.04
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$	-3.44 ± 0.08
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-5}$	-3.51 ± 0.22
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-6}$	-3.92 ± 0.09
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-7}$	-4.01 ± 0.13
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-8}$	-3.91 ± 0.06
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-9}$	-3.86 ± 0.11
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-10}$	-3.03 ± 0.20
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-11}$	-3.16 ± 0.11
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-12}$	-2.93 ± 0.08
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-13}$	-3.92 ± 0.09
$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$	-3.98 ± 0.06

Die Substanzen wiesen $\log_{D(7.4)}$ -Werte im Bereich von -4.01 ± 0.13 bis -2.17 ± 0.21 auf und sind somit für die intravenöse Applikation in *in vivo*-Anwendung in der PET/CT geeignet. Für $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ nahm die Lipophilie mit zunehmender Anzahl GE11-Einheiten zu, wobei $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-2}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ mit $\log_{D(7.4)}$ -Werten von -3.79 ± 0.04 bis -2.17 ± 0.21 dennoch eher hydrophil sind. Aufgrund der hohen Hydrophilie wird primär eine renale Ausscheidung und folglich eine geringe Aufnahme des Radiotracers in die Leber erwartet. Die geringe Leberaufnahme würde die Bildgebung von Leberkarzinomen ermöglichen, bei welchen in 68% der Fälle eine EGFR-Überexpression vorliegt.^[34-36]

3.3.4 Internalisierungsrate

Um die EGFR-spezifische Aufnahme der synthetisierten Liganden zu bestimmen, wurden *in vitro*-Internalisierungsassays durchgeführt. Hierzu wurde die EGFR-überexprimierende humane Plattenepithelkarzinomzelllinie A431, eine aus der Literatur bekannte Modellzelllinie zur Beurteilung von EGFR-Inhibitoren, verwendet.^[219-220] Zur Quantifizierung der EGFR-vermittelten Aufnahme wurden ca. $1 \cdot 10^6$ A431-Zellen mit 50 pmol [^{68}Ga]Ga-4 – [^{68}Ga]Ga-14 bei 37°C für 1 h in der Abwesenheit und Anwesenheit eines 100-fachen Überschusses an hEGF inkubiert. Oberflächengebundenes und internalisiertes Peptid wurden im Gammazähler bestimmt, wobei drei unabhängige Bestimmungen für jede Substanz durchgeführt wurden. Für die synthetisierten Radioliganden [^{68}Ga]Ga-4 – [^{68}Ga]Ga-14 wurde eine Internalisierung von $0.04\% \pm 0.01\%$ bis $0.14\% \pm 0.03\%$ gefunden. Hierbei konnte keine signifikante Reduzierung der Aufnahme durch die Blockierung mit hEGF gemessen werden. Zur Validierung des Assays wurde zusätzlich der kommerziell verfügbare Iod-radiomarkierte endogene Ligand, [^{125}I]I-hEGF, unter identischen Bedingungen getestet, wobei die gemessene Internalisierung von $24.5\% \pm 0.9\%$ des [^{125}I]I-hEGF nach einer Stunde bei 37°C auf $1.4\% \pm 0.3\%$ durch die Blockierung mit hEGF reduziert werden konnte. Insgesamt wurden $33.6\% \pm 0.6\%$ des gesamten [^{125}I]I-hEGF membrangebunden und internalisiert, während sich die membrangebundene und internalisierte Menge [^{125}I]I-hEGF durch die Blockierung mit hEGF auf $1.9\% \pm 0.2\%$ reduzieren ließ. Dies bestätigt das Ergebnis, dass keiner der Radioliganden [^{68}Ga]Ga-4 – [^{68}Ga]Ga-14 eine EGFR-vermittelte Aufnahme in A431-Zellen oder eine Bindung an die Membran aufweist.

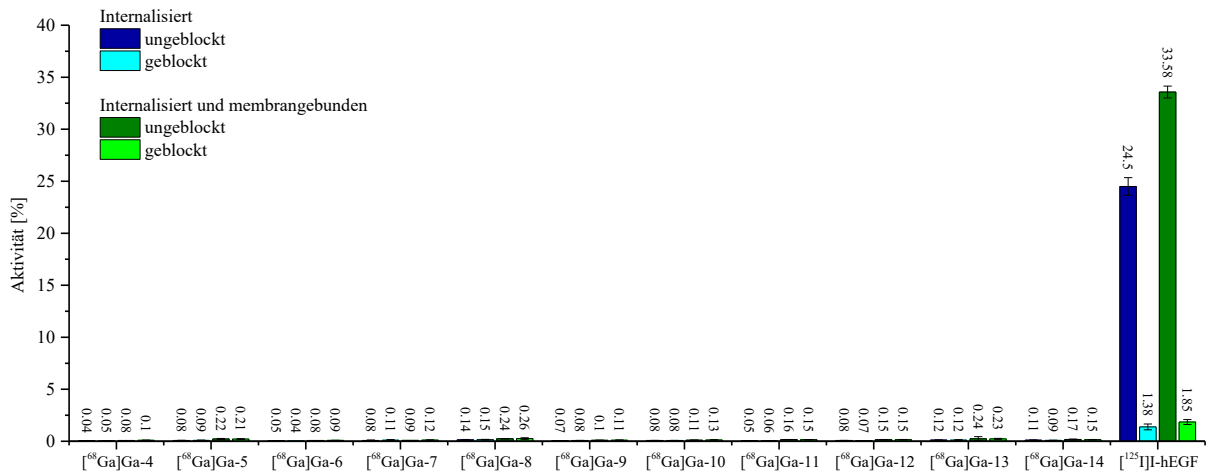


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Internalisierungsrate und der Menge an membrangebunden und internalisierten radiomarkierten Substanzen [⁶⁸Ga]Ga-4 – [⁶⁸Ga]Ga-14 und [¹²⁵I]I-hEGF.

Tabelle 13: Internalisierungsrate und Rate an membrangebunden und internalisierten radiomarkierten Substanzen [⁶⁸Ga]Ga-4 – [⁶⁸Ga]Ga-14 und [¹²⁵I]I-hEGF.

Produkt	Internalisiert		Membranegebunden und internalisiert	
	Ungeblockt [%]	Geblockt [%]	Ungeblockt [%]	Geblockt [%]
[⁶⁸ Ga]Ga-4	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.00	0.10 ± 0.02
[⁶⁸ Ga]Ga-5	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.22 ± 0.05	0.21 ± 0.04
[⁶⁸ Ga]Ga-6	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.01
[⁶⁸ Ga]Ga-7	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.02
[⁶⁸ Ga]Ga-8	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.08
[⁶⁸ Ga]Ga-9	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02
[⁶⁸ Ga]Ga-10	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02
[⁶⁸ Ga]Ga-11	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01
[⁶⁸ Ga]Ga-12	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02
[⁶⁸ Ga]Ga-13	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.24 ± 0.2	0.23 ± 0.05
[⁶⁸ Ga]Ga-14	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.02
[¹²⁵ I]I-hEGF	24.50 ± 0.85	1.38 ± 0.28	33.58 ± 0.57	1.85 ± 0.24

Dieses Ergebnis war insofern nicht erwartbar, weil zu jeder der Substanzen mindestens in einer Veröffentlichung eine Interaktion des jeweiligen Liganden mit dem EGFR postuliert wurde.^[52-86] Jedoch trifft ein Großteil der Studien nur eine qualitative Aussage zur EGFR-medierte Aufnahme und die Bindung der Liganden an den EGFR wurde nicht quantifiziert. Auch für die Teilsequenzen des hEGF, [⁶⁸Ga]Ga-11 – [⁶⁸Ga]Ga-13, konnte keine Internalisierung oder Bindung an die Membran der A431-Zellen gezeigt werden. Entsprechend kann anhand der Ergebnisse der Zellaufnahme-Assays keiner der untersuchten Substanzen eine Eignung als Radiopharmakon zum EGFR-spezifischen Bildgebung mittels PET zugesprochen werden.

3.3.5 Bindungsaffinität

Um die Ergebnisse der Internalisierungsstudien zu bestätigen und zusätzlich die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der jeweiligen Substanz zu bestimmen, wurden in kompetitiven Verdrängungsstudien an A431-Zellen die EGFR-Affinitäten der Präkursoren **1** – **14** gegen [^{125}I]I-hEGF, für das Heterodimer **3** und die jeweiligen teilgescrambleten Analoga **26** und **28** zusätzlich die Bindungsaffinitäten an den Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor auf U87MG-Zellen gegen [^{125}I]I-Echistatin^[243-244] bestimmt. Als Referenzen dienten hEGF für die A431-Zellen und c(RGDfK) für die U87MG-Zellen.

Die kompetitiven Verdrängungsstudien wurden jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen, entweder A431 oder U87MG, mit einer steigenden Konzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ M bis $1 \cdot 10^{-3}$ M für **1** – **14**, **26** und **28** mit [^{125}I]I-hEGF (A431) oder [^{125}I]I-Echistatin (U87MG) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Referenz hEGF wurde in Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-10}$ M bis $1 \cdot 10^{-6}$ M an die A431-Zellen und c(RGDfK) in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-8}$ M bis $5 \cdot 10^{-5}$ M an den U87MG-Zellen getestet. Die an den Zellen gebundene Aktivität wurde im Gammazähler gemessen und daraus wurde der IC_{50} -Wert der jeweiligen Substanz mittels nonlinearer Regressionsanalyse berechnet.

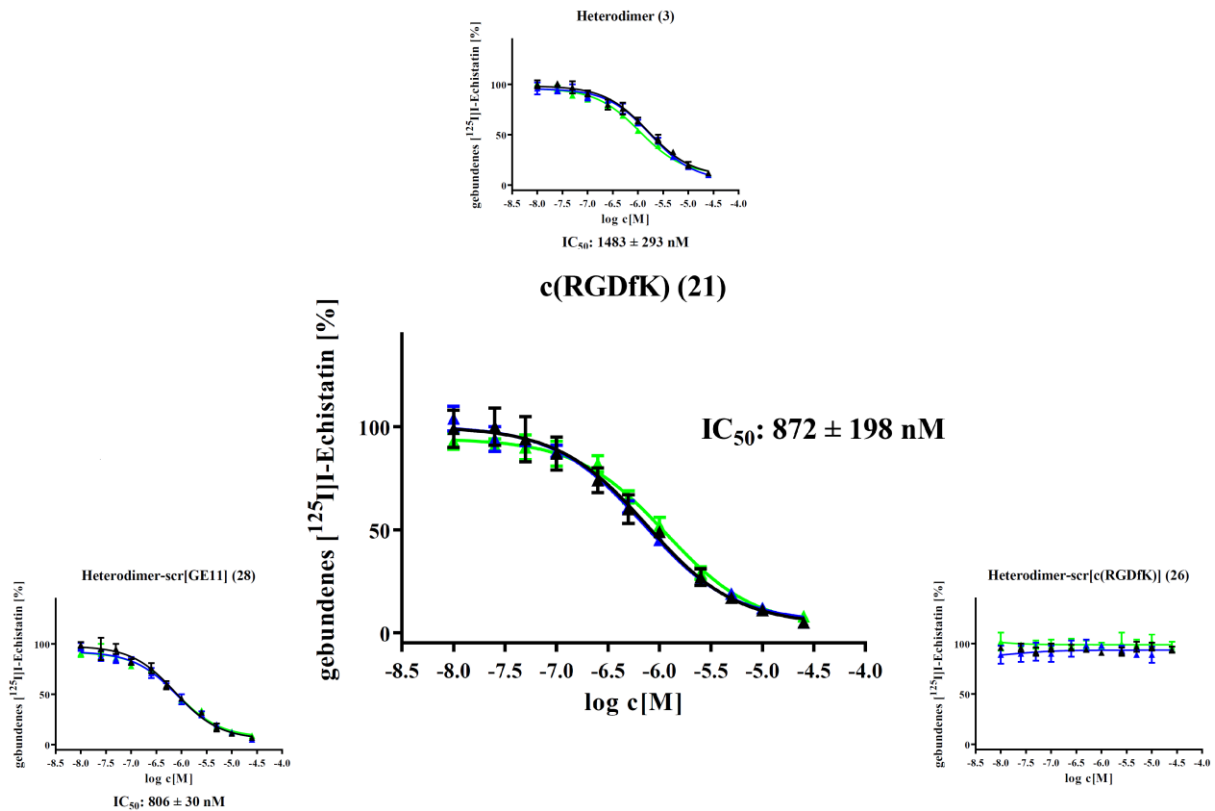


Abbildung 30: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudien an U87MG-Zellen: **3**, **26**, **28** und Referenzligand c(RGDfK).

Dem Heterodimer **3** konnte ein IC₅₀-Wert von 1483 ± 293 nM und dem Heterodimer mit der gescrembelten GE11-Einheit **28** ein IC₅₀-Wert von 806 ± 30 nM nachgewiesen werden. Für das Heterodimer mit der gescrembelten c(RGDfK)-Einheit **26** konnte hingegen keine Affinität gegenüber den U87MG-Zellen beobachtet werden. Dies bestätigt den erwarteten starken Affinitätsverlust durch die Veränderung der c(RGDfK)-Einheit, welche bei U87MG-Zellen den Großteil der Gesamtbindungsstärke ausmachen sollte. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass U87MG-Zellen auch den EGFR in geringerem Maß exprimieren.^[222] Somit entsprechen die Bindungsstärken insofern nicht den Erwartungen, als dass eine Bindung des zweiten Liganden die Gesamtaffinität des Radiotracers erhöhen müsste. So müsste **3**, durch die zusätzliche Bindung der GE11-Einheit an die Zelle, eine bessere Avidität an die Zellen als **28** aufweisen, selbst wenn der EGFR auf U87MG-Zellen nicht überexprimiert vorliegt. Durch die Veränderung der GE11-Einheit sollte also eine Abnahme der Avidität des Heterodimers verursacht werden. Gefunden wurde jedoch ein niedriger IC₅₀-Wert von 806 ± 30 nM für das Heterodimer mit der gescrembelten GE11-Einheit **28**, verglichen mit dem IC₅₀-Wert des Heterodimer **3** von 1483 ± 293 nM.

Um zu bestätigen, dass der Bindungsassay grundsätzlich zur Beurteilung der Bindungsaffinität geeignet ist, wurden die Referenzliganden hEGF gegen [¹²⁵I]-hEGF, als auch c(RGDfK) gegen [¹²⁵I]-Echistatin an U87MG-Zellen getestet. c(RGDfK) wies einen IC₅₀-Wert von 872 ± 198 nM auf, was um den Faktor 2 höher ist, als in der Literatur angegeben.^[210-211] Hierbei ist der IC₅₀-Wert des c(RGDfK) geringer als der des Heterodimers **28**, was durch positive Eigenschaften des Linkers oder des Chelators entstanden sein kann. hEGF wies einen IC₅₀-Wert von 1.0 ± 0.3 nM auf, wodurch auch gezeigt wurde, dass der EGFR auf U87MG-Zellen exprimiert wird, wobei [¹²⁵I]-hEGF maximal zu ca. 80% an die Zellen gebunden vorlag.

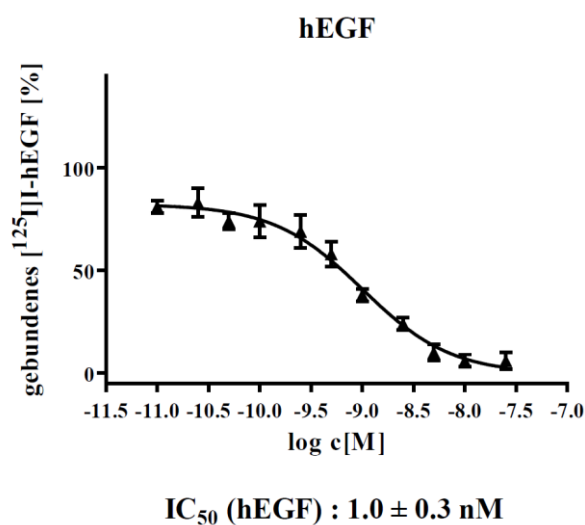


Abbildung 31: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudie von hEGF gegen [¹²⁵I]-hEGF an U87MG-Zellen.

Insgesamt lässt sich aus den Bindungsassays schließen, dass das Heterodimer **3** über die c(RGDfK)-Einheit spezifisch an U87MG-Zellen bindet.

Da postuliert wurde, dass GE11 möglicherweise erst in multivalenter Form (als Nanopartikel, Polymer, Liposom etc.^[71,245-248]) eine ausreichend hohe Affinität an EGFR-überexprimierende Zellen aufweist, wurde mit dem GE11-Monomer **4**, dem Homodimer **1**, dem Homotetramer **2** und dem Heterodimer **3** die Bindungsaffinität der GE11-Einheit in multivalenter Form an den EGFR auf A431-Zellen evaluiert.

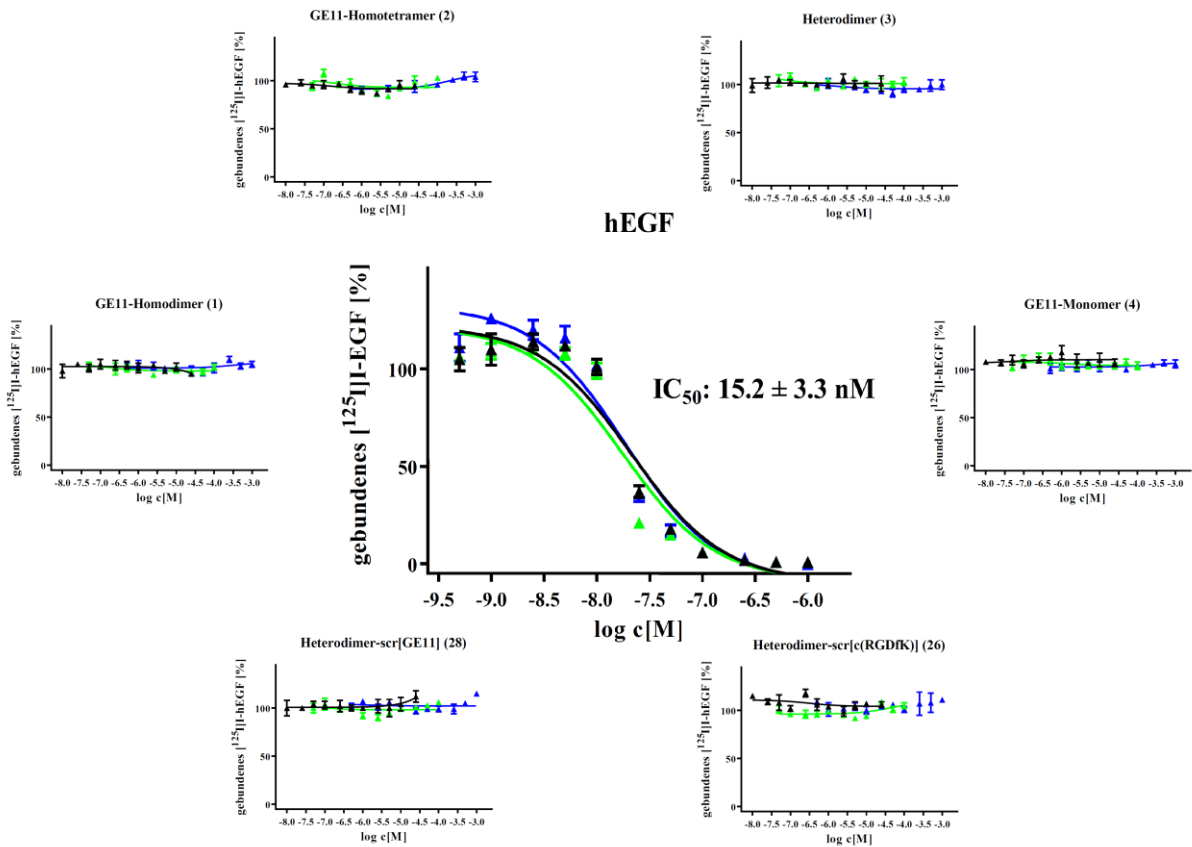


Abbildung 32: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudien von 1 – 4, 26, 28 und endogenem Referenzligand hEGF gegen $[^{125}\text{I}]\text{-hEGF}$ an A431-Zellen.

Für das GE11-Monomer **4** konnte keine Affinität gegenüber A431-Zellen gemessen werden. Auch konnte keine messbare Zunahme der Affinität durch eine bzw. drei weitere GE11-Einheiten bei dem Homodimer **1** bzw. Homotetramer **2** herbeigeführt werden. Da das Heterodimer **3** bereits keine Affinität gegenüber A431-Zellen aufwies, konnte durch die Veränderung der GE11-Einheit **28** auch kein Affinitätsverlust gemessen werden. Eine Veränderung der c(RGDfK)-Einheit **26** sorgte ebenfalls für keine Abnahme der Affinität. Das Maß an Integrin- $\alpha\text{v}\beta_3$ -Rezeptorexpression auf A431-Zellen scheint somit, wie bereits in der Literatur beschrieben, gering zu sein^[249], sodass keine signifikante Bindung der c(RGDfK)-Einheit des Heterodimers **3** an die Zellen zustande kommt.

Zur Validierung der Ergebnisse an den A431-Zellen wurden die Verdrängungsexperimente wiederum mit dem endogenen EGFR-Liganden hEGF wiederholt und es wurde mit einem IC_{50} -Wert von $15.2 \pm 3.3 \text{ nM}$ eine sehr hohe Affinität des hEGF gegenüber dem EGFR nachgewiesen (Lit.: $5.1 - 13.0 \text{ nM}$ ^[71,250-251]). Somit beweist die Referenz, dass tatsächlich keine Bindungsaffinität der GE11-Einheit gegenüber den A431-Zellen vorherrscht. Dies entspricht

Hypothesen aus der Literatur, in welcher der GE11-Einheit eine EGFR-bindende Eigenschaft und eine Verdrängung durch [¹²⁵I]I-hEGF abgesprochen werden.^[77,252]

Diese Annahme erklärt auch die vorherigen Ergebnisse der Bindungskurven des Heterodimers **3** an U87MG-Zellen. Da die GE11-Einheit keine messbare Affinität gegenüber dem EGFR vorweist, konnten auch keine Verbesserung der Gesamtaffinität des Heterodimers **3**, verglichen mit dem Referenzliganden, dem c(RGDfK), und keine bessere Avidität als das Heterodimer mit gesramblerter GE11-Einheit **28** festgestellt werden, da – wenn überhaupt – keine zeitgleiche Bindung der beiden Liganden von **3** stattfand.

Um mögliche Einflüsse des *N*-terminalen verknüpften Linkers und Chelators auf die Bindungsaffinität auszuschließen, wurde der Ligand GE11 auch ohne Funktionalisierung MIT peg-Linker und Chelator gegen [¹²⁵I]I-hEGF auf A431-Zellen getestet. Hierbei konnte dem reinen GE11 auch keine Bindungsaffinität nachgewiesen werden.

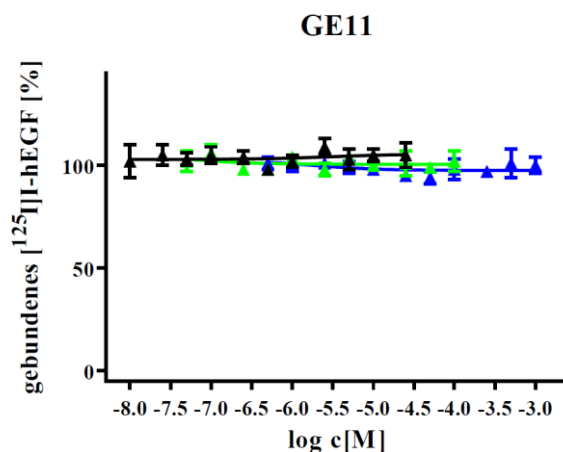


Abbildung 33: Ergebnisse der kompetitiven Verdrängungsstudien von unfunktionalisiertem GE11 gegen [¹²⁵I]I-hEGF an A431-Zellen.

Die restlichen Liganden **5** – **14** wurden auch bei Konzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ M bis $1 \cdot 10^{-3}$ M an A431-Zellen getestet, wobei auch diese Versuche mit hEGF als Referenz durchgeführt wurden.

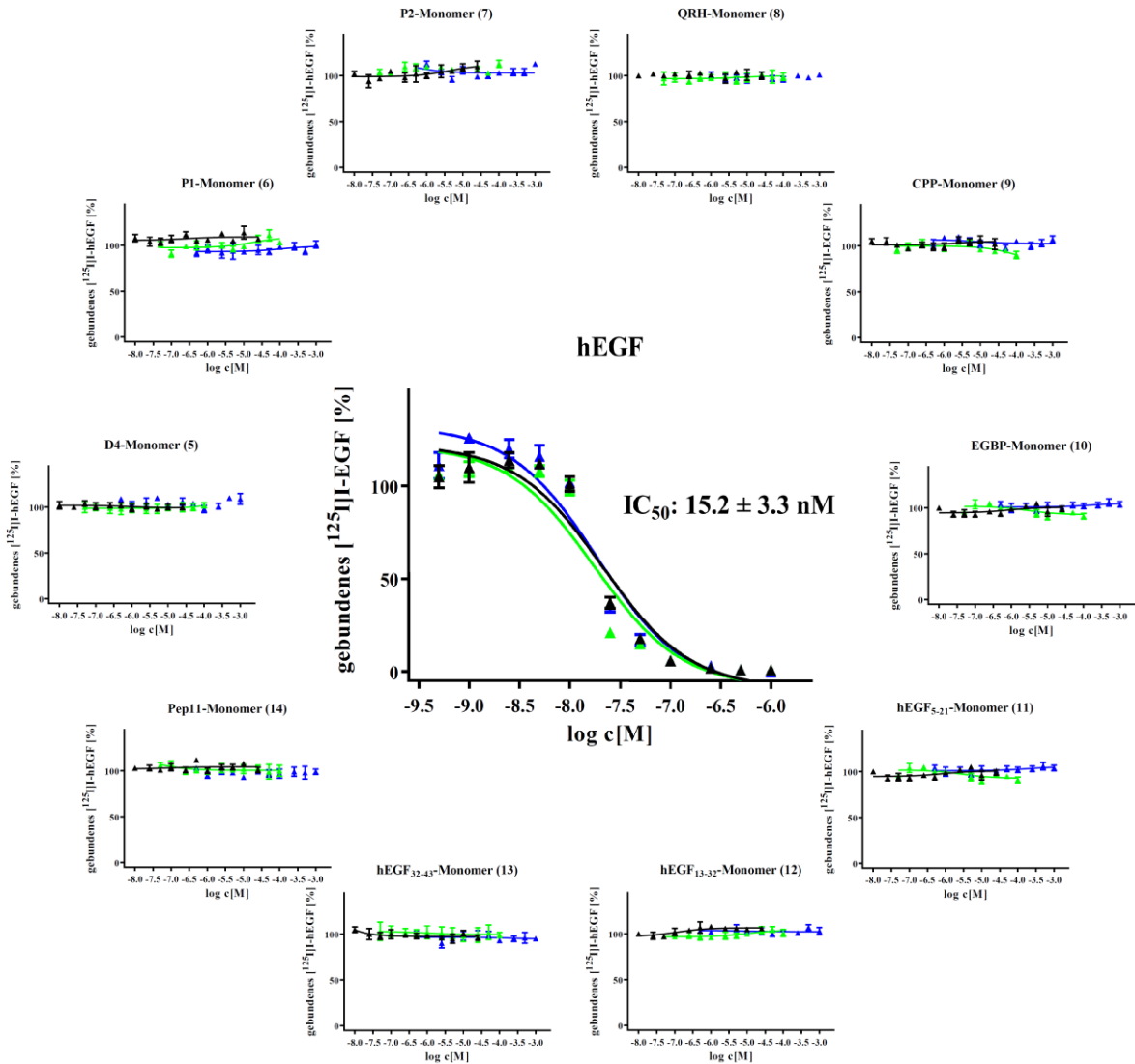


Abbildung 34: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudien an A431-Zellen: 5 – 14 und Referenzligand hEGF.

