

**Ortsgerichtete Modifikationen
von Somatostatin-14
zur Darstellung von maßgeschneiderten
Biohybridkonjugaten**

Dissertation zur Erlangung des Grades
“Doktor der Naturwissenschaften”
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Anne Pfisterer
geboren in Speyer
Mainz im Jahr 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

3. Berichterstatter:

4. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2008 bis Dezember 2011 im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
I Biohybridmaterialien – Strategien und Herausforderungen	11
I-1 Biohybridmaterialien – ein allgemeiner Überblick	11
I-2 Strategien der Biokonjugationschemie	13
I-2a Modifizierung der Lysine über aminreaktive Substanzen.....	13
I-2b Modifizierung der Cysteine über thiolreaktive Substanzen.....	15
I-2c Reagentien für bioorthogonale Modifikationen	22
I-2d Ligand- bzw. Substrat-modifizierte Substanzen	26
I-3 Die lebende radikalische Polymerisation: Revolutionäre Technik zur Darstellung von Biohybridmaterialien	28
I-3a Funktionale Initiatoren: Grafting to	28
I-3b Makromolekulare Initiatoren: Grafting from	34
I-3c Grafting through – Bioreaktive und Peptidmonomere	37
Literatur.....	39
II Zielsetzung und Motivation	45
Literatur.....	49
III Bis- und Monosulfone – Die Entwicklung einer reaktiven Plattform.....	50
III-1 Die Interkalation in Disulfidbrücken	50
III-2 Bioorthogonale Linkermoleküle	54
III-3 Mono- versus Difunktionalisierung – Betrachtungen des Mechanismus	62
III-3a Beeinflussung der Gleichgewichtslage.....	62
III-3b Substituent in der para-Position und Einfluss des Lösungsmittels	63

III-3c	Mono- und Difunktionalisierung – Die reversible Bildung von Heterokonjugaten.....	68
III-3d	Spezifische Kreuzkupplung von Peptiden mit pH-Selektivität	73
	Literatur	81
IV	Somatostatintherapeutika – Darstellung und biologische Aktivität.....	82
IV-1	Wirkstoffe, die auf Proteinen und Peptiden basieren	82
IV-2	Somatostatin-14 – Ein Neuropeptidhormon mit vielen Funktionen	83
IV-3	Fluoreszierende Sonden für die Interkalation	100
IV-3a	Modifizierung von Ethinylsomatostatin via Klickchemie	105
IV-4	Zellexperimente	109
IV-5	Exkurs: Apoptose und Krebs	115
	Literatur	122
V	Makromolekulare Somatostatintherapeutika	126
V-1	Initiatoren für lebende radikalische Polymerisationen	126
V-2	Polymer-Somatostatin-Hybride: <i>Grafting to</i>	135
V-2a	Darstellung und Synthese der PEGylierten Somatostatine	136
V-2b	Darstellung und Synthese von PMMA-Somatostatin	145
V-3	Polymer-Somatostatin-Hybride: <i>Grafting from</i>	147
	Literatur	158
VI	Somatostatin-Dendrimere	160
	Multivalente Linkersysteme.....	160
VI-1	Multivalente Somatostatinarchitekturen	168
	Literatur	179
VII	Bioreaktive Seitenkettenpolymere für Biohybridsysteme.....	180
VII-1	Funktionale Linkermomere für Seitenkettenpolymere	180

VII-2	Polyvalente Hybridsysteme.....	195
VII-2a	Poly(bissulfon-co-TEGMA-Somatostatin).....	195
VII-2b	Poly(bissulfon-co-TEGMA-Glutathion).....	199
	Literatur.....	205
VIII	Zusammenfassung und Ausblick.....	206
	Literatur.....	214
IX	Experimenteller Teil.....	215
	Material und Methoden.....	215
	Organische Synthesen.....	220
	Polymerisationen.....	262
	Modifizierte Somatostatine.....	270
	Zellaufnahmeexperimente.....	284
	Mikroskopieexperimente.....	284
	Literatur.....	285
X	Anhang.....	286
X-1	Publikationen.....	286

Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
ATRP	<i>Atom transfer radical polymerisation</i>
BI	Bissulfid
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CAL B	<i>Candida Antarctica Lipase B</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
DCM	Dichlormethan
DEPMA	3,3'-Diethoxypropylmethacrylat
DIPC	Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotheitol
E1cB	<i>Elimination 1 conjugated base</i>
EC	<i>Effective concentration</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i>
ETAC	<i>equilibrium transfer alkylating cross-link</i>
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
FD	<i>Field desorption</i>
GEP-NET	gastro-entero-pankreatische neuro-endokrine Tumore
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPC	Gel-Permeation-Chromatographie

Grb2 SH2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2 Src Homology 2</i>
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HIV	<i>Humanes Immundefizienz-Virus</i>
HOAc	Essigsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSA	<i>Human serum albumine</i>
IR	Infrarot
KO ^t Bu	Kalium- <i>tert</i> -butanolat
LCST	<i>Lower critical solution temperature</i>
LRB	Lissamin Rhodamin B
Maldi-Tof	<i>Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MMA	Methylmethacrylat
mPEG	Monomethyletherpoly(ethylenglykol)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIPAM	N-isopropylacrylamid
NLS	<i>Nuclear localizing sequence</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
NPM	Nitrophenylmethacrylat
ON	Oligonukleotid
PAMAM	Poly(amidoamin)
PAGE	Poly(acrylamid)-Gelelektrophorese
PARA	proapoptotischen Rezeptoragonisten
PB	Phosphatpuffer
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PD	Polydispersität

PDS	Pyridyldisulfid
PEG	Poly(ethylenglykol)
PHEMA	Poly(hydroethylmethacrylat)
PMDETA	Pentamethylen-diethylentriamin
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PMPC	<i>Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)</i>
PNIPAM	Poly(N-isopropylacrylamid)
POEGMA	Poly(oligo(ethylenglykol)methacrylat)
PPO	Poly(propylenoxid)
ppm	<i>Parts per million</i>
PS	Poly(styrol)
PTEGMA	Poly(tetra(ethylenglykol)methoxymethacrylat)
RAFT	<i>Reverse addition fragmentation transfer</i>
rhG-CSF	Rekombinanter humaner Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor
RNase	Ribonuklease
RPC	<i>Reversed phase chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
sCT	<i>Salmon calcitonin</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SSTR	Somatostatin Rezeptor
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEGMA	Tetraethylenglykolmethacrylat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
TMS	Trimethylsilyl
<i>tips</i>	Triisopropylsilyl
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>

UV

Ultraviolett

Ein-Buchstabencode	Drei-Buchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

I Biohybridmaterialien – Strategien und Herausforderungen

I-1 Biohybridmaterialien – ein allgemeiner Überblick

In biologischen Systemen und Prozessen sind Peptide und Proteine einzigartige und hochspezialisierte Makromoleküle von struktureller Perfektion. Sie eignen sich daher ideal für den Einsatz als Wirkstoffe, molekulare Sensoren oder biologische Schalter. Die Verwendung natürlicher sowie rekombinanter Biomoleküle umfasst mögliche Anwendungen nicht nur auf dem Gebiet der Medizin sondern auch im Bereich der Bio- sowie Nanotechnologie.

Die Verknüpfung von zwei oder mehr Molekülen liefert ein Konjugat, welches die Eigenschaften aller Komponenten besitzt. Auf diese Weise können Materialien erhalten werden, welche sich nach Kombinieren sorgfältig ausgewählter Substanzen durch außergewöhnliche Eigenschaften auszeichnen. Biohybridstrukturen werden durch die Verbindung von Biomolekülen wie Peptiden, Proteinen oder Oligonukleotiden mit funktionalen Molekülen wie chromogene oder fluoreszierende Sonden, biospezifischen Liganden oder synthetischen Polymeren erhalten.

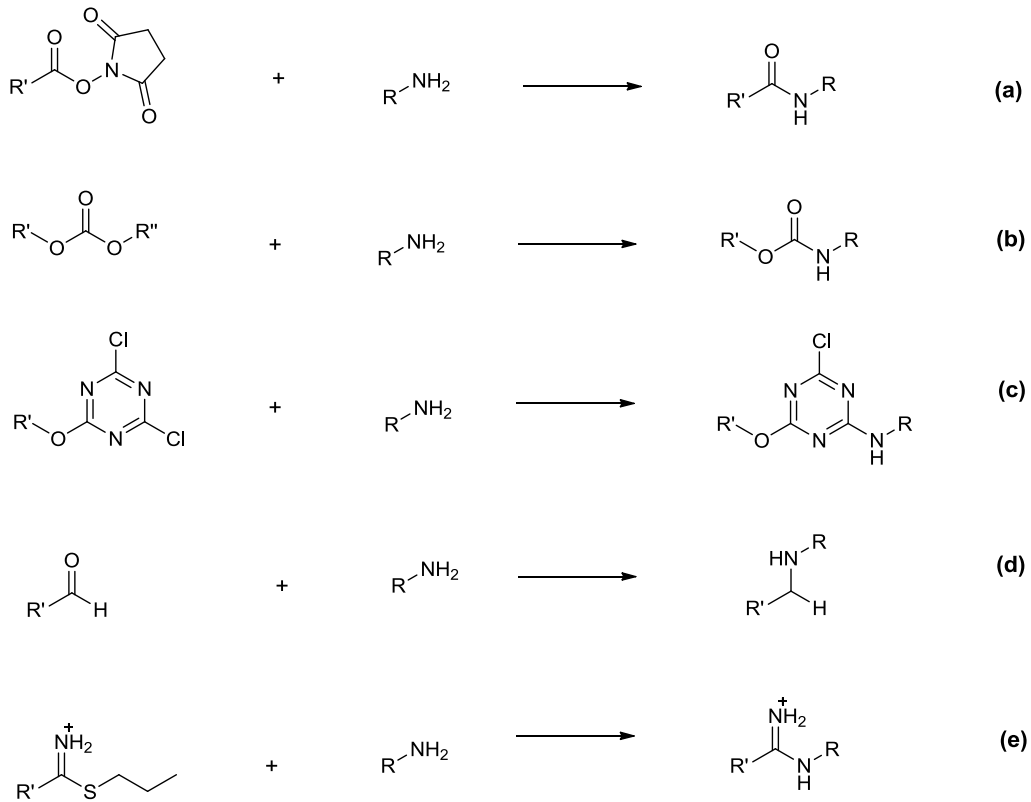
Ohne die Möglichkeit der zielgerichteten Verknüpfung zweier (Bio)moleküle käme die Forschung in vielen Gebieten der Lebenswissenschaften zum Stillstand. Das Vorantreiben neuer Entwicklungen auf dem Gebiet der Biokonjugation ist daher nicht Selbstzweck, sondern dient vielmehr der Erweiterung eines Werkzeugkastens der Methoden zur Verwirklichung von biologischen Assays, Systeme zur in-vivo-Verfolgung von (Bio)molekülen, zur Untersuchung minimaler Mengen an Analyten sowie zur Aufklärung von Proteinfunktionen und –struktur sowie der Interaktion zwischen Rezeptoren und Liganden^[1].

Während die Bildung von Hapten-Carrier-Konjugaten zur Immunisierung bzw. zur Produktion von Antikörpern und in der Vaccinforschung genutzt wird, finden Antikörper-Enzym-Komplexe oft in Immunoassays Verwendung^[2]. Durch die Beladung von Antikörpern mit Wirkstoffen erhält man Therapeutika mit Target-Einheit^[3], während die Modifikation mit synthetischen Polymeren wie Polyethylenglykol oftmals eine Verbesserung der Stabilität sowie der pharmakokinetischen Eigenschaften zur Folge hat^[4].

Jede dieser Anwendungen bedingt das Vorhandensein von Spitzentechnologien, die in enormer Weise auf die Werkzeuge der Biokonjugationschemie angewiesen sind. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an neuen Methoden entwickelt, die für fast jede Problematik auf dem Feld der spezifischen Verknüpfung zweier Moleküle eine individuelle Lösung liefern können^[1].

Jedoch kann eine Reaktion oder Technik, welche für eine Anwendung befriedigende Resultate liefert, in einem anderen Fall zu unerwünschten Ergebnissen führen. Die Erhaltung der Aktivität, besonders der des Biomoleküls, kann nicht immer gewährleistet werden, das Konjugat kann ausfallen bzw. die Kupplung nur unter schlechten Ausbeuten durchgeführt werden. Dies verdeutlicht, dass für jedes Problem sorgfältig erwogen werden muss, welche Methode aus dem vielfältigen Repertoire der Biokonjugationschemie zum Einsatz kommen soll. Im folgenden Abschnitt sollen daher die allgemeinen Strategien und Möglichkeiten zur Verknüpfung von Aminosäureresten mit funktional aktiven Molekülen vorgestellt und diskutiert werden.

I-2 Strategien der Biokonjugationschemie

I-2a Modifizierung der Lysine über aminreaktive SubstanzenAbb I-1 Kopplungsreagentien für primäre Amine^[5]

Der konventionelle Ansatz ist die Modifizierung der synthetischen Komponente mit einer bioreaktiven Funktionalität und die anschließende Umsetzung mit dem entsprechenden Protein bzw. Peptid.

So erfolgte beispielsweise die Aktivierung von Polyethylenglykol (PEG) bei PEGylierungen der ersten sowie der zweiten Generation durch Funktionalisierung der terminalen OH-Gruppe. Dadurch wurden Aktivester, Carbonate, Mono- sowie

Dichlortriazine, Aldehyde und Thioimidoester funktionalisierte Monomethylether-PEGs (mPEGs) synthetisiert, welche zur Amidkopplung mit den elektrophilen Aminogruppen des Biomoleküls genutzt werden konnten^[6].

Die Nukleophilie der hoch reaktiven ϵ -Aminogruppen des Lysins ist oberhalb des pK_s -Wertes von 9-9,5 am größten. Unter nicht basischen Bedingungen liegen diese protoniert vor und sind daher relativ unreaktiv. Der beste Kompromiss bietet sich für die meisten Markierungsreaktionen zwischen pH-Werten von 7 - 9, da stärker basische Bedingungen oft die Stabilität des Biomaterials beeinträchtigen. Nutzte man in den 70er Jahren noch hauptsächlich die Reaktion mit Aldehyden zur Kopplung (d), wurde später die Verwendung von Succinimidestern beliebter (a). Diese sichern eine spezifische Kopplung des Reagenz an die Aminofunktionen, da alle anderen Reaktionsprodukte hydrolyseempfindlich bzw. andere Gruppen wie z. B. Hydroxygruppen, sich zu wenig reaktiv verhalten^[7]. Voraussetzung zur Darstellung von NHS-Ester aktivierten Komponenten ist jedoch eine Carboxygruppe, deren Einführung beispielsweise bei mPEG aufwändig ist und deren Synthese meist mehrere Stufen beinhaltet^[8]. Die bei der Umsetzung mit dem terminalen Alkohol entstehende Esterbindung ist jedoch hydrolyseempfindlich und der nach der Abspaltung der Komponente am Protein verbleibende Succinimid-Tag kann Immunreaktionen hervorrufen^[9]. Aldehyde können an den terminalen OH-Gruppen von Polymeren durch Oxidation mit DMSO-Essigsäureanhydrid eingeführt werden und reagieren mit Aminogruppen zur Schiff-Base, die anschließend mit Natriumcyanoborhydrid zum Amin reduziert werden kann^[6b]. Dichlortriazinderivate sind sehr reaktive Arylierungsreagentien (c), die in manchen Fällen nicht nur mit Aminen sondern auch mit Thiolen reagieren, was im Fall von Phenylalanin-Ammonialyase zur Verlust der Aktivität des Polypeptids führte^[10]. Reaktive Thioimidoesterendgruppen (e) werden in einer zweistufigen Synthese erhalten. Die erste Stufe besteht aus einer Umsetzung des terminalen Alkohols mit 3-Brompropionitril wobei ein Cyanid erhalten wird, welches in der zweiten Stufe mit Thioethanol zum Thioimidoester umgesetzt wird^[11]. Besonders interessant ist diese reaktive Endgruppe aufgrund der Tatsache, dass auch nach der Reaktion die positive Ladung erhalten bleibt. Oft kann daher die Art der Verknüpfung für die Eigenschaften des Biohybridkonjugats eine entscheidende Rolle

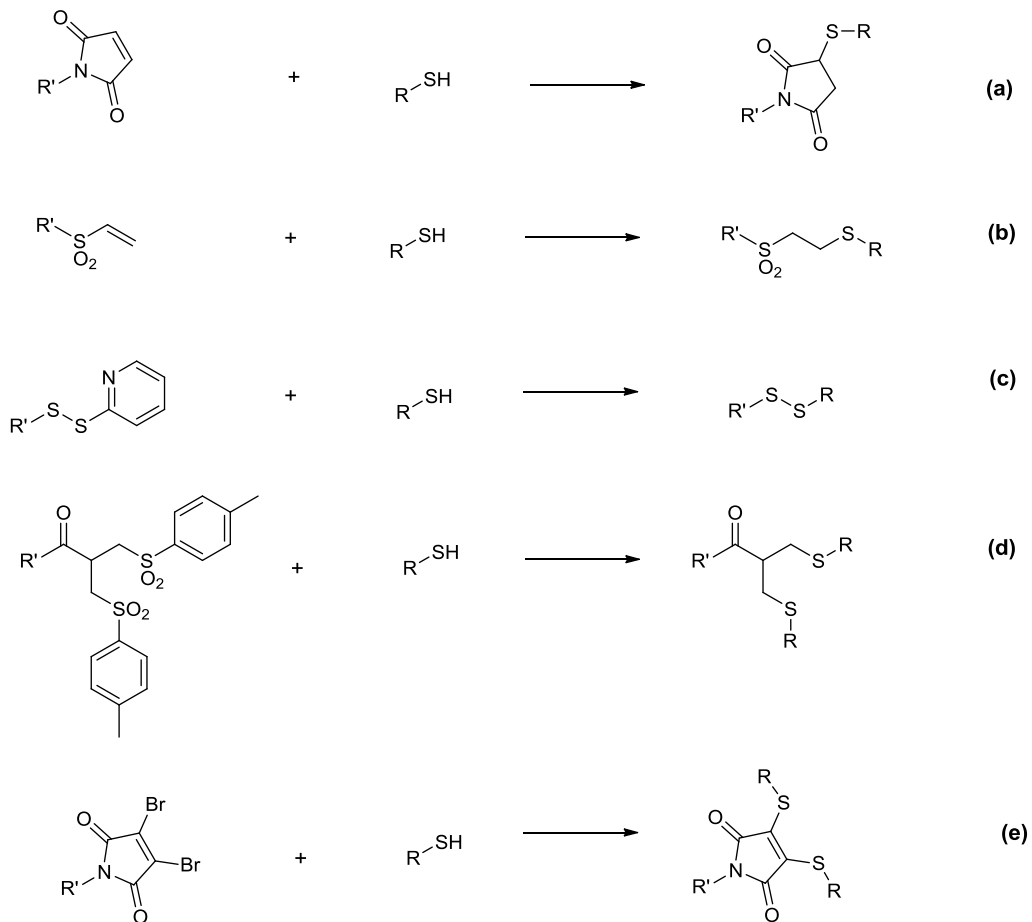
spielen. So wurde beobachtet, dass ein N-terminal pegylierter rhG-CSF wesentlich stabiler ist, wenn es sich bei der Verknüpfungsreaktion um eine reduktive Aminierung statt um eine Acylierung handelt und es wurde postuliert, dass sich diese Beobachtung durch den Erhalt der positiven Ladung am sekundären Amin erklären lässt^[12]. Wie jedoch bereits erwähnt, besteht das Problem dieser Ansätze darin, dass aufgrund der hohen Verbreitung von Lysinen in Biomolekülen viele Aminogruppen verfügbar sind und heterogene Isomerenmische erzeugt werden, die schwer zu reproduzieren und reinigen sind.

1-2b Modifizierung der Cysteine über thiolreaktive Substanzen

Bei Cystein hingegen handelt es sich um eine Aminosäure mit geringer natürlicher Verbreitung. Durch Modifizierung der Thiolfunktionalität können oft monofunktionalisierte Biomoleküle erhalten werden, was die Attraktivität dieser Konjugationmethode erhöht.

Oft werden daher auch Cysteine durch Punktmutationen in die zu untersuchenden Proteine eingeführt oder Peptide N-terminal mit Cysteinen funktionalisiert. Die Thiolgruppe besitzt eine hohe Nucleophilie, welche oberhalb des pK_s -Wertes, der bei einem isolierten Cystein bei 8.6 liegt und bei manchen Proteinen wie Papain (pK_s 3.38)^[13] und BSA ($pK_s < 5$)^[14] sogar noch tiefer anzusiedeln ist, entscheidend zunimmt. Da es sich bei Thiolen um weiche Lewis Basen handelt, ist es schwierig, sie mit harten Lewis Säuren wie Carbonsäuren und ihren Derivaten umzusetzen. Als Kopplungsreagenzien werden meistens Maleinimide eingesetzt (a), an deren Doppelbindung die 1,4-Michael Addition durch den zweifach aktivierenden Effekt der beiden Carbonylgruppen stark begünstigt wird.

Wird jedoch ein höherer pH-Wert benötigt, weil das entsprechende zu modifizierende Biomolekül bei leicht sauren bis neutralen Bedingungen nicht stabil ist, ist zwar die Konzentration an Thiolatanionen höher, die Geschwindigkeit der Hydrolyse des Maleinimides zum Maleinsäureamid nimmt jedoch ebenfalls zu^[15].

Abb I-2 Auswahl an Kopplungsreagentien für Thiole^[5b, 15-16]

Während im pH-Wert-Bereich von 6,5 bis 7,5 die Reaktivität einer Thiolgruppe im Vergleich zur ϵ -Aminogruppe des Lysins um hundertfach höher ist, reagieren bei höheren pH-Werten zunehmend auch die Aminofunktionen von Lysinen und Histidinen^[17], so dass eine spezifische Markierung der Cysteine nicht mehr gewährleistet werden kann. Verglichen mit der Konjugation an die Aminogruppen der Lysine ist die Adressierung der Thiofunktion des Cysteins jedoch äußerst selektiv.

Die attraktivere Herangehensweise besteht deshalb darin, thiolreaktive statt aminreaktive Moleküle zu synthetisieren. Pionierarbeit auf dem Gebiet der „smarten“ Biohybridkonjugate wurde von Stayton et al. geleistet, die u.a. Vinylsulfone zur Reaktion mit genetisch modifizierten Proteinen einsetzen^[18].

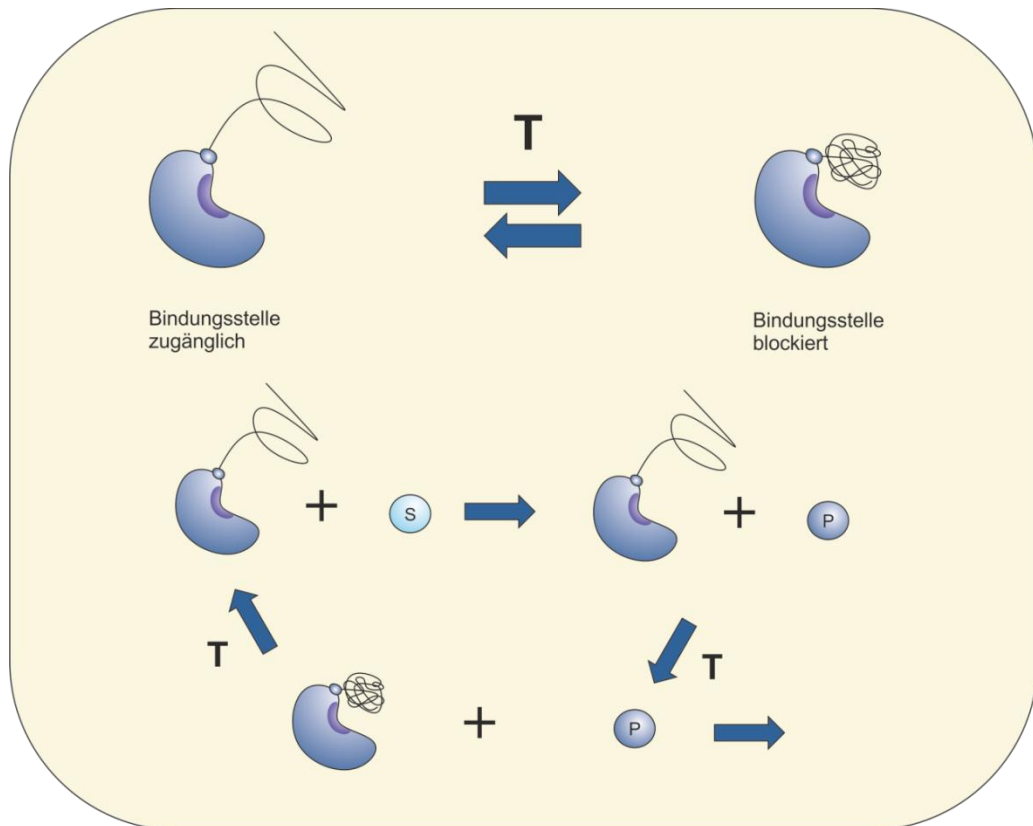


Abb I-3 Stimulus-responsive Enzyme, deren Aktivität über Veränderung der Temperatur beeinflusst werden kann^[19]

in einem ersten Ansatz wurde NIPAM unter Zusatz von 2-Mercaptoethanol als Kettentransferreagenz mittels freier radikalischer Polymerisation polymerisiert und das erhaltene thermoresponsible Polymer im Anschluss mit Divinylsulfon umgesetzt^[18a].

Das auf diese Weise terminal funktionalisierte Vinylsulfon-PNIPAM wurde mit einer Streptavidin-Mutante N49C verknüpft, bei der das Cystein durch *genetic engineering* in der Nähe des Bindungszentrums eingeführt wurde. Es konnte beobachtet werden, dass eine Korrelation zwischen der Phasenübergangstemperatur von PNIPAM und dem Bindungsverhalten des PNIPAM-Streptavidins an eine Biotin-funktionalisierte Membran besteht^[18a].

Eine weitere faszinierende Anwendung dieser stimulus-responsiven Biohybride besteht in der Möglichkeit, ein Trypsin-PNIPAM-Konjugat zur Umwandlung eines Substrates zum Produkt heranzuziehen und nach vollständigem Ablauf der Reaktion durch Phasenseparierung des Enzym-Polymerkonjugates aus der wässrigen Lösung durch Erhöhung der Temperatur aus der Reaktionslösung zu entfernen (Abb I-3). Nach der Isolierung kann das Enzym erneut gelöst und durch Senken der Temperatur unter die LCST des PNIPAM recycelt werden^[18c].

Velonia et al. erzeugten Netzwerke aus gigantischen Amphiphilen, indem sie carboxyterminiertes Polystyrol mit Thionylchlorid aktivierten, mit Maleinimid umsetzten und anschließend mit CAL B zur Reaktion brachten. Das Enzym besitzt selbst kein freies Cystein, eine der vier Disulfidbrücken des Moleküls befindet sich jedoch in Oberflächennähe und kann durch Reduktion mit DTT zugänglich gemacht werden.

Die Ansätze von Brocchini et al. basieren vollständig auf der Idee, Disulfidbrücken selektiv zu adressieren (Abb I-4)^[20]. Diese werden nach partieller Reduktion mit milden Reduktionsmitteln in einer Folge von Eliminierungs- und Additionsreaktionen mit speziellen Linkermolekülen umgesetzt. Über eine mehrstufige Syntheseroute wurden diese Bissulfonderivate synthetisiert, die zur Interkalation in die Disulfidbrücken und zur Synthese von PEG- und Poly(2-methacryloyloxyethylphosphorylcholin)-Proteinkonjugaten verwendet wurden^[20c-e]. Auf die Möglichkeiten dieser Methode wird im Rahmen dieser Arbeit intensiv eingegangen werden.

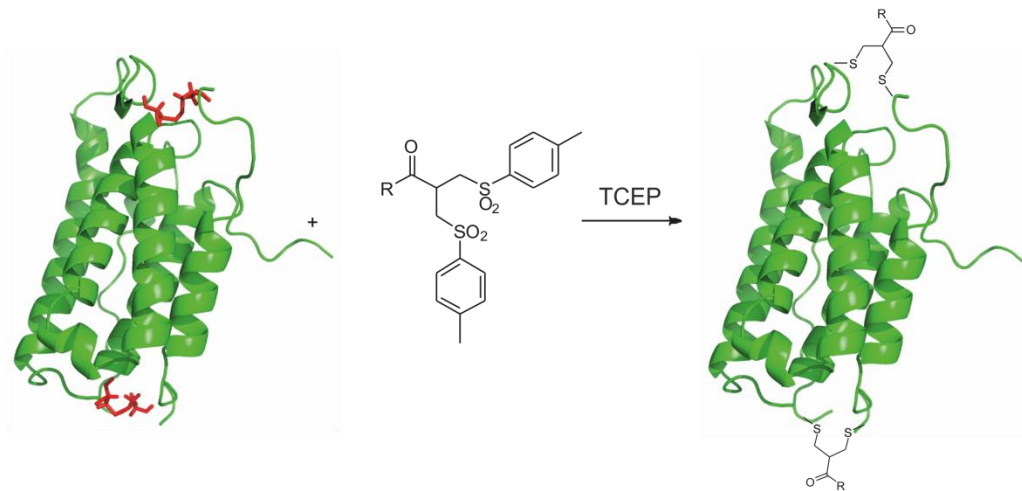


Abb I-4 Interkalation in die Disulfidbrücken von Interferon alpha-2b^[20d]

Der Vorteil der Oxidation von Thiolen zu Disulfidbrücken besteht in der Reversibilität dieser Reaktion. Diese Methode basiert auf dem Einsatz eines Dissulfidreagens, dessen Bindung nach Angriff des Cysteinthiols unter Ausbildung des neuen, gemischten Disulfids gebrochen wird, welches teilweise einen Bestandteil des eingesetzten Disulfids enthält^[21].

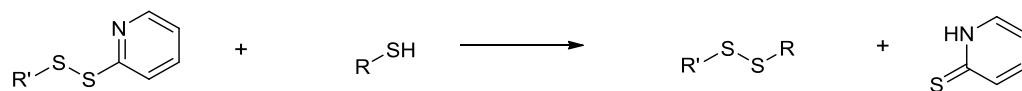


Abb I-5 Reaktion von Pyridyldisulfiden mit Thiolen zum gewünschten Disulfid unter Freisetzung von Pyridin-2-thion

Pyridyldisulfide sind weit verbreitet und besitzen den entscheidenden Vorteil, dass sich das ausgetauschte Pyridinthiol zum Pyridin-2-thion umlagert und daher nicht

selbst weiter reagieren kann, so dass sich das Gleichgewicht im Verlauf der zum gewünschten Disulfid hin verlagert (Abb I-5).

Wird statt dem Pyridyldisulfid das Disulfid des Ellmanns Reagenz verwendet, lässt sich die Reaktion darüber hinaus auch noch UV-spektrometrisch verfolgen und quantifizieren, da das 5-Thio-2-Nitrobenzoesäureanion äußerst stark bei 412 nm absorbiert. In diesem Fall sollte jedoch der Einsatz von thiolhaltigen Reduktionsmitteln vermieden werden, da diese sonst mit dem Anion interagieren und die Quantifizierung der Reaktion verfälscht wird. Li et al. nutzten die Einführung eines Pyridyldisulfid zur α,ω -Difunktionalisierung von Triblockcopolymeren (PEG-PPO-PEG, Pluronic®) und zur Immobilisierung von β -Galactosidaseenzyme auf Oberflächen^[22]. Dazu wurden die terminalen OH-Gruppen mit p-Nitrochloroformat aktiviert und mit 2-(2-Pyridyldithio)ethylamin gekoppelt.

Shiu et al. konnten zeigen, dass elektronenarme terminale Alkine ebenfalls für die Addition von Thiolen zugänglich sind. Voraussetzung für diese Addition sind jedoch leicht basische Bedingungen, die nicht von jedem Biomolekül toleriert werden^[23].

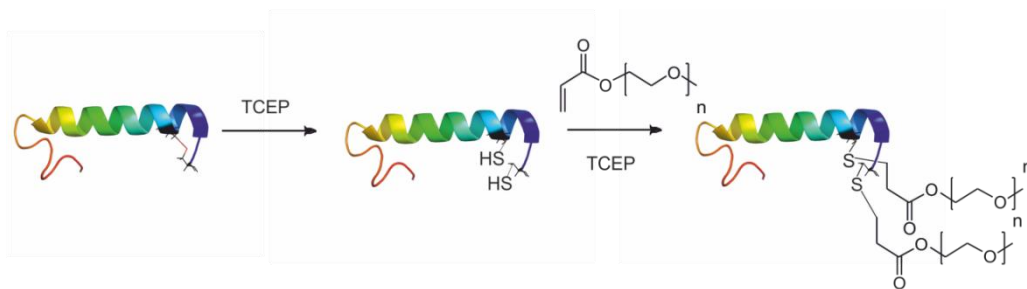


Abb I-6 Michael-Addition eines konjugierten Systems in die Disulfidbrücke von Lachscalctonin ohne Rückbildung der Brücke^[24]

Eine interessante Herangehensweise wurde von Jones et al. verfolgt, die die Disulfidbrücke von Lachscalctonin, einem aus 32 Aminosäuren bestehenden

Peptidhormon, mit wasserlöslichen Phosphinen reduzierten, die gleichzeitig dazu dienten, die Michael Addition an ein entsprechend funktionalisiertes mPEG-Methacrylat zu katalysieren^[24] (Abb I-6).

Ein sehr neuer und faszinierender Ansatz von Smith et al. kombiniert mehrere Möglichkeiten miteinander.

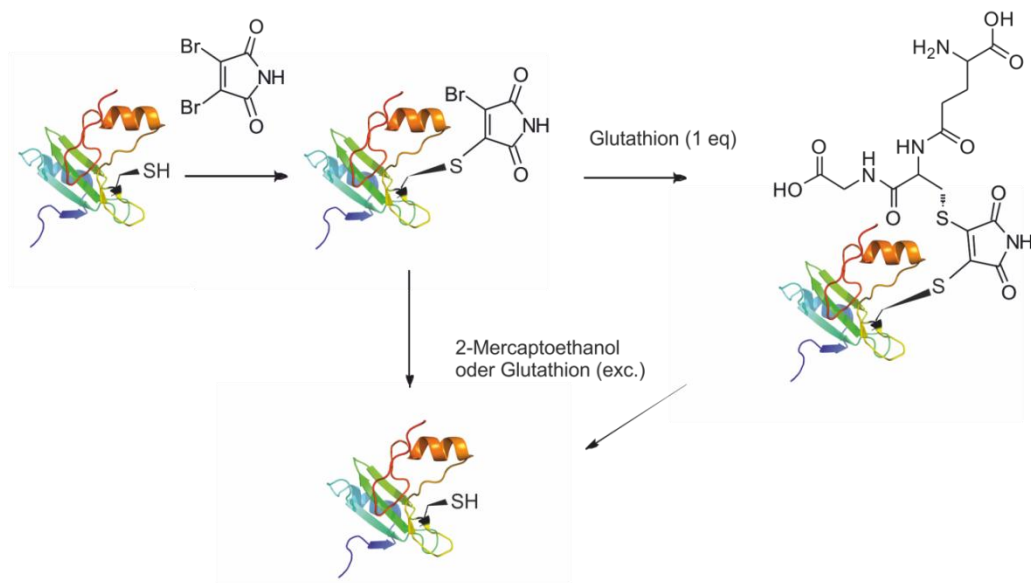


Abb I-7 Verknüpfung zweier thiofunktionalisierter Biomoleküle über Dibrommaleinimide nach Smith et al.^[25]

Als Angriffspunkt wird ein Mono- oder Dibromomaleinimid verwendet, dessen Bromatome durch nukleophile Substitution unter Bildung des Thioethers abgespalten werden. Smith et al. konnten zeigen, dass diese Reaktion im Gegensatz zum Maleinimidlabelling auch bei höheren pH-Werten hoch selektiv für Thiole ist und dass sich diese Reagentien nicht nur zur Verknüpfung von zwei verschiedenen SH-funktionalisierten Biomolekülen sondern auch für die Interkalation in Disulfidbrücken eingesetzt werden können^[25-26] (Abb I-7).

Demonstriert wurde dies durch die reversible Modifizierung der Grb2 SH2 Domäne (L111C2) mit Dibrommaleinimid, die durch die Zugabe eines großen Überschusses an TCEP, Mercaptoethanol oder Glutathion wieder rückgängig gemacht werden konnte und die anschließende Umsetzung mit Thioglucose oder Glutathion zum Bisthioether.

Die Reversibilität dieser beiden Reaktionen konnte auch unter cytoplasmatisch analogen Bedingungen gezeigt werden. Die Verbindungen besitzen drei mögliche Anknüpfungspunkte und die erfolgreiche Modifikation von Somatostatin mit einem PEG-Dibrommaleinimid wurde erfolgreich durchgeführt^[26b]. Was jedoch die Verknüpfung mit zwei verschiedenen Thiolen betrifft, liegt allerdings die Vermutung nahe, dass beide reaktiven Zentren eine äquivalente Reaktivität besitzen und daher eine 1,2-Funktionalisierung nur möglich ist, wenn im ersten Schritt eine sterisch hoch anspruchsvolle Komponente eingesetzt wird, die durch räumliche Abschirmung eine 1,1-Difunktionalisierung verhindert. Darüber hinaus zeigte sich in späteren Experimenten, dass auch diese Maleinimidkomponenten hydrolysiert werden und als Konsequenz daraus die Reversibilität verloren geht^[26a].

1-2c Reagentien für bioorthogonale Modifikationen

Sharpless et al. entwickelten 2001 das Konzept der *click chemistry* und stellten eine Reihe von modularen Reaktionen vor, die einer Vielzahl an Kriterien gerecht werden mussten^[27]. Die eingesetzten Reaktanden sollten unter hohen Ausbeuten und unter milden Reaktionsbedingungen in Gegenwart anderer funktioneller Gruppen umgesetzt werden können. Außerdem sollte die Reaktion ohne Bildung von bedenklichen Nebenprodukten und bevorzugt in wässriger Lösung durchführbar sein. Beispiele für solche Reaktionen sind die (Hetero)-Diels-Alder-Reaktion (a), die nukleophile Addition von Hydrazinen an Aldehyde und Ketone (b), die Staudinger Ligation (c und d), die Amidierung zwischen Thiosäuren und Sulfonylaziden (e) und die kupferkatalysierte Cycloaddition zwischen einem Alkin und einem Azid (f), wobei

letztere aufgrund der hohen Resonanz innerhalb der wissenschaftlichen Gemeinde als *die* Klickreaktion bezeichnet wird.

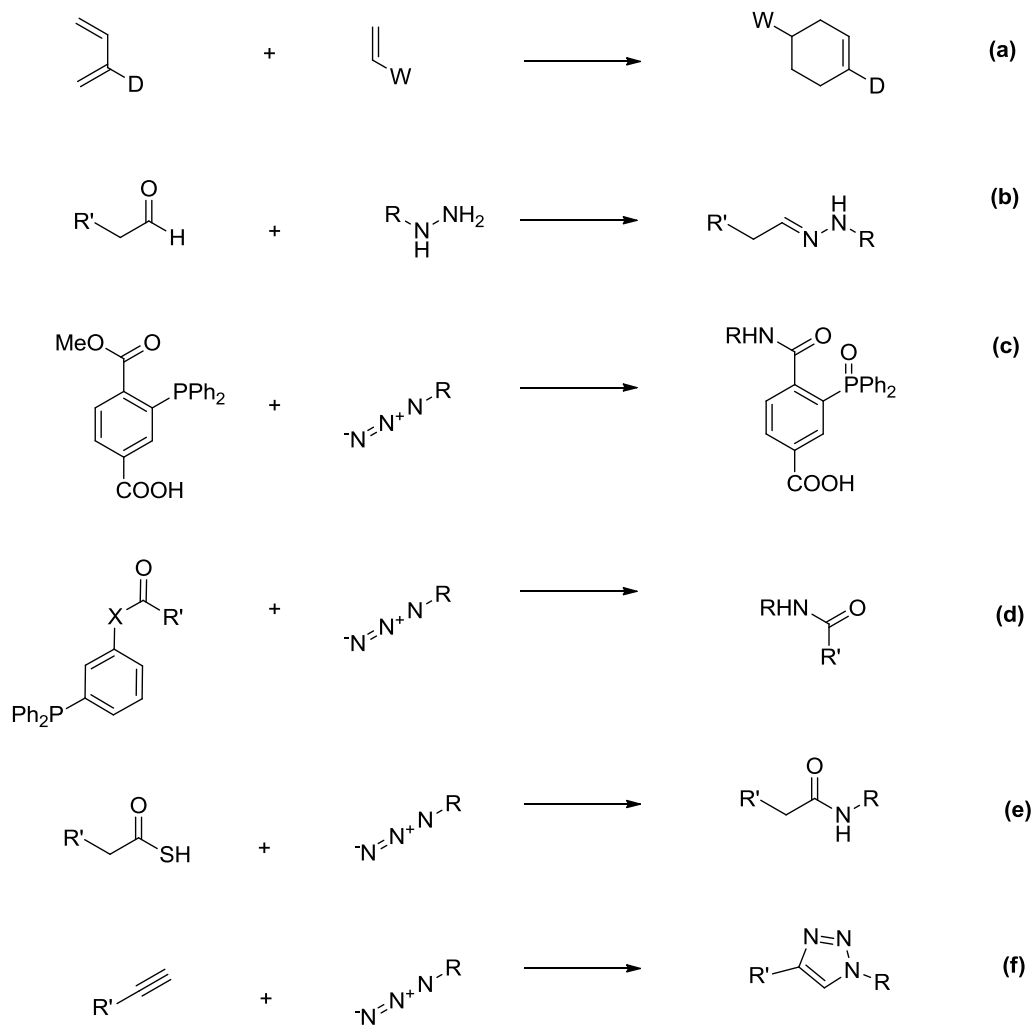


Abb I-8 Überblick über verschiedenen Klickchemie-Reaktionen

Als bioorthogonal werden funktionelle Gruppen bezeichnet, die im Repertoire der natürlichen Aminosäuren nicht enthalten sind und trotz Interaktion und Anwesenheit anderer Funktionen hochselektiv miteinander zur Reaktion gebracht werden können.

In den meisten Fällen muss jedoch das Protein oder Peptid auf die konventionelle Weise modifiziert werden, indem die orthogonale Gruppierung durch Anknüpfung an die natürlich vorkommenden Funktionen eingeführt wird. Durch die Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der lebenden radikalischen Polymerisation, die sich als äußerst robust und flexibel mit einer hohen Toleranz gegenüber der Anwesenheit verschiedenster funktioneller Gruppen erwies, erfuh die Synthese von Polymeren mit genau definierter Struktur und engen Molekulargewichtsverteilungen eine Revolution^[28].

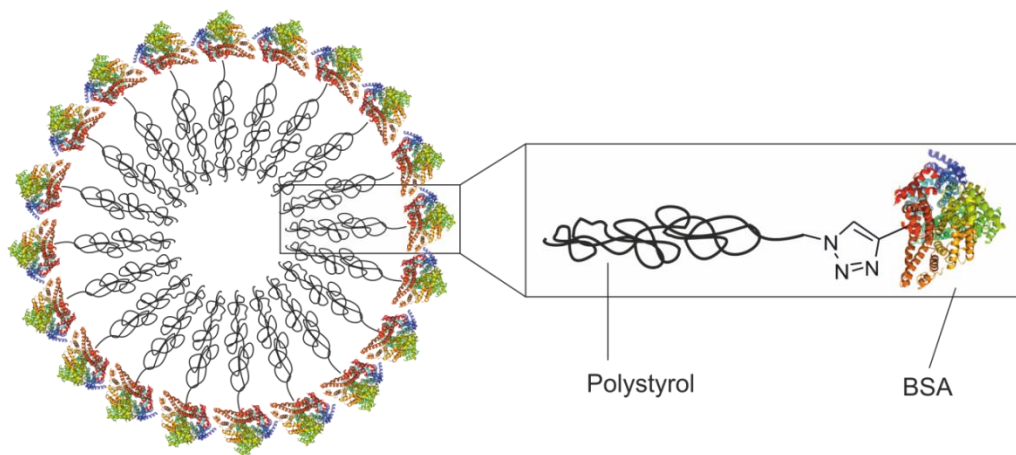


Abb I-9 Durch [2+3]-Cycloaddition erzeugte BSA-PS-Konjugate bilden gigantische Mizellen^[29]

Dirks et al leisteten auf dem Gebiet der Synthese von Polymer-Proteinkonjugaten mittels „Klick-Chemie“ Pionierarbeit^[29]. Styrol wurde mittels ATRP zum PS-Br mit enger Molekulargewichtsverteilung synthetisiert und mit TMS-N₃ und TBAF zum azidofunktionalisierten PS umgesetzt.

Dieses wurde dann unter Zusatz von Cu(II)SO₄ und Natriumascorbat in einer [2+3]-Cycloaddition zum mit BSA, welches zuvor Propargylmaleinimid zum monofunktionalisierten Alkynyl-BSA umgesetzt wurde, zum BSA-PS-Konjugat

umgesetzt (Abb I-9). Nach Dialyse gegen PB wurde die Reaktionslösung mittels TEM untersucht und es konnte die Aggregation der Heterodimere unter Ausbildung von Mizellen beobachtet werden^[29].

Die Einführung nicht-natürlicher Aminosäuren in Proteine mittels rekombinanter Techniken ist aufwändig, aber reizvoll und bis jetzt die einzige Möglichkeit, ein Protein an einer klar definierten Position hochspezifisch mit einer bioorthogonalen Gruppe auszustatten, ohne dass eine natürliche Aminosäure posttranslational zur Modifikation herangezogen werden muss. Link et al. inkorporierten Azidohomoalanin als nicht-natürliches Methioninanalogen in ein Membranprotein von *E. coli* und modifizierten das rekombinante Protein durch Zugabe von Kupfersulfat, TCEP als Reduktionsmittel und THPTE als Ligand mit einem Alkynyl-PEG-Biotin, welches die anschließende Detektion der Modifikation mittels Western Blot ermöglichte^[30].

Ein nicht zu unterschätzender Nachteil der kupferkatalysierten [2+3]-Cycloaddition stellt die hohe Zytotoxizität von Kupfer (I) dar. Die Reinigung der Konjugate und die Abtrennung des Übergangsmetallkatalysators gelingen trotz ausgefeilter Reinigungstechniken nicht immer. Bertozzi et al. entwickelten daher die Synthese von difluorierten Cyclooctynen, die auch in Abwesenheit eines Cu(I)-Katalysators eine gute Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen^[31]. Diese Technik wurde genutzt, um metabolische Studien an lebenden CHO-Zellen durchzuführen, die in zuvor in einem Medium kultiviert worden waren, welches einen Azidozucker enthielt. Allerdings ist die Synthese dieser Derivate sehr anspruchsvoll.

In den letzten Jahren hat das Interesse an übergangsmetallkatalysierten Reaktionen zur Darstellung von Biohybridkonjugaten zugenommen^[32]. Die Suzukireaktion, bei der eine C-C-Bindungsbildung durch Umsetzung einer Arylboronsäure mit einem Arylhalogenid unter Pd-Katalyse bewerkstelligt wird, lässt sich unter guten Ausbeuten in rein wässriger Lösung durchführen^[32b]. Chalker et al. stellten 2009 ein für Bioapplikationen optimiertes Pd-Katalysatorsystem vor, bei dem Pd(OAc)₂ und 2-Amino-4,6-dihydroxypyrimidin als Ligand verwendet wurden^[33]. Die Reaktion konnte bei 37°C in Phosphatpuffer in Gegenwart von Luftsauerstoff vollzogen werden und wurde zur Kupplung verschiedener Boronsäurederivate an Iodphenylalanin in verschiedenen

Biomolekülen eingesetzt^[34]. Ein weiterer entscheidender Vorteil dieses Ansatzes ist die gute Wasserlöslichkeit der eingesetzten Substanzen, die durch die Boronsäurefunktionalität entscheidend verbessert wird.

I-2d Ligand- bzw. Substrat-modifizierte Substanzen

Eine weitere Möglichkeit Biohybride zu erhalten besteht darin, die synthetische Komponente mit dem Substrat oder Liganden des Enzyms bzw. Proteins auszustatten, der durch Bindung in das aktive Zentrum oder die Bindungsstelle die hochspezifische Verknüpfung mit dem entsprechenden Protein gewährleistet^[16a]. Das mit Sicherheit populärste Beispiel ist die Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin^[35].

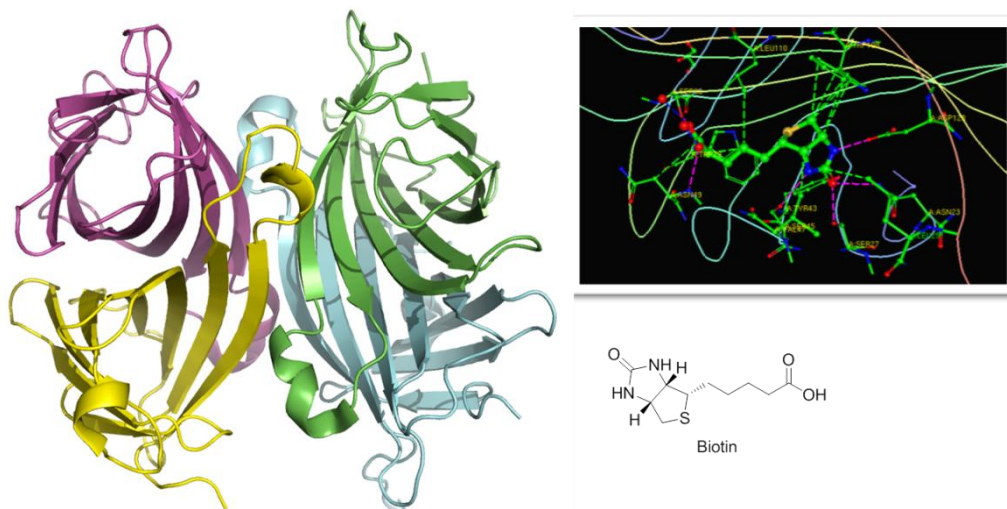


Abb I-10 Streptavidin (links), Biotin (unten) und die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein (rechts)^[36]

Biotin lässt sich einfach an der terminalen Carbonsäure aktivieren und mit einem Amin umsetzen. Die ersten gigantischen Amphiphile, bestehend aus Streptavidin als

polarer Kopfgruppe und Biotin-funktionalisiertem Polystyrol als hydrophobem Schwanz, wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. R. Nolte vorgestellt^[37]. Dazu wurde COOH-Polystyrol mit Amino-Biotin gekuppelt.

Kulkarni et al. gelang es, mittels RAFT ein thiofunktionalisiertes PNIPAM zu synthetisieren, welches mit einem Maleiniimidobiotin zum Biotin-PNIPAM umgesetzt wurde^[38]. Unterhalb der LCST von PNIPAM wiesen die Polymer-Streptavidin-Konjugate eine gute Wasserlöslichkeit auf. Wurde jedoch die Temperatur über die LCST erhöht, bewirkte der nun hydrophobe Charakter des PNIPAM eine Aggregation der Multimere zu Nanopartikeln, dessen Größe durch Molekulargewicht, Heizrate sowie die Konzentration der Konjugate in Lösung beeinflusst werden konnte^[38]. Oft wird die Einführung von bioorthogonalen Gruppierungen auch zur Darstellung von heterofunktionalen Polymeren genutzt, die zur Verknüpfung zweier Biomoleküle eingesetzt werden können. Im nächsten Abschnitt sollen Ansätze präsentiert werden, die die Synthese solcher bifunktionalen Polymere auf besonders elegante Weise beschreiben.

I-3 Die lebende radikalische Polymerisation: Revolutionäre Technik zur Darstellung von Biohybridmaterialien

I-3a Funktionale Initiatoren: Grafting to

Der Einsatz der Technik der lebenden radikalischen Polymerisation macht es möglich, α , ω -funktionalisierte Polymere darzustellen, d.h. es können nicht nur Homotelechele sondern auch Heterotelechele erhalten werden^[28]. Post-Polymerisationsmodifikationen sind dabei nur für die ω -Funktionalisierung nötig. Die ATRP (*atom transfer radical polymerisation*) wurde unabhängig von Matyjaszewski und Samamoto entdeckt^[39]. Es handelt sich dabei um einen Redoxprozess, der einen Halogenaustausch zwischen einer radikalischen, aktiven und einer schlafenden Spezies zur Folge hat, wobei das dynamische Gleichgewicht der beiden Spezies fast ausschließlich auf der Seite der schlafenden Spezies liegt. Die schlafende Spezies kann reaktiviert werden, jedoch ist der aktive Zeitraum sehr kurz und daher finden keine Kettenabbruchreaktionen durch Rekombination zweier Radikale statt. Die Polymerisation gehorcht einer Reaktionskinetik erster Ordnung, d.h. die Monomerkonzentration ist eine lineare Funktion der Zeit. Bei der direkten ATRP wird der Übergangsmetallkomplex (Mt^2L_m) in der niedrigeren Oxidationsstufe zugegeben und reagiert reversibel mit der schlafenden Spezies (P-X) unter Ausbildung eines Deaktivators ($Mt^{z+1}XL_m$) und der aktiven Spezies (P_{act}). Als Katalysatorsystem können viele verschiedene Übergangsmetallkomplexe zum Einsatz kommen (z.B. Cu, Ru, Fe, Ni).

Bei der inversen ATRP hingegen wird die Polymerisation durch einen konventionellen Initiator und einen Metallkomplex in der höheren Oxidationsstufe ($Mt_{n+1}XL_m$) gestartet^[40]. Neuere Methoden wie AGET und ARGET-Prozesse können in Gegenwart von Luftsauerstoff durchgeführt werden, da der Aktivator durch Zugabe eines Reduktionsmittels aus dem Deaktivator durch Redoxreaktion regeneriert wird^[41].

Vorteilhaft bei der letztgenannten Methode ist, dass nur geringe Konzentrationen an Katalysator benötigt werden.

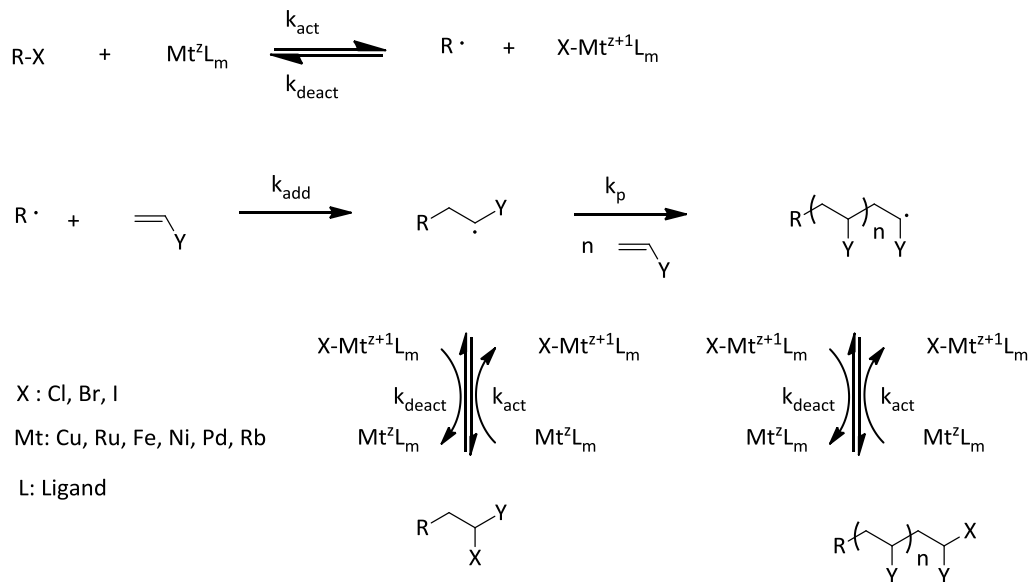


Abb I-11 Mechanismus der ATR – Polymerisation (*atom transfer radical*)

RAFT (*reversible addition fragmentation transfer*) Polymerisationen hingegen werden durch eine reversible Transferreaktion zwischen einem RAFT-Agens und einer wachsenden Polymerkette gekennzeichnet^[42]. Die Polymerisation läuft über einen zweistufigen Additions-Fragmentierungsmechanismus ab. Als RAFT-Agentien werden Thiocarbonylthioverbindungen wie Dithioester, Trithiocarbonate, Xanthate oder Dithiocarbamate eingesetzt. Die Propagationswahrscheinlichkeit ist für alle Ketten gleich und die Kettenlänge des Polymers wird durch das Verhältnis von RAFT-Agens zu Monomer sowie den Monomerumsatz bestimmt.

Mit diesen nützlichen Techniken können daher unter äußerst milden Bedingungen eine Vielzahl von Monomeren auf Acrylat- bzw. Methacrylbasis bzw. Styrol polymerisiert werden, bei weniger aktiven Monomeren ist ATRP jedoch die

geeignete Technik^[28]. Es werden maßgeschneiderte Polymere mit geringer Molekulargewichtsverteilung, determiniertem Molekulargewicht und hoher struktureller Perfektion erhalten, die für die Synthese von Biohybridmaterialien optimal geeignet sind.

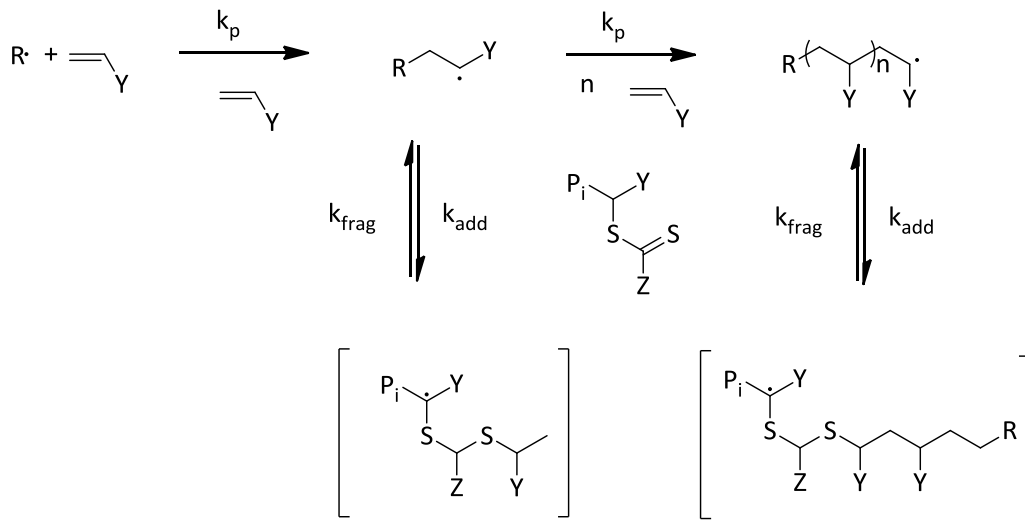


Abb I-12 Mechanismus der RAFT – Polymerisation (*reversible addition fragmentation chain transfer*)

Zur α -Funktionalisierung von Polymeren wird bei beiden Techniken ein entsprechend funktionalisierter Initiator bzw. RAFT-Agenz eingesetzt.

Abb I-13 gibt einen Überblick über die für die im nächsten Absatz vorgestellten Methoden und verwendeten Substanzen. Erste Ansätze mit NHS-ATRP-Initiatoren wurden zur Polymerisation von POEGMA und anschließender unspezifischer Adressierung der Lysine von Lysozym durchgeführt, wobei durchschnittlich 6-7 Polymerketten pro Enzym angehängt wurden^[43].

Ein mittels Ketalschutzgruppe geschützter Aldehydinitiator wurde für die Synthese von α -Aldehyd-Poly(POEGMA) verwendet und über reduktive Aminierung und in-situ Reduktion mit NaCNBH_3 an die ϵ -Aminogruppen der Lysine von Lysozym und an den Aminoterminus von Lachscalctonin gekoppelt^[44].

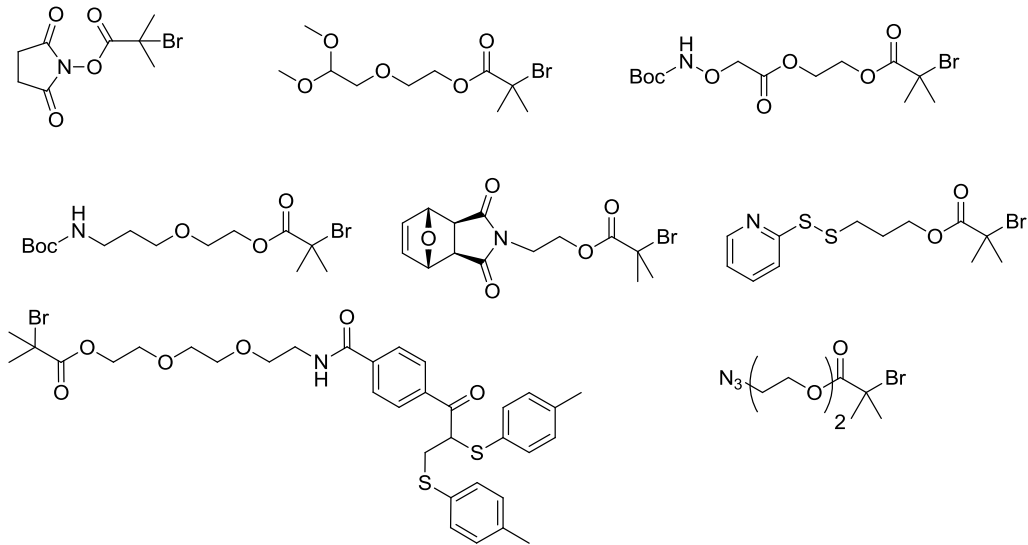


Abb I-13 Bioreaktive ATRP-Initiatoren^[45]

In letzterem Fall konnte gezeigt werden, dass das erhaltene sCT-Konjugat eine höhere Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau durch verschiedene Proteasen wie Trypsin, Chymotrypsin und Elastase aufwies^[44b]. Diese Resultate sind Indizien dafür, dass die Modifikation mit Poly(POEGMA) ähnlich wie die Anknüpfung von PEG in vielen Fällen die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert, ohne die pharmakodynamischen Eigenschaft wesentlich zu verschlechtern.

Pionierarbeit wurde von der Gruppe um Prof. Dr. H. D. Maynard geleistet. α -Aminoxy-PNIPAM wurde durch Initiation mittels boc-geschützten ATRP und RAFT Initiatoren erhalten; funktionalisiert wurde u.a. N^ϵ -Levulinyl-BSA. Heterotelechele können hier

über die Umwandlung der RAFT-Funktionalität durch aminolytische Abspaltung in Gegenwart von Butylamin und TCEP in ein Thiol erzeugt werden^[46].

Aufgrund ihrer geringeren natürlichen Verbreitung ist die Anknüpfung an Cysteine erfolgversprechender um monofunktionalisierte und genau definierte Biokonjugate zu erhalten. Maleinimidfunktionalisierte Initiatoren können dafür jedoch nicht eingesetzt werden, weil die Doppelbindung ebenfalls polymerisiert und dadurch quervernetzte Materialien erhalten werden^[47]. Um dennoch α -Maleinimido-Polymere zu erhalten, wurden zwei Strategien verfolgt. Mantovani et al. verwendeten einen boc-geschützten Amino-ATRP Initiator, der nach Entschützung mit 3-Maleinimidopropionylchlorid umgesetzt wurde, während die zweite Strategie von einem Furan-geschützten Maleinimidinitiator Gebrauch machte, welcher nach der Polymerisation durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion entschützt wurde^[48]. Beide maleinimidfunktionalisierten Polymere wurden zur Verknüpfung mit Glutathion und BSA umgesetzt.

Maynard und ihre Mitarbeiter präsentierten die erfolgreiche Verwendung eines terminalen Pyridyldisulfid-PHEMA für die reversible Verknüpfung an BSA, welches durch den Einsatz eines PDS-ATRP-Initiators synthetisiert wurde^[49]. Der Einsatz von PDS zur Bindungsbildung über Disulfidbrücken hat Vorteile: Erstens weist die proteinreaktive Gruppe im Vergleich zu Maleinimiden eine höhere Stabilität in PBS auf und zweitens ist die Verknüpfung reversibel und das Polymer kann reduktiv vom Protein abgespalten werden.

Eine Interkalation in Disulfidbrücken ist mit einem Bissulfon-PMPC-Polymer möglich, welches von Godwin et al. entwickelt wurde^[20e]. Ausgehend von einem Bissulfid-ATRP-Initiator wurde dabei lebend radikalisch polymerisiert und nach anschließender Oxidation zum Bissulfon über einen Additions-Eliminierungsmechanismus nach in-situ Reduktion in die Disulfidbrücke von Interferon-2a interkaliert.

Bioorthogonal funktionalisierte Initiatoren wurden eingesetzt, um anschließend das Polymer in einer [2+3] Cycloaddition mit dem ebenfalls orthogonal gelabelten Biomolekül umzusetzen^[50]. Während die proteinreaktive Gruppe in α -Position des

Polymers bei ATRP und RAFT durch die geschickte Wahl des Initiators vorgegeben werden kann, erfolgt die ω -Funktionalisierung nach der Polymerisation.

Bespiele dafür sind die oben schon erwähnte Aminolyse von Trithiocarbonaten oder Dithioestern in Gegenwart eines Alkylamins zum Thiol. Die nukleophile Substitution des Halogenids zum Azid ist eine sehr einfach durchzuführende Variante, die vielfältig genutzt wurde (Abb I-14).

Ein Biotin-funktionalierter RAFT-Initiator diente zur Polymerisation von NIPAM, an die die radikalische Kreuzkupplung eines geschützten Azomaleinimids mit der Trithiocarbonatfunktion nach der Polymerisation und Ligation mit Streptavidin und BSA angeschlossen wurde (Abb I-14)^[46b].

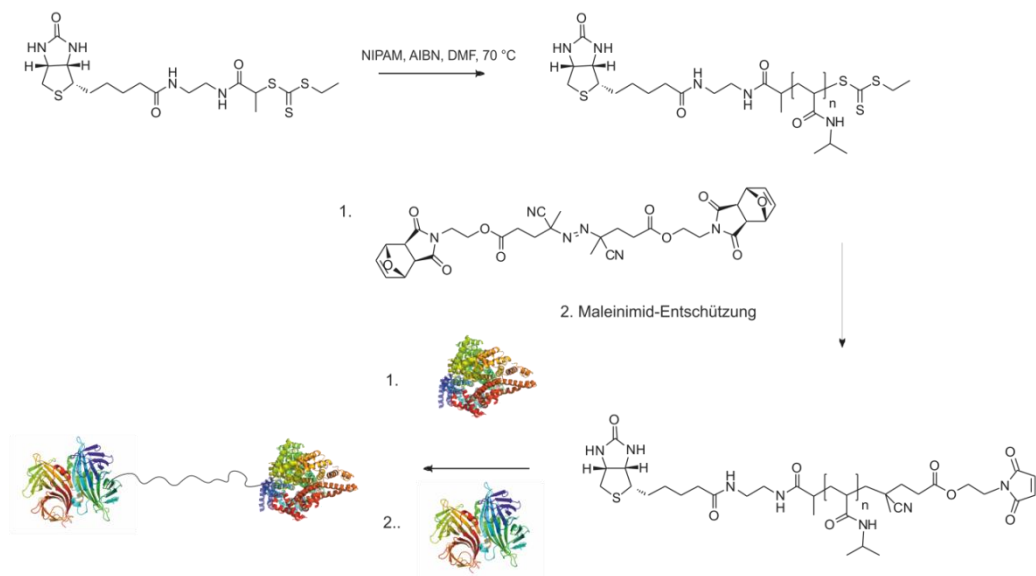


Abb I-14 Darstellung eines Heterokonjugats bestehend aus BSA - PNIPAM - Streptavidin über ein Heterotelechel^[46b]

Der Vorteil aller *grafting to* Ansätze ist, dass Reaktionen, die die Aktivität oder Tertiärstruktur des Protein oder Peptid beeinträchtigen könnten, nach der

Polymerisation am Polymer vorgenommen werden können. Darüber hinaus können Multimeren dargestellt werden, bei denen mehrere Biomoleküle auf einem verzweigten Gerüst oder einer Sternarchitektur präsentiert werden^[51]. Jedoch gestaltet sich die Abtrennung des unreaktierten Polymers vom Konjugat oft anspruchsvoll. Gerade bei Mehrfachmarkierungen ist die Charakterisierung der Biohybridkonjugate oft schwierig und genaue Informationen über die Lokalisation der Markierungen und den Markierungsgrad können nur unzureichend erhalten werden.

I-3b Makromolekulare Initiatoren: Grafting from

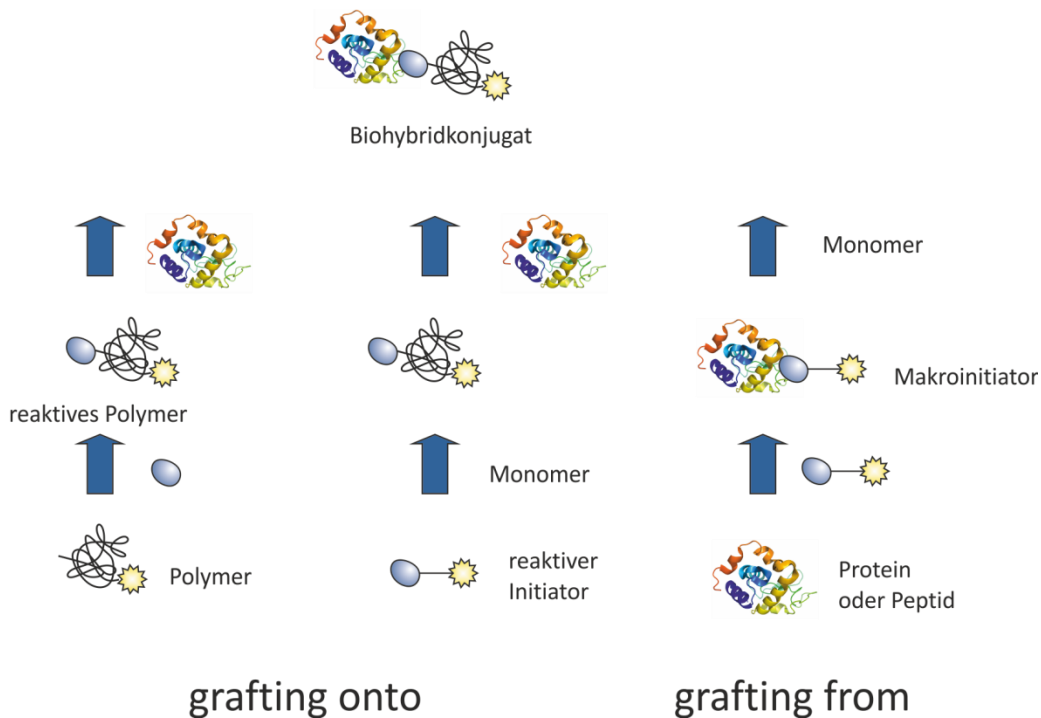


Abb I-15 Wege zu Biohybridkonjugaten am Beispiel von Polymer-Protein-Materialien^[45]

Beim *grafting from* findet die Polymerisation ausgehend von einem zuvor mit einem in Abb I-13 aufgelisteten bioreaktiven Initiator funktionalisierten Protein- oder Peptidmakroinitiator statt.

In diesen Fällen ist die Aufreinigung trivial, sie kann leicht durch Größenausschluss oder Dialyse erfolgen, da nur nicht umgesetztes Monomer und Katalysator, also kleine Moleküle, abgetrennt werden müssen.

Die anschließende Charakterisierung des Polymer-Protein-Hybridmaterials wird dadurch erleichtert, dass die Initiationsorte schon vor der Polymerisation genau bekannt sind. Die Kupplung von hydrophoben Polymeren an die polaren Biomoleküle gestaltet sich oft schwierig und muss in Gegenwart von Lösungsvermittlern und organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Diese können die strukturelle Integrität der Moleküle beeinträchtigen.

Durch die *grafting from* Methode können hydrophobe Polymer direkt in Lösung vom Protein oder Peptid ausgehend in einer Emulsion polymerisiert werden, was sich einfacher gestaltet. PDS und Maleinimidinitiatoren wurden mit einer V131C T4-Lysozymmutate verknüpft, Biotin-ATRP-Initiator wurde zu Streptavidin gegeben^[49, 52]. Ausgehend von diesen Makroinitiatoren wurden NIPAM und Styrol in Emulsion polymerisiert. Auch ein BSA-Makroinitiator wurde für die ATRP von Styrol verwendet^[49]. Es wurde beobachtet, dass sich aus gigantischen Amphiphilen bestehende sphärische Aggregate bildeten; diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Beobachtungen der Arbeiten der Nolte-Gruppe in Einklang bringen.

Eine schöne Arbeit von Depp et al. setzt sich mit der in-vitro Serumstabilität und der Enzymaktivität von PEGyliertem Chymotrypsin und einem durch ATRP von Enzym ausgehend erhaltenes biokompatibles Chymotrypsinkonjugat auseinander. Es konnte gezeigt werden, dass die ATRP-Konjugate verglichen mit dem PEG-Chymotrypsin eine höhere katalytische Aktivität aufwiesen^[53].

Ein weiterer interessanter Ansatz zeigt die spezifische Modifizierung des N-Terminus von Myoglobin durch Oxidation mit Pyridoxal-5-Phosphat und die anschließende Umsetzung mit einer Aminoxybromisobuttersäure zum Makroinitiator^[54].

Auch durch die Technik der nativen chemischen Ligation konnte bereits zur Erzeugung eines Makroinitiators genutzt werden. Diese Methode verwendet Reaktionen, die das natürliche System des Autosplicing imitieren, zu denen manche Expressionssysteme in

der Lage sind. Ein Intein ist dabei ein Stück, welches sich selbst aus der Peptidkette ausschneiden und die beiden verbleibenden Stücke (Exteine) wieder verknüpfen kann. Dazu wurde ein C-terminal mit einem entsprechenden Inteintag verknüpftes GFP mit einem entsprechend funktionalisierten ATRP-Initiator umgesetzt^[55]. Bei einem Intein

Darüber hinaus ist vorstellbar, dass Makroinitiatoren auch durch rekombinante Techniken erhalten werden könnten. Maynard und ihre Mitarbeiter entwickelten die Synthese von nicht-natürlichen Aminosäuren mit Initiatorfunktionalitäten und es wurde gezeigt, dass nach Einbau dieser künstlichen Aminosäure mittels Festphasensynthese in verschiedene Peptide eine lebende radikalische Polymerisation gestartet werden konnte^[56]. Der Gruppe um Matyjaszewski gelang kürzlich sogar der genetische Einbau von 4-(2'-Bromisobutyramido)phenylalanin, einem Phenylalaninderivat, welches als Polymerisationsinitiator genutzt werden kann, unter Verwendung einer modifizierten tRNA-Synthetase in die Oberfläche von GFP^[57]. Von diesem Makroinitiator ausgehend konnte Oligoethylenoxid-monomethylethermethacrylat (OEGMA) lebend radikalisch polymerisiert werden.

Die Nachteile dieser Methoden bestehen darin, dass große Mengen an Initiator benötigt werden, welche durch rekombinante Techniken nicht bereitgestellt werden können. Die Initiatorkonzentration hat einen hohen Einfluss auf die Polymerisationsgeschwindigkeit und bei geringen Mengen an Biomakroinitiator kann die Polymerisation nicht verwirklicht werden.

Desweiteren stellt sich die Frage, ob die Polymerisationsbedingungen einen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins haben und ob die strukturelle Unversehrtheit gerade bei empfindlichen Proteinen oder Enzymen gewahrt werden kann. Ein weiteres Problem ist wie auch bei der Klickchemie die Verwendung von Übergangsmetallkomplexen als Katalysatoren, deren erfolgreiche Abtrennung nach der Polymerisation nicht immer gelingt. Die Metallionen können, da sie durch unterschiedliche Aminosäurereste komplexiert werden, durch Dialyse nicht vollständig entfernt werden, auch nicht dann, wenn gegen Lösungen komplexierender Substanzen wie EDTA dialysiert wird.

I-3c Grafting through – Bioreaktive und Peptidmonomere

In dieser Einleitung wurde bis jetzt nur die Funktionalisierung in α und ω –Position des Polymers behandelt.

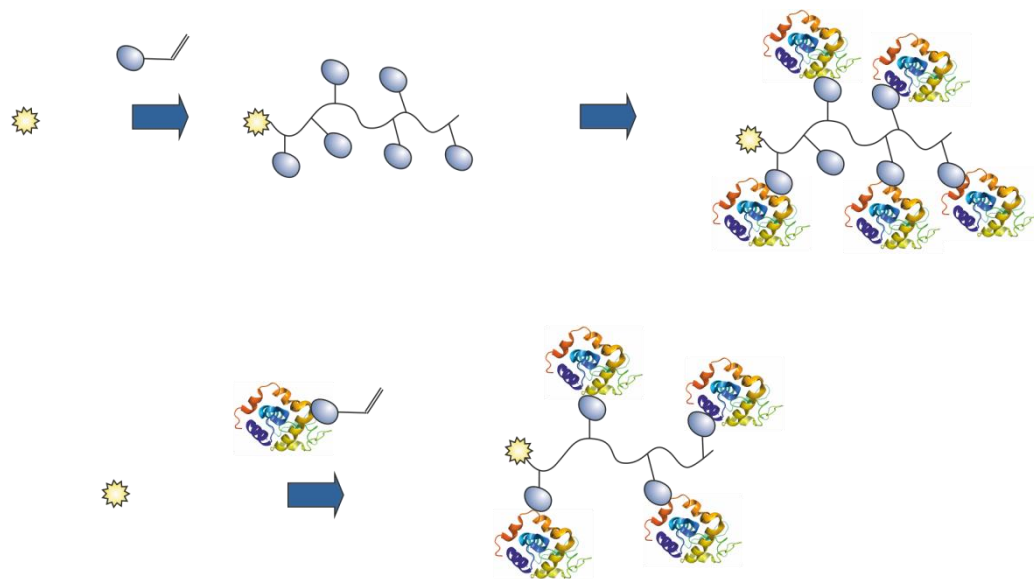


Abb I-16 Symbolische Darstellung der grafting through Methode, oben: Seitenkettenmodifikation nach der Polymerisation; unten: Verwendung von Biomakromonomeren

Es ist jedoch auch möglich, die Seitenkette eines Polymers mit Peptiden zu funktionalisieren. Diese Ansätze bezeichnet man auch als sogenannte *grafting through* Methoden (Abb I-16). Eine Möglichkeit besteht in der Polymerisation eines Monomers mit einer bioreaktiven Funktionalität. Hwang et al. polymerisierten p-Nitrophenylmethacrylat (NPMA) und 3,3'-Diethoxypropylmethacrylat (DEPMA) mittels RAFT zu den entsprechend funktionalisierten Polymeren^[58]. Während es sich

im ersten Fall um ein aminreaktives Polymer handelte, welches mit Glycinmethylester seitenkettenfunktionalisiert wurde, mussten die reaktiven Aldehydgruppen des zweiten Seitenkettenpolymers durch eine Acetalschutzgruppe geschützt werden und wurden nach der Polymerisation mit TFA entschützt. Die Aldehyde wurden anschließend mit N-terminal aminoxyfunktionalisiertem RGD sowie mit dem entsprechenden Aminoxy-TWYKIAFQRNRK, einem Dodcapeptid, umgesetzt. Allerdings ist es bei dieser Variante nicht einfach, den Funktionalisierungsgrad zu bestimmen und das Konjugat hinreichend zu charakterisieren. Es gibt jedoch noch eine weitere Variante dieser Herangehensweise: Die Gruppe um van Hest nutzte Peptidmonomere wie VPGVG und AGAG sowie Gramicidin S und polymerisierte diese mittels ATRP in Gegenwart von CuCl/Bipy in DMSO^[59]. Dabei wurden Homopolymer und mit entsprechenden Initiatoren auch Di- und Triblockcopolymer erhalten. In diesem Fall beträgt der Seitenkettenfunktionalisierungsgrad offensichtlich 100%, werden jedoch sterisch anspruchsvollere Biomakromolekülmonomere eingesetzt, gestaltet sich eine solche Polymerisation schwierig. Denkbar wäre in solchen Fälle die Polymerisation eines Comonomers als Spacereinheit, um die Wechselwirkungen zwischen den Biomolekülen zu verringern (vgl. auch Kapitel VII-2).

Diese Einleitung sollte einen Überblick über konventionelle und aktuelle Ansätze zur Darstellung von Biohybridkonjugaten geben. Auch wenn diese Arbeit nicht ausschließlich die Darstellung von Polymer-Peptidkonjugaten behandelt, kann anhand der Diskussion über Möglichkeiten und Herausforderungen zur Synthese dieser Architekturen ein umfassender Einblick über die allgemeinen Strategien und Lösungsansätze zur spezifischen Funktionalisierung von Biomolekülen gewonnen werden.

Literatur

- [1] G. T. Hermansson, *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed., Academic Press, **2008**.
- [2] C. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunobiology*, 6th ed., Garland Science, **2004**.
- [3] aP. Carter, L. Smith, M. Ryan, *Endocrine-Related Cancer* **2004**, *11*, 659-687; bP. A. McCarron, S. A. O'llwill, W. M. Y. Marouf, R. J. Buick, B. Walker, C. J. Scott, *Mol. Interv.* **2005**, *5*, 368-380.
- [4] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 214-221.
- [5] aK. L. Heredia, H. D. Maynard, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 45-53; bM. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Advanced drug delivery reviews* **2002**, *54*, 459-476.
- [6] aJ. M. Harris, R. B. Chess, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 214-221; bJ. M. Harris, E. C. Struck, M. G. Case, M. S. Paley, M. Yalpani, J. M. Van Alstine, D. E. Brooks, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **1984**, *22*, 341-352.
- [7] P. Cuatrecasas, I. Parikh, *Biochemistry* **1972**, *11*, 2291-2299.
- [8] L. Sartore, P. Caliceti, O. Schiavon, F. Veronese, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1991**, *27*, 45-54.
- [9] M. C. Carter, M. E. Meyerhoff, *J. Immunol. Methods* **1985**, *81*, 245-257.
- [10] K. J. Wieder, N. C. Palczuk, T. Vanes, F. F. Davis, *Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254*, 2579-2587.
- [11] S. Arpicco, F. Dosio, A. Bolognesi, C. Lubelli, P. Brusa, B. Stella, M. Ceruti, L. Cattel, *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 757-765.
- [12] O. B. Kinstler, D. N. Brems, S. L. Lauren, A. G. Paige, J. B. Hamburger, M. J. Treuheit, *Pharmaceutical Research* **1996**, *13*, 996-1002.

- [13] D. D. Roberts, S. D. Lewis, D. P. Ballou, S. T. Olson, J. A. Shafer, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5595-5601.
- [14] S. D. Lewis, D. C. Misra, J. A. Shafer, *Biochemistry* **1980**, *19*, 6129-6137.
- [15] Hargreav.Mk, Pritchard.Jg, H. R. Dave, *Chemical Reviews* **1970**, *70*, 439-&.
- [16] aD. Bontempo, R. C. Li, T. Ly, C. E. Brubaker, H. D. Maynard, *Chem. Commun.* **2005**, 4702-4704; bS. Mitra, R. G. Lawton, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3097-3110.
- [17] C. F. Brewer, J. P. Riehm, *Analytical Biochemistry* **1967**, *18*, 248-255.
- [18] aP. S. Stayton, T. Shimoboji, C. Long, A. Chilkoti, G. Ghen, J. M. Harris, A. S. Hoffman, *Nature* **1995**, *378*, 472-474; bZ. Ding, C. J. Long, Y. Hayashi, E. V. Bulmus, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 395-400; cZ. Ding, G. Chen, A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 498-505.
- [19] A. Chilkoti, G. H. Chen, P. S. Stayton, A. S. Hoffman, *Bioconjugate Chemistry* **1994**, *5*, 504-507.
- [20] aR. B. del Rosario, R. L. Wahl, S. J. Brocchini, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 51-59; bF. A. Liberatore, R. D. Corneau, J. M. McKearin, D. A. Pearson, B. Q. Belonfa, S. J. Brocchini, J. Kath, T. Phillips, K. Oswell, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *7*, 36-50; cS. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J.-W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241-2252; dS. Balan, J.-W. Choi, A. Godwin, I. Teo, C. M. Laborde, S. Heidelberger, M. Zloh, S. Shaunak, S. Brocchini, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 61-76; eA. Lewis, Y. Tang, S. Brocchini, J.-w. Choi, A. Godwin, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2144-2155; fS. Brocchini, A. Godwin, S. Balan, J. W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60*, 3-12.
- [21] T. P. King, Y. Li, L. Kochoumian, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1499-1506.
- [22] J.-T. Li, J. Carlsson, J.-N. Lin, K. D. Caldwell, *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, 592-599.
- [23] H.-Y. Shiu, T.-C. Chan, C.-M. Ho, Y. Liu, M.-K. Wong, C.-M. Che, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 3839-3850.

- [24] M. W. Jones, G. Mantovani, S. M. Ryan, X. Wang, D. J. Brayden, D. M. Haddleton, *Chemical Communications* **2009**, 5272-5274.
- [25] M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, S. Caddick, J. R. Baker, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1960-1965.
- [26] aC. P. Ryan, M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, D. Grohmann, D. Papaioannou, G. Waksman, F. Werner, J. R. Baker, S. Caddick, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 5452-5454; bF. F. Schumacher, M. Nobles, C. P. Ryan, M. E. B. Smith, A. Tinker, S. Caddick, J. R. Baker, *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 132-136.
- [27] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [28] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 2921.
- [29] A. J. Dirks, S. S. van Berkel, N. S. Hatzakis, J. A. Opsteen, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes, R. J. M. Nolte, *Chem. Commun.* **2005**, 4172-4174.
- [30] aA. J. Link, D. A. Tirrell, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 11164-11165; bA. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10598-10602.
- [31] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [32] aH. Dibowski, F. P. Schmidtchen, *Angewandte Chemie-International Edition* **1998**, *37*, 476-478; bA. Ojida, H. Tsutsumi, N. Kasagi, I. Hamachi, *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 3301-3305.
- [33] J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 16346+.
- [34] C. D. Spicer, B. G. Davis, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 1698-1700.

