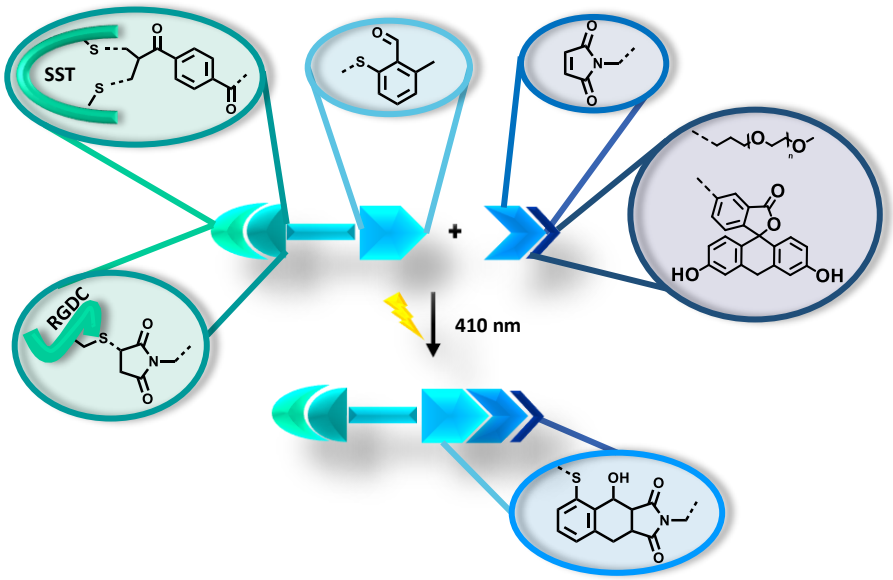
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR POLYMERFORSCHUNG

PHOTO-INDUZIERTE BIOKONJUGATION



Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science
der Biomedizinischen Chemie

Leona LUCAS RODRIGUES

Februar 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2018 bis Februar 2019 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tanja Weil im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Tanja Weil

Zweitgutachter: Prof. Dr. Pol Besenius

Abgabedatum: 28.02.2019

Eigenständigkeitserklärung

Masterarbeit im Studiengang Chemie, Biomedizinische Chemie oder Polymerchemie an der Johannes Gutenberg – Universität Mainz

Ich, Leona Lucas Rodrigues, Matrikelnummer 2707705, versichere, dass ich meine Masterarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

_____ _____

(Ort, Datum) (Unterschrift)

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Tanja Weil für die Möglichkeit bedanken, diese Masterarbeit in ihrem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen und für die Auswahl des interessanten und vielseitigen Themas.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Pol Besenius danken, dass er sich bereit erklärt hat, diese Arbeit zu begutachten. Ebenfalls zu danken habe ich der Analytikabteilung des Max-Planck-Instituts für Polymerforschung für das schnelle und zuverlässige Bearbeiten meiner Proben.

Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Arbeitskreis für die offene und freundliche Aufnahme und die entspannte und angenehme Laboratmosphäre bedanken. Dabei möchte ich mich besonders bei Maks und Astrid für die stete Hilfsbereitschaft und fachliche Beratung im Labor bedanken und bei Pia, Sarah, Julius, Thorsten und Daniel für die gute Laune und die nette Zeit im Büro bedanken. Mein Dank gilt auch meiner Betreuerin Seah Ling für wissenschaftliche und organisatorische Unterstützung. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Florian Feist, der mir trotz geographischer Distanz zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Es war mir eine große Freude, dieses Projekt mit ihm bearbeiten zu dürfen. Vielen Dank für die bereichernde, lustige und interessante Zeit und für das ausführliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, meiner Schwester und meinem Freund. Vielen Dank, dass ihr mich während des gesamten Studiums unterstützt und motiviert habt und dafür, dass ich mich auf euch verlassen kann und ihr immer für mich da seid. Danke für das Verständnis und Rücksichtnahme in dieser Zeit und ebenfalls für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen Dank.