Keiner der Liganden zeigte eine EGFR-spezifische Bindung oder eine Affinität gegenüber A431-Zellen bis zu einer Konzentration von 1 mM. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse aus den Internalisierungsassays. Wie zuvor erwähnt wurden diese Ergebnisse dennoch nicht erwartet, weil für die Substanzen GE11, D4, P1, P2, QRH, CPP, EGBP und Pep11 jeweils mindestens in einer Veröffentlichung eine Interaktion mit dem EGFR postuliert wurde. So wurde zum Beispiel dem GE11 eine Dissoziationskonstante (K_D) von 22 nM an den EGFR in SMMC-7721-Zellen zugewiesen.^[74] Die meisten Studien trafen jedoch nur eine qualitative Aussage, die Aufnahme der Liganden wurde nur partiell geblockt und die Bindungsstärken der Liganden an den EGFR wurden nicht quantifiziert. Dies lässt bereits eine

limitierte Eignung und die Unfähigkeit der Liganden den EGFR spezifisch zu adressieren erahnen.

Des Weiteren konnten auch die Ergebnisse des Internalisierungsassays für die Teilsequenzen des hEGF, [⁶⁸Ga]Ga-**11** – [⁶⁸Ga]Ga-**13**, bestätigt und keine Affinität gegenüber A431-Zellen gezeigt werden. Anhand der Bindungsaffinitäten kann dementsprechend keiner der untersuchten Substanzen eine Eignung als Basis für die Entwicklung EGFR-spezifischer PET-Radiopharmaka zugesprochen werden.

Mit dieser Arbeit konnte eine Vielzahl von literaturbekannten Liganden an den EGFR für zukünftige Untersuchungen nach EGFR-spezifischen Liganden für den Einsatz in der PET/CT erfolgreich ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Funktionalisierung über einen PEG₅-Linker und ein *bis*-amino-Dendron die Bindung der einzelnen Bindeeinheiten an den jeweiligen Ziel-Rezeptor erlaubt. Dies veranschaulichte die Bindung der c(RGDfK)-Einheit des Heterodimers **3** an U87MG-Zellen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Multivalente Peptide

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob durch Multivalenz eine Verbesserung der Bindungsaffinität des vielpublizierten GE11-Liganden an Tumorzellen erreicht werden kann. Dazu wurden Kombinationen des Peptids GE11 und c(RGDfK) mit dem Linker PEG₅ über ein *bis*- bzw. *tetra*-amino-Dendron und dem Chelator NODA-GA funktionalisiert und als GE11-Homodimer **1**, GE11-Homotetramer **2** und GE11-c(RGDfK)-Heterodimer **3** erfolgreich synthetisiert. In *in vitro*-Untersuchungen konnten die Radiomarkierungsbedingung, Stabilität in humanem Serum, Lipophilie und Bindungsaffinität zum EGFR an A431-Zellen und für das Heterodimer **3** zusätzlich zu m Integrin $\alpha_v\beta_3$ an U87MG-Zellen bestimmt und mit dem GE11-Monomer **4** verglichen werden.

Chen et al. führten bereits Versuche an einem Heterodimer aus c(RGDfK) und GE11 durch, welche über einen Cystein-Linker an NOTA gebunden waren. In *in vivo*-Untersuchungen an NCI-H292 tumortragenden Xenograft-Mäusen konnte zwar eine rezeptormediierte Aufnahme über beide Rezeptoren gezeigt werden, wobei allerdings das ⁶⁸Ga-markierte Heterodimer mit einer geringen Akkumulation im Tumor für den Einsatz in der Bildgebung ungenügende Ergebnisse lieferte.^[75]

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten für den synthetisierten GE11-c(RGDfK)-heterodimeren Liganden **3** für die Bildgebung unzureichende Ergebnisse hinsichtlich Rezeptorspezifität und Bindung erreicht werden. Es konnte keine Beurteilung der zu erwartenden Eigenschaften der Multivalenz erfolgen, da die GE11-Einheit keine Bindungsaffinität gegenüber dem EGFR aufwies und sich die entwickelten radiomarkierten Verbindungen somit nicht zur Untersuchung in *in vivo*-Studien mittels PET/CT-Bildgebung eigneten. Weder das Heterodimer **3** noch die Multimere der GE11-Einheit **1** und **2** verursachten eine messbare Zunahme der Affinität durch eine bzw. drei weitere GE11-Einheiten, verglichen mit dem Monomer **4**. Die Ergebnisse der Synthese und Charakterisierung der multivalenten Liganden sind in den Tabellen 14 und 15 zusammengefasst:

Tabelle 14: Zusammenfassung: Synthese und Charakterisierung der Liganden [⁶⁸Ga]Ga-1 – [⁶⁸Ga]Ga-4.

Produkt	Synthese	Radiomarkierung		Serumstabilität	Lipophilie
	max. Ausbeute Präkursor [%]	Rad. Reinheit [%]	Mol. Aktivität [GBq/μmol]	Intakter Radiotracer nach 90 min in humanem Serum [%]	log _{D(7.4)}
[⁶⁸ Ga]Ga-1	33	98	81	48.7 ± 2.4	-2.52 ± 0.03
[⁶⁸ Ga]Ga-2	25	97	111	28.8 ± 6.4	-2.17 ± 0.21
[⁶⁸ Ga]Ga-3	72	99	104	80.5 ± 0.7	-3.79 ± 0.04
[⁶⁸ Ga]Ga-4	57	98	88	83.0 ± 0.8	-3.44 ± 0.08

Tabelle 15: Zusammenfassung: *In vitro*-Charakterisierung der Liganden **1 – 4**, **21**, **26**, **28** und hEGF.

Produkt	Bindungsassay	
	IC ₅₀ [nM] U87MG	IC ₅₀ [nM] A431
1	n.A.	n.A.
2	n.A.	n.A.
3	1483 ± 293	n.A.
4	n.A.	n.A.
26	n.A.	n.A.
28	806 ± 30	n.A.
c(RGDfK)	872 ± 198	n.A.
hEGF	1.0 ± 0.3	15 ± 3.3

Lediglich die Lipophilie und die postulierte bessere Stabilität von Multimeren in humanem Serum konnten daher beurteilt werden. Die Lipophilie nahm mit zunehmender Anzahl an GE11-Einheiten zu, wobei alle Substanzen mit log_{D(7.4)}-Werten von -3.79 ± 0.04 bis -2.17 ± 0.21 hydrophil sind und sich somit für die nicht-invasive Bildgebung mittels PET/CT eignen würden. Für die Stabilität konnte genau das Gegenteil dessen was postuliert wurde, beobachtet werden. Das Homodimer **1** als auch das Homotetramer **2** wiesen eine geringere Serumstabilität als das Monomer **4** auf. Da die Serumstabilität mit zunehmender Anzahl an GE11-Einheiten abnahm, könnte dies möglicherweise daran liegen, dass das Homodi- und Homotetramer mehr potentielle Angriffsstellen für Peptidasen liefern. Bei multivalenten Liganden geht der Verlust einer einzelnen Einheit üblicherweise nicht mit dem Verlust der gesamten Bindungsstärke einher, da die bestehenden weiterhin intakten Einheiten noch die Möglichkeit haben eine Bindung einzugehen. Dies konnte insofern gezeigt werden, als dass das Heterodimer **3**, trotz einer inaktiven zweiten Einheit, mit der c(RGDfK)-Einheit binden konnte.

Folglich eignete sich keines der untersuchten multivalenten Peptide für *in vivo*-PET/CT-Bildgebung EGFR-positiver Tumoren.

4.1.1 Synthese von Peptidverbindungen auf Ultraschallbasis

Ein Unterziel der vorliegenden Arbeit war die Beurteilung, ob die Verwendung von Ultraschallbädern grundsätzlich zur Optimierung von Synthesen Anwendung finden können. Es wurde ein handelsübliches Ultraschallbad benutzt. Die Synthese des Heterodimers **3** und all seiner Bestandteile wurde sowohl im Ultraschallbad als auch mit mechanischem Schütteln durchgeführt. Die Ergebnisse der Synthesen sind in Tabelle der 16 zusammengefasst:

Tabelle 16: Zusammenfassung von den Ergebnissen der Synthesen des Heterodimers **3** und seiner Bausteine **15**, **17**, **20**, **21** und **22**.

Produkt	Reaktionsweg	Reagenzüberschuss pro Kupplungsschritt [Äq.]	Summe der Reaktionszeit der Kupplungen [min]	Ausbeute [%]
15	Mechanisch	4	330	45 ± 3
15	Ultraschall	2	90	78 ± 6
17	Mechanisch	4 (8 für <i>bis</i> -NHS-PEG ₅)	720	46 ± 12
17	Ultraschall	2 (5 für <i>bis</i> -NHS-PEG ₅)	180	26 ± 7
20	Mechanisch	4	240 (+ 960 min Cyclisierung)	56 ± 7
20	Ultraschall	2	60 (+ 60 min Cyclisierung)	64 ± 7
21	Mechanisch	1.3	60	38 ± 8
21	Ultraschall	1.3	15	43 ± 8
22	Mechanisch	0.6	90	25 ± 7
22	Ultraschall	0.6	30	39 ± 2
3	Mechanisch	4	90	48 ± 2
3	Ultraschall	2	60	64 ± 8

Alle Verbindungen konnten mit mechanischem Schütteln und mit Verwendung von Ultraschall erfolgreich synthetisiert werden. Die ultraschallgestützten Synthesen benötigten am Harz immer einen geringeren Reagenzüberschuss und gingen trotzdem mit einer Verbesserung der Ausbeute einher. Der NHS-Ester **17** bildet dabei eine Ausnahme, da es bei der Verwendung von Ultraschall zu einer erhöhten Menge an intermolekularer Querverknüpfung am Harz kam. So verlief die Kupplung mit mechanischen Schütteln mit einer Ausbeute von 46 ± 12% Produkt und 15 ± 5% Dimer, während bei der ultraschallgestützten Synthese zu 26 ± 7% Produkt bei bis zu 42 ± 7% Dimer isoliert wurden. Bei der analogen Synthese von **21** in Lösung wurden beim mechanischen Schütteln Ausbeuten von 38 ± 8% Produkt und 13 ± 4% Dimer erreicht; bei der ultraschallgestützten Synthese wurden 43 ± 8% Produkt bei nur 7 ± 2% Dimer erhalten. Da es bei der Synthese am Harz in vermehrtem Maß zur Dimerisierung kam, kann die erzwungene räumliche Nähe, die durch das Harz geschaffen wird, als begünstigender Faktor zur Dimerisierung gesehen werden.

Zusätzlich konnte bei der Synthese mit Ultraschall durchweg eine verringerte Reaktionsdauer festgestellt werden. Der Verlauf der Kupplungen von **3**, **21** und **22** wurde mittels analytischer HPLC überwacht, um den Zeitpunkt des vollständigen Umsatzes der Edukte zu bestimmen, wobei mindestens eine Verminderung der Reaktionszeit um den Faktor 1.5 gemessen werden konnte. Bei der Synthese am Harz konnten die Reaktionszeiten um mindestens einen Faktor 3 reduziert werden, mit gleicher oder sogar besserer Ausbeute. Hierbei wurden bereits noch stärkere Verkürzungen von der Reaktionszeit einzelner Kupplungen bei SPPS – bis zu einem Faktor von 7 – bei gleichbleibender Ausbeute postuliert.^[167]

Sowohl die Kupplungen am Harz (**15**, **17** und **20**), die Verknüpfung in Lösung (**3**, **21** und **22**), als auch die Cyclisierungen (**20**) konnten im Ultraschallbad durchgeführt werden. Diese Ergebnisse reihen sich mit der Erkenntnis ein, dass Ultraschall auch bei der Abspaltung von Schutzgruppen und der Abspaltung vom Harz die Reaktionszeit deutlich verringern kann.^[168] Somit begrenzt sich die Verwendung von Ultraschall nicht rein auf die Kupplungen von Aminosäuren oder gar Peptidsynthese, sondern kann vielseitig zur Verbesserung von Reaktionszeit, benötigter Menge an Reagenzien und der Ausbeute beitragen.

4.2 Liganden für die Bildgebung von EGFR-überexprimierenden Läsionen

Die Eignung einiger der prominentesten literaturbekanntesten EGFR-spezifischen und von drei neuen Peptiden als potentielle PET-Radiopharmaka zur EGFR-spezifischen PET/CT-Bildgebung konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit aufschlussgebend bewertet werden. Die acht literaturbekanntesten Peptide GE11, D4, P1, P2, CPP, QRH, EGBP und Pep11 und drei Teilstrukturen des hEGF, EGF₅₋₂₁, EGF₁₃₋₃₂, EGF₃₂₋₄₃, als neue Peptide wurden erfolgreich synthetisiert und mit dem Linker PEG₅ und dem Chelator NODA-GA funktionalisiert. Die Radiomarkierung der so erhaltenen Präkusoren konnte etabliert werden und in *in vitro*-Untersuchungen konnten die Stabilität in humanem Serum, Lipophilie, Bindungs- und Internalisierungsrate in A431-Zellen und Bindungsaffinitäten gegenüber derselben Zelllinie der jeweiligen Substanzen bestimmt werden. Für A431-Zellen konnte für keine der literaturbekanntesten Substanzen eine Tumorzellaufnahme oder Affinität in Bindungsstudien an den EGFR festgestellt werden. Während die verkürzten Liganden des hEGF, EGF₅₋₂₁, EGF₁₃₋₃₂, EGF₃₂₋₄₃, eine bessere Serumstabilität als der endogene Ligand – für hEGF wurde eine HWZ

von 17 min in humanem Serum dokumentiert^[253] – aufwiesen, verloren auch sie die Fähigkeit mit hoher Affinität an den EGFR zu binden.

Tabelle 17: Zusammenfassung von den Ergebnissen der Synthese, ⁶⁸Ga-Radiomarkierung und Charakterisierung der Liganden [⁶⁸Ga]Ga-4 – [⁶⁸Ga]Ga-14.

Produkt	Synthese	Radiomarkierung		Serumstabilität	Lipophilie
	max. Ausbeute Präkursor [%]	Rad. Reinheit [%]	Mol. Aktivität [GBq/μmol]	Produkt nach 90 min in humanem Serum [%]	log _D (7.4)
[⁶⁸ Ga]Ga-4	57	98	88	83.0 ± 0.8	-3.44 ± 0.08
[⁶⁸ Ga]Ga-5	74	99	41	98.1 ± 1.2	-3.51 ± 0.22
[⁶⁸ Ga]Ga-6	59	100	25	98.5 ± 3.2	-3.92 ± 0.09
[⁶⁸ Ga]Ga-7	21	100	28	97.0 ± 2.4	-4.01 ± 0.13
[⁶⁸ Ga]Ga-8	50	100	48	98.5 ± 0.6	-3.91 ± 0.06
[⁶⁸ Ga]Ga-9	49	100	42	91.8 ± 3.3	-3.86 ± 0.11
[⁶⁸ Ga]Ga-10	39	100	69	38.2 ± 1.7	-3.03 ± 0.20
[⁶⁸ Ga]Ga-11	22	99	54	n.A.	-3.16 ± 0.11
[⁶⁸ Ga]Ga-12	5	93	32	n.A.	-2.93 ± 0.08
[⁶⁸ Ga]Ga-13	11	99	36	83.9 ± 1.2	-3.92 ± 0.09
[⁶⁸ Ga]Ga-14	54	100	30	84.9 ± 0.9	-3.98 ± 0.06

Tabelle 18: Zusammenfassung von den Ergebnissen der *in vitro*-Charakterisierung der Liganden [⁶⁸Ga]Ga-4 – [⁶⁸Ga]Ga-14.

Produkt	Zellbindungsassay (internalisiert + membrangebunden)		Bindungsassay mit dem Präkursor
	Ungeblockt [%]	Geblockt [%]	IC ₅₀ [nM] A431
[⁶⁸ Ga]Ga-4	0.08 ± 0.00	0.10 ± 0.02	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-5	0.22 ± 0.05	0.21 ± 0.04	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-6	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.01	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-7	0.09 ± 0.00	0.12 ± 0.02	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-8	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.08	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-9	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-10	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.02	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-11	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-12	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-13	0.24 ± 0.2	0.23 ± 0.05	n.A.
[⁶⁸ Ga]Ga-14	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.02	n.A.
[¹²⁵ I]I-hEGF	33.58 ± 0.57	1.85 ± 0.24	15 ± 3.3

Mit dieser Arbeit kann der Großteil an literaturbekannten Liganden für den EGFR von der Entwicklung als Basis EGFR-spezifischer Radiopharmaka für die Darstellung EGFR-positiver Tumoren mittels PET/CT ausgeschlossen werden.

Zur Weiterführung der Forschung nach einem peptidischen EGFR-spezifischen Radiotracer müssten unbekanntere oder neue Liganden für den EGFR gefunden werden. Hierzu würden die erläuterten Methoden zur Bestimmung neuer Peptide Verwendung finden. Es bleibt jedoch auch die Überlegung, ob sich der EGFR als Target für peptidische Liganden eignet oder eher small molecules oder Antikörper als potentielle Liganden zu untersuchen wären. So kann der

endogene Ligand mit seinen 53 Aminosäuren möglicherweise nicht in einer gekürzten Variante genutzt werden. In Studien wurde bereits durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure (Arg⁴¹ → Ala) eine Verringerung des IC₅₀-Wertes von 13.0 nM auf 26.2 μM festgestellt.^[250] Weiter war auch für mögliche Teilsequenzen des B-Loop eine Verdrängung mit [¹²⁵I]-hEGF nicht durchführbar, da die gekürzten Varianten an anderen Bindungsstellen als der endogene Ligand gebunden haben.^[254] In Internalisierungsassays mit den Teilsequenzen von hEGF konnten in dieser Arbeit allerdings keine Bindung (Membranbindung oder Internalisierung) an A431-Zellen nachgewiesen werden, was andere Bindungsstellen als die des hEGF an den EGFR mit einschließt.

Eine letzte Möglichkeit wäre eine umfangreichere Testung der selektierten Liganden. So könnten die restlichen Peptide, die die Domänen I und III adressieren noch unfunktionalisiert gegen [¹²⁵I]-hEGF getestet werden, um eine mögliche Beeinflussung durch Linker und Chelator auszuschließen. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur mit unfunktionalisiertem GE11 durchgeführt, welches jedoch auch keine Internalisierung oder Bindungsaffinitäten an A431-Zellen aufwies. Letztlich könnten Human-Organ-Chips genutzt werden, um die Bioverteilung der Radiotracer abschätzen zu können. Die Chips versuchen menschliche Organe abzubilden und sollten idealerweise zur Beurteilung der Pharmakokinetik geeignetere Ergebnisse als Zellen liefern können. Die Chips befinden sich nur aktuell noch in der Entwicklung und können bisher nur in sehr seltenen Fällen in der Forschung eingesetzt werden. Tierversuche können sie noch nicht ersetzen.^[255]

5 Experimentalteil

5.1 Verwendete Geräte

HPLC: Die analytische HPLC-, die semipräparative HPLC- und die Radio-HPLC-Analysen wurden mit einem Dionex UltiMate 3000 System (Thermo Scientific) mit der Software Chromeleon (Version 6.80 bzw. 7.1.3) durchgeführt. Für analytische HPLC-Läufe wurde eine Chromolith Performance (RP-18e, 100-4.6 mm, Merck, Deutschland) Säule, für semipräparative HPLC-Läufe eine Chromolith SemiPrep (RP-18e, 100-10 mm, Merck, Deutschland) Säule und für Radio-HPLC-Läufe eine Chromolith Performance (RP-18e, 100-4.6 mm, Merck, Deutschland) Säule zusätzlich mit einem GABI* Radioaktivitätsdetektor (Elysia-raytest) eingesetzt. Zum Schutz der Säulen wurde jeweils eine Chromolith Vorsäule (RP-18e, 10-4.6 mm, Merck, Deutschland) verwendet. Es wurden Wasser (H₂O) + 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) und Acetonitril (MeCN) + 0.1% TFA als Lösemittelsystem bei einer Flussrate von 4 mL/min benutzt, wobei jeweilige Gradienten und Retentionszeiten, als R_t in [min], bei der zugehörigen Synthese angegeben wurden.

MALDI-TOF: Die Spektren der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation wurden mit einem Bruker Daltonics Microflex Spektrometer, im linearen Acquisitionsmodus, mit positiver Ionenquelle und mit 200 Laserimpulsen pro Probenpunkt aufgenommen. Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (α -CS) in H₂O/MeCN (75/25, v/v, 10 mg/mL) oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in H₂O/MeCN (50/50, v/v, 20 mg/mL) verwendet. Die Matrix- und Probenlösung wurden zur Probenvorbereitung vermischt (1/1, v/v), auf die Probenplatte (MSP 96 target polished steel BC) aufgetropft und das Lösungsmittel verdampft (eng. dried-droplet method). Die Spektren wurden mit der Software flexControl Version 3.3 (Build 108) aufgenommen und mit flexAnalysis Version 3.3 (Build 80) ausgewertet.

HR-ESI-MS: Die Elektrospray-Ionisation-Messungen wurden an einem Thermo Finnigan LTQ FT Ultra Fourier Transform Ionen Cyclotron Resonanz Massenspektrometer durchgeführt. Die Auflösung wurde auf 100.000 bei m/z 400 eingestellt. Gemessen wurden probenabhängig Massenbereiche von 50 bis 2000 u. Die Spraykapillarenspannung am IonMax ESI-Kopf betrug 4 kV, die Heizerkapillaren-temperatur 250 °C, der Stickstoff Sheathgasfluss 20 und der Sweepgasfluss 5 Einheiten. Die Fließinjektionsanalyse (FIA/ESI) wurde mit einer

Surveyor MS Pumpe bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit Wasser/Acetonitril (20/80, v/v oder 80/20, v/v) als Laufmittel durchgeführt. 1-10 μL Probenlösung wurden jeweils unter Verwendung eines Inlinefilters injiziert. Die ESI-Messungen wurden von Herrn Dr. Werner Spahl (Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt.

Gefriertrockner: Substanzen wurden mittels einer Alpha 2-4 LDplus (Christ Martin) oder einer LyoQuest (Telstar) Gefriertrockneranlage bei -80°C und 0.25 mbar lyophilisiert.

Gammazähler: Zur Messung von Gammastrahlung in counts per minute [cpm] wurde ein 2480 Wizard²-Gammazähler (PerkinElmer) verwendet.

Ultraschallbad: Die ultraschallunterstützten Synthesen wurden in einem Sonorex Super RK 225 H Ultraschallbad (Bandelin) bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zentrifuge: Eppis (1.5 – 2 mL) wurden in einer MiniSpin (Eppendorf) bei einer Zentrifugendrehzahl von 13 400 rpm ($12\ 100 \times g$), Falcons (15 – 50 mL) in einer 5804R, Rotor A-4-44 (Eppendorf), bei einer Zentrifugendrehzahl von 5 000 rpm ($4\ 400 \times g$) zentrifugiert.

CO₂-Inkubator: Zur Kultivierung von Zellkulturen wurde ein Brutschrank HERAcCell 150i (Thermo Scientific) oder HERAcCell VIOS 160i (Thermo Scientific) genutzt.

pH-Meter: pH-Messungen wurden mit einem SevenMulti S47 (Mettler Toledo) durchgeführt, welches mit Pufferlösungen pH 4.00, 7.00 und 10.00 von Certipur (Merck, Deutschland) kalibriert wurde.

Schüttler: Zur Inkubation von Substanzen in humanem Serum bei 37°C und auch zur Radiomarkierung bei 45°C mit zusätzlichem Schütteln wurde ein Thermomixer comfort (Eppendorf) eingesetzt. Für mechanisch durchgeführte Peptidkupplungen wurde die harzgefüllte Spritze auf einem S20 (CAT) Schüttler fixiert.

Sterilbank: Die Arbeit an Zellkulturen erfolgte in einer Fischer Scientific Safe 2020 Sterilbank, eine Sicherheitswerkbank der Klasse 2.

Waagen: Substanzen wurden mittels einer Mikrowaage CPA 26 P (Sartorius) und einer Analysenwaage CPA 224 S (Sartorius) eingewogen.

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator: [^{68}Ga]GaCl₃ wurde durch die Elution eines GalliaPharm $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator Systems (Eckert & Ziegler) mit 0.1 M Salzsäure (HCl) erhalten.

Aktivimeter: Die Aktivität und Volumenaktivität der radioaktiven Isotopen wurden mit einem ISOMED 2010 von NUVIATech Instruments GmbH bestimmt.

Mikroskop: Das Überwachen der Zellkulturen und Zählen der Zellen, mittels Zählkammer, erfolgte an einem Primo Vert Inversem Lichtmikroskop (Carl Zeiss AG).

Wasserbad: Zellmedium, Bindungsmedium, PBS, FCS etc. wurden in einem Wisd WiseBath Wasserbad (WITEG Labortechnik) erwärmt.

5.2 Verwendete Chemikalien, Lösemittel und Materialien zur chemischen Synthese, Radiomarkierung und *in vitro*-Charakterisierung

Chemische Synthese: Alle Lösungsmittel und Reagenzien wurden in p. a. Qualität erworben und, solange nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung für die Synthesen benutzt. Fmoc- und seitenkettengeschützte Aminosäuren, alle Harze (Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (Beladung 0.30 – 0.65 mmol/g), Fmoc-Ile-Wang Harz LL (Beladung 0.31 – 0.40 mmol/g), Rink Amid Harz (Beladung 0.40 – 0.80 mmol/g), Rink Amid MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g), Fmoc-Asp(NovaSynTGA)-OAll (Beladung 0.18 – 0.21 mmol/g), H-Asp(*t*Bu)-2-chlorotrityl Harz (Beladung 0.73 mmol/g) und 2-Chlorotritylchlorid Harz (Beladung 1.10 mmol/g)) sowie Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) wurden von NovaBiochem (Darmstadt, Deutschland) erworben. *Bis*(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 4,7,10,13,16,19-hexaoxadocosanedioat (*bis*-NHS-PEG₅-ester) wurde von Broadpharm (San Diego, USA), Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) (Pd(PPh₃)₄) von TCI (Eschborn, Deutschland), 15-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecansäure (PEG₃, Fmoc-NH-PEG₃-COOH), 21-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosansäure (Fmoc-NH-PEG₅-COOH) und 2-(*Bis*(3-(((9H-

fluoren-9-yl)methoxy)-carbonylamino)-propyl)-amino)essigsäure Kaliumhemisulfat ((Fmoc-NH-propyl)₂Gly-OH × KHSO₄) von Iris Biotech (Marktredwitz, Deutschland) gekauft. Der Chelator 4-(4,7-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazacyclononan-1-yl)-5-(*tert*-butoxy)-5-oxo-pentansäure (*R*-NODA-GA(*t*Bu)₃) stammte von CheMatech (Dijon, Frankreich). Dichloromethan (DCM), Diethylether, Dimethylformamid (DMF), Piperidin, 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU), Thallium(III)-trifluoroacetat, Triisopropylsilan (TIS), Trifluoressigsäure (TFA), *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) und *L*-Ascorbinsäure wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Acetonitril (HPLC-Qualität) und Wasser (HPLC-Qualität) wurden von Häberle Labortechnik (Lonsee-Ettlenschieß, Deutschland) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) beschafft. Mittels einer Reinstwasseranlage Aquinity² von membraPure wurde zudem Wasser mit HPLC-Qualität erzeugt.

Radiomarkierung: Das benötigte Natriumacetat wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Wasser (Tracepur-Qualität), Salzsäure (30%, Suprapur-Qualität) sowie auch Natriumhydroxid (30%, Suprapur-Qualität) wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben.

Zellen: Die Zelllinie A431 wurde vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland), die Zelllinie U87MG von ATCC (American Type Culture Collection, Wesel, Deutschland) gekauft. Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM), Gibco Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL) als auch Gibco Trypsin-EDTA 0.25% mit Phenolrot wurden von ThermoFisher (Kandel, Deutschland) erworben. Es wurden fötales Rinderserum (FCS) von Bio&Sell (Nürnberg, Deutschland), Ethanol 98.8% sowie Zählkammern C-Chip Neubauer improved von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und schließlich Trypanblau-Lösung 0.4% und Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erstanden.