- [35] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85-88.
- [36] I. Le Trong, Z. Wang, D. E. Hyre, T. P. Lybrand, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Acta Crystallographica Section D* **2011**, *67*, 813-821.
- [37] J. M. Hannink, J. Cornelissen, J. A. Farrera, P. Foubert, F. C. De Schryver, N. Sommerdijk, R. J. M. Nolte, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 4732-+.
- [38] S. Kulkarni, C. Schilli, A. H. E. Muller, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 747-753.
- [39] aJ.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614-5615; bM. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules* **1995**, *28*, 1721-1723.
- [40] J. Gromada, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2001**, *34*, 7664-7671.
- [41] aK. Min, H. Gao, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3825-3830; bW. Jakubowski, K. Matyjaszewski, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4482-4486.
- [42] aJ. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559-5562; bS. Perrier, P. Takolpuckdee, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2005**, *43*, 5347-5393; cG. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 379-410; dY. K. Chong, T. P. T. Le, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1999**, *32*, 2071-2074.
- [43] F. Lecolley, L. Tao, G. Mantovani, I. Durkin, S. Lautru, D. M. Haddleton, *Chemical Communications* **2004**, 2026-2027.
- [44] aL. Tao, G. Mantovani, F. Lecolley, D. M. Haddleton, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 13220-13221; bS. M. Ryan, X. X. Wang, G. Mantovani, C. T. Sayers, D. M. Haddleton, D. J. Brayden, *J. Control. Release* **2009**, *135*, 51-59.
- [45] R. M. Broyer, G. N. Grover, H. D. Maynard, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 2212-2226.

- [46] aK. L. Heredia, Z. P. Tolstyka, H. D. Maynard, *Macromolecules* **2007**, *40*, 4772-4779; bK. L. Heredia, G. N. Grover, L. Tao, H. D. Maynard, *Macromolecules* **2009**, *42*, 2360-2367.
- [47] aG. H. Deng, Y. M. Chen, *Macromolecules* **2004**, *37*, 18-26; bS. H. Liu, S. Elyashiv, A. Sen, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 12738-12739.
- [48] G. Mantovani, F. Lecolley, L. Tao, D. M. Haddleton, J. Clerx, J. Cornelissen, K. Velonia, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2966-2973.
- [49] K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16955-16960.
- [50] B. Le Droumaguet, K. Velonia, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 1073-1089.
- [51] L. Tao, C. S. Kaddis, R. R. O. Loo, G. N. Grover, J. A. Loo, H. D. Maynard, *Macromolecules* **2009**, *42*, 8028-8033.
- [52] D. Bontempo, H. D. Maynard, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 6508-6509.
- [53] V. Depp, A. Alikhani, V. Grammer, B. S. Lele, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 560-569.
- [54] J. M. Gilmore, R. A. Scheck, A. P. Esser-Kahn, N. S. Joshi, M. B. Francis, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 5307-5311.
- [55] W. P. Gao, W. G. Liu, T. Christensen, M. R. Zalutsky, A. Chilkoti, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 16432-16437.
- [56] R. M. Broyer, G. M. Quaker, H. D. Maynard, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 1041-1047.
- [57] J. C. Peeler, B. F. Woodman, S. Averick, S. J. Miyake-Stoner, A. L. Stokes, K. R. Hess, K. Matyjaszewski, R. A. Mehl, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 13575-13577.

- [58] J. Y. Hwang, R. C. Li, H. D. Maynard, *J. Control. Release* **2007**, *122*, 279-286.
- [59] aL. Ayres, M. R. J. Vos, P. J. H. M. Adams, I. O. Shklyarevskiy, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* **2003**, *36*, 5967-5973; bL. Ayres, P. H. H. M. Adams, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *Biomacromolecules* **2004**, *6*, 825-831; cL. Ayres, K. Koch, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* **2005**, *38*, 1699-1704.

II Zielsetzung und Motivation

Die von Lawton et. al. entwickelte Strategie der spezifischen Modifikation von Peptiden und Proteinen durch die partielle Reduktion der lösungsmittelzugänglichen Disulfidbrücken und der anschließenden Interkalation von Linkermolekülen in einem Additionseliminierungsprozess ist der Ausgangspunkt dieser Arbeit^[1]. Zu Beginn wird die synthetische Weiterentwicklung des Portfolios an Bissulfonen realisiert werden, dabei sollen unterschiedliche Synthesestrategien verwirklicht werden.

Durch die Einführung bioorthogonaler Funktionalitäten in p-Position sollen Biokonjugationsreagentien erhalten werden, durch die selektiv adressierbare funktionelle Gruppen in Somatostatin-14, ein Neuropeptidhormon, eingeführt werden können. Dabei ist von Interesse, ob die Rückverbrückung zum zyklischen Peptid gelingt und ob die strukturelle Integrität der Schleifenstruktur erhalten werden kann. Es wird untersucht werden, inwieweit die Funktionalisierung des Neurohormons Einfluss auf dessen biologische Aktivität hat und ob die artifiziellen Somatostatinderivate rezeptorvermittelt in Zellen aufgenommen werden können. Darüber hinaus soll ermittelt werden, ob die modifizierten Peptide selbst apoptotisch wirken und inwieweit im Vergleich mit dem nativen Peptid schon geringe Konzentrationen eine Zellantwort bewirken können.

Es wird dafür ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff ausgestattetes Linkermolekül entworfen werden, welches über die Bissulfoneinheit als thiolreaktive Gruppe verfügt und die in-vivo Verfolgung des fluoreszierenden Konjugats ermöglichen soll.

Lawton et al. nutzten diese Technik ausschließlich zur Adressierung von Disulfidbrücken nach deren partieller Reduktion. Es soll untersucht werden, inwieweit Bis- bzw. Monosulfone auch alternativ zur Maleinimiden als Reagentien für die Reaktion mit Biomolekülen genutzt werden können, die ein ungepaartes Cystein vorweisen. Dabei soll ein tieferes Verständnis für die Reaktivität und Gleichgewichtslage bei der Umsetzung der Sulfone entwickelt werden und inwiefern

durch die Variation ihrer Struktur bzw. der Reaktionsparameter dieses Gleichgewicht beeinflusst werden kann.

Es ist bekannt, dass die in p-Position amidfunktionalisierten Bissulfone unter sauren bis neutralen Bedingungen stabil sind und die Eliminierung des p-Toluensulfinats erst bei leicht basischen Bedingungen stattfindet. Daher wird in Zusammenarbeit mit Wang Tao ein Linker entworfen werden, der Maleinimid- und Bissulfonfunktionalität kombiniert und durch schrittweise Variation des pH-Werts die orthogonale Verknüpfung zweier thiofunktionalisierter Biomakromoleküle zum Heterokonjugat erlaubt. Die Bildung von Homokonjugaten, wie sie bei Bismaleinimidcrosslinkern oft beobachtet wird, könnte in diesem Fall vollständig zurückgedrängt werden.

Ausgehend von Grundbausteinen soll die Synthese komplexerer Architekturen verwirklicht werden. Neben den bereits bekannten Molekülen p-Carboxybissulfid und p-Carboxybissulfon sollen die neu entwickelten Strukturen Iod – und Ethinylmonosulfon sowie Iodbissulfid synthetisiert und als Bausteinmoleküle eingesetzt werden. In der Einleitung wurde ausführlich vorgestellt, welche verschiedenen Wege zur Darstellung von Biohybrid- und insbesondere Polymer-Biohybridkonjugaten besprochen werden können. Es wird gezeigt werden, dass Somatostatin-Polymer-Hybride durch *grafting to* mit bissulfonfunktionalisierten Polymeren erhalten werden können, dass jedoch zur Darstellung von Konjugaten mit hydrophoberem Polymeranteil die *grafting from* Methode besser geeignet ist. Dafür wird die Synthese und das Upscaling eines Somatostatinmakroinitiators realisiert werden, welcher für die lebende radikalische Polymerisation von einer Vielzahl an Monomeren zu Polymeren mit enger Molekulargewichtsverteilung genutzt werden kann.

Die Synthese peptidischer Dendrimerstrukturen stellt immer noch eine Herausforderung dar. Es soll untersucht werden, inwieweit die Interkalationsreaktion zum divergenten Aufbau solcher Materialien genutzt werden kann. Dazur sollen ausgehend von verschiedenen Kernbausteinen u.a. die Sonogashira-Hagihara-Kupplung genutzt werden, um unter Verwendung von Iodbissulfid 3-3b rigide Tetra-

und Hexasulfone zu erhalten, die mit Somatostatin zur Umsetzung gebracht werden können.

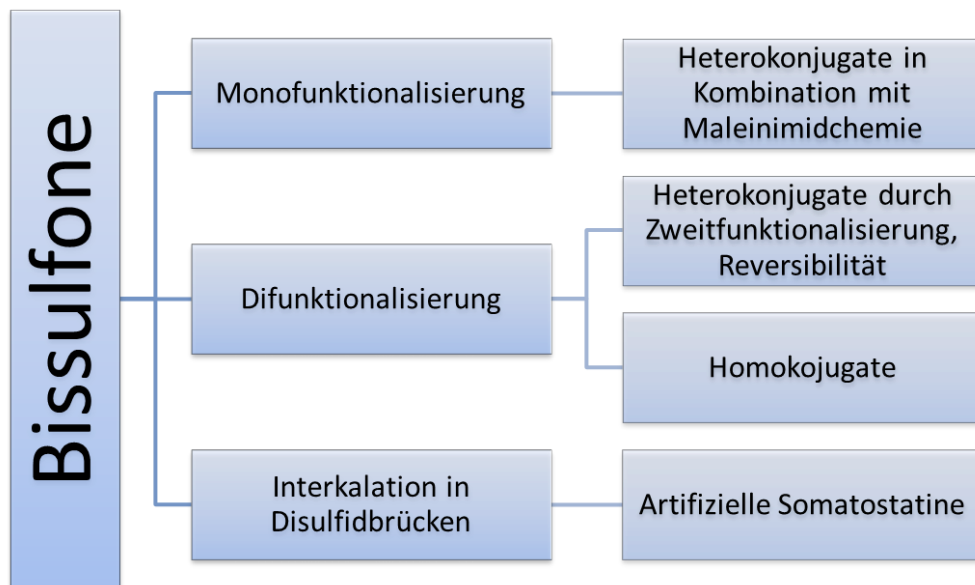


Abb II-1 Visualisierung der Vielseitigkeit der Anwendungsmöglichkeiten von Bissulfonen

Grafting through ist die einzige Möglichkeit, Polymere mit peptidischen Einheiten innerhalb der Seitenkette zu erhalten. Es wird ein Bissulfidmonomer auf Methacrylatbasis entworfen und synthetisiert werden, mit welchem die Polymerisation zu Polybissulfiden gelingt und welche anschließend durch milde Oxidation zu disulfidreaktiven Polybissulfonen aktiviert werden. Es wird gezeigt werden, dass auch auf dieses Weise Polymer-Peptid-Architekturen erhalten werden können.

Handelt es sich bei Bissulfonen nur um weitere bioreaktive Reagenzien im Repertoire der „Bioconjugate Techniques“? In dieser Arbeit soll nicht nur das breite Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten dieser Moleküle beleuchtet werden, sondern auch ihre Flexibilität und Vielfältigkeit bei der Umsetzung mit Thiolen, die erst durch ein

tiefgehendes Verständnis der Reaktion und der Beeinflussung der Reaktionsparameter, vollständig ausgeschöpft werden kann.

Literatur

- [1] aF. A. Liberatore, R. D. Corneau, J. M. McKearin, D. A. Pearson, B. Q. Belonfa, S. J. Brocchini, J. Kath, T. Phillips, K. Oswell, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *7*, 36-50; bS. Mitra, R. G. Lawton, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3097-3110; cR. B. del Rosario, R. L. Wahl, S. J. Brocchini, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 51-59; dS. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J.-W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241-2252.

III Bis- und Monosulfone – Die Entwicklung einer reaktiven Plattform

III-1 Die Interkalation in Disulfidbrücken

Das Konzept, durch konsekutive Additionen zwei nukleophile Reste von Biomaterialien intra – und intermolekular zu vernetzen, wurde 1979 von Lawton et al. vorgestellt^[1]. Bei diesen Linkern der ersten Generation handelt es sich um Derivate des p-Nitrostyrols, die von der Gruppe als ETAC (equilibrium transfer alkylating cross-link) Reagentien bezeichnet wurden (Abb III-1).

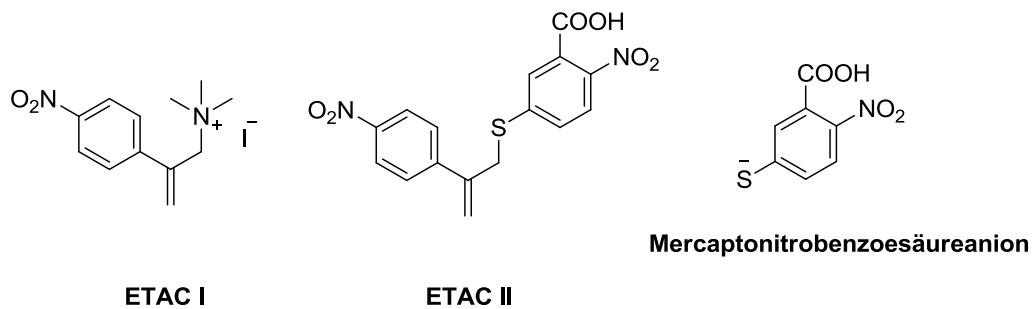


Abb III-1 ETAC Reagentien - Linker der ersten Generation^[1]

Es wurde beobachtet, dass nach der ersten nukleophilen Addition an die Doppelbindung die jeweilige Abgangsgruppe nach einem E1cB-Mechanismus eliminiert wird^[1]. Die nach der Eliminierung in-situ entstandene Doppelbindung kann erneut nukleophil angegriffen werden. Der Vorteil von ETAC II besteht darin, dass bei der auf die erste Addition folgende Eliminierung das

Mercaptonitrobenzoesäureanion, auch bekannt als die reduzierte Form des Ellmannreagenz, freigesetzt wird und somit die Verfolgung der Reaktion mittels UV-Vis-Absorptionsspektroskopie bei 412 nm ermöglicht wird. Neben Studien zur Gleichgewichtseinstellung bzw. Beeinflussung der Gleichgewichtslage (kinetisches vs. thermodynamisches Produkt, vgl. Kapitel III-3) nach Umsetzung mit n-Butylmercaptan, Dimethylaminoethylmercaptan, Dimethylamin und Benzylamin sowie mit Cystein und Lysin wurde die Umsetzung der ETAC Reagentien mit nativer, teilreduzierter und vollständig reduzierter RNase studiert. Dabei wurde nicht nur intra- sondern auch intermolekulare Vernetzung der Enzyme beobachtet, Angriffspunkte waren hauptsächlich Lysingruppen, da die Vernetzung unter basischen Bedingungen durchgeführt wurden.

	X	Y	Z		X	Y	Z	
a	H	H	H		j		H	CH ₃
b	H	H	CH ₃		k		H	CH ₃
c	H	H	Cl		l	NH ₂	H	CH ₃
d	Cl	H	Cl		m		H	CH ₃
e	NO ₂	H	Cl		n		H	CH ₃
f	NO ₂	H	CH ₃		o		H	CH ₃
g	H	NO ₂	Cl					
h	H	NO ₂	CH ₃					
i	COOH	H	CH ₃					

Tab III-1 Linkerportfolio der zweiten Generation

Der Nachteil der ersten Linkergeneration bestand darin, dass diese Derivate nicht reaktiv genug waren und relativ harsche Bedingungen pH-Wert und Temperatur betreffend benötigt wurden, um zu guten Ausbeuten zu gelangen. Außerdem eignete sich die Nitrogruppe nicht zur Einführung von spektrophotometrischen Sonden oder pharmakologisch attraktiven Substanzen. Daher wurde ein neues Portfolio an Molekülen entwickelt^[2].

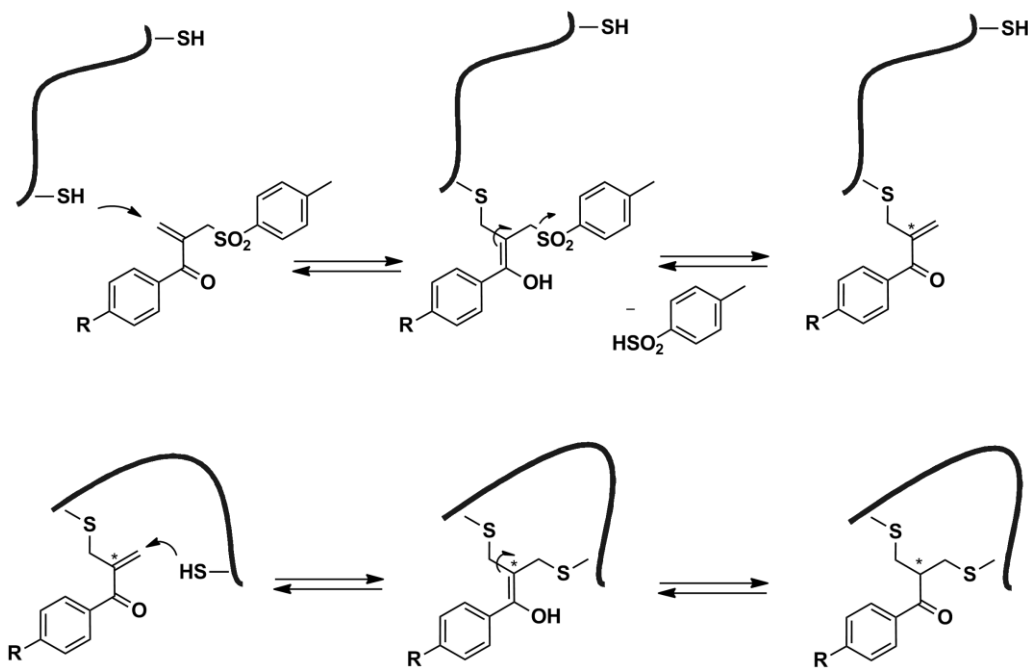


Abb III-2 Mechanismus der Interkalation in Disulfidbrücken

Als aktivierende Gruppe für die Michael-Addition diente ein in der para und bzw. oder in der meta-Position substituiertes aromatisches Keton; zur Maskierung der Doppelbindung wurden Arylsulfonylgruppen eingeführt, die als gute Abgangsgruppen fungieren. In Tab III-1 sind die beschriebenen Derivate aufgelistet^[2].

Neben p- und m-Nitro sowie p-Cl wurden auch die p-Carboxy- sowie die p-Aminoderivate synthetisiert, als Abgangsgruppen wurden die Sulfone von p-Chlorthiophenol bzw. p-Thiokresol eingeführt.

Letztlich wurde p-Carboxybissulfon (**i**) verwendet, um über das Säurechlorid die Amide von p-[¹⁵²I]Iodoanilin (**k**) und p-Aminobenzyl-diethyl-triamin-pentaessigsäure-tert-butylester (**o**) darzustellen. Diese radioaktive Verbindung bzw. dieser Chelatbildner wurden z.B. genutzt, um einen Antikörper selektiv an den durch partielle Reduktion zugänglichen Disulfidbrücken zu modifizieren^[2-3].

Dabei wurde postuliert, dass in diesem Fall eine Rückverbrückung der Thiole zu einem der Disulfidbrücke analogen strukturstabilisierendem Element stattfindet (Abb III-2)^[1]. Somit war die Idee geboren, Funktionalitäten in die Disulfidbrücken von Biomolekülen wie Enzymen und Antikörpern zu interkalieren, ohne dass diese Modifikation die strukturelle Integrität des Makromoleküls beeinträchtigen sollte.

Die Vorteile dieser Strategie sind vielfältig: Während die Modifizierung von oberflächenexponierten Gruppen wie den Aminogruppen von Lysinen oft zu entscheidenden Veränderungen der Aktivität des Moleküls führen sowie die Nettoladung des Moleküls beeinträchtigen und die Trennung der solcherart erhalten heterogenen Produktgemische nahezu unmöglich ist, überzeugt die Technik der Interkalation in Disulfidbrücken durch ihre hohe Selektivität und die Tatsache, dass Funktionalität und Tertiärstruktur nicht beeinträchtigt werden. Während Disulfidbrücken, die weit im Inneren des Proteins zu finden sind, zur Erhaltung von dessen Struktur dienen und nur durch denaturierende Agentien zugänglich gemacht werden, tragen Disulfidbrücken in Oberflächennähe, die unter milden Bedingungen reduziert werden können, zur Stabilität des Biomakromoleküls bei^[4]. Somit bietet diese Strategie einen wertvollen Ansatz, um Biohybridmaterialien mit hoher Vorhersagbarkeit und Strukturperfektion darzustellen.

III-2 Bioorthogonale Linkermoleküle

Erstes synthetisches Ziel dieser Arbeit stellte die Entwicklung und Erweiterung dieses Linkerportfolios dar. Durch die Einführung bioorthogonaler Gruppen in para-Position zum Keton soll die Möglichkeit geschaffen werden, diese nach der Interkalation selektiv und unabhängig von den herkömmlichen Funktionalitäten von Biomolekülen zu adressieren. Dies ist insofern vorteilhaft, als dass die Linker einen minimalen sterischen Anspruch besitzen und dadurch nach dem Einbau in die Disulfidbrücke die Beeinträchtigung der nativen Struktur und der Oberfläche des Biomoleküls äußerst gering ist.

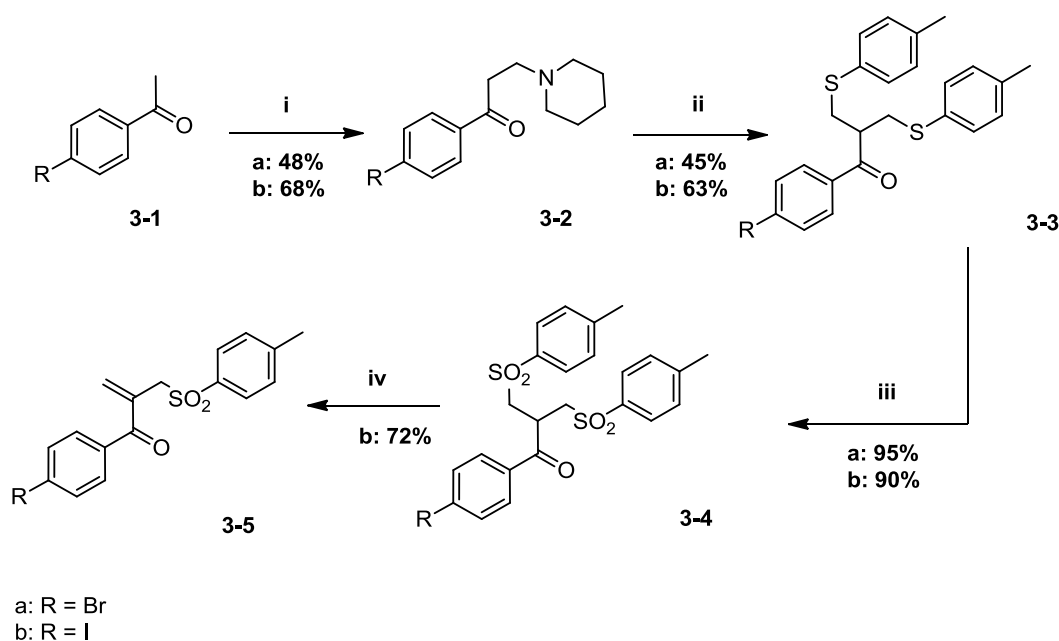


Abb III-3 Syntheseroute der Halogenidsulfone. i: Piperidinhydrochlorid, Paraformaldehyd, HCl, EtOH, 105°C, 14 h; ii: p-Thiokresol (2 eq), Piperidin, 37%ige Formaldehydlösung, EtOH, 105°C, 12 h; iii: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), EtOAc/MeCN/H₂O (6:6:1), RT; iv: KO^tBu (4 eq), THF, RT, 2 h.

Durch die hohe Rigidität des gebildeten Strukturelements wird die Gruppe an einer klar definierten Position exponiert, die sich relativ zur thiolreaktiven Einheit auf der gegenüberliegenden Seite des Moleküls liegt und somit gut zugänglich aus der Oberfläche herausragt. Aufgrund ihres hydrophoben, unpolaren Charakters gehen Halogenide sowie Ethinylfunktion kaum Wechselwirkungen mit den geladenen funktionellen Gruppen der Proteine und Peptide ein und eignen sich somit besonders für die ortsgerichtete Protein- und Peptidfunktionalisierung.

Die Synthesestrategie für alle Bis- bzw. Monosulfonlinker soll am Beispiel der p-Brom- bzw. Iodderivate vorgestellt werden (Abb III-3). Zur Entwicklung dieser Strategie wurde sich an einer der bekannten Vorschrift orientiert^[5]. Ausgangssubstanz war p-Bromacetophenon 3-1a, welches in einer Mannich-Reaktion mit Piperidinhydrochlorid und einem Überschuss an Paraformaldehyd in Anwesenheit von katalytischen Mengen Salzsäure zum Mannichsalz 3-2a umgesetzt wurde. Dazu wurde die ethanolische Reaktionslösung bei 105°C für vier Stunden gerührt, erneut mit Paraformaldehyd versetzt und weitere zehn Stunden unter Erhitzen gerührt. Durch Zugabe von Aceton kann die Löslichkeit des Salzes verringert werden, so dass nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur die Substanz als Feststoff durch Filtration erhalten werden kann, welcher zur weiteren Reinigung aus Ethanol umkristallisiert wird. Der farblose Feststoff wird in 47 % Ausbeute erhalten. Die Synthese des p-Iod-Mannichsalzes 3-2b erfolgte analog, in diesem Fall betrug die Ausbeute 64 %, die leichte Verbesserung gegenüber dem p-Brom-Mannichsalz 3-2a lässt sich dadurch erklären, dass diese Synthese mehrfach durchgeführt wurde und daher die Reaktionsbedingungen leicht optimiert werden konnten. Die Charakterisierung der Mannichsalze erfolgte mittels NMR-Spektroskopie, FD-Massenspektrometrie, IR sowie UV-Vis-Spektroskopie und wird in Kapitel IX, dem Experimentellen Teil, beschrieben.

Die Darstellung der Bissulfide 3-3 wurde unter Säurekatalyse mit 37%iger Formaldehydlösung, Piperidin sowie zwei Äquivalenten p-Thiokresol.

Um zu verhindern, dass neben dem gewünschten Bissulfid auch Monosulfid als Verunreinigung gebildet wird, die sich nur sehr schwer entfernen lässt, muss die Reaktionszeit im Vergleich zur Synthese des Carboxybissulfids deutlich verlängert und

die Reaktionslösung immer wieder mit Formalinlösung versetzt werden. Zwar entsteht dabei als Nebenprodukt das konjugierte Monosulfid, dieses lässt sich jedoch erfolgreich durch säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel mit Hexan/Aceton (2:1) als Eluens abtrennen. Brom- bzw. Iodbissulfid 3-3a bzw. 3-3b wurden in 45%iger bzw. 63%iger Ausbeute erhalten und mittels NMR-Spektroskopie, FD-Massenspektrometrie, IR sowie UV-Vis-Spektroskopie charakterisiert.

Die Bissulfide sind die Bausteine der Wahl, um Substituenten in p-Position einzuführen. Durch die Einführung der Ethynylfunktion kann ein Linker synthetisiert werden, mit dem Biomoleküle hochselektiv mit einer Dreifachbindung ausgestattet werden können. Die Ethynylgruppe ist wesentlich unempfindlicher gegenüber Licht und Luftsauerstoff als viele Azide und eignet sich daher vielfach besser für die Modifizierung von Peptiden oder Proteinen. Sie kann in einer [2 + 3] dipolaren Cycloaddition unter Kupferkatalyse mit Aziden selektiv in Anwesenheit anderer funktioneller Gruppen zum 1,2,3-Triazol umgesetzt werden.

Im Gegensatz zum Bromobissulfid 3-3a zeigte das Iodobissulfid 3-3b erwartungsgemäß eine wesentlich höhere Reaktivität unter Sonogashira-Hagihara-Kupplungsbedingungen. Während bei dem bromierten Linker die Notwendigkeit bestand, Reaktionszeiten- sowie Reaktionstemperaturen zu erhöhen bzw. unter Nutzung einer Mikrowelle zu arbeiten, verlief die Kupplung des iodierten Linker bereits bei Raumtemperatur innerhalb von 30 Minuten vollständig ab.

Die bei dem bromierten Linker häufig zu beobachtende Nebenreaktion der E1cB-Eliminierung eines Thiols unter Bildung des konjugierten Monosulfids und die dadurch bedingte Vergiftung des Pd-Katalysators konnte bei der Verwendung des Iodobissulfids 3-3b unter der Voraussetzung, dass in hoher Konzentration bei Raumtemperatur gearbeitet wurde, vollständig zurückgedrängt werden (Abb III-5).

Das Iodobissulfid 3-3b wurde unter Argon-Atmosphäre in einer THF/Et₃N (4:1) Mischung gelöst. Nach Zugabe des PdCl₂(PPh₃)₂ Katalysators, des CuI₂ sowie des Triisopropylsilylacetylens wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten wurde die Reaktionslösung aufgearbeitet und das erhaltene Rohprodukt

säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton (7:1) als Eluens aufgereinigt.

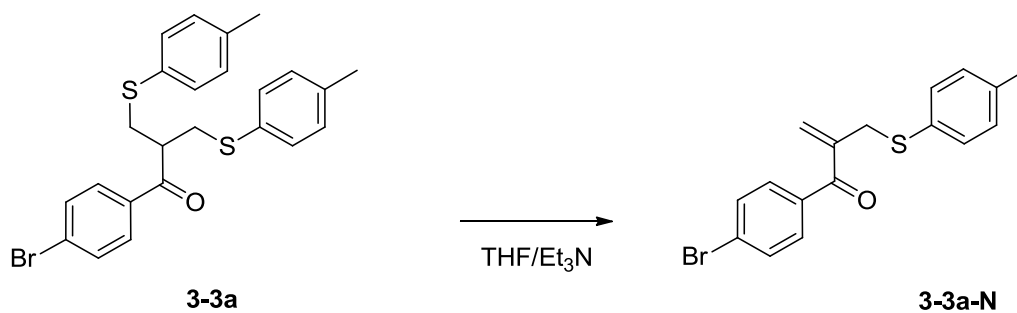


Abb III-4 Nebenreaktion zum konjugierten Monosulfid 3-3a-N bei der Sonogashira-Hagihara Reaktion

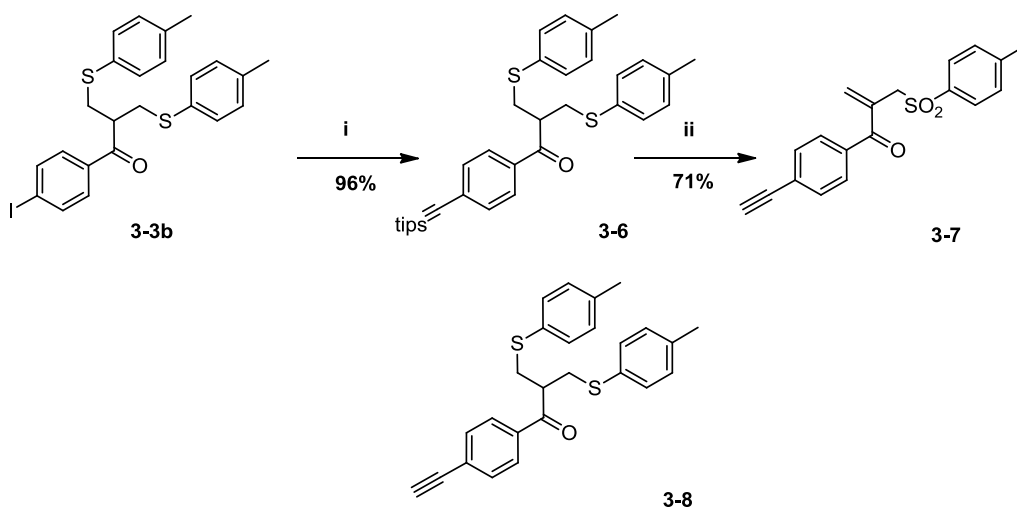


Abb III-5 Syntheseroute Ethynylmonosulfon. i: *tips*-Acetylen (1,1 eq), CuI₂, PdCl₂(PPh₃)₂, THF/Et₃N (4:1), 30 min, RT; ii: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), TBAF (2 eq), THF, 24 h bzw. 10 Min, RT

Versuche, die *tips*-geschützte Ethynylfunktion auf der Stufe des Acetophenons einzuführen, scheiterten an der Umsetzung des *p-tips*-Ethynylacetophenons zum Bissulfid, die in nur geringen Ausbeuten gelang. Desweiteren war es nicht möglich, das *p*-Iodbissulfon 3-4 zur Darstellung des *tips*-Ethynylbissulfons zu nutzen, da sich dieses unter den stark basischen Bedingungen zersetzte.

Um das Ethynylbis- bzw. monosulfon 3-7 zu erhalten, gab es nun ausgehend vom *tips*-Ethynylbissulfid 3-6 zwei Möglichkeiten: Entschützte man zuerst die Schutzgruppe, erhielt man das Ethynylbissulfid 3-8, welches sich als sehr instabil in Gegenwart von Luftsauerstoff sowie an Kieselgel erwies. Daher wurde sinnvollerweise die Oxidation zum Bissulfon vor der Entschützung der *tips*-Schutzgruppe vorgenommen. Dies hatte nicht nur den Vorteil, dass das nach der Oxidation entstehende Kaliumsulfat bei der Reaktionsführung in Dichlormethan einfach abfiltriert werden konnte, sondern darüber hinaus konnte das erhaltene Gemisch aus *tips*-Ethynylmono- und bis-sulfon nach Abdestillieren des Lösungsmittels direkt in THF mit TBAF entschützt werden. Dieses generierte mit in der Lösung enthaltenen Spuren an Wasser ein stark basisches System, welches die Eliminierung vom Bis- zum Monosulfon vorantrieb. Somit konnte das Ethynylmonosulfon 3-7 nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit Hexan/Aceton (3:1) als Eluens direkt in guten Ausbeuten erhalten werden.

Die Darstellung des Iodmonosulfons erforderte eine sorgfältige Optimierung der Reaktionsbedingungen. Optimal läuft die Eliminierung unter Einsatz von vier Äquivalenten KO^tBu bei einer Konzentration von 0,064 M in trockenem THF ab. Iodbissulfon 3-4 wurde dabei in geringer Konzentration in trockenem THF vorgelegt und langsam mit der KO^tBu -Lösung versetzt. Ein höherer Überschuss oder eine höhere Konzentration an Base führte zur vollständigen Zersetzung der Ausgangssubstanz.

Die Monosulfone von Ethynyl und Iod stellen leistungsfähige Schlüssel-moleküle dar, die für eine Vielzahl von Anwendungen zum Einsatz kommen. Die vielfältigen Möglichkeiten werden am Beispiel des Ethynylmonosulfons in Abb III-6 erläutert. Die bioorthogonale Funktionalisierung von therapeutisch interessanten Biomolekülen wie

Somatostatin durch Interkalation in oberflächenzugängliche Disulfidbrücken nach partieller Reduktion und die Eigenschaften dieser Somatostatintherapeutika werden ausführlich in Kapitel IV dargestellt.

Darüber hinaus können die Monosulfone als flexible Bausteine für den Aufbau von komplexen Makroarchitekturen genutzt werden.

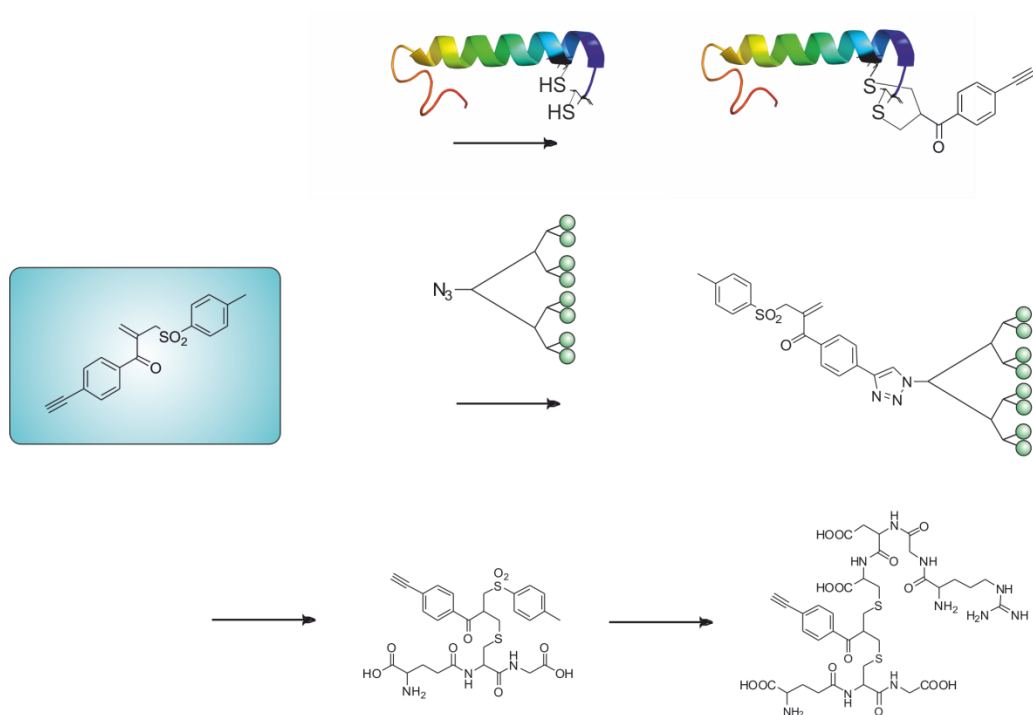


Abb III-6 Anwendungsmöglichkeiten Ethinylmonosulfon

Nach dem Prinzip des Baukastensystems können mittels Sonogashira-Hagihara- und Suzuki-Kopplung Acetylene (b) und Boronsäurederivate (a) an das Iodmonosulfon und mittels Azido-Alkin-Clickreaktion sowie Sonogashira-Hagihara-Kopplung Azide (d) und Halogenide (d) an das Ethinylmonosulfon gekoppelt werden (Abb III-7).

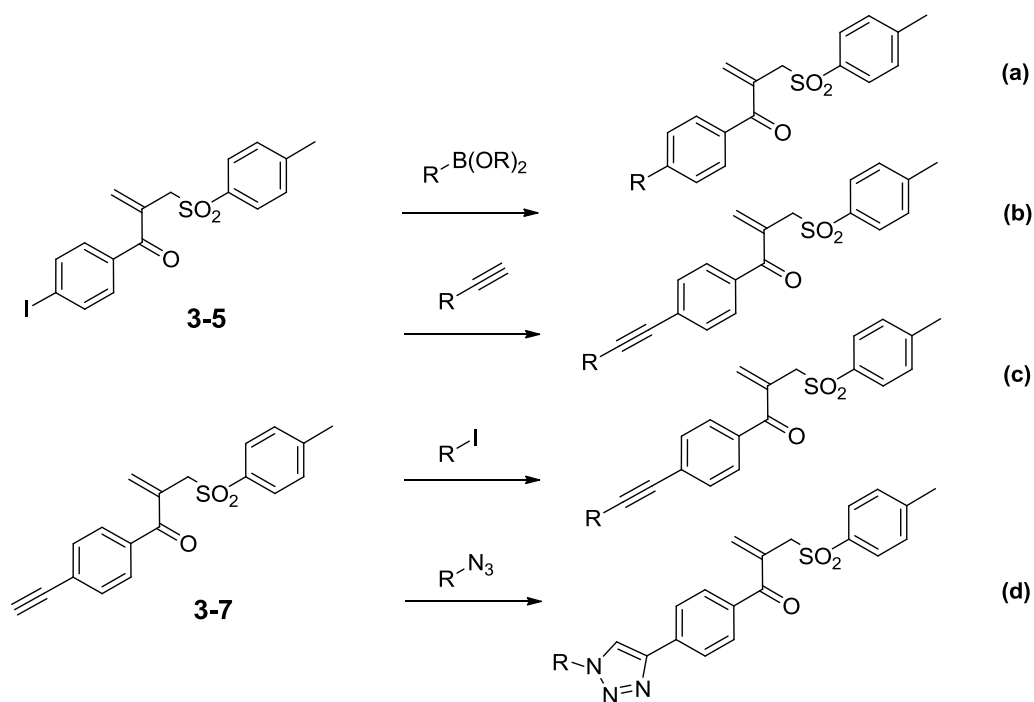


Abb III-7 Bioorthogonale Reaktionen an Iod- sowie Ethynylmonosulfon 3-5 bzw. 3-7

Die ungeheure Flexibilität dieser Moleküle wurde einer Diplomarbeit eindrucksvoll präsentiert. Gegenstand dieser Arbeit war die konvergente Synthese von PAMAM-Dendronen verschiedener Generationen mit azido- oder ethynylfunktionalisierten Kernbausteinen. Sie wurden die mittels 1,3 dipolarer Huisgen-Cycloaddition bzw. Sonogashira-Hagihara-Kupplung unter sehr guten Ausbeuten mit den jeweiligen Monosulfonen verknüpft. Diese Dendrone dienten zur hochselektiven Darstellung von pharmakologisch interessanten Biohybridtherapeutika nach der Interkalation in die Disulfidbrücke von Somatostatin und wurden desweiteren zur Monofunktionalisierung mit RGDC genutzt. So konnten auf vielversprechende Weise neue Wege zu dendronisierten Hybridarchitekturen mit biologisch aktiven Struktureinheiten durch posttranslationale Modifikation der Biokomponente beschriftet werden.

Eine dritte Anwendungsmöglichkeit besteht in der Umsetzung mit Peptiden oder Proteinen, die ein ungepaartes Cystein vorweisen können. Die Monosulfone sind wertvolle Alternativen zu Maleinimidderivaten.

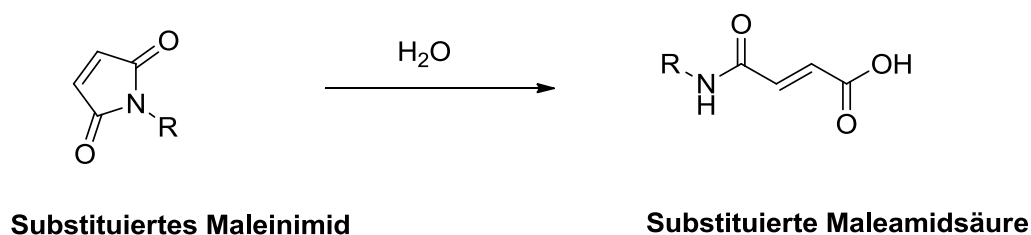


Abb III-8 Hydrolyse von Maleinimid zur Maleamidsäure in wässrigen Lösungen

Der Nachteil der Maleinimidchemie besteht in der Hydrolyse des Maleinimids, welche bei längerer Aufbewahrung in wässrigen Lösungen vor allem unter leicht basischen Bedingungen auftritt^[6]. Darüber hinaus ist die Reaktivität der Thiolate im pH-Wert-Bereich von 6,5 – 7,5 zwar 1000fach höher als die der Lysinaminogruppen, bei höheren pH-Werten reagieren jedoch zunehmend auch diese sowie die Aminofunktionen der Histidine^[7]. Somit kann unter leicht basischen Bedingungen nicht mehr von einer ausschließlichen Reaktion der Cysteine ausgegangen werden. Auch ist die klassische Reaktion eines Thiols mit Maleinimiden irreversibel. Im nächsten Abschnitt soll demonstriert werden, dass bei der Umsetzung der Bissulfone mit Thiole intelligentes Produktdesign über die Veränderung der Molekülstruktur bzw. die Variation des Lösungsmittel und pH-Wertes möglich sind. Die Variationen dieser einzelnen Parameter machen es möglich, mit guter Vorhersagbarkeit Stabilität und Architektur der Biohybridmaterialien zu beeinflussen und öffnen die Tür zu einer Fülle potentieller Anwendungsmöglichkeiten.

III-3 Mono- versus Difunktionalisierung – Betrachtungen des Mechanismus

III-3a Beeinflussung der Gleichgewichtslage

Bei der Entwicklung dieser Linkersysteme ist es von entscheidender Bedeutung, genau zu verstehen, welche Faktoren die Reaktivität und die Stabilität beeinflussen. Effekte, die im ersten Moment eventuell als nachteilig empfunden werden, können bei näherer Betrachtung für andere Anwendungen entscheidend von Vorteil sein.

Wird das Bissulfon eingesetzt, so ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Eliminierung zum Monosulfon, welche nach einem E1cB-Mechanismus abläuft^[3].

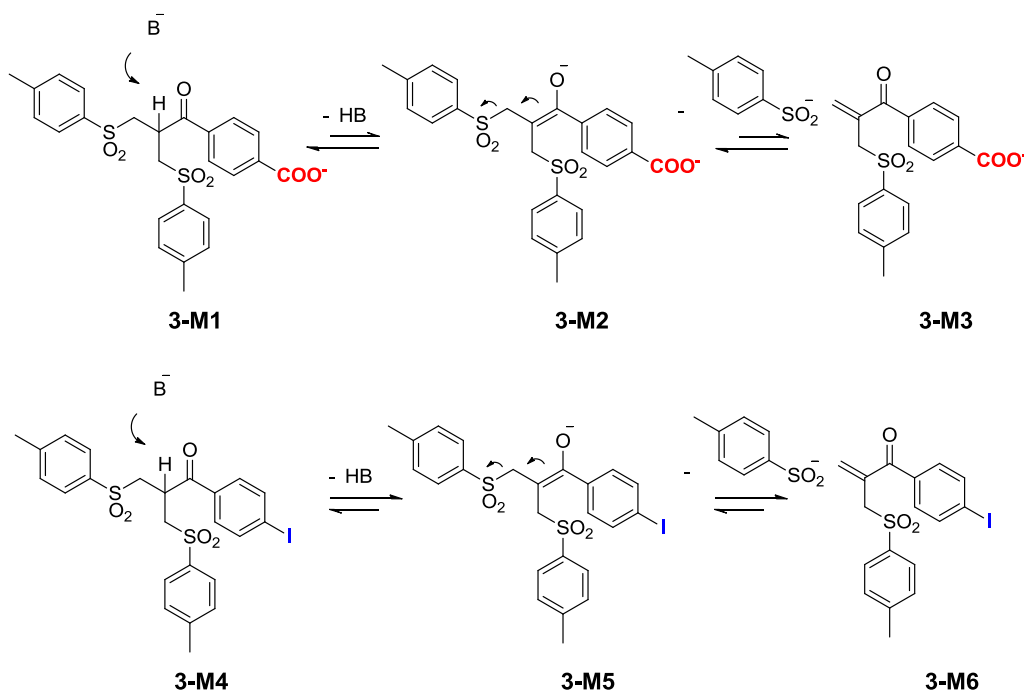


Abb III-9 Basenkatalysierte Eliminierung von p-Toluolsulfinat bei in der para-Position unterschiedlich substituierten Bissulfonen

Nach Abstraktion des aciden Protons in α -Position zum Carbonylkohlenstoff erfolgen die Stabilisierung zum Enolat und die Eliminierung der negativ geladenen Abgangsgruppe p-Toluolsulfonat (Abb III-9).

III-3b Substituent in der para-Position und Einfluss des Lösungsmittels

Für die erfolgreiche Umsetzung spielt daher die Stabilität des Bissulfons bzw. die Lage des Gleichgewichts bei dieser Reaktion eine entscheidende Rolle. Dieses kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden.

Entscheidend ist in diesem Fall die Acidität des Protons bzw. wie gut das entstehende Carbanion durch Delokalisation der negativen Ladung stabilisiert werden kann. –I bzw. –M-Substituenten in p-Position begünstigen die Eliminierung und verschieben das Gleichgewicht in Richtung Monosulfon. Je elektronenreicher der Rest in p-Position, desto stärker liegt das Gleichgewicht zwischen Bissulfon und Monosulfon auf der Seite des Bissulfons und desto schwieriger wird die Darstellung des Monosulfons ausgehend vom Bissulfon (Abb III-9).

Während es beim p-Carboxybissulfon, welches aufgrund der basischen Bedingungen als Carboxylat vorliegt und daher einen leicht aktivierenden Charakter hat, nicht möglich war, das entsprechende Monosulfon durch basenkatalysierte Eliminierung von p-Toluolsulfonat darzustellen, konnte im Fall des Iodbissulfons das Gleichgewicht in Gegenwart von Kalium-t-butanolat ausreichend in Richtung des Monosulfons verschoben und das Produkt isoliert werden. Im Fall des Ethinyl-substituierten Linkers konnte das Bissulfon aufgrund der gewählten Syntheseroute nicht dargestellt werden, da die für die Entschützung vom tips-Ethinylbissulfon notwendigen Bedingungen gleichzeitig zur vollständigen Eliminierung zum Ethinylmonosulfon führen. Am leichtesten lässt sich die Eliminierung bei gut wasserlöslichen Amidlinkern

durchführen, bei denen sich durch Inkubation in leicht basischen Pufferlösungen bei Raumtemperatur das Monosulfon in guten Ausbeuten erhalten lässt.

Dies liegt jedoch nicht nur in der elektronischen Natur des Restes, sondern auch daran, dass sich die Eliminierung aufgrund der guten Wasserlöslichkeit in wässriger Lösung durchführen lässt.

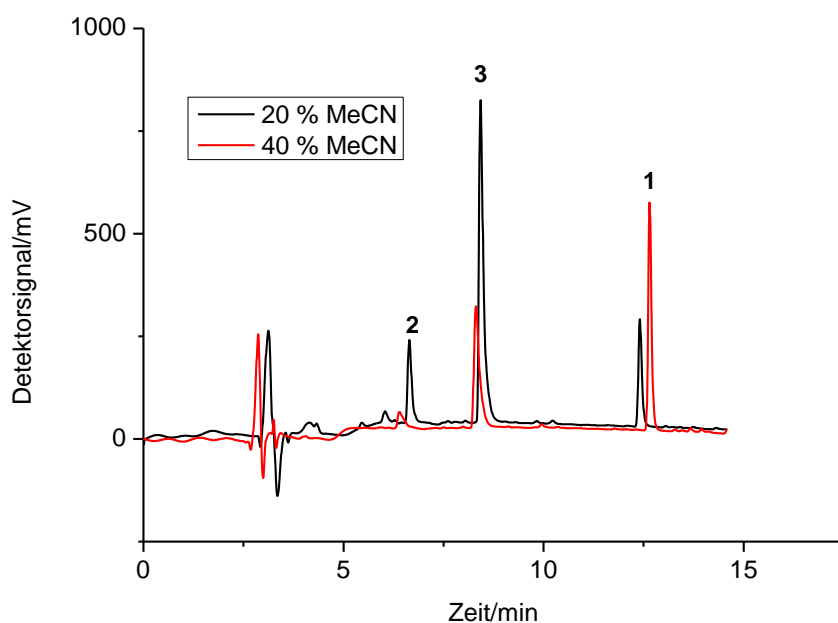


Abb III-10 Umsetzung von Carboxybisulfon 3-1 mit Glutathion in Abhängigkeit der Konzentration an Acetonitril. schwarz: HPLC-Elugramm mit 40% Acetonitril; rot: HPLC-Elugramm mit 20% Acetonitril; 1: Carboxybisulfon, 2: p-Toulensulfonat, 3: Produkt (Di-Addukt mit Glutathion) 3-M7

Im Gegensatz zu polar-aprotischen Lösungsmitteln sind polar-protische Lösungsmittel wie Wasser in der Lage, Anionen wie p-Toluensulfonat gut zu solvatisieren und daher die Rückaddition an das konjugierte System zu verhindern.

In Abb III-10 sind zwei Elugramme abgebildet, die durch Analyse der Reaktionslösung nach 24 Stunden mittels analytischer HPLC erhalten wurden. In beiden Fällen wurde Carboxybissulfon 3-1 (1) mit zwei Äquivalenten Glutathion in PB 50 mM, 10 mM EDTA, pH 7,8 in Gegenwart von TCEP umgesetzt. Während bei Fall a (schwarz) die Konzentration an Acetonitril 40% betrug, wurde die Reaktion in Fall b (rot) in nur 20% Acetonitril durchgeführt (Abb III-11).

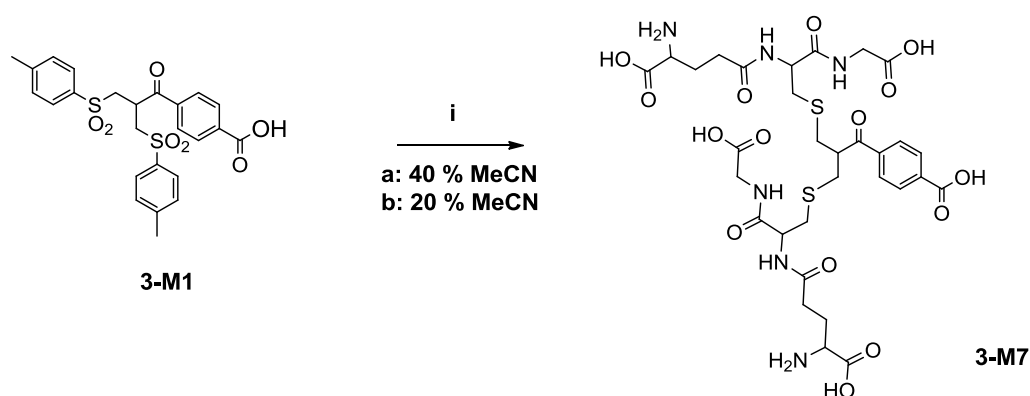


Abb III-11 Reaktionsgleichung der Umsetzung von Carboxybissulfon 3-M1 mit Glutathion, i: Glutathion (2 eq), TCEP (2 eq), PB 50 mM, pH 7,8/MeCN, RT, 18 h. Fall a: PB 50 mM, pH 7,8/MeCN (3:2); Fall b: PB 50 mM, pH 7,8/MeCN (4:1)

Es lässt sich beobachten, dass im Fall der geringeren Konzentration an organischem Lösungsmittel wesentlich mehr p-Toluolsulfinat (2) eliminiert wurde und die Menge an gebildetem Produkt (3) signifikant größer ist.

Die Natur des Restes in p-Position gibt auch einen Aufschluss über die Stabilität des gebildeten Thioladduktes. Lawton et al. machten diese Beobachtungen bereits mit ihren Linkern der ersten Generation^[1]. Bei den in Abb III-12 abgebildeten Nitroderivaten läuft die Michael- aber auch die retro-Michael-Addition sehr schnell ab, da das Proton in alpha-Stellung zum Aromaten eine hohe Acidität besitzt.

Alle verfügbaren Nucleophile können angreifen und wieder eliminieren, so dass sich das Gleichgewicht mit fortschreitender Reaktionszeit in Richtung des thermodynamisch stabilsten Produktes verschiebt. Wird jedoch die Nitrogruppe zum Amin reduziert, kann dieses Gleichgewicht eingefroren werden und je nach Zeitpunkt der Reduktion kann auch das kinetische Produkt isoliert werden^[1].

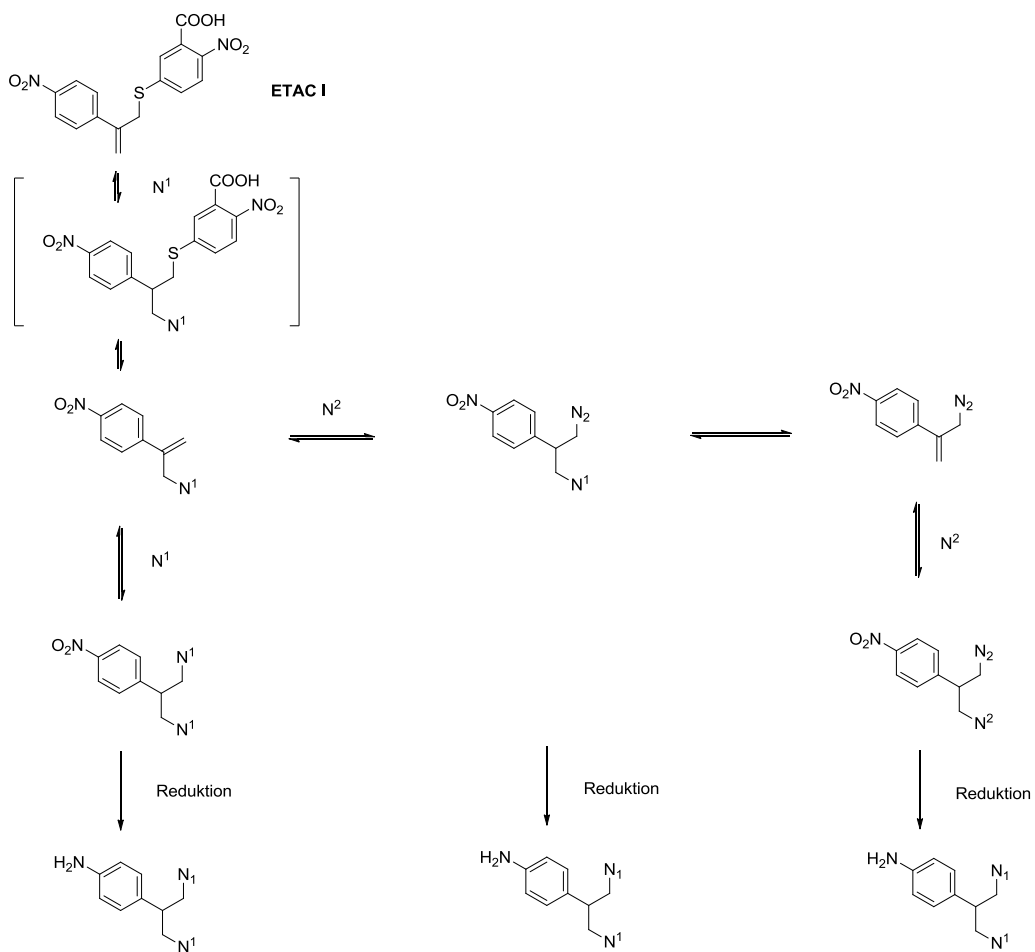


Abb III-12 Gleichgewichtslage bei Umsetzung von ETAC I (Abb III-1) mit verschiedenen Nucleophilen und Fixierung des Gleichgewichtes durch Reduktion^[1]

Bei diesen Derivaten der ersten Generation ist jedoch der Effekt der Substitution ausgeprägter, da es sich um Styrole und nicht um Acetophenone handelt und die negative Ladung des Carbanions daher auch noch über das Ringsystem stabilisiert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über die Auswahl des Substituenten in p-Position ein intelligentes Produktdesign möglich ist (Abb III-13). Ein aktivierender Rest resultiert in einer schlechteren Stabilisierung des Carbanionübergangszustands und damit auch in einer langsameren Umsetzung zum Michael-Additionsprodukt. Auch sind die Ausbeuten wesentlich geringer. Das gebildete Produkt jedoch ist sehr stabil. Ein Substituentenaustausch findet nicht statt, da die retro-Michael-Addition nicht abläuft.

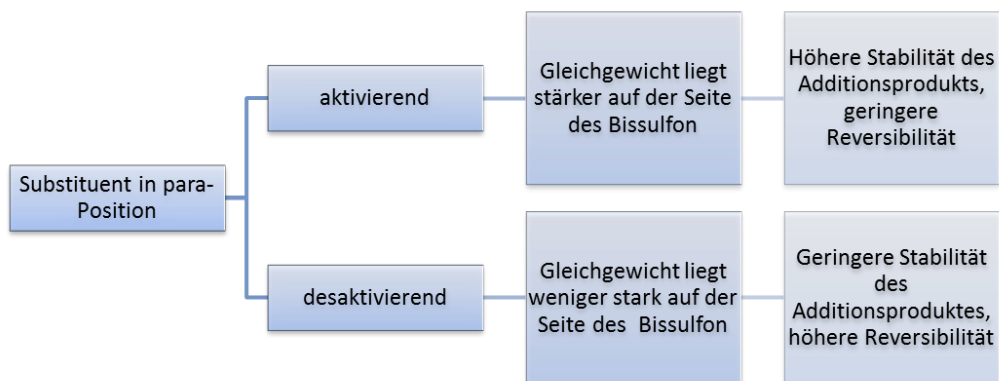


Abb III-13 Einfluss des Substituenten in para-Position auf die Produktbildung

Ein desaktivierender Rest sorgt für eine gute Stabilisierung des Übergangszustands, was bedeutet, dass die Michael-Addition aber auch die Retro-Michael-Addition

schneller abläuft. Das Produkt weist eine geringere Stabilität auf und kann durch Zugabe eines Reduktionsmittels oder eines konkurrierenden Nucleophils wieder gespalten werden.

III-3c Mono- und Difunktionalisierung – Die reversible Bildung von Heterokonjugaten

Die Linker zeichnen sich somit durch eine ungewöhnliche Vielfalt betreffend der Anwendungsmöglichkeiten aus. Eine Möglichkeit der Monofunktionalisierung eines Linkers besteht darin, das Monosulfon zu isolieren und es anschließend bei leicht sauren pH-Werten und in polar-aprotischen Lösungsmitteln umzusetzen.

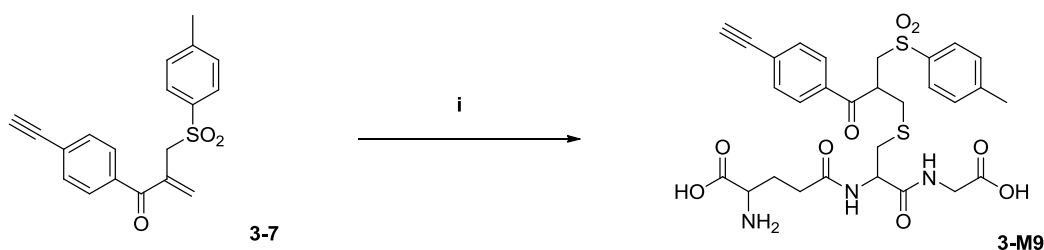


Abb III-14 Umsetzung von Ethynylmonosulfon 3-7 mit Glutathion; i: Glutathion (2 eq), DMF/MeCN/PB 50 mM (2:2:3), pH 6,2, RT, 18 h

Dadurch kann man die Eliminierung von p-Toluensulfonat weitgehend unterdrücken und durch frühzeitigen Abbruch der Reaktion das Monoaddukt als Hauptprodukt isolieren. So konnte Ethynylmonosulfon 3-7 mit Glutathion in DMF/MeCN/PB 50 mM (2:2:1) bei pH 6,2 zum Glutathion-Ethynyl-Monosulfon 3-M9 umgesetzt werden (Abb III-14).

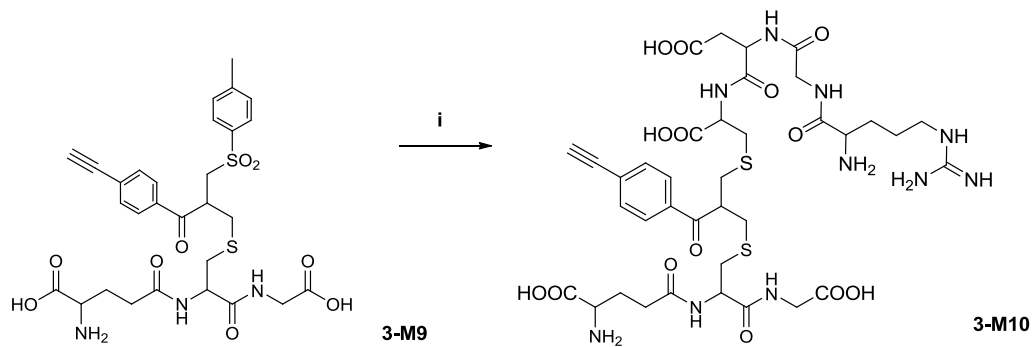


Abb III-15 Umsetzung von Glutathion-Ethynyl-Monosulfon 3-M9 mit RGDC; i: RGDC (1 eq), MeCN/PB 50 mM (1:7), pH 7,8, RT, 18 h

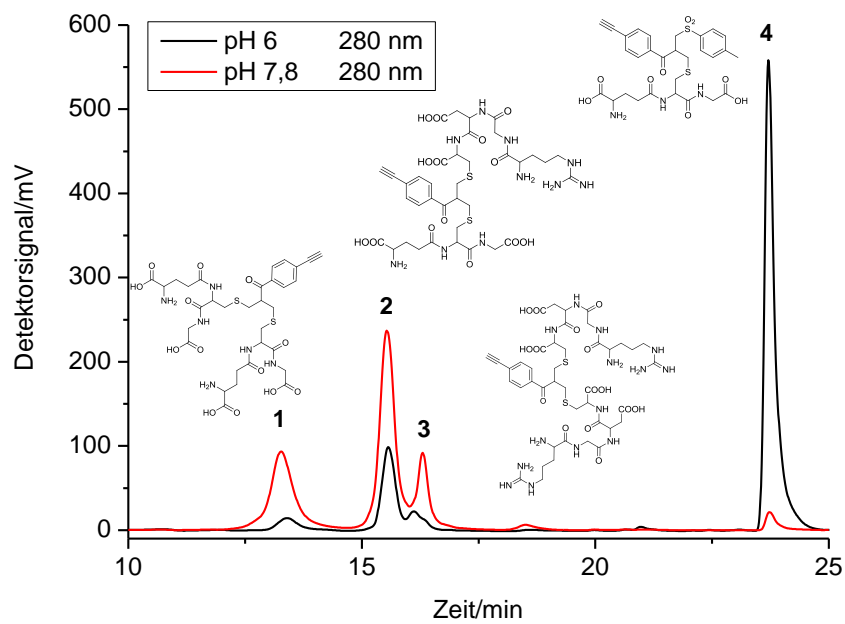


Abb III-16 Vergleich der Umsetzung von Glutathion-Ethynyl-Monosulfon 4-2 mit RGDC bei verschiedenen pH-Werten; rot: HPLC-Elugramm der Reaktion bei pH 7,8; schwarz: HPLC-Elugramm der Reaktion bei pH 6,2; 1: Homobisaddukt 3-M10, 2: Homobisaddukt 3-M11, 3: Heteroaddukt: 3-M12

Es ist anschließend möglich, dieses Monoaddukt 3-M9 mit einem RGDC zum 1,2-Addukt umzusetzen, wenn die Reaktion in Phosphatpuffer bei pH 7,8 mit einem geringeren Anteil an Acetonitril durchgeführt wird (

Abb III-15). Darüber hinaus erlaubt die bioorthogonale Ethinylfunktionalität die Verknüpfung eines dritten Azido-Biomoleküls durch 1,3 dipolare Cycloaddition.

In Abb III-16 lässt sich deutlich erkennen, dass nach 24 Stunden fast kein Edukt 4-2 (4) mehr vorhanden ist.

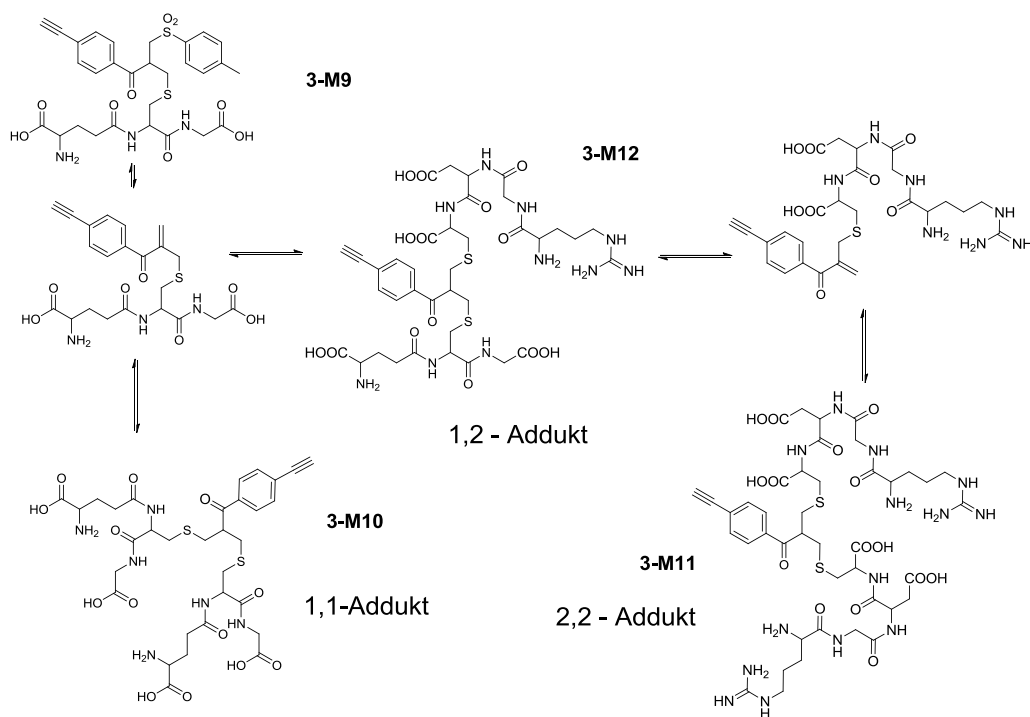


Abb III-17 Gleichgewichtseinstellung bei der Umsetzung von Glutathion-Ethynyl-Monosulfon 3-M9 mit RGDC

Wird die Reaktion bei pH 6 durchgeführt, ist die Eliminierung gehemmt und die Reaktion läuft wesentlich langsamer ab. In beiden Fällen lässt sich jedoch neben dem gemischten Addukt 3-M12 (2) auch noch die beiden Homobisaddukte 3-M10 (1) und 3-M11 (3) beobachten.

Verantwortlich für dieses Phänomen ist die bereits erwähnte Reversibilität der Michael-Addition bei der Verwendung von Bissulfonen mit deaktivierenden Substituenten in der para-Position zur Ketofunktion.

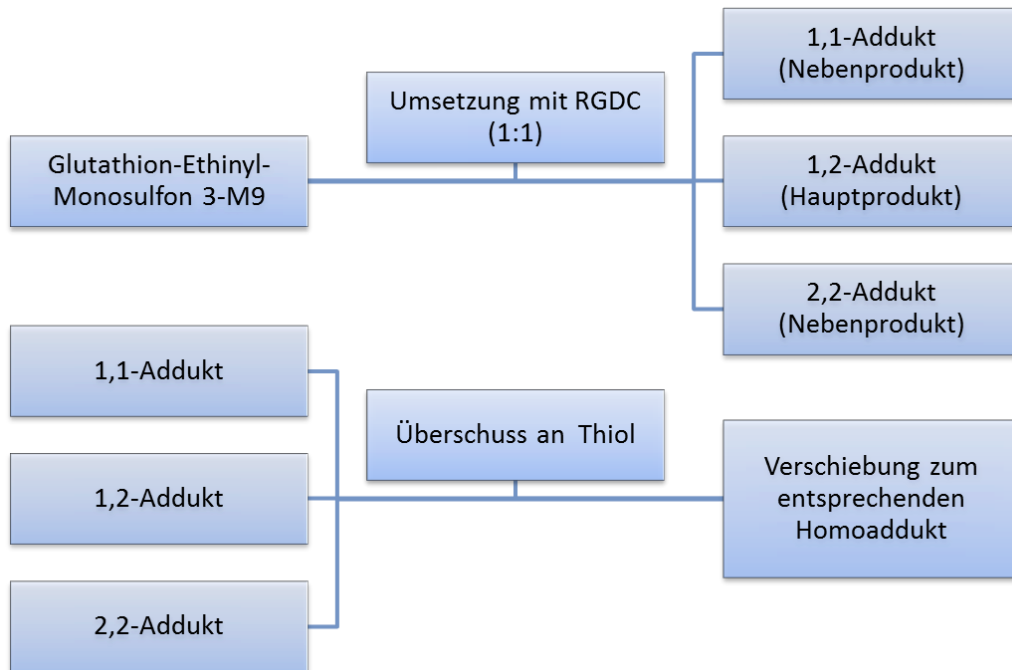


Abb III-18 Gleichgewichtseinstellung bei der Umsetzung von Glutathion-Ethynyl-Monosulfon 3-M9 mit RGDC - Organigramm

Da nicht nur die zweite sondern auch die erste Addition reversibel ist, wird unter entsprechenden Bedingungen Glutathion freigesetzt, welches mit dem Edukt 3-M9 (4) zum 1,1-Addukt 3-M10 (1) reagieren kann (Abb III-17). Aus dem 1,2-Addukt 3-M12 kann sich ebenfalls Glutathion abspalten, das entsprechende Mono-RGDC-Intermediat reagiert mit RGDC zum 2,2-Addukt 3-M11 (3). Werden Edukt 3-M9 (4) und RGDC im Verhältnis 1:1 miteinander umgesetzt, wird ein statistisches Verhältnis von 1:2:1 (1,1-Addukt : 1,2-Addukt : 2,2-Addukt) erhalten.

Dieses verschiebt sich jedoch in Richtung des 2,2-Adduktes 3-M11 (3), wenn ein sterisch anspruchsvolleres Biomolekül verwendet wird. Ein Überschuss an Glutathion kann jedoch dazu genutzt werden, um ausschließlich zum 1,1-Addukt 3-M12 (1) zu gelangen und das zweite Thiol freizusetzen. Dieses reversible Verhalten macht solche Konjugate sehr attraktiv für Drug delivery-Anwendungen.

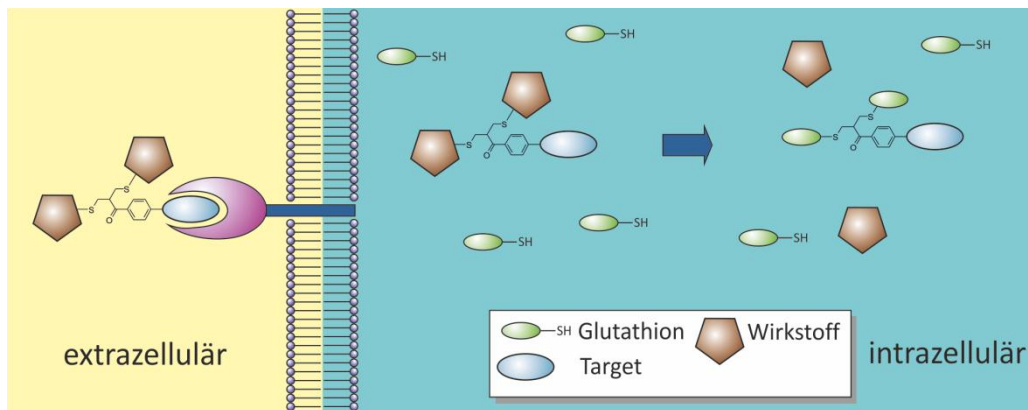


Abb III-19 Prinzip der Wirkstofffreisetzung in Zellen durch reversible Michael-Addition

Denkbar sind Architekturen, in denen ein Target irreversibel über die p-Position mit einem Linkeranker verknüpft ist, während über konjugierte Addition ein Wirkstoffmolekül reversibel verlinkt ist, welches in einem reduzierendem Medium durch einen Überschuss an Glutathion freigesetzt werden kann (Abb III-19). Da die Konzentration von Glutathion in Zellen wesentlich höher ist als im Blut, könnte dieser Ansatz genutzt werden, um Wirkstoffe gezielt in Zellen freizusetzen, während das Target dazu dient, das Konjugat hochspezifisch in die gewünschte Zelle einzuschleusen.

III-3d Spezifische Kreuzkupplung von Peptiden mit pH-Selektivität

Die kontrollierte Verknüpfung zweier verschiedener Biomoleküle über Thiolchemie stellt immer noch eine große Herausforderung dar. Werden Reagenzien verwendet, die auf beiden Seiten eine Maleinimidfunktionalität tragen, erhält man Mischungen an Homo- und Heterodimeren, die schwer voneinander zu trennen sind.

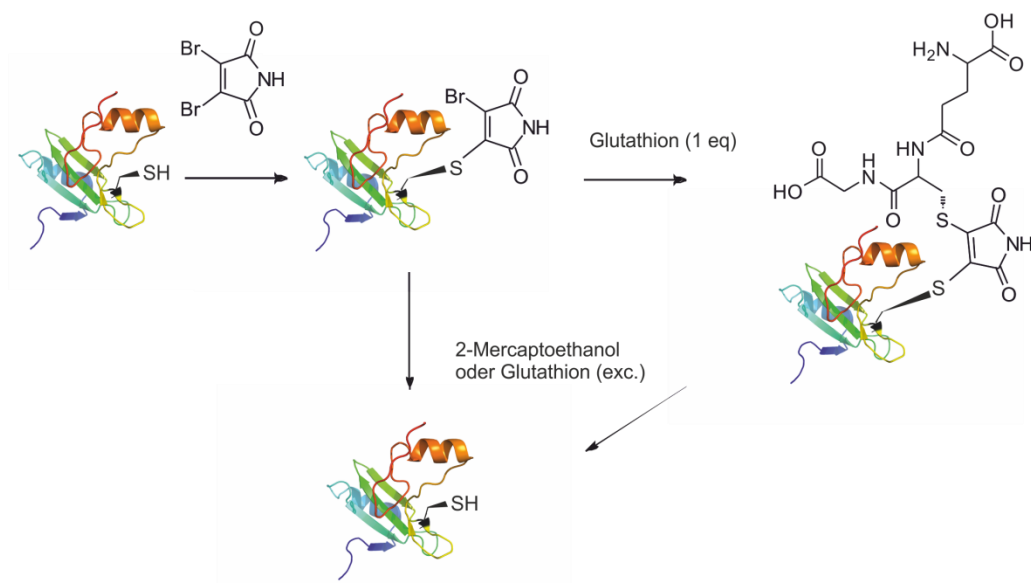


Abb III-20 Verknüpfung zweier thiofunktionalisierter Biomoleküle über Dibrommaleinimide nach Smith et al.^[8]

Smith et al. beschreiben mit ihren Mono- und Bisbrommaleinimiden die selektive Verknüpfung zweier SH-funktionalisierter Biomoleküle durch nukleophile Substitution unter Ausbildung der Bisthioether^[8-9].

Eine eingehende Betrachtung erweckt jedoch den Eindruck, dass aufgrund der äquivalenten Reaktivität der beiden Zentren eine 1,2 – Funktionalisierung nur möglich ist, wenn für die erste Substitution ein raumfüllendes Makromolekül verwendet wird

und aufgrund der sterischen Abschirmung die Bildung des 1,1 – Homodimers verhindert wird. Als zweite Komponente kann somit nur ein kleines Molekül wie Thioglucose oder Glutathion effektiv verknüpft werden (Abb III-20).

Im nächsten Absatz soll daher ein Linkermolekül entworfen werden, das die ortsgerichtete Verknüpfung zweier Makromoleküle erlaubt. Dieses Molekül kombiniert Maleinimid- und Bissulfonchemie und liefert die Möglichkeit, zwei Thiole hoch selektiv miteinander zu verbinden. Ähnlich wie beim zuvor präsentierten Ansatz besteht die Taktik darin, die erste Reaktion bei einem pH-Wert durchzuführen, bei dem die Eliminierung von p-Toluolsulfonat nur sehr langsam abläuft und die Bissulfoneinheit intakt bleibt. Die Maleinimidgruppe reagiert bei pH 6 innerhalb von fünf Minuten vollständig mit dem Thiolderivat. Das Konjugat kann aufgereinigt und charakterisiert werden.

Wird der pH-Wert anschließend auf 7,8 erhöht, findet die in-situ Eliminierung zum Monosulfon statt, welche bereitwillig mit einem zweiten Thiol reagiert. Wird im zweiten Schritt ein kleines Peptid wie Glutathion eingesetzt, kann das 1,2,2-Triaddukt erhalten werden. Reagiert jedoch ein sterisch anspruchsvolleres Peptid oder Protein, ist das zweite reaktive Zentrum nicht zugänglich und das 1,2-Bisaddukt wird unter guten Ausbeuten erhalten. Die Abschirmung bewirkt darüber hinaus, dass die Rückreaktion gehemmt wird und das gebildete 1,2-Bisaddukt somit sehr stabil ist.

Es wird zu zeigen sein, inwiefern diese Konjugate auch in Gegenwart eines hohen Überschusses an Glutathion stabil sind, aufgrund der sterischen Hinderung wird jedoch erwartet, dass das Konjugat auch dann nicht beeinträchtigt wird.

Die Synthese und Charakterisierung von Maleinimibissulfon 3-M13 ist Teil einer anderen Doktorarbeit und soll in dieser Arbeit nicht näher erläutert werden. Die folgenden Schritte und theoretischen Betrachtungen wurden innerhalb eines gemeinsamen Projektes verwirklicht und stellen einen wichtigen Teil dieser Arbeit dar. Der Maleinimidrest wurde mit Cystein modifiziert, um die detaillierte Analyse der Konjugate mittels NMR Spektroskopie zu ermöglichen.

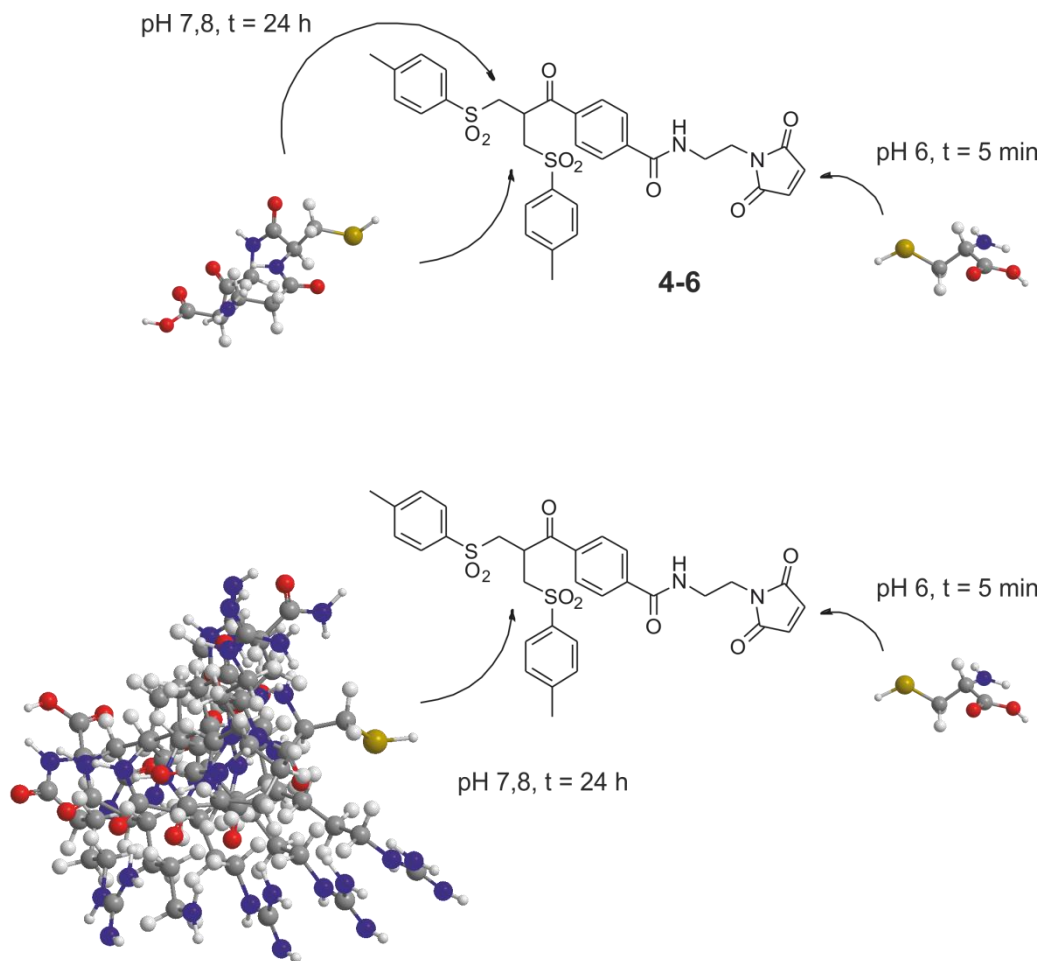


Abb III-21 Funktionalisierung von Maleinimidbissulfon 3-M13 in Abhängigkeit von pH-Wert und der Größe des Biomoleküls

Die Reaktion wurde in PB 50 mM, pH 6,2 durchgeführt und nach nur fünf Minuten Reaktionszeit abgebrochen (Abb III-21). CysMaleinimidbissulfon 4-7 wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Durch die Addition wird ein neues chirales Zentrum generiert, welches mittels NMR Spektroskopie visualisiert werden kann, wenn enantiomerenreines D-Cystein verwendet wird.