Kurzzusammenfassung

Bioorthogonale ortsspezifische Proteinmodifikationstechniken bieten großes Potential für biomedizinische Anwendungen, wie der molekularen Bildgebung zur Aufklärung komplizierter biologischer Prozesse oder dem Aufbau selektiver und effizienter Proteintherapeutika. Die Entwicklung neuer photoinduzierter bioorthogonaler Konjugationsmethoden, die mittels energiearmer, nicht zellschädlicher Strahlung aktiviert werden, bieten die Möglichkeit der örtlichen und zeitlichen Kontrolle der Reaktion und somit großes Potential im medizinischen Bereich. In dieser Arbeit wurde ein solches System, das basierend auf einer photoinduzierten Biokonjugation von *ortho*-Methylbenzaldehyden unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht entwickelt und untersucht. Hierzu wurden zunächst Linker, bestehend aus der photoreaktiven Gruppe *o*-MBA, einem Abstandshalter und der biokonjugierbaren Gruppe designt und deren Synthesen durchgeführt und optimiert. Per Biokonjugation konnten die Linker mit zwei Modelpeptiden, RGDC und SST, konjugiert und erhaltene Biokonjugate mittels Photoreaktion mit verschieden Maleimidderivaten funktionalisiert werden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Protein und Peptid Modifikationen 1

1.1.1 RGDC 2

1.1.2 Somatostatin 4

1.2 Bioorthogonale Chemie 6

1.2.1 Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf 7

1.2.2 Kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition 9

1.2.3 Kupferfreie Azid-Alkin Cycloaddition 10

1.3 Photoinduzierte Biokonjugation 12

1.3.1 Photoreaktionen 12

1.3.2 Nitrilimin-vermittelte Tetrazol-En-Cycloaddition 13

1.3.3 Weitere Beispiele Photoinduzierter Biokonjugation 14

1.3.4 *ortho*-Quinondimethane (*o*-QDM) 15

2 Motivation und Zielsetzung 17

3 Ergebnisse und Diskussion 19

3.1 Maleimid - Linker 19

3.1.1 Strukturdesign und Syntheserouten des Maleimid - Linkers 19

3.1.2 Synthese der Maleimid - Linker 21

3.2 Bissulfon - Linker 26

3.2.1 Syntheserouten Bissulfon - Linker 27

3.2.2 Syntheseergebnisse Bissulfon - Linker 29

3.3 Biokonjugation 36

3.3.1 Peptid Konjugation - RGDC 36

3.3.2 Peptid Konjugation - SST 37

3.4 Photoreaktion 40

3.4.1 Optimierung der Photoreaktion 40

3.4.2 Photoreaktionen 43

4 Zusammenfassung und Ausblick 51

5 Experimentalteil 54

5.1 Materialien und Instrumente 54

5.1.1 Lösemittel und Chemikalien 54
5.1.2 Dünnschichtchromatographie 54
5.1.3 Säulenchromatographie 54
5.1.4 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) 54
5.1.5 NMR-Spektroskopie 55
5.1.6 Massenspektroskopie 55
5.2 Synthese 56
5.2.1 Synthese des Maleimid - Linkers 56
5.2.2 Synthese des Bissulfon - Linkers 65
5.2.3 Biokonjugations Reaktionen 70
5.2.4 Photoreaktionen[74] 72
6 Literaturverzeichnis 73
7 Anhang 78

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Äq	Äquivalente
BSA	Bovines Serumalbumin
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
CH	Cyclohexan
$CHCl_3$	Chloroform
Cs_2CO_3	Cäsiumcarbonat
δ	Chemische Verschiebung
d	Dublett (NMR) oder Tag(e)
D	Asparaginsäure
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d_6	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
EtOH	Ethanol
et al.	et alii
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimid
EtOAc	Ethylacetat
G	Glycin
h	Stunde(n)
Hz	Herz
HBTU	(2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
HPLC	Hochdruckflüssig chromatographie
J	Kopplungskonstante
K_2CO_3	Kaliumcarbonat
M	Molarität
m	Multiplett
MI	Maleimid
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol
LC-MS	Flüssig-Chromatographie-Massenspektometrie
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
NEt_3	Triethylamin
p	para
PEG	Polyethylenglycol
ppm	*Parts per million*
PP	Phosphatpuffer
R	Arginin
R_f	Retentionsfaktor
RT, rt	Raumtemperatur
s	Singulett
SST	Somatostatin
t	Triplett
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
o-MBA	*ortho*-Methylbezaldehyd
o-QDM	*ortho*-Quinondimethan
z.B	Zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Protein und Peptid Modifikationen