5.2.1 *In vitro*-Charakterisierung

Serumstabilitätstest: Humanes Serum (vereinigtes Blutserum von koaguliertem Vollblut der Blutgruppe AB von männlichen Spendern) wurde von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

Lipophilie: 1-Octanol, Dinatriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat stammten von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland).

Internalisierungsassay: Für die Durchführung der Internalisierungsassays in Cellstar 24-Well Zellkultur Multiwellplatten von Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) wurden zusätzlich Glycin von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Natriumchlorid und Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA) von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) sowie rekombinantes hEGF von Peprotech (Hamburg, Deutschland) erhalten.

Kompetitive Bindungsstudien: Die Durchführung der kompetitiven Bindungsstudien in den Millipore MultiScreen_{HTS}-BV, 1.2 µm 96-well Filterplatten (Merck, Darmstadt) benötigte Opti-MEM I (GlutaMAX I) von ThermoFisher (Kandel, Deutschland), Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Magnesiumchlorid und Mangan(II)chlorid von VWR (Bruchsal, Deutschland) und Calciumchlorid von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland). [¹²⁵I]-hEGF und [¹²⁵I]-Echistatin mit molaren Aktivitäten von 81.4 TBq/mmol wurden in Auftragssynthese von PerkinElmer (Rodgau, Deutschland) hergestellt.

5.3 Chemische Synthese der EGFR-spezifischen Liganden

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Peptidsynthese (A1)

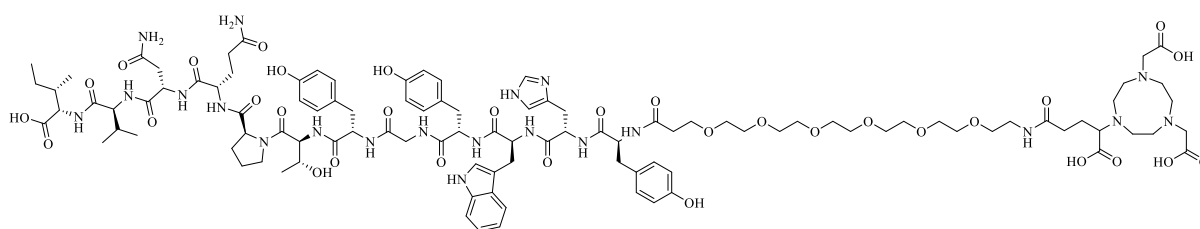
Die Synthese der Peptide wurde an fester Phase nach Fmoc-Standardprotokoll durchgeführt.^[164] Hierzu wurden 5 – 25 mL Spritzen (HSW) mit zwei Lagen 35 µm porösem HDPE-Filter (Polyethylen, hohe Dichte) (Reichert Chemietechnik) versehen und das jeweilige Harz zwischen Filter und Stempel gefüllt. Das Harz wurde für 45 min in DCM gequollen und vor der Synthese auf DMF umgespült. Zur Kupplung der einzelnen Aminosäuren wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: entweder verlief die Kupplung gestützt durch mechanisches Schütteln, oder durch Ultraschall. Die Kupplung der Aminosäuren durch mechanisches Schütteln wurde für 60 min auf einem S20 Schüttler (CAT), bei Raumtemperatur, mit 4 Äq. der jeweiligen Aminosäure und 3.9 Äq. HBTU als Kupplungsreagenz mit 4 Äq. DIPEA als Base zur Aktivierung (2 min) durchgeführt. Die ultraschallgestützte Kupplung der Aminosäuren erfolgte für 15 min in einem Sonorex Super RK 225 H Ultraschallbad (Bandelin) bei Raumtemperatur, 2 Äq. der jeweiligen Aminosäure und 1.9 Äq. HBTU als Kupplungsreagenz mit 2 Äq. DIPEA als Base zur Aktivierung (2 min). Die Fmoc-Schutzgruppe der Amine wurde mit 50% Piperidin

in DMF (v/v) für 2 und 5 min entfernt. Diese Kupplungs- bzw. Entschützungs-schritte wurden, bis zur Komplettierung des Peptids wiederholt. Das Peptid wurde mit TFA, TIS und H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) innerhalb von 3 h bei Raumtemperatur global entschützt und vom Harz abgespalten. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt, das Produkt in 1:1 MeCN/H₂O + 0.1% TFA (v/v) gelöst, mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und anschließend lyophilisiert. Die chemische Reinheit des Produkts wurde stets mittels analytischer HPLC (0-100% MeCN + 0.1% TFA in 5 min) bestimmt.

5.3.1 Synthese des GE11-Mono-, Homodi- und Homotetramers

5.3.1.1 Synthese des GE11-Monomers

NODA-GA-PEG₅-GE11 **4**



4

NODA-GA-PEG₅-GE11 **4** (NODA-GA-PEG₅-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Fmoc-Ile-Wang LL Harz (100-200 mesh, Beladung 0.31 – 0.40 mmol/g, 15.5 μmol) mit Standard *N*_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-NH-PEG₅-COOH, (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ und HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Nach globaler Entschätzung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (*R*_t = 5.42 min, 20–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff hergestellt.

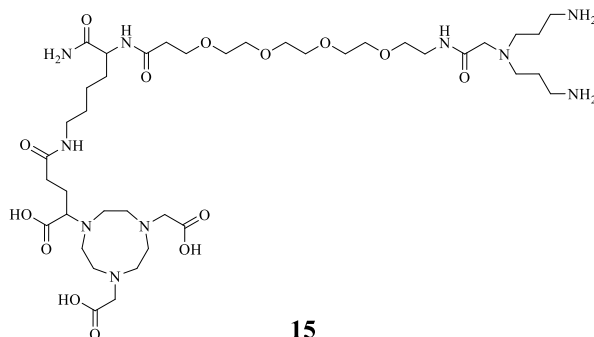
Ausbeute: 50 ± 7% (17.2 ± 2.4 mg), chemische Reinheit: 92.1% (*R*_t = 2.06 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]⁺ (ber.): 2233.76 (2234.07).

HR-ESI-MS (*m/z*): [M+2H]²⁺ (ber.): 1117.5400 (1117.5403), [M-2H]²⁻ (ber.): 1115.5249 (1115.5257), [M-4H+3K]²⁻ (ber.): 1172.5213 (1172.4618).

5.3.1.2 Synthese der verzweigten Grundgerüste

NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15**



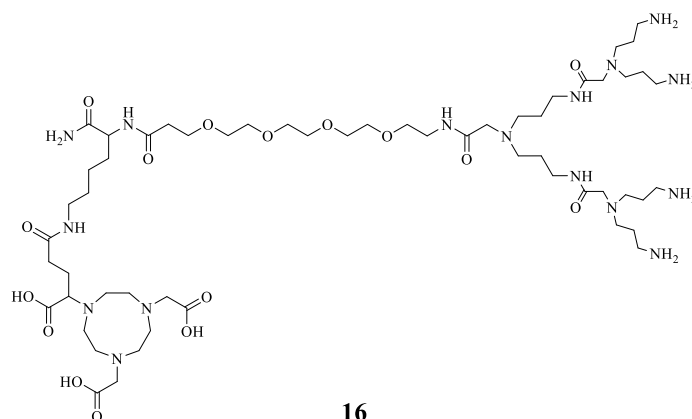
Die Synthese des NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** ($(N_\epsilon$ -NODA-GA- N_α -PEG₃-Gly-*bis*(3-aminopropyl))lysine) wurde auf dem mechanischen Schüttler und im Ultraschallbad an einem Rink Amid Harz (Beladung 0.4 – 0.8 mmol/g, 26.6 μ mol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 mit Standard N_α -Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-PEG₃-OH durchgeführt. Die Entschützung des ϵ -Amins des Lysins erfolgte mit TFA in DCM (1/99, v/v) für 3×15 min, woraufhin das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, v/v) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 53.2 μ mol, 28.9 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 50.5 μ mol, 26.3 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 53.2 μ mol, 9 μ L) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 2.5 h / 30 min (mechanisch / Ultraschall) an das ϵ -Amin gekuppelt. (Fmoc-*NH*-propyl)₂Gly-OH × KHSO₄ (4 Äq., 106.4 μ mol, 81.9 mg / 2 Äq., 53.2 μ mol, 41.0 mg (mechanisch / Ultraschall)) wurde nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1, aber mit verlängerter Reaktionszeit von 2.5 h / 30 min (mechanisch / Ultraschall), an das Amin des PEG₃-Linkers gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (R_t = 4.27 min, 0–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloses Öl isoliert.

Ausbeute: 45 ± 3% (11.0 ± 0.7 mg) / 78 ± 6% (19.1 ± 1.5 mg) (mechanisch / Ultraschall), chemische Reinheit: 100% (R_t = 1.20 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): [M+H]⁺ (ber.): 921.52 (921.56).

HR-ESI-MS (m/z): [M+2H]²⁺ (ber.): 461.2843 (461.2844), [M+H]⁺ (ber.): 921.5616 (921.5616), [M-H]⁻ (ber.): 919.5464 (919.5469).

NODA-GA-*tetra*-amino-dendron 16



Die Synthese des NODA-GA-*tetra*-amino-dendrons **16** (*(N_ε*-NODA-GA-*N_α*-PEG₃-Gly- *bis*(3-(2-(*bis*(3-aminopropyl)amino)acetamidopropyl)))lysine) wurde an einem Rink Amid Harz (Beladung 0.4 – 0.8 mmol/g, 26.6 μmol) nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad mit Standard *N_α*-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-PEG₃-OH durchgeführt. Die Entschützung des ε-Amins des Lysins erfolgte mit TFA in DCM (1/99, v/v) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, v/v) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 53.2 μmol, 28.9 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 50.5 μmol, 26.3 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 53.2 μmol, 9 μL) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ε-Amin gekuppelt. (Fmoc-*NH*-propyl)₂Gly-OH × KHSO₄ wurde zweimal (4 Äq., 106.4 μmol, 81.9 mg) (6 Äq., 159.6 μmol, 122.9 mg) mit HBTU (3.9 Äq., 103.7 μmol, 39.3 mg) (5.9 Äq., 157.0 μmol, 59.5 mg) und DIPEA (4 Äq., 106.4 μmol, 18.2 μL) (6 Äq., 159.6 μmol, 27.3 μL) mit verlängerter Reaktionszeit von jeweils 30 min gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (*R_t* = 3.76 min, 0–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten.

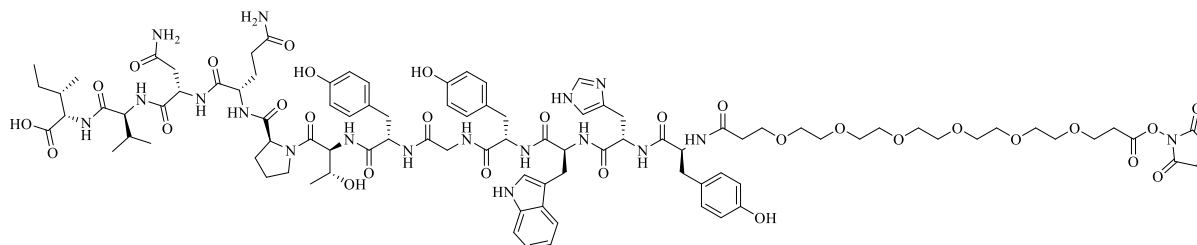
Ausbeute: 72 ± 3% (17.6 ± 0.7 mg), chemische Reinheit: 94.0% (*R_t* = 1.12 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]⁺ (ber.): 1263.22 (1263.84).

HR-ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ (ber.): 1263.8382 (1263.8359).

5.3.1.3 Synthese der GE11-Einheit

NHS-PEG₅-GE11-ester **17**



17

Der NHS-PEG₅-GE11-ester **17** (NHS-PEG₅-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile) wurde nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 sowohl auf dem mechanischen Schüttler als auch im Ultraschallbad an einem Fmoc-Ile-Wang LL Harz (100-200 mesh, Beladung 0.31 – 0.40 mmol/g, 32 μ mol) mit Standard *N* α -Fmoc-Aminosäuren, *bis*-NHS-PEG₅ und HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Kupplung des *bis*-NHS-PEG₅ (8 Äq., 0.26 mmol, 147 mg / 5 Äq., 0.16 mmol, 92 mg (mechanisch / Ultraschall)) erfolgte ohne HBTU, aber mit DIPEA (4 Äq., 0,13 mmol, 21.9 μ L) für 1 h mechanisch geschüttelt bzw. 15 min ultraschallgestützt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (R_t = 2.74 min, 20-50% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

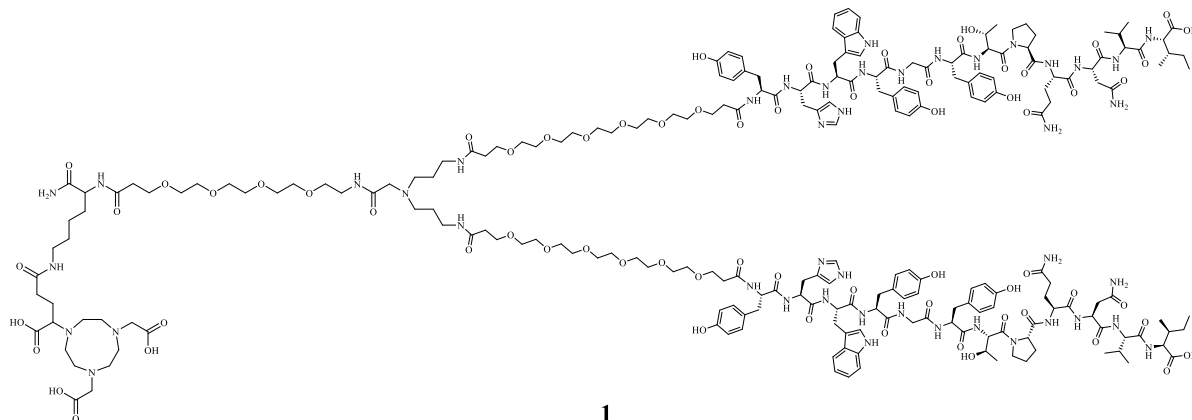
Ausbeute: 46 \pm 12% (29.2 \pm 7.6 mg) / 26 \pm 7% (16.5 \pm 4.4 mg) (mechanisch / Ultraschall), chemische Reinheit: 99.1% (R_t = 1.97 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]⁺ (ber.): 2001.91 (2001.92).

HR-ESI-MS (*m/z*): [M+2H]²⁺ (ber.): 1001.9622 (1001.9612).

5.3.1.4 Verknüpfung der Linker-modifizierten Peptide zu den Zielstrukturen

Homodimer 1



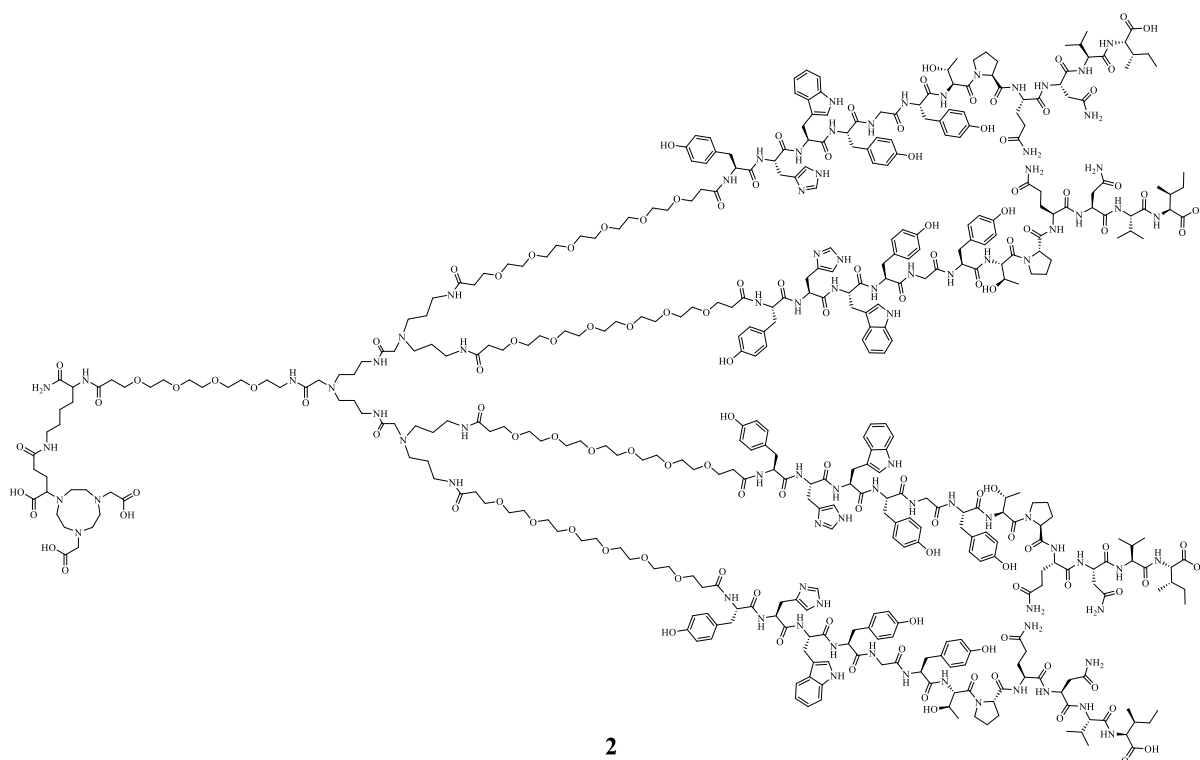
Das Homodimer **1** wurde durch die ultraschallgestützte Kupplung des NODA-GA-*bis*-amino-dendrons **15** (2.4 μmol , 2.2 mg) bei Raumtemperatur in abs. DMF (1 mL) mit dem NHS-PEG₅-GE11-ester **17** (2.6 Äq., 6.2 μmol , 12.5 mg) und DIPEA (14.6 Äq., 34.8 μmol , 6 μL) als Base erhalten. Ein vollständiger Umsatz der Edukte konnte nach 15 min mittels analytischer HPLC beobachtet werden. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 6.77$ min, 20–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und letztlich als farbloser Feststoff lyophilisiert.

Ausbeute: $23 \pm 10\%$ (2.6 ± 1.1 mg), chemische Reinheit: 95.7% ($R_t = 2.25$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 4701.08 (4695.32).

HR-ESI-MS (m/z): $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 1174.5888 (1174.5862), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 1565.7858 (1565.7792).

Homotetramer 2



Das Homotetramer **2** wurde durch die ultraschallgestützte Kupplung des NODA-GA-tetra-amino-dendrons **15** (2.4 μmol , 3.0 mg) bei Raumtemperatur in abs. DMF (1 mL) mit dem NHS-PEG₅-GE11-ester **17** (4.6 Äq., 11.0 μmol , 22.0 mg) und DIPEA (14.6 Äq., 34.8 μmol , 6 μL) als Base erhalten. Ein vollständiger Umsatz der Edukte konnte nach 60 min mittels analytischer HPLC beobachtet werden. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 6.90$ min, 0–60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und anschließend als farbloser Feststoff lyophilisiert.

Ausbeute: $20 \pm 5\%$ (4.1 ± 1.1 mg), chemische Reinheit: 97.6% ($R_t = 2.27$ min).

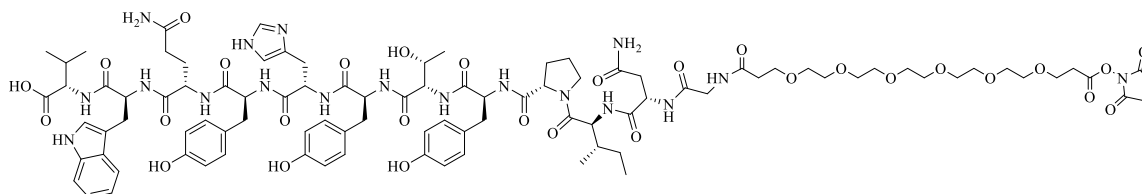
MALDI-TOF-MS (m/z): $[\text{M}+2\text{Na}]^+$ (ber.): 8852.25 (8856.33).

HR-ESI-MS (m/z): $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ (ber.): 1259.6317 (1259.6290), $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ (ber.): 1469.4027 (1469.3992), $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ (ber.): 1763.0802 (1763.0776).

5.3.2 Synthese des Heterodimers und strukturell gescrambleter Analoga

5.3.2.1 Synthese der Peptid-Einheiten

NHS-PEG₅-scr[GE11]-ester **18**



18

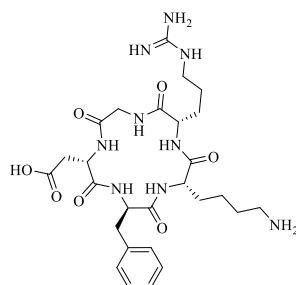
Der NHS-PEG₅-scr[GE11]-ester **18** (NHS-PEG₅-Gly-Asn-Ile-Pro-Tyr-Thr-Tyr-His-Tyr-Gln-Trp-Val) wurde nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Fmoc-Val-Wang LL Harz (100-200 mesh, Beladung 0.33 mmol/g, 33 μ mol) mit Standard *N* α -Fmoc-Aminosäuren, *bis*-NHS-PEG₅ und HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Kupplung des *bis*-NHS-PEG₅ (2 Äq., 0.07 mmol, 38 mg) erfolgte in 15 min ohne HBTU, aber mit DIPEA (2 Äq., 0,07 mmol, 11.3 μ L). Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (R_t = 2.78 min, 20–50% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 13 \pm 6% (8.7 \pm 3.9 mg), chemische Reinheit: 93.3% (R_t = 1.99 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): [M+H]⁺ (ber.): 2002.30 (2001.92).

HR-ESI-MS (m/z): [M-NHS+2H]²⁺ (ber.): 952.9525 (952.9513), [M-NHS+H]⁺ (ber.): 1905.9031 (1905.8987).

c(RGDfK) **21**



21

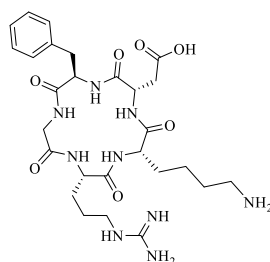
Das zyklische Peptid c(RGDfK) **21** (c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)) wurde in Anlehnung an Del Gatto et al.^[223] nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 auf dem mechanischen Schüttler wie im Ultraschallbad an einem Fmoc-Asp(NovaSynTGA)-OAll Harz (Beladung 0.18 – 0.21 mmol/g, 18 μ mol) mit Standard N_{α} -Fmoc-Aminosäuren und HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Entschützung der OAll-Schutzgruppe erfolgte mit Pd(PPh₃)₄ (0.25 Äq., 4.5 μ mol, 5.2 mg) und Phenylsilan (24 Äq., 0.45 mmol, 53.2 μ L) in DCM für 3 \times 15 min, wobei das Pd(PPh₃)₄ als Feststoff in die Spritze gefüllt und das Phenylsilan in DCM gelöst und aufgezogen wurde. Die Zyklisierung am Harz mit HBTU (1 Äq., 18 μ mol, 6.8 mg) wurde für 16 h / 1 h (mechanisch / Ultraschall) durchgeführt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (R_t = 4.77 min, 0–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 56 \pm 7% (6.1 \pm 0.8 mg) / 64 \pm 7% (6.9 \pm 0.8 mg) (mechanisch / Ultraschall), chemische Reinheit: 80.9% (R_t = 1.01 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): [M+H]⁺ (ber.): 604.10 (604.32).

HR-ESI-MS (m/z): [M+H]⁺ (ber.): 604.3199 (604.3202).

scr[c(RGDfK)] **22**



22

Das gesramblete zyklische Peptid scr[c(RGDfK)] **22** (c(Arg-Lys-Asp-D-Phe-Gly)) wurde in Anlehnung an Del Gatto et al.^[223] nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Fmoc-Asp(NovaSynTGA)-OAll Harz (Beladung 0.18 – 0.21 mmol/g, 18 μ mol) mit Standard N_{α} -Fmoc-Aminosäuren und HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Entschützung der OAll-Schutzgruppe erfolgte mit Pd(PPh₃)₄ (0.25 Äq., 4.5 μ mol, 5.2 mg) und Phenylsilan (24 Äq., 0.45 mmol, 53.2 μ L) in DCM für 3 \times 15 min, wobei das Pd(PPh₃)₄ als Feststoff in die Spritze gefüllt, das Phenylsilan in DCM gelöst und aufgezogen wurde. Die

Zyklisierung am Harz mit HBTU (1 Äq., 18 µmol, 6.8 mg) wurde für 1 h im Ultraschallbad durchgeführt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung ($R_t = 2.68$ min, 0–30% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

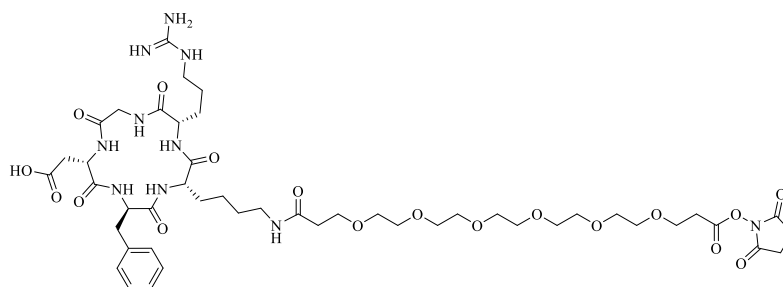
Ausbeute: $22 \pm 1\%$ (2.4 ± 0.1 mg), chemische Reinheit: 94.5% ($R_t = 0.99$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 604.04 (604.32).

HR-ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 604.3199 (604.3202).

5.3.2.2 Verknüpfung der Peptid-Einheiten mit Linkerstrukturen

NHS-PEG₅-c(RGDfK)-ester **23**



23

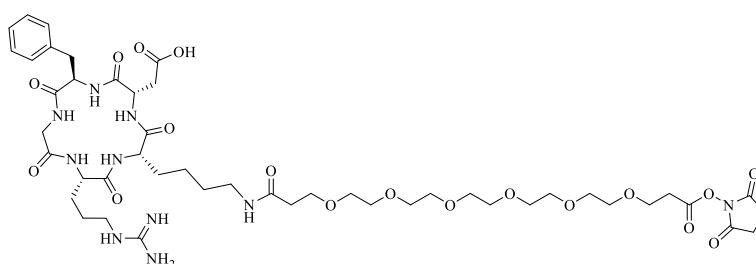
Das c(RGDfK) **21** (5.0 mg, 8.3 µmol) wurde in abs. DMF (500 µL) auf dem Schüttler, oder im Ultraschallbad fixiert und *bis*-NHS-PEG₅ (1.3 Äq., 10.4 µmol, 6.0 mg) und DIPEA (3.5 Äq., 29.0 µmol, 5 µL) hinzugegeben. Ein vollständiger Umsatz der Edukte konnte nach 60 / 15 min (mechanisch / Ultraschall) mittels analytischer HPLC beobachtet werden. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 3.40$ min, 15–25% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und anschließend als farbloser Feststoff lyophilisiert.

Ausbeute: $38 \pm 8\%$ (4.2 ± 0.9 mg) / $43 \pm 8\%$ (4.8 ± 0.9 mg) (mechanisch / Ultraschall), chemische Reinheit: 87.8% ($R_t = 1.75$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 1065.38 (1065.51).

HR-ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 1065.5105 (1065.5099).

NHS-PEG₅-scr[c(RGDfK)]-ester **24**



24

Das scr[c(RGDfK)] **22** (8.3 μmol , 5.0 mg) wurde in abs. DMF (500 μL) im Ultraschallbad fixiert und *bis*-NHS-PEG₅ (1.3 Äq., 10.4 μmol , 6.0 mg) und DIPEA (3.5 Äq., 29.0 μmol , 5 μL) hinzugegeben. Ein vollständiger Umsatz der Edukte konnte nach 15 min mittels analytischer HPLC beobachtet werden. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 3.06$ min, 15–25% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und anschließend als farbloser Feststoff lyophilisiert.