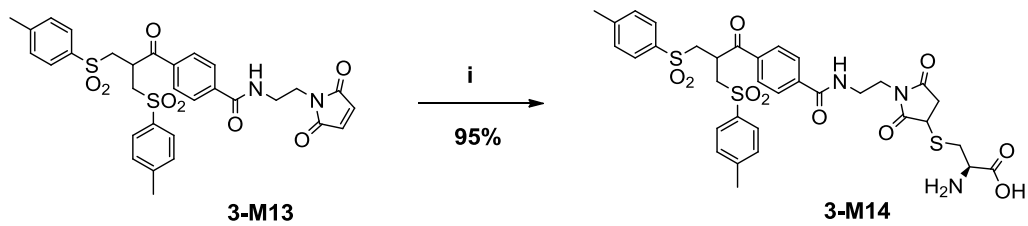


Abb III-22 Darstellung von CysMaleinimidbissulfon 3-M14. i: Cystein (1,1 eq), PB 50 mM, pH 6,2, RT, 5 Min

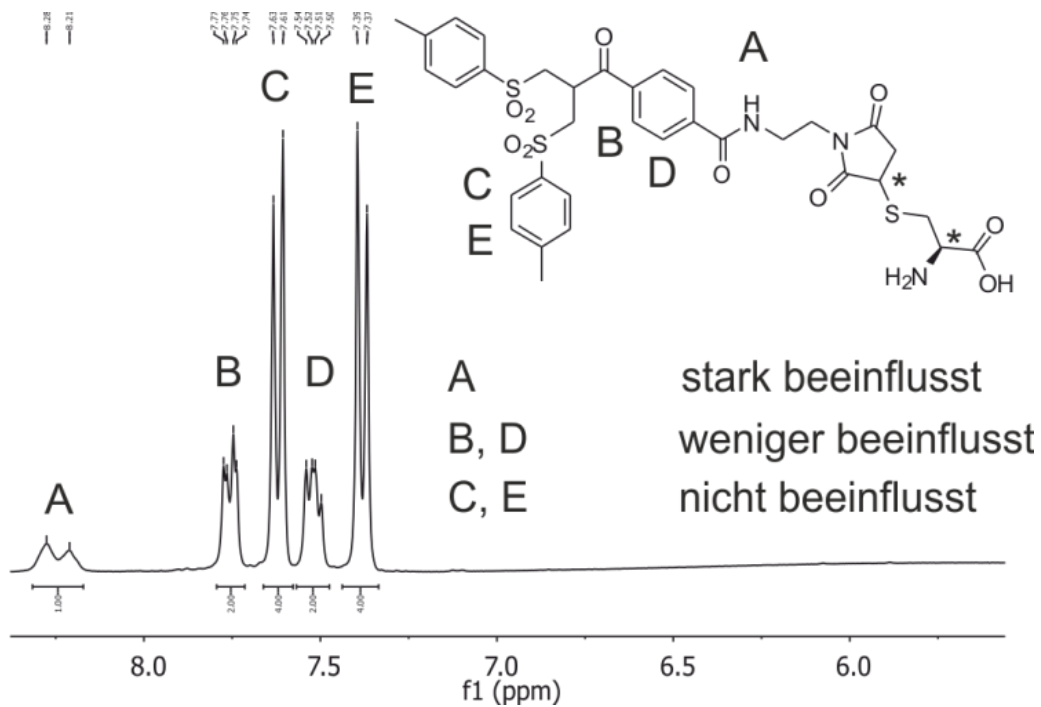


Abb III-23 ^1H -NMR-Spektrum von CysMaleinimidbissulfon in DMSO- d_6 (250 MHz)

In diesem Fall werden Diastereomere im Verhältnis 1:1 gebildet. Wie stark das Signalmuster der einzelnen Protonen durch die Veränderung des magnetischen

Umfelds beeinflusst wird, hängt u.a. vom Abstand des Protons zu den chiralen Zentren ab.

Während die Signale der aromatischen Protonen C und E nicht beeinflusst werden, kann man die zusätzliche Aufspaltung der Signale B und D beobachten. Im Falle der Amidprotonen A werden die Signale stark beeinflusst und die Aufspaltung ist deutlich zu erkennen.

Die Umsetzung des Maleinimidbissulfons 4-6 mit Cystein bei pH 6 ist hoch selektiv. Wird der pH-Wert auf 7,8 erhöht, so findet die Eliminierung des p-Toluolsulfonats statt und das in-situ dargestellte Monosulfon reagiert bereitwillig mit Thiolen. Nach der Reaktion mit Glutathion wurde ausschließlich das 1,2,2-Triaddukt 3-M15 erhalten, mittels Äkta RPC aufgereinigt und via NMR und Maldi-Tof Massenspektrometrie charakterisiert.

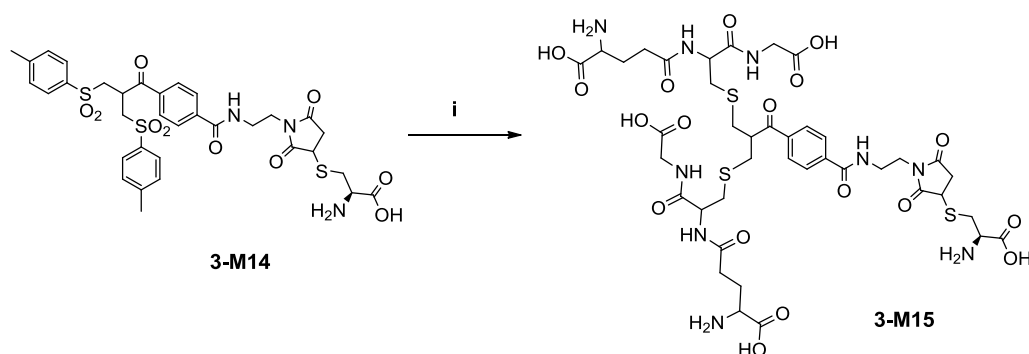


Abb III-24 Umsetzung von CysMaleinimidbissulfon 4-7 zum 1,2,2-Triaddukt 4-8. i: Glutathion (1 eq), PB 50 mM, pH 7,8, RT, 18 h

Das NMR-Spektrum ist aufgrund der Signalverdopplung sehr komplex und die Signale der einzelnen Protonen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Synthesen und Aufreinigungen der folgenden Produkte wurden von Wang Tao durchgeführt. In einem weiteren Experiment wurde das sterisch anspruchsvolle HIV Tat 48-60 Cys Peptid eingesetzt, welches als eines der ersten *cell penetrating* Peptide bekannt

wurde^[10]. In diesem Fall findet die zweite Eliminierung zwar statt, das entstandene Michael-Addition-System ist jedoch räumlich so stark abgeschirmt, dass die Anlagerung eines zweiten Moleküls nicht möglich ist.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses einzigartigen Linkers BSA und HSA schrittweise miteinander gekoppelt und zur Darstellung eines HSA-BSA-Dimers genutzt werden, während dies über den Ansatz von Smith et al. aufgrund der großen räumlichen Nähe der Reaktionszentren zueinander nicht möglich ist^[11].

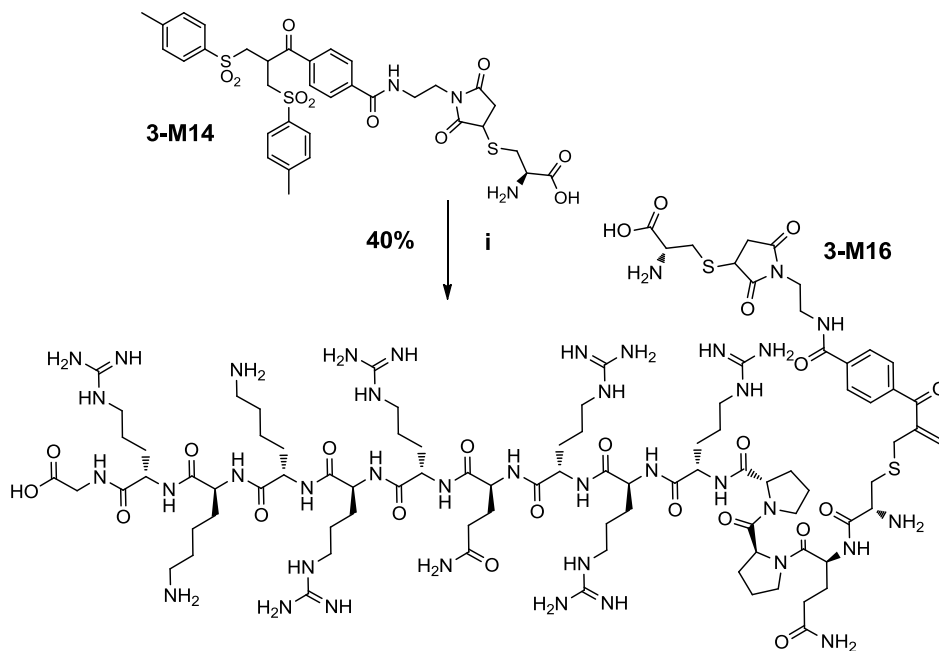


Abb III-25 Umsetzung von CysMaleinimidbissulfon 4-7 mit HIV Tat 48-60 Cys 4-9. i: H HIV Tat 48-60 Cys (0,5 eq), PB 50 mM, pH 7,8/MeCN (7:3), RT, 18 h

Auch die Verknüpfung des HIV Tat 48-60 Cys Peptid mit einem Modelloligonukleotid ON (C6SH-5'-AATTGAATAAGCTGGTAT-3') war über diesen Ansatz möglich und so konnte gezeigt werden, dass das Maleinimidbissulfon 3-M13 als universeller

Crosslinker für die Kupplung zweier Biomoleküle mittels Thiolchemie genutzt werden kann.

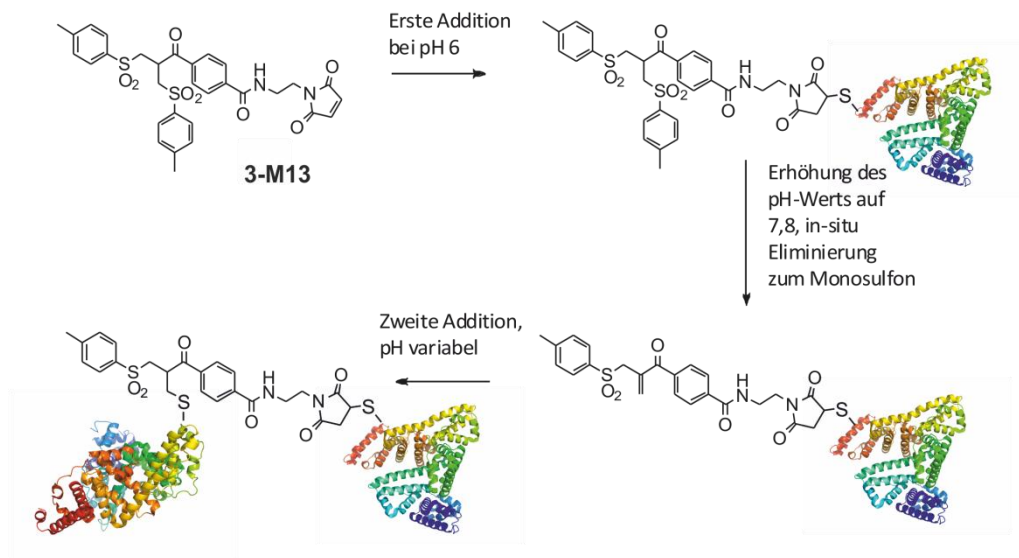


Abb III-26 Heterokonjugate über die Addition von HSA und BSA an Maleinimidbissulfon 3-M13

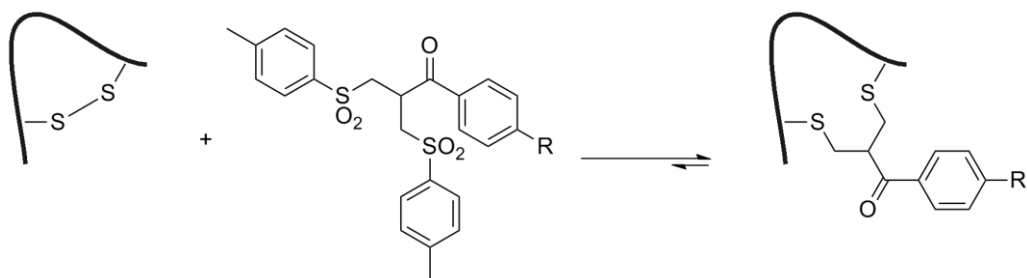


Abb III-27 Gleichgewichtslage bei der Intercalation von Bissulfonen in Disulfidbrücken

Die Umsetzung der Bissulfone zu den Bisaddukten lässt sich nur dann verwirklichen, wenn der Substituent in para-Position desaktivierend ist und der Linker eine gute

Wasserlöslichkeit besitzt. Bei der Interkalation in Disulfidbrücken hingegen spielen diese Faktoren eine geringere Rolle.

Es wird vermutet, dass das gebildete Interkalationsprodukt durch die sterische Abschirmung der Reaktionszentren eine hohe Stabilität besitzt und die basenkatalisierte retro-Michaeladdition so gut wie nicht stattfindet. Vorteilhaft ist in diesem Fall auch die räumliche Nähe der beiden Thiole, so dass die räumliche Abschirmung des reaktiven Zentrums nach der ersten Michael-Addition die zweite Eliminierungsaddition nicht behindert. Durch die Irreversibilität der letzten Addition wird das Gleichgewicht beständig in Richtung Monosulfon verschoben und damit können auch unreaktive Bissulfone in guten Ausbeuten umgesetzt werden. Die Interkalation in die Disulfidbrücke des Peptidhormons Somatostatin wird unter diesen Gesichtspunkten im nächsten Kapitel ausführlich vorgestellt und diskutiert werden.

Literatur

- [1] S. Mitra, R. G. Lawton, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3097-3110.
- [2] F. A. Liberatore, R. D. Corneau, J. M. McKearin, D. A. Pearson, B. Q. Belonfa, S. J. Brocchini, J. Kath, T. Phillips, K. Oswell, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *7*, 36-50.
- [3] R. B. del Rosario, R. L. Wahl, S. J. Brocchini, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 51-59.
- [4] J. M. Thornton, *Journal of Molecular Biology* **1981**, *151*, 261-287.
- [5] S. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J.-W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241-2252.
- [6] Hargreav.Mk, Pritchar.Jg, H. R. Dave, *Chemical Reviews* **1970**, *70*, 439-&.
- [7] C. F. Brewer, J. P. Riehm, *Analytical Biochemistry* **1967**, *18*, 248-255.
- [8] M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, S. Caddick, J. R. Baker, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1960-1965.
- [9] aC. P. Ryan, M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, D. Grohmann, D. Papaioannou, G. Waksman, F. Werner, J. R. Baker, S. Caddick, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 5452-5454; bF. F. Schumacher, M. Nobles, C. P. Ryan, M. E. B. Smith, A. Tinker, S. Caddick, J. R. Baker, *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 132-136.
- [10] aS. L. Lo, S. Wang, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2408-2414; bV. P. Torchilin, *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60*, 548-558.
- [11] W. Tao, A. Pfisterer, O. Dumele, M. Lamla, T. Weil, *Journal of the American Chemical Society (submitted)* **2011**.

IV Somatostatintherapeutika – Darstellung und biologische Aktivität

IV-1 Wirkstoffe, die auf Proteinen und Peptiden basieren

Auf Peptiden und Proteinen basierende Wirkstoffe gehören zu einem sich neu entwickelnden Gebiet von Pharmazeutika, welche sich häufig durch eine hohe Spezifität und überragende Potenz auszeichnen^[1]. Oft wird jedoch ihr Anwendungsprofil deutlich durch ihre pharmakokinetischen Eigenschaften eingeschränkt^[1]. Dies stellt eine Herausforderung an präklinische und klinische Entwicklungen von auf Biomolekülen basierender Therapeutika dar^[2]. Eine Vielzahl an posttranslationale Modifikationen wurde hinsichtlich der Verbesserung der Stabilität der Therapeutika gegenüber proteolytischem Abbau sowie der Aufnahme in Gewebe und Zellen auf ihr Potential untersucht. Jedoch sind nur wenige auf chemischen Ansätzen basierende Methoden bekannt, die die Einführung einer Funktionalität in eine spezifische Position auf der Proteinoberfläche oder des Peptidrückgrats mit hoher Reproduzierbarkeit gewährleisten. Maßgeschneiderte Reagentien oder Enzyme zur Modifikation des N-Terminus^[3], Cysteinpunktmutationen^[4] oder der Einbau nicht natürlicher Aminosäuren mit bioorthogonalen Gruppen^[5] über stellen Methoden dar, die bereits in der Vergangenheit erfolgreich Anwendung fanden. Problematisch erweisen sich oft jedoch die niedrigen Produktausbeuten und die Tatsache, dass mit der Mutagenese oder Modifizierung oft ein Verlust an biologischer Aktivität einhergehen kann.

Angesichts dieser Punkte präsentiert sich die Interkalation maßgeschneiderter Alkylierungsreagentien in native Disulfidbrücken als vielversprechende Methode, die in der Vergangenheit u.a. zur hochspezifischen PEGylierung von Antikörpern oder Fab-Fragmenten genutzt wurde^[6]. Die Synthese aller in dieser Arbeit präsentierten

Moleküle wurde durch diesen Ansatz inspiriert. Darüber hinaus wurde im Kontext dieser Arbeit der Einbau dieser vorgestellten Linkermoleküle in die Disulfidbrücke von Somatostatin-14 ausführlich untersucht.

IV-2 Somatostatin-14 – Ein Neuropeptidhormon mit vielen Funktionen

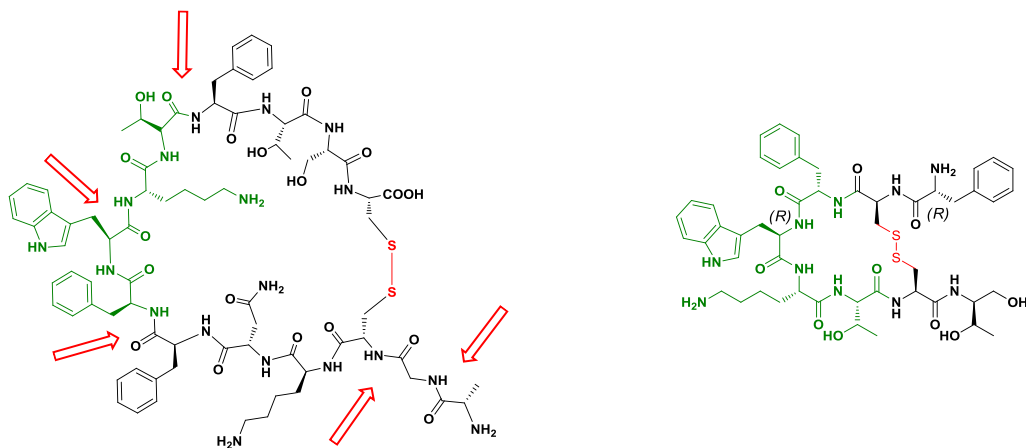


Abb IV-1 links: Natives Somatostatin-14; die roten Pfeile markieren die Stellen, an denen das Peptid bevorzugt proteolytisch gespalten wird; rechts: Struktur von Octreotid

Es handelt sich bei Somatostatin-14 um ein cyclisches Tetradecapeptid mit einer internen Disulfidbrücke, welches in der Regulation des Verdauungstraktes durch die Sekretionshemmung vieler gastrointestinaler Hormone eine entscheidende Rolle spielt^[7]. Es wird hauptsächlich im Dünndarm und im endokrinen Pankreas in den δ -Zellen der Langerhans-Inseln gebildet. Zusätzlich hemmt es die Bildung von Somatotropin in der Hypophyse^[8], die Freisetzung von Insulin und Glukagon und spielt als Neurotransmitter in vielen physiologischen Prozessen eine entscheidende Rolle^[9]. Diese breite Palette an Wirkungen mit vor allem inhibitorischen Charakter macht

Somatostatin interessant für den Einsatz gegen verschiedene Krankheiten wie Akromegalie, Blutungen des Magen-Darm-Trakts, pankreatische Fisteln und endokrine Tumoren. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von einer bis drei Minuten ist der klinische Einsatz von nativem Somatostatin jedoch problematisch^[10].

Somatostatin wird bevorzugt an fünf Stellen durch Peptidasen proteolytisch gespalten (Abb IV-1). Stabilisierend gegenüber dem proteolytischen Abbau durch Proteasen und Peptidasen wirkt der Einbau von D-Enantiomeren oder β -Aminosäuren. Durch systematischen Austausch aller Aminosäuren gegen Alanin wurde gefunden, dass die Erhaltung der Schleifensequenz Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ und ihrer Konformation essentiell für die physiologische Aktivität des Hormons sind^[11]. Diese wird durch die von Cys³ und Cys¹⁴ gebildete Disulfidbrücke erhalten und stabilisiert^[12]. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde Octreotid entwickelt, ein synthetisches Somatostatinanalogon, welches eine wesentlich längere Halbwertszeit besitzt und für klinische Anwendungen besser geeignet ist^[8, 13]. Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Umsetzung der biorthogonalen Konjugationsreagentien Iod- und Ethinylmonosulfon 3-7 und Somatostatin sowie der strukturellen Integrität der nicht-natürlichen Somatostatinanaloga.

Natives Somatostatin-14 wurde mit einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ in einer Mischung aus 50mM Phosphatpuffer, pH 6,2 und Acetonitril (3:2) gelöst und mit zwei Äquivalenten TCEP·HCl versetzt. Nach einer Stunde Inkubierens bei Raumtemperatur wurde das jeweilige Monosulfon (Ethinyl- bzw. Iodomonosulfon 3-7 bzw. 3-5) zugeben und die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Abb IV-2). Die Modifikationen konnten durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie verifiziert werden (Abb IV-3). Dafür wurde Aliquote aus der Reaktionslösung entnommen und direkt vermessen.

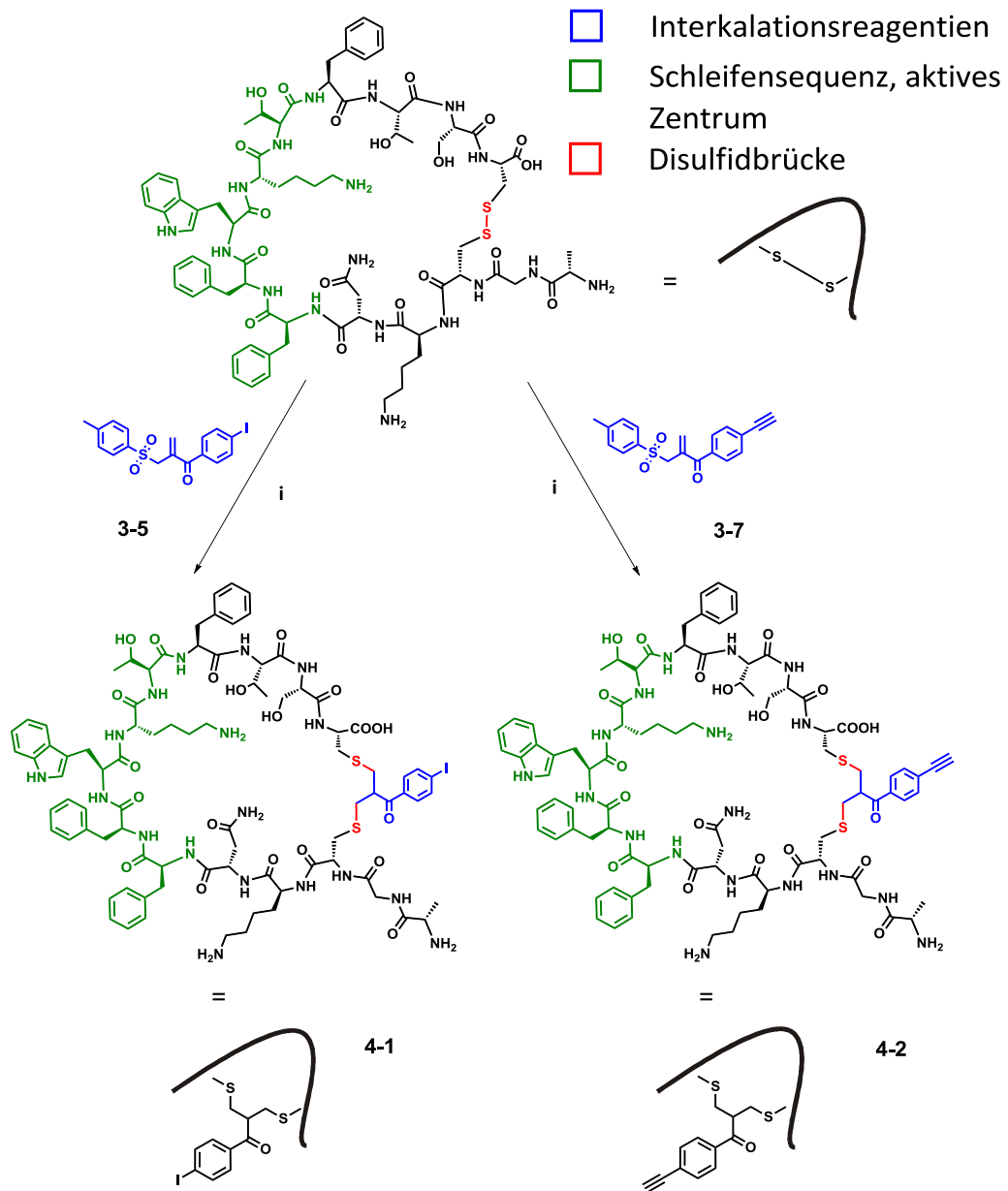


Abb IV-2 Synthese bioorthogonal funktionalisierter Somatostatine 4-1 und 4-2 über die Verwendung der entsprechende Monosulfone 3-7 und 3-5 i: Monosulfon (1,5 eq), TCEP (2 eq), PB 50 mM, pH 6,2/MeCN (3:2), RT, 18 h.

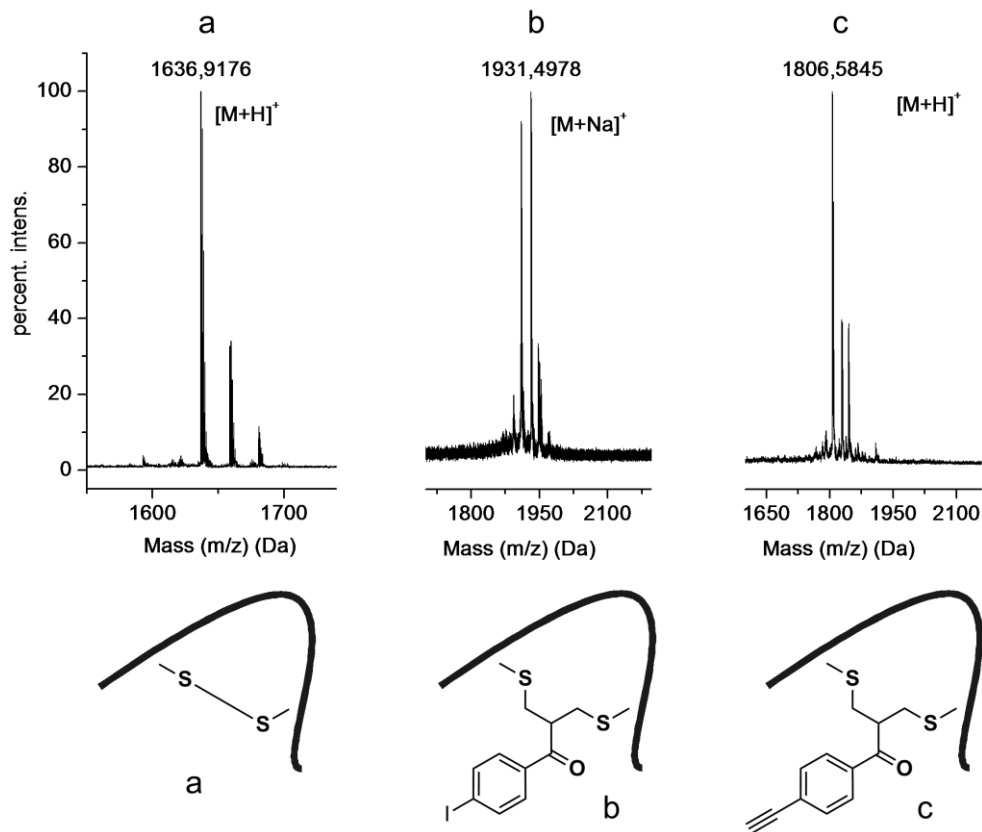


Abb IV-3 MALDI – ToF Massenspektren von Somatostatin a, Iodsomatostatin b (4-2) und Ethinylsomatostatin c (4-1). Zu sehen sind auch die Signale der Addukte mit Na^+ und K^+

Die meisten Vorschriften für die Modifikation von Proteinen und Peptiden beschreiben die Verwendung eines großen Überschusses an bioreaktivem Konjugationsreagenz. Für die Modifizierung von Somatostatin wurde die optimale Menge an Alkylierungsreagenz mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie bestimmt. Es stellte sich heraus, dass für die quantitative Interkalation in die Disulfidbrücke bereits ein geringer Überschuss von 1,5 Äquivalenten an Ethinylmonosulfon ausreichend war.

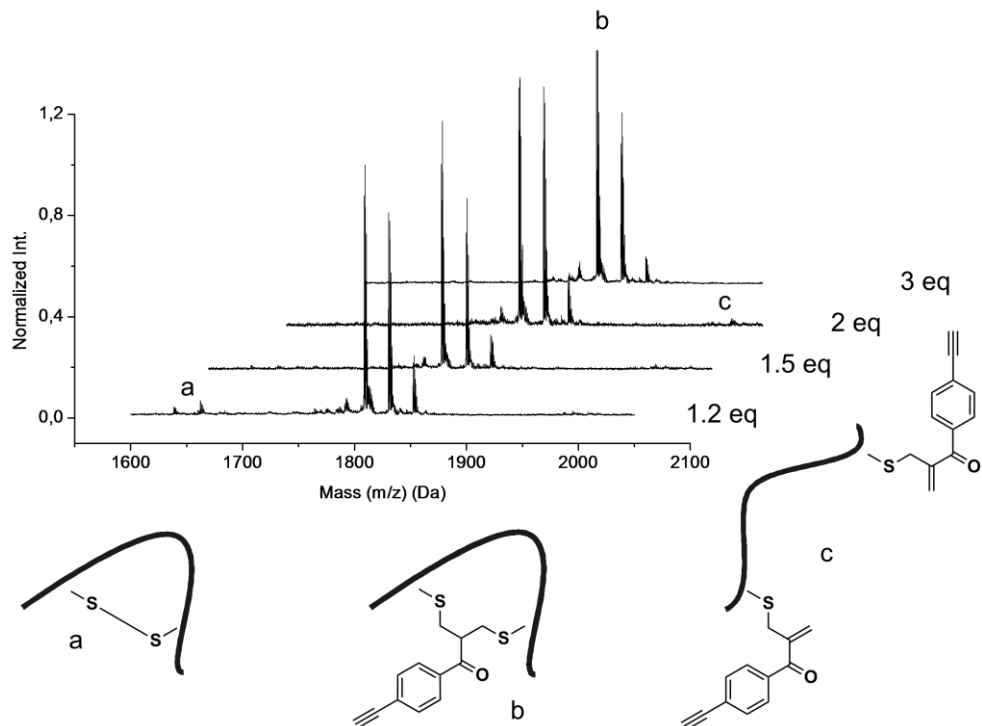


Abb IV-4 MALDI – ToF Massenspektren der Reaktionslösungen von Ethynylsomatostatin b (4-1) nach der Umsetzung mit verschiedenen Äquivalenten an Ethynylmonosulfon 3-7 I

Wurden nur 1,2 Äquivalente eingesetzt, konnten noch Spuren an unmodifiziertem Somatostatin a detektiert werden, während nach der Reaktion mit zwei bzw. drei Äquivalenten an Monosulfon einfach (b) sowie zweifach markiertes Somatostatin c detektiert werden konnte (Abb IV-4).

Offensichtlich findet bei der Umsetzung mit einem größeren Überschuss an Interkalator auch eine zweite intermolekulare Michael-Addition statt, die zu einem zweifach substituierten linearen Produkt c führt.

Lawton et al. postulierten bereits sehr früh einen Mechanismus für die Interkalation der Mono- bzw. Bissulfonderivate in native Disulfidbrücken, welcher auf einem konsekutiven Eliminierungs-Additionsprozess nach reduktiver Freisetzung der Thiole basierte (Abb IV-5)^[6a].

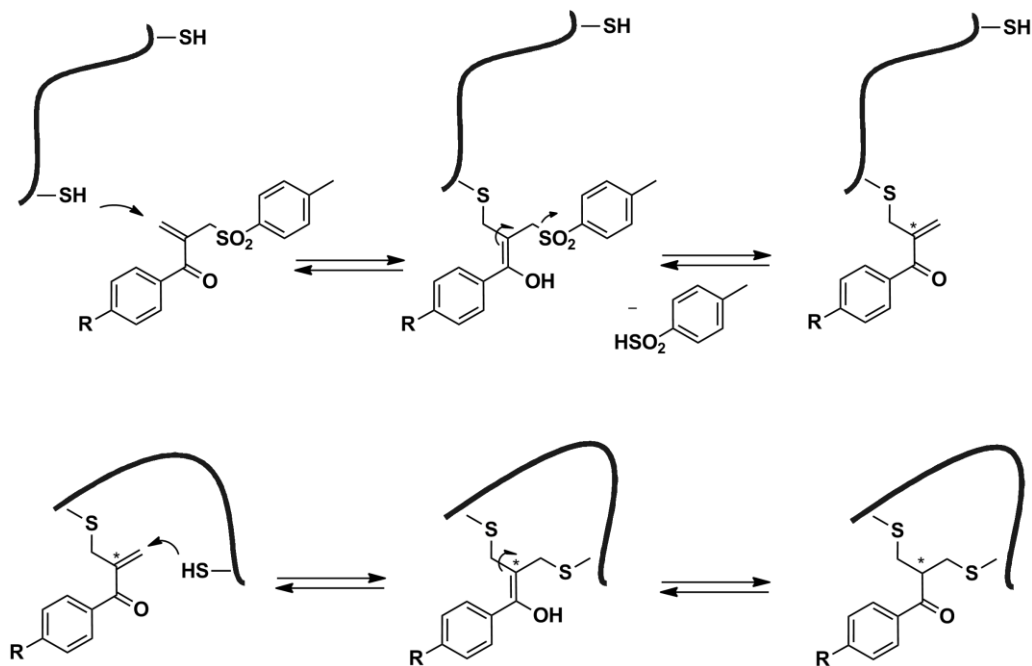


Abb IV-5 Mechanismus für die Interkalation des Monosulfons in die Disulfidbrück nach deren reduktiver Spaltung^[6a]

Nach der Eliminierung des ersten p-Toluensulfonsäurerestes addiert das erste Thiol an das in-situ entstehende konjugierte System, woraufhin der zweite Eliminierungsprozess stattfindet, auf den die Addition des zweiten Thiols folgt. Dieser Mechanismus erscheint zwar plausibel, wurde jedoch nie durch entsprechende Studien bewiesen.

Die entscheidende Frage ist nun, ob die zweite Addition tatsächlich stattfindet und eine Rückverbrückung zum zyklischen Peptid erreicht wird oder ob vielmehr ein Gleichgewicht zwischen einer offenen linearen Form 4-4 und einem geschlossenen zyklischen Form 4-3 vorliegt (Abb IV-6). Diese Frage lässt sich massenspektrometrisch nicht beantworten, da beide Formen dasselbe Molekulargewicht besitzen.

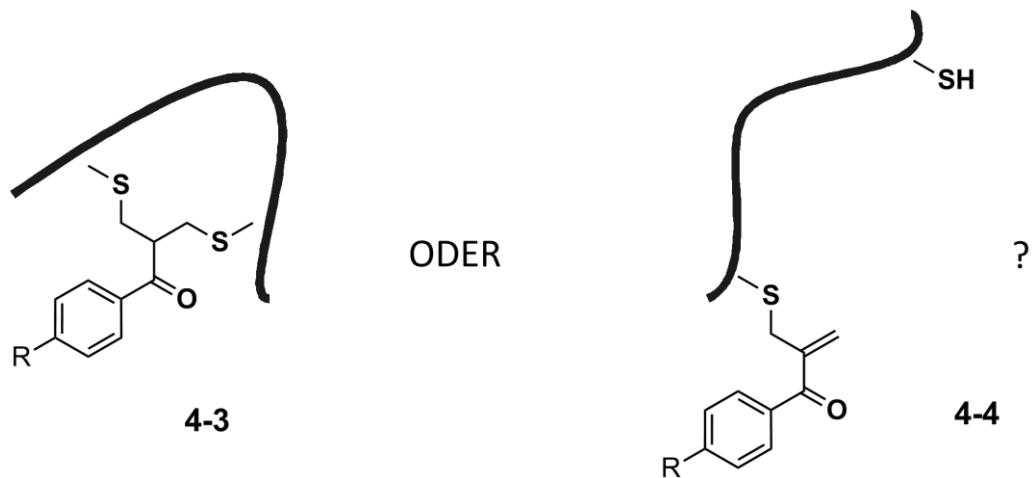


Abb IV-6 Zwei mögliche Strukturvorschläge für das Monoaddukt nach der Reaktion von Somatostatin mit dem entsprechenden Monosulfon

Die strukturelle Integrität der Disulfidbrücke ist essentiell für die Erhaltung der biologischen Aktivität. Daher ist die Verifizierung der Rückbildung dieses strukturstabilisierenden Elementes von entscheidender Bedeutung.

Die Synthese von Iod und Ethinylsomatostatin, welche erst in analytischem Maßstab verwirklicht wurde, konnte auch erfolgreich präparativ durchgeführt werden. Zur Aufreinigung wurden die organischen Lösungsmittelanteile destillativ entfernt und die Reaktionslösung anschließend dialysiert und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde an Äkta bzw. HPLC säulenchromatographisch aufgereinigt.

Eine Analyse des Elutionsverhaltens der Produkte auf einer analytischen C-18 HPLC-Säule konnte einen ersten Anhaltspunkt für die strukturelle Analyse von Iod- und Ethinylsomatostatin liefern. Es wurden Elugramme von nativem Somatostatin a, reduziertem linearem Somatostatin b sowie Iodsomatostatin c (4-2) aufgenommen (Abb IV-7). Interessanterweise unterscheiden sich die Retentionszeiten von Iodsomatostatin und nativem Somatostatin deutlich von der des reduzierten linearen

Somatostatin, während die Retentionszeiten von Iodsomatostatin und nativem Somatostatin nahezu identisch sind.

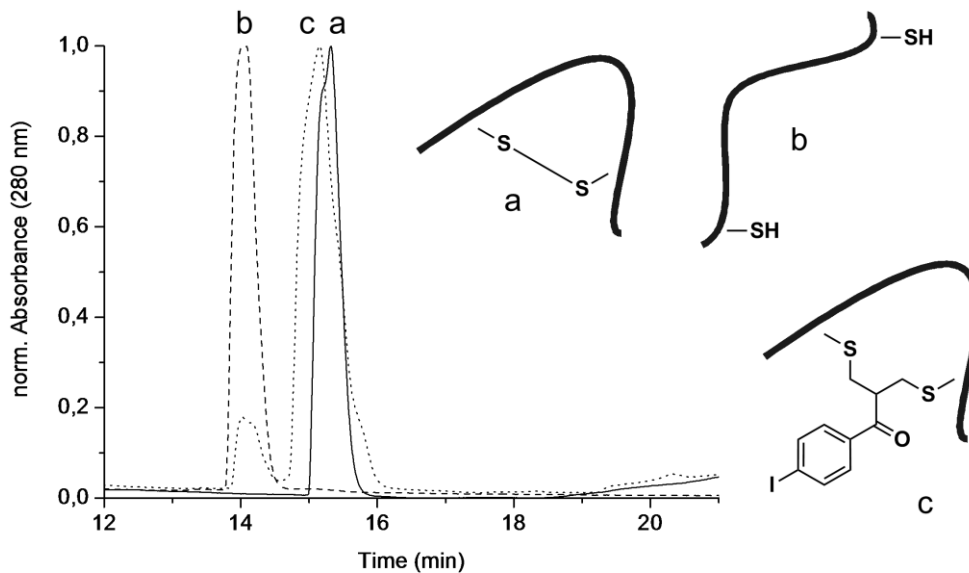


Abb IV-7 HPLC Elugramme von nativem Somatostatin a, reduziertem Somatostatin b und Iodsomatostatin c (4-2)

Diese Beobachtungen sind bereits ein erstes Indiz für die Vermutung, dass die Rückverbrückung zum cyclischen Somatostatin vollständig stattfindet.

Um jedoch den absoluten Strukturbeweis zu erbringen, reicht diese qualitative Beurteilung nicht aus. Die Kernspinnresonanz nimmt unter den Methoden zur Strukturaufklärung von Biomolekülen eine einzigartige Rolle ein, da auf diese Weise Aussagen über die dreidimensionale Struktur mit atomarer Auflösung in Lösung gewonnen werden können. Mittels NMR Spektroskopie konnte die strukturelle Integrität von Iodsomatostatin hinreichend nachgewiesen werden, indem zuerst die genaue Zuordnung der Signale der einzelnen Aminosäuren des nativen Somatostatins

durch Aufnahme ein- und zweidimensionaler Spektren erfolgte und diese Ergebnisse anschließend mit den 1D- und 2D-Spektren von Iod-somatostatin verglichen wurden.

Das ^1H -NMR-Spektrum von Somatostatin ist sehr komplex und eine genaue Zuordnung der Signale ist aufgrund der vielfachen Überlappungen nicht möglich. Um diese komplizierten Kopplungsmuster räumlich zu entzerren, wurden daher homonukleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, TOCSY und NOESY-Spektren aufgenommen. Während bei Messungen vom COSY- und TOCSY-Typ Kerne über ihre skalare Kopplung miteinander korreliert werden, ergeben sich bei NOESY-Typ Spektren Resonanzen (NOEs), falls der räumliche Abstand zweier Kerne nicht mehr als fünf Å beträgt. Die Kombination der Informationen, die aus diesen Spektren gewonnen werden, ermöglicht die Zuordnung der einzelnen Resonanzsignale zu den entsprechenden Atomen der Peptidkette.

Jede Aminosäure besitzt eine besondere Anzahl von vicinal oder geminal miteinander verbundenen Protonen. In homonuklearen 2D TOCSY oder COSY-Spektren werden diese durch ein charakteristisches Muster von Diagonal- und Kreuzresonanzen, dem sogenannten Spinnsystem sichtbar. Über die Analyse des NOESY-Spektrums können die einzelnen Spinnsysteme in Bezug zueinander gesetzt werden und ihre Position in der Peptidkette bestimmt werden. Dieses Verfahren wird auch als TOCSY/NOESY-basierte Zuordnung oder *chaintracing* bezeichnet.

Das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum lässt sich in Bereiche einteilen, in denen die auftretenden Signalmuster typisch für die einzelnen Aminosäuren sind (Abb IV-8). Während in Bereich a die Kreuzpeaks der H^β - H^δ - Protonen der aliphatischen Lysinketten erscheinen, sind in Bereich b die Kreuzresonanzen der H^δ - und H^ϵ - Protonen der Lys sichtbar. Die Signale in Bereich c entstehen durch skalare Kopplung der $\text{H}^{\beta 1}$ - und $\text{H}^{\beta 2}$ - Protonen der Aminosäuren Phe, Trp, Cys und Asn. Dieser Bereich liegt aufgrund der geringen Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Signale der $\text{H}^{\beta 1}$ - und $\text{H}^{\beta 2}$ - Protonen in großer Nähe zur Diagonalen. Im Bereich d treten die Resonanzsignale der H^α - und H^β - Protonen der Aminosäuren Ala, Thr und Lys auf, in Bereich e die der H^α - und H^β - Protonen der Aminosäuren Phe, Trp, Cys und Asn und in Bereich f die Kreuzpeaks der H^α - und H^β - Protonen der Aminosäuren Thr und Ser.

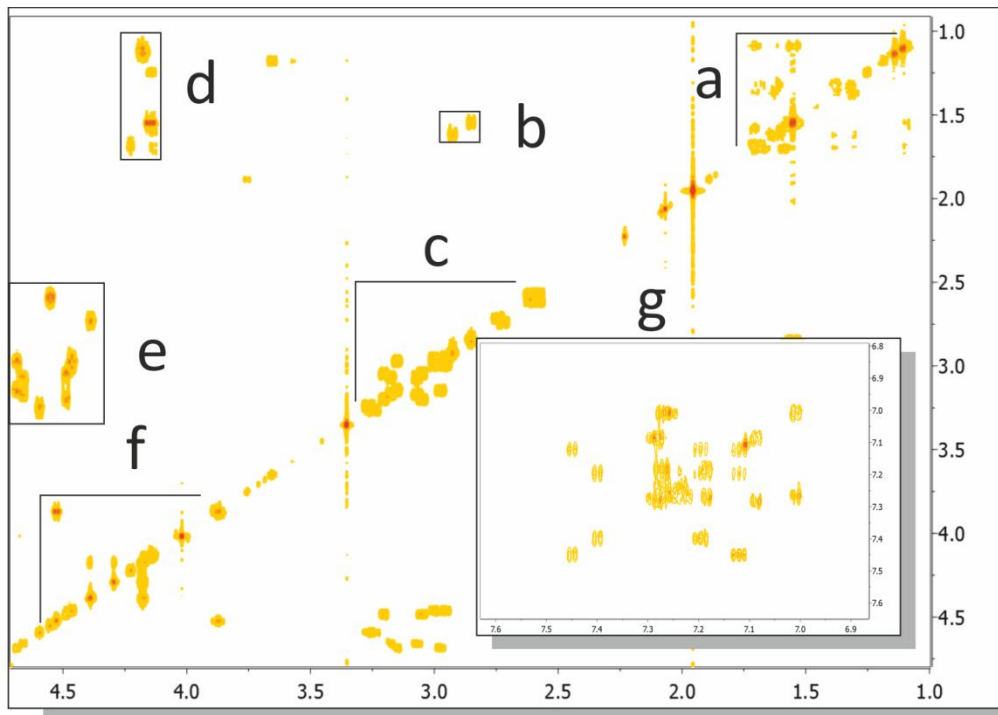
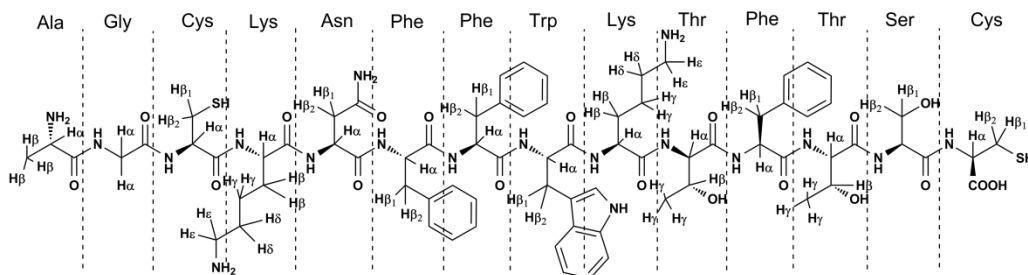
Abb IV-8 H,H-COSY Spektrum von nativem Somatostatin in D₂O (700 MHz)

Abb IV-9 Darstellung der Peptidkette von Somatostatin

Die Zuordnung der aromatischen Protonen zu den Spinsystemen der aromatischen Aminosäuren ist schwierig, da sich die Resonanzsignale der Kerne auch innerhalb der COSY Spektren der drei Phe und des Trp stark überlagern (Bereich g).

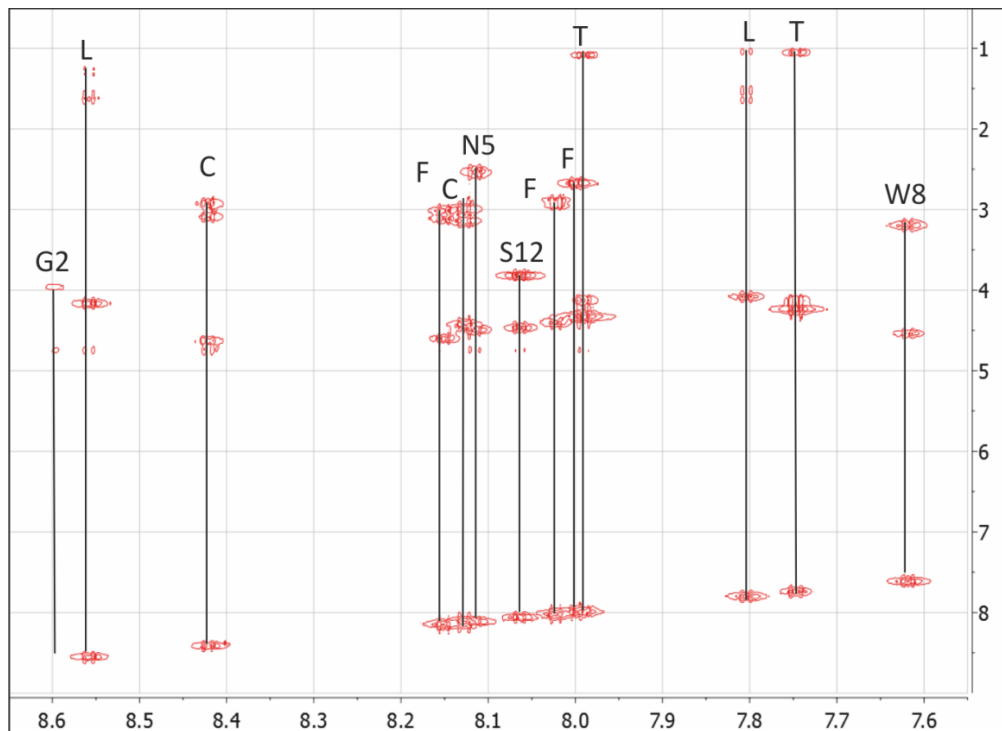


Abb IV-10 H,H-NOESY Spektrum von nativem Somatostatin in D₂O/H₂O (90:1) (700 MHz)

Durch die Vermessung von Somatostatin in D₂O wurden die Amidprotonen ausgetauscht. Wird jedoch die Messung in H₂O/D₂O (90:10) bei Unterdrückung des Wassersignals durchgeführt, lassen sich in der sogenannten Fingerprintregion anhand der Kreuzkupplungssignale der Amidprotonen und der intraresidualen Protonen die einzelnen Spinssysteme gut identifizieren (Abb IV-10).

Da jedoch in der Sequenz von Somatostatin die Aminosäuren Phe, Cys, Thr sowie Lys mehrfach vorhanden sind, können die Systeme nicht eindeutig den Positionen in der Peptidsequenz zugeordnet werden.

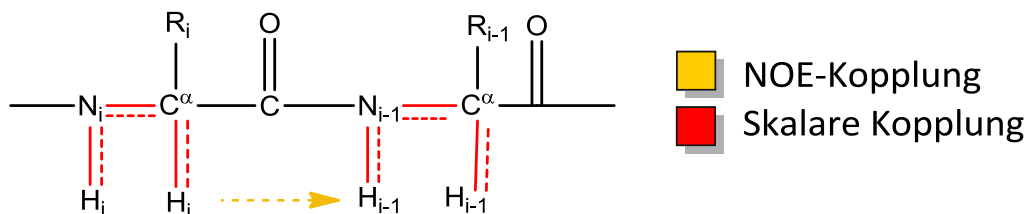


Abb IV-11 Vergleich von räumlicher Kupplung ($\text{NH}_i \rightarrow \text{C}^\alpha\text{H}_{i-1}$) und skalarer Kopplung ($\text{C}^\alpha\text{H}_i \rightarrow \text{NH}_i$)

Die sequenzielle Zuordnung der einzelnen Spinsysteme kann jedoch über ein NOESY-Spektrum erfolgen, indem die Kopplung räumlich benachbarter Protonen aufgrund des NOE-Effekts in Betracht gezogen wird. Die alternierende Kombination der Resonanzsignale durch skalare Kopplung ($\text{C}^\alpha\text{H}_i \rightarrow \text{NH}_i$) mit den Kreuzkopplungssignalen durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung ($\text{NH}_i \rightarrow \text{C}^\alpha\text{H}_{i-1}$) liefert eine kontinuierliche Verbindung des Peptid-Rückgrates (NH , C^αH).

Durch Überlagerung von TOCSY und NOESY-Spektrum kann somit eine Art Zuordnungspfad erhalten werden, welcher der Sequenz der Resonanzen des Peptidrückgrats entspricht. Die so ermittelte Folge der Spinsysteme kann mit der Aminosäuresequenz abgeglichen werden. Somit kann jedes System eindeutig einer Aminosäure zugeordnet werden.

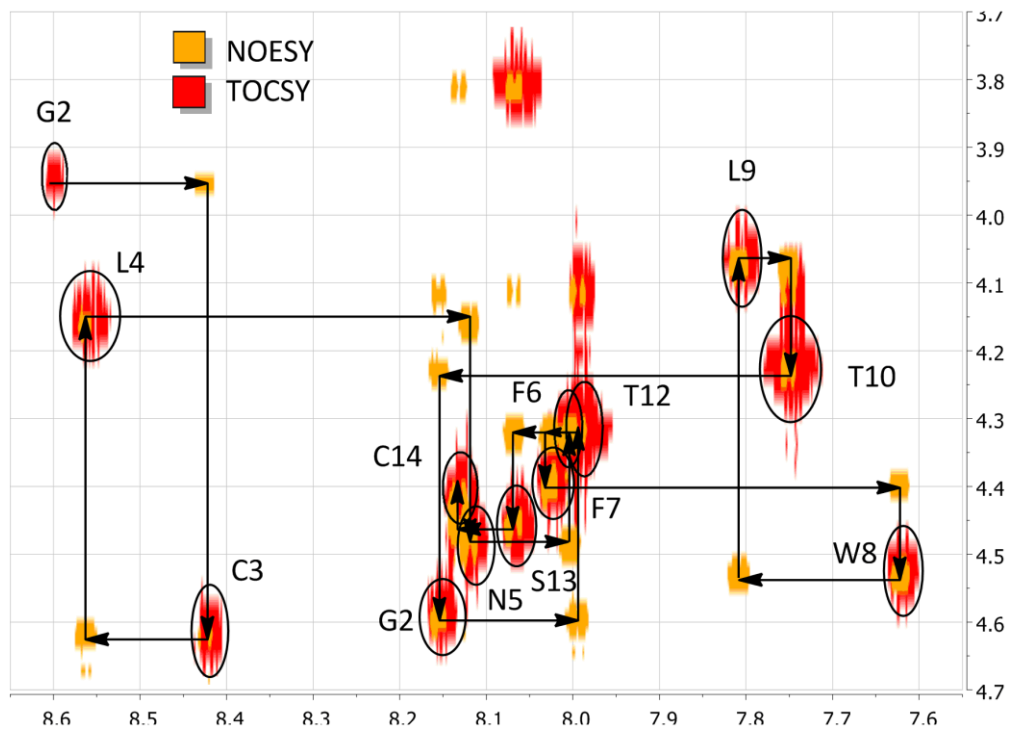


Abb IV-12 Durch Kombination aus TOCSY und NOESY erhaltener Zuordnungspfad nach der *chaintracing* Methode

Die Ergebnisse dieser Zuordnung sind in Tab IV-1 aufgelistet. Die beiden modifizierten Somatostatine Iod- und Ethinylsomatostatin 4-2 und 4-1 wurden bei Unterdrückung des HDO-Signals in D_2O vermessen. Verglichen mit nativem zyklischen Somatostatin sind die Spektren der modifizierten Derivate sehr ähnlich, bei näherer Betrachtung fallen jedoch mehrere Unterschiede in Auge. Auffällig ist die auftretende Signalverdopplung identischer Signalmuster wie zum Beispiel im Fall der Methylgruppe von Ala, für die zwei sich überlappende Dupletts detektiert werden. Dieses Phänomen lässt sich besonders gut im Bereich von 7,46 – 7,75 ppm beobachten und analysieren, da in diesem Bereich nur die Ringprotonen H-1 und H-2 des Linkersystems zueinander in Resonanz treten (Abb IV-13 unten).

Ala1	NH: -	H ^α : 4,09	H ^β : 1,50				
Gly2	NH:8,60	H ^α : 3,97					
Cys3	NH:8,42	H ^α : 4,63	H ^{β1} : 3,09	H ^{β2} : 2,92			
Lys4	NH:8,56	H ^α : 4,16	H ^{β1} : 1,64	H ^{β2} : 1,58	H ^γ : 1,25	H ^δ : 1,31	H ^ε : 2,89
Asn5	NH: 8,12	H ^α : 4,49	H ^β : 2,54	NH ₂ : 6,81			
Phe6	NH: 8,00	H ^α : 4,33	H ^β : 2,67	H ^{2,6} : 7,17	H ^{3,5} : 7,26	H ⁴ : 7,28	
Phe7	NH: 8,03	H ^α : 4,40	H ^β : 2,90	H ^{2,6} : 7,08	H ^{3,5} : 7,25	H ⁴ : 7,28	
Trp8	NH: 7,62	H ^α : 4,54	H ^{β1} : 3,23	H ^{β2} : 3,20	H ² :7,10	H ⁴ : 7,45	H ⁵ : 7,11
		H ⁶ : 7,18	H ⁷ : 7,39	NH ^{ar} : 10,13			
Lys9	NH: 7,80	H ^α : 4,08	H ^{β1} : 1,64	H ^{β2} : 1,55	H ^γ : 1,04	H ^δ : 1,50	H ^ε : 2,81
Thr10	NH: 7,75	H ^α : 4,24	H ^β : 4,14	H ^γ : 1,05			
Phe11	NH: 8,16	H ^α : 4,60	H ^{β1} : 3,11	H ^{β2} : 3,02	H ^{2,6} : 7,17	H ^{3,5} : 7,25	H ⁴ : 7,28
Thr12	NH: 7,99	H ^α : 4,33	H ^β : 4,13	H ^γ : 1,09			
Ser13	NH: 8,07	H ^α : 4,47	H ^β : 3,82				
Cys14	NH: 8,13	H ^α : 4,44	H ^{β1} : 3,14	H ^{β2} : 3,02			

Tab IV-1 Vollständige Zuordnung der Signale aller Protonen von Somatostatin in D₂O/H₂O (10:90) zu den entsprechenden Aminosäuren

Statt jedoch dem zu erwartenden Signalmuster von zwei Dupletts, dem typischen Muster für ein AB-Ringsystem, tauchen vier Dupletts auf. Die Integration dieser Signale liefert ein Intensitätenverhältnis von 1:1:1:1.

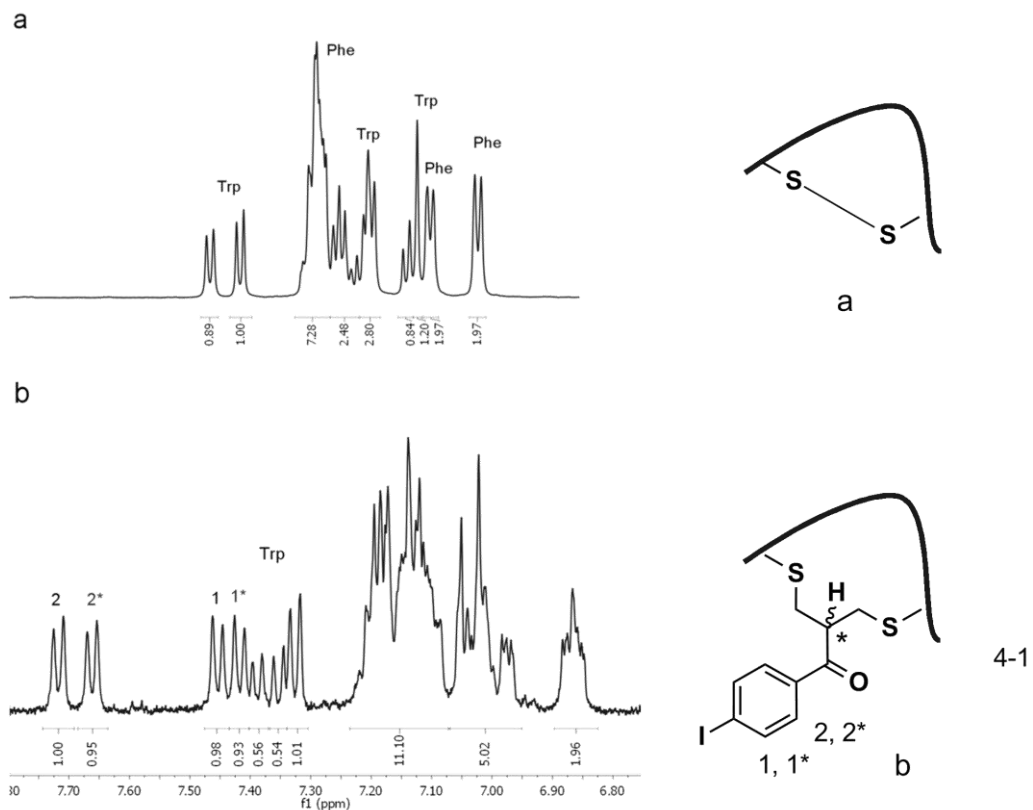


Abb IV-13 Vergleich der Aromatenregion der $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Somatostatin a und Iodomatostatin b (4-1) in D_2O (700 MHz)

Die relative Intensität dieser vier Signale wurde ins Verhältnis zu der relativen Intensität der Signale aller aromatischen Protonen gesetzt, dabei wurde ein Verhältnis von 1:6 erhalten. Die Gesamtanzahl an aromatischen Protonen von Phe, Trp und des neu generierten interkalierten Systems beträgt insgesamt 24 Protonen, dies stimmt mit dem Wert des zuvor berechneten Verhältnisses überein. Die zu beobachtende Signalverdopplung legt jedoch nahe, dass zwei nicht identische Spezies in Lösung vorliegen, die sich sehr ähnlich sein müssen und darüber hinaus im Verhältnis 1:1 vorliegen. Um diese Beobachtung zu verstehen, hilft es, wenn man sich die Struktur der modifizierten Somatostatinderivate vergegenwärtigt. Durch den Einbau der Linkersysteme in die Disulfidbrücke entsteht ein neues chirales Zentrum in α -Position zum Carbonylkohlenstoff. Aufgrund der Tatsache, dass sich durch die Keto-Enol-

Tautomerie die relative Position des α -H-Atoms permanent verändert und dass Somatostatin selbst enantiomerenrein vorliegt, hat die Interkalation die Bildung von Diastereomeren zur Folge, welche im Verhältnis 1:1 vorliegen und sich in nur einem einzigen chiralen Zentrum unterscheiden.

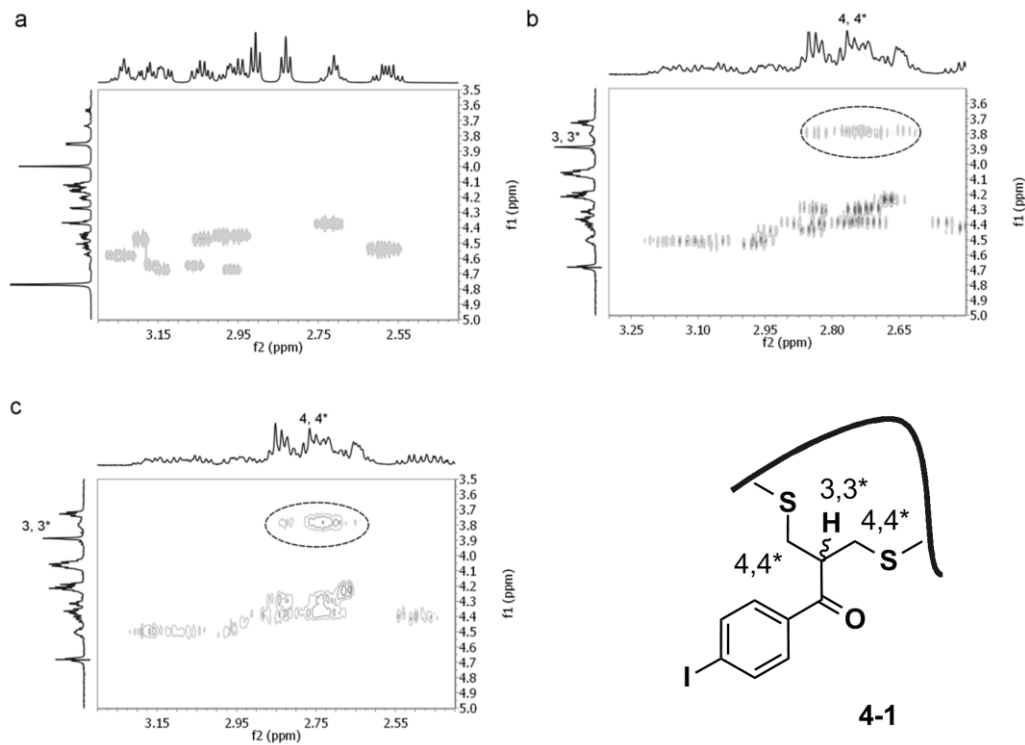


Abb IV-14 2D-Spektren, a: ^1H , ^1H -COSY von Somatostatin; b: ^1H , ^1H -COSY von lodsomatostatin 4-1; c: ^1H , ^1H -NOESY von lodsomatostatin

Diese zwei Diastereomere verhalten sich nicht magnetisch äquivalent und liefern daher zwei Sets an Signalmustern, die sehr ähnlich, jedoch nicht identisch sind. Diese Beobachtungen sind bereits ausreichend, um die Bildung des zyklischen Addukts und damit den Einbau der Linkerderivate in die Disulfidbrücke eindeutig nachzuweisen. Auch können die Signale der Protonen an der Doppelbindung und das Signal für die an den Aromaten von p-Toluensulfinsäure gebundene Methylgruppe nicht mehr

detektiert werden. Zusätzliche Informationen werden durch die 2D-Spektren geliefert (Abb IV-14): Die Kreuzkupplungssignale des Protons am chiralen Zentrum H-3,3* mit den Methylenprotonen H-4,4* bei 3,78 ppm und 2,73 ppm beweisen eindeutig die Konnektivität zwischen H-3,3* und H-4,4*. Im NOESY-Spektrum sind darüber hinaus auch die Resonanzsignale der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der aromatischen Protonen H-2,2* mit H-3,3* und H-4,4* bei 7,48, 3,78 und 2,73 ppm zu sehen (Abb IV-14c). Somit konnte mittels NMR Spektroskopie die Rückverbrückung bei der Interkalation und damit die strukturelle Integrität der Somatostatinderivate erstmals eindeutig nachgewiesen werden.

Im nächsten Abschnitt soll nun die Synthese einer fluoreszierenden Sonde vorgestellt werden, welche nach Interkalation in Somatostatin den Beweis ermöglichen soll, dass das Neuropeptidhormon auch nach der Modifikation noch funktional aktiv ist. Es wird gezeigt werden, dass das fluoreszierende Peptid von den entsprechenden Zellrezeptoren erkannt und in die rezeptorpositiven Zellen aufgenommen werden kann.

IV-3 Fluoreszierende Sonden für die Interkalation

Zur Untersuchung der Interaktionen einer bioaktiven Komponente mit ihrer natürlichen Umgebung *in vitro* oder *in vivo* werden Sonden benötigt, die Struktur und native Funktion des Biomoleküls in geringstmöglichem Maß beeinträchtigen. Möglichkeiten werden durch die Verfolgung über Komponenten offeriert, die aufgrund ihrer intrinsischen chemischen oder atomaren Eigenschaften die Detektion durch spektrophotometrische Methoden, Messung der Radioaktivität oder der Bioaffinität gegenüber anderen Proteinen erlauben. Die Sonde benötigt eine bioreaktive Gruppe, die die selektive, kovalente Verknüpfung mit den funktionellen Gruppen des zu untersuchenden Biomoleküls gewährleisten kann und eine funktionelle Einheit, die die Visualisierung des Metabolismus der Biokomponente ermöglicht.

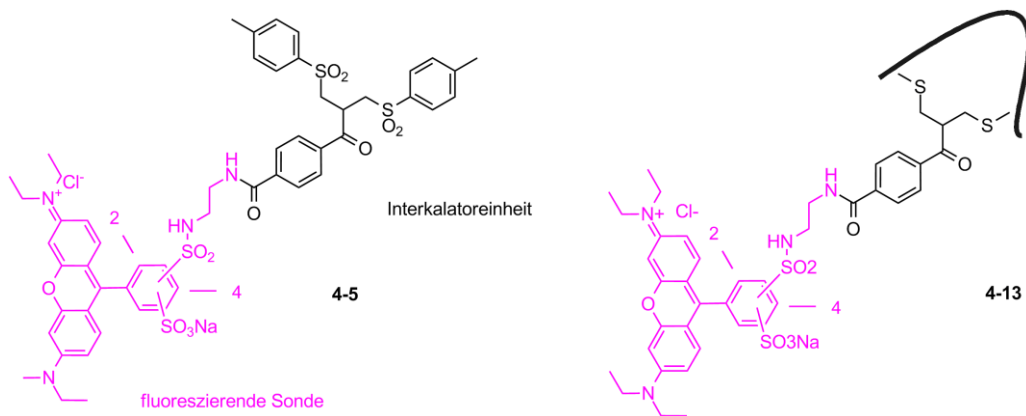


Abb IV-15 Strukturen von LRB-Bissulfon 4-5 und LRB-Somatostatin 4-13

Spektrale Sonden können farbgebend oder fluoreszierend sein. Erstere werden hauptsächlich für die nicht kovalente Anfärbung makroskopischer Strukturelemente innerhalb von Geweben und Zellen eingesetzt. Sollen allerdings Antikörper, Enzyme

oder Proteine detektiert werden, welche in biologischen Systemen in äußerst geringer Konzentration vorliegen, ist die Sensitivität von Farbstoffen sichtbarer Wellenlängen zu gering.

Fluoreszenzfarbstoffe hingegen sind enorm sensitiv und bieten die Möglichkeit, Biomoleküle kovalent mit hoch empfindlichen Sonden für eine Vielzahl von in vitro Anwendungen auszustatten.

Um eine solche Sonde für die Interkalation in Disulfidbrücken zu erhalten, wurde ein Linkermolekül entworfen, welches seinerseits über die Bissulfoneinheit als thiolreaktive Gruppe verfügt und einen Fluoreszenzfarbstoff für die Detektion mittels spektroskopischer Methoden exponiert. Ein solcher Farbstoff sollte sich nicht nur durch eine hohe Quantenausbeute auszeichnen, sondern auch eine große Stokesverschiebung haben, photostabil stabil sein und eine gewisse Löslichkeit in Wasser besitzen. Man muss sich auch versichern, dass die in der Lösung vorliegenden Inhaltsstoffe keinen löschenden Einfluss auf die fluoreszierenden Eigenschaften der Sonde haben.

Als Interkalatoreinheit wurde der Aktivester von p-Carboxybissulfon 4-10 nach einer literaturbekannten Vorschrift synthetisiert und konnte in den entsprechenden Ausbeuten erhalten werden^[14]. Die Syntheseroute ist in Abb IV-16 dargestellt.

Der Aktivester von Carboxybissulfon 4-10 ist eine sehr vielseitige Substanz, da sie über die Amidkopplung Zugang zu vielen komplexen Linkerarchitekturen bietet. Wahlweise ist es auch bei anderen mehrstufigen Zielmolekülen sinnvoller, die Kopplung am Aktivester des Carboxybissulfides durchzuführen und die Oxidation zum entsprechenden Bissulfon in der letzten Stufe zu verwirklichen. Voraussetzung hierfür ist die Inertheit des Linkerderivates gegenüber milden oxidativen Bedingungen.

Bei Lissamine Rhodamin B handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Sulforhodamin B Derivat; ein Sulfonamid mit einer primären Aminogruppe, welches mit Aktivestern zu Amiden umgesetzt werden kann. Die Reaktion mit dem Aktivester 4-10 erfolgt in DMF/DCM (1:1) unter Lichtausschluss für 48 Stunden (Abb IV-17). Der Überschuss an Aktivester kann säulenchromatographisch an Aluminiumoxid mit

EtOAc abgetrennt werden, während das Produkt anschließend mit EtOAc/EtOH eluiert werden kann, wobei der Farbstoff auf der Säule verbleibt.

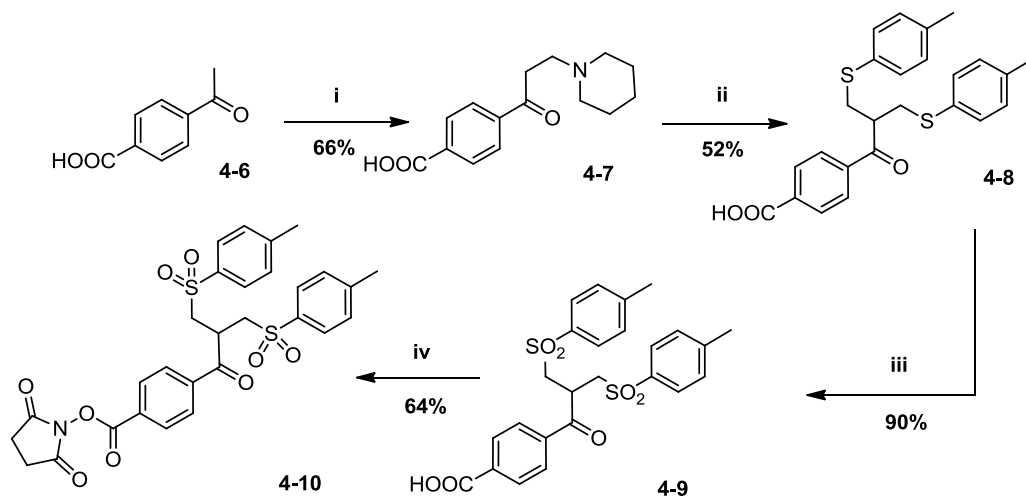


Abb IV-16 Syntheseroute Aktivester des Carboxybisulfon. i: Piperidinhydrochlorid, Paraformaldehyd, HCl, EtOH, 105°C, 14 h; ii: p-Thiokresol (2 eq), Piperidin, 37%ige Formaldehydlösung, EtOH/MeOH (2:1), 105°C, 4 h; iii: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), MeOH/H₂O (1:1), RT, 24 h; iv: NHS, DIPC, DCM, RT, 4 h.

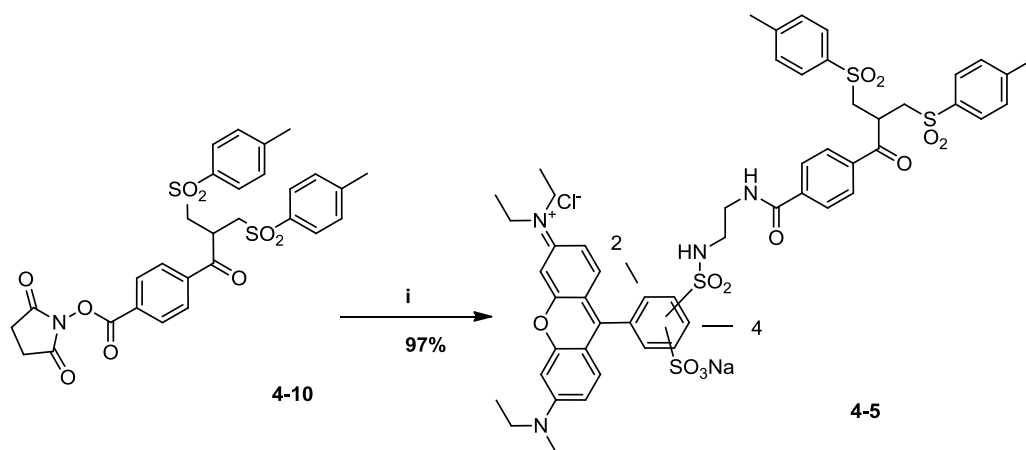


Abb IV-17 Kupplung des Aktivesters mit Rhodamin B i: Rhodamin B (0,6 eq), DMF/DCM (1:1), RT, 48 h, Lichtausschluss.

Wie bei allen p-Amidbissulfonen ist das Bissulfon leicht mit Monosulfon verunreinigt, dies spielt jedoch für die weitere Umsetzung keine entscheidende Rolle.

Lissamine Rhodamin B hat ein Absorptionsmaximum bei 556 nm mit einem sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten von $93000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (in Methanol). Der Farbstoff emittiert bei 576 nm Licht roter Wellenlänge und ist wesentlich photostabiler als z.B. Derivate des Fluoresceins.

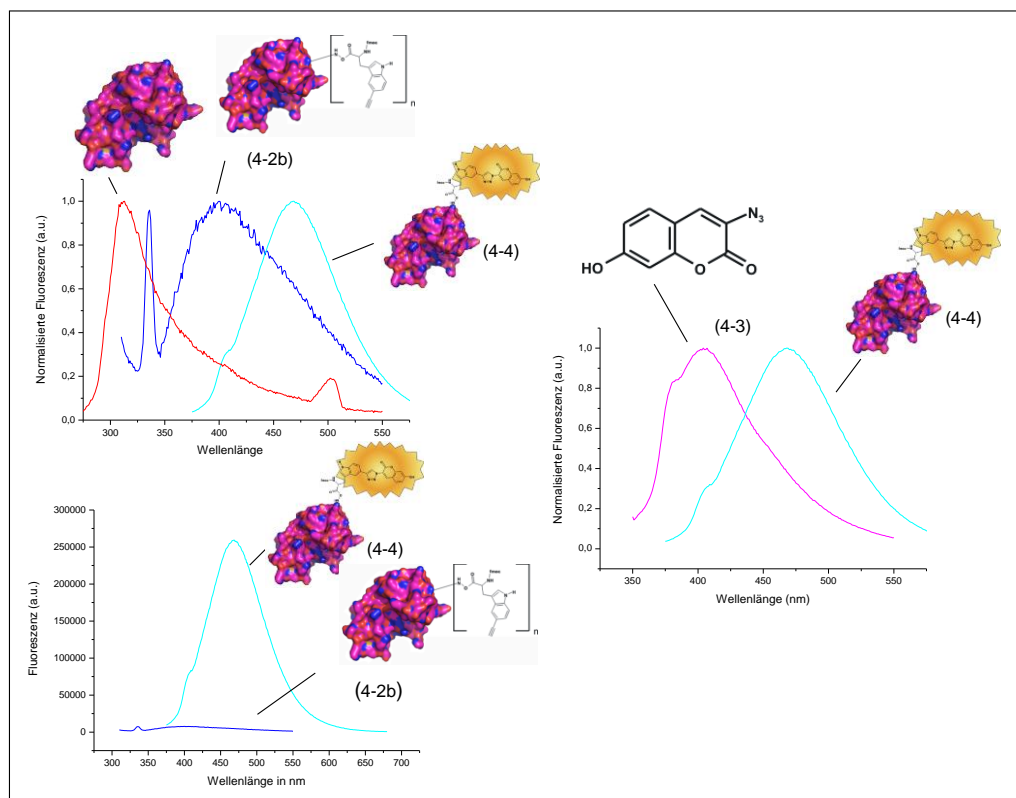


Abb IV-18 Oben: Normalisiertes Fluoreszenzspektrum von nativer RNase (rot), F5ETrp-RNase (4-2b, blau) und Cumarin-RNase (4-4); unten: Vergleich der Fluoreszenzintensität von (4-2b) und (4-4), rechts: Normalisiertes Fluoreszenzspektrum des Cumarins (4-3) und (4-4)

3-Azido-7-hydroxycumarin hat unter den Cumarinderivaten in den letzten Jahren einen gewissen Berühmtheitsgrad erlangt und wurde für zahlreiche Anwendungen genutzt. Es handelt sich bei dieser Substanz um ein Profluorophor, d.h. die Bildung des 1,3-Cycloadditionsproduktes hat einen erheblichen Anstieg der Fluoreszenzintensität zur Folge. Die Umsetzung mit 3-Azido-7-hydroxycumarin wird oft genutzt, um die Zugänglichkeit der in Biomoleküle durch posttranslationale Modifikation oder durch Einbau von nicht-natürlichen Aminosäuren mittels genetic engineering eingeführten Acetylengruppen überprüfen zu können.^[15] In vorangegangenen Arbeiten konnte beispielsweise die Reaktivität der Dreifachbindung einer mit Fmoc-Ethynyltryptophan posttranslational modifizierten RNase durch die Klick-Reaktion mit 3-Azido-7-hydroxycumarin eindrucksvoll verifiziert werden^[16].

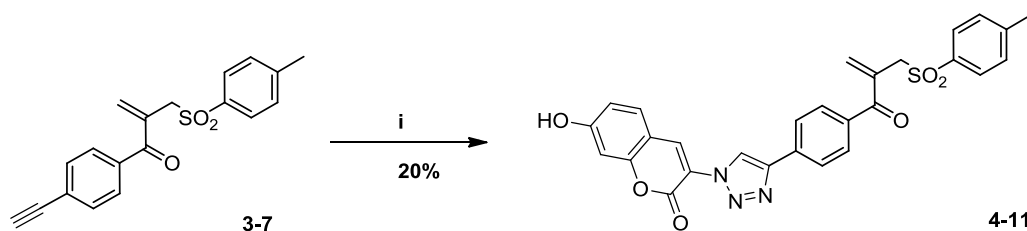


Abb IV-19 Cycloaddition zum Cumarinmonosulfon 4-11. i: 3-Azido-7-hydroxycumarin (1,1 eq), 2,6 Lutidin, $\text{Cu}(\text{MeCN})_4^*\text{PF}_6$, MeCN, 70°C, 4 h.

Auch in diesem Fall wurden eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums verglichen mit Ethynylmonosulfon 3-7 und dem freien Azidocumarin sowie eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet. Beide Farbstofflinkerkonjugate wurden zur hochselektiven Monofunktionalisierung von Somatostatin eingesetzt. In den folgenden Abschnitten wird gezeigt werden, dass diese Biohybridsonden erfolgreich verifizieren können, dass durch die Modifizierung

der internen Disulfidbrücke die biologische Integrität des Peptidhormons nicht beeinträchtigt wird. Dazu wird die Aufnahme in rezeptorpositive Zellen untersucht. Zuerst wird jedoch erörtert werden, inwieweit die Ethinylfunktion von Ethinylsomatostatin 4-2 in bioorthogonalen Modifikationen zugänglich ist.

IV-3a Modifizierung von Ethinylsomatostatin via Klickchemie

Iod- sowie Ethinylfunktionalitäten kommen in natürlichen Systemen nicht vor und sind daher als bioorthogonale Gruppen äußerst wertvoll für selektive Markierungen und Biokonjugationsreaktion. Die [2+3]-Cycloadditionsreaktion eines Acetylderivates mit einem Azid wurde in den letzten Jahren vielfach für medizinische, pharmazeutische und biologische Anwendungen genutzt^[17]. Diese Reaktion kann in wässrigem Medium bei Raumtemperatur durchgeführt werden, wenn sie durch Zusatz eines Cu(I)-Katalysators beschleunigt wird.

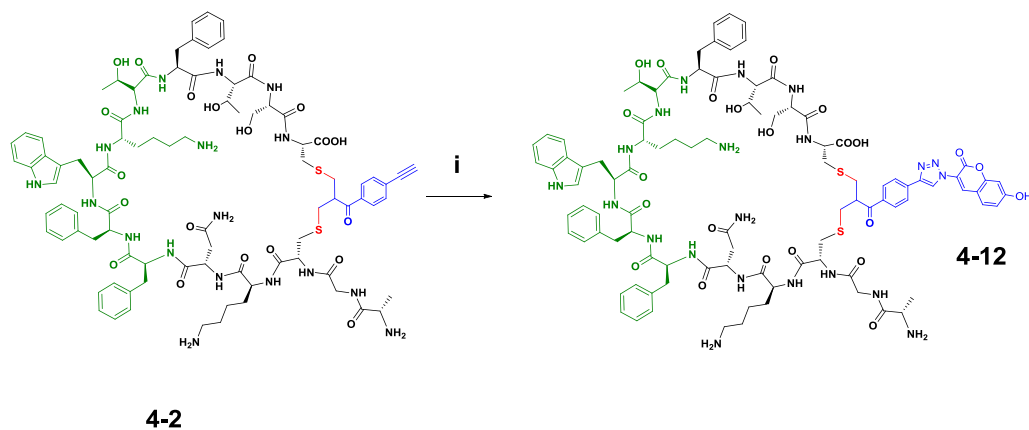


Abb IV-20 1,3-dipolare Cycloaddition von Ethinylsomatostatin 4-2 mit 3-Azido-7-hydroxycoumarin. i: 3-Azido-7-hydroxycoumarin (1,67 eq), CuSO₄, Tris(3-hydroxypropyltriazylmethyl)amin, Aminoguanidin, PB 50 mM, pH 7,8/DMSO (9:1), RT, 24 h

3-Azido-7-hydroxycumarin ist ein potentes Profluorophor, welches sich erst nach erfolgreicher Bildung des Triazolrings mittels Addition durch eine hohe Fluoreszenz auszeichnet (Abb IV-18). Daher ist die Umsetzung der eingeführten Ethinylfunktion mit diesem Cumarinderivat für die Verifizierung der Zugänglichkeit von Dreifachbindungen in biologischen Systemen oder modifizierten Biomakromolekülen ideal geeignet.

Als Katalysatorsystem in wässriger Lösung wird meist CuSO_4 /Natriumascorbat im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Jedoch hat sich gezeigt, dass dieses in der organischen Synthese oft erfolgreich verwendete System in biologischen Anwendungen erhebliche Nachteile aufweist. Bei kupferkatalysierter Reaktionsführung können reaktive Sauerstoffspezies erzeugt werden, welche die Seitenketten von Cystein, Methionin und Histidin oxidieren können^[18]. Darüber hinaus können Dehydroascorbat und andere Ascorbatnebenprodukte mit den Aminogruppen von Lysinen sowie den Guanidinresten der Arginine reagieren und somit zu einer kovalenten Modifikation von Biomolekülen führen^[19]. Vu et al. führten die Cycloaddition in biologischen Systemen in Gegenwart von Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) und Aminoguanidin durch und konnten zeigen, dass die Konjugation erfolgreich ohne unerwünschte Nebenprodukte sowie in Gegenwart geringer Cu-Konzentration verwirklicht werden konnte^[20].

Ethinylsomatostatin 4-2 wurde mit 3-Azido-7-hydroxycumarin in Gegenwart von CuSO_4 , Natriumascorbat, Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin und Aminoguanidin in PB 50 mM, pH 7,8/DMSO (9:1) für 24 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt (Abb IV-20). Das Produkt 4-12 wurde spektroskopisch, mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie sowie SDS-Gelelektrophorese charakterisiert. Cumarinsomatostatin 4-12 zeigte den erwarteten Anstieg in der Emissionsintensität im Vergleich zum nativen Somatostatin bzw. freien Cumarin bei Anregung mit $\lambda = 360$ nm mit einem Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 426$ nm (Abb IV-21).