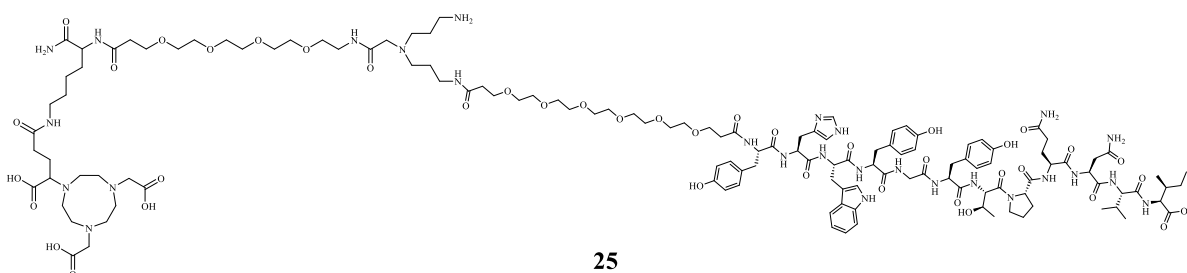
Ausbeute: $30 \pm 4\%$ (2.5 ± 0.3 mg), chemische Reinheit: 73.3% ($R_t = 1.75$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 1065.38 (1065.51).

HR-ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 1065.5105 (1065.5099).

5.3.2.3 Verknüpfung der Linker-modifizierten Peptide zu den Zielstrukturen

NODA-GA-*mono*-amino-PEG₅-GE11-dendron **25**



25

Das NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** (8.7 μmol , 4.1 mg) wurde in abs. DMF (1 mL) gelöst und auf dem Schüttler oder im Ultraschallbad fixiert. DIPEA (4.0 Äq., 35.1 μmol , 6 μL) und NHS-PEG₅-GE11-ester **17** (0.6 Äq., 5.0 μmol , 10.0 mg) wurden hinzugegeben. Die Reaktionkontrollen mittels analytischer HPLC zeigten einen vollständigen Umsatz nach 90 /

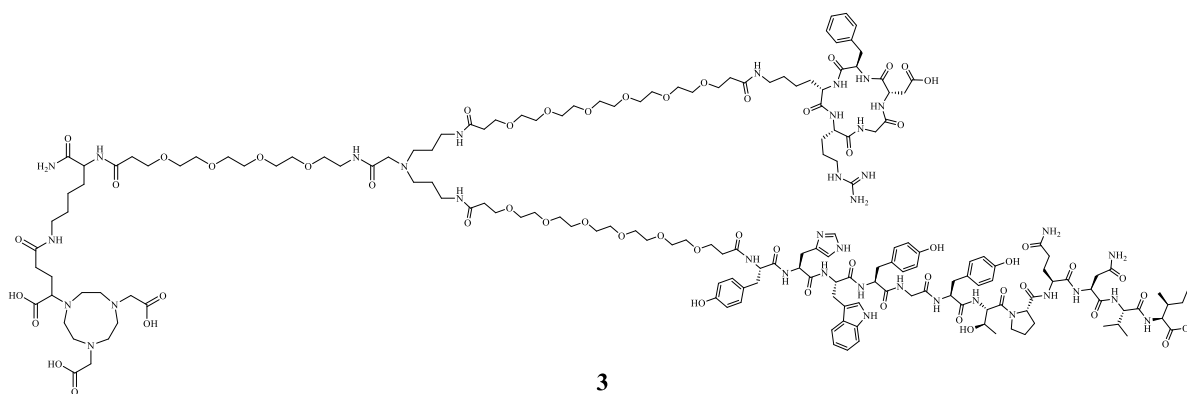
30 min (mechanisch / Ultraschall). DMF und DIPEA wurden unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt in 1:1 MeCN/H₂O + 0.1% TFA (v/v) gelöst, mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 2.94$ min, 20–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) aufgereinigt und abschließend das Produkt als farbloser Feststoff lyophilisiert.

Aubeute: $25 \pm 7\%$ (6.1 ± 1.7 mg) / $39 \pm 2\%$ (9.5 ± 0.5 mg) (mechanisch / Ultraschall), chemische Reinheit: 90.9% ($R_t = 1.94$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1404.30 (1404.72), $[M+H]^+$ (ber.): 2809.04 (2807.44).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 702.8671 (702.8660), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 936.8207 (936.8190), $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1404.7301 (1404.7248).

NODA-GA-PEG₅-GE11-PEG₅-c(RGDfK) **3**



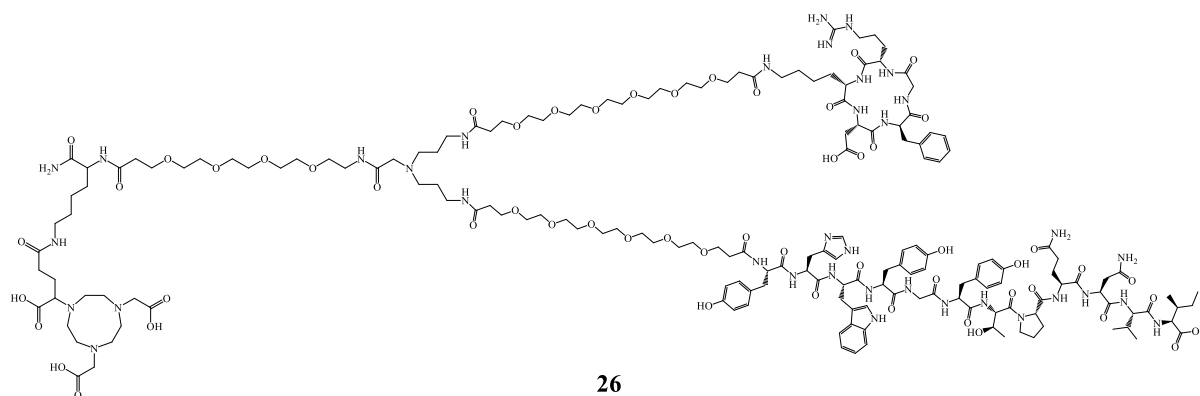
Das HBPL-Intermediat **25** ($1.5 \mu\text{mol}$, 4.1 mg) wurde in abs. DMF (1 mL) gelöst und auf dem Schüttler oder im Ultraschallbad fixiert. DIPEA ($10.6 \text{ \AA}q.$, $15.9 \mu\text{mol}$, $2.6 \mu\text{L}$) und NHS-PEG₅-c(RGDfK)-ester **23** ($2.0 \text{ \AA}q.$, $2.9 \mu\text{mol}$, 3.1 mg) wurden hinzugegeben. Die Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC zeigten einen vollständigen Umsatz nach 90 / 60 min (mechanisch / Ultraschall). Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 6.16$ min, 10–50% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und zum Schluss als farbloser Feststoff lyophilisiert.

Ausbeute: $48 \pm 2\%$ (2.7 ± 0.1 mg) / $64 \pm 8\%$ (3.6 ± 0.5 mg) (mechanisch / Ultraschall), chemische Reinheit: 92.1% ($R_t = 2.15$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 3759.43 (3757.92), $[M+Na]^+$ (ber.): 3781.38 (3779.90), $[M+K]^+$ (ber.): 3797.66 (3795.87), $[M+Na+K]^+$ (ber.): 3819.90 (3818.86).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 940.2364 (940.2350), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 1253.3128 (1253.3109), $[M-3H]^{3-}$ (ber.): 1251.6307 (1251.6307).

NODA-GA-PEG₅-GE11-PEG₅-scr[c(RGDfK)] **26**



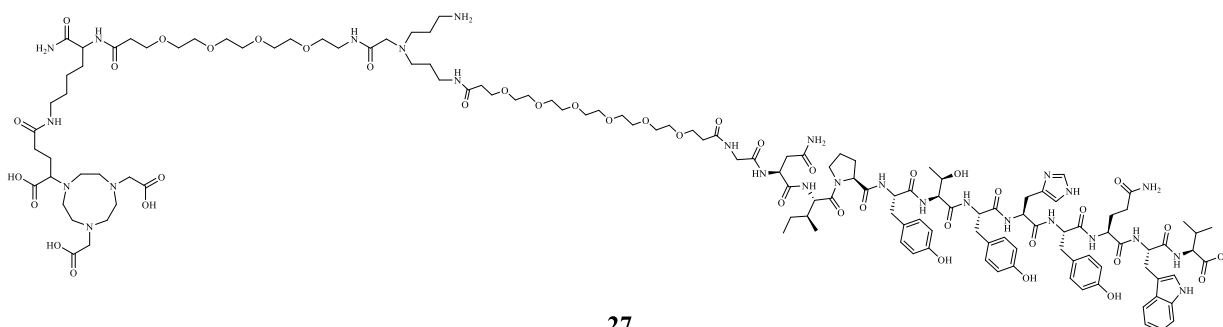
Das HBPL-Intermediat **25** (1.5 μmol , 4.1 mg) wurde in abs. DMF (1 mL) gelöst und im Ultraschallbad fixiert. DIPEA (10.6 $\text{\AA}q.$, 15.9 μmol , 2.6 μL) und NHS-PEG₅-ges[c(RGDfK)]-ester **24** (2.0 $\text{\AA}q.$, 2.9 μmol , 3.1 mg) wurden hinzugegeben. Die Reaktionskontrollen mittels analytischer HPLC zeigten nach 60 min einen vollständigen Umsatz. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 6.19$ min, 10–50% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und letztlich als farbloser Feststoff lyophilisiert.

Ausbeute: $48 \pm 3\%$ (2.7 \pm 0.2 mg), chemische Reinheit: 96.8% ($R_t = 2.16$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 3760.83 (3757.92).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 940.2373 (940.2350), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 1253.3161 (1253.3109).

NODA-GA-*mono*-amino-PEG₅-scr[GE11] dendron **27**



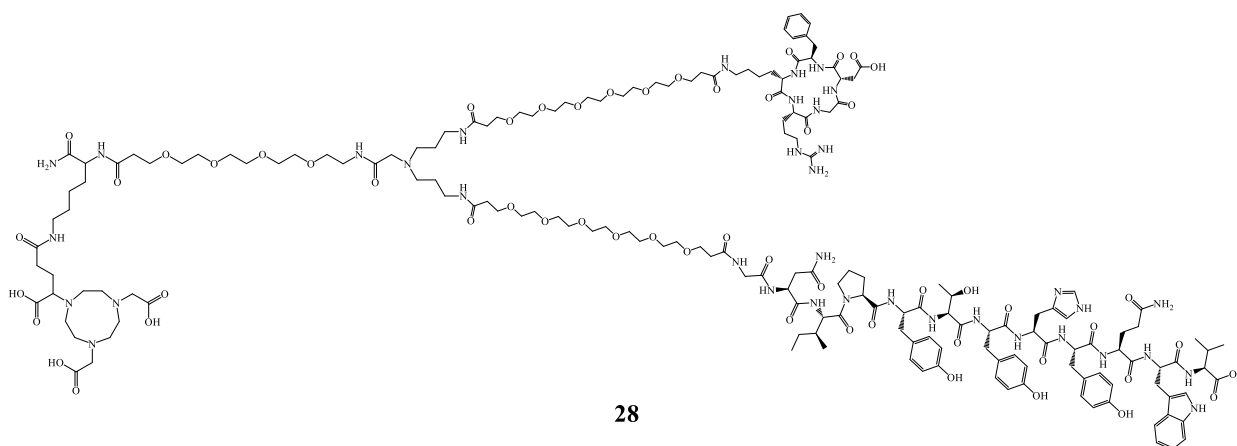
Das NODA-GA-*bis*-amino-dendron **15** (8.7 μmol , 4.1 mg) wurde in abs. DMF (1 mL) gelöst und im Ultraschallbad fixiert. DIPEA (4.0 Äq., 35.1 μmol , 6 μL) und NHS-PEG₅-scr[GE11]-ester **18** (0.6 Äq., 5.0 μmol , 10.0 mg) wurden hinzugegeben. Die Reaktionkontrollen mittels analytischer HPLC zeigten einen vollständigen Umsatz nach 30 min. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 2.94$ min, 20–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und abschließend als farbloser Feststoff lyophilisiert.

Aubeute: $32 \pm 6\%$ (4.5 ± 0.8 mg), chemische Reinheit: 90.5% ($R_t = 1.94$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1403.96 (1404.72), $[M+H]^+$ (ber.): 2807.60 (2807.44).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 702.8667 (702.8660), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 936.8201 (936.8190).

NODA-GA-PEG₅-scr[GE11]-PEG₅-c(RGDfK) **28**



Das HBPL-Intermediat **27** (1.5 μmol , 4.1 mg) wurde in abs. DMF (1 mL) gelöst und im Ultraschallbad fixiert. Nach Zugabe von DIPEA (10.6 Äq., 15.9 μmol , 2.6 μL) und NHS-PEG₅-c(RGDfK)-ester **23** (2.0 Äq., 2.9 μmol , 3.1 mg) wurde in Reaktionkontrollen mittels analytischer HPLC ein vollständiger Umsatz nach 60 min beobachtet. Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ($R_t = 6.19$ min, 10–50% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) isoliert und schließlich als farbloser Feststoff lyophilisiert.

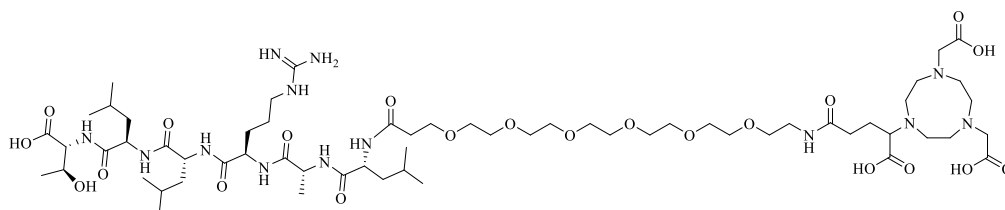
Ausbeute: $86 \pm 6\%$ (4.7 ± 0.3 mg), chemische Reinheit: 98.0% ($R_t = 2.16$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 3759.43 (3757.92).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 940.2374 (940.2350), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 1253.3166 (1253.3109).

5.3.3 Synthese der Monomere basierend auf literaturbekannten EGFR-spezifischen Peptiden

NODA-GA-PEG₅-D4 **5**



5

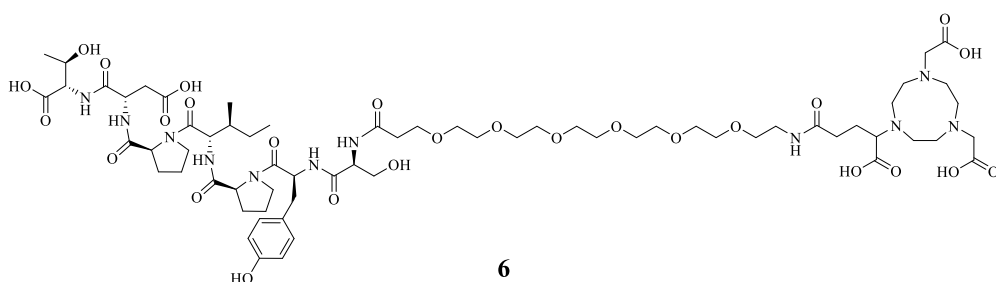
NODA-GA-PEG₅-D4 **5** (NODA-GA-PEG₅-Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (Beladung 0.65 mmol/g, 32.5 μ mol, 50 mg) mit Standard *N* $_{\alpha}$ -Fmoc-Aminosäuren und Fmoc-NH-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 65 μ mol, 35.3 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 61.8 μ mol, 32 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 65 μ mol, 11 μ L) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (R_t = 5.84 min, 10–60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 74% (33.2 mg), chemische Reinheit: 98.1% (R_t = 2.09 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 1378.51 (1378.80).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 689.9068 (689.9056), $[M+H]^+$ (ber.): 1378.8104 (1378.8040) $[M-H]^-$ (ber.): 1376.7881 (1376.7893).

NODA-GA-PEG₅-P1 6



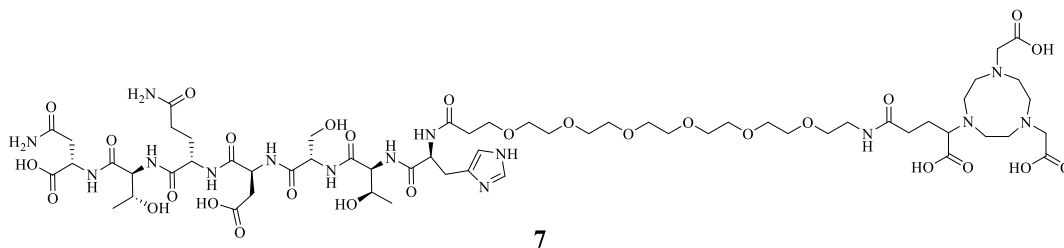
NODA-GA-PEG₅-P1 6 (NODA-GA-PEG₅-Ser-Tyr-Pro-Ile-Pro-Asp-Thr) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang Harz (Beladung 0.3 mmol/g, 30.3 μ mol, 101 mg) mit Standard *N* α -Fmoc-Aminosäuren und Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 60.5 μ mol, 32.9 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 57.5 μ mol, 30 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 72 μ mol, 12 μ L) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (R_t = 4.37 min, 10–60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 59% (26.4 mg), chemische Reinheit: 97.8% (R_t = 1.80 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): [M+H]⁺ (ber.): 1484.41 (1484.73).

HR-ESI-MS (m/z) [M+H]⁺ (ber.): 1484.7262 (1484.7255), [M-H]⁻ (ber.): 1482.7088 (1482.7108), [M-2H]²⁻ (ber.): 740.8505 (740.8518), [M-3H]³⁻ (ber.): 493.5652 (493.5654).

NODA-GA-PEG₅-P2 7



NODA-GA-PEG₅-P2 7 (NODA-GA-PEG₅-His-Thr-Ser-Asp-Gln-Thr-Asn) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Fmoc-Asn(Trt)-2-Cl-Trt Harz (Beladung 1.1 mmol/g, 44 μ mol, 40 mg) mit Standard *N* α -Fmoc-Aminosäuren und Fmoc-*NH*-

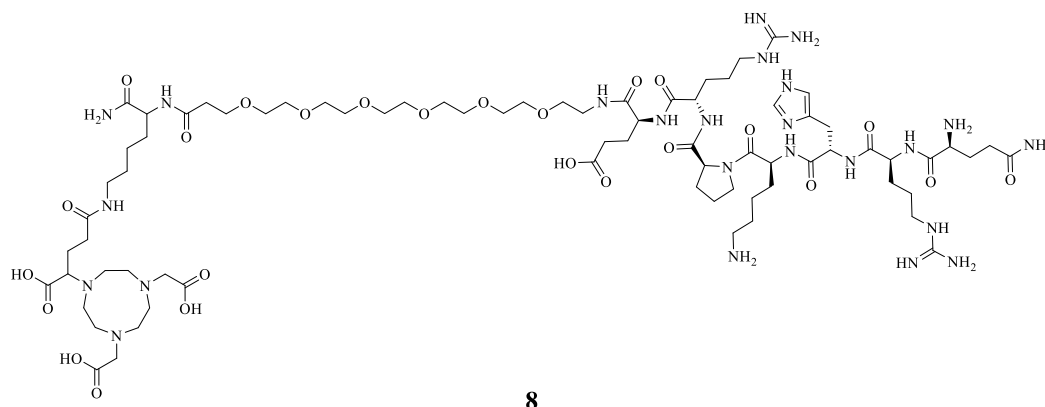
PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 88 µmol, 47.8 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 83.6 µmol, 44 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 88 µmol, 15 µL) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (*R*_t = 2.87 min, 10–60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 21% (14.1 mg), chemische Reinheit: 100% (*R*_t = 1.43 min).

MALDI-TOF-MS (*m/z*): [M+H]⁺ (ber.): 1494.10 (1494.68).

HR-ESI-MS (*m/z*) [M+2H]²⁺ (ber.): 747.8441 (747.8440), [M+H]⁺ (ber.): 1494.6817 (1494.6806), [M-H]⁻ (ber.): 1492.6620 (1492.6660), [M-2H]²⁻ (ber.): 745.8290 (745.8294).

QRH-PEG₅-NODA-GA **8**



QRH-PEG₅-NODA-GA **8** (Gln-Arg-His-Lys-Pro-Arg-Glu-PEG₅-Lys-*N*_ε-NODA-GA) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Rink-Amid-MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g, 27 µmol, 75 mg) mit Standard *N*_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Mtt-Entschützung des ε-Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH an das α-Amin des Lysins, mit TFA in DCM (1/99, *v/v*) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, *v/v*) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 54 µmol, 29.4 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 51.3 µmol, 27 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 54 µmol, 9 µL) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ε-Amin gekuppelt. Anschließend wurden die restlichen Aminosäuren weiter nach A1 gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (*R*_t = 3.03 min,

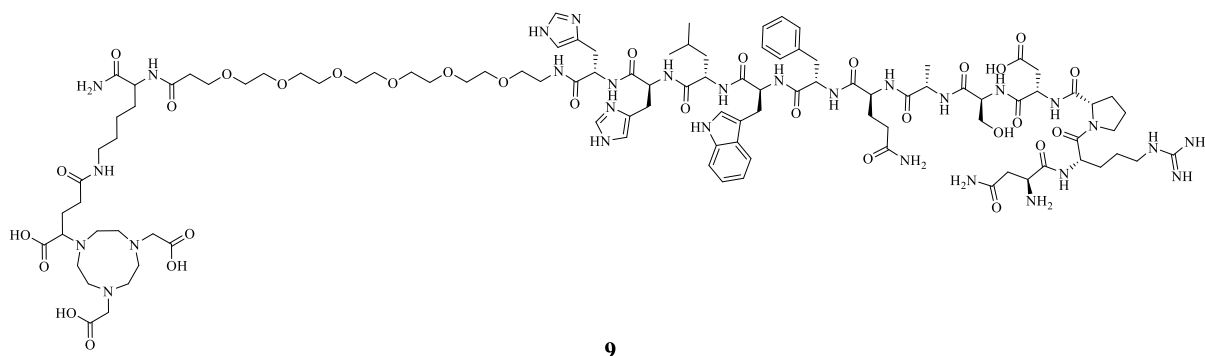
10–60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 50% (23.8 mg), chemische Reinheit: 100% ($R_t = 1.35$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 1769.95 (1769.99).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 590.6674 (590.6671), $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 885.4981 (885.4971), $[M-H]^-$ (ber.): 1767.9665 (1767.9722).

CPP-PEG₅-NODA-GA **9**



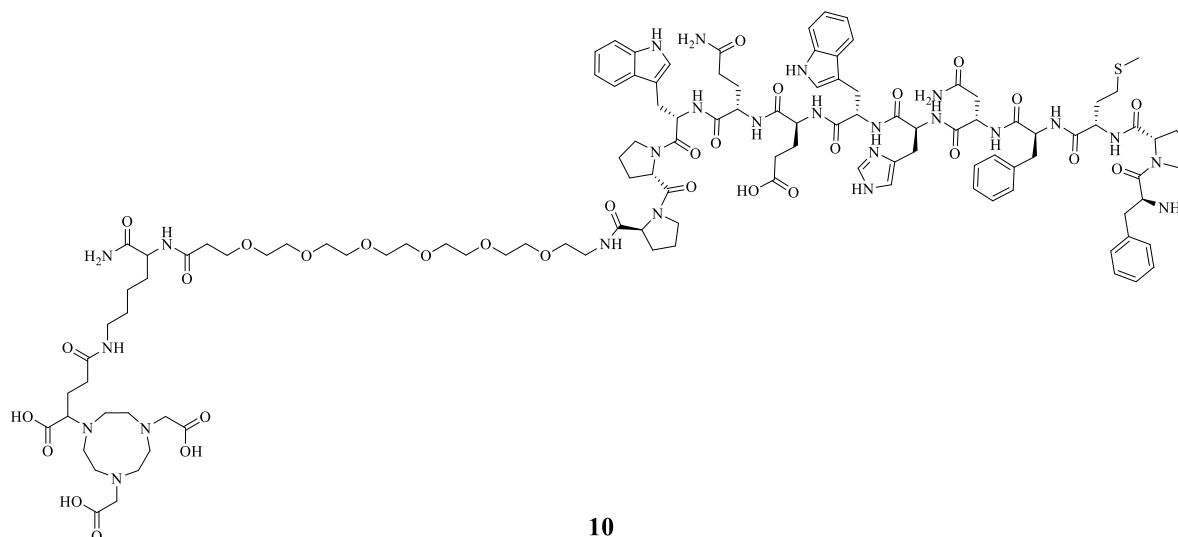
CPP-PEG₅-NODA-GA **9** (Asn-Arg-Pro-Asp-Ser-Ala-Gln-Phe-Trp-Leu-His-His-PEG₅-Lys-*N_ε*-NODA-GA) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Rink-Amid-MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g, 36 μ mol, 100 mg) mit Standard *N_α*-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Mtt-Entschützung des ϵ -Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH an das α -Amin des Lysins, mit TFA in DCM (1/99, *v/v*) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, *v/v*) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 72 μ mol, 39.1 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 68.4 μ mol, 36 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 72 μ mol, 12 μ L) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ϵ -Amin gekuppelt. Daraufhin wurden die restlichen Aminosäuren weiter nach A1 gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung ($R_t = 4.55$ min, 10–60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 49% (40.7 mg), chemische Reinheit: 100% ($R_t = 1.82$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 2327.20 (2328.18).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 582.8006 (582.8008), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 776.7317 (776.7319), $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1164.5946 (1164.5943).

EGBP-PEG₅-NODA-GA **10**



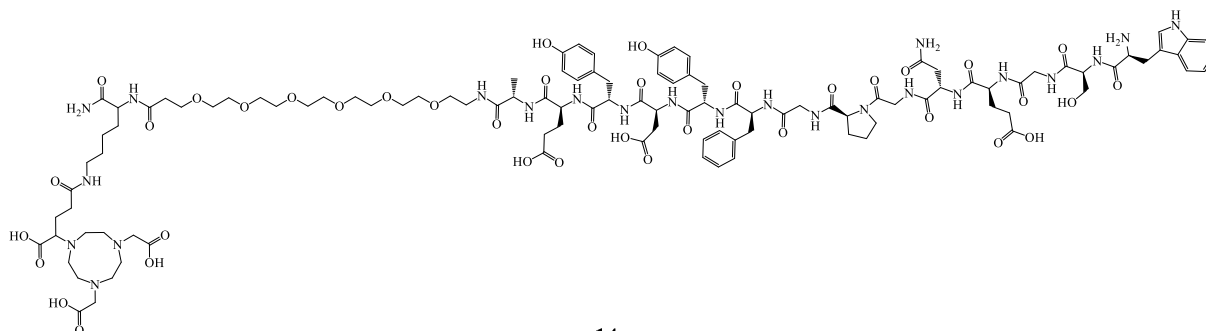
EGBP-PEG₅-NODA-GA **10** (Phe-Pro-Met-Phe-Asn-His-Trp-Glu-Gln-Trp-Pro-Pro-PEG₅-Lys-*N*_ε-NODA-GA) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Rink-Amid-MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g, 36 μmol, 100 mg) mit Standard *N*_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Mtt-Entschützung des ε-Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH an das α-Amin des Lysins, mit TFA in DCM (1/99, *v/v*) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, *v/v*) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 72 μmol, 39.1 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 68.4 μmol, 36 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 72 μmol, 12 μL) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ε-Amin gekuppelt. Im Anschluss wurden die restlichen Aminosäuren weiter nach A1 gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (*R*_t = 5.78 min, 10–60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 32 ± 7% (28.2 ± 6.4 mg), chemische Reinheit: 96.1% (*R*_t = 2.80 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 2435.47 (2436.78).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 812.7310 (812.7307), $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1218.5933 (1218.5924), $[M+H]^+$ (ber.): (2436.1774), $[M-2H]^{2-}$ (ber.): 1216.5715 (1216.5778).