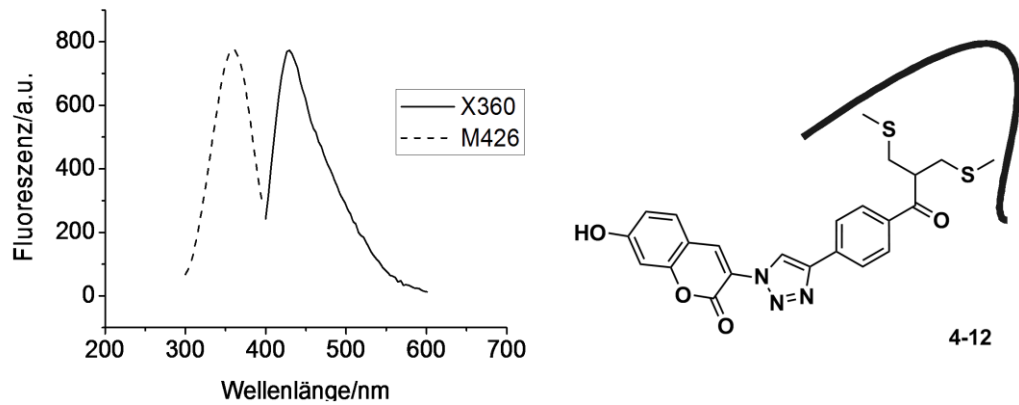


Abb IV-21 Fluoreszenzanregungs- (M426) und Emissionsspektren (X360) von Ethinylsomatostatin 4-12

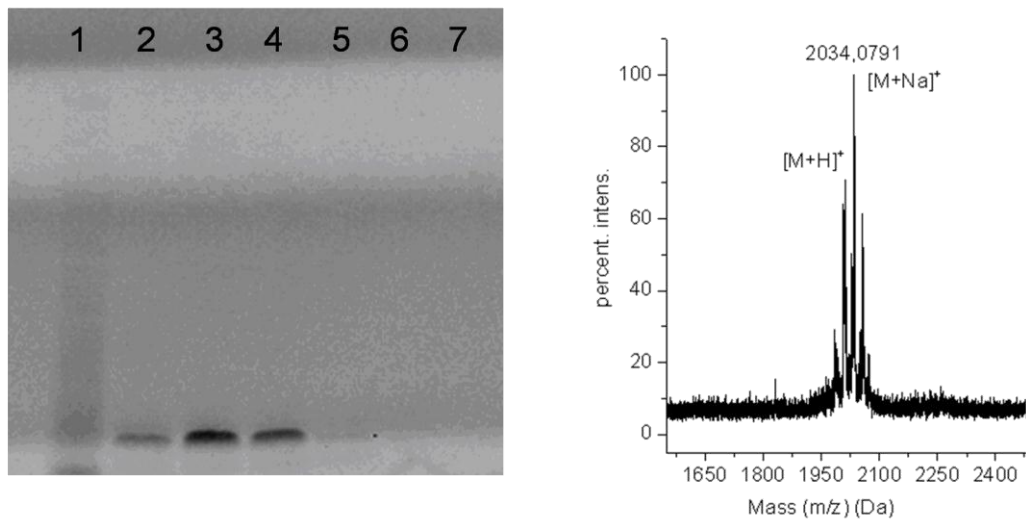


Abb IV-22 Charakterisierung von Cumarinsomatostatin 4-12. rechts: MALDI-ToF Massenspektrum; links: SDS-Gel, Bild unter UV aufgenommen, Spur 1: prestained protein ladder, Spur 2-5: Cumarinsomatostatin 4-12, Spur 6: natives Somatostatin, Spur 7: Ethinylsomatostatin

SDS-Gelelektrophorese (Aufnahme unter UV, $\lambda = 354 \text{ nm}$) sowie MALDI-ToF Massenspektrum sind in Abb IV-21 zu sehen.

Durch eingehende Betrachtung der Struktur mittels NMR konnte der Beweis erbracht werden, dass es sich auch bei den modifizierten Peptiden um cyclische Derivate handelt. Wie schon in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt wurde, ist die Erhaltung der Schleifensequenz Phe⁷-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰ und ihrer Konformation essentiell für die physiologische Aktivität des Hormons. Da diese durch die Disulfidbrücke stabilisiert wird, stellt sich nun die Frage, ob sie auch nach der Modifizierung des Peptidhormons in einer Konfiguration vorliegt, die von den Rezeptoren der SSTR-Families erkannt werden kann.

IV-4 Zellexperimente

Die Untersuchungen der Konjugate wurden in Zusammenarbeit durchgeführt und an zwei verschiedenen Zelllinien vorgenommen. Bei der Zelllinie A-549 handelt es sich um menschliche Lungenkarzinomzellen, welche keine Somatostatinrezeptoren exprimieren^[21]. Im Gegensatz dazu exprimiert die Zelllinie CAPAN-2, bei der es sich um menschliche Pankreasadenokarzinomzellen handelt, SSTR2 sowie SSTR5-Rezeptoren, welche Somatostatin erkennen und die Zellaufnahme des Peptids induzieren^[22]. Diese Zelllinie wurde von vielen Gruppen bereits erfolgreich für die Untersuchung von SSTR2-vermittelten Prozessen verwendet und ist für die Bestimmung der biologischen Aktivität nicht-natürlicher Somatostatinderivate gut geeignet^[23].

Durch die Modifizierung von Ethinylsomatostatin 4-2 mit 3-Azido-7-hydroxycumarin konnte aufgrund des Anstiegs der Fluoreszenzintensität durch die Cycloaddition eindrucksvoll gezeigt werden, dass die bioorthogonalen Peptidbausteine durch *grafting to* selektiv adressiert und modifiziert werden können, wobei die hohe Flexibilität in der Wahl der post-interkalativen Modifizierung eindeutig von Vorteil ist. Um größere Mengen an Peptid zu erhalten, ist jedoch der *grafting from* Ansatz leichter zu verwirklichen, da nur ein Aufreinigungsschritt am Peptid benötigt wird. Darüber hinaus kann der Cu-Katalysator unter organisch synthetischen Bedingungen leichter abgetrennt werden, als unter den milden Modifizierungsbedingungen für das empfindliche Hormon.

Die Vorschrift entspricht der Umsetzung von Somatostatin mit Iod- bzw. Ethinylmonosulfon 3-7 bzw. 3-5. Cumarinsomatostatin wurde nach Lyophilisation der Reaktionslösung und Aufreinigung des Peptids mittels präparativer HPLC in 47%iger Ausbeute erhalten.

Das Zellmedium wurde mit Aliquoten der Peptidlösung versetzt und 18 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

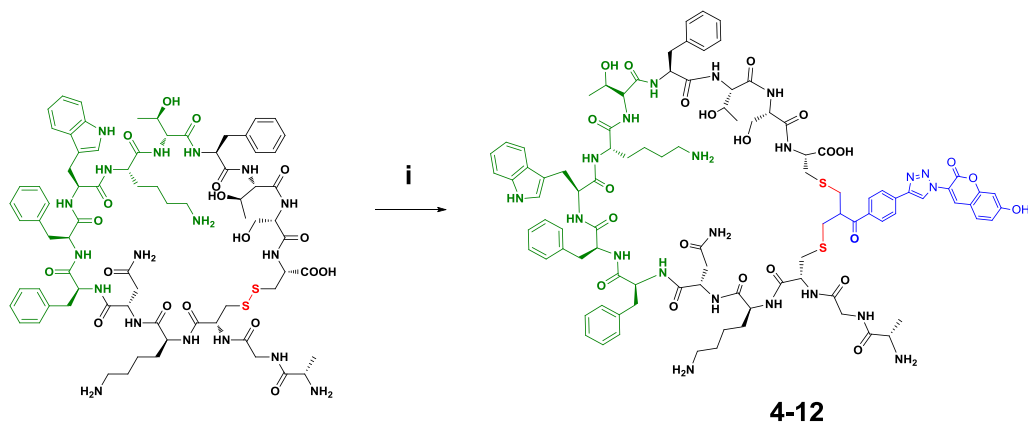


Abb IV-23 Synthese von Cumarinsomatostatin 4-12 über die *grafting to* Methode. i: Cumarinmonosulfon 4-11 (1,5 eq), TCEP (2 eq), PB 50 mM, pH 6,2/MeCN (3:2), RT, 18 h.

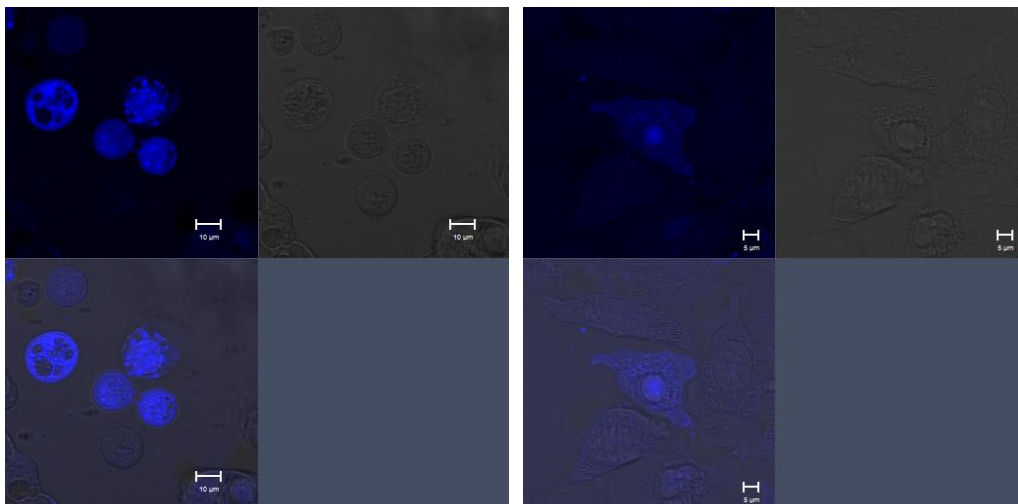


Abb IV-24 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von CAPAN-2 und A-549-Zellen nach Inkubation mit Cumarinsomatostatin 4-12 links: CAPAN-2, vesikelartige Strukturen, erhöhte Aufnahme, rechts: A-549, verminderte Aufnahme

Im Fall der rezeptornegativen A-549 Zellen lässt sich eine verminderte Aufnahme beobachten, bei den rezeptorpositiven CAPAN-2 Zellen lässt sich nicht nur eine

erhöhte Aufnahme beobachten, deutlich zeichnen sich auch vesikelartige Strukturen ab, die für eine rezeptorvermittelte Endocytose sprechen (Abb IV-24).

Problematisch bei Zellexperimenten erweist sich jedoch die unzureichende Photostabilität von Cumarinderivaten. Aus diesem Grund wurde die Aufnahme auch zusätzlich mit einem Rhodamin-B modifizierten Somatostatin untersucht, welches durch die Umsetzung mit Rhodaminbissulfon 4-5 erhalten wurde.

Dazu wurde Somatostatinacetat mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml in PB 50 mM, pH 7,8/MeCN (3:2) gelöst und nach der partiellen Reduktion der Disulfidbrücke mit zwei Äquivalenten TCEP mit dem fluoreszenten Linker 4-5 umgesetzt, in diesem Fall müssen zehn Äquivalente eingesetzt werden, damit kein natives Somatostatin mehr mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie detektiert werden kann.

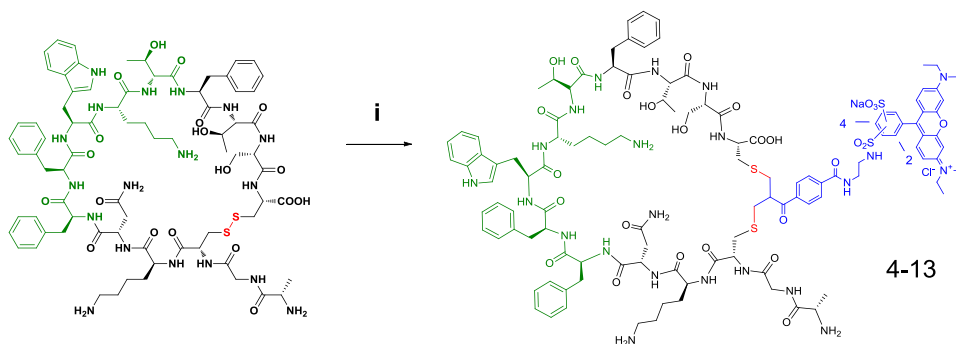


Abb IV-19 Synthese von Rhodaminsomatostatin 4-13 über die *grafting to* Methode. i: Rhodaminbissulfon 4-5 (10 eq), TCEP (2 eq), PB 50 mM, pH 7,8/MeCN (3:2), RT, 18 h.

Die Aufreinigung erfolgte nach Gefriertrocknung mittels präparativer HPLC. Das Peptid wurde in 0,1% TFA mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und in verschiedenen Mengen ins Zellmedium gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen gewaschen und die Aufnahme mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie schon in den Studien mit

Cumarinsomatostatin 5-4 beobachtet, wurde im Fall der A-549-Zellen eine verminderte Aufnahme beobachtet.

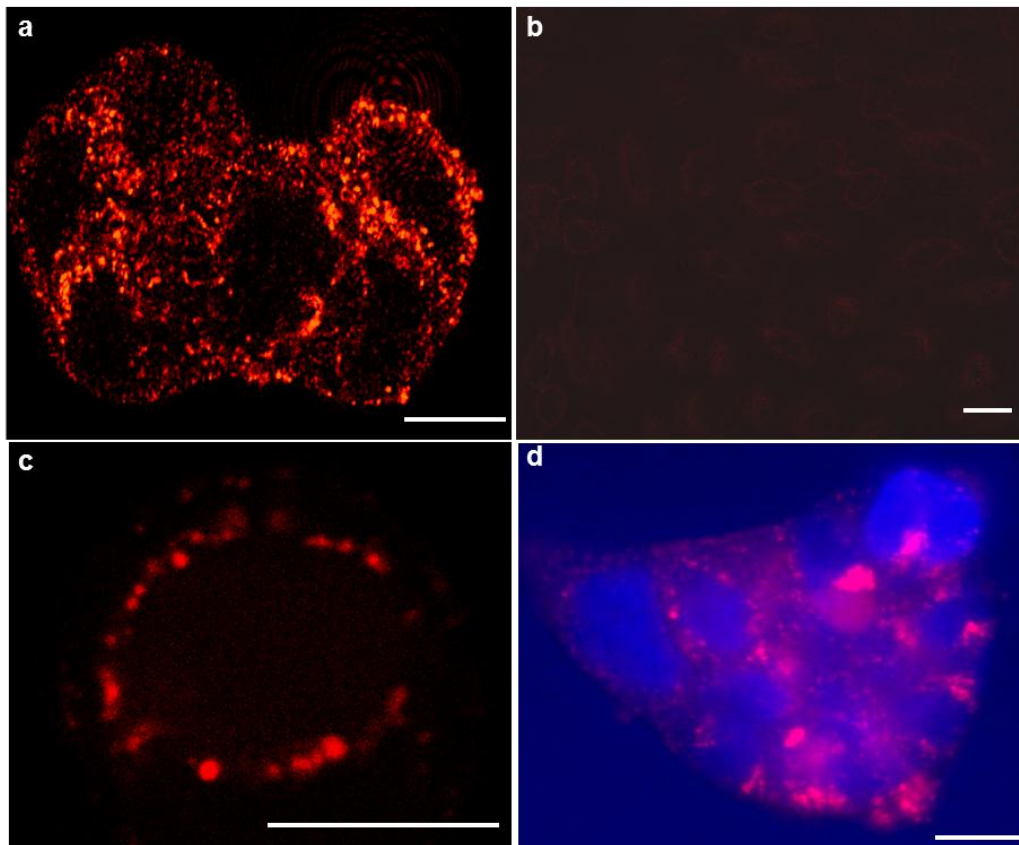


Abb IV-25 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von CAPAN-2 und A-549-Zellen nach Inkubation mit Rhodaminsomatostatin 4-13 oben links: rezeptorpositive CAPAN-2 Zellen, erhöhte Aufnahme; oben rechts: rezeptornegative A-549 Zellen, verminderte Aufnahme; unten links: CAPAN-2, Zoom, Vesikel unten rechts: CAPAN-2 Zellen nach Inkubation mit 5-6 und DAPI-staining

Die Fluoreszenz konnte hauptsächlich in der Nähe der Zellmembran lokalisiert werden, was für eine unspezifische Adsorption des Konjugats an die Membran spricht und es wurde keine Bildung von Vesikeln beobachtet.

Im Gegensatz dazu wurde bei den CAPAN-2 Zellen eine deutlich erhöhte Aufnahme beobachtet.

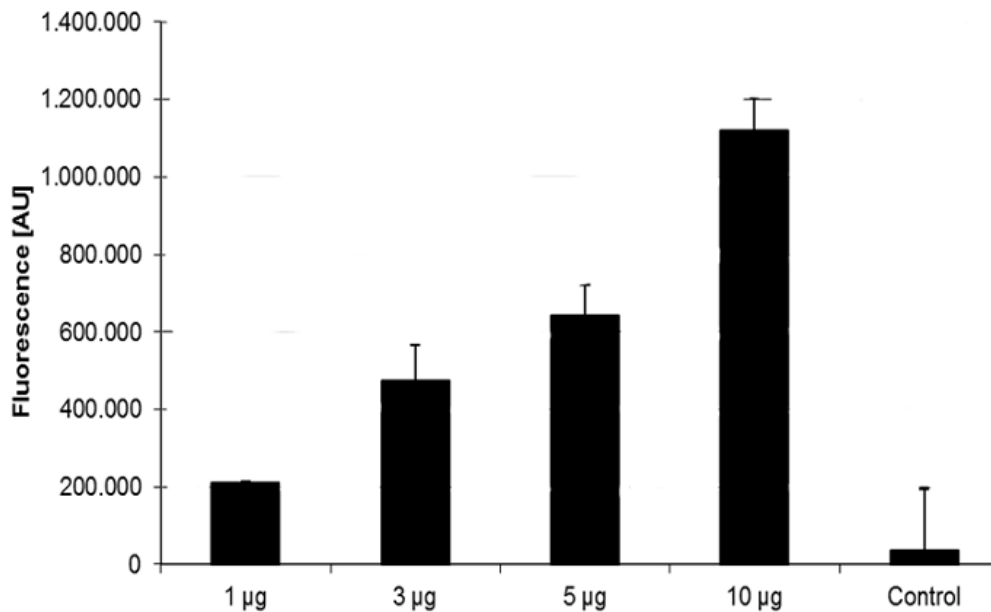


Abb IV-26 Photometrische Betrachtung der Aufnahme von Rhodaminsomatostatin 4-13 in CAPAN-2 Zellen, Kontrolle: A-459 Zellen nach Aufnahme von Rhodaminsomatostatin

Kleine Vesikel konnten bei entsprechender Vergrößerung detektiert werden. Sie sind ein Indikator für die spezifische rezeptorvermittelte Aufnahme in die Karzinomzellen. In Abb IV-26 ist die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Menge an Rhodaminsomatostatin 4-13 abgebildet, mit der die CAPAN-2 Zellen zuvor inkubiert wurden. Mit zunehmender Menge an fluoreszierendem Peptid 4-13 wurde eine erhöhte Emission und damit eine erhöhte Aufnahme detektiert (Experimenteller Teil, Mikroskopieexperimente). Die Kontrolle zeigt die Emission nach 24stündiger Inkubation mit 10 µg Rhodaminsomatostatin bei rezeptornegativen A549-Zellen, bei denen nur eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz gemessen wurde.

Die Beobachtungen im Falle des Cumarinsomatostatin 4-12 sowie des Rhodaminsomatostatin 4-13 zeigen eindeutig, dass die Konjugate trotz der Verknüpfung mit bzw. Interkalation von sterisch anspruchsvollen Fluoreszenzsonden ihre biologische Aktivität behalten und durch Rezeptoren der SSTR-Familie erkannt werden. Das Potential dieser Markierungstechnik besteht daher vor allem in der Nutzung des Somatostatins als Target-Molekül, an welches durch die Interkalation in die Disulfidbrücken selektiv und hochspezifisch Wirkstoffmoleküle angeheftet werden können.

IV-5 Exkurs: Apoptose und Krebs

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und wurde im alten Griechenland von Dichtern verwendet, um den Vorgang des Fallen eines Blattes von einem Baum, oder eines Blütenblattes von einer Blüte zu beschreiben. Sie wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet und löst im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktionen aus. Die Apoptose lässt sich in zwei Phasen unterteilen, die Initiatorphase und die Effektorphase. Am Anfang jeder Apoptose steht die Aktivierung der Initiatorprocaspasen, welche zur Familie der Caspasen gehören, Enzyme, welche entscheidend an der proteolytischen Spaltung der Zellbestandteile beteiligt sind^[24]. In der zweiten Phase, der Effektorphase wird die Caspasekaskade in Gang gesetzt. Effektorcaspasen wie die Caspasen 3, 6 und 7 sind aktiv am Abbau von Lamin und Aktin beteiligt^[24].

Es wird davon ausgegangen, dass Fehlfunktionen oder Störungen im fein regulierten Proteinnetzwerk der Signalkaskade der Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Krebs spielen^[25]. Gerade in Zellen, die aufgrund einer hohen Konzentration oder einer Überexpression von antiapoptotischen Faktoren vor der Apoptose geschützt sind, führt eine gestörte intrinsische Regulation des Zellstoffwechsels zur Bildung von besonders aggressiven Tumoren^[26]. Chemotherapeutika wirken daher oftmals direkt auf die Mitochondrien und bewirken eine Freisetzung der oben genannten proapoptotischen Faktoren. Sind die Initiatorcaspasen erst einmal aktiviert, ist die Apoptose irreversibel. Oft sind Tumorzellen auch dadurch gekennzeichnet, dass Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von wachstumsfördernden und die Apoptose hemmenden Genen steuern, hyperaktiv sind^[27].

Die vielversprechendsten Ansätze zur Apoptoseinduktion bei Tumorzellen konzentrieren sich daher entweder auf die Vertreter der BCL-2-Familie, die apoptosefördernd sind oder auf den Einsatz von proapoptotischen Rezeptoragonisten (PARAs)^[28]. Letztere haben dabei zwei entscheidende Vorteile gegenüber intrinsisch

wirkenden Substanzen: Sie umgehen den p53-Signalweg, wo Mutationen es 50 Prozent aller Tumoren ermöglichen, der Apoptose zu entgehen und sind extrem spezifisch, was bereits in vorklinischen Studien gezeigt werden konnte^[29].

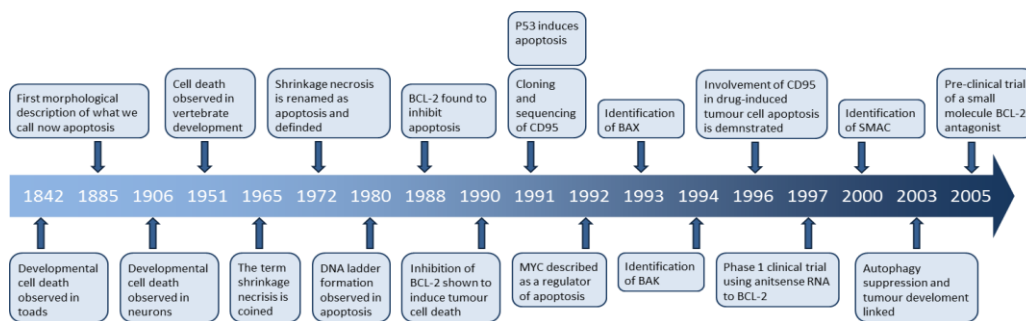


Abb IV-27 Überblick über Meilensteine der Apoptoseforschung^[25]

Die antiproliferative und apoptotische Wirkung von Somatostatin und seiner synthetischen Analoga auf viele verschiedene Tumorzelllinien in vitro wie in vivo ist erwiesen^[30], der genaue Wirkungsmechanismus konnte jedoch noch nicht geklärt werden und wird kontrovers diskutiert. Somatostatin wirkt als Ligand für eine Familie von fünf verschiedenen Rezeptoren (SSTR1 – 5) und wird G-Protein-Rezeptor vermittelt endocytotisch aufgenommen. Da in manchen Zelllinien wie Brust-, Pankreas- und kolorektalen Krebszellen eine verminderte oder sogar der Verlust der Expression des SSTR2 Gens beobachtet wurde, wird vermutet, dass ein Verlust der Sensitivität für die Apoptose mit einer verminderten Expression von SSTR2 einhergeht^[31]. Konträr dazu steht jedoch, dass in den meisten Tumorzellen die Rezeptoren der SST Familie überrepräsentiert sind. Somatostatin und seine synthetischen Analoga könnten daher attraktive als Targetsustanzen für die Chemotherapie Anwendung finden.

Bekannte chemisch modifizierte Somatostatinanaloga bestehen u.a. aminoterminal modifizierten Peptiden, die in der Lage sind, verschiedene radioaktive Isotope zu

komplexieren^[32]. So wird in der Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie das ¹¹¹Indium-markierte Analogon zur Detektion von gastro-entero-pankreatischen neuro-endokrinen Tumoren (GEP-NET) eingesetzt, da diese bestimmte Somatostatin-Rezeptortypen überexprimieren^[32]. Denkbar ist darüber hinaus auch die Anwendung für therapeutische Zwecke nach der Beladung mit einem β -Strahler, was derzeit in der Palliativtherapie betrieben wird. Mit Doxorubicin modifiziertes Octreotid wurde auf sein Potential getestet, als cytotoxisches Konjugat antiproliferativ auf verschiedene Krebszelllinien zu wirken^[33].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Potential von Somatostatin und seiner synthetischen Analoga darin liegt, dass es nicht nur als Target genutzt werden kann, sondern als Wirkstoff aktiv die Apoptose, d.h. den programmierten Zelltod beeinflussen kann. Von Octreotid, einem synthetischen Somatostatinanalog, ist bekannt, dass es aufgrund seiner höheren Halbwertszeit und Stabilität, stärker apoptotisch wirkt, als Somatostatin, welches zwar auch apoptotisch wirkt, aber jedoch wie bereits erwähnt eine geringe Halbwertszeit besitzt^[34].

In denen von Dr. Klaus Eisele durchgeführten Experimenten wurde zuerst die Viabilität der Zellen der beiden Zelllinien A-549 und CAPAN-2 nach Zugabe von nativem Somatostatin und Iodsomatostatin mittels eines Lumineszenzassays untersucht. Es zeigte sich, dass die Viabilität nur bei den rezeptorpositiven Zellen (CAPAN-2) eingeschränkt wurde, allerdings unterschied sich der Einfluss des modifizierten Somatostatins nicht wesentlich von dem des nativen Peptids und zeigte auch keine Dosisabhängigkeit (Abb IV-28).

Darüber hinaus wurde die Fähigkeit von Iodsomatostatin zur Apoptoseinduktion mit der von Somatostatin in einem weiteren Experiment untersucht. In einem Assay wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 stellvertretend für die Aktivität der Effektorcaspasen und damit als Maß für die Induktion der Apoptose bestimmt. Nach Subtraktion der Kontrollwerte konnte beobachtet werden, dass Iodsomatostatin mit zunehmender Menge vor allem in den rezeptor-positiven Zellen (CAPAN-2) zum Auslösen von Apoptose führt und dies noch in höherem Maße als Somatostatin. Es

wird vermutet, dass dies mit der höheren Stabilität des Peptids, welche durch die Modifikation bedingt ist, zusammenhängt.

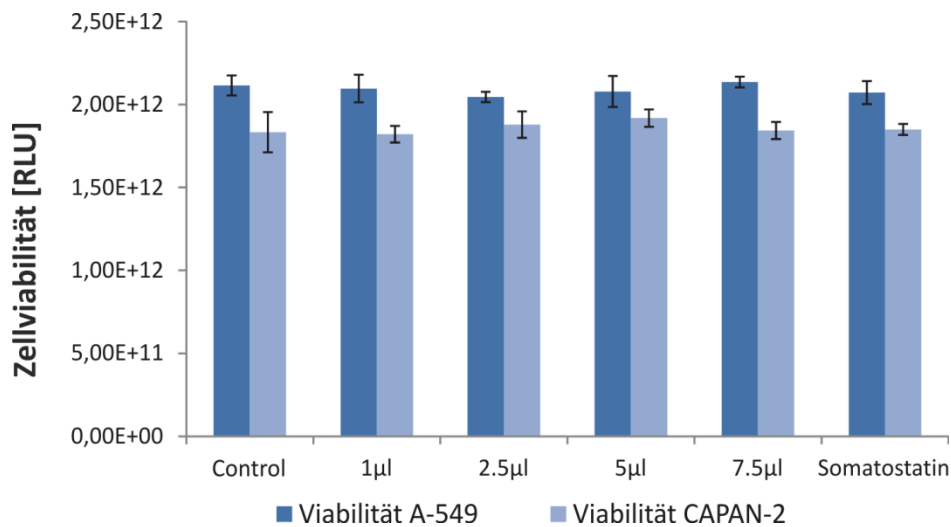


Abb IV-28 Vergleich der Viabilität von A-549 und CAPAN-2 nach Inkubation mit Iodsomatostatin 4-1 und Somatostatin

Der Viabilitätsassay zeigt keine klare Verringerung, da der programmierte Zelltod ein langsamer Vorgang ist und noch viel Rest-ATP zur Verfügung steht, welches durch den Lumineszenzassay detektiert wird.

Da von nativem Somatostatin noch keine Kristallstruktur vorliegt, wurde eine 3D-Visualisierung des Peptids sowie der Derivate durch Xi Chen unter Verwendung der Software MOE der Chemical Computing Group vorgenommen^[35]. Dazu wurden die Aminosäuren der Reihenfolge der Primärstruktur entsprechend miteinander verknüpft und anschließend eine Molecular Mechanics Berechnung (MMF94 force field) ohne Berücksichtigung von Lösungsmittelmolekülen durchgeführt. Diese Methode liefert zwar keine präzise Berechnung exakter Geometrien, die Betrachtung der Ergebnisse kann jedoch einen Eindruck über die prägnantesten strukturellen

Veränderungen geben. Die 3D-Struktur von Iodsomatostatin 4-1 im Vergleich mit Somatostatin ist in Abb IV-30 abgebildet.

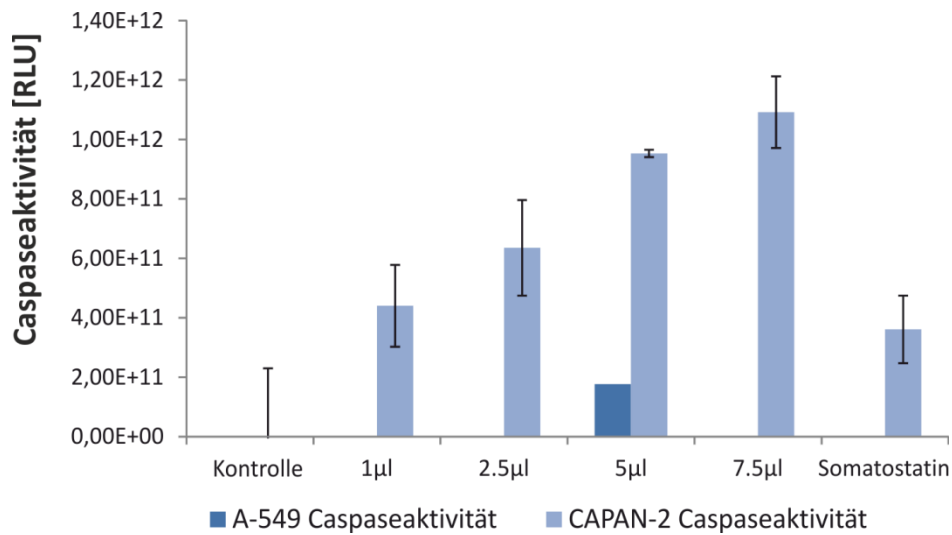


Abb IV-29 Vergleich der Caspaseaktivität von A-549 und CAPAN-2 nach Inkubation mit Iodsomatostatin 4-1 und Somatostatin

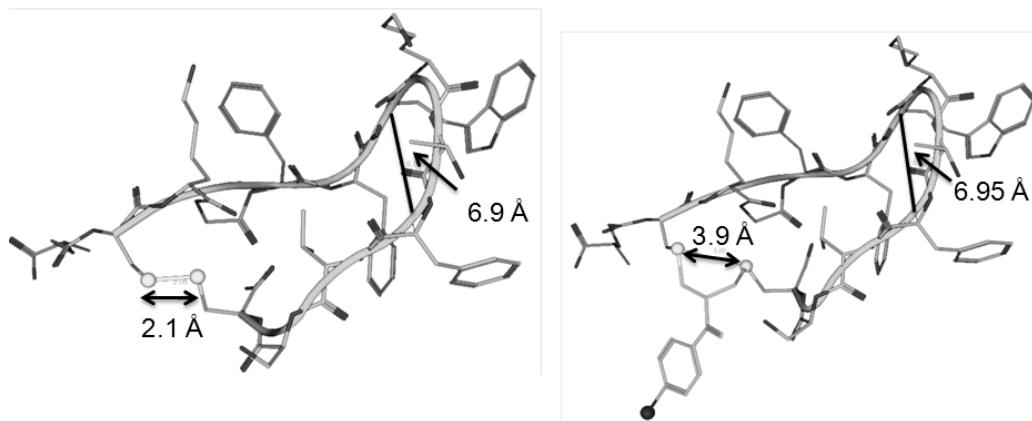


Abb IV-30 3D-Visualisierung der Peptidstrukturen, links: Somatostatin; rechts: Iodsomatostatin 4-1^[36]

Nach der Interkalation von Iodmonosulfon 3-5 in Somatostatin nimmt die Distanz zwischen den beiden Schwefelatom von 2,1 Å auf 3,9 Å zu, was zu einer Aufweitung der Schleifenstruktur vor allem in räumlicher Nähe der Disulfidbrücke führt. Da sich die Erkennungssequenz Phe₇-Trp₈-Lys₉-Thr₁₀, welche für die pharmakologische Aktivität verantwortlich ist, jedoch in der β -Schleife am gegenüberliegenden Ende des Peptids befindet, bleibt die Orientierung und strukturelle Anordnung des Tetraaminosäurenmotifs nahezu unbeeinflusst.

Darüber hinaus wurden die EC₅₀ - Werte von Iodsomatostatin und Ethinylsomatostatin bestimmt, d.h. die mittlere effektive Konzentration an Peptid, bei der ein halbmaximaler Effekt erzeugt wird. Durch einen Calcium-Flux-Assay, welcher von der Firma Millipore Corporations durchgeführt wurde, wurde die Fähigkeit der Derivate als Agonist auf SSTR2-Rezeptoren zu wirken untersucht.

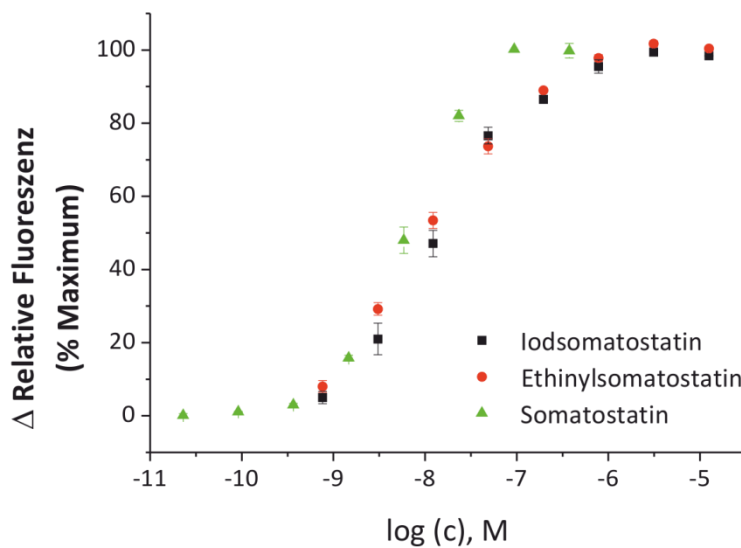


Abb IV-31 Dose-Response-Kurven von Somatostatin (grün), Ethinylsomatostatin 4-2 (rot) und Iodsomatostatin (schwarz)

Die mittlere effektive Konzentration von nativem Somatostatin beträgt 7 nM. Für die Derivate Iodsomatostatin 4-1 und Ethinylsomatostatin 4-2 wurden mittlere effektive Konzentrationen von 12 bzw. 13 nM bestimmt.

Damit liegen die Werte der Somatostatinanaloge im gleichen Bereich wie der des nativen Peptids. Sie weisen somit die gleiche Potenz auf, in SSTR2 vermittelten Prozessen in die entsprechenden Zellen aufgenommen zu werden.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass die nach selektiver Modifikation durch Adressierung der Disulfidbrücken erhaltenen Somatostatintherapeutika ein enormes Potential aufweisen: Sie können nicht nur als Targeteinheit für die hochspezifische Lieferung von Wirkstoffen in pankreatische Tumorzellen dienen, sondern haben darüber hinaus noch eigenes Potential als Wirkstoffe selbst eine apoptoseinduzierende Aktivität in diesen Zellen zu entfalten. Zukünftige Studien könnten die Untersuchung der Aktivität der Somatostatintherapeutika in Abhängigkeit von der eingeführten Funktion thematisieren. Interessant wäre darüberhinaus die Betrachtung von Serumstabilität und Halbwertszeit in *in vivo* Experimenten.

Literatur

- [1] V. H. L. Lee, U. B. Kompella, in *Peptide and Protein Drug Delivery* (Ed.: V. H. L. Lee), Marcel Dekker, New York, **1991**, pp. 391-484.
- [2] aJ. M. Harris, R. B. Chess, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 214-221; bP. Caliceti, F. M. Veronese, *Advanced drug delivery reviews* **2003**, *55*, 1261-1277.
- [3] aH. B. F. Dixon, *Journal of Protein Chemistry* **1984**, *3*, 99-108; bO. Kinstler, G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd, C. Gegg, *Advanced drug delivery reviews* **2002**, *54*, 477-485; cH. Lee, I. H. Jang, S. H. Ryu, T. G. Park, *Pharm Res* **2003**, *20*, 818-825.
- [4] aL. Polgar, M. L. Bender, *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 3153-3154; bP. I. Clark, G. Lowe, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1977**, 923-924; cG. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5052-+.
- [5] aT. H. Yoo, D. A. Tirrell, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 5340-5343; bA. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 603-609.
- [6] aS. Mitra, R. G. Lawton, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3097-3110; bS. Balan, J.-W. Choi, A. Godwin, I. Teo, C. M. Laborde, S. Heidelberger, M. Zloh, S. Shaunak, S. Brocchini, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 61-76.
- [7] S. W. J. Lamberts, E. P. Krenning, J. C. Reubi, *Endocrine Reviews* **1991**, *12*, 450-482.
- [8] M. N. Pollak, A. V. Schally, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1998**, *217*, 143-152.
- [9] A. V. Schally, A. Nagy, *Eur J Endocrinol* **1999**, *141*, 1-14.
- [10] A. V. Schally, A. M. Comaru-Schally, in *Cancer Medicine*, 4 ed. (Eds.: R. Holland, E. Frei III, R. R. Bast Jr, D. E. Kufe, D. L. Morton, R. R. Weichselbaum), Williams and Wilkins, Baltimore, **1997**, pp. 1067-1086.
- [11] W. W. de Herder, L. J. Hofland, A. J. van der Lely, S. W. J. Lamberts, *Endocrine-Related Cancer* **2003**, *10*, 451-458.

- [12] M. B. John, W. S. Horne, H. van M. Jan, W. Beatrice, R. Jean Claude, M. R. Ghadiri, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 4725-4729.
- [13] aW. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, J. Pless, *Life Sciences* **1982**, *31*, 1133-1140; bR. Z. Cai, B. Szoke, R. Lu, D. Fu, T. W. Redding, A. V. Schally, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 1896-1900; cA. V. Schally, *Cancer Research* **1988**, *48*, 6977-6985.
- [14] S. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J.-W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241-2252.
- [15] J. L. Brennan, N. S. Hatzakis, T. R. Tshikhudo, V. Razumas, S. Patkar, J. Vind, A. Svendsen, R. J. M. Nolte, A. E. Rowan, M. Brust, *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 1373-1375.
- [16] A. Pfisterer, Max-Planck-Institut für Polymerforschung (Mainz), **2008**.
- [17] aH. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 1128-1137; bH. Nandivada, X. Jiang, J. Lahann, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 2197-2208; cM. D. Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571-6584; dA. D. Moorhouse, J. E. Moses, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 715-723.
- [18] K. Uchida, S. Kawakishi, *Biochem Biophys Res Commun* **1986**, *138*, 659-665.
- [19] P. J. Thornalley, *Chem Biol Interact* **1998**, *111-112*, 137-151.
- [20] V. Hong, S. Presolski, C. Ma, M. Finn, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 9879-9883.
- [21] M. Lieber, B. Smith, A. Szakal, W. Nelsonreese, G. Todaro, *Int. J. Cancer* **1976**, *17*, 62-70.
- [22] W. E. Fisher, T. A. Doran, P. Muscarella, L. G. Boros, E. C. Ellison, W. J. Schirmer, *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 322-324.
- [23] M. C. De Martino, L. J. Hofland, S. W. Lamberts, *Prog Brain Res*, *182*, 255-280.

- [24] E. S. Alnemri, D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, J. Y. Yuan, *Cell* **1996**, *87*, 171-171.
- [25] T. G. Cotter, *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 501-507.
- [26] R. D. Gascoyne, S. A. Adomat, S. Krajewski, M. Krajewska, D. E. Horsman, A. W. Tolcher, S. E. O'Reilly, P. Hoskins, A. J. Coldman, J. C. Reed, J. M. Connors, *Blood* **1997**, *90*, 244-251.
- [27] O. Monni, H. Joensuu, K. Franssila, J. Klefstrom, K. Alitalo, S. Knuutila, *Blood* **1997**, *90*, 1168-1174.
- [28] S. Storey, *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 971-972.
- [29] A. Ashkenazi, R. S. Herbst, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1979-1990.
- [30] K. Sharma, C. B. Srikant, *Int. J. Cancer* **1998**, *76*, 259-266.
- [31] L. Buscail, N. Saint-Laurent, E. Chastre, J. C. Vaillant, C. Gespach, G. Capella, H. Kalthoff, F. Lluís, N. Vaysse, C. Susini, *Cancer Research* **1996**, *56*, 1823-1827.
- [32] W. A. P. Breeman, M. P. VanHagen, H. A. Visser-Wisselaar, M. E. vanderPluijm, J. W. Koper, B. Setyono-Han, W. H. Bakker, D. J. Kwekkeboom, M. P. Hazenberg, S. W. J. Lamberts, T. J. Visser, E. P. Krenning, *J. Nucl. Med.* **1996**, *37*, 108-117.
- [33] A. Nagy, A. V. Schally, G. Halmos, P. Armatis, R.-Z. Cai, V. Csernus, M. Kovács, M. Koppán, K. Szepesházi, Z. Kahán, *PNAS* **1998**, *95*, 1794-1799.
- [34] E. Ferrante, C. Pellegrini, S. Bondioni, E. Peverelli, M. Locatelli, P. Gelmini, P. Luciani, A. Peri, G. Mantovani, S. Bosari, P. Beck-Peccoz, A. Spada, A. Lania, *Endocr Relat Cancer* **2006**, *13*, 955-962.
- [35] 10 ed., Chemical Computing Group Inc., Montreal, **2009**.
- [36] A. Pfisterer, K. Eisele, X. Chen, M. Wagner, K. Müllen, T. Weil, *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 9697-9707.

V Makromolekulare Somatostatintherapeutika

V-1 Initiatoren für lebende radikalische Polymerisationen

Strategien, wie Biohybridkonjugate im Allgemeinen und Polymer-Biohybridkonjugate im Speziellen erhalten werden können, waren Gegenstand von Kapitel I. Der klassische Ansatz bedient sich der *grafting to* Methode, d.h. das Polymer wird entweder nach der Polymerisation durch Modifizierung des α - oder ω -Terminus mit einer proteinreaktiven Gruppe ausgestattet oder es wird ein entsprechend funktionalisierter Initiator eingesetzt, von welchem ausgehend die Polymerisation gestartet wird. Der Vorteil der letztgenannten Technik besteht darin, dass jedes Makromolekül mit einer reaktiven Gruppe ausgestattet ist.

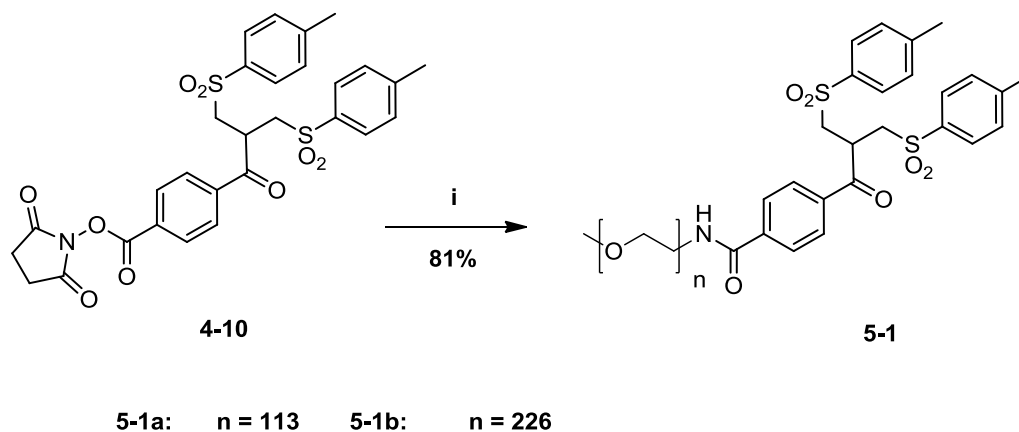


Abb V-1 Synthese der PEG-Bissulfone 5-1a und b. i: Amino-PEG-5k (5-1a) bzw. 10k (5-1b), DCM, 30°C, 48 h.

Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass in diesem Fall nur Monomere zum Einsatz

kommen können, die mittels lebender radikalischer Polymerisation polymerisiert werden können. Die Einführung von Heteroatomen in das Polymerrückgrat ist auf diese Weise nicht möglich.

Da diese meist Voraussetzung für die Bioabbaubarkeit eines Polymers sind, können daher durch diese Methode keine Polymer-Proteinkonjugate mit bioabbaubarer Polymerkomponente erhalten werden.

Brocchini et al. verfolgten beide Ansätze: Die in Abb V-1 dargestellte Reaktion von 5k und 10k PEG mit Aktivesterbissulfon 4-9 lieferte die entsprechenden PEGbissulfone^[1]. Desweiteren entwarfen sie ein ATRP-Bissulfid^[2], dessen Syntheseroute in Abb V-2 zu sehen ist. Ausgehend von diesem Initiator wurde Phosphorylcholinmethacrylat polymerisiert und das erhaltene PMPC-Polymer durch anschließende Oxidation zum disulfidreaktiven Bissulfonpolymer umgesetzt.

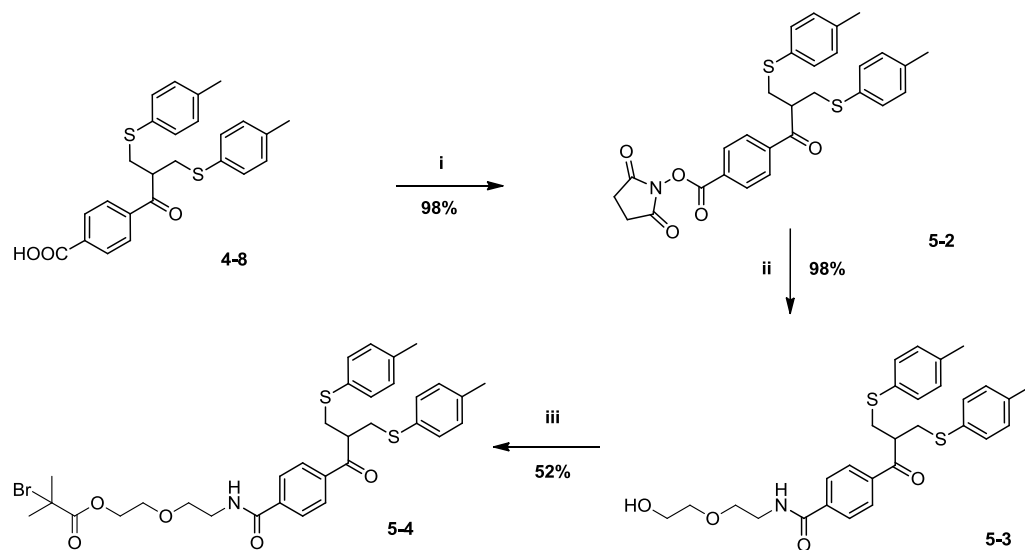


Abb V-2 Syntheseroute zum ATRP-Bissulfid 5-4. i: NHS, DIPC, DCM, RT, 4 h; ii: 2-(2-Aminoethoxy)ethanol, DCM, RT, 18 h; iii: 2-Bromisobuttersäurebromid (1,1 eq), DMAP, DCM, RT, 18 h, Argonatmosphäre^[2]

PEG- sowie PMPC-Bissulfon wurden in die Disulfidbrücke von IFN interkaliert und diese Biohybridtherapeutika vergleichend auf ihr Verhalten in vivo und ihre pharmakokinetischen Eigenschaften untersucht^[2].

Monomer und Lösungsmittel wurden dazu im Schlenk Kolben vorgelegt und 45 Minuten durch Einleitung von Argon entgast. Nach Zugabe des CuBr sowie des Liganden wurde die Bildung der Komplexverbindung abgewartet und nach Addition des Initiators wurden sofort drei *freeze-pump-thaw* Zyklen angeschlossen.

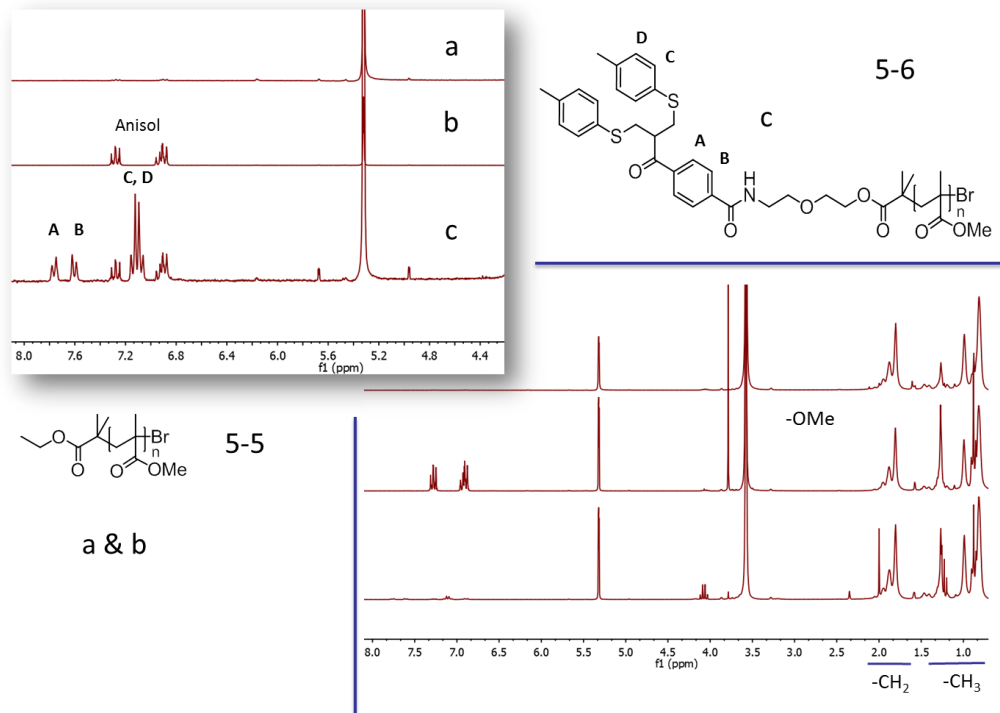


Abb V-3 Vergleich der ¹H-NMR Spektren von PMMA-Bissulfid 5-6 und PMMA 5-5 in CD₂Cl₂ (250 MHz). Oben: Vergrößerung des aromatischen Bereichs; unten: gesamtes Spektrum

Die Reaktionslösung wurde auf 32°C erwärmt und nach Rühren über Nacht durch Entfernen der Inertgasatmosphäre abgebrochen. Das Polymer wurde durch Zutropfen

in Hexan ausgefällt und der Katalysator durch säulenchromatographische Reinigung an Alox mit Essigester als Eluens abgetrennt.

Die Charakterisierung erfolgte durch NMR-Spektroskopie und GPC-Analyse. Zum Vergleich wurde die Polymerisation mit einem konventionellen ATRP-Initiator, Ethyl-2-bromoisobutyrat, unter identischen Bedingungen durchgeführt.

In Abb V-3 sind die ^1H -NMR-Spektren beider Polymere in d^2 -Dichlormethan zu sehen. Die Signale im aromatischen Bereich zeigen neben einer leichten Verunreinigung mit Anisol das klassische Signalmuster der Protonen zweier A, B-Systeme (Signale **A** und **B** bzw. **C** und **D**).

Das theoretische Molekulargewicht wurde durch das Verhältnis der Integrale der Signale von Initiatorproton A und der Signale der Methylesterprotonen des PMMA ermittelt. Der errechnete Polymerisationsgrad P_n beträgt 172, daraus lässt sich $M_{n,th}$ nach folgender Gleichung 5-1 berechnen:

$$M_{n,th} = P_n \times M_{Monomer} + M_{Initiator}$$

Gleichung 5-1

Der theoretisch berechnete Wert liegt mit 17415 g/mol etwas höher als der Wert, den die GPC –Analyse mit $M_n = 16783$ g/mol lieferte. Wie in Abb V-4 zu sehen ist, lieferten beide Ansätze monomodale Verteilungen, allerdings mit etwas breiten Molekulargewichtsverteilungen mit Werten von 1,55 (PMMA 5-5) und 1,49 (PMMA-BI 5-6), wie sie eher für radikalische Polymerisationen typisch sind. Der Grund für diese Beobachtung liegt offensichtlich in einer erhöhten Konzentration an aktiver Spezies bzw. reaktiven Radikalen, wodurch es zu einer Zunahme von Kettenabbruch- bzw. Rekombinationsreaktionen kommt. Anhand der folgenden Gleichung 5-2 lässt sich

nachvollziehen, welche Faktoren die Molekulargewichtsverteilung bei der ATRP beeinflussen können.

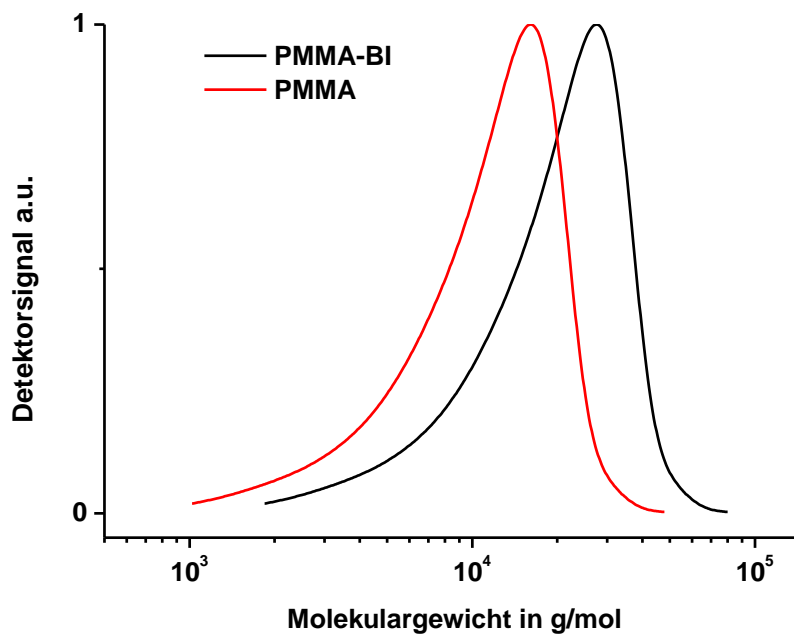


Abb V-4 GPC Elugramm von PMMA-BI 5-6 im Vergleich zu PMMA 5-5

$$PDI = \frac{M_w}{M_n} = 1 + \left(\frac{k_p [RX]_0}{k_{deact} [Cu^{II}L_nX]} \right) \left(\frac{2}{conv} - 1 \right)$$

Gleichung 5-2

Es wird deutlich, dass eine hohe Polymerisationsgeschwindigkeit k_p sowie eine hohe Initiatorkonzentration $[RX]_0$ sowie eine langsame Deaktivierungsgeschwindigkeit und eine niedrige Konzentration an Deaktivator $[Cu^{II}L_nX]$ sowie ein niedriger Umsatz eine

breite Molekulargewichtsverteilung zur Folge haben. Eine Möglichkeit besteht darin, dass bei der Polymerisation die Konzentration an deaktivierendem Cu(II)-Komplex aufgrund der schlechten Löslichkeit in Anisol und der daraus resultierenden Abscheidung an der Glaswand zu gering war und dadurch das Gleichgewicht auf die Seite der aktiven Spezies verschoben wurde. Möglich ist darüber hinaus, dass eine zu hoch gewählte Monomerkonzentration für eine erhöhte lokale Konzentration an Radikalen verantwortlich war.

Es lässt sich beobachten, dass die Verteilung sich zu kleineren Molekulargewichten hin verbreitert, was ein Indiz dafür ist, dass viele Abbruchreaktionen am Anfang der Polymerisation stattfanden. Daher ist wahrscheinlich, dass eine hohe Reaktivität des Initiators die anfängliche Konzentration an aktiver Spezies und damit die Rekombinations- und Terminierungsrate erhöhte, was wiederum zu einer erhöhten Konzentration an Deaktivator führte und insgesamt in einer Verbreiterung der Molekulargewichtsverteilung bei gleichzeitiger Verringerung der Polymerisationsgeschwindigkeit resultierte.

Ersichtlich ist jedoch, dass bei gleichen Bedingungen schon die Variation eines Parameters wie in diesem Fall die Wahl des Initiators einen entscheidenden Einfluss auf Reaktionskinetik und Molekulargewichtsverteilung hat und daher eine gründliche Feinabstimmung in der Wahl von Lösungsmittel, Monomer, Monomerkonzentration, Initiator sowie Katalysatorsystem und Reaktionstemperatur nötig ist, um eine lebende radikalische Polymerisation und eine geringe Molekulargewichtsverteilung zu gewährleisten. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Umsetzung dieser Polymerkonjugate zu Biohybriden, so dass keine weitere Optimierung der Molekulargewichtsverteilung vorgenommen wurde.

Um die Konjugation an Biomaterialien zu ermöglichen, musste PMMA-Bissulfid 5-6 zum PMMA-Bissulfon 5-7 oxidiert werden.

Dazu wurde PMMA-Bissulfid 5-7 in EtOAc/MeCN/H₂O (6:6:1) gelöst und mit einem Überschuss an Kaliumperoxomonosulfat versetzt. Die erfolgreiche Oxidation konnte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verifiziert werden. In Abb V-5 sind die ¹H-NMR-

Spektren von ATRP-Bissulfid 5-4, ATRP-Bissulfon 5-8 sowie PMMA-Bissulfid 5-6 und PMMA-Bissulfon 5-7 zueinander in Relation gesetzt.

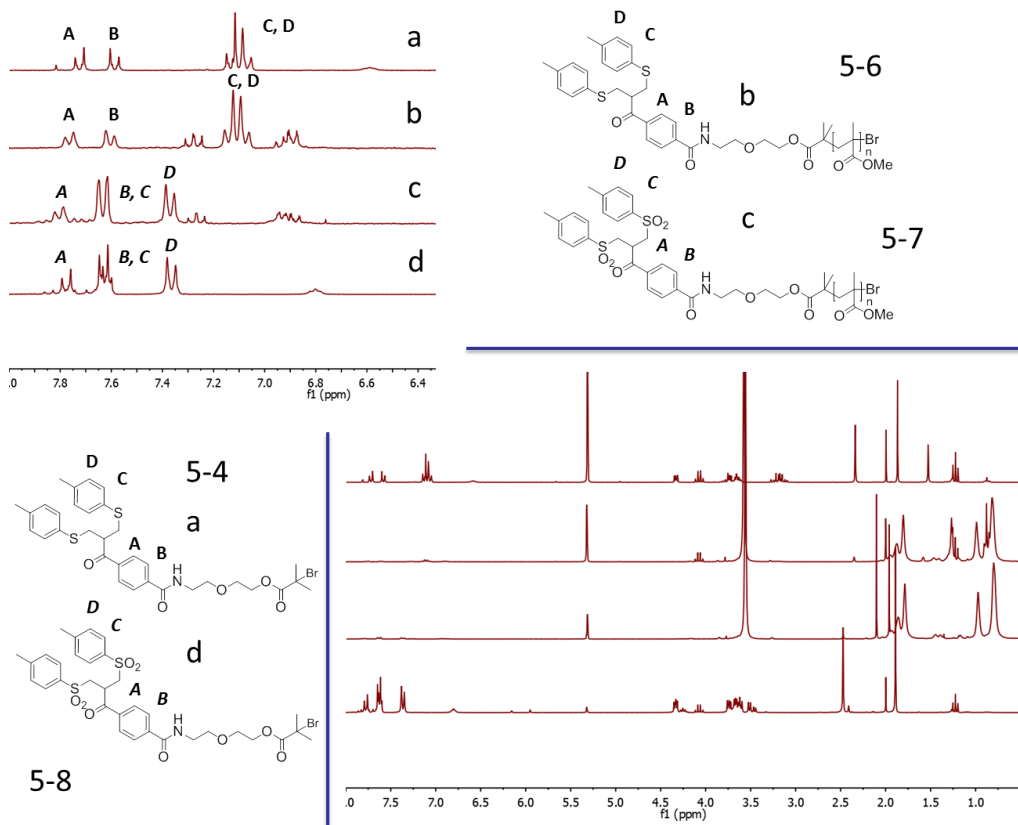


Abb V-5 Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Spektren von PMMA-Bissulfid 5-6, PMMA-Bissulfon 5-7, ATRP-Bissulfid 5-4 und ATRP-Bissulfon 5-8 in CD_2Cl_2 (250 MHz). Oben: Vergrößerung des aromatischen Bereichs; unten: gesamtes Spektrum

Deutlich zu erkennen ist hier die durch die Oxidation der Sulfide zu den Sulfonen resultierende Tieffeldverschiebung der Signale der Protonen D und C.

Auf diese Art und Weise ist die Darstellung von Biohybridamphiphilen durch Interkalation in Disulfidbrücken vorstellbar. Die Konjugation hydrophober Polymere ist wesentlich weniger gut untersucht als die Kupplung wasserlöslicher Polymere und

ist äußerst interessant, da sie die Synthese gigantischer Amphiphile ermöglicht, die sich aufgrund ihrer Struktur in wässriger Lösung zu vesikulären Überstrukturen anordnen. Pionierarbeit auf diesem Gebiet wurde von Nolte et al. geleistet, die PS-Peptid und PS-BSA-Amphiphile durch kupferkatalysierte Klick-Chemie erzeugten und auf ihre Eigenschaften in Lösung mittels TEM untersuchten^[3].

Der Grund, dass die Kupplung von hydrophoben Polymeren an polare Biomoleküle erst in neuerer Zeit besser untersucht wurde, liegt darin, dass sie sich oft schwierig gestaltet bzw. in Gegenwart von Lösungsvermittlern und organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden muss. Nachteilig wirkt sich bei der *grafting to* Strategie daher oft aus, dass diese organischen Substanzen die strukturelle Integrität der Moleküle beeinträchtigen können.

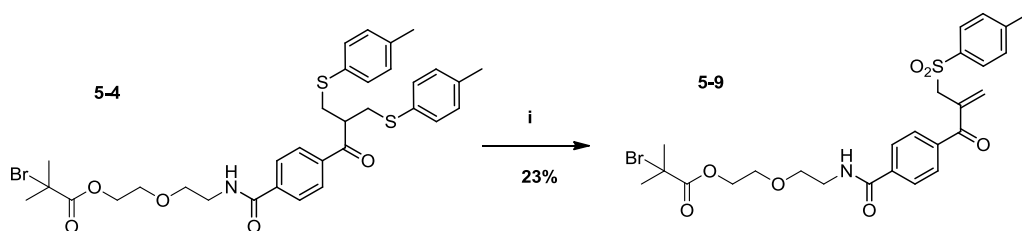


Abb V-6 Darstellung des ATRP-Monosulfons 5-9. i: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), MeOH/H₂O (1:1), RT, 18 h, anschließend PB 50 mM, 10 mM EDTA, pH 7,8/MeCN (2:3), RT, 18 h.

Die *grafting from* Methode macht es hingegen möglich, auch hydrophobe Monomere direkt in Lösung vom Protein oder Peptid ausgehend zu polymerisieren. Auf die innovativen Ansätze um Makroinitiatoren und vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten wurde bereits intensiv in der Einleitung eingegangen. Innerhalb dieser Arbeit wurde die Synthese eines disulfidreaktiven ATRP-Initiators verwirklicht.

Dazu wurde ATRP-Bissulfid 5-4 (in MeOH/H₂O (1:1) mit Kaliumperoxomonosulfat erst zum ATRP-Bissulfon 5-8 oxidiert und das erhaltene Gemisch aus Bis – und Monosulfon

in PB 50 mM, 10 mM EDTA, pH 7,8/MeCN (2:3) zum Monosulfon 5-9 umgesetzt (Abb V-6).

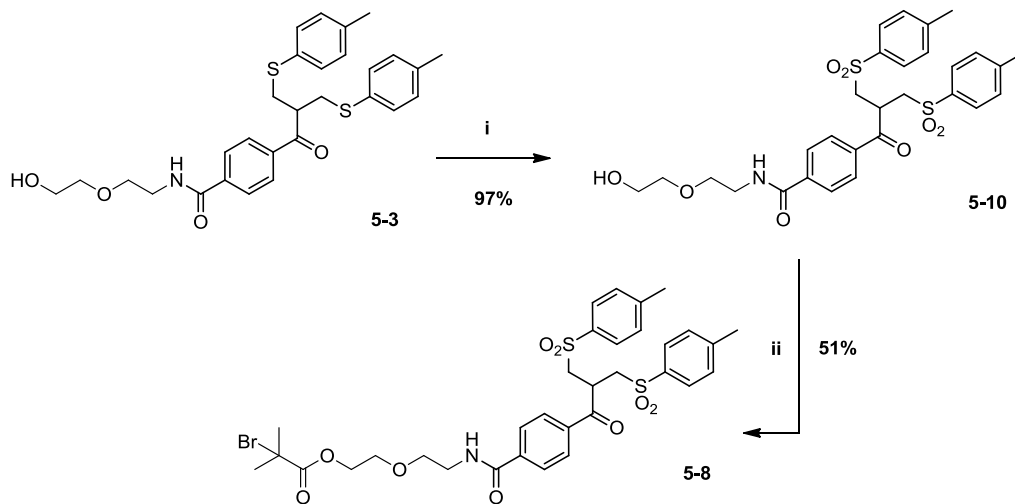


Abb V-7 Alternative Syntheseroute zum ATRP-Bissulfon 5-8. i: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), EtOAc/CH₃CN/H₂O (6:6:1), RT, 18 h; ii: 2-Bromisobuttersäurebromid (1,1 eq), DMAP, DCM, RT, 18 h, Argonatmosphäre

Da die Ausbeute über diese Syntheseroute nicht sehr gut war, wurde alternativ ein anderer Weg gewählt. Dazu wurde p-Amidoethoxyethanoldisulfid 5-3 in EtOAc/CH₃CN/H₂O (6:6:1) mit Kaliumperoxomonosulfat zum entsprechenden Bissulfon 5-10 oxidiert und dieses anschließend in trockenem DCM mit 2-Bromisobuttersäurebromid zum ATRP-Bissulfon verestert (Abb V-7). Im nächsten Abschnitt soll beschrieben werden, wie die Synthese von PEGylierten Somatostatinen über die *grafting to* Methode durchgeführt werden konnte. Darüberhinaus wird gezeigt werden, wie dieser thiolreaktive Initiator zur Modifikation von Somatostatin genutzt wurde und wie darüber hinaus dieser pharmazeutisch interessante Makroinitiator zur Darstellung von Polymerhybridtherapeutika eingesetzt werden konnte.

V-2 Polymer-Somatostatin-Hybride: *Grafting to*

Der Begriff der *magic bullet* wurde im späten 19. Jahrhundert von dem Bakteriologen und Mediziner Paul Ehrlich geprägt und beschreibt ursprünglich eine Substanz, mit der die spezifische Adressierung von Mikroorganismen erfolgreich möglich ist^[4]. Seither wird dieser Begriff oft verwendet, um dem Traum von der Synthese von Substanzen Ausdruck zu verleihen, welche die perfekten Wirkstoffe zur Behandlung einer bestimmten Krankheit oder Disfunktion darstellen und sich durch geringe Nebenwirkungen auszeichnen. Protein- oder auch Peptidtherapeutika besitzen eine hohe Spezifität und eine Vielzahl an komplexen Funktionen. Therapeutika basierend auf humanen Proteinen und Peptiden weisen in der Regel auch weniger Nebenwirkungen sowie aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades mit körpereigenen Stoffen eine geringere Immunantwort hervor.

Nachteile von Polypeptid- bzw. Peptidwirkstoffen bestehen darin, dass sie durch Proteasen abgebaut werden und daher intravenös oder subkutan verabreicht werden müssen. Sie haben meist eine kurze Halbwertszeit, werden schnell über die Niere ausgeschieden und weisen oftmals auch eine schlechte Wasserlöslichkeit auf. Die ersten Pegylierungen wurden von Wieder et al. durchgeführt und waren ursprünglich dazu gedacht, die Immunantwort von Proteinen und Biomolekülen nicht humanen Ursprungs zu senken^[5]. Dies konnte nur in geringem Maß beobachtet werden, die Blutzirkulationszeit hingegen verlängerte sich entscheidend. Dies führte zu einer dramatischen Erhöhung der Halbwertszeit eines pegylierten Wirkstoffs.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei vielen Polypeptiden die Modifizierung mit PEG eine Verbesserung der pharmakokinetischen und der pharmakodynamischen Eigenschaften zur Folge hat und die Wasserlöslichkeit der Biohybridkonjugate verbessert werden konnte^[6]. Bei gegebenem Molekulargewicht nimmt ein PEG-Polymer ein 5-10fach erhöhtes Volumen im Vergleich zu einem Protein mit entsprechendem Molekulargewicht ein^[7]. Verantwortlich hierfür ist die Bindung von zwei bis drei Wassermolekülen pro PEG-Einheit. Dieser Gewinn an hydrodynamischen

Volumen führt wiederum dazu, dass ein solcherart modifiziertes Protein oder Peptid langsamer ausgeschieden wird, da die renale Clearance größenabhängig ist^[8]. Der Abschirmungseffekt des PEG bewirkt zusätzlich, dass die Biokonjugate besser gegen proteolytischen Abbau geschützt sind. PEG ist darüber hinaus nicht toxisch und wird nicht abgebaut^[9].

Bei Pegylierungen der ersten Generation wurden hauptsächlich die ϵ -Aminogruppen der Lysine adressiert^[10]. Aufgrund der großen Anzahl an möglichen reaktiven Zentren wurden jedoch Mehrfachmarkierungen erzeugt und die Schwierigkeit bestand in der Reproduzierung der erhaltenen Isomeregemische. Die Ansätze der zweiten Generation wichen daher auf andere Verknüpfungsmethoden aus, die beispielsweise eine selektive Modifizierung des N-Terminus gewährleisteten^[11]. Die Einführung von Cysteinen an präzise definierten Orten im Biomolekül durch *genetic engineering* führte ebenfalls dazu, dass dieses monofunktionalisiert werden konnte^[12]. Desweiteren wurden PEGs mit höheren Molekulargewichten sowie verzweigte PEGs eingesetzt, mit denen die pharmakokinetischen Eigenschaften noch weiter verbessert werden konnten^[13].

V-2a Darstellung und Synthese der PEGylierten Somatostatine

Die Interkalation der PEG-5k- bzw. PEG-10k-Bissulfone 5-1a und 5-1b, deren Synthese im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde, in die Disulfidbrücke von Somatostatin erfolgte nach folgender Vorschrift:

Somatostatinacetat wurde in H₂O (25 mg/ml) vorgelöst und dann in PB 50 mM, pH 7,8 pipettiert. PEG-Bissulfon 5-1a bzw. 5-1b sowie TCEP werden zugegeben und die Reaktionslösung wird bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wird die Reaktionslösung direkt auf eine PD-10 Säule aufgetragen, die entsprechenden Fraktionen gesammelt und gefriergetrocknet. Die Reaktionen wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen an Somatostatin und PEG-Linker 5-1a und b in

Lösung durchgeführt, wobei der Überschuss an Somatostatin konstant gehalten wurde (Tab V-1).

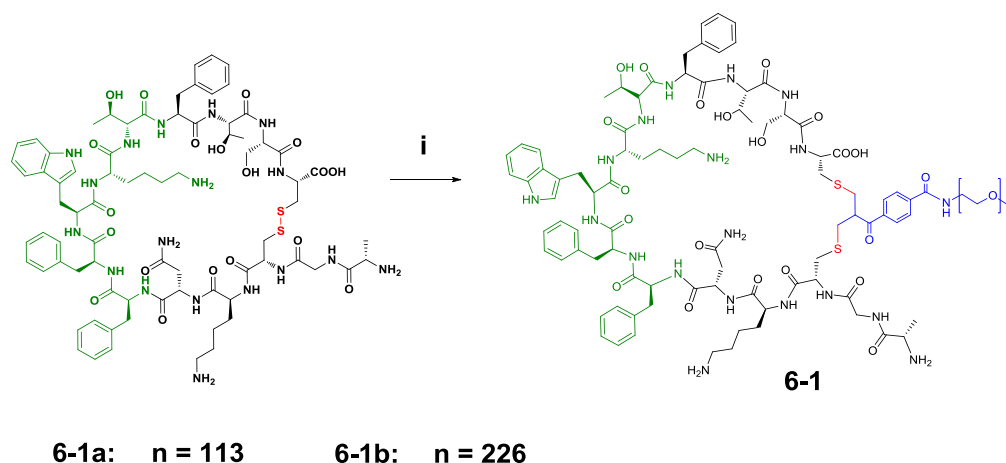


Abb V-8 Syntheschema für die PEGylierten Somatostatine 6-1a und 6-1b über die *grafting to* Methode i: PEG-Bissulfon-5k (5-1a) bzw. PEG-Bissulfon-10k (5-1b) (0,84 eq), TCEP (1 eq), PB 50 mM, pH 7,8, 4°C, 18 h.

	PEG	m/mg	M/gmol ⁻¹	n/μmol	V/ml	c(PEG)/mM	c(Soma)/mM
6-1a-1	5-1a	6	5382,1	1,1	1	1,1	1,4
6-1b-1	5-1b	7,3	10398	0,7	1	0,7	0,9
6-1a-2	5-1a	35	5382,1	6,35	50,5	0,125	0,15
6-1b-2	5-1b	67	10398	6,33	50,5	0,125	0,15

Tab V-1 Reaktionsbedingungen für die PEGylierung von Somatostatin, verschiedene Konzentrationen

Die Konjugate wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Bilder der Gele sind in Abb V-9 zu sehen. In Fall a (6-1a-2 und 6-1b-2) wurden die Reaktionen bei geringeren

Konzentrationen durchgeführt. Neben den breiten Banden für die Konjugate 6-1a bzw. 6-1b ist nach Coomassie-Staining auch leicht die Bande von nativem Somatostatin zu sehen.

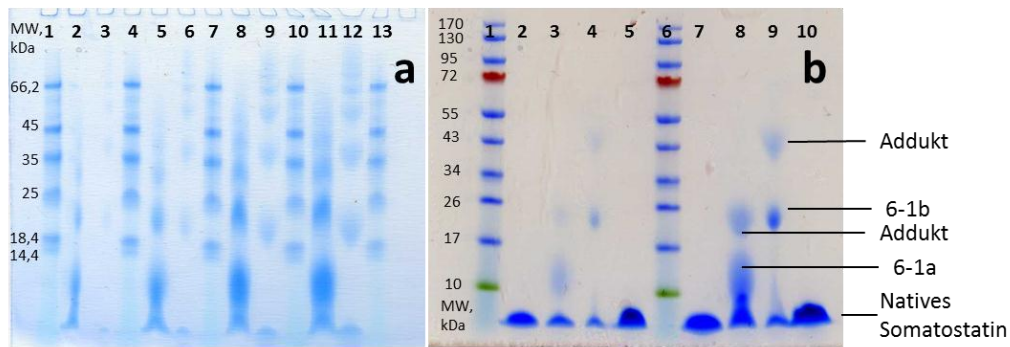


Abb V-9 SDS-PAGE-Bilder nach Anfärbung mit Coomassieblau a: Spur 1, 4, 7, 10 und 13: prestained protein ladder; Spur 2, 5, und 11: PEG-5k-Somatostatin 6-1a 1xc_{0,a}, 2 xc_{0,a}, 4 xc_{0,a}, 8 xc_{0,a}; Spur 3, 6, 9 und 12: 1xc_{0,b}, 2 xc_{0,b}, 4 xc_{0,b}, 8 xc_{0,b}; b: Spur 1 und 6: prestained protein ladder; Spur 2 und 7: Somatostatin 1xc_s und 2xc_s; Spur 3 und 8: PEG-5k-Somatostatin 6-1a 1xc_{5k} und 2xc_{5k}; Spur 4 und 9: PEG-10k-Somatostatin 1xc_{10k} und 2xc_{10k}; Spur 5 und 10: Coumarinsomatostatin 4-12 1xc_c und 2xc_c (c entspricht ca. 10 mg/ml)

Grund dafür ist nicht nur die Tatsache, dass Somatostatin in leichtem Überschuss eingesetzt wurde und mittels PD-10 nicht vollständig entfernt werden konnte, sondern auch dass durch das bei der Probenvorbereitung notwendige Erhitzen der Analyselösung auf 90°C unter reduzierenden Bedingungen wahrscheinlich ein Bruchteil des Konjugats gespalten wurde.

In beiden Fällen tauchen darüber hinaus Banden bei den doppelten Molekulargewichten der Konjugate auf, im Fall a sogar bei den jeweiligen 2ⁿ-Vielfachen. Dieses Verhalten beruht wahrscheinlich auf einer Aggregation der Konjugate und kann auch bei der Analyse verschiedener Proteine wie RNase oder BSA beobachtet werden. Diese Aggregate können gelelektrophoretisch nicht voneinander getrennt werden.

Zusätzlich wurden die Konjugate mittels Gelpermeationschromatographie unter Verwendung eines PEG-Standards in DMF analysiert. Im Gegensatz zu den SDS-PAGE Gelen wurde bei der Analyse mittels GPC kein freies Somatostatin detektiert. Dies ist ein Indiz für die Vermutung, dass zumindest ein Teil des Konjugats bei der Vorbereitung der SDS-Proben gespalten wurde.

Überraschenderweise ist jedoch die Bande, die bei der Betrachtung der Polyacrylamidgele nach Coomassiestaining für typische Aggregatbande gehalten wurde, auch in den GPC Elugrammen zu sehen (Abb V-10).

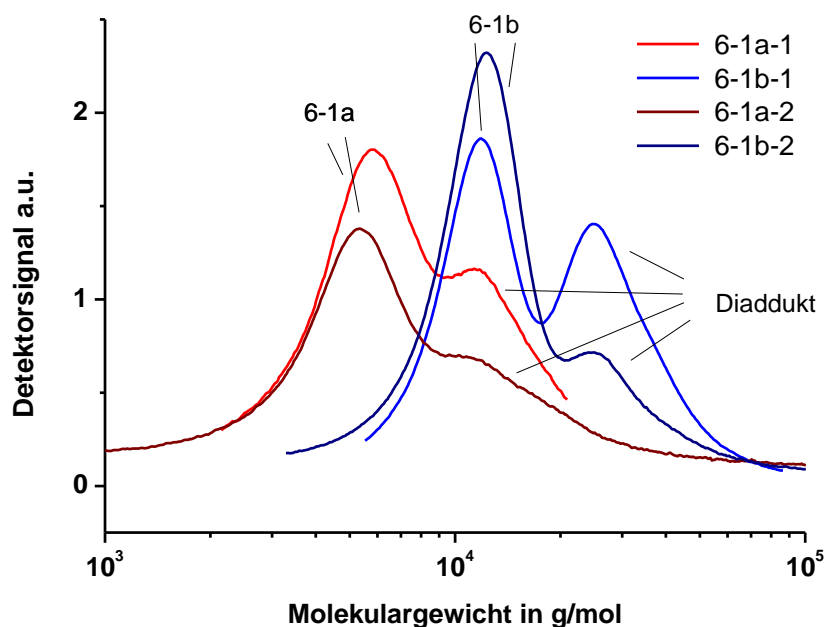


Abb V-10 GPC-Elugramme, Detektion durch Bestimmung des Brechungsindex. a) 6-1a-1 ($M_{\text{Max}} = 5331 \text{ g/mol}$); b) 6-1a-2 ($M_{\text{Max}} = 5802 \text{ g/mol}$); c) 6-1b-1 ($M_{\text{Max}} = 11878 \text{ g/mol}$); d) 6-1b-2 ($M_{\text{Max}} = 12299 \text{ g/mol}$)

Es wurde beobachtet, dass dieses Phänomen in Abhängigkeit der Konzentrationen an Somatostatin und PEG-Linker 5-1a und b in Reaktionslösung unterschiedlich stark auftritt. Vermutet wurde, dass diese Erhöhung, vor allem der Konzentration der PEG-

Linker 5-1a und b, in Lösung zu einer stärkeren Bevorzugung der intermolekularen Reaktion führt und damit der Anteil an Diaddukt steigt (Abb V-11). Betrachtet man die Ansätze 6-1a-2 sowie 6-1b-2, so lässt sich beobachten, dass dieses Phänomen stärker bei der Verknüpfung von PEG-5k-Bissulfon 5-1a (6-1a-2) mit Somatostatin als bei der Verknüpfung mit PEG-10k-Bissulfon 5-1b (6-1b-2) auftritt.

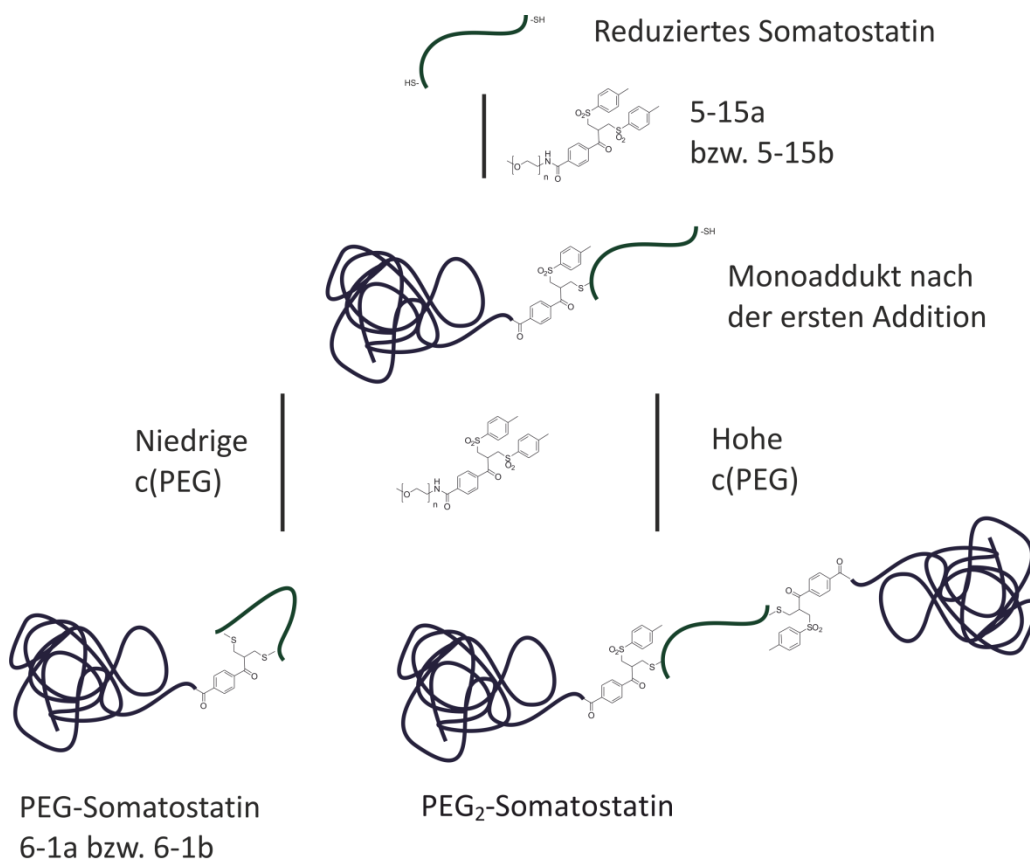


Abb V-11 Reaktionsverlauf in Abhängigkeit von der Konzentration von 5-1a bzw. 5-1b in Reaktionslösung

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die sterische Abschirmung der zweiten Thiolgruppe eine entscheidende Rolle spielt, welche im Falle des PEG-10k-Bissulfon 5-1b größer ist. Allerdings zeigt die Verringerung der Konzentration vor allem einen enormen

Effekt bei der Modifizierung mit PEG-10k-Bissulfon, während dieser Aspekt bei der Funktionalisierung mit PEG-5k-Bissulfon einen wesentlich geringeren Einfluss zu haben scheint. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei dieser Reaktion der Konzentrationsfaktor bei hoher sterischer Abschirmung stärker ins Gewicht fällt.