Pep11-PEG₅-NODA-GA **14**



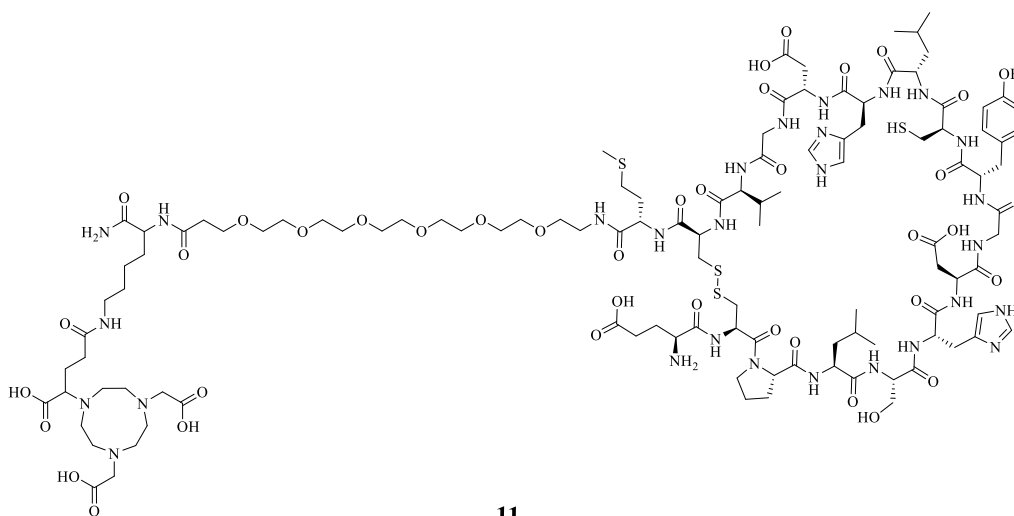
Pep11-PEG₅-NODA-GA **14** (Trp-Ser-Gly-Glu-Asn-Gly-Pro-Gly-Phe-Tyr-Asp-Tyr-Glu-Ala-PEG₅-Lys- N_{ϵ} -NODA-GA) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Rink-Amid-MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g, 36 μ mol, 100 mg) mit Standard N_{α} -Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH und Fmoc-NH-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Mtt-Entschützung des ϵ -Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-NH-PEG₅-COOH an das α -Amin des Lysins, mit TFA in DCM (1/99, v/v) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, v/v) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 72 μ mol, 39.1 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 68.4 μ mol, 36 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 72 μ mol, 12 μ L) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ϵ -Amin gekuppelt. Im nächsten Schritt wurden die restlichen Aminosäuren weiter nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 gekuppelt. Nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (R_t = 5.99 min, 10–40% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation wurde das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: 54% (47 mg), chemische Reinheit: 91.0% (R_t = 1.84 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 2412.34 (2412.10).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1206.5559 (1206.5516), $[M-2H]^{2-}$ (ber.): 1204.5350 (1204.5370), $[M-3H]^{3-}$ (ber.): 802.6877 (802.6889).

EGF₅₋₂₁-PEG₅-NODA-GA **11**



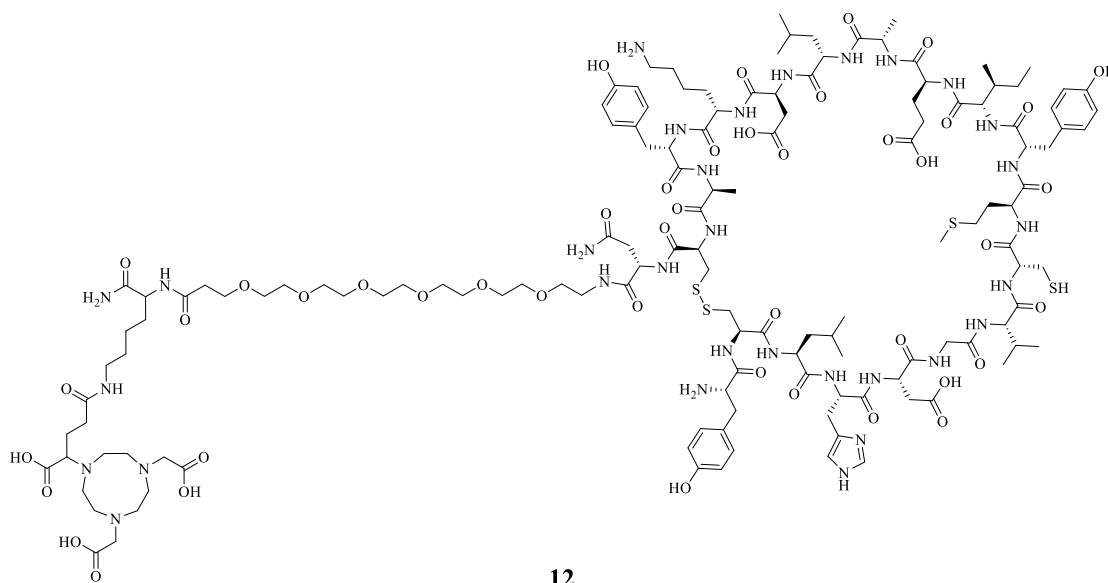
11

EGF₅₋₂₁-PEG₅-NODA-GA **11** (Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His-Asp-Gly-Tyr-Cys-Leu-His-Asp-Gly-Val-Cys-Met-PEG₅-Lys-*N_ε*-NODA-GA) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Rink-Amid-MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g, 27 μmol, 75 mg) mit Standard *N_α*-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH und Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Mtt-Entschützung des ε-Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-*NH*-PEG₅-COOH an das α-Amin des Lysins, mit TFA in DCM (1/99, *v/v*) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, *v/v*) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 54 μmol, 29.4 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 51.3 μmol, 27 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 54 μmol, 9 μL) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ε-Amin gekuppelt. Anschließend wurden die restlichen Aminosäuren weiter nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 gekuppelt. Die Entfernung der Mmt-Schutzgruppe der Cysteine (EGF₆ und EGF₂₀) erfolgte mit TFA in DCM (2/98, *v/v*) für 3×15 min, woraufhin das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, *v/v*) gewaschen wurde. Danach wurden die freien Thiolgruppen mit *N*-Chlorosuccinimid (NCS) (1.05 Äq., 28.4 μmol, 4 mg) innerhalb von 15 min bei Raumtemperatur zur Disulfidbrücke oxidiert. Das Harz wurde mit DMF und DCM gewaschen und nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung (*R_t* = 4.54 min, 0–100% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation das Produkt als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 22% (15.7 mg), chemische Reinheit: 90.9% (*R_t* = 1.99 min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 2697.48 (2697.17).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 899.7312 (899.7297), $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1349.0952 (1349.0909), $[M-2H]^{2-}$ (ber.): 1347.0750 (1347.0763).

EGF₁₃₋₃₂-PEG₅-NODA-GA **12**



EGF₁₃₋₃₂-PEG₅-NODA-GA **12** (Tyr-Cys-Leu-His-Aps-Gly-Val-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Ala-Leu-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys-Asn-PEG₅-Lys-N_ε-NODA-GA) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Rink-Amid-MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g, 27 μmol, 75 mg) mit Standard N_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH und Fmoc-NH-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Mtt-Entschützung des ε-Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-NH-PEG₅-COOH an das α-Amin des Lysins, mit TFA in DCM (1/99, v/v) für 3×15 min, woraufhin das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, v/v) gewaschen wurde. (R)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 54 μmol, 29.4 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 51.3 μmol, 27 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 54 μmol, 9 μL) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ε-Amin gekuppelt. Schließlich wurden die restlichen Aminosäuren weiter nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 gekuppelt. Die Entfernung der Mmt-Schutzgruppe der Cysteine (EGF₁₄ und EGF₃₁) erfolgte mit TFA in DCM (2/98, v/v) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, v/v) gewaschen wurde. Die

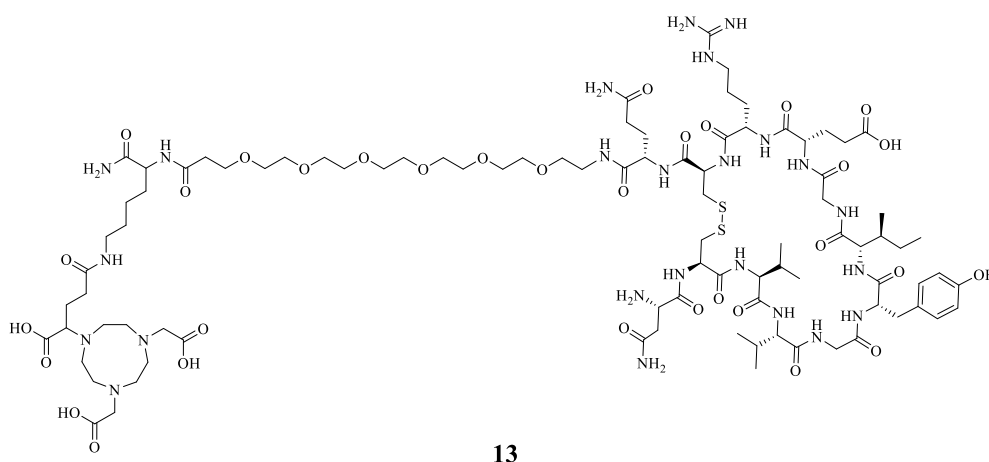
freien Thiolgruppen wurden mit *N*-Chlorosuccinimid (NCS) (1.05 Äq., 28.4 μmol , 4 mg) innerhalb von 15 min bei Raumtemperatur zur Disulfidbrücke oxidiert. Das Harz wurde mit DMF und DCM gewaschen und nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung ($R_t = 5.49$ min, 10-60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: $3 \pm 2\%$ (2.7 ± 1.9 mg), chemische Reinheit: 65.1% ($R_t = 2.11$ min).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 3127.48 (3126.46).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+4H]^{4+}$ (ber.): 782.3710 (782.3692), $[M+3H]^{3+}$ (ber.): 1042.8266 (1042.8232).

EGF₃₂₋₄₃-PEG₅-NODA-GA **13**



EGF₃₂₋₄₃-PEG₅-NODA-GA **13** (Asn-Cys-Val-Val-Gly-Tyr-Ile-Gly-Glu-Arg-Cys-Gln-PEG₅-Lys-N_ε-NODA-GA) wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 im Ultraschallbad an einem Rink-Amid-MBHA Harz LL (Beladung 0.36 mmol/g, 27 μmol , 75 mg) mit Standard *N*_α-Fmoc-Aminosäuren, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Cys(Acm)-OH und Fmoc-NH-PEG₅-COOH mit HBTU als Kupplungsreagenz synthetisiert. Die Mtt-Entschützung des ϵ -Amins des Lysins erfolgte, nach der Kupplung des Fmoc-NH-PEG₅-COOH an das α -Amin des Lysins, mit TFA in DCM (1/99, v/v) für 3×15 min, wonach das Harz mit DCM und dann DIPEA in DCM (1/9, v/v) gewaschen wurde. (*R*)-NODA-GA(*t*Bu)₃ (2 Äq., 54 μmol , 29.4 mg) wurde mit PyBOP (1.9 Äq., 51.3 μmol , 27 mg) als Kupplungsreagenz und mit DIPEA (2 Äq., 54 μmol , 9 μL) als Base zur Aktivierung (2 min) innerhalb von 30 min an das ϵ -Amin gekuppelt. Daraufhin wurden die

restlichen Aminosäuren weiter nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift A1 gekuppelt. Die Entfernung der AcM-Schutzgruppe der Cysteine (EGF₃₃ und EGF₄₂) erfolgte mit Thallium(III)-Trifluoracetat (4 Äq., 108 µmol, 58.7 mg), welches simultan die Thiolgruppen innerhalb von 45 min bei Raumtemperatur zur Disulfidbrücke oxidiert. Das Harz wurde mit DMF und DCM gewaschen und nach globaler Entschützung, Abspaltung vom Harz, Aufreinigung ($R_t = 4.47$ min, 10-60% MeCN + 0.1% TFA in 8 min) und Lyophilisation das Produkt als farbloser Feststoff isoliert.

Ausbeute: $10 \pm 1\%$ (5.9 ± 0.6 mg), chemische Reinheit: 96.7% ($R_t = 1.78$).

MALDI-TOF-MS (m/z): $[M+H]^+$ (ber.): 2158.12 (2158.05).

HR-ESI-MS (m/z) $[M+2H]^{2+}$ (ber.): 1080.0339 (1080.0313), $[M+2H]^{2-}$ (ber.): 1078.0131 (1078.0167).

5.4 Radiomarkierung der NODA-GA-Konjugate

5.4.1 Radiomarkierung mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$

Für die Radiomarkierung genutztes $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$ wurde als $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ durch Elution eines GalliaPharm $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator Systems mit 0.1 M HCl erhalten. Hierbei wurde der Vorlauf (1.8 mL), der möglichen ^{68}Ge -Durchbruch beinhalten könnte, verworfen. Der in Wasser (Tracepur-Qualität) ($1 - 20$ nmol, $1 - 20$ µL, $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) gelöste Präkursor wurde zu $\sim 50 - 250$ MBq $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ (0.5 mL – 1 mL) hinzugegeben und der pH wurde mit einem Natriumacetat-Puffer (pH 4.6, 1.25 M, $100 - 250$ µL) auf 3.5 – 4.0 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 45°C im Thermoschüttler wurde die radiochemische Reinheit mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt. Um die molare Aktivität zu optimieren, wurde die hinzugegebene Substanzmenge bei gleichbleibender Aktivität stufenweise über mehrere Markierungsversuche reduziert, bis freies $^{68}\text{Ga}^{3+}$ mit der analytischen Radio-HPLC nachgewiesen werden konnte.

5.4.2 Radiomarkierung mit $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$

Für die Radiomarkierung verwendetes $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ wurde als $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ von der Universitätsklinik Tübingen in 0.1 M HCl erhalten. Der Präkursor, der in Wasser (Tracepur-Qualität) ($0.5 - 5$ nmol, $0.5 - 5$ μL , $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) gelöst wurde, wurde zu $\sim 5-10$ MBq $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ ($5 - 20$ μL) hinzugegeben und der pH wurde mit einem Natriumacetat-Puffer (pH 5.0, 0.25 M, $125 - 150$ μL) auf $4.8 - 5.0$ eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min bei 25°C im Thermoschüttler wurde die radiochemische Reinheit mittels analytischer Radio-HPLC bestimmt.

5.5 Arbeiten mit Zellen und verwendete Zelllinien

5.5.1 Allgemeine Methoden bei Zellarbeiten

Zellkultivierung: Die Arbeiten an Zellkulturen wurden in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Materialien wurden steril verpackt gekauft bzw. vor der Verwendung in der Sterilbank desinfiziert oder sterilisiert. Die Sterilbank wurde während Ruhezeiten mit UV-Licht bestrahlt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $95 \pm 3\%$ ^[256]. Das Wachstum der Zellen wurde mit einem Primo Vert Inversem Lichtmikroskop überprüft und das Medium in einem Intervall von 3-4 Tagen gewechselt. Zellen wurden in 150 cm^2 Zellflaschen kultiviert.

Passagieren: Die Vereinzelung und Umsetzung der Zellen wurde bei einer Konfluenz von $> 80\%$ durchgeführt. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen wurden mit PBS (20 mL) gewaschen und mit Trypsin/EDTA mit Phenolrot (5 mL, 0.05%, v/v) für 5 min bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre vereinzelt und vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zelllösung wurde auf drei neue Zellkulturflaschen verteilt und das Trypsin wurde durch die Zugabe von frischem Zellmedium, das mit FCS (10%, v/v) und Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL, 1%, v/v) angereichert wurde, inaktiviert.

Zellvitalität und Zellzahl: Die Bestimmung der Zellmenge benötigt für die Bindungsstudien und Internalisierungsstudien erfolgte mit C-Chip Neubauer-Zählkammern. Hierfür wurde in Anschluss an die Inaktivierung von Trypsin der Zellsuspension eine Probe (10 μL) entnommen, welche mit einer Tryphanblaulösung (10 μL , 0.4%, v/v) versetzt wurde. Der Diazofarbstoff

Trypanblau wird nur von beschädigten und toten Zellen aufgenommen, was das Zählen vereinfacht und eine Beurteilung der Vitalität der Zellen ermöglicht. Zur Bestimmung der Menge an Zellen wurden vier Großquadrate ausgezählt und mit der Formel 2 errechnet:

$$\text{Anzahl Zellen} = 10^4 \cdot \frac{n_1+n_2+n_3+n_4}{4} \cdot \text{VF} \cdot V \quad (2)$$

n_x = Anzahl gezählter Zellen im Großquadrat X (X = 1 bis 4) unterteilt in je 16 Quadrate a 0.25 mm Seitenlänge

V = Volumen des verwendeten Mediums in [mL]

VF = Verdünnungsfaktor (e. g. bei der Verwendung von 10 μ L Zellsuspension und 10 μ L Tryphanblaulösung: VF = 2)

Die Vitalität aller eingesetzten Zellen lag bei > 95%.

Lagerung der Zellen: Gekaufte Zellen wurden tiefgefroren geliefert (Medium/FBS/DMSO, 7/2/1, v/v/v) und die durch Subkultivierungen erhaltenen Zellen wurden in FCS/DMSO ($3 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^6$ Zellen, 1 mL, 9/1, v/v) Aliquots in einem Mr. Frosty Gefrierbehälter tiefgefroren bei -80°C gelagert. Zur Verwendung der tiefgefrorenen Zellen wurden diese aufgetaut und in Zellkulturmedium (19 mL) vorgelegt. Um DMSO zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einem frischen Zellkulturmedium/FCS/Penicillin-Streptomycin (89/10/1, v/v/v) resuspendiert. Die Zelllösung wurde anschließend auf drei neue Zellkulturflaschen verteilt.

5.5.2 Zelllinie A431

Die humanen Epithelkarzinomzellen A431 wurden in DMEM kultiviert, welches mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL) angereichert wurde.

5.5.3 Zelllinie U87MG

Die humanen Glioblastomzellen U87MG wurden in EMEM kultiviert, welches mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL) angereichert wurde.

5.6 *In vitro*-Untersuchungen

5.6.1 Stabilitätsstudien in humanem Serum

Radiomarkiertes Peptid (125 µL, 10 – 30 MBq, pH 7.4) wurde zu humanem Serum (500 µL) hinzugegeben und bei 37°C für 90 min inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (t = 0, 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min) wurde ein Aliquot (75 µL) der Lösung eiskaltem Ethanol (75 µL) beigelegt und für 1 min auf Eis gekühlt. Daran anschließend wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei 13 400 rpm (12 100 ×g) für 90 s von dem Überstand getrennt. Der entnommene Überstand wurde mittels analytischer Radio-HPLC untersucht, nachdem zuvor jeweils die Aktivität des Präzipitats und Überstands bestimmt wurde. Die Peaks der Radio-HPLC wurden integriert, um die Zersetzung der Substanz zum jeweiligen Zeitpunkt zu bestimmen, woraus sich die HWZ der Substanz in humanem Serum errechnen ließ. Es wurden drei unabhängige Bestimmungen je getesteter Substanz durchgeführt.

5.6.2 Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient-Bestimmung bei pH 7.4 ($\log_{D(7.4)}$)

Radiomarkiertes Peptid (5 µL, 0.5 – 2 MBq) wurde in ein Gemisch aus 1-Octanol (800 µL) und Phosphat-Puffer (0.05 M, pH 7.4, 795 µL) gegeben. Die Lösung wurde für 5 min geschüttelt und anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 13 400 rpm (12 100 ×g) für 2 min getrennt. Drei Aliquot (125 µL) der organischen und wässrigen Phase wurden entnommen und im Gammazähler die Radioaktivität der jeweiligen Phasen gemessen. Es wurden drei unabhängige Bestimmungen von jeder Verbindung mit je drei Aliquots sowie drei Messungen pro Aliquot durchgeführt. Der $\log_{D(7.4)}$ wurde mit der folgenden Formel 1 errechnet:

$$\log_{D(7.4)} = \log \left[\frac{\text{cpm}_{1\text{-Octanol}}}{\text{cpm}_{\text{Phosphat-Puffer}_{7.4}}} \right] \quad (1)$$

$\text{cpm}_{1\text{-Octanol}}$ = Aktivitätsmenge der 1-Octanol-Phase in *counts per minute* [cpm]

$\text{cpm}_{\text{Phosphat-Puffer}_{7.4}}$ = Aktivitätsmenge der Phosphat-Puffer-Phase in *counts per minute* [cpm]

5.6.3 Internalisierungsassays an A431-Zellen

A431-Zellen ($1 \cdot 10^6$ pro Well) wurden in eine 24-Well Zellkultur Multiwellplatte (Cellstar) passagiert und für 2 Tage bei 37°C in einer CO_2 -haltigen Atmosphäre (5%, v/v) mit einer Luftfeuchtigkeit von $\geq 95\%$ inkubiert. Als Internalisierungsmedium wurde DMEM/FCS (99/1, v/v) verwendet. Zu Beginn des Assays wurden die Wells zweimal mit eiskaltem Internalisierungsmedium gewaschen und anschließend auf 1.35 mL pro Well befüllt. Zu der Hälfte der Wells wurde PBS/BSA (150 μL , 99.5/0.5, v/w) hinzugegeben, während der anderen Hälfte ein 100-facher molarer Überschuss an hEGF oder unmarkiertem Peptid (5 nM) in PBS/BSA (150 μL , 99.5/0.5, v/w) beigegeben wurde. Nachdem für 10 min bei 37°C inkubiert wurde, wurde jedem Well radiomarkiertes Peptid (0.05 nM) in Internalisierungsmedium (8 μL) hinzugegeben, wonach die Platte für 60 min bei 37°C inkubiert wurde. Um die Menge an freiem Peptid im Internalisierungsmedium bestimmen zu können, wurden die Zellen vom Medium getrennt, zweimal mit eiskaltem Internalisierungsmedium gewaschen, und das jeweils gesammelte Internalisierungsmedium wurde im Gammazähler gemessen. Zur Bestimmung der oberflächengebundenen Peptide wurde jeder Well zweimal für 5 min mit eiskaltem Glycin-Puffer (pH 2.8, 0.05 M, 1 mL) inkubiert; der Überstand wurde gesammelt und im Gammazähler gemessen. Internalisiertes Peptid konnte bestimmt werden, indem die Zellen mit Natriumhydroxid-Lösung (2 M, 1 mL) lysiert wurden und die Lösungen gesammelt wurde, um im Gammazähler gemessen zu werden. Die Radioaktivität jeder Fraktion (3x freies Peptid ungeblockt; 3x freies Peptid geblockt; 3x membrangebundenes Peptid ungeblockt; 3x membrangebundenes Peptid geblockt; 3x internalisiertes Peptid ungeblockt; 3x internalisiertes Peptid geblockt) wurde ermittelt, wobei drei unabhängige Bestimmungen je getesteter Substanz absolviert wurden.

5.6.4 Bindungsassays an A431- und U87MG-Zellen

Kompetitive Verdrängungsstudien wurden in dreifacher Ausführung zur Bestimmung der Affinität der Liganden zu den jeweils zugehörigen Rezeptoren durchgeführt. Millipore MultiScreen_{HTS}-BV, 1.2 μm 96-Well Filterplatten wurden 1 h mit PBS/BSA (200 μL , 99/1, v/w) vor dem Assay konditioniert. Für A431-Zellen wurde als Bindungsmedium Opti-MEM I, für U87MG-Zellen EMEM, ergänzt mit 20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 und 0.1% (v/w) BSA, verwendet. Pro Well wurden entweder $1 \cdot 10^5$

A431-Zellen oder $1 \cdot 10^5$ U87MG-Zellen in Bindungsmedium (50 μL), nach Zugabe von steigenden Konzentrationen des Kompetitors (25 μL), mit [^{125}I]I-hEGF (A431) (25 μL , 0.25 - 0.5 kBq) oder [^{125}I]I-Echistatin (U87MG) (25 μL , 0.25 - 0.5 kBq) für 1 h bei 37°C inkubiert. Über 11 Wells wurden Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-8}$ M bis $1 \cdot 10^{-3}$ M des Kompetitors (**1 – 14**), $5 \cdot 10^{-10}$ M bis $1 \cdot 10^{-6}$ M für hEGF oder $1 \cdot 10^{-8}$ M bis $5 \cdot 10^{-5}$ M für c(RGDfK) verwendet. Hierbei wurde ein Well ohne Kompetitor belassen, um eine vollständige Bindung des Radioliganden zu ermöglichen. Abschließend wurden die Filter mit PBS (1 \times 200 μL , 2 \times 100 μL) gewaschen um ungebundenes [^{125}I]I-EGF / [^{125}I]I-Echistatin zu entfernen, ausgestanzt und in einem Gammazähler gemessen. Die Berechnung der IC₅₀-Werte mittels nonlinearer Regressionsanalyse und die graphische Darstellung dieser erfolgte mit GraphPad Prism (v5.04).

6 Literaturverzeichnis

- [1] Tomasetti C., Li L., Vogelstein B. *Science* **2017**, Vol. 355, Issue 6331, 1330-1334, DOI: 10.1126/science.aaf9011.
- [2] Erdmann F., Spix C., Katalinic A., Christ M., Folkerts J. et al. Krebs in Deutschland für 2017/18 *Robert Koch-Institut* **2021**, 13. Ausgabe.
- [3] Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2021, 71 (3), S. 209-249, DOI: 10.3322/caac.21660.
- [4] Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation *Cell* **2011**, Vol. 144, Issue 5, 646-674, DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [5] Bedard P.L., Hansen A.R., Ratain M.J., Siu L.L. Tumour heterogeneity in the clinic *Nature* **2013**, 501, 7467, 355-364, DOI: 10.1038/nature12627.
- [6] Burrell R., McGranahan N., Bartek J. et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution *Nature* **2013**, 501, 338–345, DOI:10.1038/nature12625.
- [7] Rintu T., Zhang W. Rethink of EGFR in Cancer With Ist Kinase Independent Function on Board *Frontiers in Oncology* **2019**, Vol. 9, DOI: 10.3389/fonc.2019.00800.
- [8] Burgess A.W. EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic targets *Growth Factors* **2009**, Vol 26, Issue 5, DOI: 10.1080/08977190802312844.
- [9] Ullrich A., Coussens L., Hayflick J. et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells *Nature* **1984**, 309, 418–425, DOI: 10.1038/309418a0.
- [10] Bajaj M., Waterfield M.D., Schlessinger J., Taylor W.R., Blundell T. On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1987**, Vol. 916, Issue 2, 220-226, DOI: 10.1016/0167-4838(87)90112-9.
- [11] Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J-H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M., Yokoyama S. Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular

- Domains, *Cell* **2002**, Vol. 110, Issue 6, 775-787, DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00963-7.
- [12] Purba E.R., Saita E.I., Maruyama I.N. Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model" *Cells* **2017**, 6(2), 13, DOI: 10.3390/cells6020013.
- [13] Sako Y., Minoghchi S., Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol* **2000** Vol. 2, 168–172, DOI: 10.1038/35004044.
- [14] Chung I., Akita R., Vandlen R. et al. Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature* **2010** 464, 783–787, DOI: 10.1038/nature0882.
- [15] Dawson J. P., Berger M. B., Lin C.-C., Schlessinger J., Lemmon M. A., Ferguson K. M. Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Activation Require Ligand-Induced Conformational Changes in the Dimer Interface. *Molecular and Cellular Biology* **2005**, 25(17), 7734–7742, DOI:10.1128/MCB.25.17.7734-7742.2005.
- [16] Moriki T., Maruyama H., Maruyama I.N. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain *Journal of Molecular Biology* **2001**, 311(5), 0–1026, DOI:10.1006/jmbi.2001.4923.
- [17] Liu P., Cleveland T. E., Bouyain S., Byrne P. O., Longo P. A., Leahy D. J. A single ligand is sufficient to activate EGFR dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012** 109(27), 10861–10866, DOI:10.1073/pnas.1201114109.
- [18] Shimizu T., Izumi H., Oga A., Furumoto H., Murakami T., Ofuji R., Muto M., Sasaki K. Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression and Genetic Aberrations in Metastatic Squamous-Cell Carcinoma of the Skin *Dermatology* **2001**, 202:203-206, DOI: 10.1159/000051637.
- [19] Day K. C., Lorenzatti Hiles G., Kozminsky M., Dawsey S. J., Paul A., Broses L. J., Shah R., Kunju L. P., Hall C., Palanisamy N., Daignault-Newton S., El-Sawy L., Wilson S. J., Chou A., Ignatoski K. M., Keller E. T., Thomas D. G., Nagrath S., Morgan T. M., Day M. L. HER2 and EGFR overexpression support metastatic progression of prostate cancer to bone. *Cancer Research* **2016**, 0008-5472.CAN-16-1656, DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-1656.