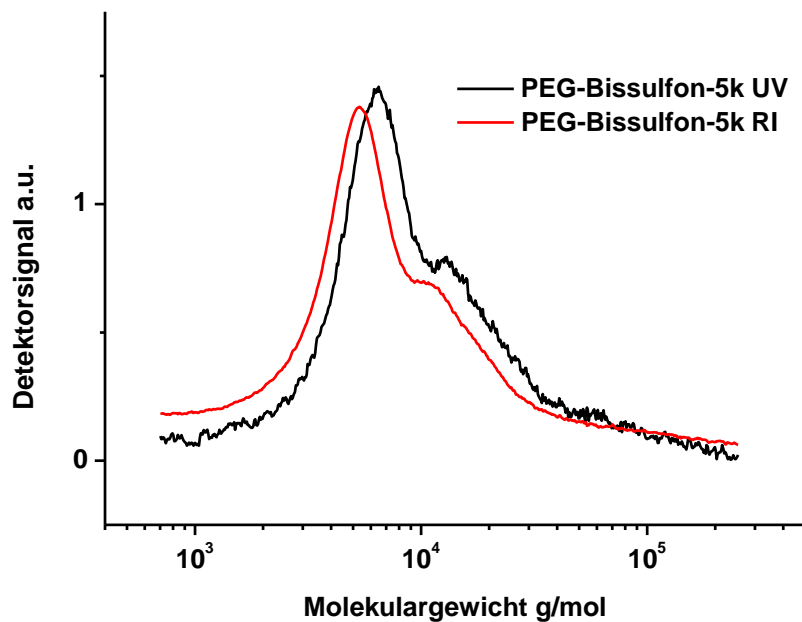


Abb V-12 GPC-Eluogramme von 6-1a-2, Detektion durch Bestimmung des Brechungsindex (rot) bzw. durch Messung der UV-Absorption (schwarz)

Die Detektion durch UV ermöglicht desweiteren nur die Detektion der Endgruppe bzw. des Somatostatins, da das Polymerrückgrat von PEG nicht absorbiert, während bei der Detektion durch Bestimmung des Brechungsindex sowohl Somatostatin als auch Polymerrückgrat detektiert werden (

Abb V-12). Die Werte für die Maxima der Molekulargewichtesverteilungen weichen daher aufgrund von Konzentrationseffekten leicht voneinander ab ($\text{Max}_{\text{UV}} = 6479 \text{ g/mol}$, $\text{Max}_{\text{RI}} = 5330 \text{ g/mol}$, $\text{Max}_{\text{ber}} = 6491 \text{ g/mol}$).

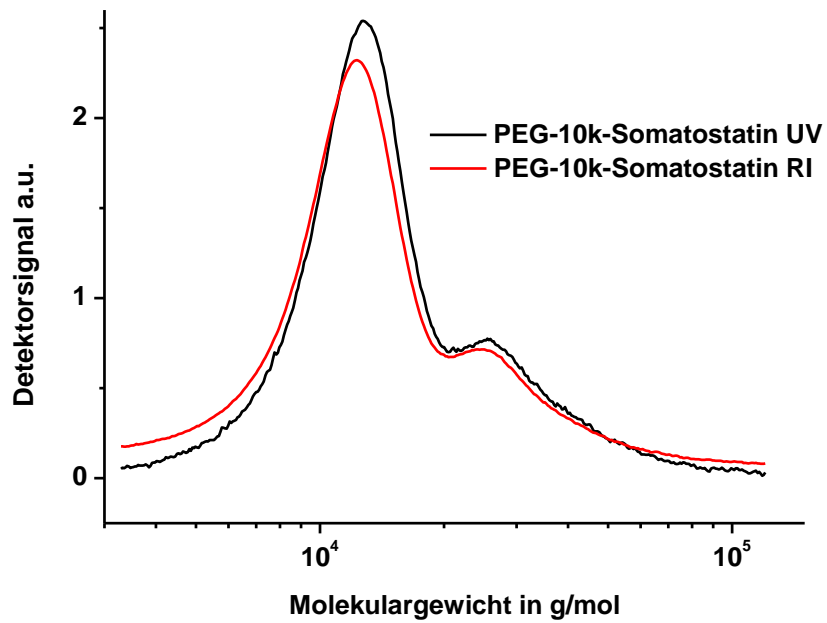


Abb V-13 GPC-Elugramme von 6-1b-2, Detektion durch Bestimmung des Brechungsindex (rot) bzw. durch Messung der UV-Absorption (schwarz)

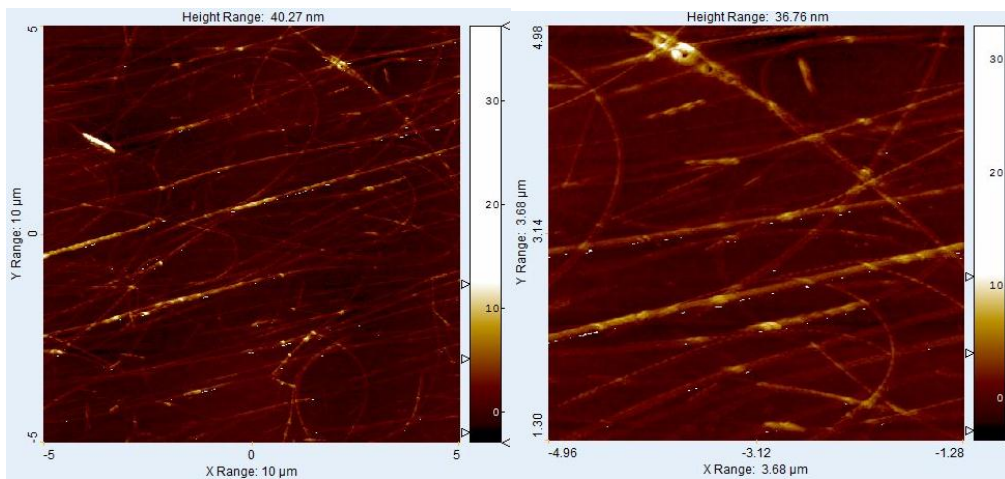


Abb V-14 AFM-Aufnahmen von Somatostatin, 3w% in 0,1M HCl

Auch die Maxima bei Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von PEG-10k-Somatostatin sind nicht identisch und liegen darüber hinaus höher als der theoretisch berechnete Wert ($\text{Max}_{\text{UV}} = 12877 \text{ g/mol}$, $\text{Max}_{\text{RI}} = 12260 \text{ g/mol}$, $\text{Max}_{\text{ber}} = 11830 \text{ g/mol}$) (Abb V-13).

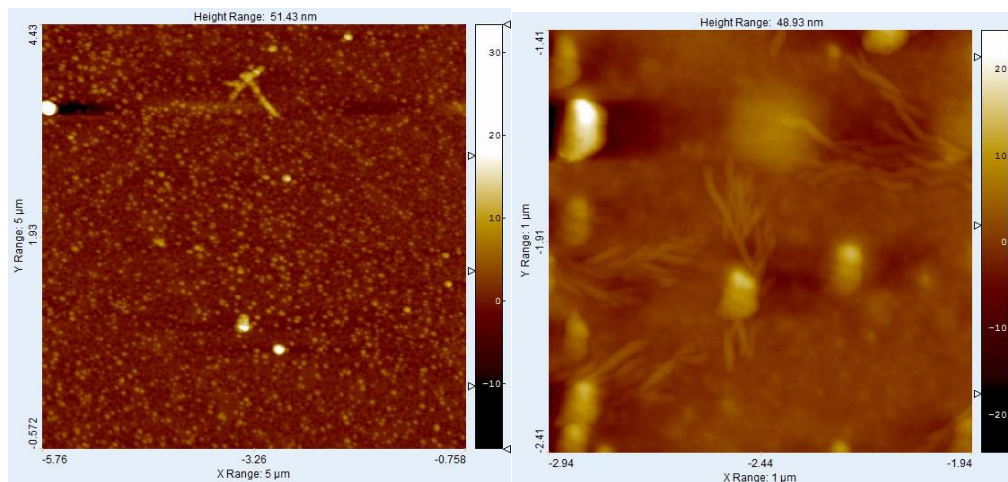


Abb V-15 AFM-Aufnahmen von PEG-5k-Somatostatin 5-1a, rechts: 45 µg/ml in Milli-Q-Wasser; links: 22,5 µg/ml in Milli-Q-Wasser

Es ist bekannt, dass natives Somatostatin in wässriger Lösung spontan zu verdrillten Nanofasern aggregiert^[14], dabei lagern sich die hydrophoben Schleifen nach innen, während die hydrophilen Reste nach außen zeigen und die Peptide über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander wechselwirken.

Abb V-14 zeigt die faserartigen Strukturen, welche mittels AFM nach Trocknen einer 3 wt%igen Lösung des nativen Peptids in 0,1 M HCl visualisiert werden konnten. Die Fibrillen haben einen Durchmesser von 5-10 nm und sind mehrere Mikrometer lang. Im Gegensatz dazu bildete keines der Somatostatinderivate nach der Interkalation in die Disulfidbrücke faserartige Strukturen in Lösung. Dies könnte dadurch begründet sein, dass die Aufweitung der Disulfidbrücke den Abstand zwischen den beiden

Schleifensträngen vergrößert und somit die anti- β -Faltblatt-Sekundärstruktur gestört wird, so dass die supramolekulare Aggregationstendenz zu fibrillären Strukturen verringert wird.

Bei PEG-5k-Somatostatin 5-1a bilden sich mizellenartige Strukturen, umgeben von fibrillären Strukturelementen, die von PEG-Verunreinigungen stammen könnten (Abb V-15).

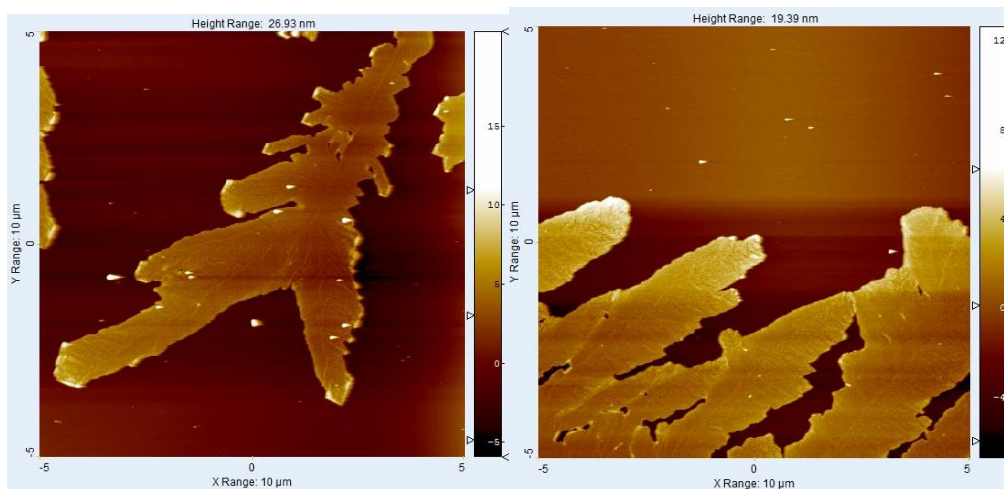


Abb V-16 AFM-Aufnahmen von PEG-10k-Somatostatin 5-1b, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Milli-Q-Wasser

Bei PEG-10k-Somatostatin 5-1b hingegen werden großflächig verzweigte Strukturen betrachtet, wie sie auch für kristallisiertes PEG beobachtet werden können^[15]. Das Verhalten solcher Biohybridstrukturen wird stark durch die Natur des Polymers beeinflusst, so konnte beispielsweise bei der Verknüpfung von BSA mit hydrophobem PS die Bildung von Mizellen visulasiert werden^[16].

V-2b Darstellung und Synthese von PMMA-Somatostatin

In den meisten Fällen werden zur Darstellung von Polymerhybridkonjugaten über die *grafting to* Methode wasserlösliche Polymere in wässriger Pufferlösung mit dem Biomolekül verknüpft. Bei der Konjugation von schwer wasserlöslichen Polymeren wird vorwiegend in Lösungsmitteln wie DMF oder DMSO gearbeitet. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die entsprechenden Proteine oder Peptide die Gegenwart von organischen Lösungsmitteln tolerieren und ihre strukturelle Integrität und biologischen Funktionalität trotzdem erhalten werden kann.

Bei der Interkalation in die Disulfidbrücke von Somatostatin liegt das Problem nicht darin, dass das Hormon einen gewissen prozentalen Anteil an organischen Lösungsmitteln wie DMF oder Acetonitril nicht toleriert, sondern darin dass die Eliminierung des p-Toluensulfonats in Lösungsmittelgemischen mit hohem organischem Lösungsmittelanteil gehemmt ist (vgl. Kapitel III-3).

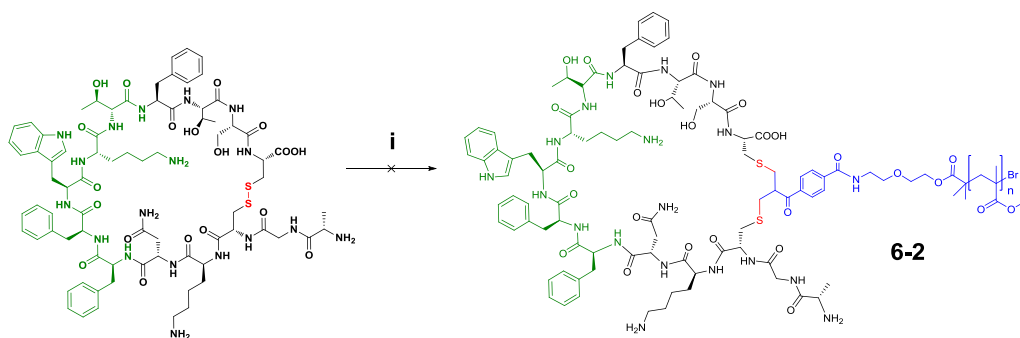


Abb V-17 Angestrebte Synthese von PMMA-Somatostatin 6-2 über die *grafting to* Methode i: PMMA-Bissulfon 5-7 (0,5 eq), TCEP (2q), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{PB}$ 50 mM, pH 7,8 (verschiedene Verhältnisse),

Es ist jedoch sehr schwierig, PMMA-Bissulfon 5-7 in Gemischen mit wässrigem Anteil in Lösung zu halten. Dazu ist unter anderem ein hoher Prozentsatz an DCM nötig. Die

Umsetzung mit Somatostatin wurde in den unterschiedlichsten Gemischen mit verschiedenen Zusammensetzungen durchgeführt. Die Bildung des entsprechenden Konjugats 6-2 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. GPC-Analyse sowie NMR-Spektrum zeigten nur unmodifiziertes PMMA-Bissulfon 5-7 mit Spuren von Eliminierungsprodukt, das SDS-PAGE Gel zeigt nach Anfärbung mit Coomassie nur natives Somatostatin. Es wird vermutet, dass durch den hohen organischen Lösungsmittelanteil die Eliminierungsgeschwindigkeit stark verringert wurde und daher die Bildung des Amphiphils nicht gelang (vgl. III-3 Mono- versus Difunktionalisierung – Betrachtungen des Mechanismus, III-3b). Dieses Verhalten konnte nicht nur bei diesem PMMA-Bissulfon-Linker 5-7 beobachtet werden, sondern stellte allen Bis- und Monosulfonen mit schlechter Wasserlöslichkeit wie z.B. Tetra- und Hexasulfon 6-4 und 6-6 sowie Poly(bissulfon) 7-3 eine Herausforderung dar. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die reaktive Bissulfonfunktionalität durch das Polymerknäuel abgeschirmt wurde bzw. im Inneren des Knäuels schwer zugänglich war.

Der Grund, dass die Kupplung von hydrophoben Polymeren an polare Biomoleküle erst in neuerer Zeit besser untersucht wurde, liegt hauptsächlich darin, dass sie sich in wässriger Lösung oft schwierig gestaltet bzw. in Gegenwart von Lösungsvermittlern und organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden muss. Nachteilig wirkt sich bei der *grafting to* Strategie daher oft aus, dass diese organischen Substanzen die strukturelle Integrität der Moleküle beeinträchtigen können. Die *grafting from* Methode macht es hingegen möglich, auch hydrophobe Monomere direkt in Lösung vom Protein oder Peptid ausgehend in Emulsion zu polymerisieren.

V-3 Polymer-Somatostatin-Hybride: *Grafting from*

Die Gruppe um Prof. Dr. H. D. Maynard konnte zeigen, dass die Polymerisation von Styrol ausgehend von einem proteinogenen Makroinitiator möglich war: Das ungepaarte Cystein von BSA wurde mit einem Maleinimidinitiator markiert und der BSA-Makroinitiator für die lebende radikalische Polymerisation von Styrol verwendet^[17].

Ähnlich wie beim BSA bietet sich auch beim Somatostatin die Möglichkeit eine reaktive Einheit hochspezifisch zu adressieren und einen Makroinitiator zu generieren, welcher sich durch eine hohe Strukturperfektion auszeichnet. Während hingegen im Fall des Proteins nur 65 - 70% der SH-Gruppen für Modifikationen zugänglich sind^[18] und daher nach deren Funktionalisierung immer eine Mischung aus Makroinitiator und nativem BSA vorliegt, kann Somatostatin gezielt durch partielle Reduktion der Disulfidbrücke und anschließender Interkalation modifiziert werden. Die Abtrennung des unmodifizierten Peptids gelingt aufgrund der veränderten Geometrie des Somatostatins im reduzierten Zustand leicht mittels HPLC. Es wird ein hochrein vorliegender Makroinitiator erhalten, welcher das Wachstum genau einer Polymerkette startet. Idealerweise lässt sich die Molekulargewichtsverteilung der Polymere bei lebend radikalischen Polymerisationen durch das Verhältnis aus Initiator und Monomer mit guter Voraussagbarkeit beeinflussen und es werden Polymere mit niedrigen Werten für PD erhalten. Dies ermöglicht die Darstellung genau definierter Polymer-Peptid-Hybridarchitekturen.

Für die Synthese des Makroinitiatorpeptids 6-3 wird Somatostatinacetat in PB 50 mM, pH 7,8 vorgelegt, mit zwei Äquivalenten TCEP und Acetonitril sowie in Acetonitril gelöstem ATRP-Bissulfon 5-8 versetzt, letzteres muss im letzten Schritt zugegeben werden, um zu verhindern, dass der Linker ausfällt. Nach der Reaktion, die über drei Tage bei Raumtemperatur durchgeführt wird, wird das Acetonitril vorsichtig im Vakuum abdestilliert. Der gefriergetrocknete Feststoff wird in entionisiertem Wasser suspendiert, die Mischung zentrifugiert und der Überstand entfernt und analysiert.

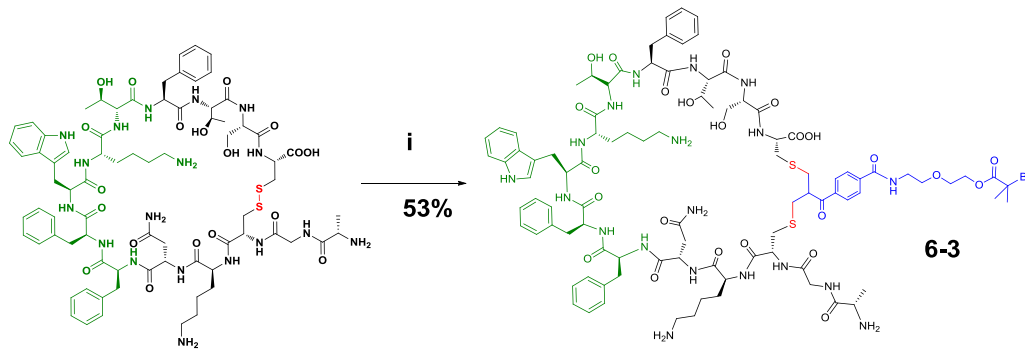


Abb V-18 Synthese von ATRP-Somatostatin 6-3, i: ATRP-Bissulfon 5-8 (2 eq), TCEP (2 eq), MeCN/PB 50 mM, pH 7,8 (3:2), RT, 72h.

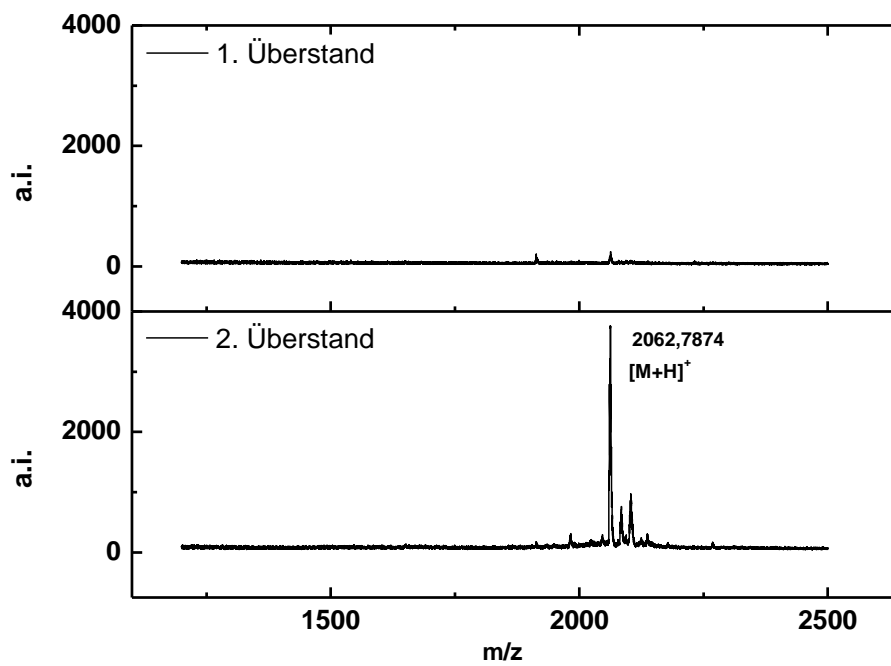


Abb V-19 MALDI-ToF Massenspektren der Lösungen oben: Analyse des Überstandes nach dem ersten Waschen, unten: Analyse des Überstandes nach dem zweiten Waschen, enthält ATRP-Somatostatin 6-3, zu sehen sind auch die Peaks der Na⁺- und K⁺-Addukte

Es zeigte sich, dass dieser kaum Produkt sondern hauptsächlich Salz und Nebenprodukte enthielt. Dieses Nebenprodukt konnte mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie nicht detektiert werden, es ist jedoch UV-aktiv und absorbiert bei 280 nm.

Vermutlich handelt es sich dabei um Aggregate von nativem Somatostatin, welche durch nicht-kovalente Wechselwirkungen oder auch Oxidation gebildet werden. Die Aggregatbildung wurde auch bei der Synthese von Ethinyl- und Iodsomatostatin 4-1 und 4-2 beobachtet. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich in all diesen Fällen für die moderaten Ausbeuten verantwortlich, welche im Bereich um die 50% liegen. Ob und in welchem Maße sich Aggregate bilden, hängt von der Somatostatinkonzentration in der Reaktionslösung und der Reaktionsdauer ab. Je höher die Konzentration und je länger die Reaktionszeit, desto stärker wird die Bildung von Aggregaten beobachtet.

Der Rückstand wird erneut mit entionisiertem Wasser versetzt und der Überstand nach Zentrifugieren der Suspension erneut analysiert.

Dabei stellte sich heraus, dass der Makroinitiator 6-3 bei geringerer Ionenstärke der resultierenden Lösung eine wesentlich höhere Löslichkeit in Wasser besitzt. Nach Aufreinigung durch präparative RPC mittels Äkta konnten 44 mg (53,4%) des Makroinitiatorpeptids isoliert werden.

Da die Konzentration des Initiators die Reaktionsgeschwindigkeit entscheidend beeinflusst, läuft die Polymerisation (vgl. Kinetikgleichung ATRP, Kapitel V-1) bei zu geringer Konzentration des Initiators zu langsam oder gar nicht ab. Dies stellt eine nicht zu unterschätzende Herausforderung bei *grafting from* Ansätzen mit Biomakromolekülinitiatoren dar. Bei der Polymerisation von HEMA ausgehend von ATRP-Somatostatin 6-3 wurde ein Verhältnis von 1 : 4,8 : 9,6 : 1511 (Initiator : CuBr : 2,2'-Bipyridin : Monomer) eingesetzt, die Monomerkonzentration betrug 8,3 M, die Initiatorkonzentration 5,5 mM. Wurde die Reaktion unter identischen Bedingungen bei einer Initiatorkonzentration von 2,8 mM durchgeführt, lief die Polymerisation nicht ab. Heredia et al. berichteten hingegen von einer ATRP ausgehend von einem BSA-Makroinitiator, dessen Konzentration in der Lösung 1,6 mM betrug^[17].

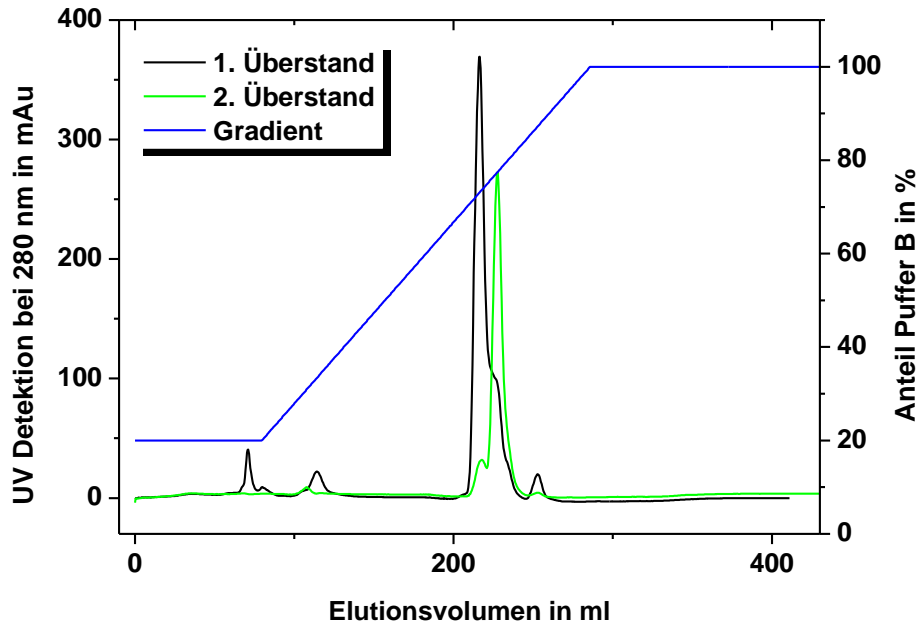


Abb V-20 Elugramme der Äkta-RPC schwarz: Aufreinigung des 1. Überstands, grün: Aufreinigung des 2. Überstands blau: Lösungsmittelgradient, Anteil an Puffer B in %

Es muss eine also eine ausreichende Menge an Initiator zur Verfügung stehen, dies ist vor allem dann schwierig, wenn Biomakromoleküle funktionalisiert werden sollen, die durch genetische Expression durch Mikroorganismen in maximal nanomolaren Mengen gewonnen werden können. Heredia et al. verwendeten in ihren Ansätzen eine Art Opferinitiator, welcher an ein Harz gebunden wurde, dadurch ließ sich die Gesamtkonzentration an Initiator erhöhen und es wurden geringere Mengen an BSA-Makroinitiator benötigt^[17]. Im Fall des ATRP-Somatostatin 6-3 stand für biologische Verhältnisse eine vergleichsweise große Menge an Initiator zur Verfügung. Trotzdem musste die Polymerisation in sehr kleinen Reaktionsvolumina mit sehr hoher Monomerkonzentration durchgeführt werden (s. IX Experimenteller Teil).

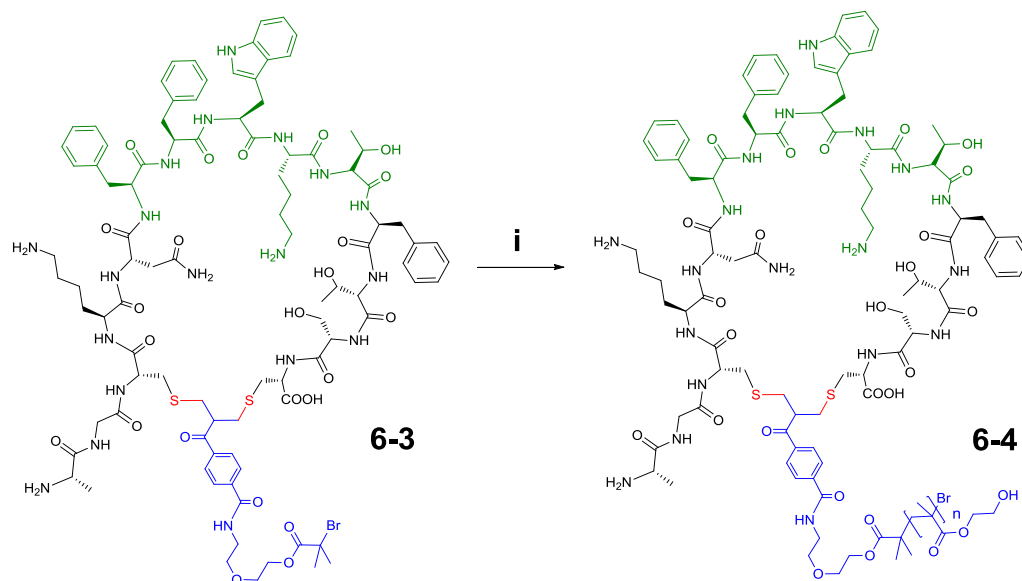


Abb V-21 *Grafting from* ATRP Somatostatin i: HEMA (1511 eq), CuBr (4,8 eq), 2,2'-Bipyridin (9,6 eq), MeOH, RT, 18h

ATRP-Somatostatin 6-3 und Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) wurden in entgastem Methanol vorgelegt und im eingefrorenen Zustand dreimal evakuiert, bevor ein Aliquot einer Katalysatorstocklösung im Argongegenstrom zugegeben wurde (Abb V-21). Die Polymerisation wurde über Nacht durchgeführt, durch Entfernen der Inertgasatmosphäre abgebrochen und durch zweimaliges Eintropfen in Diethylether gereinigt. Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigte nach der Aufreinigung kein freies HEMA mehr, allerdings konnten die Signale des Peptidinitiators nicht eindeutig zugeordnet werden.

Um zu zeigen, dass die Polymerisation vom Peptid ausgehend erfolgreich war, wurde daher eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb V-22). Durch Anfärbung mit Coomassieblau werden nur Peptid-Komponenten sichtbar. Im Gelbild wird deutlich, dass die Initiatoreffizienz nicht bei 100% lag, sondern dass vielmehr die Polymerisation von einem Teil der Makroinitiatormoleküle nicht gestartet werden konnte. Allerdings

muss dabei berücksichtigt werden, dass die Bandenintensität des Initiators aufgrund der großen Breite der Peptid-Polymerbande irreführend gering wirkt.

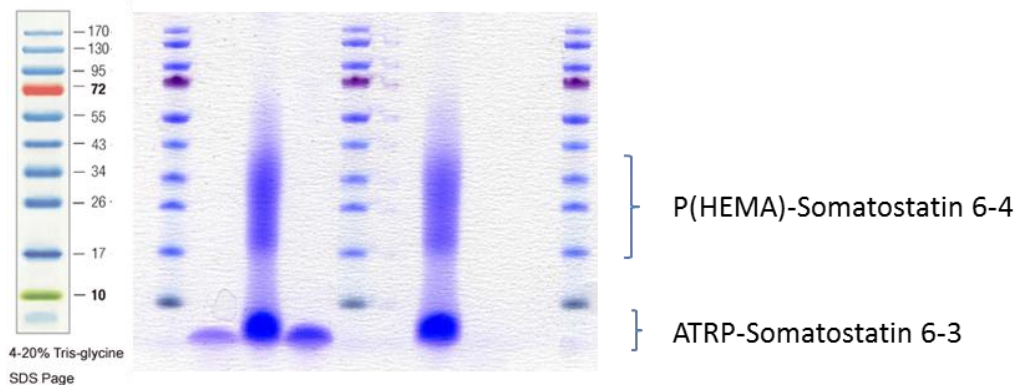


Abb V-22 SDS-PAGE-Bilder nach Anfärbung mit Coomassieblau, Spur 1, 5, und 10: prestained protein ladder; Spur 2 und 4: ATRP-Somatostatin 6-3; Spur 3 und 7: HEMA-Somatostatin 6-4 (Auftragung der Reaktionslösung)

Die Molekulargewichtsverteilung des erhaltenen Polymer-Peptid-Konjugates wurde darüber hinaus mittels GPC unter Verwendung eines PMMA-Standards bestimmt ($M_n = 14966$ g/mol, $M_w = 27875$ g/mol, PDI = 1,86). Eine Bestimmung des theoretischen Molekulargewichts $M_{n,th}$ konnte nicht durch Integration der entsprechenden NMR-Signale bestimmt werden, da die Initiatorsignale des Peptids nicht eindeutig zugeordnet werden konnten bzw. mit den Polymersignalen überlappen. Die Verteilung des Molekulargewichts ist monomodal, jedoch relativ breit mit einer Verschiebung zu kleineren Molekulargewichten. Diese Beobachtungen lassen sich mit Ergebnissen der Polymerisation von PMMA-BI 5-6 (vgl. Kapitel V-I, Initiatoren für die lebende radikalische Polymerisation) vergleichen. Es wurde beobachtet, dass sich gegen Ende der Polymerisation die Viskosität der Reaktionen erhöhte, was wiederum eine Erhöhung der lokalen Konzentration an Radikalen bedingte und zu Abbruchreaktionen durch Rekombination führte.

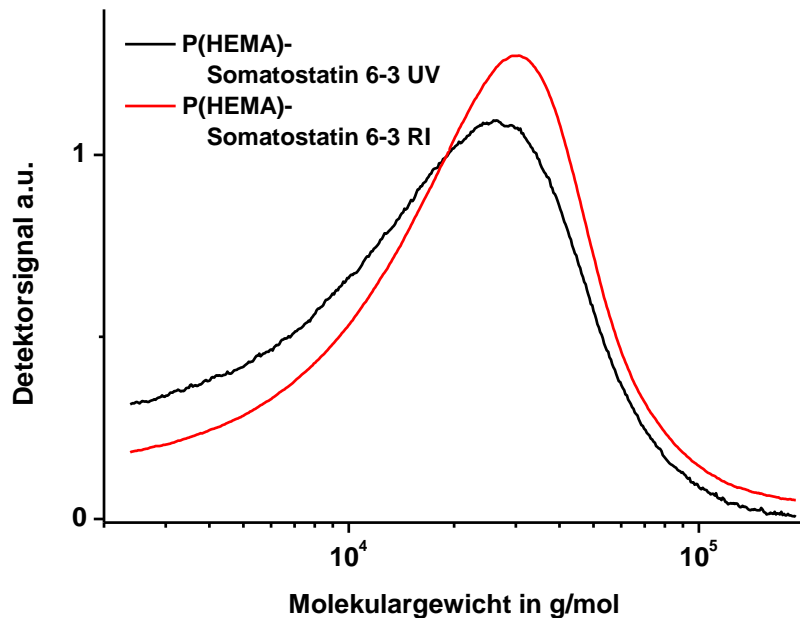


Abb V-23 GPC-Elugramme von HEMA-Somatostatin 6-4, Detektion durch Bestimmung des Brechungsindex (rot) bzw. durch Messung der UV-Absorption (schwarz)

Dies erklärt jedoch nicht, warum sich die Verteilung zu kleineren Molekulargewichten hin verbreitert, was ein Indiz dafür ist, dass viele Abbruchreaktionen zu Anfang der Polymerisation stattfanden.

Die lebende radikalische Polymerisation von PHEMA zur Synthese von Biohybridkonjugaten ist bekannt, allerdings handelte es sich dabei um Polymerisationen ausgehend von bioreaktiven Initiatoren, d.h. die entsprechenden Polymere wurden erst anschließend mit dem Biomakromolekül verknüpft^[19]. Die erhaltenen Molekulargewichtsverteilungen liegen im Rahmen von 1,2 – 1,24, die Zahlenmittel des Molekulargewichtes bei $M_n = 3090 - 11840$ und die mittleren Polymerisationsgrade bei $P_n = 24 - 91$. Bei grafting from Ansätzen wurden bislang hauptsächlich Styrol, NIPAM und OEGMA als Monomere eingesetzt, hier liegen die Molekulargewichtsverteilungen mit 1,4 - 1,7 durchschnittlich höher, allerdings

wurden diese in vielen Publikationen gar nicht bestimmt bzw. angegeben^[20].. Dadurch gelang es auch, die Werte für die PD zu senken, ohne Opferinitiator wurde ein Wert von 1,5 ($M_n = 55400$), mit Opferinitiator ein Wert von 1,34 ($M_n = 11300$) erhalten.

Ein Nachteil von radikalischen Polymerisationstechniken besteht darin, dass keine Polymere mit Heteroatomen im Polymerrückgrat dargestellt werden können. Es gibt jedoch PEG-analoge Polymere auf Methacrylatbasis wie Poly(tetra(ethylenglykol)methylethermethacrylat) PTEGMA, die ähnlich wie PEG eine gute Wasserlöslichkeit aufweisen und biokompatibel sind. Da die renale Clearance durch die Größe des Konjugats beeinflusst wird, führt auch in diesem Fall der Gewinn an hydrodynamischem Volumen dazu, dass solche Biohybridmaterialien langsamer ausgeschieden werden.

Gao et al. konnten kürzlich zeigen, dass Poly(oligo(ethylenoxid)methylmethacrylat) POEGMA die pharmakokinetischen Eigenschaften von Myoglobin und GFP entscheidend verbessern^[21]. Im Falle des Myoglobin wurde dazu N-terminal eine Transaminierung gefolgt von einer chemoselektiven Aldehyd-Hydroxylamin-Reaktion durchgeführt, die dazu diente, einen ATRP Initiator am N-Terminus einzuführen und von einem in-situ Wachstum von POEGMA gefolgt wurde^[21a]. Im Falle des GFP wurde ein entsprechender Initiator am C-Terminus intein-vermittelt eingeführt^[21b]. Es konnte gezeigt werden, dass POEGMA-GFP wesentlich länger im Blutplasma nachgewiesen werden konnte als unmodifiziertes GFP. Der EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*) ist eine Folge der erhöhten Durchlässigkeit der Blutgefäße sowie des Mangels eines voll funktionsfähigen Lymphsystems in festen Tumorgeweben und der Grund dafür, dass sich Makromoleküle über einen Zeitraum von 24-48 h bevorzugt in diesen Geweben anreichern^[22]. Im Fall des POEGMA-GFP konnte eine 50fach erhöhte Anreicherung im Vergleich zu normalen GFP im Tumorgewebe beobachtet werden.

ATRP-Somatostatin 6-3 sowie TEGMA wurden in entgastem Anisol gelöst und es wurde weitere 30 Minuten lang Argon durch die Lösung geleitet. PMDETA und CuBr wurden im Argongegenstrom zugegeben, und die Reaktionslösung eingefroren evakuiert.

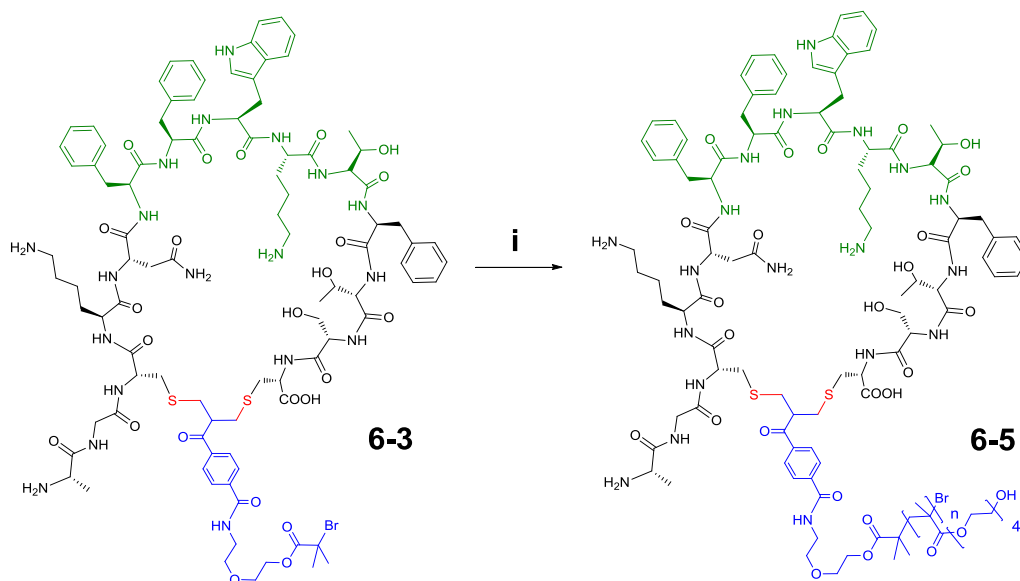


Abb V-24 *Grafting from* ATRP Somatostatin i: TEGMA (500 eq), CuBr (10 eq), PMDETA (10 eq), Anisol/MeOH, RT, 18h

Da sich ATRP-Somatostatin schlecht in Anisol löste, wurde die Lösung mit etwas entgastem Methanol im Argongegenstrom versetzt. Die Polymerisationsreaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Konjugat durch mehrmaliges Präzipitieren in Hexan gereinigt. Das Produkt konnte anschließend nicht mehr in DCM gelöst werden und ließ sich nur sehr schwer in Wasser in Lösung bringen. Ein Teil des Überstandes wurde über PD-10 Säulen über Größenausschluss chromatographisch gereinigt und die entsprechenden Fraktionen gefriergetrocknet. Es wurde ein farbloses Öl erhalten, welches mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und SDS-PAGE analysiert wurde. Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt die für PTEGMA typischen Signale, allerdings können wie auch bei PHEMA-Somatostatin 6-4 die Peptidsignale nicht eindeutig zugeordnet und das theoretische Zahlenmittel des Molekulargewichts $M_{n,th}$ somit nicht ermittelt werden. Die Ausbeute und sowie die Molekulargewichtsverteilung mittels GPC ließen sich nicht bestimmen, da sich

P(TEGMA)-Somatostatin 6-5, wie bereits erwähnt, nach dem Zentrifugieren nicht mehr in Lösung bringen ließ und somit nicht weiter aufgereinigt werden konnte.

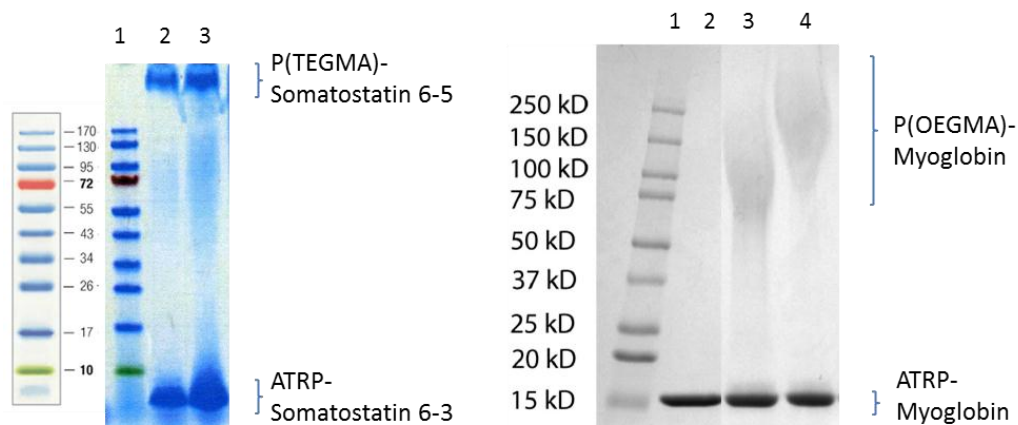


Abb V-25 SDS-PAGE-Bilder nach Anfärbung mit Coomassieblau links: Spur 1: prestained protein ladder; Spur 2: PTEGMA-Somatostatin nach Aufreinigung; Spur 3: PTEGMA-Somatostatin (Reaktionslösung); rechts^[21a]: Spur 1: prestained protein ladder; Spur 2: ATRP-Myoglobin; Spur 3 und 4: POEGMA-Myoglobin nach verschiedenen Reaktionszeiten

In Abb V-25 sind die Bilder der SDS-PAGE-Gele nach Anfärbung mit Coomassieblau zu sehen. Im Gegensatz zu PHEMA-Somatostatin 6-4 (vgl. Abb V-23) zeigt PTEGMA-Somatostatin 6-5 ein schlechtes Laufverhalten und verbleibt in der Nähe der Auftragetasche. Dies scheint jedoch für diese Polymerklasse typisch zu sein, da für die Myoglobin bzw. GFP-Konjugate ähnliche Beobachtungen gemacht wurden^[21]. Zum Vergleich ist in Abb V-25 das SDS-PAGE-Gelbild der POEGMA-Myoglobin-Konjugate abgebildet^[21a]. Auch hier wird beobachtet, dass von einem Großteil der ATRP-Myoglobin-Biomakromoleküle keine Polymerisation gestartet werden konnte. In diesem Fall ist das Intensitätenverhältnis zwischen Initiator und Polymer-Konjugatbande geringer als im Fall des PTEGMA-Somatostatins, dies zeigt, dass die Initiatoreffizienz des ATRP-Somatostatins 6-3 vergleichsweise hoch ist.

Problematisch ist beim *grafting to* die Entfernung des zytotoxischen Kupfers, das aufgrund der Komplexbildung durch Polymer und Peptid nicht vollständig entfernt werden kann. Auch nach säulenchromatographischen Reinigungsschritten sind die erhaltenen Feststoffe immer noch leicht grünlich bzw. bläulich gefärbt. Chang et al. konnten zeigen, dass die Aufreinigungsmethode bei der Cytotoxizität von durch ATRP synthetisiertes P(EGMA) eine entscheidende Rolle spielt^[23]. Während das durch wiederholtes Ausfällen gereinigte Polymer zytotoxisch war, zeigte das durch Dialyse gegen Wasser aufgereinigte Polymer keine erhöhte Toxizität. Inwieweit sich diese Beobachtung auf Biokonjugate mit kupferkomplexierenden Eigenschaften übertragen lässt, ist bis jetzt nicht untersucht worden. In eigenen Experimenten wurde festgestellt, dass PHEMA-Somatostatin 6-4 auch der mehrtägigen Dialyse gegen eine 4mM EDTA – Lösung noch grünlich gefärbt war. Dies wiederum wäre eine potentielle Fehlerquelle bei den Bestimmungen von Cytotoxizität bzw. Zellviabilität verschiedener rezeptorpositiver sowie negativer Zellen, da beiden Fällen sehr wahrscheinlich eine erhöhte Zellsterblichkeit beobachtet werden würde. Bei Untersuchungen zur Halbwertszeit bzw. zur Akkumulation in verschiedenen Gewebetypen fällt dieser Punkt weniger ins Gewicht.

Literatur

- [1] S. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J.-W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241-2252.
- [2] A. Lewis, Y. Tang, S. Brocchini, J.-w. Choi, A. Godwin, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2144-2155.
- [3] K. Velonia, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 4224.
- [4] K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 473-480.
- [5] K. J. Wieder, N. C. Palczuk, T. Vanes, F. F. Davis, *Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254*, 2579-2587.
- [6] aA. Kozlowski, S. A. Charles, J. M. Harris, *Biodrugs* **2001**, *15*, 419-429; bN. V. Katre, *Advanced drug delivery reviews* **1993**, *10*, 91-114.
- [7] A. Kozlowski, J. M. Harris, *J. Control. Release* **2001**, *72*, 217-224.
- [8] M. L. Nucci, R. Shorr, A. Abuchowski, *Advanced drug delivery reviews* **1991**, *6*, 133-151.
- [9] J. M. Harris, N. E. Martin, M. Modi, *Clinical Pharmacokinetics* **2001**, *40*, 539-551.
- [10] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Advanced drug delivery reviews* **2002**, *54*, 459-476.
- [11] H. Lee, I. H. Jang, S. H. Ryu, T. G. Park, *Pharm Res* **2003**, *20*, 818-825.
- [12] R. J. Goodson, N. V. Katre, *Bio-Technology* **1990**, *8*, 343-346.
- [13] N. Yamasaki, A. Matsuo, H. Isobe, *Agricultural and Biological Chemistry* **1988**, *52*, 2125-2127.

- [14] W. v. Grondelle, C. L. Iglesias, E. Coll, F. Artzner, M. Paternostre, F. Lacombe, M. Cardus, G. Martinez, M. Montes, R. Cherif-Cheikh, C. Valéry, *Journal of Structural Biology* **2007**, *160*, 211-223.
- [15] M. Motomatsu, H.-Y. Nie, W. Mizutani, H. Tokumoto, *Polymer* **1996**, *37*, 183-185.
- [16] A. J. Dirks, S. S. van Berkel, N. S. Hatzakis, J. A. Opsteen, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, A. E. Rowan, J. C. M. van Hest, F. P. J. T. Rutjes, R. J. M. Nolte, *Chem. Commun.* **2005**, 4172-4174.
- [17] K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16955-16960.
- [18] T. Peters, Jr., *Adv Protein Chem* **1985**, *37*, 161-245.
- [19] aD. Bontempo, K. L. Heredia, B. A. Fish, H. D. Maynard, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15372-15373; bK. L. Heredia, Z. P. Tolstyka, H. D. Maynard, *Macromolecules* **2007**, *40*, 4772-4779.
- [20] K. L. Heredia, H. D. Maynard, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 45-53.
- [21] aW. P. Gao, W. G. Liu, J. A. Mackay, M. R. Zalutsky, E. J. Toone, A. Chilkoti, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 15231-15236; bW. P. Gao, W. G. Liu, T. Christensen, M. R. Zalutsky, A. Chilkoti, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 16432-16437.
- [22] aM. R. Dreher, W. Liu, C. R. Michelich, M. W. Dewhirst, F. Yuan, A. Chilkoti, *J Natl Cancer Inst* **2006**, *98*, 335-344; bH. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J Control Release* **2000**, *65*, 271-284.
- [23] C.-W. Chang, E. Bays, L. Tao, S. N. S. Alconcel, H. D. Maynard, *Chemical Communications* **2009**, 3580-3582.

VI Somatostatin-Dendrimere

Multivalente Linkersysteme

Die Synthese von dendritischen Peptidarchitekturen stellt eine nicht zu unterschätzende Herausforderung dar. Interessant ist hier vor allem der Einfluss der Mehrfachfunktionalisierung auf die Bindungsaffinität des Konstrukts im Vergleich zu einfach funktionalisierten Molekülen. Das Prinzip der Multivalenz basiert auf der Wechselwirkung der Liganden mit mehreren identischen Bindungsstellen an eine mehrfach präsentierte Akzeptoreinheit^[1]. Multivalente Liganden können, wenn sie im richtigen Abstand auf definierten Gerüsten präsentiert werden, eine überproportionale Verstärkung an einem entsprechenden Akzeptor hervorrufen. Zur Darstellung solcher multivalenten Verbindungen wird eine Reaktion benötigt, die mit ausreichender Geschwindigkeit und hoher Selektivität sowie Effizienz verläuft.

Wie bereits gezeigt wurde, verläuft die Interkalation in Disulfidbrücken bei Somatostatin schnell und in guten Ausbeuten. Es wurde daher ein Tetrasulfonlinker 6-2 entworfen und synthetisiert, dessen Struktur und Syntheseroute in Abb VI-1 präsentiert wird.

Carboxybissulfon 4-9 wurde dazu mit Thionylchlorid zum Säurechlorid 6-1 nach Literaturvorschrift umgesetzt und direkt in trockenem THF mit p-Aminoanilin in zweifachem Überschuss vier Tage bei Raumtemperatur umgesetzt^[2]. Der Tetrasulfonlinker 6-2 fällt dabei aus der Reaktionslösung aus und wird abzentrifugiert. Der erhaltene Feststoff wird in Dichlormethan resuspendiert, zentrifugiert und besitzt nach dem Trocknen im Hochvakuum analytische Reinheit.

Zusätzlich wurden weitere Tetra- und Hexasulfonlinker 6-4 und 6-6 entworfen und synthetisiert. Wie gezeigt werden konnte, ist Iodbissulfid 3-3b in großen Mengen leicht zugänglich und kann in einer Sonogashira-Hagihara Kupplung mit sehr guten

Ausbeuten zu Acetylderivaten umgesetzt werden. Iodbissulfid 3-3b stellt daher einen idealen Baustein zur Darstellung multivalenter Linkersysteme dar.

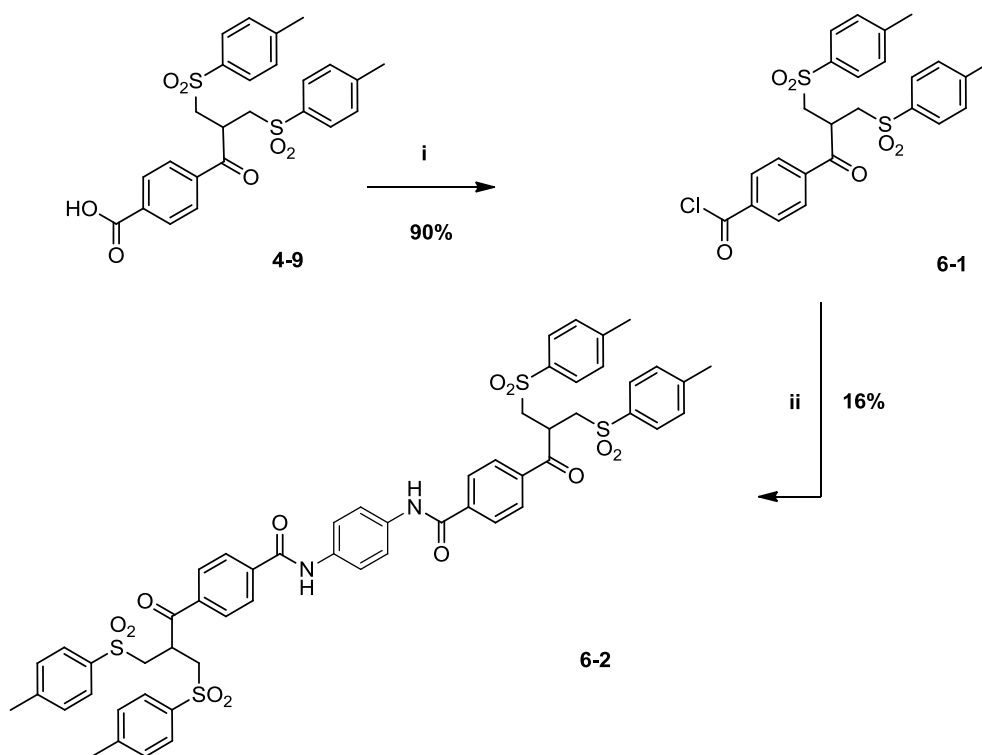


Abb VI-1 Synthese des Tetrasulfon 6-2. i: Thionylchlorid, RT, 18 h; ii: 1,4-Phenyldiamin (0,5 eq), Pyridin, THF, RT, 96 h.

Die Syntheseroute soll nun anhand des Tetrasulfonlinkers 6-4 exemplarisch erläutert werden und wurde analog für die Darstellung des Hexasulfons 6-6 verwendet. Nachdem Iodobissulfid 3-3b unter Argon in einer THF/Et₃N (4:1) Mischung gelöst worden war, wurde der PdCl₂(PPh₃)₂ Katalysator, Cu₂I₂ sowie 1,4-Diethynylbenzol zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Stunden wurde die Reaktionsmischung aufgearbeitet und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (4:1) als Eluens aufgereinigt. Das erhaltene Tetrasulfid 6-3 wurde in einer EtOAc/MeCN/H₂O (10:6:1) Mischung

gelöst und mit vier Äquivalenten Kaliumperoxomonosulfat versetzt. Nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion aufgearbeitet.

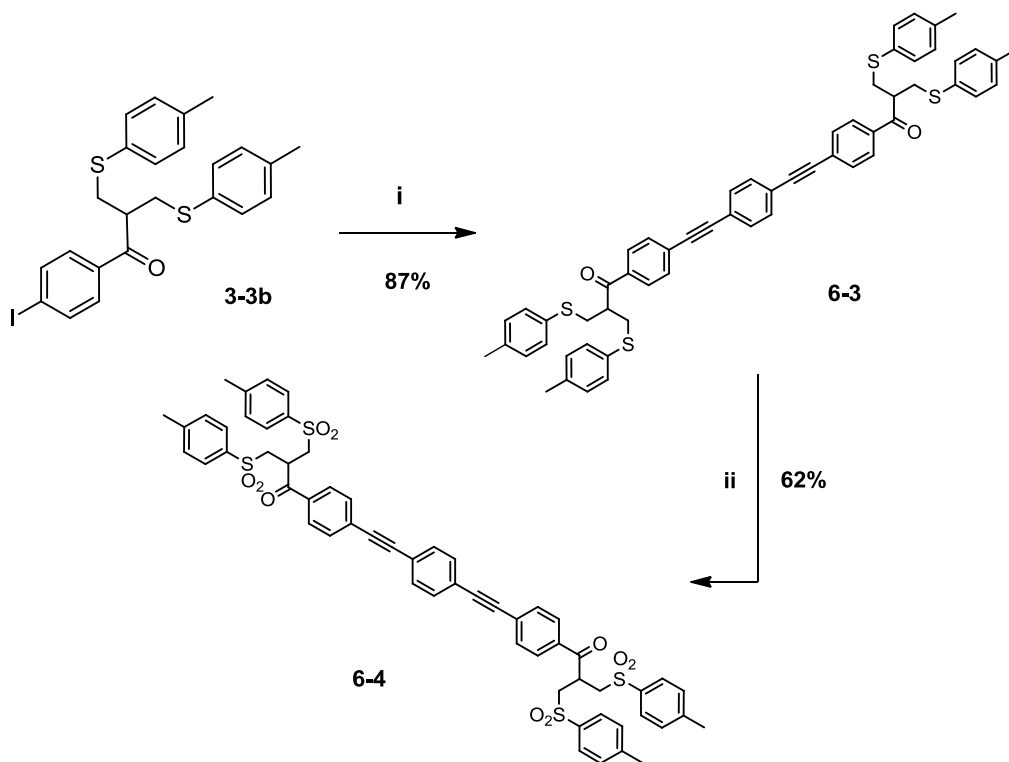


Abb VI-2 Darstellung von Tetrasulfon 6-4. i: 1,4 Diethynylbenzol (0,47 eq), Cu_2I_2 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, THF/ Et_3N , RT, 2h, Argonatmosphäre, ii: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), EtOAc/MeCN/ H_2O (10:6:1), RT, 18 h

Erhalten wurde ein farbloser Feststoff, welcher zu 10% das Trisulfon enthält. Dieses wird in der Gegenwart von Wasser als Lösungsmittel im Verlauf der Oxidationsreaktion generiert und lässt sich mittels präparativer HPLC vom Tetrasulfon trennen. Für die weitere Umsetzung zur Interkalation in die Disulfidbrücken ist die Abtrennung des Trisulfons jedoch nicht nötig, da die in-situ Eliminierung bei pH 7,8 zum Trisulfon bzw. Bissulfon eine notwendige Voraussetzung für die erfolgreiche Modifikation der Biomoleküle ist.

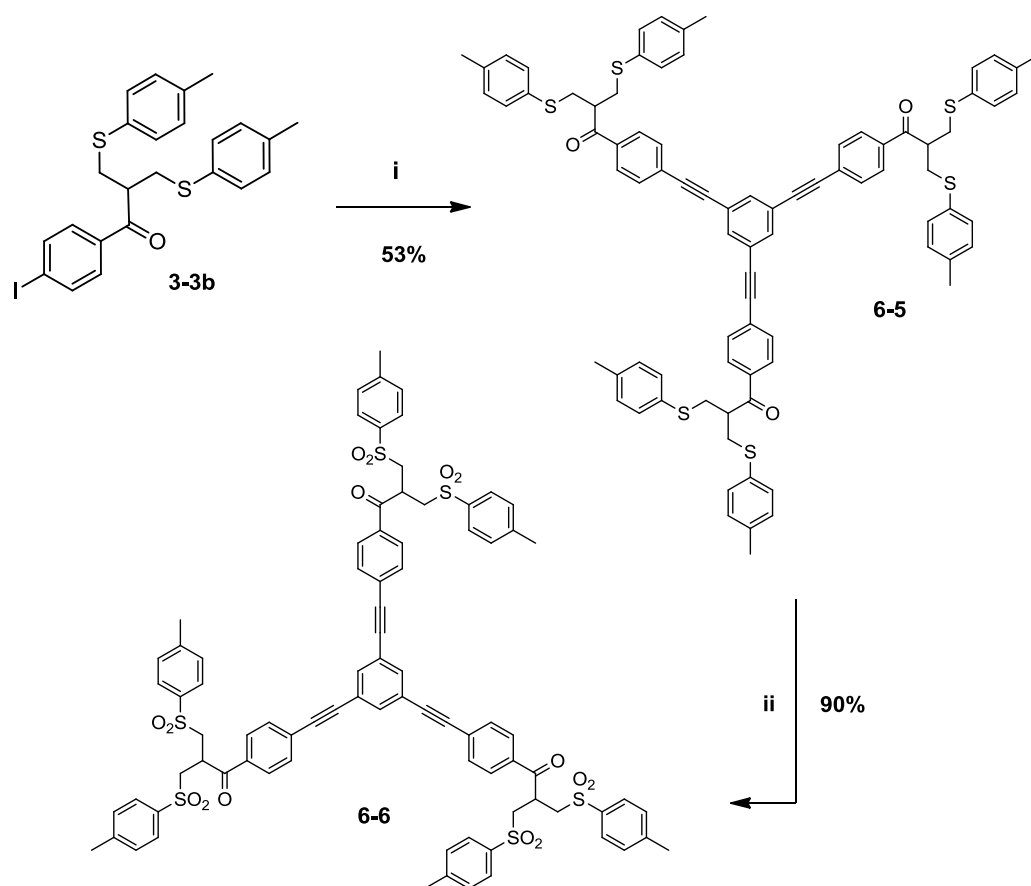


Abb VI-3 Darstellung von Hexasulfon 6-6 i: 1,3,5 Triethynylbenzol (0,32 eq), Cu_2I_2 , $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, THF/ Et_3N , RT, 2h, Argonatmosphäre, ii: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), EtOAc/MeCN/ H_2O (10:6:1), RT, 18 h

Die Synthese von Hexasulfon 6-6 wurde auf die gleiche Art und Weise bewerkstelligt wie die Synthese des Tetrasulfons 6-4. Als Kernbaustein wurde in diesem Fall 1,3,5 - Triethynylbenzols eingesetzt. Nach Oxidation mit Kaliumperoxomonosulfat wurde das Rohprodukt in 90 %iger Ausbeute erhalten; eine Mischung aus Hexa-, Penta- und Tetrasulfon. Leider weisen die erhaltenen Linker 6-4 und 6-6 eine geringe Löslichkeit in Wasser bzw. Wasser/MeCN-Gemischen auf.

Generell bietet die Funktionalisierung mittels Sonogashira-Hagihara-Kupplung unter Verwendung von Iodbisulfid 3-3b einen attraktiven Weg zu komplexen, multivalenten Linkerarchitekturen.

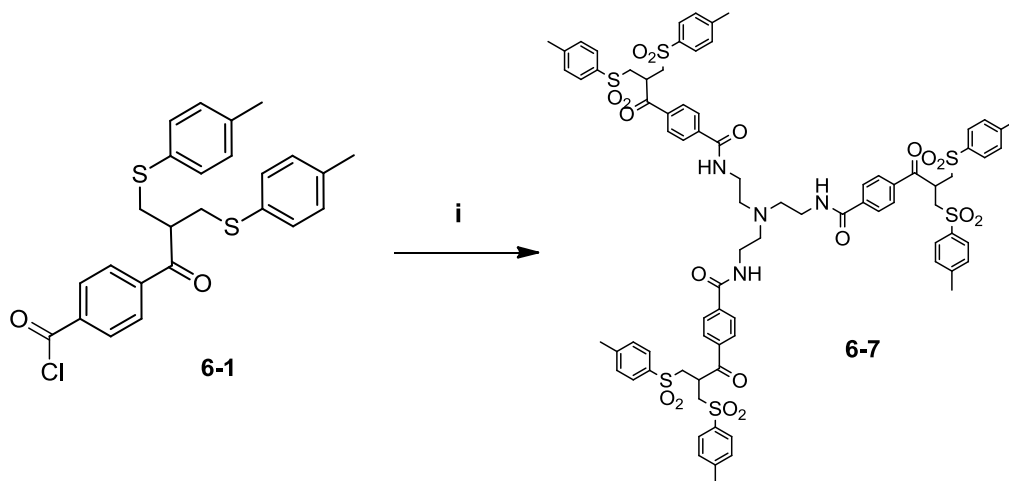


Abb VI-4 Darstellung von Hexasulfon 6-7. i: Tris-(2-Aminoethylamin) (0,35 eq), DCM/NaOH, RT, 96 h.

Denkbar wäre an dieser Stelle auch die Verwendung sulfonierter Polyphenylendrimere mit einer einzelnen Ethynylfunktion als Kernbaustein, um formstabile Dendrimer-Peptid-Hybride mit hoher Strukturperfektion zu erhalten.

Architekturen mit besserer Wasserlöslichkeit erhält man durch Einführung von Amidbindungen. Hexasulfon 6-7 wurde durch Amidkupplung des Säurechlorids 6-1 mit dem Kernbaustein Tris-(2-Aminoethylamin) synthetisiert (Abb VI-4). Säurechlorid 6-1 wurde dazu in DCM vorgelegt und mit einer Lösung von Tris-(2-Aminoethylamin) und 3 Äquivalenten NaOH in Wasser unter Eiskühlung versetzt. Nach 2 Tagen Rühren bei Raumtemperatur wurde ein Aliquot entnommen und mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert.

In der Reaktionslösung liegt hauptsächlich Hexasulfon 6-7 vor, nach Aufarbeitung jedoch erhält man ein Gemisch aus Hexa-, Penta und Tetrasulfon, dessen Abtrennung von überschüssigem Säurebissulfon säulenchromatographisch an Kieselgel schwer möglich ist (Abb VI-5).

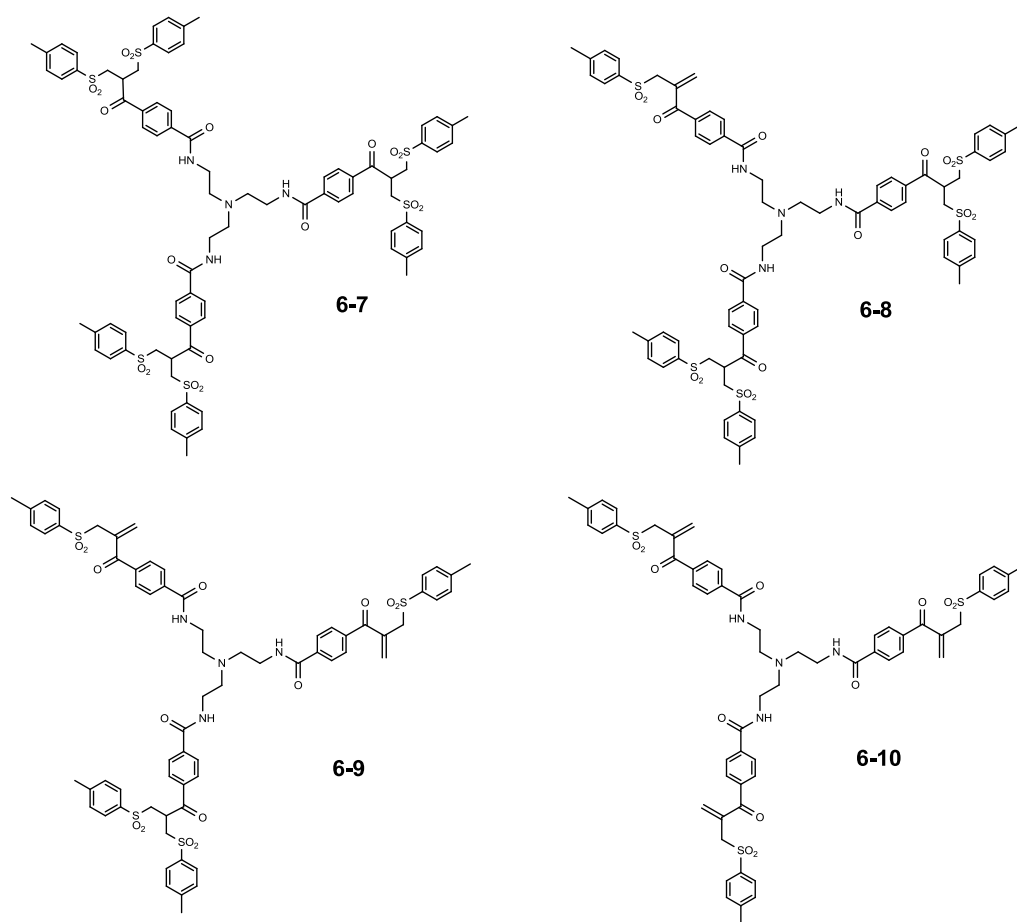


Abb VI-5 Verschiedene Spezies, die bei der Synthese des Hexasulfons aufgrund der Eliminierung von p-Toluensulfonsäure in wässriger Lösung auftreten

Für die genaue Charakterisierung wurde daher ein Aliquot entnommen und mittels RPC-HPLC aufgereinigt, dadurch ließen sich Penta-, Tetrasulfon und Trisulfon (6-8, 6-9 und 6-10) voneinander trennen und einzeln massenspektrometrisch (Abb VI-6) und im Falle des Tetrasulfons 6-9 auch mittels NMR Spektroskopie analysieren (Abb VI-7). Auch in diesem Fall ist es aufgrund der in-situ Eliminierung nicht nötig, die einzelnen Spezies zu isolieren, um diese als Kernbaustein für die Interkalation in die Disulfidbrücken zu nutzen. Die beste Wasserlöslichkeit besitzt das Hexasulfon 6-7,

wird das Trisulfon 6-10 verwendet, kann die Markierung bei niedrigerem pH-Wert und höheren Konzentrationen an organischem Lösungsmittel durchgeführt werden.

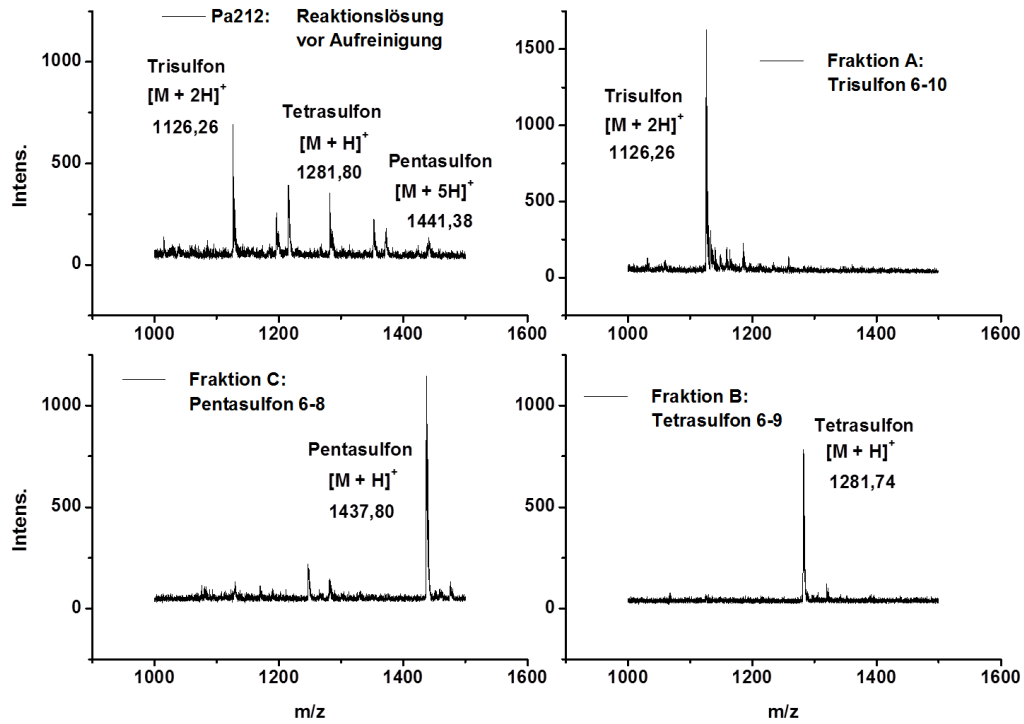


Abb VI-6 MALDI-ToF Massenspektren links oben: Reaktionslösung von Pa212, Mischung aus Penta-, Tetra- und Trisulfon (6-8, 6-9 und 6-10), rechts oben: Fraktion A: Trisulfon 6-10, links unten: Pentasulfon 6-8, rechts unten: Tetrasulfon 6-9

Die Umsetzung aller der in diesem Abschnitt vorgestellten multifunktionalen Bausteine mit Somatostatin zur Synthese von multivalenten Peptid-Dendrimer-Therapeutika ist Gegenstand des nächsten Abschnitts.

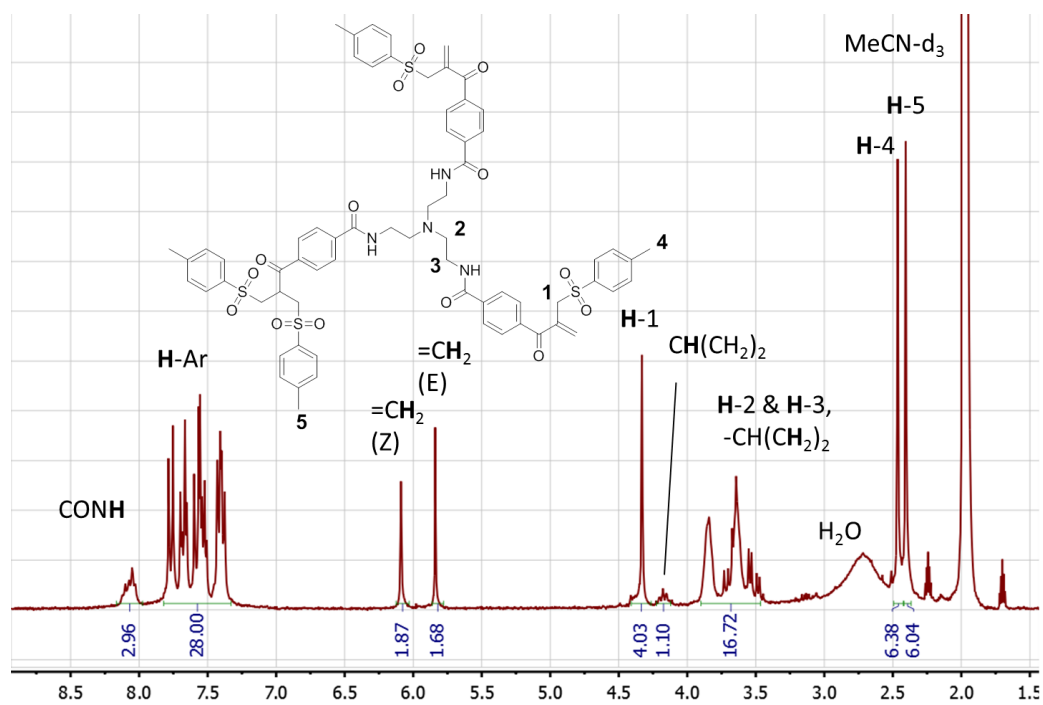


Abb VI-7 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Tetrasulfon 6-9 in MeCN-d_3 (250 MHz) mit Zuordnung der einzelnen Signale zu den entsprechenden Protonen

VI-1 Multivalente Somatostatinarchitekturen

Beobachtet man die Bindung von Antikörpern (Ak) an Antigene (Ag), so gibt es mehrere Möglichkeiten: Bindet eine Antikörperbindungsstelle an ein monovalentes Antigen, so beschreibt die Affinität die Kraft dieser einzelnen Bindung. Antikörper haben jedoch zwei Antigenbindungsstellen (Fab-Regionen), welche an Antigene, die in natürlichen Systemen meist multivalent vorliegen, binden können. In diesem Fall ist die Bindungsstärke um ein Vielfaches erhöht, da für die Loslösung des Ak von den Ag die gleichzeitige Spaltung aller Ak-Ag-Bindungen nötig wäre. Diese Kraft wird als Avidität bezeichnet. Interagieren somit mehrere Target- oder Erkennungseinheiten mit mehreren Rezeptoren, ist die relative Bindungsstärke nicht nur verdoppelt oder vervierfacht, sondern um den Faktor $10^3 - 10^7$ erhöht (Abb VI-8).

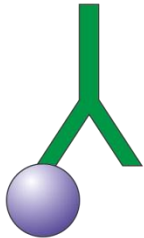
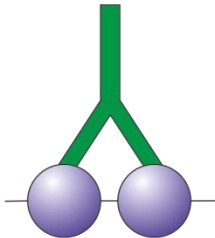
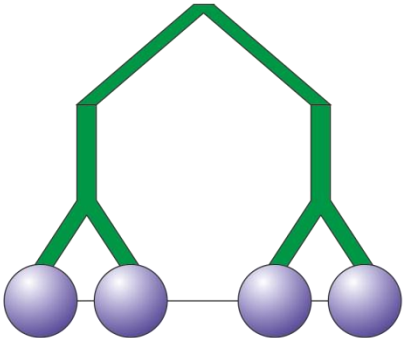
		
rel. Bindungsstärke 1	rel. Bindungsstärke 10^3	rel. Bindungsstärke 10^7
Affinität	Avidität	Avidität

Abb VI-8 Verschiedene Ak-Ag-Bindungsmöglichkeiten und ihre relative Bindungsstärken

In den letzten Jahren wurde daher intensiv untersucht, ob dieses Phänomen auch bei synthetischen multivalenten Substanzen erreicht wird, da sich dies für therapeutische Anwendungen als äußerst wertvoll erweisen könnte. Cheng et al. beschreiben die Synthese von RGD-Multimeren mit angeheftetem NIR-Dye und ihre Affinitäten gegenüber $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren (Abb VI-9)^[3]. Die IC-50-Werte vom Tetra- zum Monomer nehmen zu und auch das Verteilungsverhältnis zwischen Tumor und gesundem Gewebe ist nach Injektion des Tetramers erhöht.

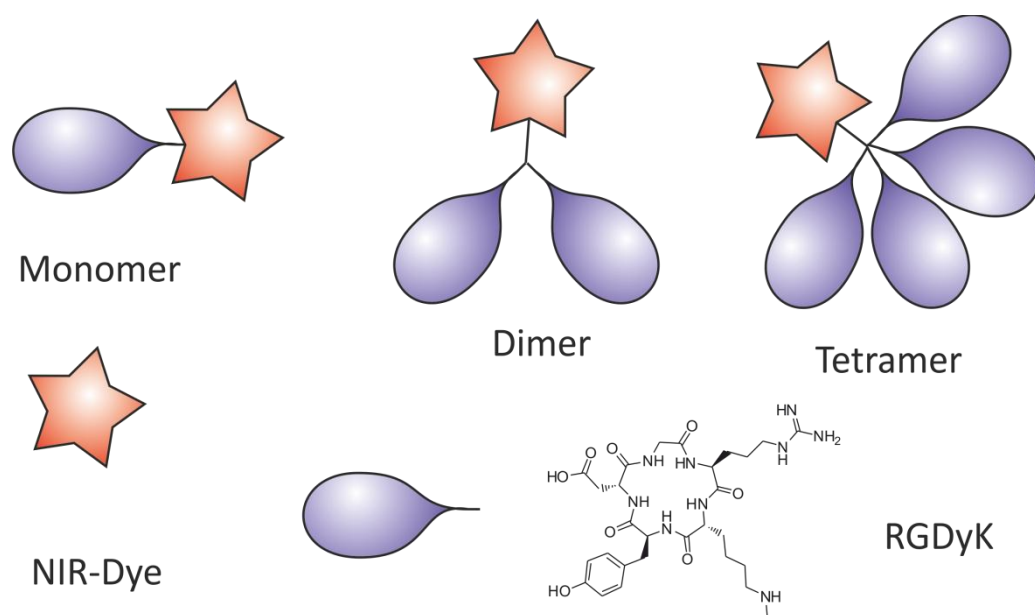


Abb VI-9 RGDyK-Multimere, mit einem NIR-Dye verknüpft^[3]

Für die Synthese von Somatostatindimeren wurden die Linker Tetrasulfon 6-4 und 6-2 eingesetzt (Abb VI-10). Somatostatinacetat wurde in PB 50 mM, pH 7,8 gelöst und diese Lösung wurde mit Acetonitril versetzt. Tetrasulfon 6-4 bzw. 6-2 wurden in Acetonitril gelöst und ebenfalls zur Somatostatinlösung gegeben. Nach 72 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wird die Reaktionslösung mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert.

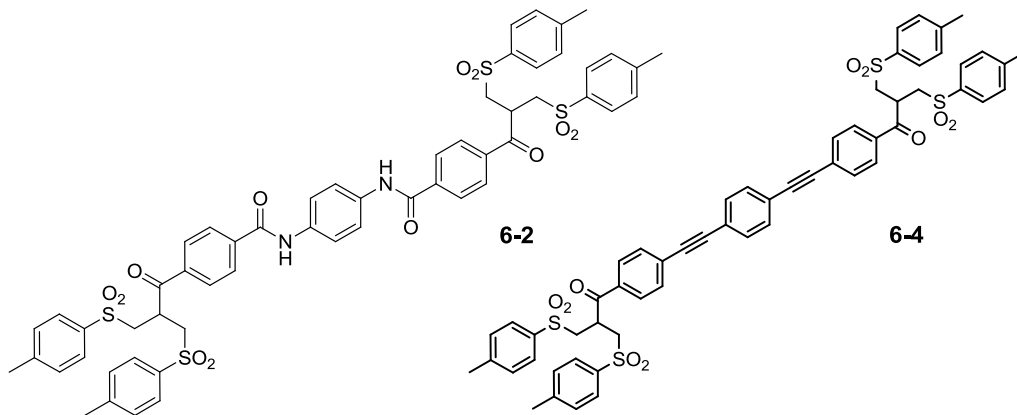


Abb VI-10 Strukturformeln der Tetrasulfone 6-2 sowie 6-4

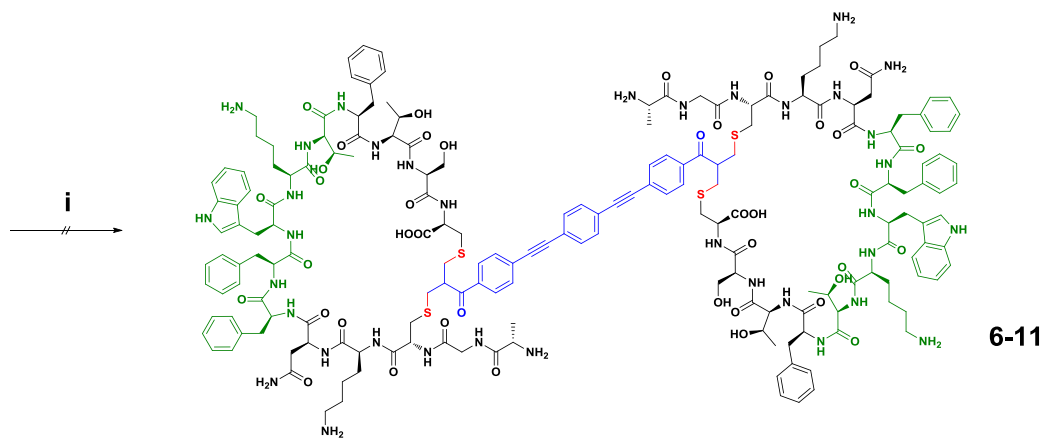


Abb VI-11 Angestrebte Synthese Somatostatindimer 6-11 durch Umsetzung mit Tetrasulfon 6-4 i: Tetrasulfon 6-4 (0,5 eq), TCEP (2 eq), MeCN/PB 50 mM, pH 7,8 (3:2), RT, 72h.

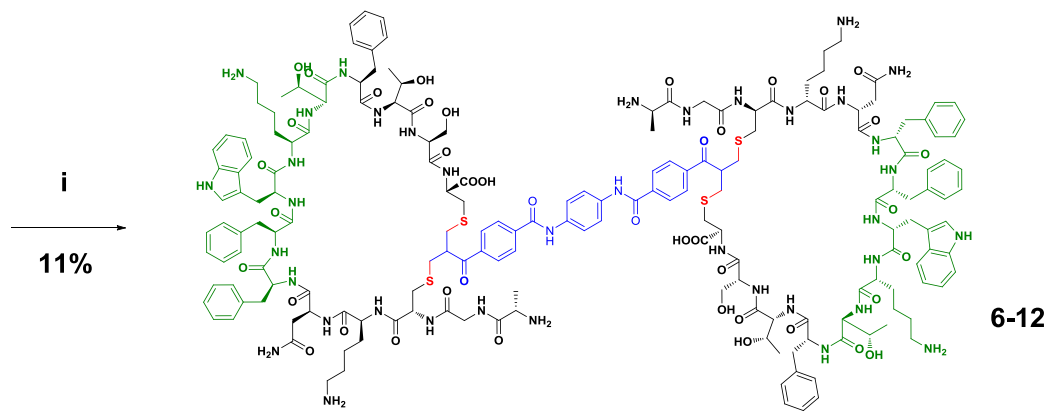


Abb VI-12 Synthese Somatostatindimer 6-12 durch Umsetzung mit Tetrasulfon 6-2 i: Tetrasulfon 6-2 (1,1 eq), TCEP (2 eq), MeCN/PB 50 mM, pH 7,8 (3:2), RT, 72h.