-
- [20] Rodriguez-Antona C., Pallares J., Montero-Conde C., Inglada-Perez L., Castelblanco E., Landa I., Leskela S., Leandro-Garcia L. J., Lopez-Jimenez E., Leton R., Cascon A., Lerma E., Martin M C., Carralero M C., Mauricio D., Cruz Cigudosa J., Matias-Guiu X., Robledo M. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocrine Related Cancer* **2010**, 17(1), 7–16, DOI:10.1677/ERC-08-0304.
- [21] Di Lorenzo G., Tortora G., D'Armiento F.P., De Rosa G., Staibano S., Autorino R., D'Armiento M., De Laurentiis M., De Placido S., Catalano G., Bianco A.R., Ciardiello F. Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **2002**, 8(11):3438-44. PMID: 12429632.
- [22] Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2005**, 24(1):47-69, DOI:10.1007/s10555-005-5047-1.
- [23] Bloomston M., Bhardwaj A., Ellison E.C., Frankel W. L. Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Pancreatic Carcinoma Using Tissue Microarray Technique. *Dig Surg* **2006**, 23:74-79. DOI: 10.1159/000093497.
- [24] Dancer J., Takei H., Ro J., Lowery-Nordberg M. Coexpression of EGFR and HER-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: A comparative study using immunohistochemistry correlated with gene amplification by fluorescent in situ hybridization. *Oncology Reports* **2007** DOI:10.3892/or.18.1.151.
- [25] Uhlman D.L., Nguyen P., Manivel J.C., Zhang G., Hagen K., Fraley E., et al. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin Cancer Res.* **1995** 1:913–20, DOI:10.1016/S0046-8177(97)90198-2.
- [26] Hirsch F.R., Scagliotti G.V., Langer C.J., Varella-Garcia M., Franklin W.A. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* **2003** 41(), 29–42, DOI:10.1016/s0169-5002(03)00137-5.
- [27] Nishio M., Taguchi F., Ohyanagi F., Horikike A., Ishikawa Y., Satoh Y., Okumura S., Nakagawa K., Nishio K., Horai T. Gefitinib efficacy associated with multiple
-

- expression of HER family in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **2006**, 26(5B):3761-5. PMID: 17094398.
- [28] Suo Z.; Nesland J.M. Type 1 Protein Tyrosine Kinases in Breast Carcinoma: A Review. *Ultrastructural Pathology* **2002**, 26(3), 125–135, DOI:10.1080/01913120290076784.
- [29] Gonzalez-Conchas G. A., Rodriguez-Romo L., Hernandez Barajas D., Gonzalez-Guerrero J.F., Rodriguez-Fernandez I.A., Verdines-Perez A., Templeton A.J., Ocana A., Seruga B., Tannock I.F., Amir E.; Vera-Badillo F.E. Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression and Outcomes in Early Breast Cancer: A Systematic Review and a Meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*, **2017**, S0305737217301780, DOI:10.1016/j.ctrv.2017.10.008.
- [30] Spindler K.-L., Lindebjerg J., Nielsen J., Olsen D., Bisgård C., Brandslund I., Jakobsen A. Epidermal growth factor receptor analyses in colorectal cancer: A comparison of methods. *International Journal of Oncology* **2006**, DOI:10.3892/ijo.29.5.1159.
- [31] Carlsson J., Wester K., De La Torre M., Malmström, P.-U., Gårdmark T. EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides. *Radiology and Oncology* **2015**, 49(1), DOI:10.2478/raon-2014-0015.
- [32] Stadlmann S., Gueth U., Reiser U. et al. Epithelial growth factor receptor status in primary and recurrent ovarian cancer. *Mod Pathol* **2006**, Vol. 19, 607–610, DOI:10.1038/modpathol.3800575.
- [33] Maihle N. J., Baron A. T., Barrette B. A., Boardman C. H., Christensen T. A., Cora E. M., Faupel-Badger J. M., Greenwood T., Juneja S. C., Lafky J. M., Lee H., Reiter J. L., Podratz K. C. EGF/ErbB Receptor Family in Ovarian Cancer. *Ovarian Cancer* **2002**, Vol. 107, pp 247-258, DOI: 10.1007/978-1-4757-3587-1_11.
- [34] Kira S., Nakanishi T., Suemori S., Kitamoto M., Watanabe Y., Kajyama G. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma. *Liver* **1997**, Vol. 17, Iss. 4, 177-182, DOI:10.1111/j.1600-0676.1997.tb00803.x.

-
- [35] Ito Y., Takeda T., Sakon M., Tsujimoto M., Higashiyama S., Noda K., Miyoshi R., Monden M., Matsuura N. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer* **2001**, Vol. 84, 1377-1383, DOI: 10.1054/bjoc.2000.1580.
- [36] Daveau M., Scotte M., Francois A., Coulouran C., Ros G., Tallet Y., Hiron M., Hellot M-F., Salier J-P. Hepatocyte Growth Factor, Transforming Growth Factor α , and Their Receptors as Combined Markers of Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular carcinogenesis*, **2003**, Vol. 36, 130-141, DOI: 10.1002/mc.10103.
- [37] Kersemaekers A.M., Fleuren G.J., Kenter G.G., Van den Broek L.J., Uljee S.M., Hermans J. et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res.* **1999**, 5:577–86.
- [38] Kim M. A., Lee H. S., Lee H. E., Jeon Y. K., Yang H. K., Kim W. H. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology* **2008**, Vol. 52, Iss. 6, 738-746, DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03021.x.
- [39] Galizia G., Lieto E., Orditura M. et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression is Associated With a Worse Prognosis in Gastric Cancer Patients Undergoing Curative Surgery. *World J Surg* **2007**, 31, 1458–1468, DOI:10.1007/s00268-007-9016-4.
- [40] Wong A. J., Bigner S. H., Bigner D. D., Kinzler K. W., Hamilton S. R., Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *PNAS* **1987**, Vol. 84, Iss. 19, 6899-6903, DOI: 10.1073/pnas.84.19.6899.
- [41] Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* **1990**, Vol. 265, Iss. 14, 7709-7712, DOI: 10.1016/S0021-9258(19)38983-5
- [42] Bavaro T., Tengattini S., Rezwan R. et al. Design of epidermal growth factor immobilization on 3D biocompatible scaffolds to promote tissue repair and regeneration. *Sci Rep* **2021**, Vol 11, 2629, DOI:10.1038/s41598-021-81905-1.
- [43] Herbst R., Fukuoka M. & Baselga, J. Gefitinib — a novel targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer* **2004**, Vol. 4, 956–965, DOI:10.1038/nrc1506.
-

-
- [44] Bareschino M.A., Schettino C., Troiani T., Martinelli E., Morgillo F., Ciardiello F. Erlotinib in cancer treatment. *Ann Oncol.* **2007**, DOI: 10.1093/annonc/mdm222.
- [45] Blick S.K.A., Scott L.J. Cetuximab. *Drugs* **2007**, Vol. 67, 2585–2607, DOI:10.2165/00003495-200767170-00008.
- [46] Kirkpatrick P., Graham J., Muhsin M. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, Vol. 3, 549–550, DOI: 10.1038/nrd1445.
- [47] Rinne S. S., Orlova A., Tolmachev V. PET and SPECT Imaging of the EGFR Family (RTK Class I) in Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(7), 3663, DOI:10.3390/ijms22073663.
- [48] Li S., Schmitz K.R., Jeffrey P.D., Wiltzius J.J., Kussie P., Ferguson K.M. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell.* **2005**, Vol. 7(4):301-11, DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.003.
- [49] Wright N.M.A., Gross G.D. Third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research* **2019**, Vol 8., DOI:10.21037/tlcr.2019.06.01.
- [50] Diao L., Meibohm B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clin Pharmacokinet.* **2013**, Vol. 52(10):855-68, DOI: 10.1007/s40262-013-0079-0.
- [51] La Manna S., Di Natale C., Florio D., Marasco D. Peptides as Therapeutic Agents for Inflammatory-Related Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, Vol 19(9), 2714, DOI:10.3390/ijms19092714.
- [52] Song S., Liu D., Peng I-J., Xu Y. Peptide ligand targeted delivery to EGFR Expressing Cancer Cells in Vitro and in Vivo *International Conference on Biomedical and Pharmaceutical Engineering* **2006** pp. 490-493.
- [53] Song S., Liu D., Peng I-J., Deng H., Guo Y., Xu L., Miller A., Xu Y. Novel peptide ligand directs liposomes toward EGF-R high-expressing cancer cells in vitro and in vivo. *The FASEB Journal* **2009**, Vol. 23, Iss. 5, 1396-1404, DOI: 10.1096/fj.08-117002.
- [54] Kazemi Z., Zahmatkesh M.H., Abedi S.M., Hosseinimehr S.J.. Biological Evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-EDDA/tricine-(Ser)-D4 Peptide for Tumor

- Targeting. *Curr Radiopharm.* **2017**, 10(2):123-130, DOI: 10.2174/1874471010666170519165430.
- [55] Williams T.M., Sable R., Singh S., Vicente M.G.H., Jois S.D. Peptide ligands for targeting the extracellular domain of EGFR: Comparison between linear and cyclic peptides. *Chem Biol Drug Des.* **2018**, 91(2):605-619, DOI: 10.1111/cbdd.13125.
- [56] Zahmatkesh M.H., Abedi S.M., Hosseinimehr S.J. 99mTc-HYNIC-D4 Peptide: A New Small Radiolabeled Peptide for Non Small Cell Lung Tumor Targeting. *Anticancer Agents Med Chem.* **2017**, 17(5):734-740, DOI: 10.2174/1871520616666160907142130.
- [57] Zahmatkesh M.H., Abedi S.M., Hosseinimehr S.J. Preparation and biological evaluation of 99mTc-HYNIC-(Ser)3-D4 peptide for targeting and imaging of non-small-cell lung cancer. *Future Oncology* **2017**, Vol. 13, No. 10, DOI:10.2217/fon-2016-0426.
- [58] Tesauro D., Mastro R., Cusimano A. et al. Synthetic peptide-labelled micelles for active targeting of cells overexpressing EGF receptors. *Amino Acids* **2019**, Vol. 51, 1177–1185, DOI:10.1007/s00726-019-02755-w.
- [59] Williams T.M., Kaufman N.E.M., Zhou Z., Singh S.S., Jois S.D., Vicente M.D.G.H. Click Conjugation of Boron Dipyrromethene (BODIPY) Fluorophores to EGFR-Targeting Linear and Cyclic Peptides. *Molecules.* **2021**, Vol. 26(3):593, DOI: 10.3390/molecules26030593.
- [60] Mizuguchi T., Uchimura H., Kakizawa T., Kimura T., Yokoyama S., Kiso Y., Saito K. Inhibitory effect of a dimerization-arm-mimetic peptide on EGF receptor activation. *Bioorg Med Chem Lett.* **2009**, Vol. 19(12):3279-82, DOI:10.1016/j.bmcl.2009.04.080.
- [61] Toyama K., Mizuguchi T., Nomura W., Tamamura H. Functional evaluation of fluorescein-labeled derivatives of a peptide inhibitor of the EGF receptor dimerization. *Bioorg Med Chem.* **2016**, 24(16):3406-12, DOI:10.1016/j.bmc.2016.05.026.
- [62] Toyama K., Nomura W., Kobayakawa T., Tamamura H. Delivery of a proapoptotic peptide to EGFR-positive cancer cells by a cyclic peptide mimicking the dimerization arm structure of EGFR. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, 29(6):2050-7, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00250.

-
- [63] Zhou J., Joshi B.P., Duan X., Pant A., Qiu Z., Kuick R., Owens S.R., Wang T.D. EGFR Overexpressed in Colonic Neoplasia Can be Detected on Wide-Field Endoscopic Imaging. *Clin Transl Gastroenterol.* **2015**, 16;6(7):e101, DOI:10.1038/ctg.2015.28.
- [64] Gan B.K., Yong C.Y., Ho K.L. et al. Targeted Delivery of Cell Penetrating Peptide Virus-like Nanoparticles to Skin Cancer Cells. *Sci Rep* **2018**, Vol. 8, 8499, DOI:10.1038/s41598-018-26749-y.
- [65] Gan, B.K., Rullah, K., Yong, C.Y. et al. Targeted delivery of 5-fluorouracil-1-acetic acid (5-FA) to cancer cells overexpressing epithelial growth factor receptor (EGFR) using virus-like nanoparticles. *Sci Rep* **2020**, Vol. 10, 16867, DOI: 10.1038/s41598-020-73967-4.
- [66] Komoriya A., Hortsch M., Meyers C., Smith M., Kanety H., Schlessinger J. Biologically active synthetic fragments of epidermal growth factor: localization of a major receptor-binding region. *PNAS* **1984**, Vol 81, No. 5, 1351-1355, DOI:10.1073/pnas.81.5.1351
- [67] Jeong M-H., Kim K., Kim E-M., Cheong S-J., Lee C-H., Jeong H-J., Kim D.W., Lim S.T., Sohn M-H., Chung J. In vivo and in vitro evaluation of Cy5.5 conjugated epidermal growth factor receptor binding peptide. *Nuclear Medicine and Biology* **2012**, Vol. 39, Iss. 6, 805-812, DOI:10.1016/j.nucmedbio.2012.01.001.
- [68] Li Z., Zhao R., Wu X., Sun Y., Yao M., Li J., Xu Y., Gu J. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *The FASEB Journal* **2005**, 19: 1978-1985., DOI:10.1096/fj.05-4058com.
- [69] Dissoki S., Hagooly A., Elmachily S., Mishani E. Labeling approaches for the GE11 peptide, an epidermal growth factor receptor biomarker. *J. Label Compd. Radiopharm* **2011**, 54: 693-701, DOI:10.1002/jlcr.1910.
- [70] Dejesus O.T. Synthesis of [64Cu]Cu-NOTA-Bn-GE11 for PET imaging of EGFR-rich tumors. *Curr Radiopharm.* **2012**, 5(1):15-8, DOI:10.2174/1874471011205010015.
- [71] Abourbeh G., Shir A., Mishani E., Ogris M., Rödl W., Wagner E., Levitzki A. PolyIC GE11 polyplex inhibits EGFR-overexpressing tumors. *IUBMB Life* **2012**, 64: 324-330, DOI:10.1002/iub.1002.
-

-
- [72] Yu H-M., Chen J-H., Lin K-L., Lin W-J. Synthesis of ⁶⁸Ga-labeled NOTA-RGD-GE11 heterodimeric peptide for dual integrin and epidermal growth factor receptor-targeted tumor imaging. *J. Label Compd. Radiopharm* **2015**, 58, 299–303. DOI: 10.1002/jlcr.3296.
- [73] Rahmanian N., Hosseinimehr S.J., Khalaj A. et al. ^{99m}Tc-radiolabeled GE11-modified peptide for ovarian tumor targeting. *DARU J Pharm Sci* **2017**, Vol. 25, 13, DOI:10.1186/s40199-017-0179-8.
- [74] Genta I., Chiesa E., Colzani B., Modena T., Conti B., Dorati R. GE11 Peptide as an Active Targeting Agent in Antitumor Therapy: A Minireview. *Pharmaceutics*. **2018**, 10(1):2, DOI:10.3390/pharmaceutics10010002.
- [75] Chien-Jen Chen, Chen-Hsin Chan, Kun-Liang Lin, Jyun-Hong Chen, Chun-Hao Tseng, Ping-Yen Wang, Chuan-Yi Chien, Hung-Man Yu, Lin W-J. ⁶⁸Ga-labelled NOTA-RGD-GE11 peptide for dual integrin and EGFR-targeted tumour imaging. *Nuclear Medicine and Biology* **2019**, Vol. 68–69, DOI:10.1016/j.nucmedbio.2018.11.003.
- [76] Chiesa E., Pisani S., Colzani B., Dorati R., Conti B., Modena T., Braeckmans K., Genta I. Intra-Articular Formulation of GE11-PLGA Conjugate-Based NPs for Dexamethasone Selective Targeting — In Vitro Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19(8):2304, DOI:10.3390/ijms19082304.
- [77] Rahmanian N., Hosseinimehr S.J., Khalaj A. et al. ^{99m}Tc labeled HYNIC-EDDA/tricine-GE11 peptide as a successful tumor targeting agent. *Med Chem Res* **2018**, Vol. 27, 890–902, DOI:10.1007/s00044-017-2111-7.
- [78] Jiao H., Zhao X., Han J., Zhang J., Wang J. Synthesis of a novel ^{99m}Tc labeled GE11 peptide for EGFR SPECT imaging. *International Journal of Radiation Biology* **2019**, Vol. 96, Iss. 11, 1443-1451, DOI:10.1080/09553002.2020.1811419.
- [79] Li X., Hu K., Liu W., Wei Y., Sha R., Long Y., Han Y., Sun P., Wu H., Li G., Tang G., Huang S. Synthesis and evaluation of [¹⁸F]FP-Lys-GE11 as a new radiolabeled peptide probe for epidermal growth factor receptor (EGFR) imaging. *Nuclear Medicine and Biology* **2020**, Vol. 90–91,2020, 84-92, DOI:10.1016/j.nucmedbio.2020.10.004.
- [80] Williams T.M., Kaufman N.E.M., Zhou Z., Singh S.S., Jois S.D., Vicente M.dG.H.. Click Conjugation of Boron Dipyrromethene (BODIPY) Fluorophores
-

- to EGFR-Targeting Linear and Cyclic Peptides. *Molecules* **2021**, 26(3):593, DOI:10.3390/molecules26030593.
- [81] Hamzeh-Mivehroud M., Mahmoudpour A., Dastmalchi S. Identification of New Peptide Ligands for Epidermal Growth Factor Receptor Using Phage Display and Computationally Modeling their Mode of Binding. *Chemical Biology & Drug Design* **2012**, 79: 246-259, DOI:10.1111/j.1747-0285.2011.01282.x.
- [82] Kim M.H., Kim S.G., Kim D.W. A novel dual-labeled small peptide as a multimodal imaging agent for targeting wild-type EGFR in tumors. *PLoS One* **2022**, 17(2):e0263474, DOI:10.1371/journal.pone.0263474.
- [83] Ulfo L., Cantelli A., Petrosino A., Costantini P.E., Nigro M., Starinieri F., Turrini E., Zadran S., Zuccheri G., Saporetti R., Di giosia M., Danielli A., Calvaresi M. Orthogonal Nanoarchitectonics of M13 Phage for Receptor Targeted Anticancer Photodynamic Therapy. *Nanoscale* **2021**, DOI:10.1039/D1NR06053H.
- [84] Ulfo L., Costantini P.E., Di Giosia M., Danielli A., Calvaresi M. EGFR-Targeted Photodynamic Therapy. *Pharmaceutics* **2022**, 14(2):241, DOI:10.3390/pharmaceutics14020241.
- [85] Furman O., Zaporozhets A., Tobi D., Bazylevich A., Firer M.A., Patsenker L., Gellerman G., Lubin B.C.R. Novel Cyclic Peptides for Targeting EGFR and EGRvIII Mutation for Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, 14(7):1505, DOI:10.3390/pharmaceutics14071505.
- [86] Sachdeva S., Joo H., Tsai J. *et al.* A Rational Approach for Creating Peptides Mimicking Antibody Binding. *Sci Rep* **2019**, Vol. 9, 997, DOI:10.1038/s41598-018-37201-6.
- [87] Smith G.P., Petrenko V.A. Phage Display. *Chem. Rev.* **1997**, Vol. 97, 2, 391-410, DOI:10.1021/cr960065d.
- [88] Willats W.G. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* **2002**, **50**, 837–854, DOI:10.1023/A:1021215516430.
- [89] Smith. G.P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* **1985**, Vol. 228, Iss 4705, 1315-1317, DOI:10.1126/science.4001944.
- [90] Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H.R. Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annual Review of Immunology* **1994**, Vol12:433-455, DOI:10.1146/annurev.iy.12.040194.002245.

-
- [91] Kay B.K., Hoess R.H. CHAPTER 2 - Principles and Applications of Phage Display. *Phage Display of Peptides and Proteins* **1996**, pp 21-34, DOI:10.1016/B978-012402380-2/50004-6.
- [92] Hufton S.E., Moerkerk P.T., Meulemans E.V., de Bruïne A., Arends J-W., Hoogenboom H.R.. Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *Journal of Immunological Methods* **1999**, Vol. 231, Iss. 1–2, pp 39-51, DOI:10.1016/S0022-1759(99)00139-8.
- [93] Lunder M., Bratkovič T., Doljak B. *et al.* Comparison of bacterial and phage display peptide libraries in search of target-binding motif. *Appl Biochem Biotechnol* **2005**, Vol.127, 125–131, DOI:10.1385/ABAB:127:2:125.
- [94] Sofi M.Y., Shafi A., Masoodi K.Z. Bioinformatics for Everyone. **2021**, DOI:10.1016/C2020-0-03935-6.
- [95] Charron C.L., Hickey J.L., Nsiama T.K., Cruickshank D.R., Turnbull W.L., *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 761-800, DOI: 10.1039/C5NP00083A
- [96] Reisinger I., Bohuslavitzki K.H., Brenner W., Braune S., Dittrich I., Geide A., Kettner B., Otto H-J., Schmidt S., Munz D.L. *Journal of Nuclear Medicine February* **1998**, 39 (2) 224-227.
- [97] Yang B., Gelfanov V.M., Perez-Tilve D., DuBois B., Rohlf s R., Levy J., Douros J.D., Finan B., Mayer J.P., DiMarchi R.D. Optimization of Truncated Glucagon Peptides to Achieve Selective, High Potency, Full Antagonists. *J. Med. Chem.* **2021**, 64, 8, 4697–4708, DOI:10.1021/acs.jmedchem.0c02069.
- [98] Shukla V., Zheng Y.-L., Mishra S.K., Amin N.D., Steiner J., Grant P., Kesavapany S., Pant H.C. A truncated peptide from p35, a Cdk5 activator, prevents Alzheimer's disease phenotypes in model mice. *The FASEB Journal* **2013**, 27: 174-186, DOI:10.1096/fj.12-217497.
- [99] Ai S., Duan J., Liu X., Bock S., Tian Y., Huang Z. Biological Evaluation of a Novel Doxorubicin–Peptide Conjugate for Targeted Delivery to EGF Receptor-Overexpressing Tumor Cells. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, 8, 2, 375–386, DOI:10.1021/mp100243j.
- [100] Herzog H. Methods and applications of positron-based medical imaging. *Radiation Physics and Chemistry* **2007**, Vol. 76, Iss. 2, 337-342, DOI:10.1016/j.radphyschem.2006.03.063.
-

- [101] Masselli G., De Angelis C., Sollaku S., Casciani E., Gualdi G. PET/CT in pediatric oncology. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. **2020**, 10(2):83-94. PMID: 32419977 ; PMID: PMC7218696.
- [102] Delbeke D., Schöder H., Martin W.H., Wahl R.L. Hybrid Imaging (SPECT/CT and PET/CT): Improving Therapeutic Decisions. *Seminars in Nuclear Medicine* **2009**, Vol. 39, Iss. 5, DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2009.03.002.
- [103] Muzic R.F., DiFilippo F.P. Positron Emission Tomography-Magnetic Resonance Imaging: Technical Review. *Seminars in Roentgenology* **2014**, Vol. 49, Iss. 3, pp 242-254, DOI:10.1053/j.ro.2014.10.001.
- [104] Herzog H., Roesch F. PET- und SPECT-Technik: Chemie und Physik der Bildgebung. *Pharmazie in unserer Zeit* **2005**, 34(6):468-473, DOI:10.1002/pauz.200500144.
- [105] Hicks R., Hofman M. Is there still a role for SPECT–CT in oncology in the PET–CT era?. *Nat Rev Clin Oncol* **2012**, Vol. 9, 712–720, DOI:10.1038/nrclinonc.2012.188.
- [106] Hämisch Y., Egger M. Positronenemissionstomographie (PET) kombiniert mit Computertomographie (PET-CT) — Hybridbildgebung zur funktionalen Diagnostik und Therapiemanagement. Ein technologischer überblick. *Medizintechnik* **2007**, DOI:10.1007/978-3-540-34103-1_17.
- [107] James M.L., Gambhir S.S. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev*. **2012**, 92(2):897-965, DOI:10.1152/physrev.00049.2010.
- [108] Crişan G., Moldovean-Cioroianu N.S., Timaru D.G., Andrieş G., Căinap C., Chiş V. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT Imaging: A Literature Review over the Last Decade. *Int J Mol Sci*. **2022**, 30;23(9):5023, DOI:10.3390/ijms23095023.
- [109] Badawi R.D., Kohlmyer S.G., Harrison R.L., Vannoy S.D., Lewellen T.K. The effect of camera geometry on singles flux, scatter fraction and trues and randoms sensitivity for cylindrical 3D PET—a simulation study. IEEE Nuclear Science Symposium. *Conference Record*. **1999**, Vol. 3, 1522-1526, DOI:10.1109/NSSMIC.1999.842848.
- [110] Pichler B.J., Wehrl H.F., Judenhofer M.S. Latest advances in molecular imaging instrumentation. *J Nucl Med*. **2008**, Vol. 49, Suppl 2:5S-23S, DOI:10.2967/jnumed.108.045880.