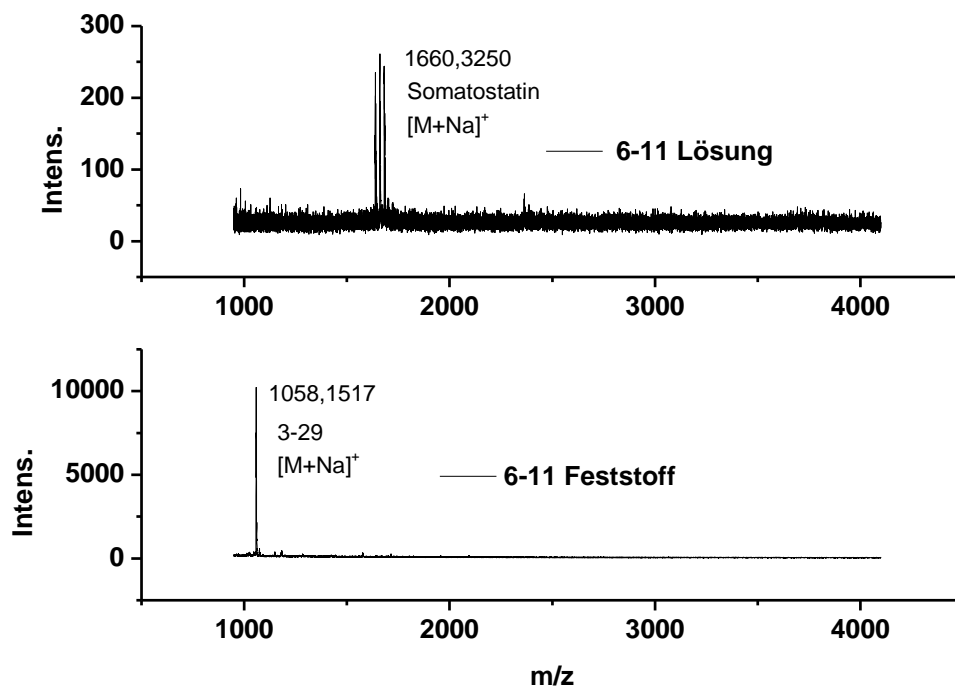


Abb VI-13 MALDI-ToF Massenspektren oben: Reaktionslösung von 6-11; unten: Zentrifugat 6-11

Wird Somatostatin mit Tetrasulfon 6-4 umgesetzt, fällt bereits nach kurzer Zeit ein Feststoff aus (Abb VI-11). In der Reaktionslösung (6-11 Lösung) konnte nur natives, reduziertes Somatostatin (1640 g/mol) gefunden werden. Bei dem Niederschlag (6-11 Feststoff), welcher nach Lösen in THF ebenfalls analysiert werden konnte, handelt es sich um Tetrasulfon 6-4 (Abb VI-10). Bei der Umsetzung von Somatostatin mit Tetrasulfon 6-2 hingegen wird erst nach 48 Stunden die Bildung eines Niederschlags beobachtet (Abb VI-12). Auch in diesem Fall werden Reaktionslösung und ausgefallener Feststoff getrennt voneinander massenspektrometrisch analysiert.

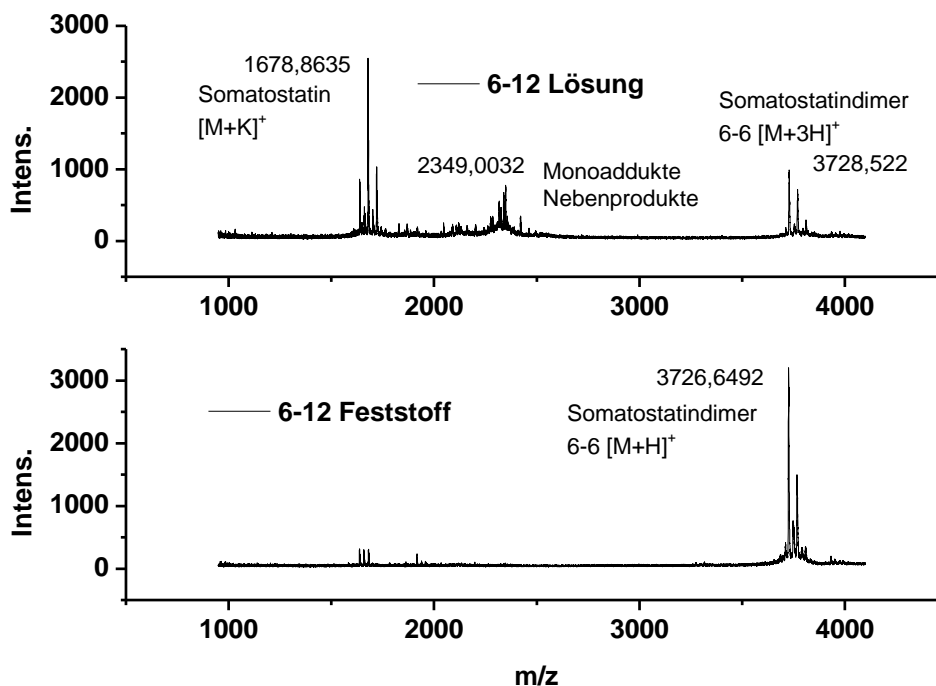


Abb VI-14 MALDI-ToF Massenspektren oben: Reaktionslösung von 6-12; unten: Zentrifugat 6-12

Während in der Lösung (6-12 Lösung) neben dem Somatostatindimer 6-12 auch natives Somatostatin sowie Nebenprodukte im Monoadduktbereich detektiert werden konnten, deren genaue Struktur nicht aufgeklärt werden konnte, handelt es sich bei dem Niederschlag (6-12 Feststoff) um reines Somatostatindimer 6-12.

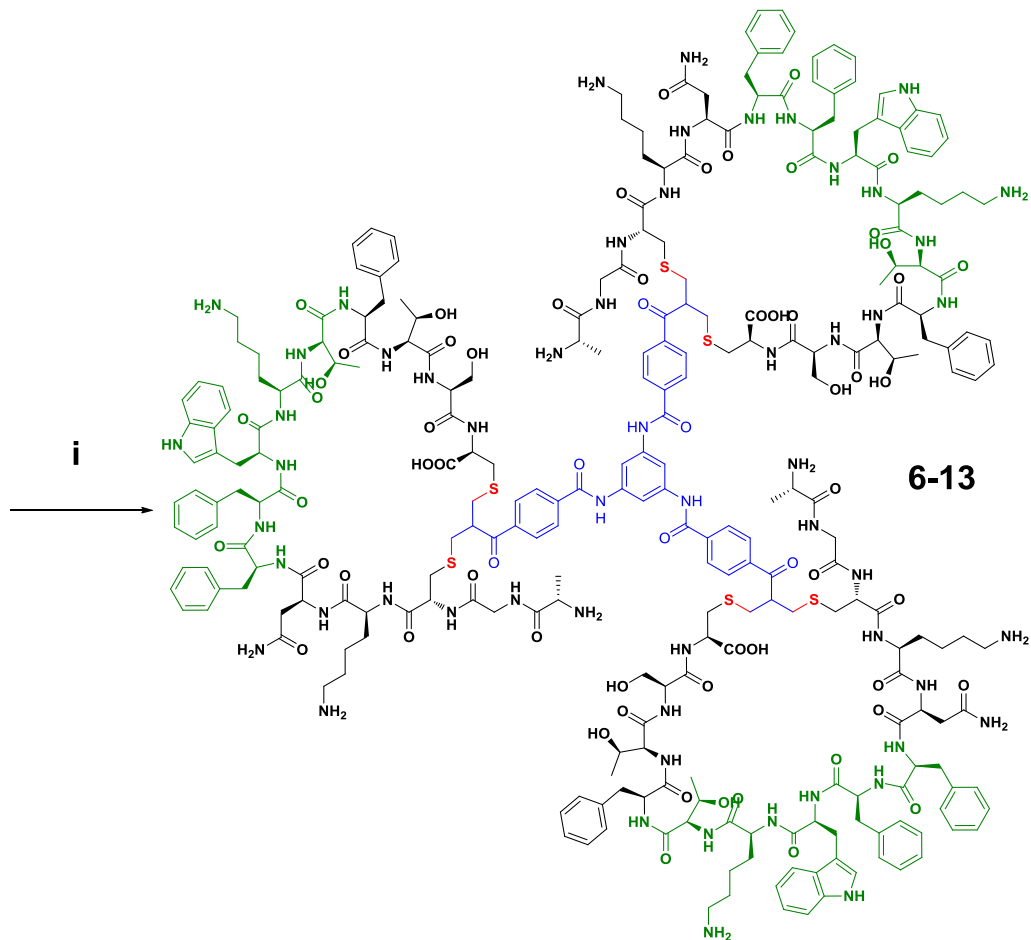


Abb VI-15 Synthese Somatostatintrimer 6-13 durch Umsetzung mit Tetrasulfon 6-4 i: Tetrasulfon 6-4 (0,33 eq), TCEP (2 eq), MeCN/PB 50 mM, pH 7,8 (3:2), RT, 72h

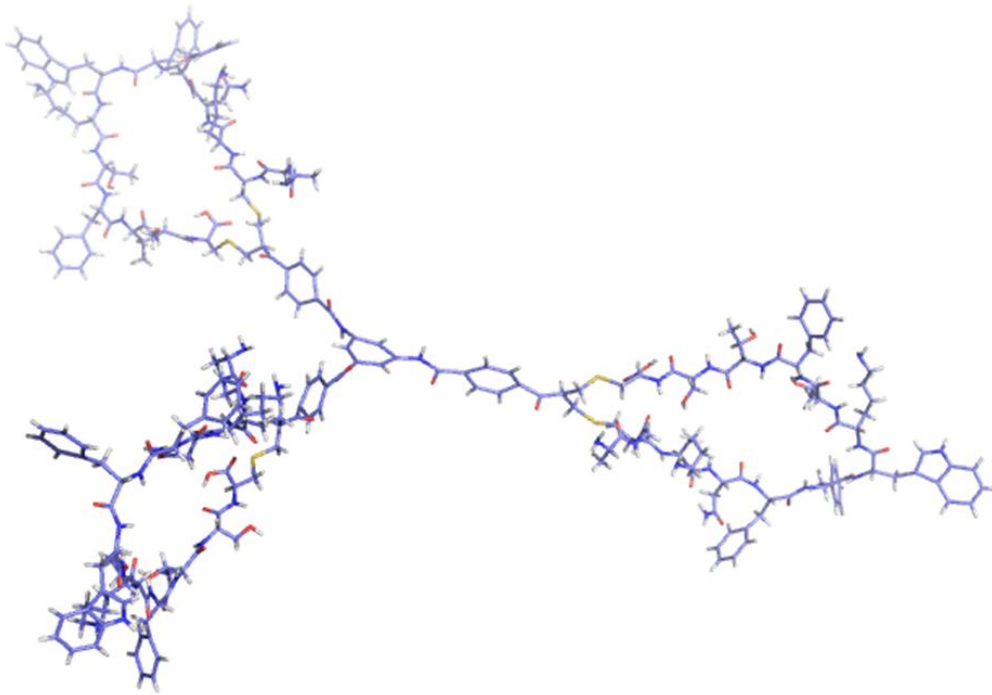


Abb VI-16 Geometrieoptimierte 3-D-Struktur von Somatostatin-Trimer 6-13 (Spartan'02 Paket)

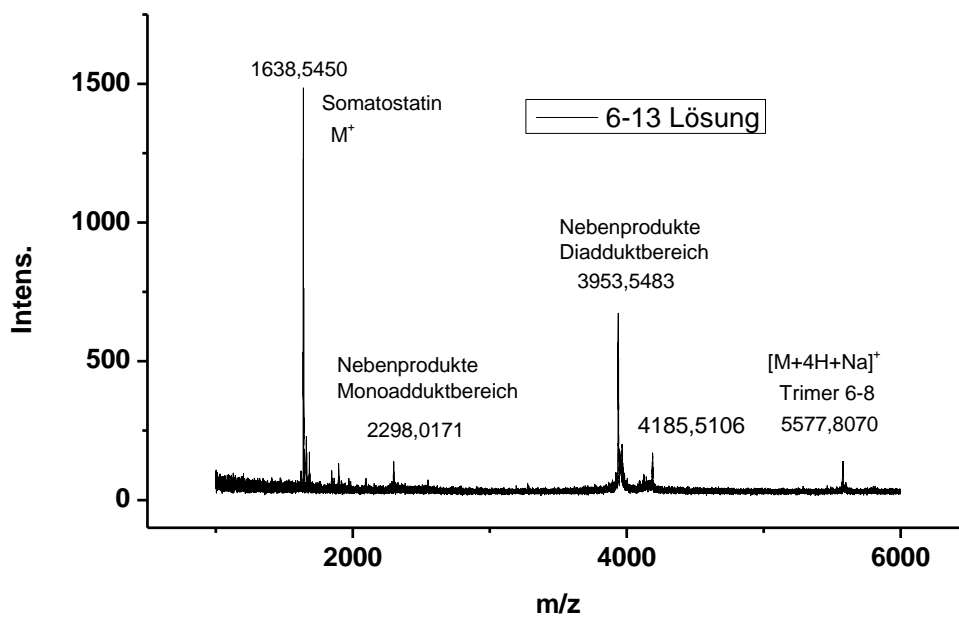


Abb VI-17 MALDI-ToF Massenspektrum der Reaktionslösung von 6-13

Somatostatintrimer 6-13 wurde durch Umsetzung von Somatostatinacetat mit Tetrasulfon 6-4 dargestellt. Die Reaktion wurde wie die Synthese des Dimers durchgeführt, die Konzentration an Somatostatin in Lösung betrug dabei 0,25 mg/ml. Zugeben wurden Somatostatin, TCEP und Tetrasulfon 6-4 zu einer Lösung von Acetonitril/PB 50 mM (2:3) in jeweils Wasser bzw. Acetonitril. Nach Inkubation der Lösung über 72 Stunden wurde diese mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert. Neben nativem Somatostatin (1638 g/mol) sowie Nebenprodukten im Mono- und Diadduktbereich konnte die Bildung von Trimer 6-13 eindeutig nachgewiesen werden (Abb VI-17) Die Lösung wurde gefriergetrocknet und das Lyophilisat mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

In Abb VI-18 ist das Elugramm der Aufreinigung abgebildet.

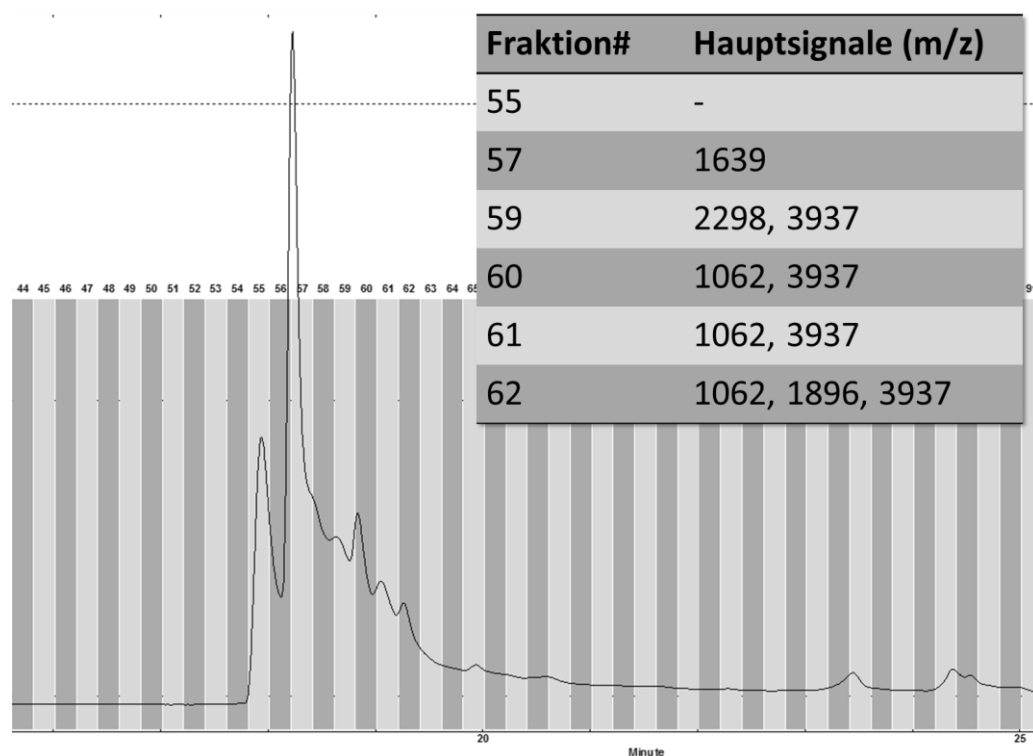


Abb VI-18 HPLC-Elugramm in Kombination mit den massenspektrometrischen Ergebnissen der einzelnen Fraktionen

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert. Die Hauptfraktion (57) enthält natives Somatostatin, die folgenden Fraktionen (59-62) hingegen enthalten hauptsächlich Nebenprodukte aus dem Mono- und Diadduktbereich. In keiner der Fraktionen wurde das Trimer 6-13 nachgewiesen. Daher konnte Trimer 6-13 nicht rein isoliert werden und mit dieser Substanz keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt werden. Im Falle des Somatostatin-Dimers 6-12 war dies aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Dimers auch nur eingeschränkt möglich, welches in einer Lösung von 85% DMSO, 0,01% TFA mit einer Konzentration von 0,1 mM gelöst werden konnte.

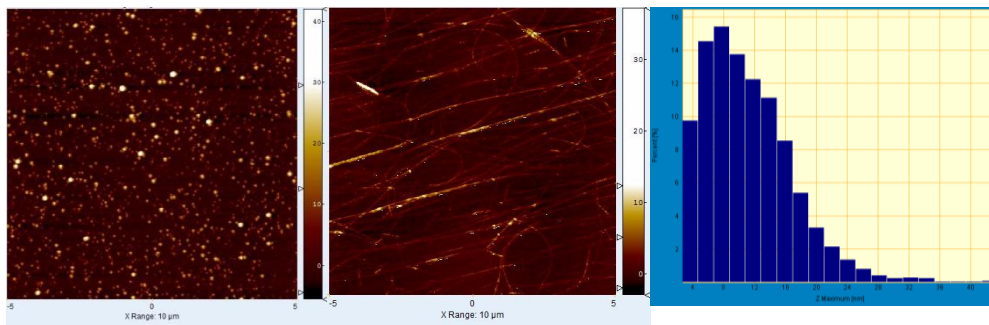


Abb VI-19 AFM-Bilder von Dimer 6-12 und nativem Somatostatin links: Dimer 6-12, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Milli-Q-Wasser/DMSO; rechts: natives Somatostatin, 3w% in 0,1 M HCl

Um zu untersuchen, inwieweit diese Doppelschleifenstruktur, welche über einen rigiden Mittelteil verbrückt ist (Abb VI-20), supramolekulare Aggregate in Lösung bildet, wurde diese Lösung mit Wasser verdünnt und nach *drop casting* mittels AFM analysiert.

Es bilden sich kugelförmige Nanostrukturen mit einer relativ einheitlichen Größenverteilung und Durchmessern von 6 - 20 nm (Abb VI-19).

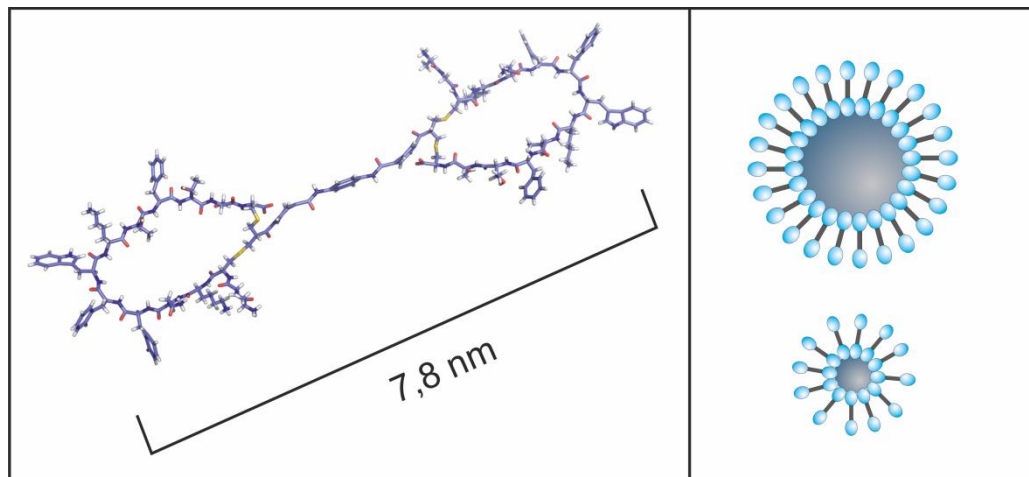


Abb VI-20 links: Geometrieoptimierte 3-D Struktur von Dimer 6-12 (Spartan '02 Paket), rechts: mögliche Nanostrukturen durch Aggregation

Da die Strukturen sehr rigide sind, ist es vorstellbar, dass sich die Dimere in Doppelschichten mit einer hydrophoben Zwischenschicht anordnen, welche in wässrigen Systemen Mizellen bilden (Abb VI-20). Dabei interagieren vermutlich die Schleifenregionen miteinander, während der steife Mittelteil abgeschirmt wird. Es ist überraschend, dass sich diese Strukturen nicht über β -Faltblatt-Wechselwirkungen zu fibrillär verdrehten Strukturen anordnen, wie dies bei Konjugaten cyclischer Peptide mit synthetischen Polymeren bereits beobachtet werden konnte^[4].

Für multivalente Therapeutika ist nicht nur die Art und Weise der räumlichen Anordnung der Erkennungseinheiten entscheidend, sondern auch die Flexibilität der erhaltenen Strukturen sowie der Abstand der Einheiten zueinander. Diese Eigenschaften werden maßgeblich durch die Wahl der Kernbausteine beeinflusst. Die gute Wasserlöslichkeit der Strukturen spielt ebenfalls eine sehr große Rolle. Yim et al. beobachteten beispielsweise für ihre Octreotid-Multimere, dass die IC-50-Werte, d.h. die Werte für die mittlere inhibitorische Konzentration, für das monomere Octreotidkonjugat am besten waren^[5]. Dies widerspricht der Aussage, dass dendritische Architekturen, auf deren Oberfläche mehrere Targeteinheiten

präsentiert werden, generell eine höhere Affinität zu den entsprechenden Rezeptoreinheiten aufweisen bzw. bei geringerer Konzentration eine äquivalente bzw. erhöhte Antwortreaktion auslösen können. Yim et al. begründeten diese unerwünschten Beobachtungen mit der verminderten Wasserlöslichkeit des Tetramers im Vergleich zu Monomer.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten EC-50-Werte sowie Zytotoxizität von Somatostatindimer 6-12 nicht untersucht werden. In Anbetracht der Tatsache, dass das Dimer 6-12 in wässriger Lösung zur Bildung von Mizellen neigt, auf deren Oberfläche die Schleifensequenzen in großer Zahl exponiert werden, liegt die Vermutung jedoch nahe, dass gerade solche Strukturen eine erhöhte Bindungsaffinität zeigen bzw. Aufnahme in rezeptorpositive Zellen bewirken könnten.

Literatur

- [1] M. Mathai, C. Seok-Ki, M. W. George, *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 2754-2794.
- [2] F. A. Liberatore, R. D. Corneau, J. M. McKearin, D. A. Pearson, B. Q. Belonfa, S. J. Brocchini, J. Kath, T. Phillips, K. Oswell, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *7*, 36-50.
- [3] Z. Cheng, Y. Wu, Z. M. Xiong, S. S. Gambhir, X. Y. Chen, *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 1433-1441.
- [4] H. M. König, A. F. M. Kilbinger, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 8334-8340.
- [5] C.-B. Yim, O. C. Boerman, M. de Visser, M. de Jong, A. C. Dechesne, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1323-1331.

VII Bioreaktive Seitenkettenpolymere für Biohybridsysteme

VII-1 Funktionale Linkermonomere für Seitenkettenpolymere

Die bereits vorgestellten Methoden zur Generierung von Polymerbiohybriden basieren entweder auf der Reaktion eines bioreaktiven Polymers mit der bioaktiven Komponente (*grafting to*) oder einer von einem Biomakroinitiator ausgehenden Polymerisation (*grafting from*). Es gibt jedoch noch weitere Möglichkeiten, die gerade in den letzten Jahren mit größerem Interesse betrachtet wurden.

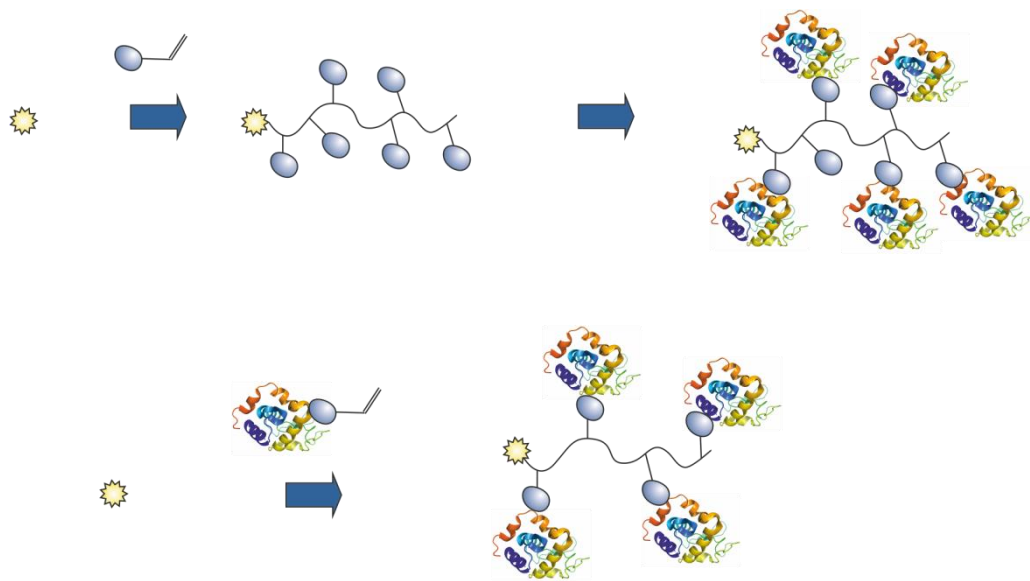


Abb VII-1 Symbolische Darstellung der *grafting through* Methode, oben: Seitenkettenmodifikation nach der Polymerisation; unten: Verwendung von Biomakromonomeren

Die Polymerisation eines Monomers mit einer bioaktiven Einheit stellt hierbei einen der neuesten Ansätze dar und wird als *grafting through* Ansatz bezeichnet^[1]. Ebenfalls unter diesen Terminus fällt die Polymerisation eines Monomers mit einer bioreaktiven Gruppierung wie z.B. einem Aktivester und die anschließende Umsetzung mit dem gewünschten Protein oder Peptid, obwohl es sich bei dieser Herangehensweise streng genommen um einen *grafting to* Ansatz handelt^[2].

Die Gemeinsamkeit dieser beiden Ansätze besteht darin, dass in beiden Fällen eine Funktionalisierung der Polymerseitenkette vorgenommen werden kann und steht damit im Gegensatz zu den beiden im ersten Absatz erwähnten Methoden, bei denen das Polymer nur in α oder in ω – Position adressiert werden kann (Abb VII-1).

Tao et al. konnten zeigen, dass es möglich ist durch die Verknüpfung einer Sternpolymerarchitektur mit mehreren Konjugationsstellen an den Polymerarmen mit Biomakromolekülen multivalente Protein-Polymer-Konjugate über die *grafting to* Methode darzustellen^[3]. Generell ist dies jedoch schwierig, da ein voluminöses Polymer, dessen reaktive Endgruppen je nach Konfiguration des Polymers nicht immer oberflächenzugänglich sind, mit mehreren sterisch anspruchsvollen Biomolekülen zur Reaktion gebracht werden muss.

Der Zugang zu multi- bzw. polyvalenten Biohybridarchitekturen ist mittels *grafting from* nur in Bezug auf Konjugate möglich, bei denen mehrere Polymere mit einem Biomolekül verknüpft sind. Durch die Verwendung von biofunktionalisierten Monomeren werden automatisch polyvalente Hybridkonjugate erhalten. Ist die Biokomponente des Monomers voluminös, besteht das Problem der sterischen Behinderung der einzelnen Monomere jedoch weiterhin, was vielleicht der Grund sein mag, dass bis jetzt nur Peptidmonomere erfolgreich über diese Technik polymerisiert werden konnten. Es wäre denkbar, durch Copolymerisation mit einem anderen Monomer Seitenkettenabschnitte einzufügen, die die Wechselwirkung der Biomonomere verringern, allerdings muss in diesem Fall berücksichtigt werden, dass die Reaktion des sterisch weniger anspruchsvollen Monomers wahrscheinlich bevorzugt ablaufen wird. Eine Anpassung der Dichte der bioaktiven Einheiten in der

Seitenkette über das Verhältnis der Monomere zueinander bzw. über die Reaktivität des Comonomers ist jedoch vorstellbar.

Leichter einstellen lässt sich die Dichte der Biomoleküle an den Seitenketten, wenn bioreaktive Monomere mit anderen Molekülen copolymerisiert werden, besonders, wenn beide auf einer ähnlichen Grundstruktur basieren und dadurch eine ähnliche Reaktivität aufweisen. Die Funktionalisierung der Seitenkette erfolgt jedoch in diesem Fall nach der Polymerisation, was aufgrund der gegenseitigen räumlichen Behinderung der Biomakromoleküle schwierig gestaltet und eher für die Modifikation mit Peptiden geeignet ist als für die Darstellung polyvalenter Protein-Polymerkonjugate.

Der Übergang von multivalenten zu polyvalenten Systemen bietet die interessante Möglichkeit, synthetische Makromoleküle als Wirkstoffträger zu verwenden. Die Synthese eines mit Somatostatin modifizierten Makromonomers über den Ansatz der selektiven Adressierung seiner Disulfidbrücke nach dessen reduktiver Spaltung ist zwar denkbar, jedoch aufgrund der an Monomer benötigten Mengen wenig sinnvoll. Außerdem kann die für die radikalische lebende Polymerisation essentielle reaktive Einheit ebenfalls mit den freien Thiolgruppen des reduzierten Peptids reagieren.

Daher wurde ein disulfidreaktives Monomer auf Methacrylatbasis entworfen, dessen Synthese in letzten Abschnitt dieses Kapitels präsentiert werden soll (Abb VII-2). Bissulfid 7-1, welches über eine kurze Spacereinheit und eine reaktive OH-Gruppe verfügt, wurde in trockenem THF gelöst, mit 1,5 Äquivalenten Et_3N versetzt und die Reaktionslösung im Eisbad gekühlt. Dann wurden 1,2 Äquivalente Methacrylsäurechlorid in trockenem THF vorsichtig zugetropft und die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 20 Stunden Rühren wurde die Lösung aufgearbeitet und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton (1:1) als Eluens aufgereinigt.

Für den ersten Polymerisationsansatz dieses Monomers wurden Anisol als Lösungsmittel und 2-Bromisobuttersäureethylester als Initiator gewählt (Abb VII-3).

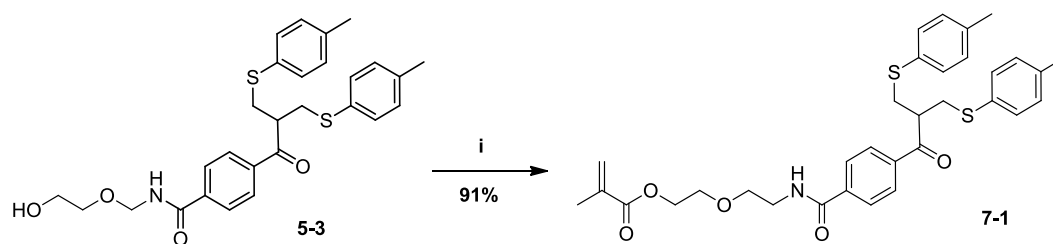


Abb VII-2 Darstellung Bissulfidmethacrylat 7-1 i: Methacrylsäurechlorid (1,7 eq), Et₃N, THF, RT, 18 h.

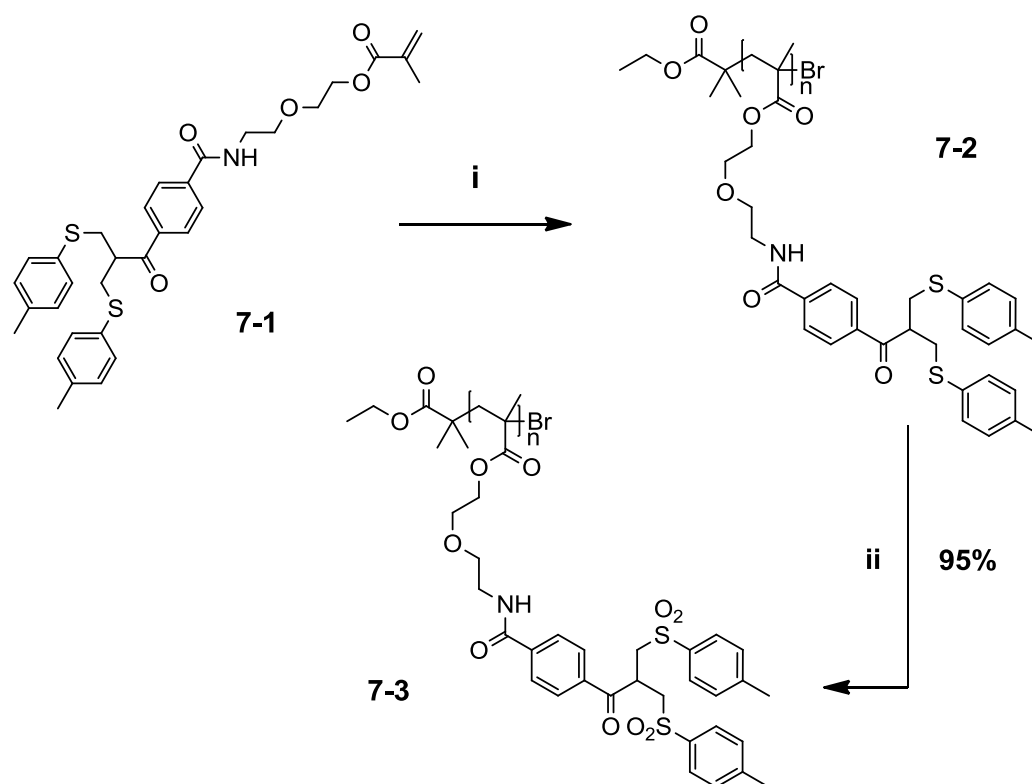


Abb VII-3 ATRP von Bissulfidmethacrylat 7-1 und anschließende Oxidation des Poly(bissulfids) 7-2 zum Poly(bissulfon) 7-3. i: 2-Bromisobuttersäureethylester (0,01 eq), CuBr₂, PMDETA, Anisol, 32°C, 18 h; ii: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), EtOAc/MeCN/H₂O (10:6:1), RT, 18 h

Als Katalysatorsystem wurde CuBr in Kombination mit Pentamethylen-diethylentriamin als komplexierenden Liganden eingesetzt. Monomer und Lösungsmittel

wurden dazu im Schlenkkolben vorgelegt und 45 Minuten durch Einleitung von Argon entgast. Nach Zugabe einer Stocklösung von CuBr sowie des Liganden in entgastem Anisol wurde die Bildung der Komplexverbindung abgewartet, bevor die Reaktion mit einem Aliquot im Argongegenstrom versetzt wurde. Nach Addition des Initiators wurden sofort drei freeze-pump-thaw Zyklen angeschlossen. Die Reaktionslösung wurde auf 32°C erwärmt und nach 18 Stunden durch Entfernen der Inertgasatmosphäre abgebrochen. Die Charakterisierung des Polymers nach Aufarbeitung der Reaktion erfolgte durch NMR-Spektroskopie und GPC-Analyse.

Das theoretische Molekulargewicht $M_{n,th}$ wurde aus dem Umsatz an Monomer p , welcher aus dem Verhältnis aus verbrauchtem Monomer m_v (Differenz aus eingesetztem Monomer m_0 und resoliertem Monomer m_r) und m_0 bestimmt wurde, sowie aus dem Verhältnis aus den eingesetzten Stoffmengen aus Monomer (n_M) und Initiator (n_I) auf die folgende Weise über den Polymerisationsgrad P_n berechnet:

$$m_v = m_r - m_0 = 235 \text{ mg} - 369 \text{ mg} = 134 \text{ mg}$$

$$p = \frac{m_v}{m_0} = \frac{134 \text{ mg}}{369 \text{ mg}} = 0,363$$

$$P_n = p \frac{n_M}{n_I} = 0,363 \frac{0,64 \text{ mmol}}{0,0064 \text{ mmol}} = 36,3$$

$$M_{n,th} = P_n \times M_M + M_I = 36,3 \times 591,8 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 195,1 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 21685,9 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Diese Berechnung basiert auf der Annahme, dass ausgehend von einem Initiatormolekül eine Polymerkette wächst. Für $M_{n,th}$ wurde ein Wert von 21685,9 g/mol berechnet.

Dieser ist um den Faktor 1,6 größer als das durch die Eichung mit dem PMMA-Standard über GPC-Messung erhaltene Zahlenmittel des Molekulargewichts M_n . Die GPC-Messungen erfolgten mit einem PMMA-Standard, dessen hydrodynamisches

Volumen bei gleichem Molekulargewicht offensichtlich wesentlich größer ist als das hydrodynamische Volumen des neu entwickelten Poly(bissulfon). Durch GPC-Analyse wurden ein M_n von 13195 g/mol und eine enge Molekulargewichtsverteilung von 1,17 bestimmt (Abb VII-4).

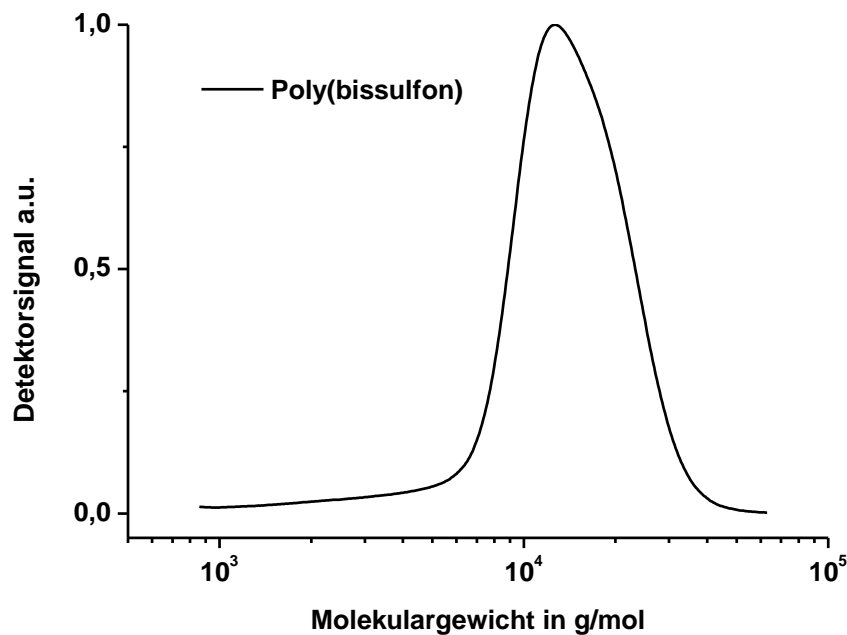


Abb VII-4 Molekulargewichtsverteilung von Poly(bissulfon) 7-3, GPC-Standard: PMMA

In Abb VII-5 werden die NMR-Spektren von Poly(bissulfid) 7-2 und Poly(bissulfon) 7-3 zueinander in Relation gesetzt. Durch die Oxidation der Sulfide erfahren die Signale der aromatischen Protonen C eine Tieffeldverschiebung. Der Vergleich der Integrale dieser Signale zeigt, dass über 95 Prozent der Bissulfide zum Bissulfon umgesetzt wurden.

Poly(bissulfon) 7-3 zeigt jedoch kein optimales Löslichkeitsverhalten in Wasser und wässrigen Gemischen mit niedrigem prozentualem Anteil an organischen Lösungsmitteln. Um die Löslichkeit des Polymers zu verbessern, wurde der Entschluss

gefasst, Bissulfidmonomer 7-1 mit einem Monomer zu copolymerisieren. Tetraethylglycolmethoxymethacrylat 7-5 wurde nach Literaturvorschrift durch Veresterung mit Methacrylsäurechlorid in trockenem THF dargestellt^[4].

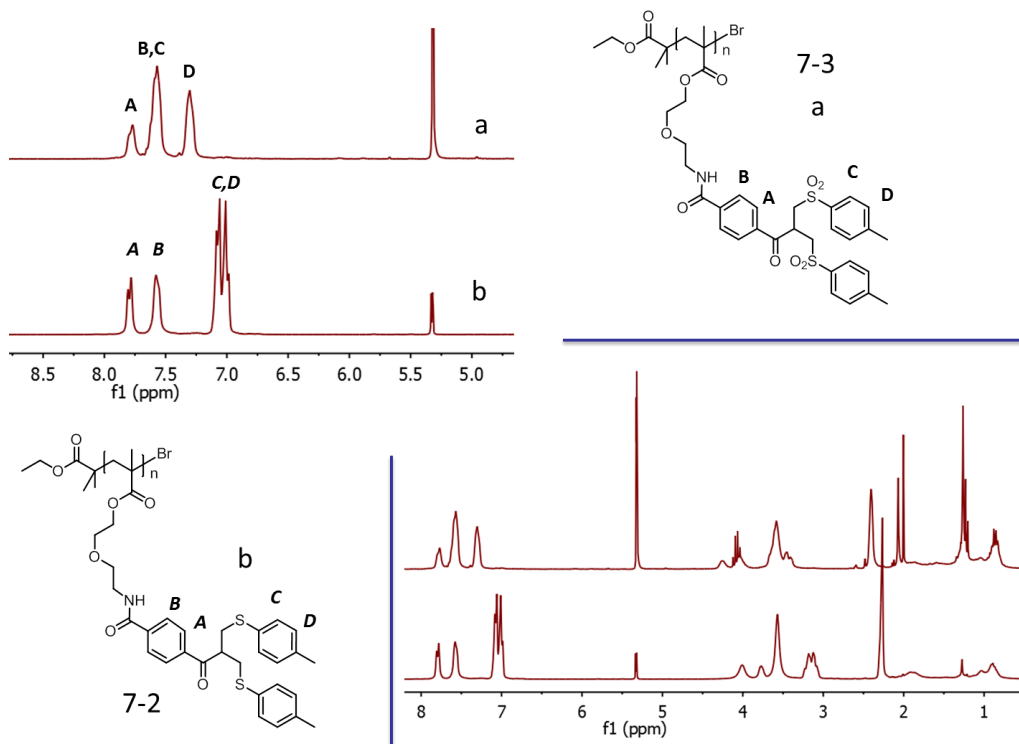


Abb VII-5 Vergleich der ¹H-NMR Spektren von Poly(bissulfid) 7-2 und Poly(bissulfon) 7-3 in CD₂Cl₂ (250 MHz). Oben: Vergrößerung des aromatischen Bereichs; unten: gesamtes Spektrum

Es ist bekannt, dass Poly(tetra(ethylenglykol)methoxymethacrylat) (PTEGMA) als Homopolymer über eine weite Temperaturspanne wasserlöslich ist und einen Cloudpoint $T_c = 68\text{ °C}$ hat^[4].

Die Copolymerisation wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Homopolymerisation durchgeführt, Bissulfid 7-1, Tetraethylglycolmethoxymethacrylat 7-5 und Initiator wurden im Verhältnis

Die Charakterisierung des Copolymers erfolgte durch NMR-Spektroskopie und GPC-Analyse. Durch den Vergleich mit einem PMMA-Standard wurde eine monomodale enge Molekulargewichtsverteilung detektiert ($M_n = 9424 \text{ g/mol}$, $PDI = 1,18$). Das Verhältnis der beiden Monomere zueinander innerhalb des Copolymers konnte aufgrund der Überlappung der NMR-Signale beim Poly(bissulfid-co-TEGMA) 7-6 erst nach der Oxidation zum Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 durch Vergleich zweier Integrale bestimmt werden. Dazu wurde die Integrale der Signale des α -CH-Protons von Bissulfon 7-7 und der Methoxyprotonen von Tetraethylglykolmonomethylether 7-4 bestimmt. Der daraus errechnete Wert ergab ein Verhältnis von 47:53 (TEGMA:Bissulfon) im Copolymer Poly(bissulfon-co-TEGMA).

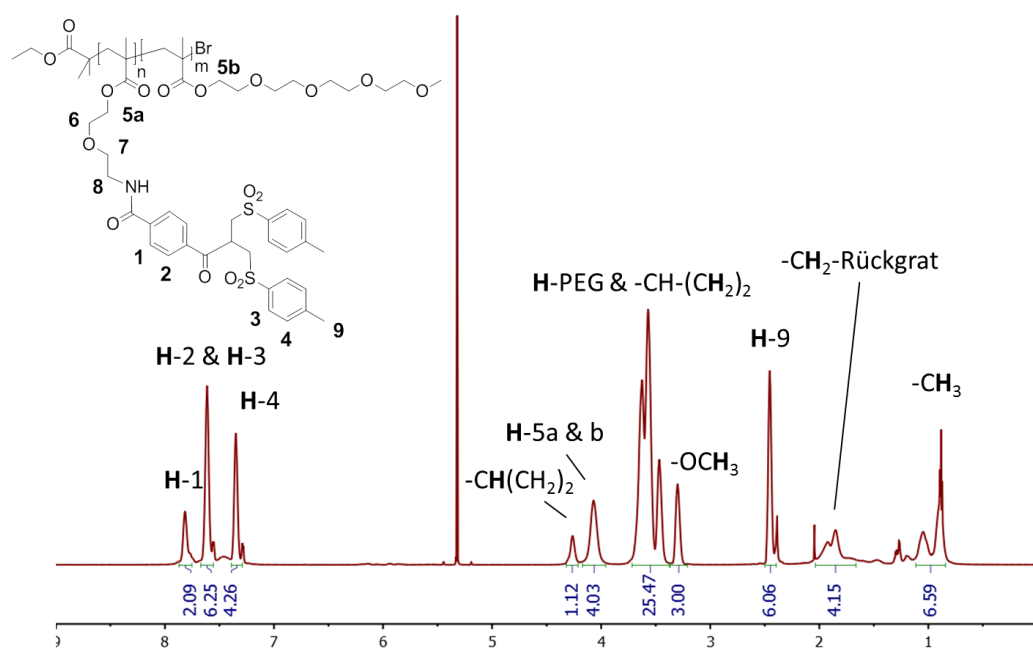


Abb VII-8 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 in CD_2Cl_2 (700 MHz) mit Zuordnung der einzelnen Signale zu den entsprechenden Protonen

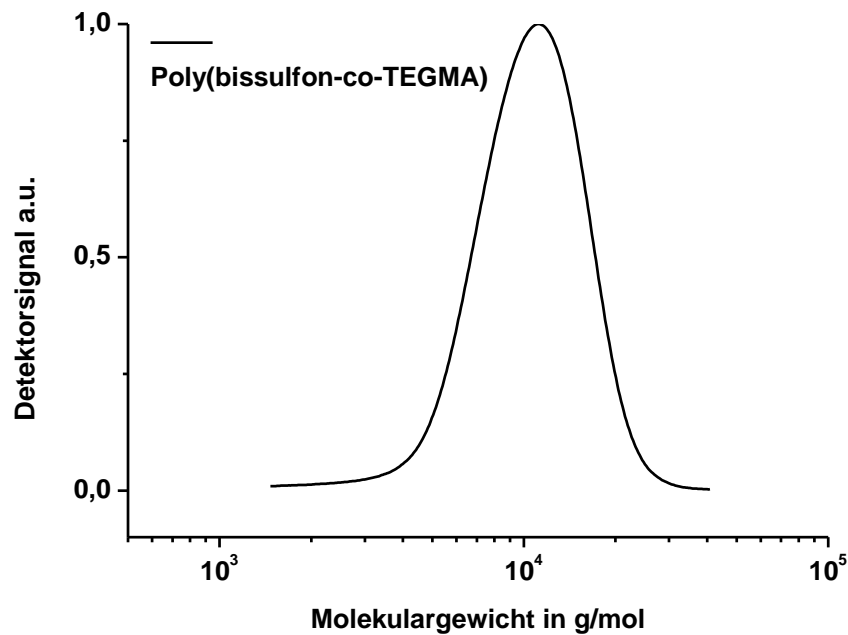


Abb VII-9 Molekulargewichtsverteilung von Poly(bissulfon-co-TEGMA), GPC-Standard: PMMA

Poly(bissulfon) 7-3 und Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 weisen trotz des geringen Umsatzes enge Molekulargewichtsverteilungen auf, dies ist ein Indikator dafür, dass unter den oben genannten Bedingungen das Verhältnis aus k_p und k_{deact} sehr gering ist und die Polymerisation sehr langsam abläuft. Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 besitzt eine wesentlich bessere Löslichkeit in wässrigen Lösungen organischer Lösungsmittel, so lässt sich das Copolymer mit einer Konzentration von 0,092 mg/ml in einer 9%igen Lösung von DMF in Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,8 in Lösung halten, wenn es zuvor in reinem DMF mit einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst und dann zu der wässrigen Pufferlösung gegeben wird. Somit konnte die Synthese zweier disulfidreaktiven Seitenkettenpolymere als potentielle Precursor für polyvalente Wirkstoffträger durch lebende radikalische Polymerisation erfolgreich verwirklicht werden.

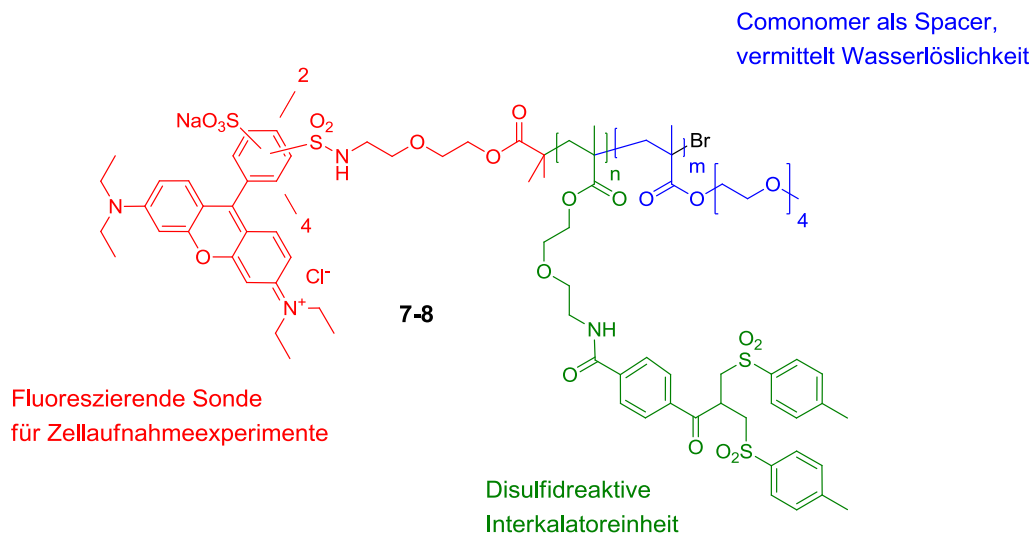


Abb VII-10 Funktionale Untereinheiten von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8

Die Interaktion von bioaktiven Komponenten mit lebenden Organismen auf zellulärer Ebene lässt sich jedoch nur dann genau verfolgen, wenn Erstere mit einer entsprechend sensitiven Sonde ausgestattet ist.

Wie schon im Vorfeld diskutiert wurde kann durch die Wahl des Initiators die Funktionalität in α -Position des Polymers beliebig variiert werden. Daher wurde für die Synthese von Copolymer 7-8 ein fluoreszierender Rhodamin B Initiator 7-11 entworfen und synthetisiert, um eine mögliche Zellaufnahme der Polymerpeptidkonjugat besser verfolgen zu können (Abb VII-11).

Sulforhodaminsulfonsäurechlorid 7-9 wurde in Pyridin gelöst, mit DMAP versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur mit 2-(2-Aminoethoxy)ethanol zum Amid 7-10 unter Lichtausschluss umgesetzt.

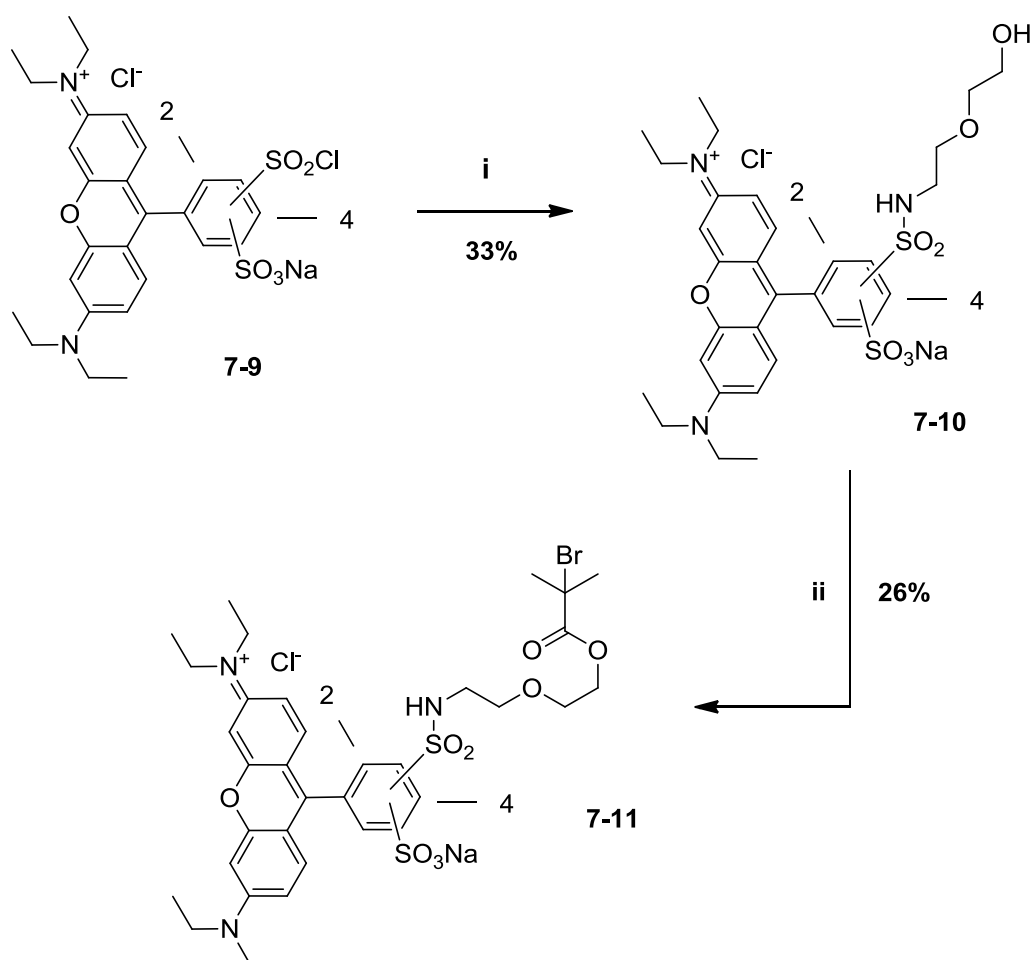


Abb VII-11 Synthese Rhodamininitiator 7-11 i: 2-(2-Amino)ethoxyethanol (1,6 eq), DMAP, Pyridin, RT, 72 h, Lichtausschluss; ii: 2-Bromisobuttersäurebromid (exc.), DMAP, DCM/THF (7:1), RT, 72 h, Lichtausschluss

Die Charakterisierung erfolgte durch NMR-Spektroskopie und MALDI-ToF Massenspektrometrie.

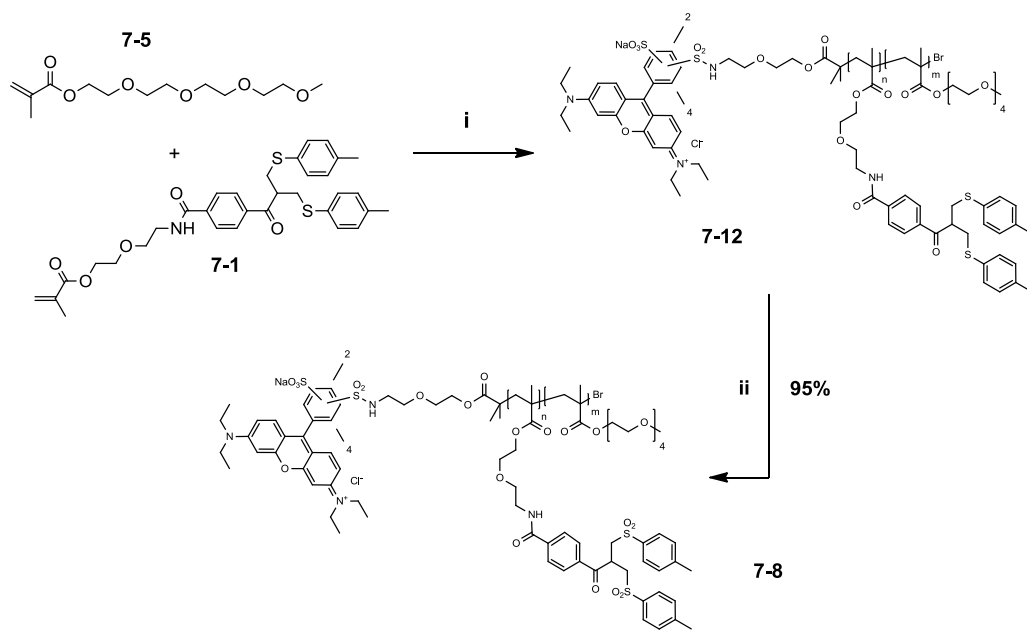


Abb VII-12 ATRP von Bissulfidmethacrylat 7-1 und Tetra(ethylenglykol)monomethoxymethacrylat 7-5 mit Rhodamininitiator 7-11 und anschließende Oxidation des Poly(bisulfid-co-TEGMA) 7-12 zum Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8. i: Rhodamininitiator 7-11 (0,01 eq), CuBr_2 , PMDETA, Anisol, 32°C , 18 h; ii: Kaliumperoxomonosulfat (4 eq), EtOAc/MeCN/ H_2O (10:6:1), RT, 18 h

Für die Copolymerisation wurden die beiden Monomere und das Lösungsmittel im Schlenkcolben vorgelegt und 45 Minuten durch Einleitung von Argon entgast. Nach Zugabe von CuBr sowie des Liganden wurde die Bildung der Komplexverbindung abgewartet, bevor die Reaktion mit Initiator 7-11 im Argongegenstrom versetzt wurde. Im Anschluss wurden direkt drei freeze-pump-thaw Zyklen durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde auf 60°C erwärmt und über Nacht gerührt. Danach wurde die Reaktion durch Entfernen der Inertgasatmosphäre abgebrochen.

Das Polymer wurde durch Zutropfen aus Hexan ausgefällt und der Katalysator durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit DCM als Eluens abgetrennt. Der Initiator erwies sich unter den Reaktionsbedingungen als instabil und wenig effizient. Nach Aufreinigung konnten 18 mg Poly(bisulfid-co-TEGMA) 7-12 erhalten werden.

Diese wurden in EtOAc/MeCN/H₂O (6:6:1) suspendiert und mit einem Überschuss an Oxon zum Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8 oxidiert.

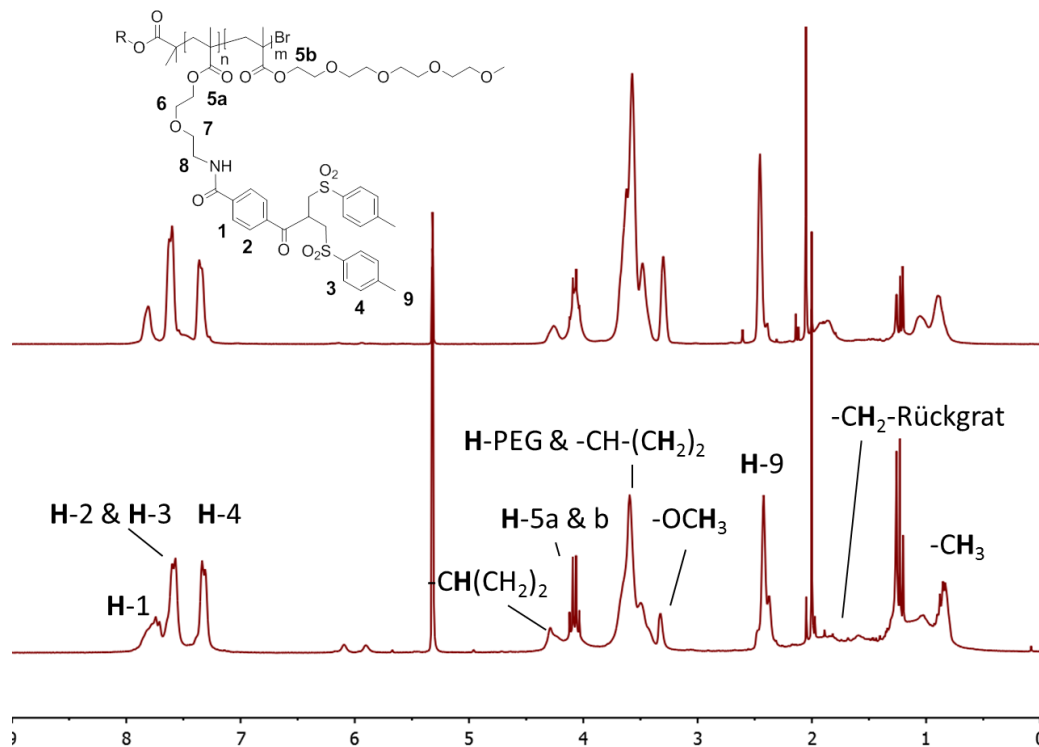


Abb VII-13 Vergleich der ¹H-NMR Spektren von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 (oben) und 7-8 (unten) 7-3 in CD₂Cl₂ (250 MHz)

Die Charakterisierung erfolgte mittels NMR Spektroskopie (Abb VII-13) und GPC-Analyse. Durch Vergleich mit einem PMMA-Standard in THF wurde eine enge Molekulargewichtsverteilung mit niedrigem Molekulargewicht detektiert ($M_n = 8690$ g/mol, PDI = 1,16). Wie bei Poly(bissulfon-co-TEGMA) konnte $M_{n,th}$ nicht durch Integration der entsprechenden NMR-Signale bestimmt werden, da die Initiatorsignale mit den Polymersignalen überlappen. Die charakteristische Tieffeldverschiebung der Signale der Aromatenprotonen in ortho-Position zum

Sulfonrest konnte zur Verifizierung der erfolgreichen Oxidation von Poly(bissulfid-co-TEGMA) 7-12 zu Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8 mittels NMR genutzt werden.

Diese Polymere ermöglichen den Zugang zu Hybridkonjugaten durch Postpolymerisationsmodifizierungen, während die fluoreszierende Sonde die in vivo Verfolgung des bioaktiven Konjugats zulässt. Im nächsten Abschnitt wird über die Umsetzung mit Somatostatin und anderen Peptiden berichtet.

VII-2 Polyvalente Hybridsysteme

Die in Kapitel VI vorgestellten Somatostatin-Dendrimere zeichnen sich durch eine hohe Formstabilität und Strukturperfektion aus. Wie jedoch schon erwähnt wurde, ist bei solchen unflexiblen Strukturen ein hohes Maß an Optimierungsschritten nötig, um effiziente Konjugate gewünschten Reaktionsverhaltens darzustellen.

Polymere Systeme hingegen sind flexibel und die Erkennungseinheiten sind in wässrigen Systemen auf der Polymeroberfläche vielfach exponiert, so dass der gewünschte Effekt eher beobachtet werden kann. In letzter Zeit wurden auch entsprechend oberflächenfunktionalisierte Nanopartikel auf Multivalenzeffekte in Abhängigkeit der Ligandendichte untersucht^[5]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 und 7-8 mit Somatostatin umgesetzt. Diese Synthesen und Ergebnisse sind Gegenstand des nächsten Abschnitts.

VII-2a Poly(bissulfon-co-TEGMA-Somatostatin)

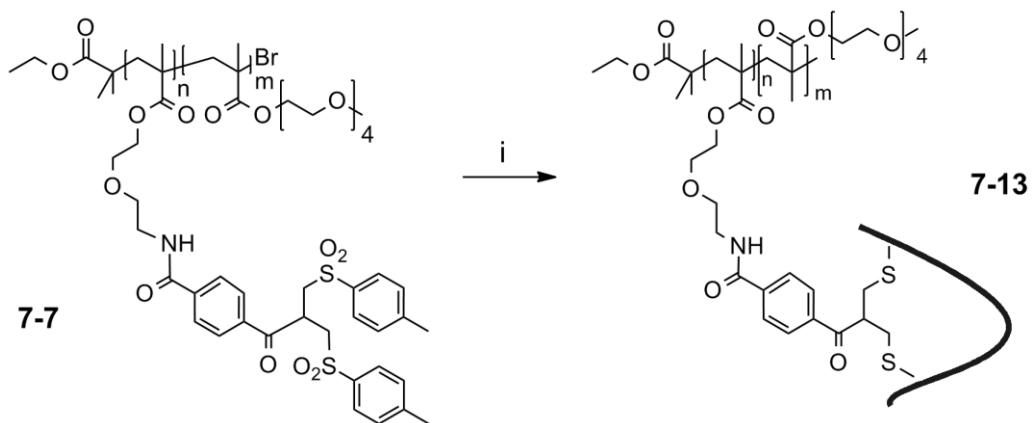


Abb VII-14 Post-Polymerisationsmodifikation von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 mit Somatostatin i: Somatostatin (2 eq), TCEP (4 eq), 1 % DMF in PB (50 mM, pH 7,8), RT, 18 h

Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 wurde in DMF gelöst und in PB 50 mM, pH 7,8 pipettiert, dabei trübte sich die Lösung leicht.

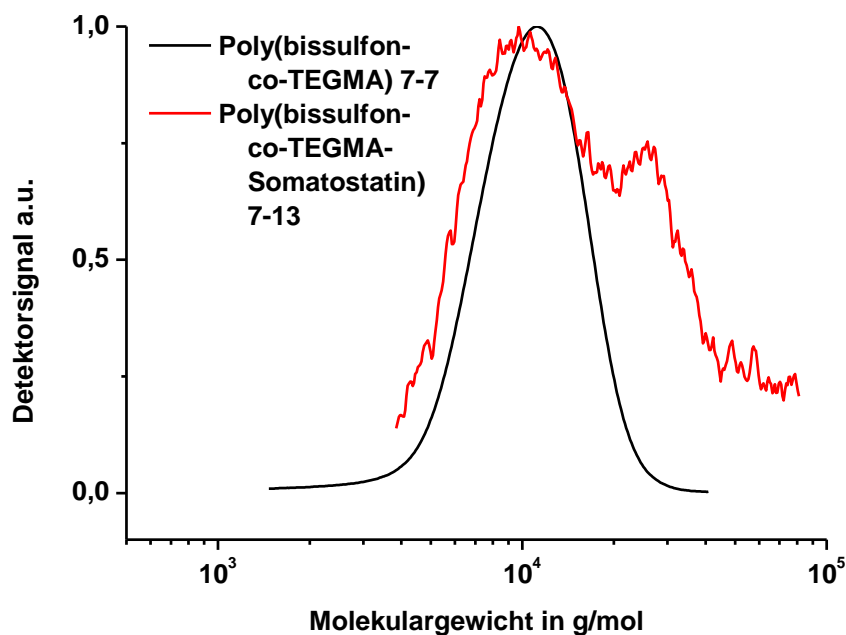


Abb VII-15 GPC-Eluogramme von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 und Poly(bissulfon-co-TEGMA-Somatostatin) 7-13, Detektion durch Bestimmung der UV-Absorption

Somatostatinacetat und TCEP wurden in Wasser gelöst und zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, dabei bildete sich ein Niederschlag, der sich weder in wässrigen noch in organischen Lösungsmitteln in Lösung bringen ließ. Die Suspension wurde zweimal mit DCM extrahiert und die organische Lösung wurde im Vakuum eingedunstet. Das Polymer wurde in Hexan ausgefällt (ca. 1 mg) und mittels GPC analysiert.

Es zeigte sich, dass die Umsetzung von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 mit zwei Äquivalenten Somatostatin eine bimodale Molekulargewichtsverteilung lieferte. Das

erste Maximum entspricht dem Signal des unmodifizierten Polymers. Die zweite Verteilung erstreckt sich von 15 – 40 kDa, wobei das Maximum bei 26 kDa liegt. Daraus ergibt sich ein Umsatz mit Somatostatin von 3,4 - 18,6 Peptidmolekülen pro Polymer mit durchschnittlich 10 Peptideinheiten pro Polymer.

Rechnet man mit dem Zahlenmittel des Molekulargewichts $M_n = 9424$ g/mol und einem Verhältnis von 48:53 der beiden Monomere zueinander, so erhält man einen Wert von durchschnittlich 10,6 reaktive Linkereinheiten pro Polymer. Dies würde bedeuten, dass nahezu jede reaktive Einheit mit Somatostatin zur Umsetzung gebracht werden konnte.

Die Ausbeute an modifiziertem Polymer war jedoch gering und es wurde wie bereits erwähnt die Bildung eines Niederschlags beobachtet, welcher sich weder in wässriger noch in organischer Phase in Lösung bringen ließ. Es wird vermutet, dass es sich dabei u.a. um vernetztes Material handeln könnte, bei dem beispielsweise ein Somatostatin mit zwei Polymerketten reagiert haben bzw. sogar noch höher vernetzte Architekturen entstanden sein könnten (Abb VII-16). Dies würde auch die Detektion höherer Molekulargewichte (bis zu 40 kDa) erklären. Quervernetzungen sind auch innerhalb einer Polymerkette denkbar.

Aufgrund des hohen sterischen Anspruchs der Somatostatinmoleküle bei der Verknüpfung mit dem Polymer behindern sich die einzelnen Peptide gegenseitig, so dass Quervernetzungsreaktionen sterisch begünstigt sind.

Es zeigte sich, dass die Technik der Interkalation in Disulfidbrücken nach deren partieller Reduktion bei solchen polyvalenten Systemen an ihre Grenzen stößt.

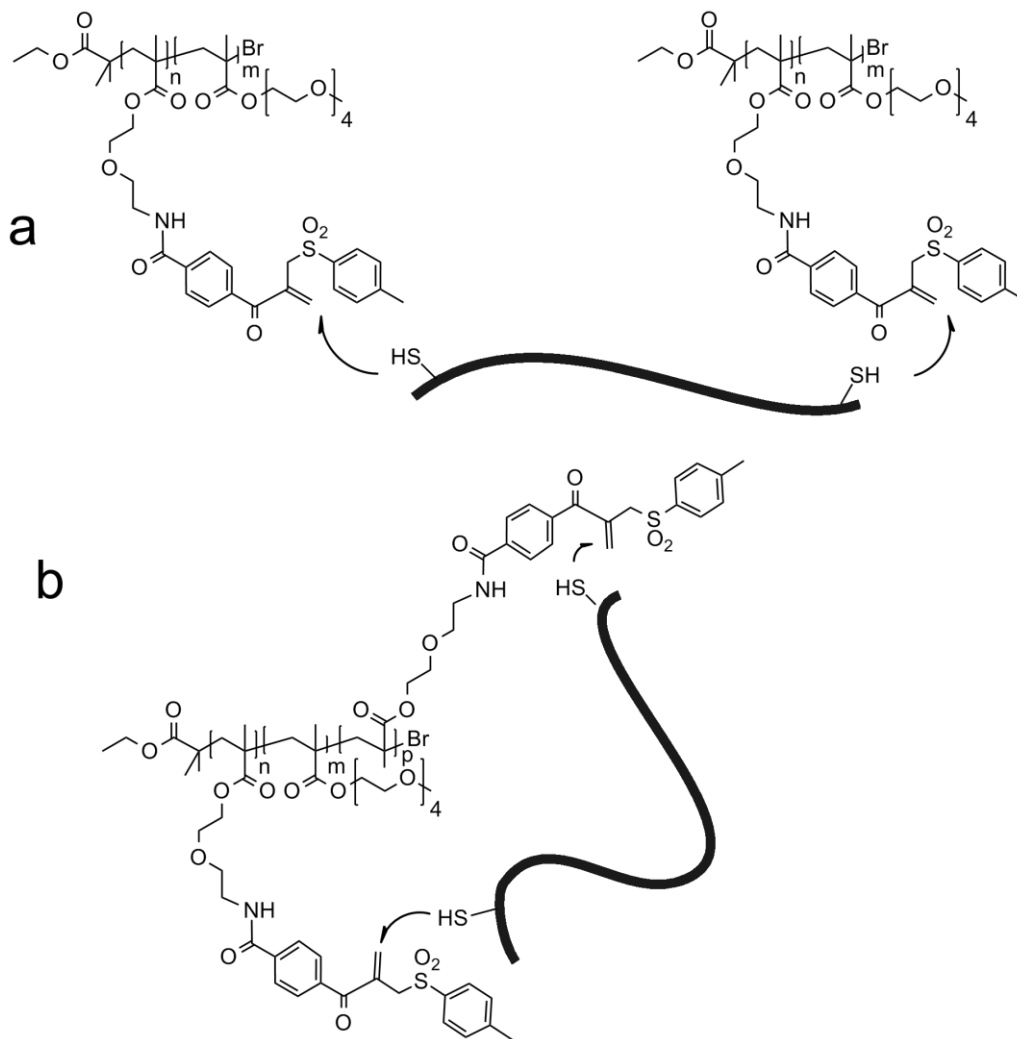


Abb VII-16 Mögliche Quervernetzungsreaktionen von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 mit Somatostatin a Zwischen zwei Polymerketten; b innerhalb einer Polymerkette

VII-2b Poly(bissulfon-co-TEGMA-Glutathion)

Wie in Kapitel III ausführlich dargelegt wurde, können Bissulfonfunktionalitäten nicht nur zur Interkalation in Disulfidbrücken genutzt werden, sondern stellen bei der Umsetzung mit Thiolen eine attraktive Alternative zur Maleinimidchemie dar.

Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin) ist ein Pseudotripeptid, welches in fast allen Zellen vorhanden ist und aus Glu, Cys und Gly gebildet wird. Neben seiner Funktion als wichtigstes Antioxidanz dient es u.a. als Speicher und Reserve für Cystein. Im Folgenden diente das als Dimer vorliegende Glutathiondisulfid als Modellpeptid, um zeigen zu können, dass die Bissulfoneinheiten Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 durch Peptide über deren Thiofunktion adressiert werden können. Glutathiondisulfid wurde in-situ mit zwei Äquivalenten TCEP reduziert und mit Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 umgesetzt (Abb VII-17). Um sämtliche Reagenzien in Lösung zu halten, wurde eine Mischung aus PB (50 mM, pH 7,8), 20 % DMF, 30 % MeCN gewählt.

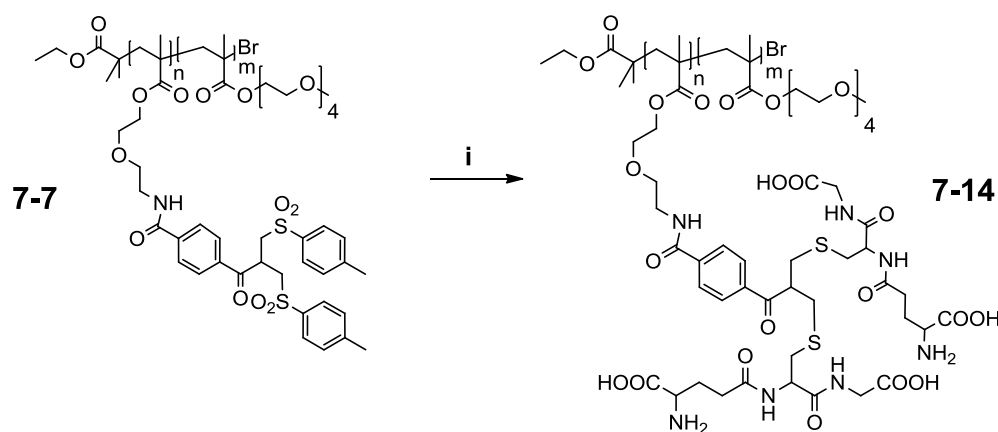


Abb VII-17 Post-Polymerisationsmodifikation von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 mit Glutathion
i: Glutathion (2 eq), TCEP (2 eq), 20 % DMF, 30 % MeCN in PB (50 mM, pH 7,8), RT, 18 h

Nach Inkubation über Nacht wurde mehrmals mit DCM extrahiert und die wässrige Phase bis zum Trocknen eingengt. Der Rückstand wurde in 200 μ l Wasser gelöst, über eine PD-10 Säule mit Wasser als Eluens aufgereinigt und gefriergetrocknet (2,1 mg). Der Erfolg der Modifikation konnte gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (Abb VII-19).

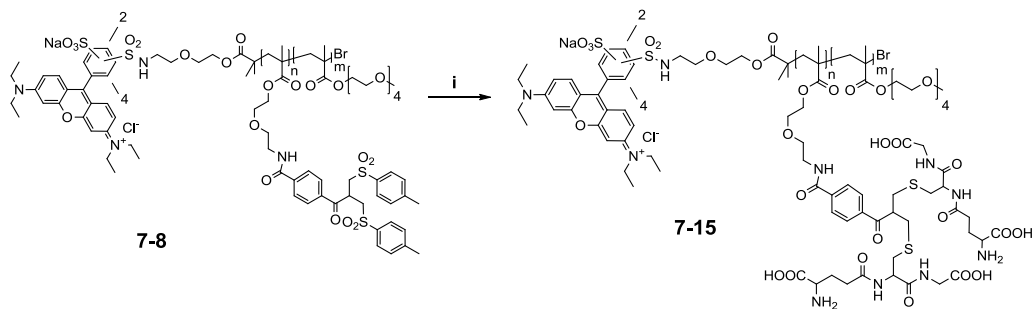


Abb VII-18 Post-Polymerisationsmodifikation von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8 mit Glutathion
i: Glutathion (2 eq), TCEP (2 eq), 20 % DMF, 30 % MeCN in PB (50 mM, pH 7,8), RT, 18 h

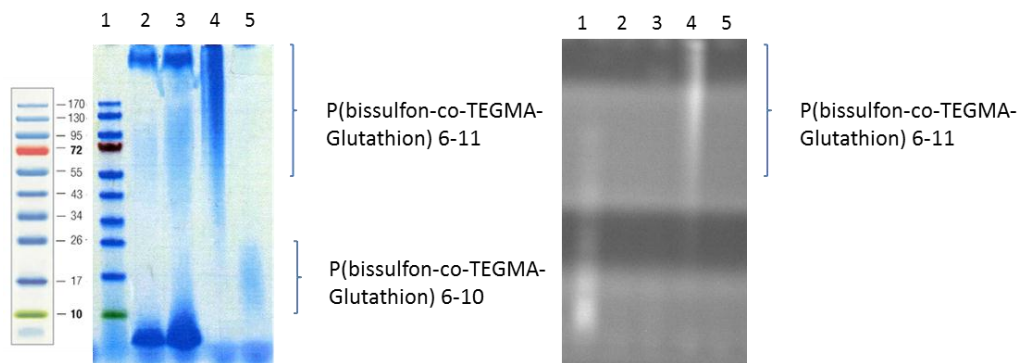


Abb VII-19 SDS-PAGE-Bilder, Spur 1: prestained protein ladder; Spur 2: PTEGMA-Somatostatin 6-5 nach Aufreinigung; Spur 3: PTEGMA-Somatostatin 6-5, Spur 4: P(bissulfon-co-TEGMA-Glutathion) 7-15, Spur 5: P(bissulfon-co-TEGMA-Glutathion) 7-14 (Reaktionslösung); links: nach Anfärbung mit Coomassieblau, rechts: Gelbild unter UV-Beleuchtung

Auch Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8 wurde in PB 50 mM, 20 % DMF, 30 % MeCN gelöst und mit Glutathiondisulfid umgesetzt, welches in situ mit 2 Äquivalenten TCEP zum Thiol reduziert wurde. Nach Inkubation über Nacht wurde mehrmals mit DCM extrahiert und die wässrige Phase bis zum Trocknen eingeeengt.

Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, über eine PD-10 Säule mit Wasser als Eluens aufgereinigt und gefriergetrocknet (6,4 mg). Der Erfolg dieser Modifikation konnte ebenfalls gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (Abb VII-19).

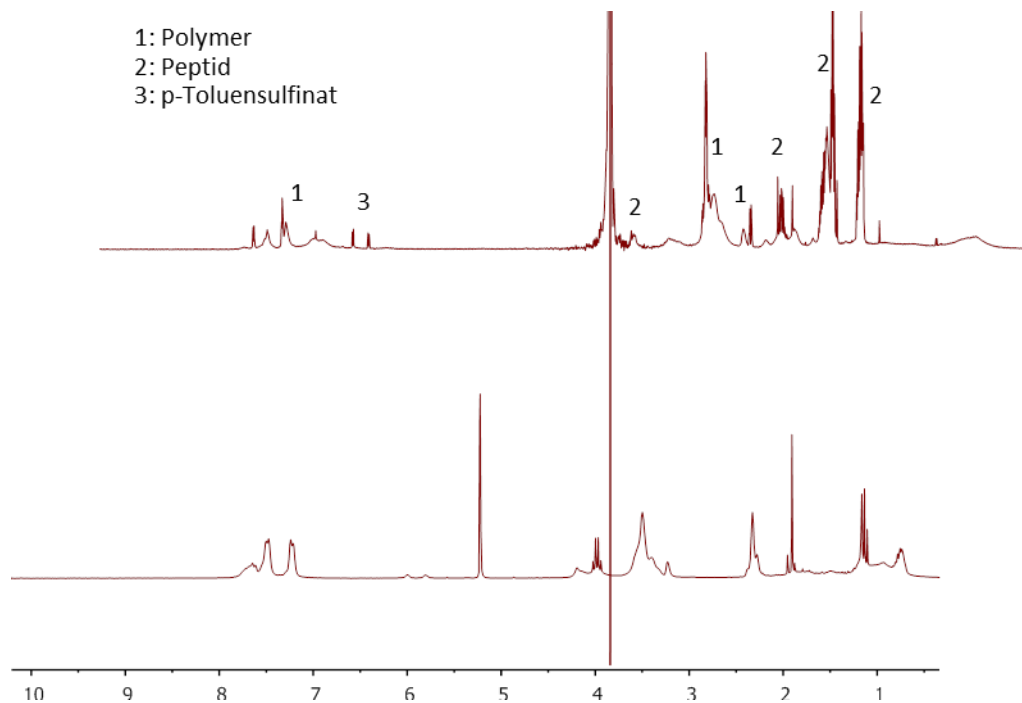


Abb VII-20 ¹H-NMR-Spektren von oben: Poly(bissulfon-co-TEGMA-Glutathion) 6-11, D₂O, 700 MHz; unten: Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8, CD₂Cl₂, 250 MHz

Obwohl Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 und Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8 ähnliche Molekulargewichtsverteilungen besitzen (7-7: $M_n = 9424$ g/mol, PDI = 1,18 und 7-8: $M_n = 8690$ g/mol, PDI = 1,16) und sich nur in der Kopfgruppe unterscheiden, zeigen sie

bei der SDS-PAGE ein völlig unterschiedliches Laufverhalten. Da Lissamin Rhodamin B in den meisten Fällen keinen Einfluss auf das Laufverhalten hat, kann dieses Verhalten nur mit einem unterschiedlichen Funktionalisierungsgrad bzw. einer unterschiedlichen Belegdichte erklärt werden. Über diese Werte konnte jedoch mittels NMR Spektroskopie nur eine ungefähre Aussage getroffen werden.

Für Poly(bissulfon-co-TEGMA-Glutathion) 6-11 wurde ein ^1H -NMR-Spektrum in D_2O bei 700 MHz aufgenommen. Die genaue Zuordnung der einzelnen Signale ist nur schwer möglich, dennoch kann zwischen Polymer- und Glutathionsignalen unterschieden werden. Die Schärfe und Intensität der Signale des Peptids weist auf einen niedrigen Funktionalisierungsgrad und die Gegenwart von freiem Glutathion hin. Bei der SDS-PAGE konnte jedoch kein freies Peptid detektiert werden, welches am unteren Rand des Gels nachgewiesen hätte werden können. Interessanterweise sind darüber hinaus die Doppelbindungssignale, die bei der Eliminierung entstehen und auch bei Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8 nachgewiesen werden konnten, nicht mehr vorhanden. Daraus lässt sich schließen, dass eine Doppelbindung, sobald sie durch Eliminierung erzeugt wurde, sofort mit Glutathion reagiert und auch in diesem Fall der Schritt der Eliminierung dafür entscheidend ist, in welchem Maße die Funktionalisierung stattfindet (III-3a Beeinflussung der Gleichgewichtslage). Es handelt sich bei Glutathion um ein sterisch nicht sehr anspruchsvolles Tripeptid, so dass Peptideinheiten, die bereits am Polymerrückgrat sitzen, neu angreifende Moleküle in geringerem Maße beeinträchtigen, als dies bei der Umsetzung mit z.B. Somatostatin der Fall ist.

Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8 bietet als Grundgerüst ein enormes Potential. Es besitzt durch die Copolymerisation von TEGMA eine ausreichende Wasserlöslichkeit und ist mit einer fluoreszierenden Sonde ausgestattet, die die Verfolgung *in vivo* und *in vitro* ermöglicht. Hwang et al. polymerisierten p-Nitrophenylmethacrylat (NPMA) und 3,3'-Diethoxypropylmethacrylat (DEPMA) mittels RAFT zu den entsprechend funktionalisierten Polymeren^[2]. In beiden Fällen handelt es sich um amin- bzw. aminoxyreaktive Seitenkettenpolymere. Über ein Polymer, welches in der Gegenwart von Aminogruppen selektiv durch Thiole adressiert werden kann, ist bis jetzt nichts

bekannt. Problematisch hierbei ist, dass die Doppelbindung von Michael-Systemen auch der radikalischen Polymerisation zugänglich ist und somit geschützt werden muss^[6]. Durch die Vorhergehensweise bei der Synthese von Poly(bissulfon-co-TEGMA) ist die Doppelbindung geschützt und wird erst durch die Oxidation der Sulfide zu den Sulfonen aktiviert und Additionsreaktionen zugänglich. Eine Erhöhung des pH-Wertes in den leicht basischen Bereich bewirkt eine Entschützung der Doppelbindung auf eine sehr milde Weise.

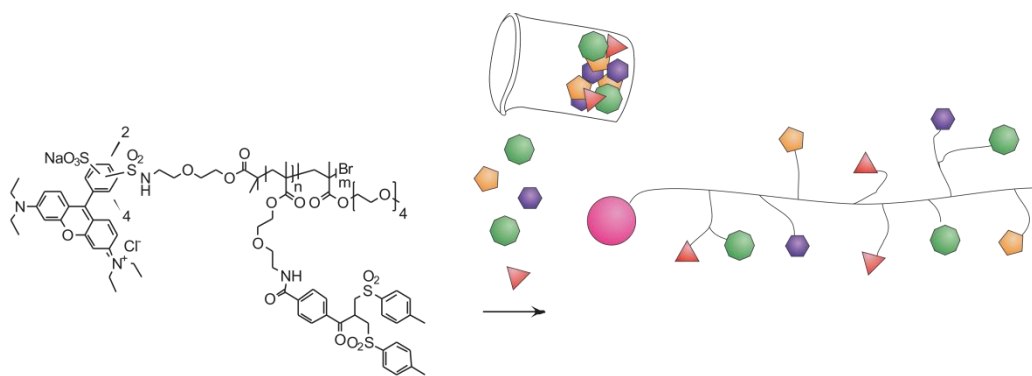


Abb VII-21 Darstellung eines möglichen „Alles in einem“-Polymer ausgehend von Poly(bissulfon-co-TEGMA)

Das Polymer enthält somit neben einer fluoreszierenden Sonde und Wasserlöslichkeit vermittelnden Spacereinheiten thiol-reaktive Einheiten, die auch in sehr unspezifischen Ansätzen umgesetzt werden könnten.

Eine Mischung mit verschiedenen funktionalen Komponenten oder Peptiden könnte daher mit dem Polymer 7-8 zu einem multifunktionalen Konjugat umgesetzt werden, bei dem jede einzelne Komponente ihre spezifische Eigenschaft an das Hybridkonjugat weitergibt (Abb VII-21). Denkbar wären hierbei z.B. die Verknüpfung mit einem Tat-Peptid, welches die Zellaufnahme des Konjugats vermittelt, mit einem NLS (nuclear localizing sequence) – Peptid, welches den Transport in den Zellkern

bewirkt und mit Wirkstoffen wie Doxorubicin, die am Zielort ihre zelltoxischen Wirkung entfalten könnten.

Literatur

- [1] aD. W. P. M. Loewik, L. Ayres, J. M. Smeenk, H. J. C. M. Van, *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *202*, 19-52; bJ. M. Smeenk, L. Ayres, H. G. Stunnenberg, J. C. M. van Hest, *Macromolecular Symposia* **2005**, *225*, 1-8; cL. Ayres, P. H. H. M. Adams, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *Biomacromolecules* **2004**, *6*, 825-831; dL. Ayres, K. Koch, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* **2005**, *38*, 1699-1704; eL. Ayres, M. R. J. Vos, P. J. H. M. Adams, I. O. Shklyarevskiy, J. C. M. van Hest, *Macromolecules* **2003**, *36*, 5967-5973; fF. Sanda, T. Endo, *Macromolecular Chemistry and Physics* **1999**, *200*, 2651-2661.
- [2] J. Y. Hwang, R. C. Li, H. D. Maynard, *J. Control. Release* **2007**, *122*, 279-286.
- [3] L. Tao, C. S. Kaddis, R. R. O. Loo, G. N. Grover, J. A. Loo, H. D. Maynard, *Macromolecules* **2009**, *42*, 8028-8033.
- [4] T. Ishizone, A. Seki, M. Hagiwara, S. Han, H. Yokoyama, A. Oyane, A. Deffieux, S. p. Carlotti, *Macromolecules* **2008**, *41*, 2963-2967.
- [5] R. Zhang, C. Xiong, M. Huang, M. Zhou, Q. Huang, X. Wen, D. Liang, C. Li, *Biomaterials* **2011**, *32*, 5872-5879.
- [6] G. H. Deng, Y. M. Chen, *Macromolecules* **2004**, *37*, 18-26.

VIII Zusammenfassung und Ausblick

Erstes Ziel dieser Arbeit beinhaltete den konsequenten Ausbau der von Lawton et al. entwickelten Methode^[1]. Diese basiert auf der hochspezifischen Funktionalisierung von Proteinen und Peptiden durch milde reduktive Spaltung der lösungsmittelzugänglichen Disulfidbrücken und anschließende Rückverbrückung durch den Einbau spezieller Reagenzien über einen konsekutiven Eliminierungs-Additionsprozess (Abb VIII-1).

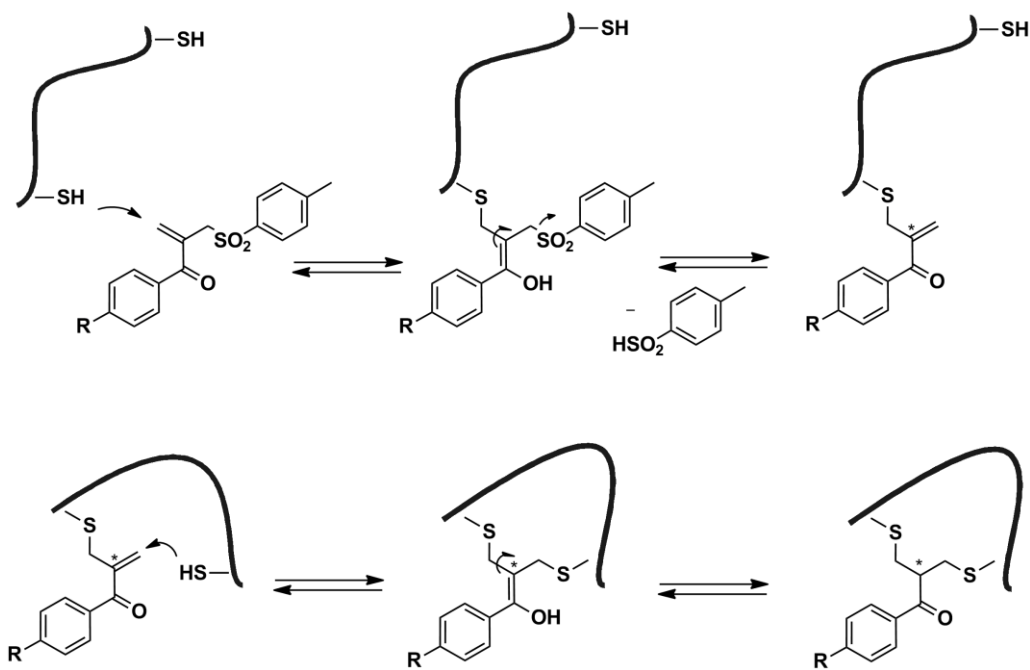


Abb VIII-1 Additions-Eliminierungsmechanismus für die Interkalation in Disulfidbrücken nach deren Reduktion nach Lawton et al.

Die Erweiterung des Linkerportfolios stellte in erster Instanz die Entwicklung von bioorthogonal funktionalisierten Systemen dar. Die Iod – sowie Ethinylmonosulfon 3-5b und 3-7 konnten als hochflexible Kernbausteine für den Aufbau komplexer Architekturen wie PAMAM-Dendrimere genutzt werden.

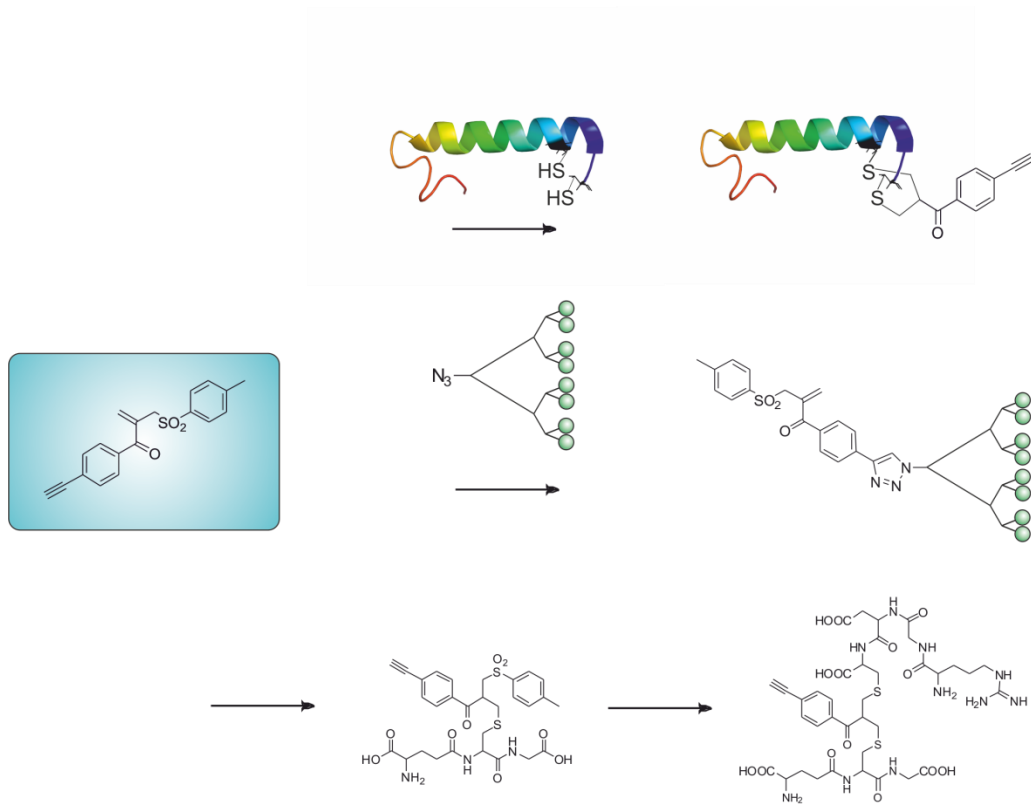


Abb VIII-2 Biorthogonale Monosulfone als leistungsfähige Schlüssel-moleküle

Bei der Umsetzung mit Biomakrolekülen, die ein ungepaartes Cystein aufweisen, konnte gezeigt werden, dass intelligente Variation von Parametern wie Lösungsmittel und pH-Wert ermöglichte, die Architektur der Biohybridkonjugate entscheidend und vorhersehbar zu beeinflussen. Darüber hinaus wurde ermittelt, dass die Natur des Substituenten in p-Position einen entscheidenden Einfluss auf die Reversibilität der Addition und somit die Stabilität des gebildeten Konjugats hat. Solche Ansätze können beispielsweise dazu genutzt werden, in Gegenwart eines Überschusses an Glutathion

ein Wirkstoffmolekül wieder freizusetzen. Dieses reversible Verhalten macht solche Konjugate sehr attraktiv für *drug delivery* Anwendungen.

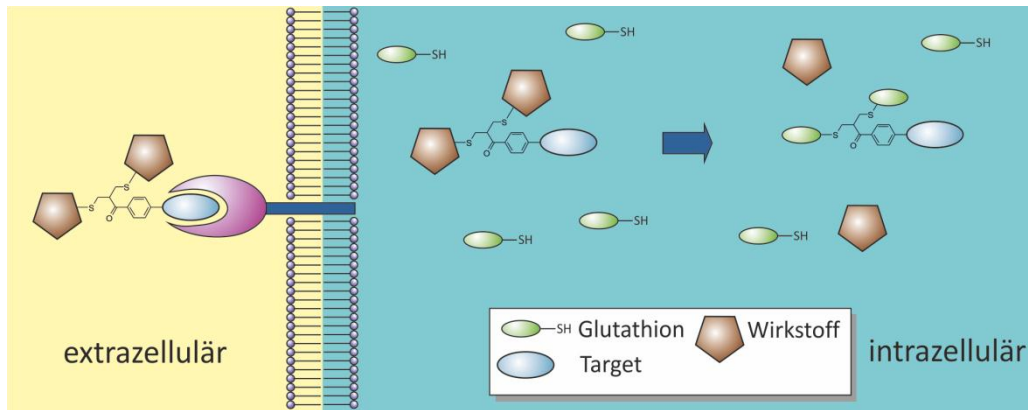


Abb VIII-3 Potentielle Anwendung von Biokonjugaten durch intrazelluläre Wirkstofffreisetzung in der Gegenwart von Glutathion

Das enorme Potential der Mono – und Bissulfone, als wertvolle Alternative zur Maleinimidderivaten zur gerichteten Adressierung von Thiolen genutzt werden zu können, zeigte sich im Falle des Maleinimidbissulfons besonders eindrucksvoll: Während die erste Addition eines Biomakromoleküls an die Maleinimidfunktion bei leicht sauren pH-Werten in kurzer Zeit erfolgte, verhielt sich die Bissulfoneinheit unter diesen Bedingungen inert. Erst die Erhöhung des pH-Wertes in den leicht basischen Bereich führte zur in-situ Eliminierung von p-Toluensulfonat und der Bildung eines zweiten Michael-Systems, welches dann zur Umsetzung mit einem zweiten Thiol genutzt werden konnte. In Zusammenarbeit mit Wang Tao konnten auf diese Weise Cys-Tat-, HSA-BSA – sowie Tat-ON-Heterokonjugate in guten Ausbeuten erhalten werden.

Drittens konnten die Monosulfone Ethinyl- sowie Iodsulfon erfolgreich selektiv in die Disulfidbrücke des peptidischen Neurohormons Somatostatin-14 interkaliert werden.

Es wurde gezeigt, dass die Rückverbrückung unter Rezyklisierung gelang. Die detaillierte Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie lieferte den eindeutigen Beweis, dass die Interkalation über den postulierten Mechanismus unter Bildung zweier diastereomerer Formen statt fand.

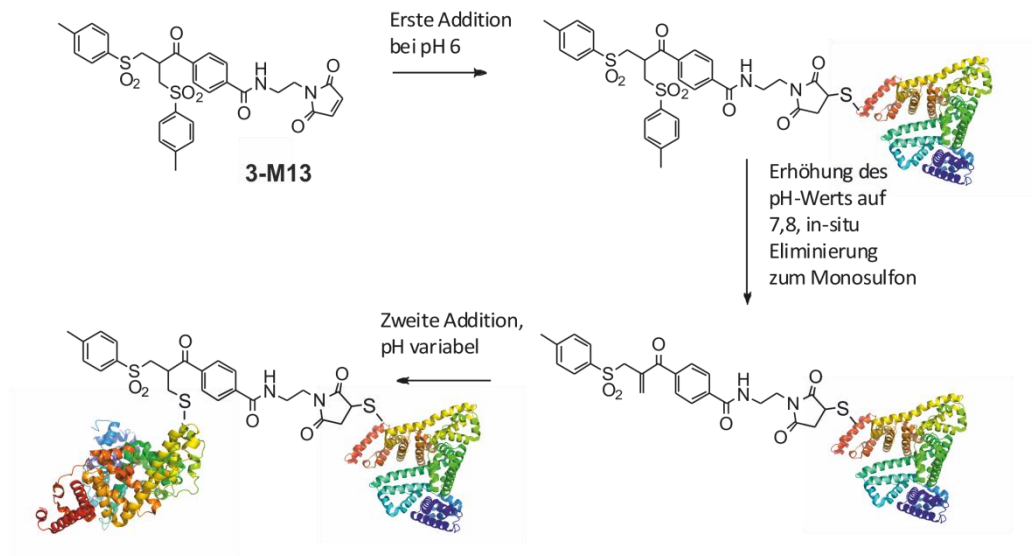


Abb VIII-4 Heterokonjugate über die Addition zweier Makromoleküle an Maleinimidbissulfon 3-M13

Die ortsgerichtete Einführung der biorthogonalen Ethynylfunktionalität ermöglichte die selektive Adressierung dieser bei der Umsetzung mit 3-Azido-7-hydroxycumarin in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition. Durch die Verknüpfung von Somatostatin mit einer fluoreszierenden Sonde, einem Lissamin Rhodamin B Derivat konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die biologische Integrität durch die Modifikation nicht beeinträchtigt wurde. Während die erfolgreiche Aufnahme in rezeptorpositive Zellen (CAPAN-2) gezeigt werden konnte, wurden die fluoreszenten Somatostatinderivate in rezeptornegative Zellen (A-549) nicht aufgenommen.

Auf diese Art und Weise erhaltene artifizielle Somatostatine könnten daher als wertvolle Targetsubstanzen für die Chemotherapie Verwendung finden. Durch die Beladung mit Zytostatika könnten solche Derivate für die selektive Aufnahme in Zellen eingesetzt werden, die Rezeptoren der SSTR-Familie überexprimieren, wie dies bei Zellen unterschiedlicher Tumortypen der Fall ist.

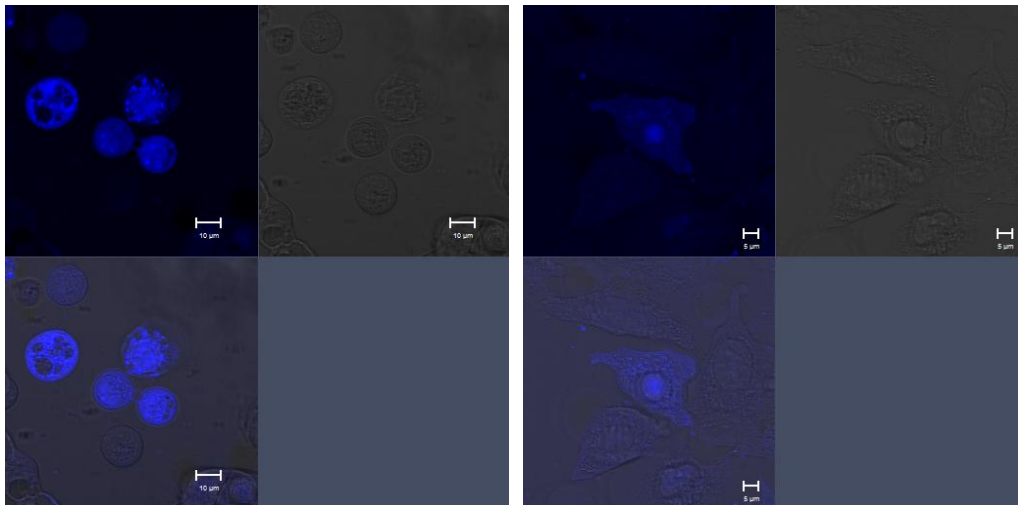


Abb VIII-5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von CAPAN-2 und A-549-Zellen nach Inkubation mit Cumarinsomatostatin 4-12 links: CAPAN-2, vesikelartige Strukturen, erhöhte Aufnahme, rechts: A-549, verminderte Aufnahme

Es stellte sich im Laufe der Arbeit jedoch heraus, dass modifizierte Somatostatine nicht nur als Targetmoleküle attraktiv sind, sondern darüber hinaus selbst ein nicht zu unterschätzendes Potential als Wirkstoffe besitzen. Iodsomatostatin zeigte im Vergleich zu nativem Somatostatin ein erhöhtes Potential, nach G-Protein-Rezeptor vermittelter Zellaufnahme selbst als aktive Substanz die Apoptose, d. h. den programmierten Zelltod, zu induzieren. Desweiteren wurden für die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) Werte im gleichen Konzentrationsbereich wie für natives Somatostatin gemessen. Die Derivate präsentieren sich somit als attraktive Therapeutika mit dualer Funktionsweise.

Im letzten Teil der Arbeit wurden Möglichkeiten zur Darstellung hochkomplexer Makrohybridarchitekturen vorgestellt. Polymer-Peptid-Konjugate wurden einerseits über die *grafting to* Methode durch Modifizierung von Somatostatin mit PEGbissulfonen und andererseits durch *grafting from* unter Verwendung eines Makroinitiators, welcher wiederum durch die Interkalation eines ATRPbissulfons in die stabilisierende Disulfidbrücke erhalten werden konnte. Dadurch konnten PHEMA- sowie PTEGMA-Somatostatine synthetisiert werden.

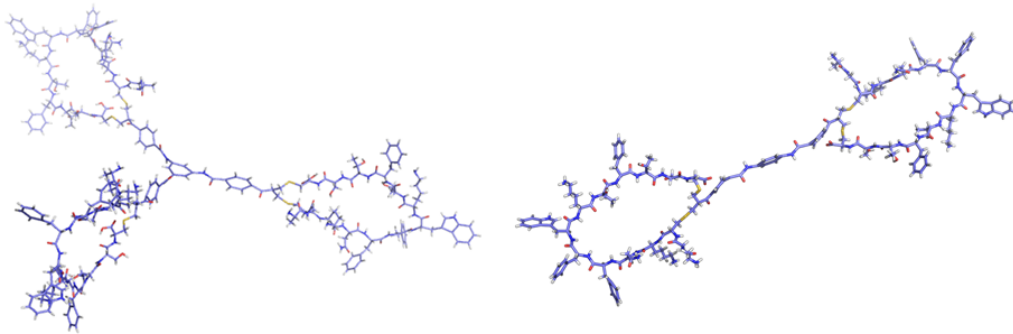


Abb VIII-6 Geometrieoptimierte 3-D-Strukturen von Somatostatin-Trimer 6-13 (links) und – Dimer 6-12 (rechts)

Multivalente Konjugate konnten durch die Synthese von hochsymmetrischen Tetra- sowie Hexasulfonen und anschließende Umsetzung mit Somatostatin erhalten werden. In Zukunft soll untersucht werden, inwieweit solche Architekturen aufgrund der definierten Anordnung ihrer Erkennungseinheiten eine überproportionale Verstärkung an entsprechenden Akzeptoren hervorrufen.

Wo liegen die Grenzen dieser Methode? Intra- und intermolekulare Reaktionen laufen in Konkurrenz zueinander ab, so dass Mehrfach- und Vernetzungsreaktion bei komplexen Systemen zur Bildung von Nebenprodukten führen können.

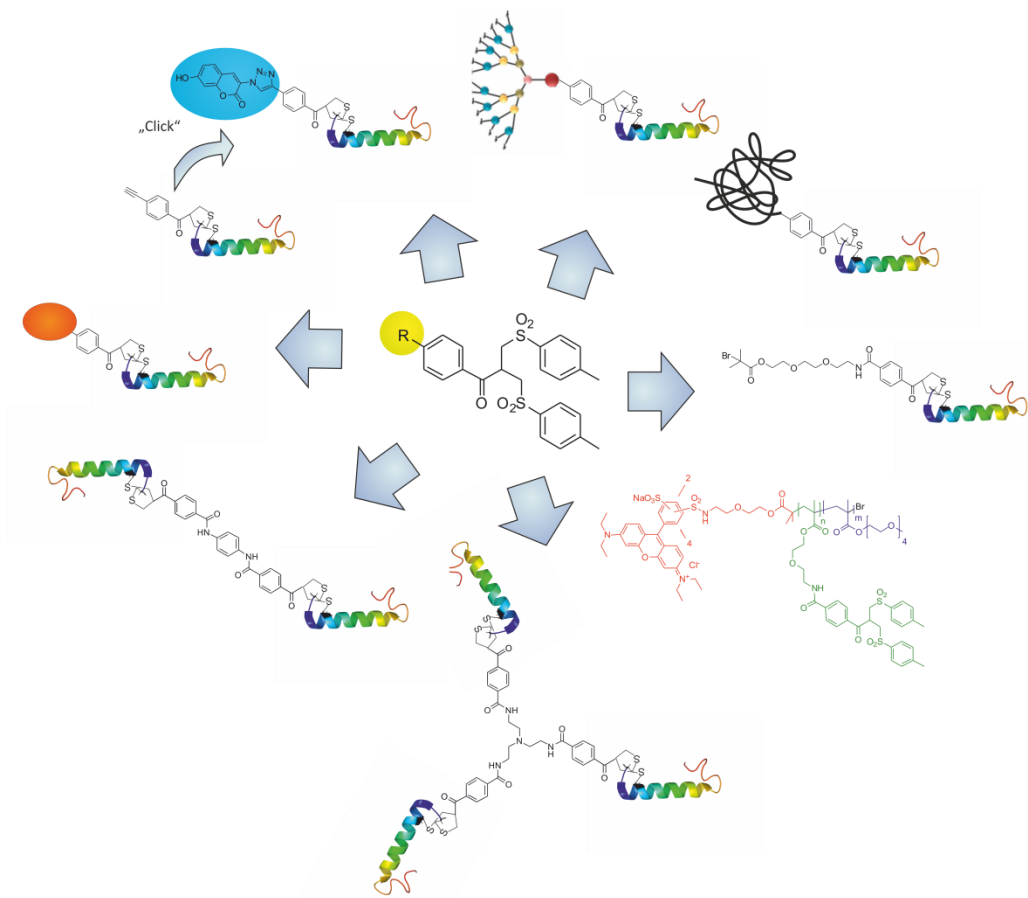


Abb VIII-6 Großer Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Materialien

Im Fall der Polyinterkalatorpolymere P(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 und 7-8, die durch lebende radikalische Polymerisation von Bissulfidmonomer 7-1 generiert wurden, wurde nach der Umsetzung mit Somatostatin Quervernetzung der Polymerstränge beobachtet. Jedoch konnte durch die Umsetzung dieser Polymere mit Glutathion gezeigt werden, dass die theoretische Möglichkeit besteht, multifunktionale Konjugate durch die Reaktion mit verschiedenen funktionalen Komponenten oder Peptiden zu erhalten bei dem jede einzelne Komponente ihre spezifische Eigenschaft an das Hybridkonjugat weitergibt (Abb VIII-7).

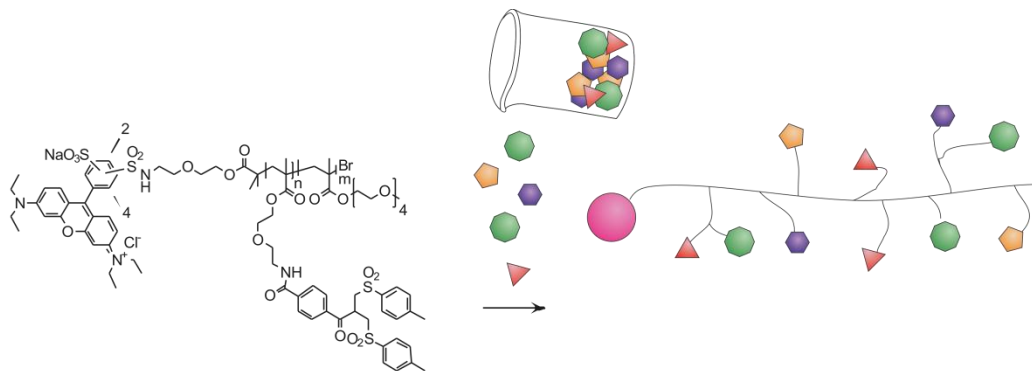


Abb VIII-7 Darstellung eines möglichen „Alles in einem“-Polymer ausgehend von Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8

Zusammenfassend gesehen ist es die ungeheure Flexibilität dieser Technik, die sie zur attraktiven Alternative der Maleinimidchemie auf dem Gebiet der ortsgerichteten Funktionalisierung von Biomakromolekülen über die Thiofunktion macht und die letztendlich aufgrund der Vielfalt ihrer Anwendungsmöglichkeiten überzeugt.

Literatur

- [1] aS. Mitra, R. G. Lawton, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3097-3110; bR. B. del Rosario, R. L. Wahl, S. J. Brocchini, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 51-59; cF. A. Liberatore, R. D. Corneau, J. M. McKearin, D. A. Pearson, B. Q. Belonfa, S. J. Brocchini, J. Kath, T. Phillips, K. Oswell, R. G. Lawton, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *7*, 36-50; dS. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J.-W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241-2252; eS. Balan, J.-W. Choi, A. Godwin, I. Teo, C. M. Laborde, S. Heidelberger, M. Zloh, S. Shaunak, S. Brocchini, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 61-76; fA. Lewis, Y. Tang, S. Brocchini, J.-w. Choi, A. Godwin, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2144-2155; gS. Brocchini, A. Godwin, S. Balan, J. W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60*, 3-12.

IX Experimenteller Teil

Material und Methoden

Folgende Geräte wurden zur Charakterisierung und Analytik der synthetisierten Substanzen eingesetzt:

Hochaufgelöste ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie

- Bruker DPX 250
- Bruker AMX 300
- Bruker DRX 500
- Bruker WS 700

Massenspektrometrie

- FD: VG Instruments, ZAB 2-SE-FPD, 8 kV
- EI: VG Instruments, TRIO-2000
- MALDI-ToF: Bruker Reflex
- ESI-ToF HR MS: Navigator 1, ThermoQuest

IR-Spektroskopie

- Nicolet FT-IR 730

UV-VIS-Spektroskopie

- Perkin-Elmer V900

Fluoreszenz-Spektroskopie

- :PEX USA Fluorolog 2 Typ F212; Detektoren: Hamamatsu PMT R508 und PMT R928,
Anregung: Xenon-Bogenlampe XBO

Elementaranalyse

- Analytisches Labor, Institut für Organische Chemie, Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz:

- C, H, N: Foss Heraeus Vario EL

FPLC und HPLC

- GE Healthcare, Äkta Explorer

- JASCO HPLC 2000 series system

- Verwendete Säulen: GE Healthcare, Superose 6 und 12, GE Healthcare, RESOURCE
RPC 3ml, Fa. Merck, LiChroPrep C 18, 310 x 25 mm, Dr. Maisch GmbH, ReproSil 100
C18, 5 µm (250 x 4,6 mm), Dr. Maisch GmbH, ReproSil-PQ-JASCO, 5 µm (250 x 10
mm), Dr. Maisch GmbH, ReproSil 100 C18, 5 µm (250 x 20 mm),

Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von ABCR, Acros, Bio-Rad Laboratories Inc., Organics, Fluka, Merck, Riedel-de-Haën und Sigma-Aldrich bezogen und in Einzelfällen durch Destillation oder Säulenchromatographie gereinigt. Somatostatin Acetat wurde bei Chengdu CP Biochem Co., Ltd bezogen. Die NMR-Spektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln der Firma Deutero GmbH gemessen. Die Reinheitsgrade der eingesetzten Lösungsmittel waren „zur Analyse (p.A.)“ bzw. „Chromasolv“.

Schutzgas

Für Reaktionen unter Inertgasatmosphäre wurde Argon der Firma Linda verwendet, welches zuvor durch Hydro- und Oxysorbfilter der Firma Messer-Griessheim von Sauerstoff- und Feuchtigkeitsspuren befreit wurde.

Dünnschichtchromatographie

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumfolien 60 F 254 der Firma Merck verwendet. Die Detektion der Chromatographiezonen erfolgte durch Eigenfarbe, Fluoreszenzlösung bei 254 nm, Eigenfluoreszenz bei 366 nm sowie durch Anfärbung mit Ioddämpfen, Kaliumpermanganatlösung, Phosphormolybdatlösung und Ninhydrin.

Präparative Säulenchromatographie

Zur säulenchromatographischen Trennung wurde als stationäre Phase Kieselgel der Korngröße 0.063 mm - 0.200 mm der Firma Merck verwendet. Zur säulenchromatographischen Aufreinigung durch Ionenaustauschchromatographie wurde Dowex 50Wx4-100 der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt.

Aufreinigung der Peptidkonjugate

Für die Aufreinigung der Peptidmodifikationen mittels Gel-Permeations-Chromatographie wurden zur Entsalzung PD-10 Säulen der Firma GE Healthcare verwendet. Desweiteren wurden Superose 6 und Superose 12 Säulen von GE Healthcare eingesetzt. Reversed Phase Chromatographie wurde mit Hilfe einer RESOURCE RPC 3ml von GE Healthcare oder einer LiChromPrep C18 Säule durchgeführt. Die gewählten Flussraten betragen 2 ml bzw. 4 ml pro Minute. Es wurde ein linearer Gradient von Puffer A nach Puffer B verwendet, dabei wurden unterschiedliche Pufferzusammensetzungen und Steigungen gewählt. Die Aufreinigung mittels präparativer HPLC wurde mit einem JASCO HPLC 2000 Series System und einer ReproSil 100 C18, 5 µm (250 x 20 mm) durchgeführt. Dabei wurde in linearer Gradient von Puffer B (10%, drei Minuten, 10-70%, 21 Minuten, 70-100%, 0.5 Minuten und 100%, 9,5 Minuten) in Puffer A (Puffer A: 0,1% Trifluoressigsäure in H₂O und Puffer B: 0,1 Trifluoressigsäure in 95% MeCN, 5% H₂O) verwendet. Die Analyse mittels analytischer HPLC erfolgte mit einer Reprisil 100 C18, 5 µm (250 x 4,6 mm) bzw. einer ReproSil C18-PQ-JASCO, 5 µm (250 x 10 mm).

SDS-Gelelektrophorese

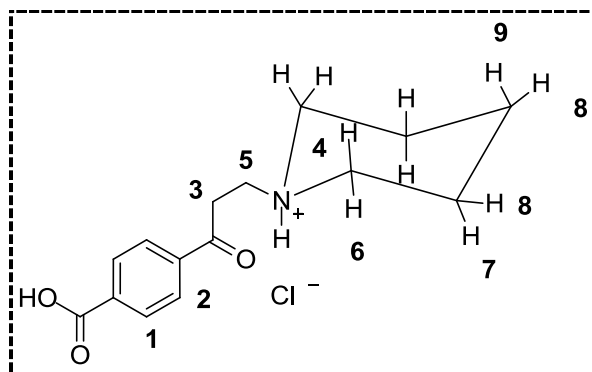
Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden NuPAGE 4-12% Bis-Tris, NuPAGE 10% Bis-Tris – sowie Novex 10-20% Tricine Gele der Firma Invitrogen verwendet. Als Laufpuffer diente NuPAGE Mes Running Buffer (20x) bzw. Novex Tricine Running Buffer, als Auftragspuffer wurde NuPAGE LDS bzw. Novex Tricine Sample Buffer (4x) der Firma Invitrogen verwendet. Zur Reduktion wurde NuPAGE Sample Reducing Agent (10x) von Invitrogen verwendet. Zum Vergleich wurde als Molekulargewichtsstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas eingesetzt. Die Probenvorbereitung wurde folgendermaßen durchgeführt: 5-13 µl Probenlösung wurden mit 5 µl Auftragspuffer, 2 µl Reduktionsmittel und 8-0 µl H₂O vermischt und für vier Minuten bei 95°C inkubiert. Aufgetragen wurden je nach Konzentration 5-20 µl Lösung. Die Laufzeit der Gele betrug 30 Minuten bei 200 Volt,

Coomassie Staining erfolgte durch Inkubation in Imperial™ Protein Stain bzw. SimplyBlue™ SafeStain von Invitrogen.

Zellexperimente

Die Zelllinien A-549 und CAPAN-2 wurden von der DSMZ bezogen (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen). Die verwendeten Medien und Zusätze wurden von Gibco (Invitrogen, Mannheim) erhalten. Die Verbrauchsgegenstände aus Plastik, Wellplatten, Kulturbehälter etc. stammten von GreinerBioOne (Frickenhausen).

Organische Synthesen

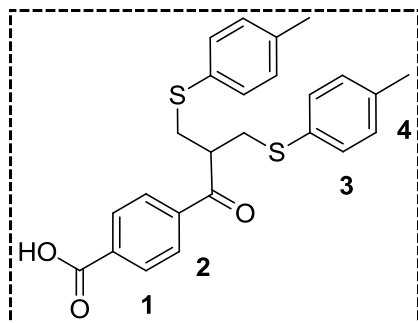
(1-[3-(4-Carboxyphenyl)-3-oxopropyl]piperidinium HCl) 4-7^[1]

p-Carboxyacetophenon 4-6 (25,8 g, 0,16 mol), Piperidinhydrochlorid (19,1 g, 0,16 mol) und Paraformaldehyd (28,2 g, 0,94 mol) werden in 155 ml absolutem EtOH gelöst. Dazu wird 37%ige HCl (1,54 ml, 0,016 mol) vorsichtig hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wird auf 105°C erhitzt. Nach vier Stunden Rühren wird erneut Paraformaldehyd (14,1 g, 0,16 mol) zugeben und die Lösung weitere zehn Stunden gerührt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fällt ein farbloser Feststoff aus, dessen Löslichkeit durch Zugabe von 150 ml Aceton weiter verringert wird. Der Feststoff wird abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet. Für analytische Reinheit wird die Substanz in EtOH umkristallisiert und aufgereinigt.

Ausbeute: 30,03 g (0,104 mol, 66%) als farbloser Feststoff

Die Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[1]

4-[3-(4-Thiotoyl)-2-(4-thiotoyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoesäure 4-8^[1]



p-Carboxy Mannich Salz 4-7 (30 g, 0,1 mol) und p-Thiokresol (25 g, 0,2 mol) werden in 104 ml absolutem EtOH und 70 ml MeOH vorgelegt und mit 37% (wt/vol) wässrige Formaldehydlösung (60 ml) und Piperidin (4,3 ml) versetzt. Die Lösung wird für vier Stunden auf 105°C erhitzt. Nach einer Stunde wird erneut Formalin (30 ml) zugegeben. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Lösungsmittel unter Vakuum abdestilliert und der erhaltene Rückstand in 50 ml MeOH umkristallisiert. Die cremige Substanz wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 22,8 g (0,052 mol, 52,2%) als cremefarbener Feststoff

Schmelzpunkt: 145-146°C (Lit. 142-143°C)

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 435,4 (100%)

(berechnet für $C_{25}H_{24}O_7S_2 = 498,74$)

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CDCl₃, 293 K):

δ 8,06 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-1), 7,62 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2), 7,15 (d, $J = 8,2$ Hz, 4H, H-3), 7,07 (d, $J = 8,0$ Hz, 4H, H-4), 3,82 (p, $J = 6,7$ Hz, 1H, -CH-), 3,21 (A₂B₂X, $J = 13,6, 6,7$ Hz, 4H, -CH₂-), 2,36 (s, 6H, -CH₃)

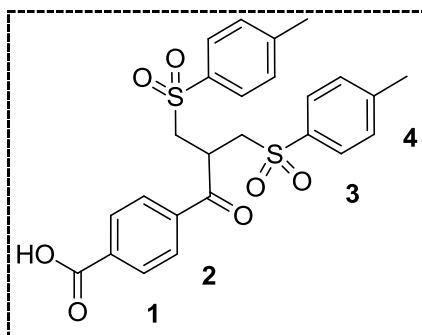
¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CDCl₃, 293 K):

δ 200,61 (-COOH), 171,21 (-C=O), 140,72 (C-Ar), 137,39 (C-Ar), 133,04 (C-Ar), 131,68 (C-Ar), 131,21 (C-Ar), 130,43 (C-Ar), 129,99 (C-Ar), 128,47 (C-Ar), 46,03 (-CH-), 36,52 (-CH₂-), 21,23 (-CH₃)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm⁻¹] 729, 800, 901, 1010, 1090, 1240, 1270, 1400, 1490, 1680, 2530, 2920

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 253,5 (27635)

4-[3-(4-Tosyl)-2-(4-tosyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoesäure 4-9^[1]

p-Carboxybissulfid 4-8 (9 g, 20,6 mmol) wird in einer 1:1 Mischung aus Methanol und destilliertem H₂O (300 ml) gelöst und Kaliumperoxomonosulfat (76 g, 0,12 mol) zugegeben. Die resultierende Suspension wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Chloroform (150 ml) wird die wässrige Phase erneut mit Chloroform (150 ml) gewaschen werden und zusätzlich mit H₂O (300 ml) versetzt um die restlichen Salze in Lösung zu bringen. Die wässrige Phase wird ein drittes Mal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Extrakte werden vereinigt und mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 9,3 g (18,6 mmol, 90%) als cremefarbener Feststoff

Schmelzpunkt: 232-234°C

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

$$m/z (\text{u e}_0^{-1}) = 550,3 (100\%)$$

(berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{S}_2 = 550,1$)

 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3 , 293 K):

δ 8,09 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, H-1), 7,75 – 7,66 (m, 6H, H-2 und H-3), 7,36 (d, $J = 8,1$ Hz, 4H, H-4), 4,47–4,33 (m, 1H, -CH-), 3,57 ($\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$, $J = 14,3, 6,2$ Hz, 4H, - CH_2 -), 2,48 (s, 6H, - CH_3),

 $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz, CDCl_3 , 293 K):

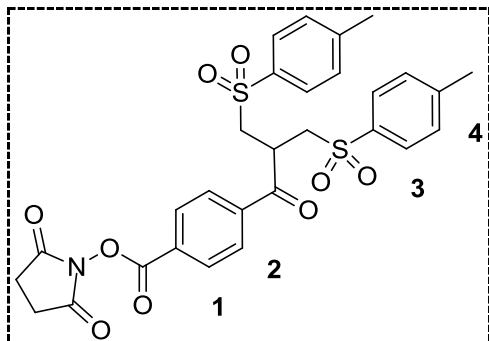
δ 195,40 (-COOH), 170,02 (-C=O), 145,62 (C-Ar), 138,18 (C-Ar), 135,30 (C-Ar), 133,76 (C-Ar), 130,57 (C-Ar), 130,22 (C-Ar), 128,57 (C-Ar), 128,34 (C-Ar), 55,67 (-CH-), 35,73 (- CH_2 -), 21,73 (- CH_3)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm^{-1}] 930, 1150, 1290, 1410, 1590, 1680, 2430, 2940

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ϵ) 227,5 (24389), 254 (17113)

(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)-4-[3-(4-tosyl)-2-(4-tosyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoesäureester 4-10^[1]



p-Carboxybissulfon 4-9 (2 g, 4,0 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (0,483 g, 4,2 mmol) werden in einem trockenem Schlenkkolben unter Argon vorgelegt und in trockenem DCM (5 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird auf 4°C gekühlt. Durch ein Septum wird DIPC (657 μ l, 4,2 mmol) injiziert und die Mischung bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Nach anderthalb Stunden Reaktionszeit wird erneut DIPC (60 μ l, 0,38 mmol) zugegeben. Nach Entfernen der Inertgasatmosphäre wird die Suspension durch Baumwolle gefiltert, um den ausgefallen Diisopropylharnstoff zu entfernen. Das Filtrat wird mit DCM verdünnt und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,5 g (2,6 mmol, 64%) als farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 168-169°C

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃, 298,3 K):

δ 8,12 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, **H-1**), 7,74 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, **H-2**), 7,68 (d, $J = 8,3$ Hz, 4H, **H-3**), 7,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 4H, **H-4**), 4,42–4,29 (m, 1H, **-CH-**), 3,64–3,54 (m, 4H, **-CH-(CH₂)₂-**), 2,93 (s, 4H, **-(CH₂)₂-**), 2,47 (s, 6H, **-CH₃**),

¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CDCl₃, 298,3 K):

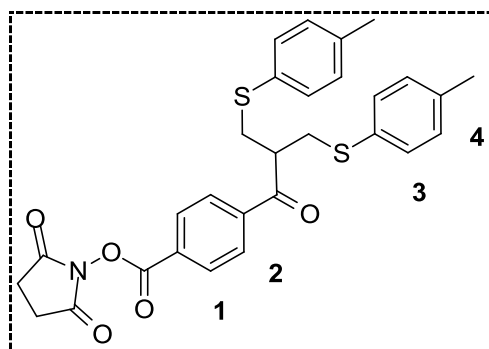
δ 195,39 (-COOR), 169,04 (-C=O, Keton), 161,06 (-C=O, Imid), (145,76 (C-Ar), 139,20 (C-Ar), 135,37 (C-Ar), 131,04 (C-Ar), 130,36 (C-Ar), 129,7 (C-Ar), 128,84 (C-Ar), 128,40 (C-Ar), 55,77 (-CH-), 35,98 (-CH-(CH₂)₂-), 25,81 (, -(CH₂)₂-), 21,23 (-CH₃)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm⁻¹] 852, 999, 1140, 1300, 1410, 1590, 1690, 1740, 1770, 2970

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 227,5 (268081), 255 (20409)

(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)-4-[3-(4-thiotolyl)-2-(4-thiotolyl)methyl]-1-oxopropyl] benzooesäureester 5-2^[2]



p-Carboxybissulfid 4-8 (10,9 g, 25 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (3 g, 26,3 mmol) werden in einem trockenem Schlenkcolben unter Argon vorgelegt und in trockenem DCM (15 ml) gelöst. Die Reaktionslösung wird auf 4°C gekühlt. Durch ein Septum wird DIPC (4 ml, 26,3 mmol) injiziert und die Mischung bei Raumtemperatur für drei Stunden gerührt. Nach anderthalb Stunden Reaktionszeit wird erneut DIPC (365 µl, 2,4 mmol) zugegeben. Nach Entfernen der Inertgasatmosphäre wird die Suspension durch Baumwolle gefiltert, um den ausgefallenen Diisopropylharnstoff zu entfernen. Das Filtrat wird mit DCM verdünnt und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 12,7 g (24,5 mmol, 98%) als farbloser Feststoff

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 533,6 (100%)

(berechnet für $C_{29}H_{27}NO_5S_2 = 533,13$)

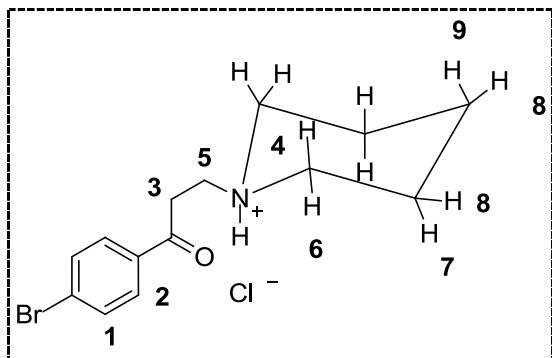
1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $CDCl_3$, 298,3 K):

δ 8.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, **H-1**), 7.59 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, **H-2**), 7.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H, **H-3**), 7.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H, **H-4**), 3.83 – 3.73 (m, 1H, **-CH-**), 3.18 (A_2B_2X , $J = 13.6, 6.8$ Hz, 4H, **-CH₂-**), 2.90 (s, 4H, **-CH₂-CH₂-**), 2.33 (s, 6H, **-CH₃**).

^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, $CDCl_3$, 298,3 K)::

δ 200,32 (**-COOR**), 169,10 (**-C=O**, Imid), 161,19 (**-C=O**, Keton), 141,31 (**C-Ar**), 137,35 (**C-Ar**), 137,24 (**C-Ar**), 131,58 (**C-Ar**), 130,96 (**C-Ar**), 130,66 (**C-Ar**), 129,94 (**C-Ar**), 128,81 (**C-Ar**), 128,51 (**C-Ar**), 45,9 (**-CH-**), 36,36 (**-CH-(CH₂)₂-**), 25,73 (**-(CH₂)₂-**), 21,12 (**-CH₃**)

1-[3-(4-Bromo-phenyl)-3-oxo-propyl]-piperidinium HCl 3-2a



p-Bromoacetophenon 3-1a (25,8 g, 0,16 mol), Piperidinhydrochlorid (19,1 g, 0,16 mol) und Paraformaldehyd (28,2 g, 0,94 mol) werden in 155 ml absolutem EtOH gelöst. Dazu wird 37%ige HCl (1,54 ml, 0,016 mol) vorsichtig hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wird auf 105°C erhitzt. Nach vier Stunden Rühren wird erneut Paraformaldehyd (14,1 g, 0,16 mol) zugeben und die Lösung weitere zehn Stunden

gerührt. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fällt ein farbloser Feststoff aus, dessen Löslichkeit durch Zugabe von 150 ml Aceton weiter verringert wird. Der Feststoff wird abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet. Für analytische Reinheit wird die Substanz in EtOH umkristallisiert und aufgereinigt.

Ausbeute: 4,4 g (0,104 mol, 47%) als farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: Braunfärbung bei 212°C, schmilzt bei 203-205°C unter Zersetzung

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 294,8 (100%)

(berechnet für $C_{14}H_{18}BrNO$ = 295,1)

1H -NMR-Spektrum (500 MHz, $CDCl_3$, 298,3 K):

δ 12,25 (s, 1H, -NH-), 7,85 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-1), 7,59 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-2), 3,80 (t, J = 7,0 Hz, 2H, H-3), 3,51 (d, J = 11,9 Hz, 2H, H-4), 3,41 (dd, J = 12,5, 6,8 Hz, 2H, H-5), 2,70 (qd, J = 12,1, 2,3 Hz, 2H, H-6), 2,32 – 2,13 (m, 2H, H-7), 1,94 – 1,79 (m, 3H, H-8), 1,51 – 1,34 (m, 1H, H-9)

^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, $CDCl_3$, 298,3 K):

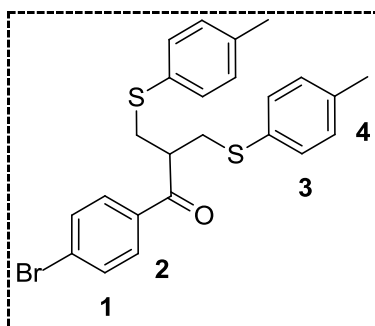
δ 195,26 (-C=O), 134,25 (C-Ar), 132,18 (C-Ar), 129,80 (C-Ar), 129,38 (C-Ar), 53,85 (C-4), 51,97 (C-5), 33,28 (C-3), 22,63 (C-7), 21,98 (C-8)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm^{-1}] 953, 1070, 1220, 1400, 1450, 1590, 1680, 2530, 2920

UV/VIS (H_2O) λ_{max} (ϵ) 267,5 (5408)

4-[2,2-Bis[(4-tolylthio)-methyl]bromo]acetophenon 3-3a



p-Brom-Mannich Salz 3-2a (30 g, 0,1 mol) und p-Thiokresol (25 g, 0,2 mol) werden in 104 ml absolutem EtOH vorgelegt und mit 37% (wt/vol) wässrige Formaldehydlösung (60 ml) und Piperidin (4,3 ml) versetzt. Die Lösung wird für vier Stunden auf 105°C erhitzt. Nach einer Stunde wird erneut Formalin (30 ml) zugegeben. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Lösungsmittel unter Vakuum abdestilliert und der erhaltene Rückstand in 50 ml MeOH umkristallisiert. Die cremige Substanz wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,6 g (5,5 mmol, 45%) als farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 87-88°C

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 470,1 (100%) und 471,1 (98 %)

(berechnet für $C_{24}H_{23}BrOS_2$ = 470,04 (93 %) und 471,04 (100 %))

1H -NMR-Spektrum (250 MHz, $CDCl_3$, 293 K):

δ 8,04 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-1), 7,61 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-2), 7,14 (d, J = 8,2 Hz, 4H, H-3), 7,06 (d, J = 8,1 Hz, 4H, H-4), 3,81 (p, J = 6,7 Hz, 1H, -CH-), 3,21 (A_2B_2X , J = 13,6, 6,7 Hz, 4H, -CH₂-), 2,36 (s, 6H, -CH₃)

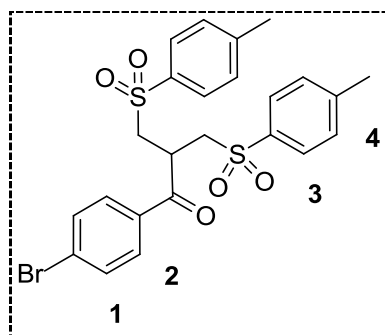
^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, $CDCl_3$, 298,3 K):

δ 195,76 (-C=O), 137,17 (C-Ar), 135,33 (C-Ar), 131,78 (C-Ar), 131,52 (C-Ar), 131,20 (C-Ar), 129,89 (C-Ar), 129,83 (C-Ar), 128,59 (C-Ar), 45,37 (-CH-), 36,42 (-CH₂-), 21,11 (-CH₃)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm^{-1}] 935, 1070, 1180, 1280, 1420, 1490, 1580, 1680, 2530, 2920

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ϵ) 256,5 (26826)

4-[2,2-Bis[(4-tosyl)-methyl]iodo] acetophenone 3-4a

p-Bromobissulfid 3-3a (19,5 mg, 0,04 mmol) und Kaliumperoxomonosulfat (102 mg, 0,16 mmol) werden in EtOAc/CH₃CN/H₂O (6:6:1, 1,1 ml) suspendiert. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann filtriert und mit DCM/H₂O (1:1, 4 ml) verdünnt. Die wässrige Phase wird zweimal mit DCM extrahiert und die organischen Extrakte mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Produkt als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 21 mg (0,038 mmol, 95%), farbloses Öl

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 534,0 (100%) und 536,0 (98%)

(berechnet für C₂₄H₂₃BrO₇S₂ = 534,02 (94,1%) und 536,01 (100%))

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CD₂Cl₂, 293 K):

δ 7,56 (d, J = 8,3 Hz, 4H, H-3), 7,45 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-1), 7,38 – 7,25 (m, 6H, H-2 und H-4), 4,18 – 4,06 (m, 1H, -CH-), 3,44 (A₂B₂X, J = 14,4, 6,3 Hz, 4H, -CH₂-), 2,39 (s, 6H, -CH₃)

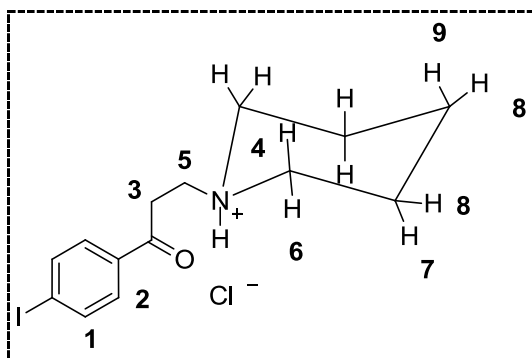
¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CDCl₃, 293 K):

δ 195,30 (-C=O), 146,30 (C-Ar), 135,92 (C-Ar), 133,72 (C-Ar), 132,76 (C-Ar), 130,75 (C-Ar), 130,46 (C-Ar), 129,92 (C-Ar), 128,78 (C-Ar), 56,18 (-CH-), 35,99 (-CH₂-), 22,02 (-CH₃)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

810, 926, 1070, 1140, 1290, 1400, 1580, 1680, 2930

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 224,5 (24135), 255 (17913)

(1-[3-(4-Iod-phenyl)-3-oxo-propyl])-piperidinium HCl 3-2b

p-Iodacetophenon 3-2a (3,7 g, 15 mmol), Piperidinhydrochlorid (1,8 g, 15 mmol) und Paraformaldehyd (1,4 g, 45 mmol) werden in absolutem EtOH (15 ml) gelöst. Dazu wird 37%ige HCl (0,15 ml) vorsichtig hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wird auf 105°C erhitzt und für neun Stunden gerührt. Nach drei Stunden Reaktionszeit wird erneut Paraformaldehyd (1,4 g, 45 mmol) hinzugegeben. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur fällt ein farbloser Feststoff aus, dieser wird abgesaugt und aus MeOH/DCM umkristallisiert.

Ausbeute: 3,84 g (10,1 mmol, 67,5%) als farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: Braunfärbung bei 212°C, schmilzt bei 214-216°C unter Zersetzung

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

$$m/z (\text{u e}_0^{-1}) = 342,6 (100\%)$$

(berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{INO} = 343,04$)

 $^1\text{H-NMR-Spektrum (250 MHz, } \text{CD}_2\text{Cl}_2, 298,3 \text{ K):}$

δ 12,53 (s, 1H, -NH-), 7,88 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-1), 7,73 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-2), 3,77 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, H-3), 3,48 (d, $J = 12,6$ Hz, 2H, H-4), 3,37 (dd, $J = 12,3, 7,1$ Hz, 2H, H-5), 2,68 (qd, $J = 12,2, 2,9$ Hz, 2H, H-6), 2,31 – 2,08 (m, 2H, H-7), 1,95 – 1,77 (m, 3H, H-8), 1,53 – 1,32 (m, 1 H, H-9)

 $^{13}\text{C-NMR-Spektrum (75 MHz, } \text{CD}_2\text{Cl}_2, 298,3 \text{ K)::}$

δ 195,62 (-C=O), 138,23 (C-Ar), 134,75 (C-Ar), 129,62 (C-Ar), 98,50 (C-Ar (Iod)), 51,96 (C-4), 51,96(C-5), 33,21 (C-3), 22,64 (C-7), 22,03(C-8)

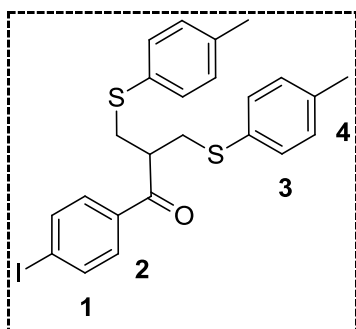
FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm^{-1}] 802, 830, 882, 921, 996, 1090, 1180, 1220, 1360, 1400, 1490, 1580, 1600, 1680, 2860, 2940, 3020

UV/VIS (H_2O): λ_{max} (ϵ) 275 (14510)

HRMS (ESI) calc. 344,0511 exp. 344,0515

4-[2,2-Bis[(4-tolylthio)-methyl]iod]acetophenon 3-3b



p-Iod Mannich Salz 3-2b (2 g, 5,4 mmol) und p-Thiokresol (1,34 g, 10,8 mmol) werden in 104 ml absolutem EtOH (10 ml) vorgelegt und mit 37% (wt/vol) wässrige Formaldehydlösung (1,6 ml) und Piperidin (0,23 ml) versetzt. Die Lösung wird für zwölf Stunden auf 105°C erhitzt. Nach je drei Stunden Reaktionszeit wird erneut Formalin (1,6 ml) zugegeben. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur fällt die Substanz als farbloser Feststoff aus, welcher abgesaugt und an Kieselgel mit Hexan/Aceton (2:1) als Eluens säulenchromatographisch aufgereinigt wird.

Ausbeute: 1,8 g (5,5 mmol, 63%) als farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 109°C

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 518,02 (100%)

(berechnet für $C_{24}H_{23}IOS_2$ = 518,02)

1H -NMR-Spektrum (250 MHz, $CDCl_3$, 293 K):

δ 7,71 (d, J = 8,6 Hz, 2H, **H-1**), 7,23 (d, J = 8,6 Hz, 2H, **H-2**), 7,13 (d, J = 8,4 Hz, 4H, **H-3**), 7,07 (d, J = 8,2 Hz, 4H, **H-4**), 3,70 (p, J = 6,8 Hz, 1H, **-CH-**), 3,17 (A_2B_2X , J = 13,6, 6,8 Hz, 4H, **-CH₂-**), 2,34 (s, 6H, **-CH₃**)

¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CDCl₃, 298,3 K)::

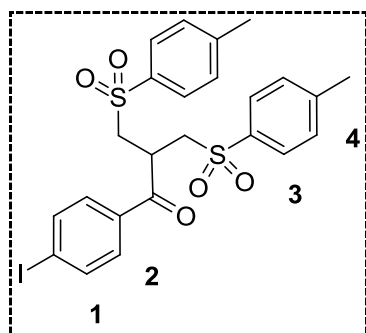
δ 200,09 (-C=O), 137,80 (C-Ar), 137,54 (C-Ar), 137,16 (C-Ar), 131,50 (C-Ar), 131,21 (C-Ar), 129,82 (C-Ar), 129,89 (C-Ar), 129,74 (C-Ar), 101,46 (C-Ar), 45,33 (-CH-), 36,41 (-CH₂-), 21,11 (-CH₃)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm⁻¹] 740, 802, 868, 928, 1020, 1140, 1200, 1240, 1300, 1390, 1420, 1490, 1580, 1680, 2910, 3020, 3090

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 258 (29550)

HRMS (ESI) calc. 541,0133 exp. 541,0141

4-[2,2-Bis[(4-tosyl)-methyl]iodo] acetophenon 3-4b

p-Iodobissulfid 3-3b (0,2 g, 0,4 mmol) und Kaliumperoxomonosulfat (0,95 g, 1,54 mmol) werden in EtOAc/CH₃CN/H₂O (6:6:1, 8 ml) suspendiert. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann filtriert und mit EtOH/H₂O (1:1, 100 ml) verdünnt. Die wässrige Phase wird zweimal mit EtOAc extrahiert und die organischen Extrakte mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 210 mg (0,36 mmol, 90%), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 144°C

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

$$m/z (\text{u e}_0^{-1}) = 581,8 (100\%)$$

(berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{IO}_7\text{S}_2 = 582,0$)

 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3 , 293 K):

δ 7,76 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-1), 7,72 (d, $J = 8,3$ Hz, 4H, H-3), 7,4-7,25 (m, 6H, H-2 und H-4), 4,33 (p, $J = 6,3$ Hz, 1H, -CH-), 3,55 ($\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$, $J = 14,3, 6,3$ Hz, 4H, - CH_2 -), 2,48 (s, 6H, - CH_3)

 $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz, CDCl_3 , 293 K):

δ 200,09 (-C=O), 145,49 (C-Ar), 138,24 (C-Ar), 137,63 (C-Ar), 135,39 (C-Ar), 130,16 (C-Ar), 129,81 (C-Ar), 128,33 (C-Ar), 112,02 (C-Ar), 55,68 (-CH-), 35,73 (- CH_2 -), 21,72 (- CH_3)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

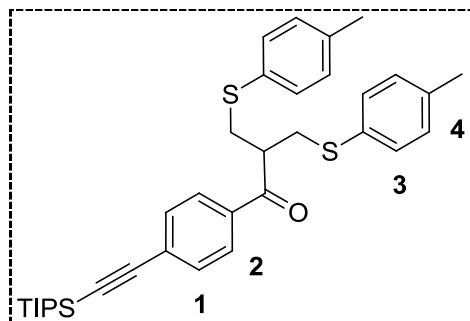
ν [cm^{-1}] 740, 802, 868, 928, 1000, 1020, 1090, 1140, 1170, 1200, 1240, 1300, 1390, 1420, 1490, 1580, 1680, 2910, 2980, 3020, 3090

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ϵ) 225 (14210), 274 (3877)

HRMS (ESI) calc. 604,9929 exp. 604,9958

4-[2,2-Bis[(4-tolylthio)-methyl]triisopropylsilylethynyl]acetophenon

3-6



In einem trockenem Schlenkrohr werden unter Argonatmosphäre p-Iodbissulfid 3-3b (0,3 g, 0,58 mmol), Triisopropylsilylacetylen (0,15 ml, 0,67 mmol), Kupfer(I)iodid (0,023 g 0,03 mmol) und PdCl₂(PPh₃)₂ (0,023 g, 0,06 mmol) in trockenem THF/Et₃N vorgelegt. Die Lösung wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Wasser (50 ml) und 3 M HCl (25 ml) verdünnt und dreimal mit DCM (80 ml) extrahiert. Alle organischen Extrakte werden vereinigt, mit gesättigter Ammoniumchloridlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton (3:1) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 105 mg (5,5 mmol, 96%) als farbloses Öl

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 573,1 (100%)

(berechnet für C₃₅H₄₄OS₂Si = 572,26)

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CDCl₃, 293 K):

δ 7,49 (d, J = 8,6 Hz, 2H, **H-2**), 7,39 (d, J = 8,6 Hz, 2H, **H-1**), 7,15 (d, J = 8,2 Hz, 4H, **H-3**), 7,06 (d, J = 8,0 Hz, 4H, **H-4**), 3,76 (p, J = 6,7 Hz, 1H, -CH-), 3,18 (A₂B₂X, J = 13,5, 6,8 Hz, 4H, -(CH₂)₂-), 2,35 (s, 6H, -CH₃), 1,14 (s, 21H, -CH-(CH₃)₂)

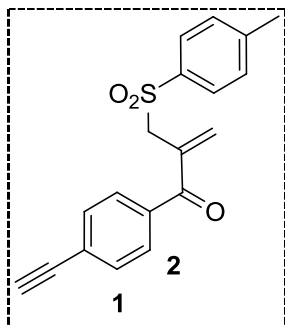
¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CDCl₃, 298,3 K)::

δ 199,93 (-C=O), 137,08 (C-Ar), 135,71 (C-Ar), 132,02 (C-Ar), 131,51 (C-Ar), 129,81 (C-Ar), 128,52 (C-Ar), 128,21 (C-Ar), 106,07 (C-Ar), 45,37 (-CH-), 36,46 (-CH₂-), 21,07 (-CH₃)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm⁻¹] 802, 830, 882, 921, 996, 1090, 1180, 1220, 1360, 1400, 1490, 1580, 1600, 1680, 2860, 2940, 3020

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 283 (41840)

[3-(4-ethynyl-phenyl)-3-oxo-1-[(4-tosyl)methyl]propen 3-7

tips-Ethinylbissulfid 3-6 (0,105 g, 0,18 mmol) und Kaliumperoxomonosulfat (0,443 g, 0,72 mmol) werden in DCM suspendiert und die erhaltene Suspension für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die restlichen Salze werden dann durch Filtration entfernt und das Filtrat wird unter Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in trockenem THF (10 ml) wieder aufgenommen und mit Tetrabutylammoniumfluorid (0,094 g, 0,36 mmol) versetzt. Nach zehn Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von Wasser (10 ml) abgebrochen und die wässrige Lösung zweimal mit DCM extrahiert. Die organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton (3:1) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 41 mg (0,13 mmol, 70%), farbloser Feststoff

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

$$m/z (\text{u e}_0^{-1}) = 324,5 (100\%)$$

(berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{IO}_7\text{S}_2 = 324,08$)

 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz, CDCl_3 , 293 K):

$\delta = 7,75$ (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, **H-3**), $7,64$ (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, **H-2**), $7,54$ (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, **H-1**), $7,35$ (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, **H-4**), $6,15$ (s, 1H, =**CH**₂), $5,95$ (s, 1H, =**CH**₂), $4,31$ (s, 2H, -**CH**₂-), $2,41$ ppm (s, 3H, -**CH**₃)

 $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (75 MHz, CDCl_3 , 293 K):

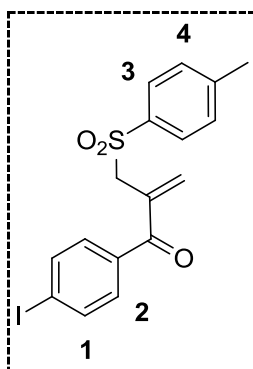
δ 194,11 (-**C=O**), 145,19 (-**C=CH**₂), 136,20 (**C-Ar**), 135,90 (**C-Ar**), 133,94 (**C-Ar**), 132,11 (**C-Ar**), 130,00 (**C-Ar**), 129,70 (**C-Ar**), 128,48 (**C-Ar**), 126,70 (-**C=CH**₂), 107,69 (**C-Ar**), 87,22, 82,78 (**—C** \equiv **CH**), 80,43 (**—C** \equiv **CH**), 57,99 (-**CH**₂), 21,76 (-**CH**₃)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm^{-1}] 740, 802, 868, 928, 1000, 1020, 1090, 1140, 1170, 1200, 1240, 1300, 1390, 1420, 1490, 1580, 1680, 2910, 2980, 3020, 3090

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ϵ) 225 (14210), 274 (3877)

HRMS (ESI) calc. 604,9929 exp. 604,9958

[3-(4-Iodphenyl)-3-oxopropen]-1-(4-tosyl)sulfon 3-5b

Kalium-*tert*-butylat (0,076 g, 0,68 mmol) wird in trockenem THF (34 ml) gelöst und eventuell unglöster Feststoff abfiltriert. p-Iodobissulfon 3-4b (0,1 g, 0,17 mmol) wird ebenfalls in THF (10 ml) gelöst und langsam zur Kalium-*tert*-butylatlösung getropft. Die Reaktionslösung wird für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann mit DCM/Wasser verdünnt. Die wässrige Phase wird nochmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird für analytische Reinheit säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton (3:1) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 52 mg (0,49 mmol, 72%), farbloser Feststoff

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

$$m/z \text{ (u e}_0^{-1}\text{)} = 425,4 \text{ (100\%)}$$

(berechnet für $C_{17}H_{15}IO_3S = 425,98$)

$^1\text{H-NMR-Spektrum (300 MHz, } CDCl_3, 293 \text{ K):}$

$\delta = 7,83$ (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H-2**), $7,75$ (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, **H-3**), $7,40$ (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H-1**), $7,34$ (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, **H-4**), $6,14$ (s, 1H, =**CH**₂), $5,94$ (s, 1H, =**CH**₂), $4,31$ (s, 2H, -**CH**₂-), $2,41$ ppm (s, 3H, -**CH**₃)

¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CD₂Cl₂, 293 K):

δ 194,48 (-C=O), 145,81 (-C=CH₂), 138,21 (C-Ar), 136,46 (C-Ar), 136,31 (C-Ar), 136,24 (C-Ar), 134,12 (C-Ar), 131,54 (C-Ar), 130,43 (C-Ar), 128,82 (-C=CH₂), 100,69 (C-Ar), 58,41 (-CH₂), 21,93 (-CH₃)

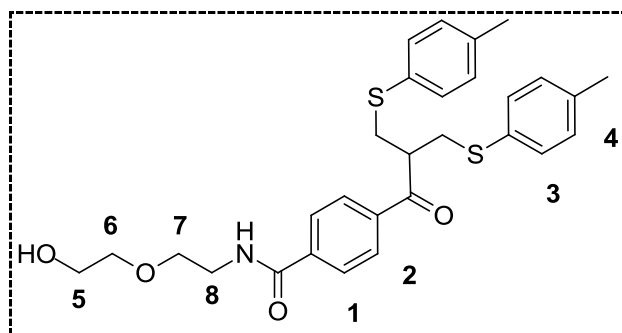
FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm⁻¹] 665, 710, 789, 839, 899, 987, 1090, 1150, 1250, 1290, 1400, 1480, 1580, 1650, 2380, 2980

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 271 (24400), 225 (6000)

HRMS (ESI) calc. 448,9684 exp. 448,9691

[(2-Aminoethoxy)ethanol]-4-[3-(4-thiotolyl)-2-(4-thiotolyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoesäureamid 5-3^[2]



p-Carboxybissulfidaktivester 5-2 (10,9 g, 25 mmol) wird in trockenem DCM unter Argon vorgelegt. 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (2,75 mol, 28 wird langsam zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum vollständig eingengt und der verbleibende Rückstand wird in Essigsäureethylester wieder aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit Wasser gewaschen, wobei beim letzten Mal die wässrige Phase mit einigen Tropfen HCl angesäuert wird. Die organischen Extrakte werden nochmals mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das

Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiterverwendet.

Ausbeute: 5,03 g (24,5 mmol, 98%) als farbloser Feststoff

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 522,4 (100%)

(berechnet für $C_{29}H_{27}NO_5S_2 = 523,19$)

1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

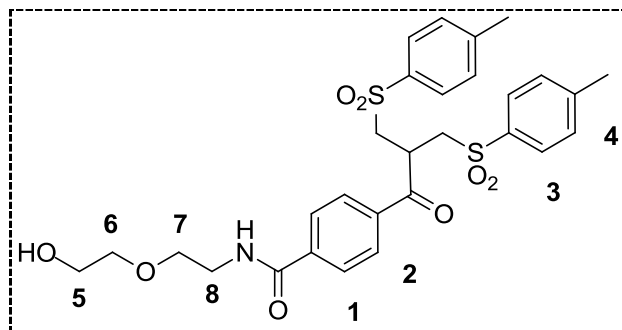
δ 7,72 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H-1**), 7,58 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H-2**), 7,13 (d, $J = 8,2$ Hz, 4H, **H-3**), 7,07 (d, $J = 8,2$ Hz, 4H, **H-4**), 3,83 – 3,53 (m, 9H, **H-5 bis H-8 & -CH-**), 3,18 (A_2B_2X , $J = 13,6, 6,8$ Hz, 4H, **-CH-(CH₂)₂₋**), 2,34 (s, 6H, **-CH₃**)

^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K)::

δ 200,58 (**-CONHR**), 166,66 (**-C=O**, Keton), 139,10 (**C-Ar**), 137,67 (**C-Ar**), 131,68 (**C-Ar**), 131,55 (**C-Ar**), 130,21 (**C-Ar**), 128,80 (**C-Ar**), 127,56 (**C-Ar**), 72,71 (**C-5**), 70,05 (**C-6**), 62,09 (**C-7**), 45,95 (**-CH-**), 40,30 (**C-8**), 36,36 (**-CH-(CH₂)₂₋**), 21,18 (**-CH₃**)

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ϵ) 271 (24400), 225 (6000)

[(2-Aminoethoxy)ethanol]-4-[3-(4-tosyl)-2-(4-tosyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoesäureamid 5-10



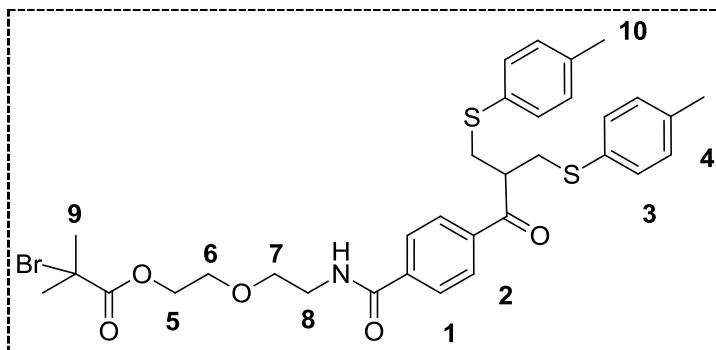
p-Amidoethoxyethanolbissulfid 5-3 (1,4 g, 2,7 mmol) und Kaliumperoxomonosulfat (6,6 g, 10,7 mmol) werden in EtOAc/CH₃CN/H₂O (6:6:1, 52 ml) suspendiert. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann filtriert und mit DCM/H₂O (6:1, 35 ml) verdünnt. Die wässrige Phase wird zweimal mit DCM extrahiert und die organischen Extrakte mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Produkt als farbloses Öl erhalten, welches an Kieselgel säulenchromatographisch mit DCM/MeOH (10:1) als Eluens aufgereinigt wird.

Ausbeute: 1,53 g (24,5 mmol, 97%) als farbloser Feststoff

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃, 298,3 K):

δ 7,76 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, **H-1**), 7,62 (d, *J* = 8,3 Hz, 6H, **H-2 & H-3**), 7,36 (d, *J* = 7,9 Hz, 4H, **H-4**), 7,05 (s, *J* = 14,3 Hz, 1H, **N-H**), 4,26 (p, *J* = 6,2 Hz, 1H, **-CH-**), 3,75 – 3,43 (m, 11H, **H-5 bis H-8 & -CH-(CH₂)₂₋**), 2,46 (s, 6H, **-CH₃**)

2-Brom-2-methyl-[2-[2-[[4-[3-(4-thiotolyl)-2-[(4-thiotolyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoyl]amino]ethoxy]ethyl]propansäureester 5-4^[2]



p-Amidoethoxyethanolbissufid 5-3 (1 g, 1,9 mmol) wird in einem trockenem Schlenkkolben unter Argon vorgelegt und in trockenem DCM (10 ml) gelöst. 2-Bromisobuttersäurebromid (225 μ l, 2 mmol) und eine Mikrospatelspitze DMAP werden im Argongegenstrom zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Entfernen der Inertgasatmosphäre wird die Lösung mit Essigsäureethylester verdünnt und einmal mit Wasser, mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat, erneut mit Wasser und abschließend mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 670 mg (1 mmol, 52%) als gelbes Öl

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 671,5 (98%) und 673,5 (100%)

(berechnet für $C_{33}H_{38}BrNO_5S_2$ = 671,14 (95%) und 673,14 (100%))

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 7,77 (d, J = 8,6 Hz, 2H, **H-1**), 7,63 (d, J = 8,6 Hz, 2H, **H-2**), 7,18 (d, J = 8,4 Hz, 4H, **H-3**), 7,12 (d, J = 8,2 Hz, 4H, **H-4**), 6,64 (s, 1H, **N-H**), 4,42 – 4,33 (m, 2H, **H-5**), 3,89 – 3,63 (m, 7H, **H-6 bis H-8 & -CH-**), 3,23 (A_2B_2X , J = 13,6, 6,8 Hz, 4H, **-CH-(CH₂)₂₋**), 2,39 (s, 6H, **H-9**), 1,92 (s, 6H, **H-10**)

¹³C-NMR-Spektrum (63 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K)::

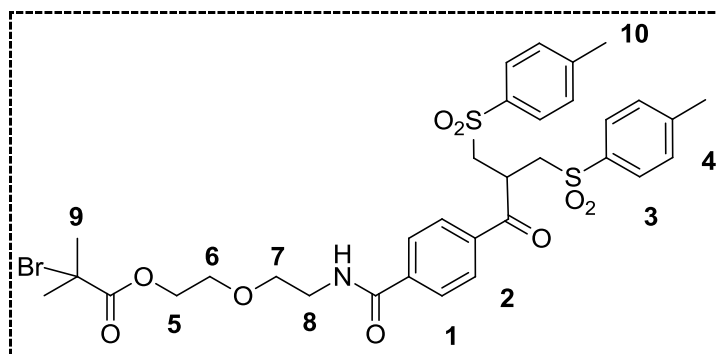
δ 200,73 (-CONHR), 165,21 (-C=O, Keton), 156,94 (-COOR), 139,94 (C-Ar), 137,84 (C-Ar), 131,86 (C-Ar), 131,70 (C-Ar), 130,39 (C-Ar), 128,98 (C-Ar), 127,79 (C-Ar), 126,41 (C-Ar), 70,09 (C-5), 69,32 (C-6), 65,39 (C-7), 46,08 (-CH-), 40,44 (C-8), 36,76 (-CH-(CH₂)₂-), 31,04 (C-9), 21,37 (-C-10)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν [cm⁻¹] 758, 908, 1460, 1490, 1650, 1740, 2920

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 254,4 (29375)

2-Brom-2-methyl-[2-[2-[[4-[3-(4-tosyl)-2-[(4-tosyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoyl]amino]ethoxy]ethyl]propansäureester 5-8



p-Amidoethoxyethanolbissulfon 5-10 (1,53 g, 2,6 mmol) wird in einem trockenem Schlenkkolben unter Argon vorgelegt und in trockenem DCM (35 ml) gelöst. 2-Bromisobuttersäurebromid (307 µl, 2,9 mmol) und DMAP (16 mg, 0,13 mmol) in DCM (1,3 ml) werden im Argongegenstrom zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Entfernen der Inertgasatmosphäre wird die Lösung mit Essigsäureethylester verdünnt und einmal mit Wasser, mit 0,1 M Natriumhydrogencarbonat, erneut mit Wasser und abschließend mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat

getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 947 mg (1,32 mmol, 51%) als gelbes Öl

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,79 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, **H-1**), 7,64 (d, *J* = 8,3 Hz, 6H, **H-2** und **H-3**) (d, *J* = 8,4 Hz, 4H, **H-3**), 7,38 (d, *J* = 7,9 Hz, 4H, **H-4**), 6,71 (s, 1H, **N-H**), 4,38 – 4,32 (m, 2H, **H-5**), 3,77 – 3,45 (m, 11H, **H-6** bis **H-8** & **-CH-(CH₂)₂**), 2,48 (s, 6H, **H-10**), 1,89 (s, 6H, **H-9**)

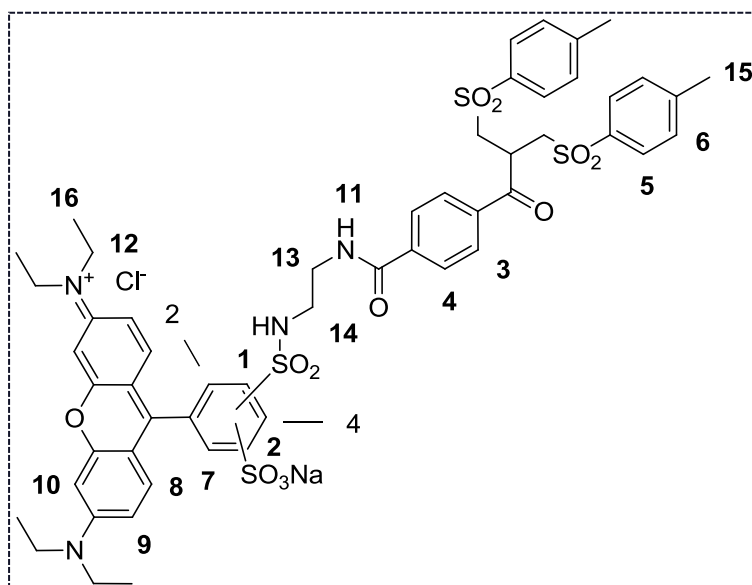
¹³C-NMR-Spektrum (63 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K)::

δ 195,06 (**-CONHR**), 171,64 (**-C=O**, Keton), 166,27 (**-COOR**), 145,55 (**C-Ar**), 139,24 (**C-Ar**), 136,23 (**C-Ar**), 135,27 (**C-Ar**), 130,19 (**C-Ar**), 128,63 (**C-Ar**), 128,25 (**C-Ar**), 127,64 (**C-Ar**), 69,47 (**C-5**), 68,74 (**C-6** & **C-7**), 55,92 (**C_q**), 55,52 (**-CH-**), 39,92 (**C-8**), 35,64 (**-CH-(CH₂)₂₋**), 30,64 (**C-9**), 21,70 (**-C-10**)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

v [cm⁻¹] 739, 1090, 1290, 1450, 1650, 1740, 2920xx

UV/VIS (MeCN): λ_{max} (ε) 227 (36545), 255 (25868)

Lissamine Rhodamin B bissulfon 4-5

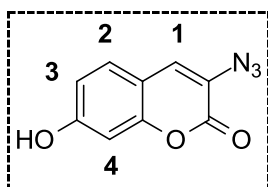
Lissamine Rhodamin B (10 mg, 0,017 mmol) wird unter Lichtausschluss in DMF/DCM (1:1, 2 ml) gelöst und mit NHS Bissulfon 4-10 (17,2 mg, 0,029 mmol) versetzt. Die Lösung wird für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird daraufhin mit EtOAc verdünnt und säulenchromatographisch an Aluminiumoxid (neutral) mit EtOAc => EtOAc/EtOH (1:1) als Eluens aufgereinigt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in etwas Aceton gelöst und in Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 17,9 mg (0,0165 mmol, 97%), dunkelvioletter Feststoff

MALDI-ToF MS (M^+): m/z 1083,42

$^1\text{H-NMR-Spektrum (250 MHz, } CD_2Cl_2, 298,3 \text{ K):}$

δ 8,79 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, **H-1**), 8,06 (s, 1H, -NH-CO), 7,99 (dd, $J = 8,0, 1,8$ Hz, 1H, **H-2**), 7,88 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H-3**), 7,74 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, **H-4**), 7,55 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H-5**), 7,35 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, **H-6**), 7,29 (d, $J = 9,5$ Hz, 2H, **H-7**), 7,20 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, **H-8**), 6,84 (dd, $J = 9,6, 2,4$ Hz, 2H, **H-9**), 6,67 (d, $J = 2,3$ Hz, 2H, **H-10**), 5,99 (s, 1H, **H-11**), 5,85 (s, 1H, **H-11**), 4,31 (s, 2H, -CH₂-SO₂), 3,63 – 3,45 (m, 12H, **H-12 bis H-14**), 2,39 (s, 3H, **H-16**), 1,29 – 1,19 (m, 12H, **H-17**)

3-Azido-7-hydroxycumarin^[3]

2,4-Dihydroxybenzaldehyd (276 mg, 2 mmol), N-Acetylglycin (235 mg, 2 mmol), wasserfreies Natriumacetat (493 mg, 6 mmol) werden in Essigsäureanhydrid (10 ml) vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gegossen, der ausfallende Feststoff abfiltriert und in HCl/Ethanol (1:1, 1 ml) gelöst. Die Lösung wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Dann wird Eiswasser (1,3 ml) hinzu gegeben und die Lösung im Eisbad auf 4°C gekühlt. Dazu wird Natriumnitrit (386 mg, 6 mmol) gegeben und die Lösung wird 20 Minuten gerührt. Nach der Zugabe von Natriumazid (390 mg, 6 mmol) wird die Lösung für weitere 15 Minuten gerührt, der Feststoff wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 228 mg (1,1 mmol, 51%), brauner Feststoff

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z (u_{e_0-1}) = 203,4 (100%)

(berechnet für $C_9H_5N_3O_3 = 203,16$)

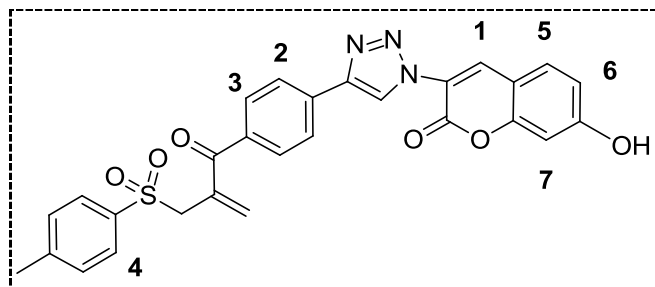
¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, *d*₆-DMSO, 293 K):

δ (ppm) = 10,55 (s, 1 H, -OH), 7,6 (s, 1 H, H-1), 7,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, H-2), 6,81 (dd, $J = 8,5, 2,3$ Hz, 1 H, H-3), 6,76 (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H, H-4)

FT-IR-Spektrum (Reinsubstanz):

ν (cm⁻¹): 1320, 1600, 1680, 2110, 3290

7-Hydroxy-3-(4-(4-(2-(tosylmethyl)acryloyl)phenyl)-H-1,2,3-triazol-1-yl)-2H-chromen-2-on 4-11



Ethynylmonosulfon 3-7 (10,7 mg, 0,033 mmol) wird in MeCN (0,3 ml) vorgelegt und mit einer Lösung von 3-Azido-7-hydroxycumarin (9,1 mg, 0,044 mmol) in MeCN (0,4 ml) versetzt. Desweiteren werden 2,6 Lutidin (1 μ l), eine μ -Spatelspitze $\text{Cu}(\text{MeCN})_4 \cdot \text{PF}_6$ und zwei Tropfen DCM zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf 70 °C erhitzt und vier Stunden gerührt. Nach zwei Stunden Reaktionszeit wird noch etwas Cu(I)-Katalysator und MeCN (0,6 ml) hinzu gegeben. Die Reaktion wird auf Raumtemperatur abgekühlt, mit EtOAc verdünnt und auf Kieselgel aufgezogen. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgt mit Hexan/Aceton als Eluens.