-
- [111] Hofman M.S., Hicks R.J. Gallium-68 EDTA PET/CT for Renal Imaging. *Semin Nucl Med.* **2016**, 46(5):448-61, DOI:10.1053/j.semnuclmed.2016.04.002.
- [112] Moghbel M., Newberg A., Alavi A. Positron emission tomography: ligand imaging. *Handb Clin Neurol.* **2016**, 135:229-240, DOI:10.1016/B978-0-444-53485-9.00012-X
- [113] Conti P.S., Lilien D.L., Hawley K., Keppler J., Grafton S.T., Bading J.R. PET and [18F]-FDG in oncology: A clinical update. *Nuclear Medicine and Biology* **1996**, Vol. 23, Iss. 6, 717-735, DOI:10.1016/0969-8051(96)00074-1.
- [114] Segobin S., La Joie R., Ritz L. FDG-PET Contributions to the Pathophysiology of Memory Impairment. *Neuropsychol Rev* **2015**, Vol. 25, 326–355, DOI:10.1007/s11065-015-9297-6.
- [115] Ismet S. PET imaging in neurology: Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nuclear Medicine Communications* **2015**, Vol. 36, Nr. 8, pp. 775-781(7), DOI:10.1097/MNM.0000000000000320.
- [116] Burneo J., Poon R., Kellett S., Snead O. The Utility of Positron Emission Tomography in Epilepsy. *Canadian Journal of Neurological Sciences* **2015**, 42(6), 360-371, DOI:10.1017/cjn.2015.279.
- [117] Vaidyanathan S., Patel C.N., Scarsbrook A.F., Chowdhury F.U. FDG PET/CT in infection and inflammation—current and emerging clinical applications. *Clinical Radiology* **2015**, Vol. 70, Iss. 7,787-800, DOI:10.1016/j.crad.2015.03.010.
- [118] Wadsak W., Mitterhauser M. Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. *European Journal of Radiology* **2010**, Vol. 73, Iss. 3, pp. 461-469, DOI:10.1016/j.ejrad.2009.12.022.
- [119] Neels O., Kratochwil C., Patt M. Aktuelle radiopharmazeutische Entwicklungen für die theranostische Anwendung. *Der Nuklearmediziner* **2021**, 44(02): 135-151, DOI:10.1055/a-1474-8976.
- [120] Jødal L. Beta emitters and radiation protection, *Acta Oncologica* **2009**, 48:2, 308-313, DOI: 10.1080/02841860802245163.
- [121] Bartholomä M.D., Vortherms A.R., Hillier S., Joyal J., Babich J., Doyle R.P., Zubieta J. Synthesis, cytotoxicity and cellular uptake studies of N3 functionalized Re(CO)₃ thymidine complexes. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 6216-6225, DOI:10.1080/02841860802245163.
-

- [122] Holland J.P., Williamson M.J., Lewis J.S. Unconventional Nuclides for Radiopharmaceuticals. *Molecular Imaging* **2010**, Vol. 9, No 1, pp 1–20, DOI:10.2310/7290.2010.00008.
- [123] Ku A., Facca V.J., Cai Z. et al. Auger electrons for cancer therapy – a review. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2019**, Vol. 4, 27, DOI:10.1186/s41181-019-0075-2.
- [124] Velikyan I. Prospective of ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical Developmen. *Theranostics* **2014**, 4(1): 47–80, DOI:10.7150/thno.7447.
- [125] Gleason G.I. A positron cow. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1960**, Vol. 8, Iss. 2–3, pp. 90-94, DOI:10.1016/0020-708X(60)90052-1.
- [126] Barrall R.C., Chakalian V.M., Colombetti L.G., Finston R.A. Purity Tests of a ⁶⁸Ge-⁶⁸Ga Generator. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1971**, Vol. 22, pp. 149-154, DOI:10.1016/0020-708X(71)90117-7.
- [127] Rösch F. Past, present and future of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators. *Applied Radiation and Isotopes* **2013**, Vol. 76, pp. 24-30, DOI:10.1016/j.apradiso.2012.10.012.
- [128] B. J. Krause B.J., Beyer T., Bockisch A., Delbeke D., Kotzerke J., Minkov V., Reiser M., Willich N. FDG-PET/CT in der Onkologie. *Nuklearmedizin* **2007**, 46(06): 291-301, DOI:10.3413/nukmed-282.
- [129] Yao R., Lecomte R., Crawford E.S. Small-Animal PET: What Is It, and Why Do We Need It?. *Journal of Nuclear Medicine Technology* **2012**, 40 (3) 157-165, DOI: 10.2967/jnmt.111.098632.
- [130] Greene M.W, Tucker W.D. AN IMPROVED GALLIUM-68 COW. *Intern. J. Appl. Radiation and Isotopes* **1961**, DOI:10.1016/0020-708X(61)90034-5
- [131] Yano Y., Anger H.O. A GALLIUM-68 POSITRON COW FOR MEDICAL USE. *J Nucl Med.* **1964**, 5:484-7. PMID: 14191416
- [132] Fani M., Mansi R., Nicolas G.P., Wild D. Radiolabeled Somatostatin Analogs—A Continuously Evolving Class of Radiopharmaceuticals. *Cancers* **2022**, 14(5):1172, DOI:10.3390/cancers14051172.
- [133] Hennrich U., Eder M. [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11: The First FDA-Approved ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* **2021**, 14(8):713, DOI:10.3390/ph14080713.
- [134] Martell A.E., Motekaitis R.J., Clarke E.T., Delgado R., Sun Y., Ma R. Stability constants of metal complexes of macrocyclic ligands with pendant donor groups.

- Supramolecular Chemistry* **1996**, 6:3-4, 353-363, DOI: 10.1080/10610279608032555.
- [135] Naderi M., Zolghadri S., Yousefnia H., Ramazani A., Jalilian A.R. Preclinical Study of ⁶⁸Ga-DOTATOC: Biodistribution Assessment in Syrian Rats and Evaluation of Absorbed Dose in Human Organs. *Oceania J Nucl Med Biol.* **2016**, 4(1):19-29, DOI:107508/aojnmb.2016.04.004.
- [136] Chitambar C.R., Gallium and its competing roles with iron in biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2016**, Vol. 1863, Iss. 8, pp. 2044-2053, DOI:10.1016/j.bbamcr.2016.04.027.
- [137] Tsan M.F. Mechanism of gallium-67 accumulation in inflammatory lesions. *J Nucl Med.* **1985**, 26(1):88-92. PMID: 3880816.
- [138] Love C., Palestro C.J. Radionuclide imaging of infection. *J Nucl Med Technol.* **2004**, 32(2):47-57; quiz 58-9. PMID: 15175400.
- [139] Bleeker-Rovers C.P., Vos F.J., van der Graaf W.T.A., Oyen W.J.G. Nuclear Medicine Imaging of Infection in Cancer Patients (With Emphasis on FDG-PET). *The Oncologist* **2011**, Vol. 16, Iss. 7, pp 980–991, DOI:10.1634/theoncologist.2010-0421 .
- [140] Mohtavinejad N., Ardestani M.S., Khalaj A., Pormohammad A., Najafi R., Bitarafan-Rajabi A., Hajiramezanali M., Amanlou M. Application of radiolabeled peptides in tumor imaging and therapy. *Life Sciences* **2020**, Vol. 258, 118206, DOI:10.1016/j.lfs.2020.118206.
- [141] Li X., Cai H., Wu X., Li L., Wu H., Tian R. New Frontiers in Molecular Imaging Using Peptide-Based Radiopharmaceuticals for Prostate Cancer. *Front. Chem.* **2020**, 8:583309, DOI: 10.3389/fchem.2020.583309.
- [142] Sun Y., Ma X., Zhang Z., Sun Z., Loft M, Ding B., Liu C., Xu L., Yang M., Jiang Y., Liu J., Xiao Y., Cheng Z., Hong Y. Preclinical Study on GRPR-Targeted ⁶⁸Ga-Probes for PET Imaging of Prostate Cancer. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, 27 (8), 1857-1864, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00279
- [143] Hu K., Ma X, Xie L., Zhang Y., Hanyu M., Obata H., Zhang L., Nagatsu K., Suzuki H., Shi R., Wang W., Zhang M-R. Development of a Stable Peptide-Based PET Tracer for Detecting CD133-Expressing Cancer Cells. *ACS Omega* **2022**, 7 (1), 334-341, DOI: 10.1021/acsomega.1c04711.

- [144] Trotta A.M., Aurilio M., D'Alterio C., Ieranò C., Di Martino D., Barbieri A., Luciano A., Gaballo P., Santagata S., Portella L., Tomassi S., Marinelli L., Sementa D., Novellino E., Lastoria S., Scala S., Schottelius M., Di Maro S. Novel Peptide-Based PET Probe for Non-invasive Imaging of C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4) in Tumors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 64 (6), 3449-3461, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00066.
- [145] Aschoff P., Plathow C., Lichy M.P., Öksüz M.Ö., Erb G., Claussen C.D., Pfannenbergl C. FDG-PET/CT zur Beurteilung von Leberläsionen: Klinisch relevante Beeinflussung der CT-basierten Schwächungskorrektur durch Gabe von intravenösem Kontrastmittel mit hoher Jodkonzentration?. *RöFo* **2008**, 180 - VO_311_1, DOI:10.1055/s-2008-1073676.
- [146] Ozaki K., Harada K., Terayama N. et al. FDG-PET/CT imaging findings of hepatic tumors and tumor-like lesions based on molecular background. *Jpn J Radiol* **2020**, 38, 697–718, DOI:10.1007/s11604-020-00961-1.
- [147] Mena E., Lindenberg M.L., Turkbey I.B., Shih J.H., Harmon S.A., Lim I., Lin F., Adler S., Eclarinal P., McKinney Y.L., Citrin D., Dahut W., Wood B.J., Krishnasamy V., Chang R., Levy E., Merino M., Pinto P., Eary J.F., Choyke P.L. 18F-DCFPyL PET/CT Imaging in Patients with Biochemically Recurrent Prostate Cancer After Primary Local Therapy. *Journal of Nuclear Medicine Jun* **2020**, 61 (6) 881-889, DOI: 10.2967/jnumed.119.234799.
- [148] Eiber M., Maurer T., Souvatzoglou M., Beer A.J., Ruffani A., Haller B., Graner F.P., Kübler H., Haberkorn U., Eisenhut M., Wester H.J., Gschwend J.E., Schwaiger M. Evaluation of Hybrid ⁶⁸Ga-PSMA Ligand PET/CT in 248 Patients with Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. *J Nucl Med.* **2015**, 56(5):668-74, DOI: 10.2967/jnumed.115.154153.
- [149] Touijer K.A., Michaud L., Alvarez H.A.V., Gopalan A., Kossatz S., Gonen M., Beattie B., Sandler I., Lyaschenko S., Eastham J.A., Scardino P.T., Hricak H., Weber W.A. Prospective Study of the Radiolabeled GRPR Antagonist BAY86-7548 for Positron Emission Tomography/Computed Tomography Imaging of Newly Diagnosed Prostate Cancer. *European Urology Oncology* **2019**, Vol. 2, Iss. 2, pp 166-173, DOI:10.1016/j.euo.2018.08.011.
- [150] Dimitrakopoulou-Strauss A., Hohenberger P., Haberkorn U., Mäcke H.R., Eisenhut M., Strauss L.G. ⁶⁸Ga-Labeled Bombesin Studies in Patients with

- Gastrointestinal Stromal Tumors: Comparison with 18F-FDG. *Journal of Nuclear Medicine* **2007**, 48 (8) 1245-1250; DOI: 10.2967/jnumed.106.03809.
- [151] Wieser G., Mansi R., Grosu A.L., Schultze-Seemann W., Dumont-Walter R.A., Meyer P.T., Maecke H.R., Reubi J.C., Weber W.A. Positron Emission Tomography (PET) Imaging of Prostate Cancer with a Gastrin Releasing Peptide Receptor Antagonist - from Mice to Men. *Theranostics* **2014**, 4(4): 412–419, DOI:10.7150/thno.7324.
- [152] Geijer H., Breimer L.H. Somatostatin receptor PET/CT in neuroendocrine tumours: update on systematic review and meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2013**, Vol. 40, 1770–1780, DOI:10.1007/s00259-013-2482-z.
- [153] Beer A.J., Grosu A-L., Carlsen J., Kolk A., Sarbia M., Stangier I., Watzlowik P., Wester H-J., Haubner R., Schwaiger M. [18F]Galacto-RGD Positron Emission Tomography for Imaging of $\alpha v \beta 3$ Expression on the Neovasculature in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res* **2007**, 13 (22): 6610–6616, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-0528.
- [154] Minamimoto R., Jamali M., Barkhodari A. et al. Biodistribution of the 18F-FPPRGD2 PET radiopharmaceutical in cancer patients: an atlas of SUV measurements. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2015**, 42, 1850–1858, DOI:10.1007/s00259-015-3096-4.
- [155] Mena E., Owenius R., Turkbey B., Sherry R., Bratslavsky G., Macholl S., Miller M.P., Somer E.J., Lindenberg L., Adler S., Shih J., Choyke P., Kurdziel K. [18F]Fluciclatide in the in vivo evaluation of human melanoma and renal tumors expressing $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2014**, 41:1879–1888, DOI:10.1007/s00259-014-2791-x.
- [156] Lapa C., Lückerrath K., Kleinlein I., Monoranu C.M., Linsenmann T., Kessler A.F., Rudelius M., Kropf S., Buck A.K., Ernestus R-I., Wester H-J., Löhr M., Herrmann K. 68Ga-Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor 4 Expression in Glioblastoma. *Theranostics* **2016**, 6(3): 428–434, DOI:10.7150/thno.13986.
- [157] Verlander M. Industrial Applications of Solid-Phase Peptide Synthesis – A Status Report. *Int J Pept Res Ther* 2007, 13, 75–82, DOI:10.1007/s10989-006-9075-7.

- [158] Merrifield R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963** 85 (14), 2149-2154, DOI: 10.1021/ja00897a025.
- [159] Amblard M., Fehrentz J.A., Martinez J. et al. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol Biotechnol* **2006**, 33, 239–254, DOI:10.1385/MB:33:3:239.
- [160] Al Musaimi O., Basso A., de la Torre B.G., Albericio F. Calculating Resin Functionalization in Solid-Phase Peptide Synthesis Using a Standardized Method based on Fmoc Determination. *ACS Combinatorial Science* **2019**, 21 (11), 717-721, DOI: 10.1021/acscombsci.9b00154.
- [161] Pearson D.A., Blanchette M., Baker M.L., Guindon C.A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1989**, 1;30(21):2739-42, DOI: 10.1016/S0040-4039(00)99113-5.
- [162] Wang L., Wang N., Zhang W., Cheng X., Yan Z., Shao G., Wang X., Wang R., Fu C. Therapeutic peptides: Current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022**, 14;7(1):48, DOI:10.1038/s41392-022-00904-4.
- [163] Laps S., Satish G., Brik A. Harnessing the power of transition metals in solid-phase peptide synthesis and key steps in the (semi) synthesis of proteins. *Chemical Society Reviews* **2021**, 50(4):2367-87, DOI:10.1039/D0CS01156H.
- [164] Wellings D.A., Atherton E. Standard Fmoc protocols. *Methods in enzymology* **1997**, 289:44-67, DOI:10.1016/s0076-6879(97)89043-x.
- [165] Pedersen S.L., Tofteng A.P., Malik L., Jensen K.J. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chemical Society Reviews*. **2012**, 41(5):1826-44, DOI:10.1039/C1CS15214A .
- [166] Takahashi S., Shimonishi Y. Solid phase peptide synthesis using ultrasonic waves. *Chemistry Letters* **1974**, 3(1):51-6, DOI:10.1246/cl.1974.51.
- [167] Raheem S.J., Schmidt B.W., Solomon V.R., Salih A.K., Price E.W. Ultrasonic-Assisted Solid-Phase Peptide Synthesis of DOTA-TATE and DOTA-linker-TATE Derivatives as a Simple and Low-Cost Method for the Facile Synthesis of Chelator–Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2020**, 32(7):1204-13, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.0c00325.

-
- [168] Merlino F., Tomassi S., Yousif A.M., Messere A., Marinelli L., Grieco P., Novellino E., Cosconati S., Di Maro S. Boosting Fmoc solid-phase peptide synthesis by ultrasonication. *Organic letters* **2019**, 21(16):6378-82, DOI:10.1021/acs.orglett.9b02283.
- [169] Wołczański G., Płóciennik H., Lisowski M., Stefanowicz P. A faster solid phase peptide synthesis method using ultrasonic agitation. *Tetrahedron Letters* **2019**, 60(28):1814-8, DOI:10.1016/j.tetlet.2019.05.069.
- [170] Summer D., Kroess A., Woerndle R., Rangger C., Klingler M., Haas H., Kremser L., Lindner H.H., von Guggenberg E., Decristoforo C. Multimerization results in formation of re-bindable metabolites: A proof of concept study with FSC-based minigastrin imaging probes targeting CCK2R expression. *PLoS One* **2018**, 13(7):e0201224, DOI:10.1371/journal.pone.0201224.
- [171] Summer D., Rangger C., Klingler M., Laverman P., Franssen G.M., Lechner B.E., Orasch T., Haas H., von Guggenberg E., Decristoforo C. Research Article Exploiting the Concept of Multivalency with ⁶⁸Ga- and ⁸⁹Zr-Labelled Fusarinine C-Minigastrin Bioconjugates for Targeting CCK2R Expression, **2018** DOI:10.1155/2018/3171794.
- [172] Reubi J.C., Fleischmann A., Waser B., Rehmann R. Concomitant vascular GRP-receptor and VEGF-receptor expression in human tumors: Molecular basis for dual targeting of tumoral vasculature. *Peptides* **2011**, 32(7):1457-62, DOI:10.1016/j.peptides.2011.05.007.
- [173] Reubi J.C., Maecke H.R. Approaches to multireceptor targeting: hybrid radioligands, radioligand cocktails, and sequential radioligand applications. *Journal of Nuclear Medicine* **2017**, 58(Supplement 2):10S-6S, DOI:10.2967/jnumed.116.186882.
- [174] Mannweiler S., Amersdorfer P., Trajanoski S., Terrett J.A., King D., Mehes G. Heterogeneity of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate carcinoma with distant metastasis. *Pathology & Oncology Research* **2009**, 15:167-72, DOI:10.1007/s12253-008-9104-2.
- [175] Ananias H.J., van den Heuvel M.C., Helfrich W., de Jong I.J. Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer. *The Prostate* **2009**, 69(10):1101-8, DOI:10.1002/pros.20957.
-

- [176] Judmann B., Braun D., Wängler B., Schirmmacher R., Fricker G., Wängler C. Current state of radiolabeled heterobivalent peptidic ligands in tumor imaging and therapy. *Pharmaceuticals* **2020**, 13(8):173, DOI:10.3390/ph13080173.
- [177] Zhang J., Niu G., Lang L., Li F., Fan X., Yan X., Yao S., Yan W., Huo L., Chen L., Li Z. Clinical translation of a dual integrin $\alpha\beta 3$ –and gastrin-releasing peptide receptor–targeting PET radiotracer, ^{68}Ga -BBN-RGD. *Journal of Nuclear Medicine* **2017**, 58(2):228-34, DOI:10.2967/jnumed.116.177048.
- [178] Zhang J., Mao F., Niu G., Peng L., Lang L., Li F., Ying H., Wu H., Pan B., Zhu Z., Chen X. ^{68}Ga -BBN-RGD PET/CT for GRPR and integrin $\alpha\beta 3$ imaging in patients with breast cancer. *Theranostics* **2018**, 8(4):1121, DOI:10.7150/thno.22601.
- [179] Fischer G., Schirmmacher R., Wängler B., Wängler C. Radiolabeled heterobivalent peptidic ligands: an approach with high future potential for in vivo imaging and therapy of malignant diseases. *ChemMedChem* **2013**, 8(6):883-90, DOI:10.1002/cmdc.201300081.
- [180] Bandari R.P., Jiang Z., Reynolds T.S., Bernskoetter N.E., Szczodroski A.F., Bassuner K.J., Kirkpatrick D.L., Rold T.L., Sieckman G.L., Hoffman T.J., Connors J.P. Synthesis and biological evaluation of copper-64 radiolabeled [DUPA-6-Ahx-(NODAGA)-5-Ava-BBN (7-14) NH₂], a novel bivalent targeting vector having affinity for two distinct biomarkers (GRPr/PSMA) of prostate cancer. *Nuclear medicine and biology* **2014**, 41(4):355-63, DOI:10.1016/j.nucmedbio.2014.01.001.
- [181] Eder M., Schäfer M., Bauder-Wüst U., Haberkorn U., Eisenhut M., Kopka K. Preclinical evaluation of a bispecific low-molecular heterodimer targeting both PSMA and GRPR for improved PET imaging and therapy of prostate cancer. *The Prostate* **2014**, 74(6):659-68, DOI: 10.1002/pros.22784.
- [182] Liolios C., Schafer M., Haberkorn U., Eder M., Kopka K. Novel bispecific PSMA/GRPr targeting radioligands with optimized pharmacokinetics for improved PET imaging of prostate cancer. *Bioconjugate Chemistry*. **2016**, 27(3):737-51, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00687.
- [183] Mendoza-Figueroa M.J., Escudero-Castellanos A., Ramirez-Nava G.J., Ocampo-García B.E., Santos-Cuevas C.L., Ferro-Flores G., Pedraza-Lopez M., Avila-Rodriguez M.A. Preparation and preclinical evaluation of ^{68}Ga -iPSMA-BN as a

- potential heterodimeric radiotracer for PET-imaging of prostate cancer. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2018**, 318:2097-105, DOI:10.1007/s10967-018-6285-3.
- [184] Escudero-Castellanos A., Ocampo-García B., Ferro-Flores G., Santos-Cuevas C., Morales-Ávila E., Luna-Gutiérrez M., Isaac-Olivé K. Synthesis and preclinical evaluation of the ¹⁷⁷Lu-DOTA-PSMA (inhibitor)-Lys3-bombesin heterodimer designed as a radiotheranostic probe for prostate cancer. *Nuclear Medicine Communications* **2019**, 40(3):278-86, DOI:10.1097/MNM.0000000000000966.
- [185] Mitran B., Varasteh Z., Abouzayed A., Rinne S.S., Puuvuori E., De Rosa M., Larhed M., Tolmachev V., Orlova A., Rosenström U. Bispecific GRPR-antagonistic anti-PSMA/GRPR heterodimer for PET and SPECT diagnostic imaging of prostate cancer. *Cancers* **2019**, 11(9):1371, DOI:10.3390/cancers11091371.
- [186] Li Z.B., Wu Z., Chen K., Ryu E.K., Chen X. ¹⁸F-labeled BBN-RGD heterodimer for prostate cancer imaging. *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, 49(3):453-61, DOI:10.2967/jnumed.107.048009.
- [187] Liu Z., Yan Y., Chin F.T., Wang F., Chen X. Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using ¹⁸F-labeled PEGylated RGD-bombesin heterodimer ¹⁸F-FB-PEG3-Glu-RGD-BBN. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, 52(2):425-32, DOI:10.1021/jm801285t.
- [188] Yan Y., Chen K., Yang M., Sun X., Liu S., Chen X. A new ¹⁸F-labeled BBN-RGD peptide heterodimer with a symmetric linker for prostate cancer imaging. *Amino acids* **2011**, 41:439-47, DOI:10.1007/s00726-010-0762-5.
- [189] Liu Z., Yan Y., Liu S., Wang F., Chen X. ¹⁸F, ⁶⁴Cu, and ⁶⁸Ga labeled RGD-bombesin heterodimeric peptides for PET imaging of breast cancer. *Bioconjugate chemistry*. **2009**, 20(5):1016-25, DOI:10.1021/bc9000245.
- [190] Liu Z., Niu G., Wang F., Chen X. ⁶⁸Ga-labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2009**, 36:1483-94, DOI:10.1007/s00259-009-1123-z.
- [191] Jackson A.B., Nanda P.K., Rold T.L., Sieckman G.L., Szczodroski A.F., Hoffman T.J., Chen X., Smith C.J. ⁶⁴Cu-NO₂A-RGD-Glu-6-Ahx-BBN (7-14) NH₂: a heterodimeric targeting vector for positron emission tomography imaging of

- prostate cancer. *Nuclear medicine and biology* **2012**, 39(3):377-87, DOI:10.1016/j.nucmedbio.2011.10.004.
- [192] Liu Z., Li Z.B., Cao Q., Liu S., Wang F., Chen X. Small-animal PET of tumors with ⁶⁴Cu-labeled RGD-bombesin heterodimer. *Journal of Nuclear Medicine* **2009**, 50(7):1168-77, DOI:10.2967/jnumed.108.061739.
- [193] Jiang L., Miao Z., Liu H., Ren G., Bao A., Cutler C.S., Shi H., Cheng Z. ¹⁷⁷Lu-labeled RGD-BBN heterodimeric peptide for targeting prostate carcinoma. *Nuclear medicine communications* **2013**, 34(9):909-14, DOI:10.1097/MNM.0b013e328362d2b6.
- [194] Durkan K., Jiang Z., Rold T.L., Sieckman G.L., Hoffman T.J., Bandari R.P., Szczodroski A.F., Liu L., Miao Y., Reynolds T.S., Smith C.J. A heterodimeric [RGD-Glu-[⁶⁴Cu-NO₂A]-6-Ahx-RM₂] $\alpha\beta$ 3/GRPr-targeting antagonist radiotracer for PET imaging of prostate tumors. *Nuclear medicine and biology* **2014**, 41(2):133-9, DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2013.11.006.
- [195] Bandara N., Reynolds T.J., Schehr R., Bandari R.P., Diebolder P.J., Krieger S., Xu J., Miao Y., Rogers B.E., Smith C.J. Matched-pair, ⁸⁶Y/⁹⁰Y-labeled, bivalent RGD/bombesin antagonist, [RGD-Glu-[DO₃A]-6-Ahx-RM₂], as a potential theranostic agent for prostate cancer. *Nuclear medicine and biology* **2018**, 62:71-7, DOI:10.1016/j.nucmedbio.2018.06.001.
- [196] Lucente E., Liu H., Liu Y., Hu X., Lacivita E., Leopoldo M., Cheng Z. Novel ⁶⁴Cu labeled RGD₂-BBN heterotrimers for PET imaging of prostate cancer. *Bioconjugate chemistry* **2018**, 29(5):1595-604, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.8b00113.
- [197] Lindner S., Fiedler L., Wängler B., Bartenstein P., Schirmacher R., Wängler C. Design, synthesis and in vitro evaluation of heterobivalent peptidic radioligands targeting both GRP-and VPAC₁-Receptors concomitantly overexpressed on various malignancies—Is the concept feasible?. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 155:84-95, DOI:10.1016/j.ejmech.2018.05.047.
- [198] Lindner S., Rudolf H., Palumbo G., Oos R., Antons M., Hübner R., Bartenstein P., Schirmacher R., Wängler B., Wängler C. Are heterobivalent GRPR-and VPAC₁R-bispecific radiopeptides suitable for efficient in vivo tumor imaging of prostate carcinomas?. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2021**, 48:128241, DOI:10.1016/j.bmcl.2021.128241.