Ausbeute: 3,4 mg (0,0064 mmol, 20%) als farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (250 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

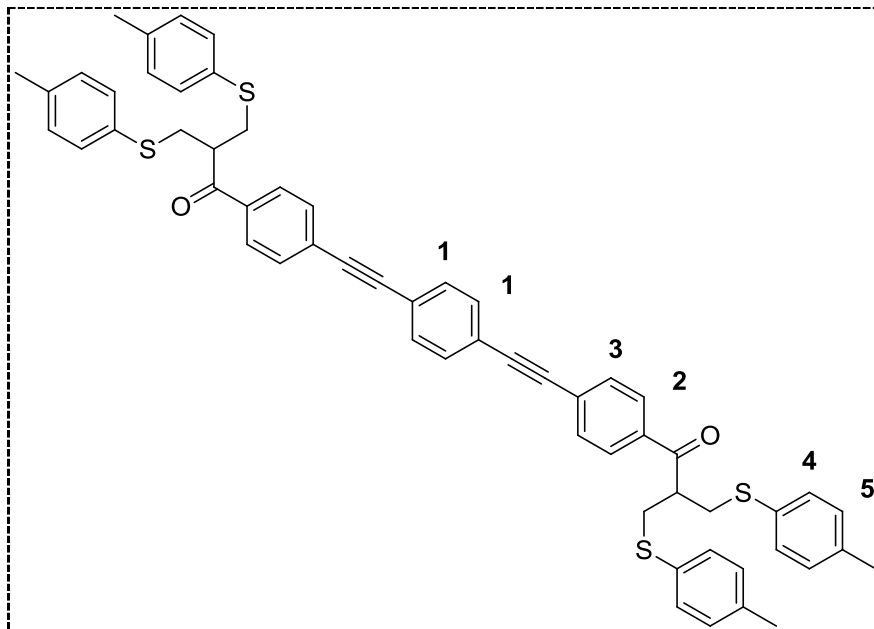
δ 8,95 (s, 1H, -CH-N), 8,55 (s, 1H, H-1), 8,00 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-2), 7,79 (d, $J = 7,2$ Hz, 4H, H-3 & H-4), 7,58 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-5), 7,37 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, H-6), 6,96 – 6,85 (m, 2H, H-7 & H-8), 6,15 (s, 1H, =CH₂), 6,03 (s, 1H, =CH₂), 4,36 (s, 2H, -CH₂-), 2,42 (s, 3H, -CH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (126 MHz, CDCl_3 , 298,3 K, Signale erhalten durch HSQC, C_q nicht sichtbar):

δ 134,06 (C-1), 133,60 (=CH₂), 130,39 (C-4), 130,31 (C-6), 129,88 (C-5), 128,43 (C-3), 125,46 (C-2), 121,56 (-CH-N), 114,60 (C-7), 103,13 (C-8), 57,96 (-CH₂-), 21,58 (-CH₃)

HRMS (ESI) calc. 550,1049 exp. 550,1036

1,1'-((1,4-phenylenbis(ethin-2,1-diyl))bis(4,1-phenylen))bis(3-(p-tolylthio)-2-((p-tolylthio)methyl)propan-1-on 6-3



In einem trockenem Schlenkrohr werden unter Argonatmosphäre p-Iodbissulfid 3-3b (200 mg, 0,38 mmol), 1,4-Diethinylbenzol (22 mg, 0,18 mmol) und Kupfer(I)iodid (0,016 g 0,04 mmol) in trockenem THF/Et₃N (4:1, 4 ml) vorgelegt. Die Lösung wird für 15 Minuten mit Argon entgast und PdCl₂(PPh₃)₂ (0,023 g, 0,06 mmol) werden im Argongegenstrom zugegeben. Die Lösung wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann mit 1 M HCl (40 ml) verdünnt und dreimal mit Chloroform (40 ml) extrahiert. Alle organischen Extrakte werden vereinigt, mit gesättigter Ammoniumchloridlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (5:1) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 142 mg (0,16 mmol, 87 %) , Öl

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u \cdot e_0^{-1}$) = 906,9 (100%)

(berechnet für $C_{58}H_{50}O_2S_4 = 906,3$)

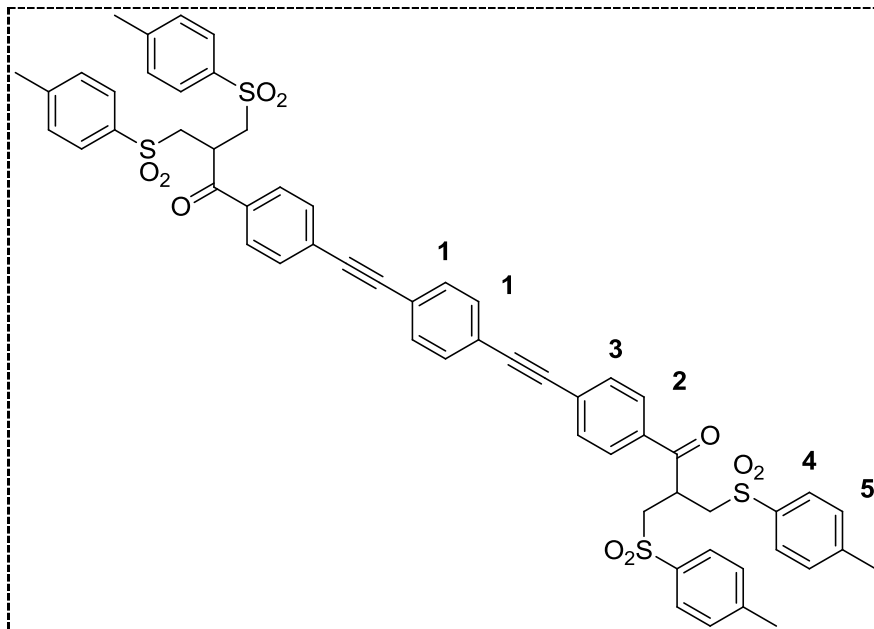
 1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 7,59 (s, 4H, H-1), 7,57 – 7,48 (m, 8H, H-2 & H-3), 7,17 (d, $J = 8,2$ Hz, 8H, H-4), 7,10 (d, $J = 8,2$ Hz, 8H, H-5), 3,79 (p, $J = 6,7$ Hz, 2H, , -CH(CH₂)₂), 3,21 (A₂B₂X, $J = 13,6, 6,7$ Hz, 8H, -CH(CH₂)₂), 2,37 (s, 12H, -CH₃)

 ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 200,11 (-C=O, Keton), 137,64 (C-Ar), 136,42 (C-Ar), 132,19 (C-Ar), 132,03 (C-Ar), 131,77 (C-Ar), 131,68 (C-Ar), 130,21 (C-Ar), 128,71 (C-Ar), 128,27 (C-Ar), 123,47 (C-Ar), 92,60 ($-C\equiv C-$), 91,03 ($-C\equiv C-$), 45,74 (-CH(CH₂)₂), 36,70 (-CH-(CH₂)₂-), 21,21 (-CH₃)

1,1'-((1,4-phenylenbis(ethin-2,1-diyl))bis(4,1-phenylen))bis(3-(p-tosyl)-2-((p-tosyl)methyl)propan-1-on 6-4



Diethynylbenzoltetrasulfid 6-3 (142 mg, 0,16 mmol) wird in EtOAc/MeCN/H₂O (10:6:1, 17 ml) gelöst und mit Kaliumperoxomonosulfat (394 mg, 0,64 mmol) versetzt. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann mit DCM/H₂O (1:1, 40 ml) verdünnt und mit DCM (20 ml) extrahiert. Alle organischen Extrakte werden vereinigt, mit Wasser gewaschen und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Filtrat wird unter Vakuum konzentriert. Erhalten wird das Produkt als farbloser Feststoff.

Ausbeute: 101,4 mg (0,01 mmol, 62 %)

MALDI-ToF MS ($M^+ + Na^+$): m/z 1058,14

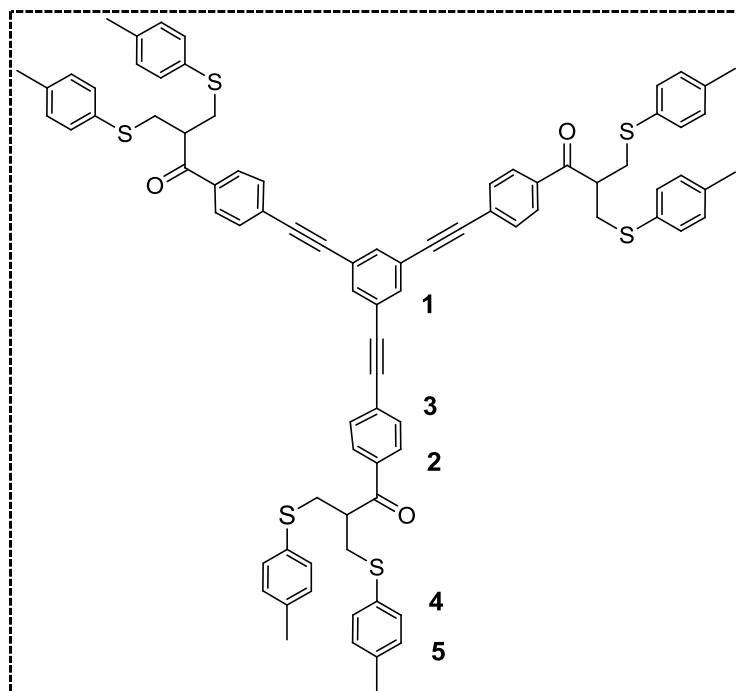
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,70 – 7,52 (m, 20H, H-1 – H-4), 7,38 (d, *J* = 8,0 Hz, 8H, H-5), 4,31 – 4,19 (m, 2H, -CH(CH₂)₂), 3,56 ((A₂B₂X, *J* = 14,4, 6,2 Hz, 8H, -CH(CH₂)₂), 2,49 (s, 12H, -CH₃)

¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 195,08 (-C=O, Keton), 146,09 (C-Ar), 135,78 (C-Ar), 134,00 (C-Ar), 132,32 (C-Ar), 132,26 (C-Ar), 131,84 (C-Ar), 130,57 (C-Ar), 130,26 (C-Ar), 130,08 (C-Ar), 129,15 (C-Ar), 128,83 (C-Ar), 128,65 (C-Ar), 123,45 (C-Ar), 93,21 (—C≡C—), 90,81 (—C≡C—), 55,98 (-CH(CH₂)₂), 35,90 (-CH-(CH₂)₂-), 21,86 (-CH₃)

1,1',1''-((benzol-1,3,5-triyltris(ethin-2,1-diyl))tris(benzol-4,1-diyl))tris(3-(p-tolylthio)-2-((p-tolylthio)methyl)propan-1-on 6-5



Unter Argonatmosphäre werden in einem trockenem Schlenkrohr werden p-Iodbissulfid (200 mg, 0,38 mmol), 1,3,5-Triethinylbenzol (18 mg, 0,12 mmol) und Kupfer(I)iodid (0,016 g 0,04 mmol) in trockenem THF/Et₃N (4:1, 4 ml) vorgelegt. Die Lösung wird für 15 Minuten mit Argon entgast und PdCl₂(PPh₃)₂ (0,023 g, 0,06 mmol) wird im Argongegenstrom zugegeben. Die Lösung wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann mit 1 M HCl (40 ml) verdünnt und dreimal mit DCM (40 ml) extrahiert. Alle organischen Extrakte werden vereinigt, mit gesättigter Ammoniumchloridlösung und Wasser gewaschen und anschließend mit

Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (5:1) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 84,2 mg (0,064 mmol, 53 %) , Öl

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

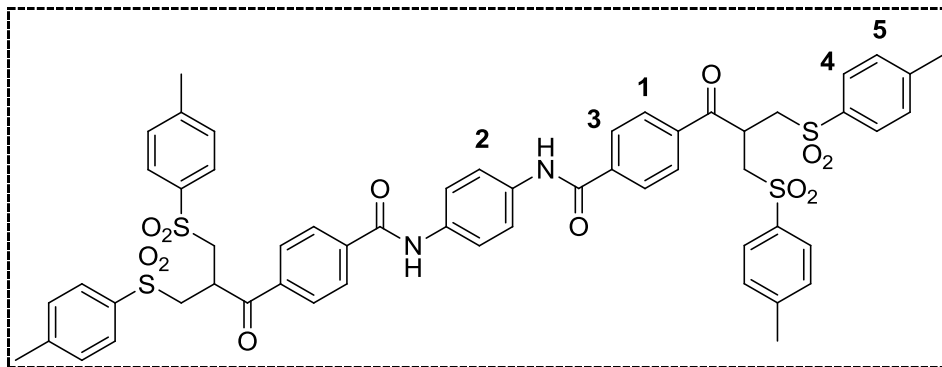
m/z (u_{e_0-1}) = 1320,8 (100%)

(berechnet für $C_{84}H_{72}O_3S_6 = 1320,38$)

1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 7,75 (s, 3H, H-1), 7,58 – 7,49 (m, 12H, H-2 & H-3), 7,16 (d, $J = 8,3$ Hz, 12H, H-4), 7,09 (d, $J = 8,1$ Hz, 12H, H-5), 3,84 – 3,71 (m, 3H, $-CH(CH_2)_2$), 3,21 (A_2B_2X , $J = 13,6, 6,7$ Hz, 12H, $-CH(CH_2)_2$), 2,36 (s, 18H, $-CH_3$)

N,N'-(1,4-phenylen)bis(4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl)benzamid 6-2



Carboxybissulfon 4-9 (950 mg, 1,9 mmol) wird unter Inertgasatmosphäre mit einem Überschuss an Thionylchlorid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird überschüssiges Thionylchlorid bei 110°C unter Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit DCM (10 ml) versetzt, welches ebenfalls abdestilliert wird. Das Säurechlorid wird in trockenem THF (20 ml) gelöst und direkt für

die Kopplung mit dem Amin eingesetzt. 1,4-Phenylendiamin (86,5 mg, 0,8 mmol) und Pyridin (160 μ l, 2,1 mmol) werden in trockenem THF (10 ml) vorgelegt und vorsichtig mit der Säurechloridlösung versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird teilweise im Vakuum entfernt und die eingeeengte Lösung mit DCM (50 ml) versetzt. Dabei fällt das Produkt als hellgelber Feststoff aus und wird abfiltriert.

Ausbeute: 134 mg (0,13 mmol, 16 %) , hellgelber Feststoff

MALDI-ToF MS (M^+): m/z 1073,84

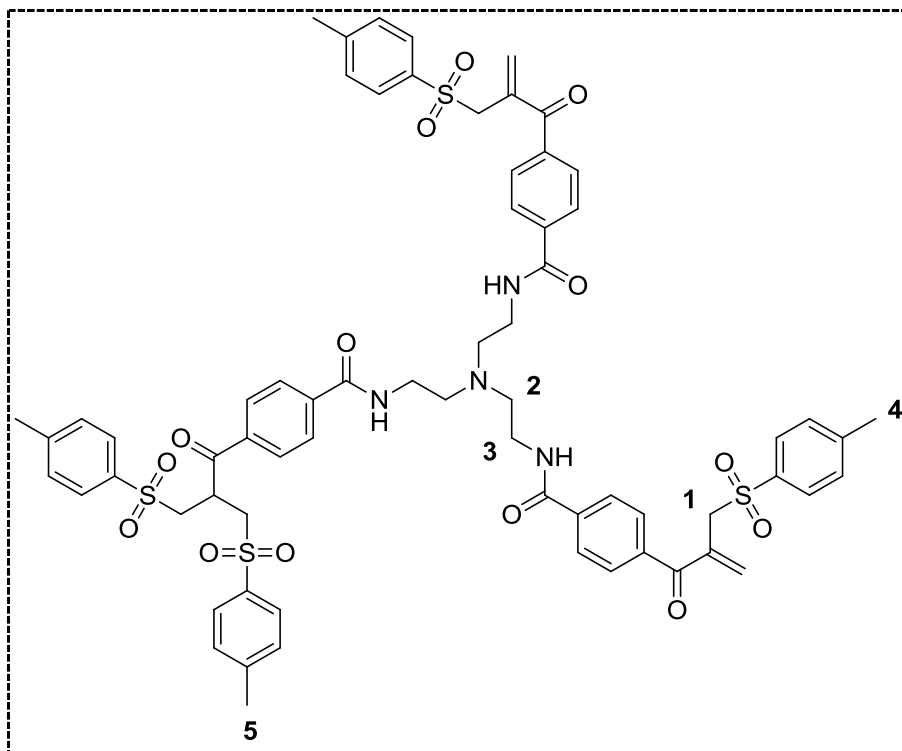
$^1\text{H-NMR-Spektrum}$ (300 MHz, *DMSO-d6*, 298,3 K):

δ 10,07 (s, 2H, NH), 7,55 (d, $J = 8,4$ Hz, 4H, H-1), 7,39 (s, 4H, H-2), 7,22 – 7,06 (m, 12H, H-3 & H-4), 7,04 (d, $J = 8,3$ Hz, 8H, H-5), 3,66 – 3,53 (m, 2H, $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 3,37 (A_2B_2X , $J = 14,6, 6,1$ Hz, 8H, $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 2,04 (s, 12H, $-\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR-Spektrum}$ (75 MHz, *DMSO-d6*, 298,3 K):

δ 195,60 ($-\text{CONHR}$), 164,44 ($-\text{C}=\text{O}$, Keton), 145,21 (C-Ar), 139,43 (C-Ar), 136,75(C-Ar), 135,14(C-Ar), 134,97(C-Ar), 130,15(C-Ar), 128,12(C-Ar), 127,98(C-Ar), 127,84(C-Ar), 120,80(C-Ar), 54,89 ($-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 35,20 ($-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$ -), 21,16 ($-\text{CH}_3$),

N,N'-(((2-(4-(3-tosyl-2-tosylmethyl)propanoyl)benzamido)ethyl)azanediyl)bis(ethane-2,1-diyl)bis(4-(2-(tosylmethylacryloyl)benzamid 3-34



Carboxybissulfon 4-9 (950 mg, 1,9 mmol) wird unter Inertgasatmosphäre mit einem Überschuss an Thionylchlorid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird überschüssiges Thionylchlorid bei 110°C unter Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit DCM (10 ml) versetzt, welches ebenfalls abdestilliert wird. Das Säurechlorid wird in erneut in trockenem DCM (10 ml) gelöst und direkt für die Kopplung mit dem Amin eingesetzt. Dazu werden Triaminoethylamin (99,3 µl, 0,66 mmol) und NaOH (80 mg, 2 mmol) in Wasser (10ml) gelöst. Anschließend wird die Säurechloridlösung langsam zugetropft und die Suspension heftig für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wird dreimal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte dann mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Lösung wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, einkonzentriert und der Rückstand über Nacht im Hochvakuum. Das so erhaltene Rohprodukt enthält noch Carboxybissulfon und wird

säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton (1:2, 1% Et₃N) als Eluens gereinigt. Nach dieser Aufreinigung wird ein Gemisch aus Penta-, Tetra- und Trisulfon erhalten (270 mg, davon wird die Hälfte eingesetzt), welches anschließend mittels präparativer HPLC getrennt wird. Als Hauptprodukt wird das Tetrasulfon 3-34 rein isoliert, als Nebenprodukte konnten Trisulfon 3-35 (0,5 mg) und Pentasulfon 3-33 (0,8 mg) detektiert werden.

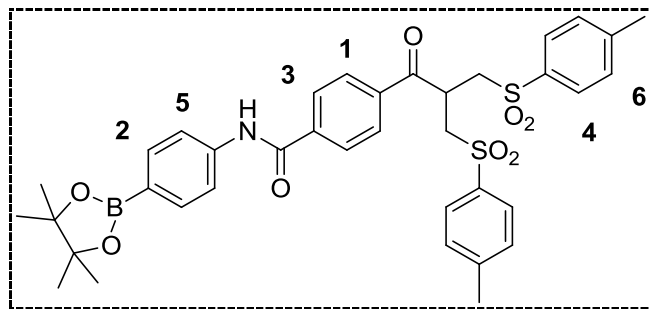
Ausbeute: 3,4 mg (0,0021 mmol, 3,2 %) , gelbes Öl

MALDI-ToF MS ([M + H]⁺): m/z 1281,74

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₃CN, 298,3 K):

δ 8,09 – 7,87 (m, 3H, NH), 7,82 – 7,25 (m, 28H, H-Ar), 6,05 (s, 2H, =CH₂), 5,80 (s, 2H, =CH₂), 4,29 (s, 4H, H-1), 4,20 – 4,05 (m, 1H, -CH(CH₂)₂), 3,91 – 3,55 (m, 16H, H-2 & H-3, -CH(CH₂)₂), 2,42 (s, 6H, H-4), 2,36 (s, 6H, H-5)

2-N-(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)-4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl)benzamid



Carboxybissulfon 4-9 (950 mg, 1,9 mmol) werden unter Inertgasatmosphäre mit einem Überschuss an Thionylchlorid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird überschüssiges Thionylchlorid bei 110°C unter Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wird mit DCM (10 ml) versetzt, welches ebenfalls abdestilliert wird. Das Säurechlorid wird in trockenem THF (20 ml) gelöst und direkt für die Kopplung mit dem Amin eingesetzt. B-(4-Aminophenyl)pinakolboran (423 mg, 1,9 mmol) und Pyridin (160 µl, 2,1 mmol) werden in trockenem THF (10 ml) vorgelegt

und vorsichtig mit der Säurechloridlösung versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM (50 ml) gelöst. Die organische Phase wird mit destilliertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wird im Vakuum eingeeengt, dabei wird der Rückstand in Aceton wiederaufgenommen und in Hexan getropft. Das nach Filtrieren erhaltene Rohprodukt wird aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,26 g (1,8 mmol, 95 %) , gelbes Öl

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

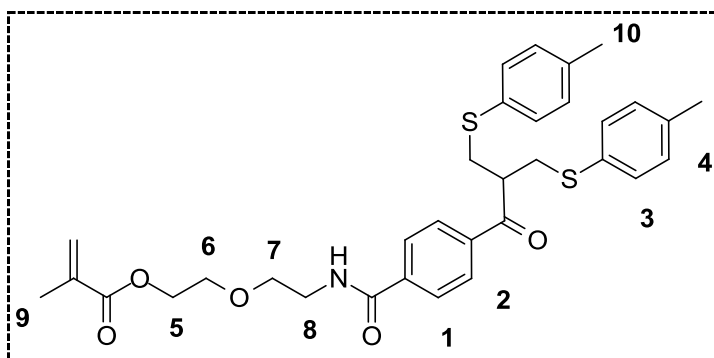
m/z (u_{e_0-1}) = 701,3 (100%)

(berechnet für $C_{37}H_{40}BNO_8S_2 = 701,2$)

1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 7,99 (s, 1H, NH), 7,86 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H-1), 7,80 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-2), 7,73 – 7,62 (m, 8H, H-3 – H-5), 7,38 (d, $J = 8,9$ Hz, 4H, H-6), 4,30 (p, $J = 6,2$ Hz, 1H, $-CH(CH_2)_2$), 3,56 (A_2B_2X , $J = 20,2, 14,4, 6,3$ Hz, 4H, $-CH(CH_2)_2$), 2,49 (s, 6H, Ar- CH_3), 1,34 (s, 12H, $-CH_3$),

2-[2-[4-[3-(4-thiotolyl)-2-[(4-thiotolyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoyl]amino]ethoxy]ethyl]methacrylat 7-1



p-Amidoethoxyethanolbissufid 5-3 (1,75 g, 3,3 mmol) wird in einem trockenem Schlenkkolben unter Argon vorgelegt und in trockenem THF (7 ml) gelöst.

Triethylamin (0,74 ml, 5,3 mmol) werden zugegeben. Die Lösung wird auf 0°C gekühlt und eine Lösung von Methacrylsäurechlorid (0,5 ml, 5,5 mmol) in trockenem THF (5 ml) wird vorsichtig zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid wird abfiltriert und mit THF gewaschen. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer konzentriert und säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/Aceton (1:1) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 1,83 g (3,1 mmol, 91%) als gelbes Öl

FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

m/z ($u e_0^{-1}$) = 591,78 (100%)

(berechnet für $C_{33}H_{37}NO_5S_2 = 591,78$)

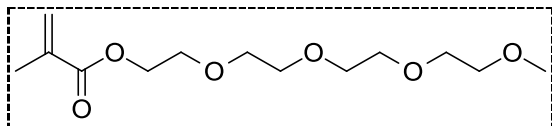
1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 7,73 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, **H-1**), 7,59 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, **H-2**), 7,14 (d, $J = 8,3$ Hz, 4H, **H-3**), 7,07 (d, $J = 8,1$ Hz, 4H, **H-4**), 6,70 (s, 1H, **-NH**), 6,05 (dd, $J = 1,6, 1,0$ Hz, 1H, =**CH₂**(trans)), 5,54 – 5,50 (m, 1H, =**CH₂**(cis)), 4,34 – 4,28 (m, 2H, **H-5**), 3,84 – 3,60 (m, 7H, **H-6 – H-8** & **-CH(CH₂)₂-**), 3,20 (A_2B_2X , $J = 13,6, 6,8$ Hz, 4H, **-CH(CH₂)₂-**), 2,34 (s, 6H, **H-9**), 1,91 – 1,83 (m, 3H, **H-10**)

^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K)::

δ 200,57 (**-CONHR**), 167,60 (**-C=O**, Keton), 166,48 (**-COOR**), 139,10 (**C-Ar**), 137,66 (**C-Ar**), 136,73 (=CH₂) 131,67 (**C-Ar**), 131,58 (**C-Ar**), 130,22 (**C-Ar**), 128,78 (**C-Ar**), 127,57 (**C-Ar**), 125,79 (**C-Ar**), 69,84 (**C-5**), 69,48 (**C-6**), 63,94 (**C-7**), 45,95 (**-CH-**), 40,25 (**C-8**), 36,61 (**-CH(CH₂)₂-**), 21,19 (**C-9**), 18,45 (**-C-10**)

2-Methyl-[2-[2-[[4-[3-(4-thiotolyl)-2-[(4-thiotolyl)methyl]-1-oxopropyl]benzoyl]amino]ethoxy]ethyl]acrylsäureester 7-5^[4]



Tetraethylglykol (1,9 g, 9,3 mmol) wird in einem trockenen Schlenkcolben mit Toluol (2 ml) versetzt. Anschließend wird das azeotrope Gemisch aus Wasser und Toluol im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in trockenem THF (18 ml) in Lösung gebracht. Die Reaktionslösung wird auf 0°C gekühlt und mit Triethylamin (1,94 ml, 14 mmol) versetzt. Danach wird eine Lösung von Methacrylsäurechlorid (1 ml, 11 mmol) in trockenem THF (14 ml) vorsichtig zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid wird abfiltriert und mit THF gewaschen. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer konzentriert. Der Rückstand wird in DCM aufgenommen und zweimal mit verdünnter Kaliumhydrogencarbonatlösung, einmal mit Wasser und einmal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet, einkonzentriert und säulenchromatographisch an Kieselgel mit Hexan/EtOAc (10:3) => Hexan/EtOAc (10:6) als Eluens aufgereinigt.

Ausbeute: 2,5 g (8,9 mmol, 96%) als farblose Flüssigkeit

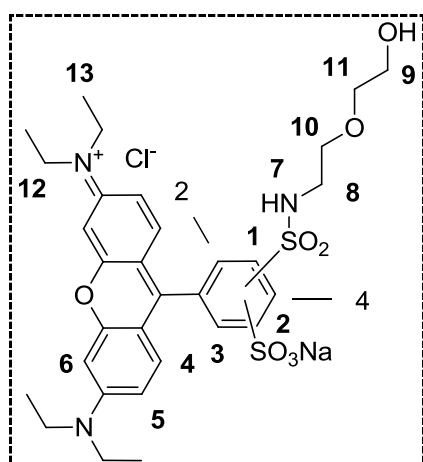
FD-Massenspektrum (FD, 8 kV):

$$m/z \text{ (u e}_0^{-1}\text{)} = 277,6 \text{ (100\%)}$$

(berechnet für C₁₃H₂₄O₆ = 276,16)

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,15 (s, 1H, =CH₂(trans)), 6,72 – 6,58 (m, 1H, =CH₂(cis)), 5,37 – 5,28 (m, 2H, H-5), 4,80 – 4,53 (m, 15H, -CH₂(PEG)), 4,39 (s, 3H, -OCH₃), 2,99 (d, J = 0,9 Hz, 3H, -CH₃)

Sulforhodamin B Amid 7-10

Sulforhodaminsäurechlorid Natriumsalz (257 mg, 0,45 mmol) wird in Pyridin (2 ml) gelöst. Dazu wird eine Mikrospatelspitze DMAP und 2-(2-Amino)ethoxyethanol (69 μ l, 0,7 mmol) gegeben. Die Lösung wird unter Lichtausschluss für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird daraufhin mit DCM/H₂O (1:1) verdünnt, einmal mit 10%iger HCl gewaschen und die wässrige Phase im Folgenden noch viermal mit DCM extrahiert. Die organischen Extrakte werden vereingigt, mit Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen des Filtrats am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit DCM/MeOH (10:1) als Eluens aufgereinigt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in etwas Aceton gelöst und in Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 95 mg (0,15 mmol, 33%), dunkelvioletter Feststoff

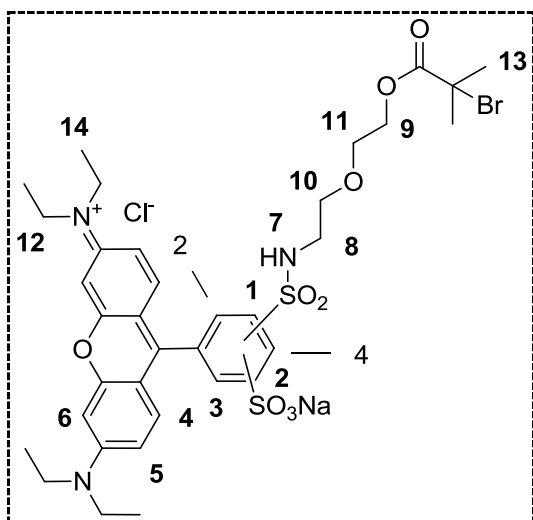
MALDI-ToF MS ([M + H]⁺): m/z 646,39

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 8,67 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, **H-1**), 8,01 (dd, $J = 7,9, 1,8$ Hz, 1H, **H-2**), 7,31 -7,13 (m, 3H, **H-3** & **H-4**), 6,86 (dd, $J = 9,4, 2,4$ Hz, 2H, **H-5**), 6,74 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, **H-6**), 5,88 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, -NH), 3,73 – 3,23 (m, 16H, **H-8 bis H-12**), 1,31 (t, $J = 7,2$ Hz, 12H, **H-13**)

¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 158,42, 156,23, 133,54, 130,56, 127,85, 127,21, 114,77, 114,02, 96,29, 88,66, 72,95, 69,07, 61,92, 46,46, 43,98, 12,89

Sulforhodamin B Initiator 7-11

Sulforhodamin B Amid 7-10 (95 mg, 0,15 mmol) wird in DCM/THF (7:1, 7 ml) gelöst, kurz mit Argon entgast und überschichtet. Dazu wird eine Mikrospatelspitze DMAP und 2-Bromisobuttersäurebromid (50 µl, 0,36 mmol) gegeben. Nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wird die Reaktionslösung erneut mit DMAP (Mikrospatelspitze) und 2-Bromisobuttersäurebromid (50 µl, 0,36 mmol). Die Lösung wird weiterhin bei Raumtemperatur gerührt und immer wieder mit DMAP und Säurebromid versetzt, bis sich nach drei Tagen die Intensität des Produktpots auf der DC nicht weiter verändert. Die Lösung wird direkt säulenchromatographisch an Kieselgel mit DCM/MeOH (10:1) als Eluens aufgereinigt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in etwas Aceton gelöst und in Hexan ausgefällt.

Ausbeute: 31 mg (0,04 mmol, 26%), dunkelvioletter Feststoff

MALDI-ToF MS ([M + H]⁺): m/z 794,30

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

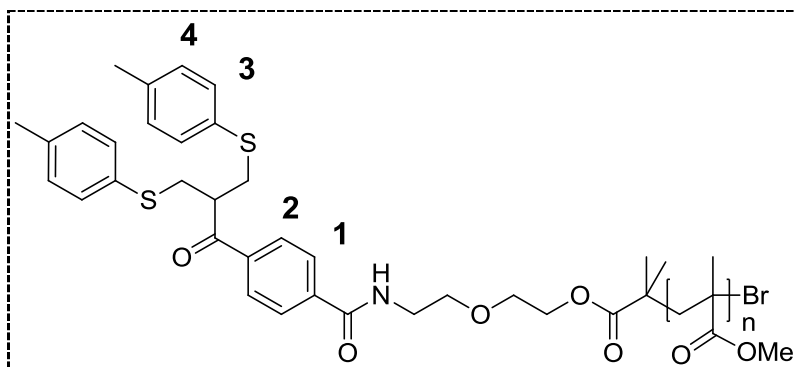
δ 8,67 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, H-1), 8,00 (dd, *J* = 7,9, 1,9 Hz, 1H, H-2), 7,29 -7,19 (m, 3H, H-3 & H-4), 6,85 (dd, *J* = 9,5, 2,4 Hz, 2H, H-5), 6,74 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, H-6), 5,81 – 5,70 (m, 1H, -NH), 3,68 – 3,39 (m, 16H, H-8 bis H-12), 2,39 (s, 6H, H-13), 1,29 – 1,19 (t, *J* = 7,2 Hz, 12H, H-14)

¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 179,55, 158,40, 156,23, 148,82, 142,37, 134,33, 133,74, 130,64, 127,66, 124,56, 114,78, 114,00, 109,02, 96,28, 70,11, 69,28, 65,61, 46,46, 43,99, 31,17, 12,93

Polymerisationen

PMMA-Bissulfid 5-6



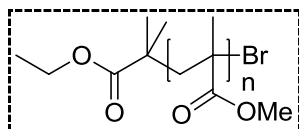
Methylmethacrylat (2 ml, 19 mmol) wird in Anisol (10 ml) im Schlenkcolben vorgelegt und 45 Minuten durch Einleitung von Argon entgast. Nach Zugabe von Cu(I)Br (14 mg, 0,1 mmol) sowie PMDETA (17 μ l, 0,09 mmol) wird die Bildung der Komplexverbindung abgewartet und nach Addition von ATRP-BI 5-4 (63 mg, 0,09 mmol) sofort drei freeze-pump-thaw Zyklen angeschlossen. Die Reaktionslösung wird auf 32°C erwärmt und nach Rühren über Nacht durch Entfernen der Inertgasatmosphäre abgebrochen. Das Polymer wird durch Zutropfen in Hexan ausgefällt und der Katalysator durch säulenchromatographische Reinigung an Alox mit Essigester als Eluens abgetrennt.

Masse: 870 mg (Umsatz = 46%, $P_n = 172$)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (250 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 7,76 (d, $J = 8,1$ Hz, $f = 0,01$, **H-1**), 7,60 (d, $J = 8,2$ Hz, $f = 0,01$, **H-2**), 7,14 (d, $J = 8,3$ Hz, $f = 0,02$, **H-3**), 7,07 (d, $J = 8,1$ Hz, $f = 0,02$, **H-4**), 3,58 (s, $f = 3$, $-\text{OCH}_3$), 1,98 – 1,72 (m, $f = 2$, $-\text{CH}_2$ -Rückgrat), 1,06 – 0,72 (m, $f = 3\text{H}$, $-\text{CH}_3$)

GPC (THF, PMMA-Standard): $M_n = 16783$ g/mol, $M_w = 25007$ g/mol, $D = 1,49$

PMMA 5-5

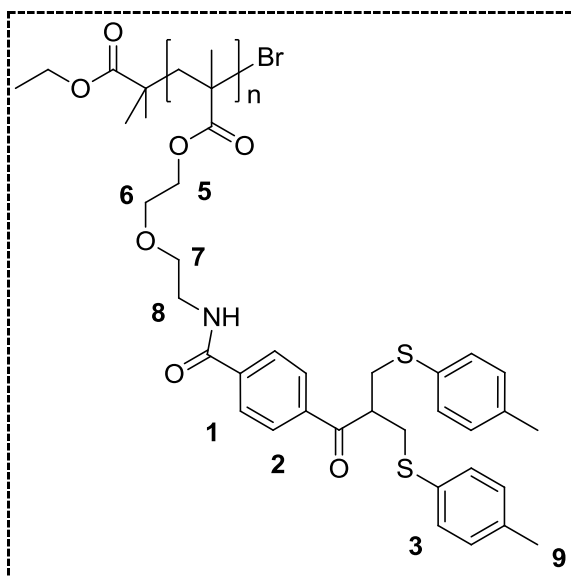
Die Polymerisation wird nach der Vorschrift von PMMA-Bissulfid 5-6 vorgenommen, als Initiator wird 2-Bromisobuttersäureethylester (27,6 μl , 0,9 mmol) eingesetzt. Verwendete Mengen: Methylmethacrylat (2 ml, 19 mmol), Cu(I)Br (27 mg, 0,19 mmol), PMDETA (33 μl , 0,19 mmol).

Masse: 1,27 g (Umsatz = 68%), $P_n = 140$

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (250 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 3,57 (s, $f = 3$, -OCH₃), 1,98 – 1,74 (m, $f = 2$, -CH₂-Rückgrat), 1,03 – 0,75 (m, $f = 3\text{H}$, -CH₃)

GPC (THF, PMMA-Standard): $M_n = 13977$ g/mol, $M_w = 21612$ g/mol, $D = 1,55$

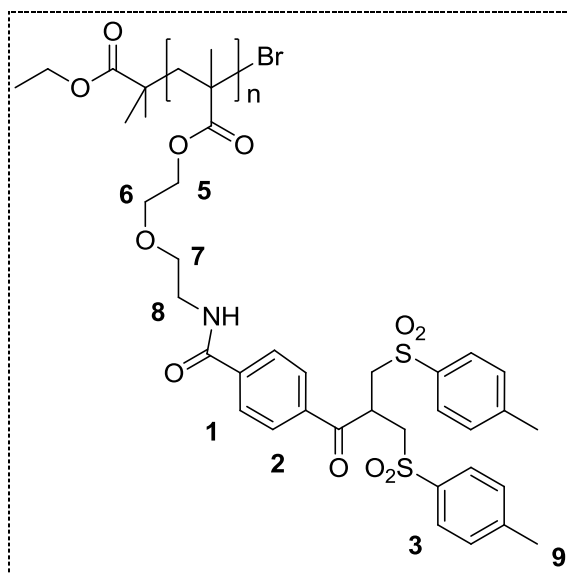
Poly(bissulfid) 7-2

Interkalatormonomer 7-1 (369 mg, 0,62 mmol) wird in entgastem Anisol (200 μ l) gelöst. Kupfer(II)bromid (0,9 mg, 0,0064 mmol) und PMDETA (1,3 μ l, 0,0064 mmol) werden ebenfalls in entgastem Anisol vorgelegt und anschließend im Argongegenstrom zu der Monomerlösung gegeben. Nach der Zugabe von 2-Bromisobuttersäureethylester (0,9 μ l, 0,0064 mmol) wird die Reaktionslösung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und am Hochvakuum drei freeze-pump-thaw Zyklen angeschlossen. Die Lösung wird unter Argon aufgetaut, auf 32°C erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Entfernen der Inertgasatmosphäre und Verdünnen mit MeOH abgebrochen. Das Polymer wird durch wiederholtes Ausfällen in Diethylether und anschließendem Säulen an Aluminiumoxid von Katalysator und restlichem Monomer gereinigt

Masse: 61 mg (Umsatz = 17%)

¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,79 (d, $J = 7,5$ Hz, $f = 3$, H-1 & -NH), 7,62 - 7,54 (m, $J = 8,5$ Hz, $f = 2$, H-2), 7,12 - 6,91 (m, $f = 8$, H-3 & H-4), 4,31 - 3,87 (m, $f = 2$, H-5), 3,87 - 3,68 (m, $f = 1$, -CH(CH₂)₂), 3,72 - 3,38 (m, $f = 6$, H-6 - H-8), 3,30 - 3,03 (m, $f = 4$, -CH-(CH₂)₂-), 2,26 (s, $f = 6$, H-9), 2,05 - 1,70 (m, $f = 2$, -CH₂-Rückgrat), 1,11 - 0,78 (m, $f = 3$ H, -CH₃)

Poly(bissulfon) 7-3

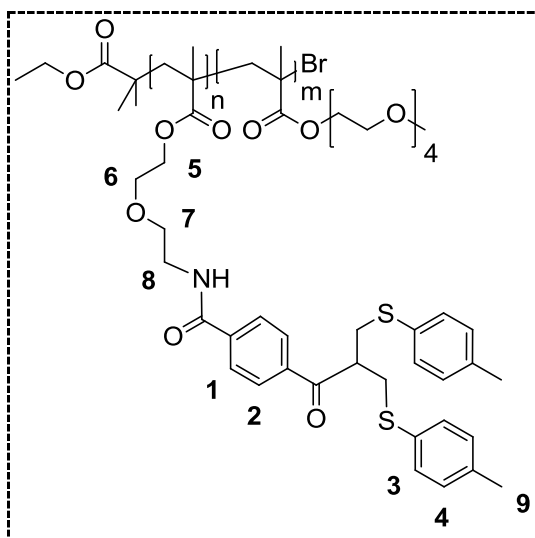
Poly(bissulfid) 7-2 (61 mg, entspricht 0,11 mmol an 7-1) wird in EtOAc/MeCN/H₂O (6:6:1, 13 ml) gelöst und mit Kaliumperoxomonosulfat (360 mg, 0,11 mmol) versetzt. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann mit EtOAc/H₂O (1:1, 100 ml) verdünnt und mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organischen Extrakte werden anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Filtrat wird unter Vakuum konzentriert und das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 12,9 mg (entspricht 0,02 mmol an oxidiertem 7-1, 18%), farbloser Feststoff

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,84 – 7,71 (m, *f* = 2, H-1), 7,64 – 7,51 (m, *f* = 6, H-2 und H-3), 7,35 – 7,25 (m, *f* = 4, H-4), 4,33 – 4,18 (m, *f* = 1, -CH(CH₂)₂), 4,13 – 3,95 (m, *f* = 2, H-5), 3,70 – 3,36 (m, *f* = 10, H-6 – H-8 & -CH-(CH₂)₂-), 2,41 (s, *f* = 6, H-9), 2,12 – 1,97 (m, *f* = 2, -CH₂-Rückgrat), 1,39 – 0,72 (m, *f* = 3H, -CH₃).

GPC (THF, PMMA-Standard): M_n = 13195 g/mol, M_w = 15480 g/mol, D = 1,17

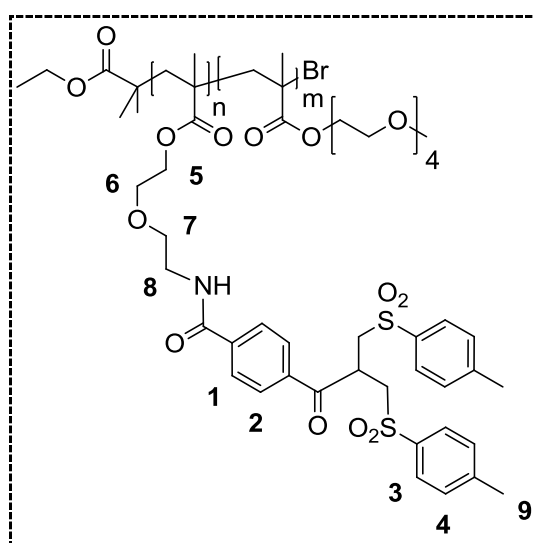
Poly(bissulfid-co-TEGMA) 7-6

Interkalatormonomer 7-1 (479 mg, 0,81 mmol) und Methacrylat 7-5 (242 mg, 0,88 mmol) werden in entgastem Anisol (630 μ l) vorgelegt und weitere 15 Minuten mit Argon entgast. Kupfer(II)bromid (2,4 mg, 0,017 mmol) und PMDETA (3,4 μ l, 0,017 mmol) werden im Argongegenstrom zugegeben. Nach zwei Minuten hat sich der Kupferkomplex gebildet und nach der Zugabe von 2-Bromisobuttersäureethylester (2,4 μ l, 0,017 mmol) wird die Reaktionslösung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und am Hochvakuum werden drei freeze-pump-thaw Zyklen angeschlossen. Die Lösung wird unter Argon aufgetaut, auf 32°C erhitzt und über 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Polymerisation durch Entfernen der Inertgasatmosphäre und Verdünnen mit MeOH abgebrochen. Das Polymer wird durch wiederholtes Ausfällen in Diethylether und anschließendem Säulen an Aluminiumoxid von Katalysator und restlichem Monomer gereinigt

Masse: 117 mg (Umsatz = 16,4%)

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,80 (d, *J* = 7,3 Hz, *f* = 2, **H-1**), 7,59 (d, *J* = 6,3 Hz, *f* = 2, **H-2**), 7,17 – 7,01 (m, *f* = 8, **H-3** & **H-4**), 4,16 – 3,97 (m, *f* = 4, **H-5a&b**), 3,72 – 3,05 (m, *f* = 25, **H-PEG** & **-CH-(CH₂)₂-** und **-CH-(CH₂)₂**), 2,32 (s, *f* = 6, **H-9**), 2,02 – 1,69 (m, *f* = 2, **-CH₂-Rückgrat**), 1,12 – 0,75 (m, *f* = 3H, **-CH₃**)

Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7

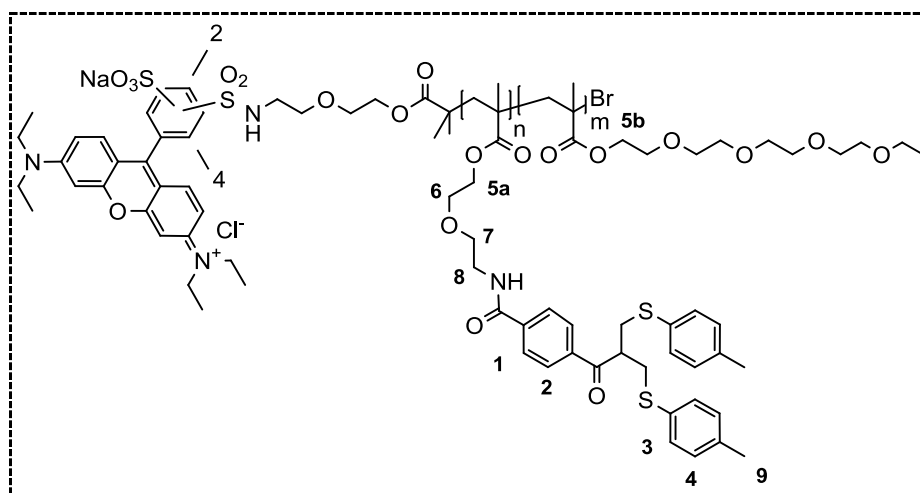
Poly(bissulfid-co-TEGMA) 7-7 (117 mg, entspricht 0,1 mmol an 7-1) wird in EtOAc/MeCN/H₂O (6:6:1, 13 ml) gelöst und mit Kaliumperoxomonosulfat (492 mg, 0,8 mmol) versetzt. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann mit DCM/H₂O (1:1, 100 ml) verdünnt und die wässrige Phase nochmals mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Filtrat wird unter Vakuum konzentriert. Bei dem Produkt handelt es sich um einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 72 mg (entspricht 0,06 mmol, 56%), farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (700 MHz, CD_2Cl_2 , 298,3 K):

δ 7,85 – 7,77 (m, $f = 2$, H-1), 7,65 – 7,57 (m, $f = 6$, H-2 & H-3), 7,39 – 7,30 (m, $f = 4$, H-4), 4,33 – 4,21 (m, $f = 1$, $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$), 4,11 – 3,99 (m, $f = 4$, H-5a & b), 3,69 – 3,40 (m, $f = 24$, H-PEG & $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$), 3,30 (s, $f = 3$, $-\text{OCH}_3$), 2,45 (s, $f = 6$, H-9), 2,00 – 1,81 (m, $f = 2$, $-\text{CH}_2$ -Rückgrat), 1,13 – 0,83 (m, $f = 3\text{H}$, $-\text{CH}_3$)

GPC (THF, PMMA-Standard): $M_n = 9513$ g/mol, $M_w = 11241$ g/mol, $D = 1,18$

Poly(bissulfid-co-TEGMA) 7-12

Interkalatormonomer 7-1 (273 mg, 0,46 mmol), Methacrylat 7-5 (409 mg, 2,0 mmol) und Sulforhodamin B Initiator 7-11 (2-4 mg, 0,0025 – 0,005 mmol) werden in entgastem Anisol (714 μl) vorgelegt und weitere 15 Minuten mit Argon entgast. Kupfer(II)bromid (3,2 mg, 0,022 mmol) und PMDETA (4,7 μl , 0,023 mmol) werden im Argongegenstrom zugegeben. Nach zwei Minuten hat sich der Kupferkomplex gebildet und die Reaktionslösung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und am Hochvakuum werden drei freeze-pump-thaw Zyklen angeschlossen. Die Lösung wird unter Argon aufgetaut, auf 60°C erhitzt und über Nacht gerührt. Anschließend wird die Polymerisation durch Entfernen der Inertgasatmosphäre und Verdünnen mit DCM abgebrochen. Das Polymer wird durch wiederholtes Ausfällen in Hexan und

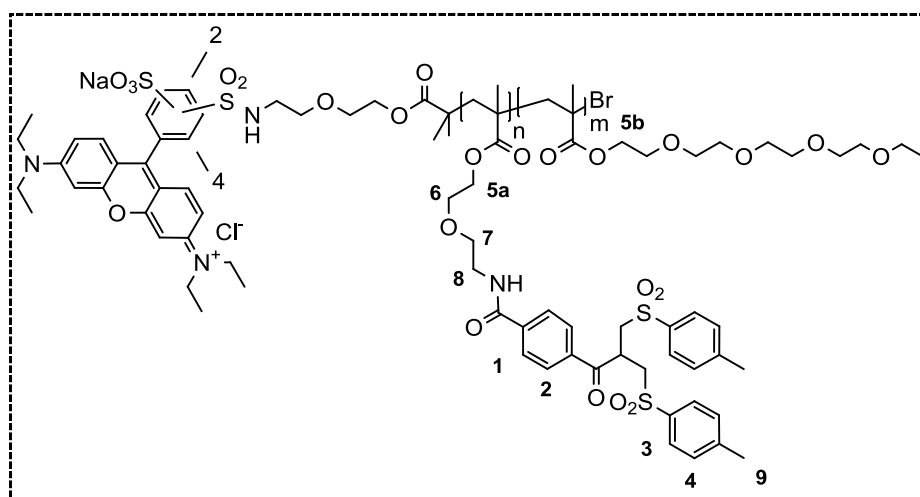
anschließendem Säulen an Aluminiumoxid von Katalysator und restlichem Monomer gereinigt

Masse: 18 mg (Umsatz = 1,7%)

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,89 – 7,68 (m, *f* = 2, H-1), 7,67 – 7,51 (m, *f* = 2, H-2), 7,15 – 6,94 (m, *f* = 6, H-3 & H-4), 4,27 – 3,90 (*f* = 2, H-5a&b), 3,89 – 3,01 (m, *f* = 15, H-PEG & -CH-(CH₂)₂- und -CH-(CH₂)₂), 2,29 (s, *f* = 5, H-9), 2,09 – 1,49 (m, *f* = 2, -CH₂-Rückgrat), 1,17 – 0,73 (m, *f* = 3H, -CH₃)

Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-8



Poly(bissulfid-co-TEGMA) 7-12 (18 mg, 0,034 mmol) wird in EtOAc/MeCN/H₂O (6:6:1, 1 ml) gelöst und mit Kaliumperoxomonosulfat (492 mg, 0,16 mmol) versetzt. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dann mit DCM (2 ml) verdünnt und die organische Phase mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Lösung wird anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Filtrat unter Vakuum eingedunstet. Das Polymer wird als violetter Feststoff erhalten.

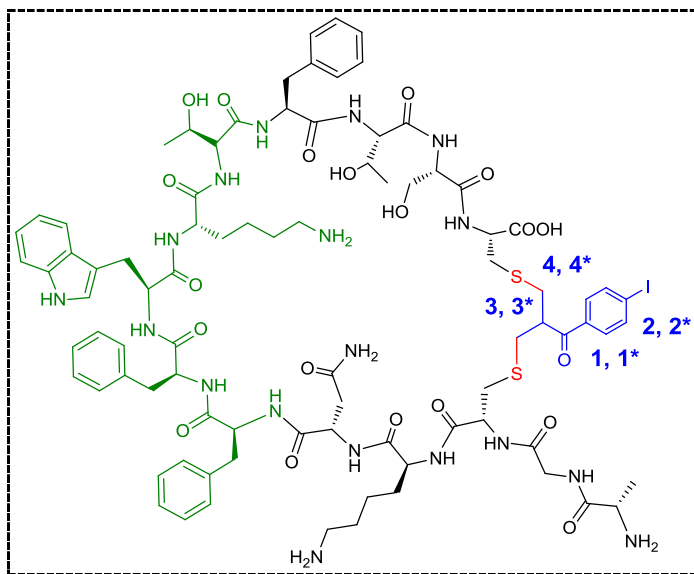
Ausbeute: 14,6 mg (0,032 mmol, 90%), violetter Feststoff

¹H-NMR-Spektrum (250 MHz, CD₂Cl₂, 298,3 K):

δ 7,92 – 7,63 (m, $f = 4$, H-1 & H-2), 7,57 (d, $J = 6,7$ Hz, $f = 4$, H-3), 7,32 (d, $J = 6,8$ Hz, $f = 4$, H-4), 4,34 – 4,22 (m, $f = 1$, -CH(CH₂)₂), 4,18 – 3,94 (m, $f = 3$, H-5a & b), 3,77 – 3,27 (m, $f = 15$, H-PEG & -CH-(CH₂)₂- & OCH₃), 2,40 (s, $f = 6$, H-9), 2,09 – 1,44 (m, $f = 2$, -CH₂-Rückgrat), 1,19 – 0,74 (m, $f = 3H$, -CH₃)

GPC (THF, PMMA-Standard): $M_n = 8690$ g/mol, $M_w = 10006$ g/mol, $D = 1,16$

Modifizierte Somatostatine

Iod-Somatostatin 4-1

Somatostatinacetat (5 mg, 3 μ mol) wird in PB 50 mM, pH 7,8 (12 ml). Zu dieser Lösung wird Tris(2-carboxyethyl)phosphin HCl (1,7 mg, 6 μ mol) gegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Iodmonosulfon 3-5b (3,5 mg, 6 μ mol) wird in Acetonitril (8 ml) gelöst und vorsichtig zur Lösung des reduzierten Peptids hinzuge tropft. Die Mischung wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, einkonzentriert und durch einen Membranfilter (0,22 μ m) filtriert. Iodsomatostatin xx

wird nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC und Gefriertrocknung der entsprechenden Fraktionen als farbloser Feststoff enthalten.

Ausbeute: 2,5 mg (1,3 μmol , 43%) als farbloser Feststoff

MALDI-ToF MS ($[M + H]^+$): m/z 1909,5

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (700 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10), 298,3 K):

Peptidrückgrat:

Ala1	NH: -	H^α : 4,09	H^β : 1,50				
Gly2	NH:8,60	H^α : 3,97					
Cys3	NH:8,42	H^α : 4,63	$\text{H}^{\beta 1}$: 3,09	$\text{H}^{\beta 2}$: 2,92			
Lys4	NH:8,56	H^α : 4,16	$\text{H}^{\beta 1}$: 1,64	$\text{H}^{\beta 2}$: 1,58	H^γ : 1,25	H^δ : 1,31	H^ϵ : 2,89
Asn5	NH: 8,12	H^α : 4,49	H^β : 2,54	NH_2 : 6,81			
Phe6	NH: 8,00	H^α : 4,33	H^β : 2,67	$\text{H}^{2,6}$: 7,17	$\text{H}^{3,5}$: 7,26	H^4 : 7,28	
Phe7	NH: 8,03	H^α : 4,40	H^β : 2,90	$\text{H}^{2,6}$: 7,08	$\text{H}^{3,5}$: 7,25	H^4 : 7,28	
Trp8	NH: 7,62	H^α : 4,54	$\text{H}^{\beta 1}$: 3,23	$\text{H}^{\beta 2}$: 3,20	H^2 :7,10	H^4 : 7,45	H^5 : 7,11
		H^6 : 7,18	H^7 : 7,39	NH^{ar} : 10,13			
Lys9	NH: 7,80	H^α : 4,08	$\text{H}^{\beta 1}$: 1,64	$\text{H}^{\beta 2}$: 1,55	H^γ : 1,04	H^δ : 1,50	H^ϵ : 2,81
Thr10	NH: 7,75	H^α : 4,24	H^β : 4,14	H^γ : 1,05			
Phe11	NH: 8,16	H^α : 4,60	$\text{H}^{\beta 1}$: 3,11	$\text{H}^{\beta 2}$: 3,02	$\text{H}^{2,6}$: 7,17	$\text{H}^{3,5}$: 7,25	H^4 : 7,28
Thr12	NH: 7,99	H^α : 4,33	H^β : 4,13	H^γ : 1,09			
Ser13	NH: 8,07	H^α : 4,47	H^β : 3,82				
Cys14	NH: 8,13	H^α : 4,44	$\text{H}^{\beta 1}$: 3,14	$\text{H}^{\beta 2}$: 3,02			

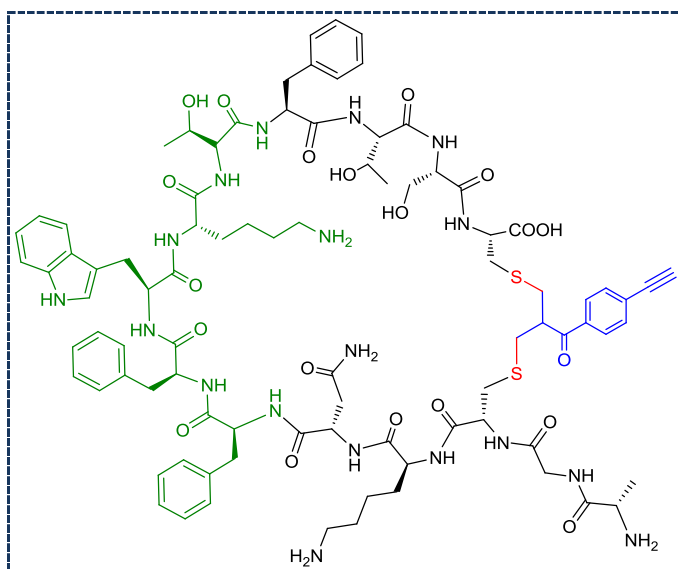
Linker (so weit identifizierbar, * entspricht dem zweiten Diastereomer):

δ 7,69 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, **H-1**), 7,63 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, **H-1***), 7,43 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, **H-2**), 7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, **H-2***), 3,81 – 3,75 (m, 2H, **H-3** und **H-3***)

UV/VIS (H₂O): λ_{\max} (ϵ) 278,5 (11739)

HRMS (ESI) calc. 1909,6987 exp. 1909,6993

Ethynyl-Somatostatin 4-2



Somatostatinacetat (5 mg, 3 μ mol) wird in PB 50 mM, pH 7,8 (12 ml) vorgelegt. Zu dieser Lösung wird Tris(2-carboxyethyl)phosphin HCl (1,7 mg, 6 μ mol) gegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Ethynylmonosulfon 3-7 (2 mg, 6 μ mol) wird in Acetonitril (8 ml) gelöst und vorsichtig zur Lösung des reduzierten Peptids hinzuge tropft. Die Mischung wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, einkonzentriert und durch einen Membranfilter (0,22 μ m) filtriert. Iodsomatostatin xx wird nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC und Gefriertrocknung der entsprechenden Fraktionen als farbloser Feststoff erhalten.

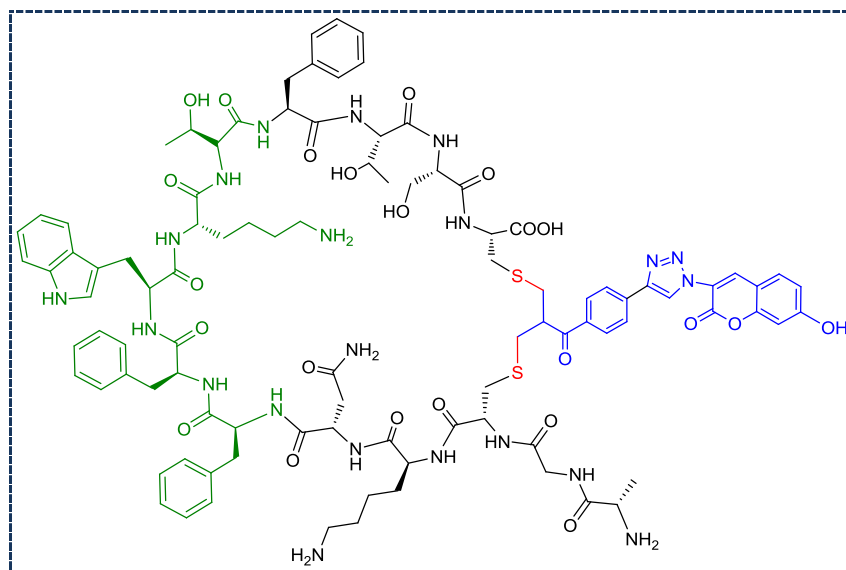
Ausbeute: 2,5 mg (1,7 μ mol, 56%) als farbloser Feststoff

MALDI-ToF MS ($[M + H]^+$): m/z 1809,24

HRMS (ESI) calc. 904,4028 exp. 904,4018

UV/VIS (H₂O): λ_{\max} (ϵ) 281,5 (16108)

Cumarin-Somatostatin 4-12

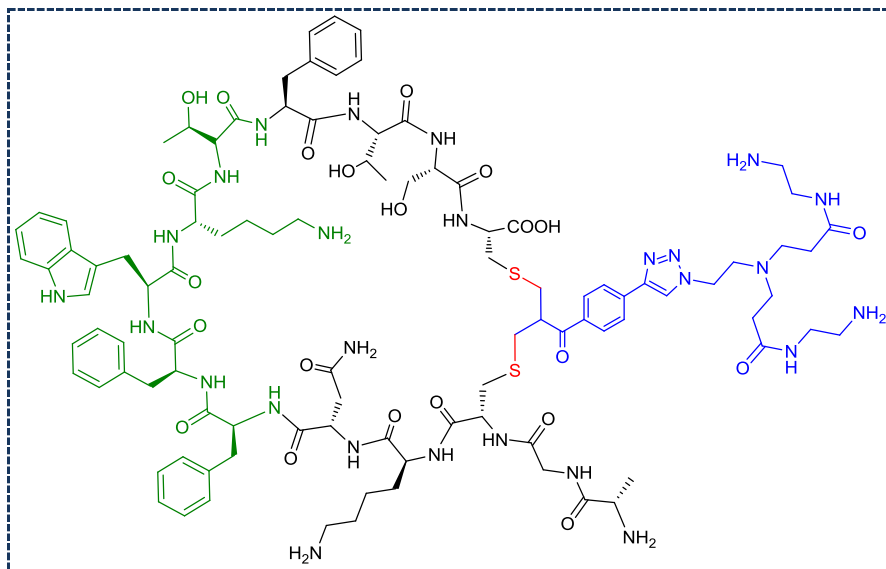


Ethynyl-Somatostatin 5-2 (0,05 mg, 0,03 μmol) wird in H₂O (90 μl) gelöst und dazu wird PB 50 mM, pH 7,8 (298 μl) gegeben. Das Peptid wird anschließend mit einer Lösung von 3-Azido-hydroxycumarin (0,01 mg, 0,05 μmol) in DMSO (50 μl) versetzt. Kupfer(II)sulfat (0,008 mg, 0,05 μmol) in H₂O (2,3 μl) wird vor der Zugabe mit Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (0,11 mg, 0,25 μmol) in H₂O (34,3 μl) vermischt und dann zur Reaktion hinzu pipettiert. Nach der Zugabe von Aminoguanidin (0,19 mg, 2,5 μmol) in Wasser (4,8 μl) und Natriumascorbat (0,5 mg, 2,5 μmol) in Wasser (34,3 μl) wird die Mischung gevortext und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Lösung einkonzentriert und durch einen Membranfilter (0,22 μm) filtriert. Das Produkt wird nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC und Gefriertrocknung der entsprechenden Fraktionen als farbloser Feststoff enthalten.

MALDI-ToF MS ($[M + H]^+$): m/z 2012,09

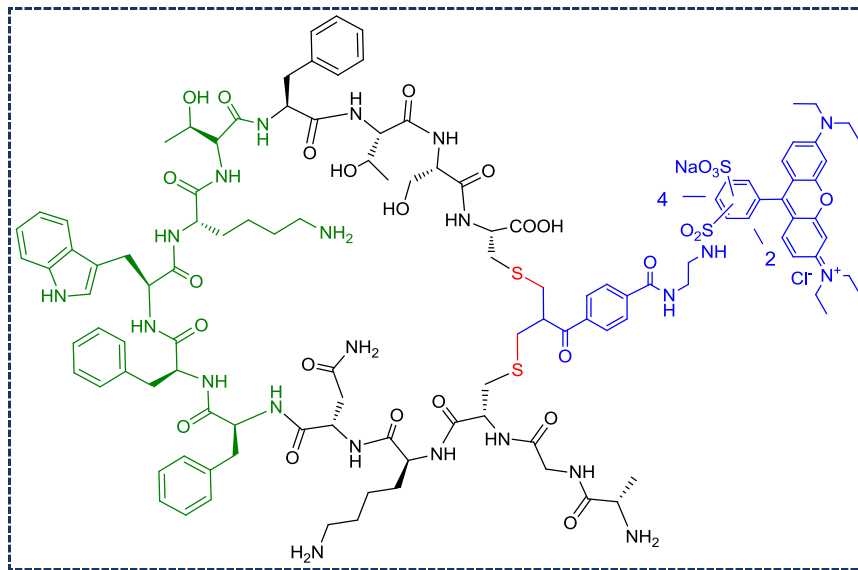
HRMS (ESI) calc. 1005,9193, exp. 1005,9155

PAMAM-G1-Somatostatin



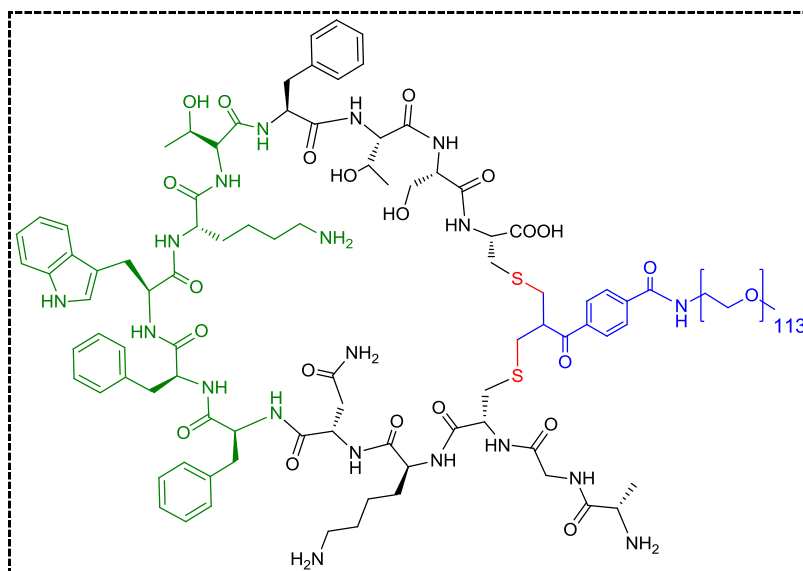
Ethynyl-Somatostatin 4-2 (0,05 mg, 0,03 μmol) wird in H_2O (46 μl). Danach werden Kupfer(II)sulfat (0,01 mg, 0,06 μmol), Natriumascorbat (0,06 mg, 0,3 μmol) und PAMAM-G1-Monosulfon (0,02 mg, 0,06 μmol , vgl. Diplomarbeit O. Dumele) in Wasser gelöst zupipettiert. Die Lösung wird kurz gevortext und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Analyse mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie werden 5 μl Reaktionslösung entnommen.

MALDI-ToF MS ($[M + \text{Na}]^+$): m/z 2145,03

LRB-Somatostatin 4-13

Somatostatinacetat (1 mg, 0,6 μmol) wird in PB 50 mM, pH 7,8 (2,5 ml) vorgelegt und mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin HCl (0,3 mg, 1,2 μmol) versetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. LRB Bissulfon 4-5 (3,25 mg, 3 μmol) wird in Acetonitril (1,6 ml) gelöst und vorsichtig zur Lösung des reduzierten Peptids hinzuge tropft. Die Mischung wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, einkonzentriert und durch einen Membranfilter (0,22 μm) filtriert. Iodsomatostatin xx wird nach Aufreinigung mittels präparativer HPLC und Gefriertrocknung der entsprechenden Fraktionen als leicht violett gefärbter Feststoff enthalten.

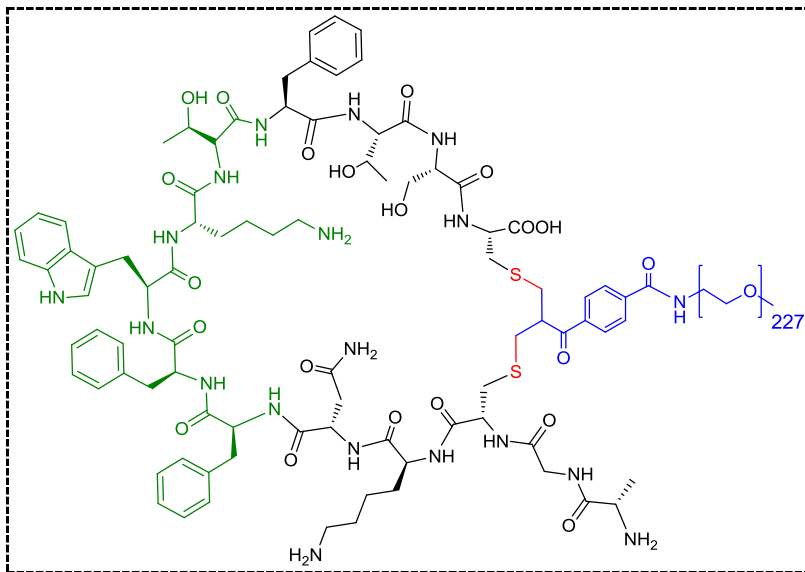
MALDI-ToF MS ($[M + H]^+$): m/z 2412,11

PEG-(5k)-Somatostatin 6-1a

Somatostatinacetat (12,5 mg, 7,6 μmol) wird in H_2O (25 mg/ml) vorgelöst und dann in PB 50 mM, pH 7,8 (50 ml) pipettiert. PEG-5K-Bissulfon 3-15 (34,9 mg, 6,4 μmol) werden zugeben und vorsichtig durch Schwenken in Lösung gebracht. Nach fünf Minuten wird die Lösung mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin HCl (2,2 mg, 7,8 μmol) gelöst in Wasser (74 μl) versetzt. Die Lösung wird bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Reaktionslösung wird direkt auf PD-10 Säulen aufgetragen, die ersten 2,5 ml Eluat verworfen und die folgenden 3,5 ml Eluat gesammelt und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 37 mg (5,3 μmol , 84%) als farbloser Feststoff

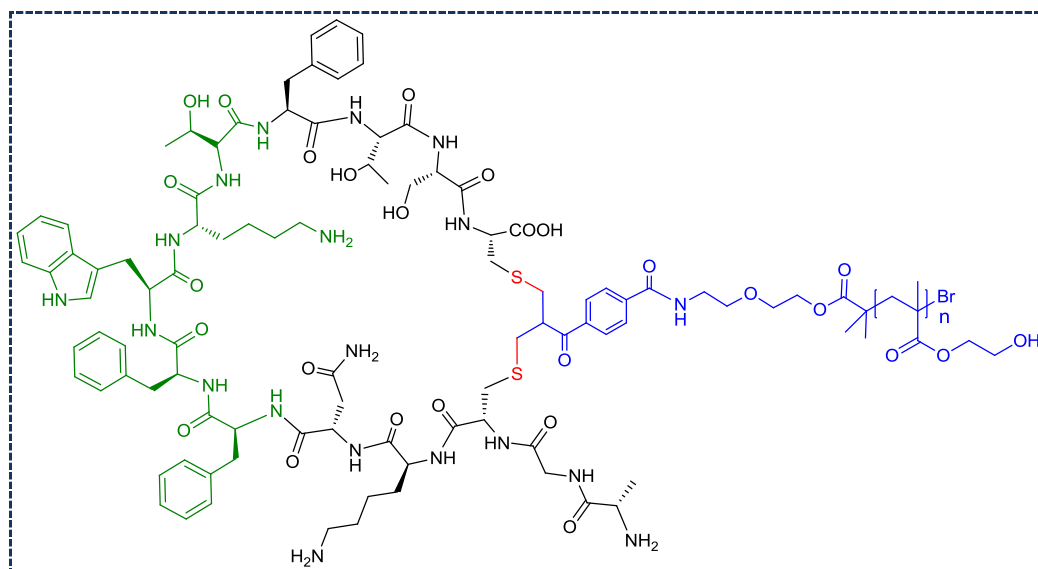
GPC (DMF, PEO-Standard): $\text{Max}_{\text{uv}} = 6479 \text{ g/mol}$ ($\text{Max}_{\text{ber}} = 6491 \text{ g/mol}$)

PEG-(10k)-Somatostatin 6-1b

Die Versuchsdurchführung und Aufreinigung entspricht dem Ansatz von PEG-(5k)-Somatostatin. An Stelle von PEG-(5k)-Bissulfon wird PEG-(10K)-Bissulfon (66,5 mg, 6,3 mmol) eingesetzt.

Ausbeute: 64 mg (5,4 μ mol, 87%) als farbloser Feststoff

GPC (DMF, PEO-Standard): $\text{Max}_{\text{UV}} = 12877 \text{ g/mol}$ ($\text{Max}_{\text{ber}} = 11830 \text{ g/mol}$)

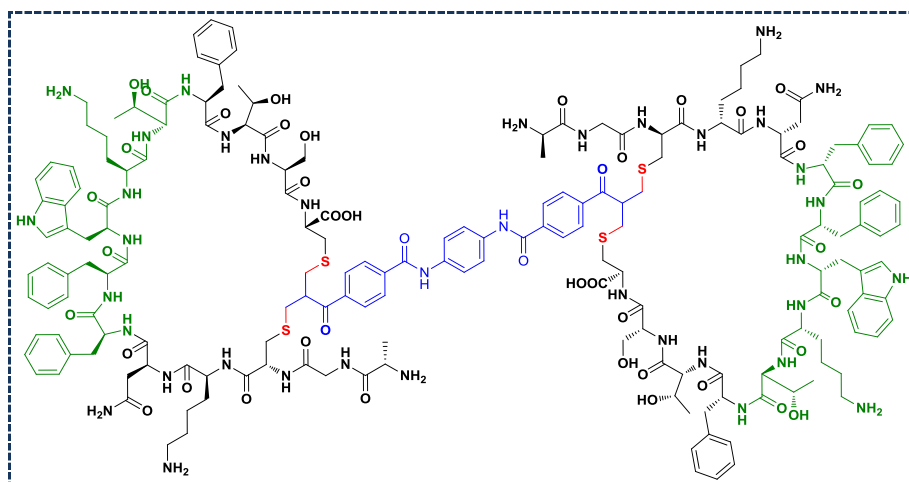
PHEMA-Somatostatin 6-4

ATRP-Somatostatin 6-3 (5,3 mg, 1,3 μmol) und Hydroxyethylmethacrylat (220 μl , 2 mmol) werden in entgastem MeOH vorgelegt. Die Lösung wird im Hochvakuum in flüssigem Stickstoff eingefroren, drei Vakuum-Argon-Zyklen angeschlossen und die Reaktionlösung unter Argon aufgetaut. In einem zweiten Schlenkcolben werden Kupfer(II)bromid (0,9 mg, 6,8 μmol) und 2,2'-Bipyridin (1,8 mg, 12,5 μmol) vorgelegt und nach mehreren Vakuum-Argon-Zyklen mit entgastem MeOH (52,5 mg/ml) versetzt. Diese Katalysatorlösung wird im Argongegenstrom zu der Initiatorlösung pipettiert. Die Polymerisation wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Entfernen der Inertgasatmosphäre und Verdünnen mit MeOH abgebrochen. Das Polymer wird durch wiederholtes Ausfällen in Diethylether von Katalysator und restlichem Monomer gereinigt.

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD-d_4 , 298,3 K)

δ 8,17 – 6,69 (m, $J = 0,56$, alle aromatischen Protonen von Somatostatin, sowie die Linkerprotonen des A,B-Systems), 4,04 (s, $J = 2$, $-\text{CH}_2-\text{COOR}$), 3,78 (s, $J = 2$, CH_2-OH), 2,24 – 1,74 (m, $J = 2$, $-\text{CH}_2$ -Rückgrat), 1,20 – 0,83 (m, $J = 3\text{H}$, $-\text{CH}_3$)

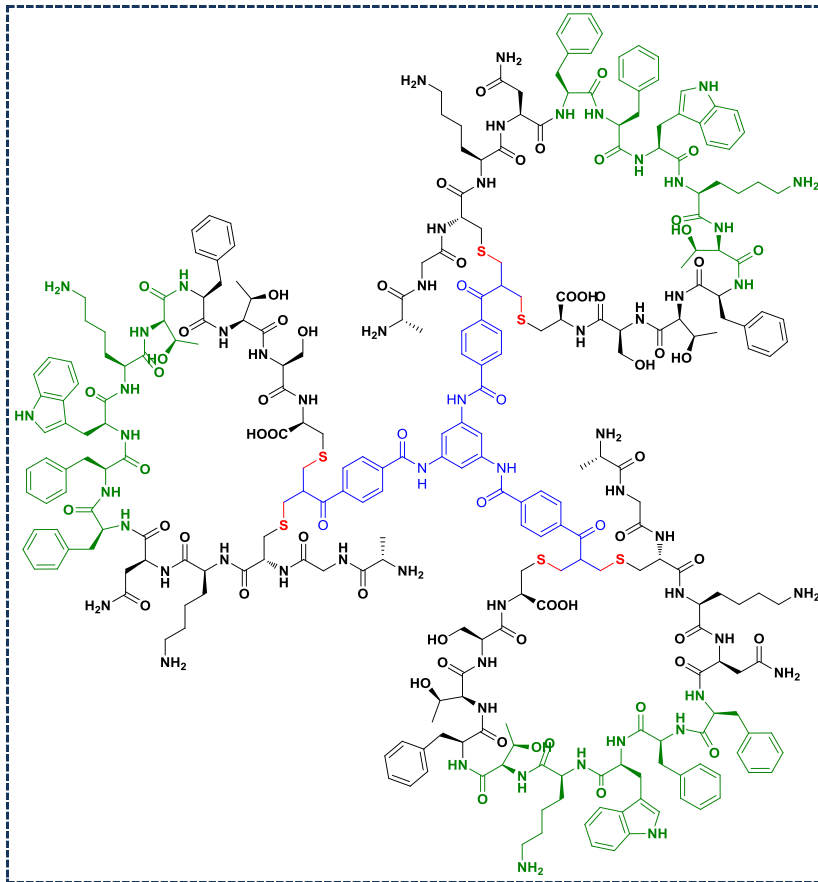
GPC (DMF, PMMA-Standard): $M_n = 14966$ g/mol, $M_w = 27875$ g/mol, $D = 1,86$

Somatostatin-Dimer 6-11

Somatostatin (17,9 mg, 11 μ mol) wird in destilliertem Wasser (10 mg/ml) gelöst und vorsichtig in PB 50 mM, pH 7,8 (40 ml) zugetropft. Die Lösung wird mit Acetonitril (27 ml) versetzt und Tetrasulfon 6-4 (12,4 mg, 12 μ mol), welches zuvor in Acetonitril (562 μ l) gelöst wird, wird zugegeben. Die Lösung wird vorsichtig geschwenkt und für 72 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Reaktion fällt ein farbloser Feststoff aus, der abzentrifugiert wird und im Hochvakuum getrocknet wird.

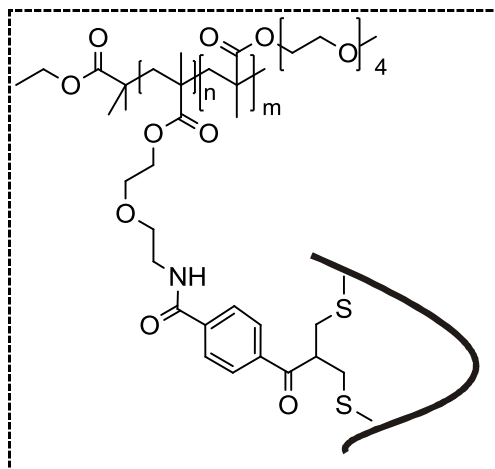
Ausbeute: 4 mg (1,1 μ mol, 11%) als farbloser Feststoff

MALDI-ToF MS (M^+): m/z 3726,70

Somatostatin Trimer 6-13

Tetrasulfon 3-34 (1,3 mg, 1 μ mol) wird in Acetonitril (4,5 mg/ml) gelöst und zu einer Lösung von TCEP (1,7 mg, 6 μ mol) und Somatostatin (5 mg, 3 μ mol) in PB 50 mM, pH 7,8/Acetonitril (3:2, 20 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wird vorsichtig geschwenkt und übers Wochenende bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird gefriergetrocknet, der Rückstand in destilliertem Wasser wiederaufgenommen und über präparative HPLC aufgereinigt. Erhalten werden konnte dabei natives Somatostatin und difunktionalisiertes 3-34, das Produkt wird in der Reaktionslösung massenspektrometrisch nachgewiesen.

MALDI-ToF MS ($[M+5H+Na]^+$): m/z 5578,42

Poly(bissulfon-co-TEGMA-Somatostatin) 7-13

Poly(bissulfon-co-TEGMA) 7-7 (1 mg, entspricht 0,8 μmol an 7-1 wird in DMF (100 μl) gelöst und in PB 50 mM, pH 7,8 (10,2 ml) pipettiert. Somatostatinacetat (2,55 mg, 1,6 μmol) und TCEP (0,9 mg, 3,1 μmol) werden in Wasser gelöst und zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, dabei bildete sich ein Niederschlag, der sich weder in wässrigen noch in organischen Lösungsmitteln in Lösung bringen ließ. Die Suspension wird zweimal mit DCM extrahiert und die organische Lösung wird im Vakuum eingedunstet. Das Polymer wird in Hexan ausgefällt.

GPC (THF, PMMA-Standard): $M_n = 11392 \text{ g/mol}$, $M_w = 15685 \text{ g/mol}$, $D = 1,38$

Bei folgenden Substanzen war kein Reinheitsnachweis möglich: 3-6, 4-5, 5-8, 5-10, 6-1a, 6-1b, 6-3, 6-4, 6-5, 7-1, 7-10, 7-11.

Zellaufnahmeexperimente

In einer schwarzen 96 *well plate* mit durchsichtigem Boden werden in 100 μl Medium 20 000 Zellen pro *well* ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen wird LRB-Somatostatin 4-13 zugegeben, jeder Wert wird dabei als Triplikat bestimmt. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C in Gegenwart von 5% CO₂ werden die Zellen zur Entfernung von ungebundenem LRB-Somatostatin 4-13 dreimal mit PBS gewaschen. Die Emission des aufgenommenen Konjugats in die Zellen wird mit einem Grünfilter (Excitation: 525 nm, Emission: 580 – 640 nm) unter Verwendung der Fluoreszenzeinheit des GloMax Multireaders (Promega) gemessen.

Mikroskopieexperimente

25 00 Zellen pro *well* werden in 350 μl Medium in ein Deckglas mit acht *wells* (LabTek, Nunc, Langensfeld) gesät und nach Anwachsen mit verschiedenen Mengen an LRB-Somatostatin 4-13 (0,5 mg/ml) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Betrachtung unter dem Mikroskop werden die Zellen entweder in PBS in Gegenwart von 3% Glukose für Lebendzelluntersuchungen gehalten oder mit 80% Methanol und 20% PBS für zehn Minuten fixiert. Als Setup wird ein Olympus laser scanning Setup Mikroskop IX70 mit einem 40x Wasserobjektiv (Olympus) eingesetzt. Die Anregungswellenlänge betrug 543 nm, die Emission wird unter Verwendung eines 565 nm *long pass* Filters gemessen. Für die Anfärbung mit DAPI werden die fixierten Zellen in einer 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI-Lösung für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen einmal mit Methanol gewaschen und während der Mikroskopieexperimente in PBS aufbewahrt. Für die Anregungsexperimente wird das DAPI-Chromophor, eine Quecksilberdampfampe und der Filterwürfel WU (Olympus, ex: BP 330-385 nm, Em BA 420 LP) verwendet.

Literatur

- [1] S. Brocchini, S. Balan, A. Godwin, J.-W. Choi, M. Zloh, S. Shaunak, *Nature Protocols* **2006**, *1*, 2241-2252.
- [2] A. Lewis, Y. Tang, S. Brocchini, J.-w. Choi, A. Godwin, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2144-2155.
- [3] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Organic Letters* **2004**, *6*, 4603-4606.
- [4] T. Ishizone, A. Seki, M. Hagiwara, S. Han, H. Yokoyama, A. Oyane, A. Deffieux, S. p. Carlotti, *Macromolecules* **2008**, *41*, 2963-2967.

X Anhang

X-1 Publikationen

- [1] A. Pfisterer, K. Eisele, X. Chen, M. Wagner, K. Müllen, T. Weil, *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 9697-9707.
- [2] W. Tao, A. Pfisterer, O. Dumele, M. Lamla, T. Weil, *Journal of the American Chemical Society (in preparation)* **2011**.