-
- [199] Vall-Sagarra A., Litau S., Decristoforo C., Wängler B., Schirmacher R., Fricker G., Wängler C. Design, Synthesis, In Vitro, and Initial In Vivo Evaluation of Heterobivalent Peptidic Ligands Targeting Both NPY(Y1)- and GRP-Receptors—An Improvement for Breast Cancer Imaging? *Pharmaceutics* **2018**, 11(3):65, DOI:10.3390/ph11030065.
- [200] Wu H., Chen H., Pan D., Ma Y., Liang S., Wan Y., Fang Y. Imaging integrin $\alpha v \beta 3$ and NRP-1 positive gliomas with a novel fluorine-18 labeled RGD-ATWLPPR heterodimeric peptide probe. *Molecular imaging and biology* **2014**, 16:781-92, DOI:10.1007/s11307-014-0761-0.
- [201] Papo N., Silverman A.P., Lahti J.L., Cochran J.R. Antagonistic VEGF variants engineered to simultaneously bind to and inhibit VEGFR2 and $\alpha v \beta 3$ integrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108(34):14067-72, DOI:10.1002/jlcr.3222.
- [202] Liang S., Ma Y., Guo J., Guo R., Wang H. 18 F-radiolabeled analogs of peptide RGD-A7R for simultaneous PET imaging of both $\alpha v \beta 3$ and VEGF in tumors. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **2015**, 303:1891-6, DOI:10.1007/s10967-014-3689-6.
- [203] Liu W., Ma H., Li F., Cai H., Liang R., Chen X., Lan T., Yang J., Liao J., Yang Y., Liu N. PET imaging of VEGFR and integrins in glioma tumor xenografts using ^{89}Zr labelled heterodimeric peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2022**, 59:116677, DOI:10.1016/j.bmc.2022.116677.
- [204] Jiang Y., Long Y., Ji H., Qiao P., Liu Q., Xia X., Qin C., Zhang Y., Lan X., Gai Y. Development and Evaluation of a Peptide Heterodimeric Tracer Targeting CXCR4 and Integrin $\alpha v \beta 3$ for Pancreatic Cancer Imaging. *Pharmaceutics* **2022**, 14(9):1791, DOI:10.3390/pharmaceutics14091791.
- [205] Muttenthaler M., King G.F., Adams D.J., Alewood P.F. Trends in peptide drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* **2021**, 20(4):309-25, DOI:10.1038/s41573-020-00135-8.
- [206] Karatas H., Maric T., D'Alessandro P.L., Yevtodiyyenko A., Vorherr T., Hollingworth G.J., Goun E.A. Real-Time Imaging and Quantification of Peptide Uptake in Vitro and in Vivo. *ACS Chemical Biology* **2019**, 14 (10), 2197-2205, DOI: 10.1021/acscchembio.9b00439.
-

-
- [207] Larimer B.M., Phelan N., Wehrenberg-Klee E., Mahmood U. Phage display selection, in vitro characterization, and correlative PET imaging of a novel HER3 peptide. *Molecular imaging and biology* **2018**, 20:300-8, DOI:10.1007/s11307-017-1106-6.
- [208] van den Brand D., Massuger L.F., Brock R., Verdurmen W.P.R. Mimicking Tumors: Toward More Predictive In Vitro Models for Peptide- and Protein-Conjugated Drugs. *Bioconjugate Chemistry* **2017**, 28 (3), 846-856, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00699.
- [209] Lämpchen T., Holland J.P., Kiefer Y. et al. Preparation and preclinical evaluation of a ⁶⁸Ga-labelled c(RGDfK) conjugate comprising the bifunctional chelator NODIA-Me. *EJNMMI radiopharm. chem.* **2018**, 3, 6, DOI:10.1186/s41181-018-0043-2.
- [210] Sulaiman G.M., Jabir M.S., Hameed A.H. Nanoscale modification of chrysin for improved of therapeutic efficiency and cytotoxicity. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2018**, 46(sup1):708-20, DOI:10.1021/bc500452y.
- [211] Tomaselli E. ¹¹¹In-Labeled Dimeric Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha\beta_3$ -Targeted Radiotracers for Breast Tumor Imaging **2014**, DOI:10.13140/RG.2.1.1452.0726.
- [212] Brooks P.C., Clark R.A., Cheresh D.A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **1994**, 264(5158):569-71, DOI: 10.1126/science.7512751.
- [213] Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer* **2010**, 10(1):9-22, DOI:10.1038/nrc2748.
- [214] Niu G., Chen X. Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics* **2011**, 1:30, DOI:10.7150/thno/v01p0030.
- [215] Veronese F.M., Mero A. The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs* **2008**, 22:315-29, DOI:10.2165/00063030-200822050-00004.
- [216] Guillou A., Earley D.F., Klingler S., Nisli E., Nüesch L.J., Fay R., Holland J.P. The influence of a polyethylene glycol linker on the metabolism and pharmacokinetics of a ⁸⁹Zr-radiolabeled antibody. *Bioconjugate Chemistry* **2021**, 32(7):1263-75, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.1c00172.
-

-
- [217] Rogers B.E., Manna D.D., Safavy A. In vitro and in vivo evaluation of a ^{64}Cu -labeled polyethylene glycol-bombesin conjugate. *Cancer Biother Radiopharm.* **2004**, 19(1):25-34, DOI:10.1089/108497804773391649.
- [218] Lee W., Bobba K.N., Kim J.Y., Park H., Bhise A., Kim W., Lee K., Rajkumar S., Nam B., Lee K.C., Lee S.H. A short PEG linker alters the in vivo pharmacokinetics of trastuzumab to yield high-contrast immuno-PET images. *Journal of Materials Chemistry* **2021**, 9(13):2993-7, DOI:10.1039/d0tb02911d.
- [219] Björkelund H., Gedda L., Andersson K. Comparing the epidermal growth factor interaction with four different cell lines: intriguing effects imply strong dependency of cellular context. *PloS one* **2011**, 6(1):e16536, DOI:10.1371/journal.pone.0016536.
- [220] Zhang F., Wang S., Yin L., Yang Y., Guan Y., Wang W., Xu H., Tao N. Quantification of epidermal growth factor receptor expression level and binding kinetics on cell surfaces by surface plasmon resonance imaging. *Analytical chemistry* **2015**, 87(19):9960-5, DOI:10.1021/acs.analchem.5b02572.
- [221] Allen M., Bjerke M., Edlund H., Nelander S., Westermark B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Science translational medicine* **2016**, 8(354):354re3-, DOI:10.1126/scitranslmed.aaf6853.
- [222] Benedetto S., Pulito R., Crich S.G., Tarone G., Aime S., Silengo L., Hamm J. Quantification of the expression level of integrin receptor $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ in cell lines and MR imaging with antibody-coated iron oxide particles. *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine* **2006**, 56(4):711-6, DOI:10.1002/mrm.21023.
- [223] Del Gatto A., De Simone M., de Paola I., Saviano M., Zaccaro L. Investigation of the best conditions to obtain c (RGDfK) peptide on solid phase. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2011**, 17:39-45, DOI:10.1007/s10989-010-9238-4.
- [224] Raheem S.J., Schmidt B.W., Solomon V.R., Salih A.K., Price E.W. Ultrasonic-Assisted Solid-Phase Peptide Synthesis of DOTA-TATE and DOTA-linker-TATE Derivatives as a Simple and Low-Cost Method for the Facile Synthesis of Chelator–Peptide Conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2020**, 32(7):1204-13, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.0c00325.
-

- [225] Postma T.M., Albericio F. Disulfide formation strategies in peptide synthesis. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 2014(17):3519-30, DOI:10.1002/ejoc.201402149.
- [226] Kamber B., Hartmann A., Eisler K., Riniker B., Rink H., Sieber P., Rittel W. The synthesis of cystine peptides by iodine oxidation of S-trityl-cysteine and S-acetamidomethyl-cysteine peptides. *Helvetica Chimica Acta* **1980**, 63(4):899-915, DOI:10.1002/hlca.19800630418.
- [227] Spetzler J.C., Meldal M. Evaluation of strategies for 'one-pot' deprotection, cleavage and disulfide bond formation in the preparation of cystine-containing peptides. *Letters in Peptide Science* **1997**, 3:327-32, DOI:10.1007/BF00127963.
- [228] Spears R.J., McMahon C., Chudasama V. Cysteine protecting groups: applications in peptide and protein science. *Chemical Society Reviews* **2021**, 50(19):11098-155, DOI:10.1039/D1CS00271F.
- [229] <https://www.gyrosproteintechnologies.com/purepep-blog/peptide-purity-yield-spps> besucht 11.10.2022
- [230] Reilly R.M., Chen P., Wang J., Scollard D., Cameron R. Vallis K.A. *Journal of Nuclear Medicine* **2006**, 47 (6) 1023-1031.
- [231] Meisenheimer M., Kürpig S., Essler M., Eppard E. Ethanol effects on 68 Ga-radiolabelling efficacy and radiolysis in automated synthesis utilizing NaCl post-processing. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry* **2019**, 4:1-0, DOI:10.1186/s41181-019-0076-1.
- [232] Scott P.J., Hockley B.G., Kung H.F., Manchanda R., Zhang W., Kilbourn M.R. Studies into radiolytic decomposition of fluorine-18 labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography. *Applied Radiation and Isotopes* **2009**, 67(1):88-94, DOI:10.1016/j.apradiso.2008.08.015 .
- [233] Seebach D., Matthews J.L. β -Peptides: a surprise at every turn. *Chemical Communications* **1997**, (21):2015-22, DOI:10.1039/A704933A.
- [234] Fani M., Maecke H.R., Okarvi S.M. Radiolabeled peptides: valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics* **2012**, 2(5):481, DOI:10.7150/thno.4024.
- [235] Terán M., Savio E., Paolino A., Frier M. Hydrophilic and lipophilic radiopharmaceuticals as tracers in pharmaceutical development: In vitro–In vivo studies. *BMC Nuclear Medicine* **2005**, 5(1):1-8, DOI:10.1186/1471-2385-5-5.

-
- [236] Tafreshi N.K., Kil H., Pandya D.N., Tichacek C.J., Doligalski M.L., Budzevich M.M., Delva N.C., Langsen M.L., Vallas J.A., Boulware D.C., Engelman R.W. Lipophilicity Determines Routes of Uptake and Clearance, and Toxicity of an Alpha-Particle-Emitting Peptide Receptor Radiotherapy. *ACS pharmacology & translational science* **2021**, 4(2):953-65, DOI:10.1021/acspsci.1c00035.
- [237] Akizawa H., Uehara T., Arano Y. Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Advanced drug delivery reviews* **2008**, 60(12):1319-28, DOI:10.1016/j.addr.2008.04.005.
- [238] Glaser M., Morrison M., Solbakken M., Arukwe J., Karlsen H., Wiggen U., Champion S., Kindberg G.M., Cuthbertson A. Radiosynthesis and biodistribution of cyclic RGD peptides conjugated with novel [18F] fluorinated aldehyde-containing prosthetic groups. *Bioconjugate chemistry* **2008**, 19(4):951-7, DOI:10.1021/bc700472w.
- [239] García Garayoa E., Schweinsberg C., Maes V., Brans L., Bläuenstein P., Tourwé D.A., Schibli R., Schubiger P.A. Influence of the molecular charge on the biodistribution of bombesin analogues labeled with the [99mTc (CO) 3]-core. *Bioconjugate chemistry* **2008**, 19(12):2409-16, DOI:10.1021/bc800262m.
- [240] Kashyap R., Jackson P., Hofman M.S., Eu P., Beaugregard J.M., Zannino D., Hicks R.J. Rapid blood clearance and lack of long-term renal toxicity of ¹⁷⁷Lu-DOTATATE enables shortening of renoprotective amino acid infusion. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **2013**, 40:1853-60, DOI:10.1007/s00259-013-2504-x.
- [241] Gühne F., Heinzig A., Seifert P., Drescher R., Freesmeyer M. The Dependence of Renal ⁶⁸Ga [Ga]-DOTATOC Uptake on Kidney Function and Its Relevance for Peptide Receptor Radionuclide Therapy with ¹⁷⁷Lu [Lu]-DOTATOC. *Diagnostics* **2021**, 11(7):1216, DOI:10.3390/diagnostics11071216.
- [242] Sarikaya I., Elgazzar A., Alfeeli M., Sarikaya A. Can gallium-68 prostate-specific membrane antigen ligand be a potential radiotracer for renal cortical positron emission tomography imaging?. *World Journal of Nuclear Medicine* **2018**, 17(02):126-9, DOI:10.4103/wjnm.WJNM_35_17.
- [243] Chen Y.C., Chang Y.T., Chen C.Y., Shiu J.H., Cheng C.H., Huang C.H., Chen J.F., Chuang W.J. Structural Insight into Integrin Recognition and Anticancer Activity of Echistatin. *Toxins* **2020**, 12(11):709, DOI:10.3390/toxins12110709.
-

- [244] Kumar C.C., Nie H., Rogers C.P., Malkowski M., Maxwell E., Catino J.J., Armstrong L. Biochemical characterization of the binding of echistatin to integrin alphavbeta3 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* **1997**, 283(2):843-53. PMID: 9353406.
- [245] Milane L., Duan Z., Amiji M. Development of EGFR-targeted polymer blend nanocarriers for combination paclitaxel/Ionidamine delivery to treat multi-drug resistance in human breast and ovarian tumor cells. *Molecular pharmaceutics* **2011**, 8(1):185-203, DOI:10.1021/mp1002653.
- [246] Colzani B., Biagiotti M., Speranza G., Dorati R., Modena T., Conti B., Tomasi C., Genta I. *Current Nanoscience* **2016**, Vol. 12, Nr. 3, pp. 347-356(10).
- [247] Pi J., Jiang J., Cai H., Yang F., Jin H., Yang P., Cai J., Chen Z.W. GE11 peptide conjugated selenium nanoparticles for EGFR targeted oridonin delivery to achieve enhanced anticancer efficacy by inhibiting EGFR-mediated PI3K/AKT and Ras/Raf/MEK/ERK pathways. *Drug Delivery* **2017**, 24(1):1549-64, DOI: 10.1080/10717544.2017.1386729.
- [248] Cheng L., Huang F.Z., Cheng L.F., Zhu Y.Q., Hu Q., Li L., Wei L., Chen D.W. GE11-modified liposomes for non-small cell lung cancer targeting: preparation, ex vitro and in vivo evaluation. *International journal of nanomedicine* **2014**, 9:921, DOI:10.2147/IJN.S53310.
- [249] Bauer K., Mierke C., Behrens J. Expression profiling reveals genes associated with transendothelial migration of tumor cells: a functional role for $\alpha v \beta 3$ integrin. *International journal of cancer* **2007**, 121(9):1910-8, DOI: 10.1002/ijc.22879.
- [250] Engler D.A., Montelione G.T., Niyogi S.K. Human epidermal growth factor: distinct roles of tyrosine 37 and arginine 41 in receptor binding as determined by site-directed mutagenesis and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEBS letters.* **1990**, 271(1-2):47-50, DOI:10.1016/0014-5793(90)80368-S.
- [251] Engler D.A., Hauser M.R., Cook J.S., Niyogi S.K. Aromaticity at position 37 in human epidermal growth factor is not obligatory for activity. *Molecular and cellular biology* **1991**, 11(5):2425-31, DOI:10.1128/mcb.11.5.2425-2431.1991.
- [252] Striese F., Sihver W., Gao F., Bergmann R., Walther M., Pietzsch J., Steinbach J., Pietzsch H.J. Exploring pitfalls of 64 Cu-labeled EGFR-targeting peptide GE11 as a potential PET tracer. *Amino Acids* **2018**, 50:1415-31, DOI:10.1007/s00726-018-2616-5.

-
- [253] Araki F., Nakamura H., Nojima N., Tsukumoto K., Sakamoto S. Stability of Recombinant Human Epidermal Growth Factor in Various Solutions. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **1989**, 37(2):404-6, DOI:10.1248/cpb.37.404.
- [254] Gembitsky D.S., Bozsó Z., O’Flaherty M., Ötvös F., Murphy R.F., Lovas S. A specific binding site for a fragment of the B-loop of epidermal growth factor and related peptides. *Peptides* **2002**, 23(1):97-102, DOI:10.1016/S0196-9781(01)00584-8.
- [255] Ingber D.E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nature Reviews Genetics* **2022**, 23(8):467-91, DOI:10.1038/s41576-022-00466-9.
- [256] <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LPD/brochures/BRHERACELL150i240iCO2-DE%200820%20Web.pdf> abgerufen 19.10.2022
- [257] Farag S., Smith M.J., Fotiadis N., Constantinidou A., Jones R.L.. Revolutions in treatment options in gastrointestinal stromal tumours (GISTs): The latest updates: Revolutions in treatment options in GIST. *Current Treatment Options in Oncology* **2020**, 21:1-1, DOI:10.1007/s11864-020-00754-8.
- [258] Diaz Jr L.A., Williams R.T., Wu J., Kinde I., Hecht J.R., Berlin J., Allen B., Bozic I., Reiter J.G., Nowak M.A., Kinzler K.W. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **2012**, 486(7404):537-40, DOI: 10.1038/nature11219.
- [259] Maecke H.R., André J.I. 68 Ga-PET radiopharmacy: a generator-based alternative to 18 F-radiopharmacy. *PET chemistry: the driving force in molecular imaging*. **2007**, 215-42. DOI:10.1007/978-3-540-49527-7_8.
- [260] Sosman, J.A.; Puzanov, I.; Atkins, M.B. Opportunities and obstacles to combination targeted therapy in renal cell cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 764s–769s. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1975.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Äq.	Moläquivalente
abs.	absolutiert
A_{mol}	molare Aktivität
AS	Aminosäure
A431	epidermoides Karzinom Zelllinie
BBN	Bombesin
ber.	berechnet
BRCA	Brustkrebs (bre ast can cer)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl₂	Calciumchlorid
CADD	computerunterstütztes Arzneimittel Design (Computer-Aided Drug Design)
CH₂Cl₂	Dichlormethan
cpm	counts per minute
c(RGDfK)	cyclisiertes (Arg-Gly-Asp- <i>D</i> -Phe-Lys)-Peptid
CT	Computer-Tomographie (com puted tom ography)
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (de oxyribo nucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
e. g.	zum Beispiel
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epi dermal gro wth fac tor)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (epi dermal gro wth fac tor rec eptor)
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ESI	Elektronensprayionisation (elec tro spr ay ion ization)
Et₂O	Diethylether
EtOH	Ethanol

FCS	fötales Kalbserum
FDA	Food and Drug Administration
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
GBq	Gigabecquerel
h	Stunde
HBPL	heterobivalenter Peptidligand
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HCl	Salzsäure
HDI	Index der menschlichen Entwicklung (H uman D evelopment I ndex)
hEGF	humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (h uman e pidermal g rowth f actor)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H₂O	Wasser
HPLC	hochleistungsflüssigkeitschromatographie (h igh- p erformance l iquid chromatography)
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (h igh r esolution m ass s pectrometry)
HWZ	Halbwertszeit
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (h alf m aximal i nhibitory concentration)
ID/g	injizierte Dosis pro Gramm
kBq	Kilobecquerel
K₂CO₃	Kaliumcarbonat
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
Lit.	Literatur
log_D	Verteilungskoeffizient
M	Molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (m atrix- a ssisted l aser d esorption/ i onization)
MBq	Megabecquerel
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm

MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	Malignes Melanom
mmol	Millimol
MnCl₂	Mangan(II)chlorid
MOE	Molecular Operating Environment
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MS	Massenspektrometrie
Mmt	Methoxytrityl
Mtt	Methyltrityl
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Stoffmenge
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NaH₂PO₄	Natriumhydrogenphosphat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na₂SO₃	Natriumsulfit
Na₂SO₄	Natriumsulfat
n. b.	nicht bestimmt
NEt₃	Triethylamin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
n. i.	nach Injektion
nM	Nanomolar
NMR	Kernresonanzspektroskopie (n uclear m agnetic r esonance spectroscopy)
NODA-GA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure
n, p	Neutron, Proton
p. a.	pro analysi oder analysenrein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (p hosphate b uffered s aline)
Pd(PPh₃)₄	Tetrakis(triphenylphospin)palladium(0)

PEG	Polyethylenglycol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PhSiH₃	Phenylsilan
PPh₃	Triphenylphosphin
ppm	parts per million
PRRT	Peptid-Radiorezeptor-Therapie
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonim-hexafluorphosphat
RCA	radiochemische Ausbeute
RCR	radiochemische Reinheit
RGD	Arg-Gly-Asp-Peptid
RNA	Ribonukleinsäure (ribo nucleic acid)
RP	reverse phase
rpm	revolutions per minute
R_t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
scr	scrambled
SG	Schutzgruppe
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (single-photon emission computerised tomography)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (solid phase peptide synthesis)
t_{1/2}	Halbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
u	atomare Masseneinheit
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
Vol.-%	Volumenprozent
v/v	Volumenanteil

z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µmol	Mikromol
×g	times gravity

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz (Dunkelblau) und Sterblichkeitsrate (Hellblau) der 15 am stärksten verbreiteten Krebsarten in Ländern mit hohem/sehr hohem HDI von Frauen im Jahr 2020. Die Daten sind der globalen Krebsstatistik 2020 entnommen. ^[3]	1
Abbildung 2: Inzidenz (Dunkelblau) und Sterblichkeitsrate (Hellblau) der 15 am stärksten verbreiteten Krebsarten in Ländern mit hohem/sehr hohem HDI von Männern im Jahr 2020. Die Daten sind der globalen Krebsstatistik 2020 entnommen. ^[3]	2
Abbildung 3: Kristallstruktur des 2:2 hEGF•EGFR-Komplexes mit Zuordnung der jeweiligen Domänen. ^[11]	3
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung des EGFR durch hEGF nach dem Rotationsmodell (A) und dem Ligand-induzierten Dimerisierungsmodell (B). Grafik erstellt in Anlehnung an E.R. Purba et al. ^[12]	4
Abbildung 5: Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF, h uman e pidermal g rowth f actor): der endogene Ligand des EGFR. (A) hEGF Aminosäuresequenz. Abbildung erstellt nach Bavaro et al. ^[42] ; (B) hEGF Struktur. Der A-Cyclus ist in Blau, der B-Cyclus in Grün und der C-Cyclus in Rot dargestellt. ^[11]	6
Abbildung 6: Literaturbekannte Liganden unterteilt nach der von ihnen jeweils adressierten Bindungsdomäne des EGFR.	8
Abbildung 7: Ablauf des Phagen-Displays. Grafik erstellt in Anlehnung an W. Willats. ^[88] ..	9
Abbildung 8: (A) Computergenerierte Darstellung der Bindungstasche des EGFR; (B) Computergenerierte Darstellung von D4 in der EGFR-Bindungstasche. Mögliche Wasserstoffbrücken sind in Hellgrün dargestellt. ^[53]	10
Abbildung 9: Computergenerierte Bindungsmöglichkeiten des Liganden P1 an dem EGFR. ^[81]	11
Abbildung 10: (A) Aminosäuresequenz von hEGF, mit der verkürzten EBP-Sequenz in Gelb; (B) Strukturformel der EBP-Sequenz.	12
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Prozesse des Positronenzerfalls, der Annihilation des Positrons mit einem Elektron und die Detektion der Vernichtungsstrahlung mittels eines PET/CT-Scans	14
Abbildung 12: Typischer Aufbau eines Zielstruktur-spezifischen Radiometall-basierten Radiotracers für die PET.	16

Abbildung 13: Zerfallsschema Germanium-68/Gallium-68 erstellt nach H.R. Maecke et al. ^[259]	19
Abbildung 14: Strukturformeln der wichtigsten acyclischen und cyclischen Chelatoren für die Komplexierung mit Ga ³⁺	20
Abbildung 15: Schematische Darstellung einer Peptidsynthese an fester Phase nach Fmoc- Strategie.....	24
Abbildung 16: (A) Maximale Ausbeute von SPPS, bei 95% Umsatz (Blau) bzw. 99% Umsatz (Violett) je Kupplung; (B) Ligationsreaktionen NCL, KAHA und Ser/Thr.	25
Abbildung 17: SPPS-Kupplungsmöglichkeiten: (A) Mechanisches Schütteln; (B) Ultraschall; (C) Mikrowellen.....	26
Abbildung 18: Typischer Aufbau eines homobivalenten Peptids.....	27
Abbildung 19: Bindung an die Rezeptoren auf der Oberfläche einer Zelle (A) Monomer; (B) Homotetramer; (C) Heterodimer.....	28
Abbildung 20: Multivalente Zielstrukturen dieser Arbeit: Homodi- 1 , Homotetra- 2 , Heterodimer 3 mit GE11- (Grün) und c(RGDfK)-Einheit (Blau).....	32
Abbildung 21: Strukturen der für die Synthese von 3 notwendigen Molekülbausteine 15 , 17 , 21 , 23 , 25 und das Heterodimer 3 mit GE11- (Grün) und c(RGDfK)-Einheit (Blau).	34
Abbildung 22: Darstellung der zu vergleichenden N-terminal funktionalisierten Peptide mit Angabe ihrer jeweiligen Zielbindungsdomäne des EGFR.....	35
Abbildung 23: Darstellung der zu vergleichenden C-terminal funktionalisierten Peptide mit Angabe ihrer jeweiligen Zielbindungsdomäne des EGFR.....	36
Abbildung 24: Dimer 17a , das bei der Reaktion des GE11 mit bis-NHS-PEG ₅ an fester Phase als Nebenprodukt erhalten wurde.....	41
Abbildung 25: Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme von [⁶⁸ Ga]Ga- 4 nach 0, 2, 6, 8 und 10 min Reaktionszeit. Freies [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺ mit einer Retentionszeit von 0.6 min, [⁶⁸ Ga]Ga- 4 mit einer Retentionszeit von 2.4 min.....	56
Abbildung 26: (A) Analytische HPLC-Chromatogramme der Präkursoren 1 – 14 und (B) Analytische Radio-HPLC Chromatogramme von [⁶⁸ Ga]Ga- 1 – [⁶⁸ Ga]Ga- 14 nach der erfolgreichen Radiomarkierung mit [⁶⁸ Ga]Ga ³⁺	56
Abbildung 27: Beurteilung der Menge an radiolyse/peptidase-bedingter Zersetzung: (A) Analytische Radio-HPLC-Chromatogramme des Radiomarkierungsproduktes [⁶⁸ Ga]Ga- 4 nach 0, 15, 30, 45, 60, 75 und 90 min Inkubationszeit in humanem Serum; (B) [⁶⁸ Ga]Ga- 4 nach 90	

min Inkubationszeit in humanem Serum mit freiem ^{68}Ga /Radiolyseprodukt/Peptidaseprodukt (Blau) und intaktem Radiotracer (Rot).....	59
Abbildung 28: Graphische Darstellung der Serumstabilität von ^{68}Ga]Ga-1 – ^{68}Ga]Ga-14 im humanen Serum über 90 min.	60
Abbildung 29: Graphische Darstellung der Internalisierungsrate und der Menge an membrangebunden und internalisierten radiomarkierten Substanzen ^{68}Ga]Ga-4 – ^{68}Ga]Ga-14 und ^{125}I]I-hEGF.....	64
Abbildung 30: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudien an U87MG-Zellen: 3, 26, 28 und Referenzligand c(RGDfK).	66
Abbildung 31: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudie von hEGF gegen ^{125}I]I-hEGF an U87MG-Zellen.....	67
Abbildung 32: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudien von 1 – 4, 26, 28 und endogenem Referenzligand hEGF gegen ^{125}I]I-hEGF an A431-Zellen.	68
Abbildung 33: Ergebnisse der kompetitiven Verdrängungsstudien von unfunktionalisiertem GE11 gegen ^{125}I]I-hEGF an A431-Zellen.....	69
Abbildung 34: Grafische Darstellung von den Ergebnissen der kompetitiven Verdrängungsstudien an A431-Zellen: 5 – 14 und Referenzligand hEGF.	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Maligne Tumore und ihre prozentualen Anteile, die den EGFR überexprimieren. .	5
Tabelle 2: Literaturbekannte Peptid-Liganden und ihre gemessene Affinität.....	7
Tabelle 3: Klinisch eingesetzte Radionuklide in der PET. ^[120-123]	18
Tabelle 4: Selektion von Peptiden in klinischen PET-Bildgebungsstudien.	22
Tabelle 5: Heterobivalente Peptide in der Entwicklung für die PET-Bildgebung.	29
Tabelle 6: Vergleich der Reaktionsbedingungen für 15 bei mechanischen und ultraschallgestützten Kupplungen. Die Synthesen wurden mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die Angabe der Ausbeute erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.	39
Tabelle 7: Vergleich des Reagenzüberschusses für die Synthese von 17 bei mechanischen und ultraschallgestützten Kupplungen. Die Synthesen wurden mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die Angabe der Ausbeute erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.	41
Tabelle 8: Vergleich der Reaktionsbedingungen und erhaltenen Produkte für die vollständige Synthese von 3 bei mechanischen und ultraschallgestützten Kupplungen und Cyclisierungen in	

Lösung oder am Harz. Die Synthesen wurden mit $n \geq 3$ durchgeführt. Die Angabe der Ausbeute erfolgt als Mittelwert \pm Standardabweichung.	49
Tabelle 9: Übersicht radiochemischer Reinheiten und nicht-optimierter molarer Aktivitäten von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-26}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-28}$	57
Tabelle 10: Übersicht radiochemischer Reinheit und nicht-optimierter molarer Aktivitäten von $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-1}$ – $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-4}$	58
Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der Serumstabilität von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$ im humanem Serum nach 90 min und die daraus errechnete Halbwertszeit.	60
Tabelle 12: Gefundene $\log_{D(7.4)}$ -Werte der radiomarkieren Substanzen $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$	62
Tabelle 13: Internalisierungsrate und Rate an membrangebunden und internalisierten radiomarkierten Substanzen $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$ und $[^{125}\text{I}]\text{I-hEGF}$	64
Tabelle 14: Zusammenfassung: Synthese und Charakterisierung der Liganden $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-1}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$	73
Tabelle 15: Zusammenfassung: In vitro-Charakterisierung der Liganden 1 – 4 , 21 , 26 , 28 und hEGF.	73
Tabelle 16: Zusammenfassung von den Ergebnissen der Synthesen des Heterodimers 3 und seiner Bausteine 15 , 17 , 20 , 21 und 22	74
Tabelle 17: Zusammenfassung von den Ergebnissen der Synthese, ^{68}Ga -Radiomarkierung und Charakterisierung der Liganden $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$	76
Tabelle 18: Zusammenfassung von den Ergebnissen der in vitro-Charakterisierung der Liganden $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-4}$ – $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-14}$	76