In den letzten Jahren ist in der Biochemie und der Pharmazie ein wachsendes Interesse an der ortsselektiven Funktionalisierung von Biomolekülen für therapeutische Anwendungen entstanden.[1] Es werden viele neuartige Biokonjugate hergestellt, um diese für medizinische Zwecke zu untersuchen.[2] Die große Vielfalt dieses Forschungsgebietes ist bedingt durch die Diversität an zu adressierenden biologischen Komponenten, wie Peptide, Oligonukleotide oder Antikörper und den entsprechenden Biokonjugationsmöglichkeiten.[3]

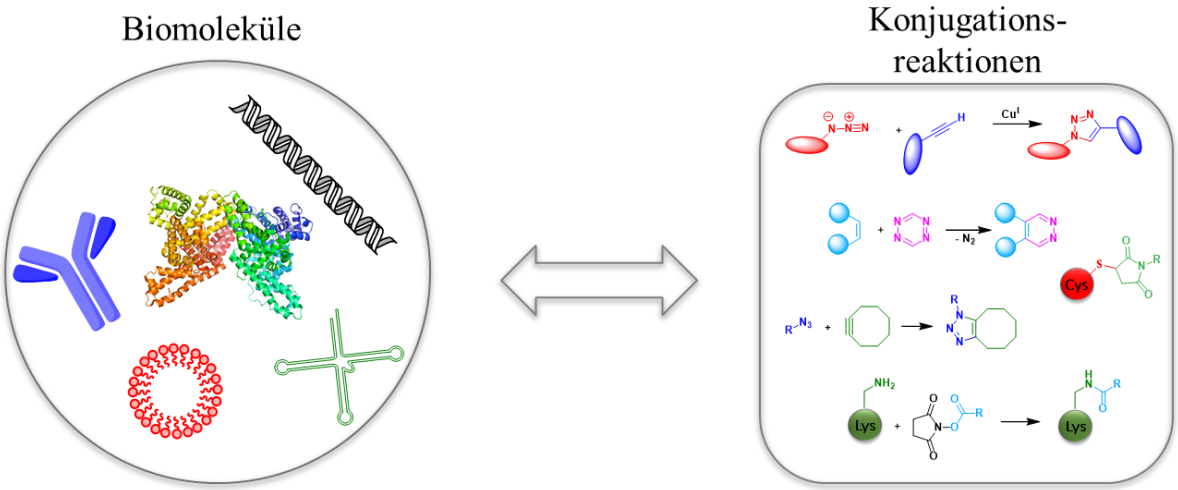


Abbildung 1 – Biokonjugation: Zusammenspiel von Biomolekülen und verschiedener Konjugationsreaktionen.

Es wird zum Beispiel die Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Proteinen, die Verknüpfung von Biomolekülen mit Chromophoren für bildgebende Verfahren oder die Anpassung neuartiger Biohybridmaterialen wie Protein-Polymer-Amphiphile untersucht.[4][5][6] Für solche und weitere biomedizinische Anwendungen ist eine ortsspezifische und homogene Proteinmarkierung essentiell. Interessante Biomoleküle müssen daher zunächst genau untersucht werden, um mögliche Konjugationsstellen zu identifizieren. Anschließend kann das Biomolekül mittels bekannter chemischer Ligationsmethoden wie der Click-Reaktion[7], Staudinger-Ligation[8], Kupplungsreaktionen oder Cycloadditionen[9] modifiziert werden. Ebenfalls ist die biochemische Veränderung bestimmter Zielsubstanzen durch enzymatische posttranslationale Modifikationen, metabolischen Einbau spezieller Aminosäuren oder Cystein-Punkt-Mutationen möglich.[10] Durch diese Ligationsmethoden wird selektive eine kovalente Bindung zwischen biologischen Molekülen ohne die Erfordernis einer Schutzgruppe ermöglicht.[11]

Attraktive konjugierbare Funktionalitäten in Proteinen und Peptiden sind z.B. freie Thiole, Disulfidbrücken sowie Amine und Carbonsäuren. Ein aktuelles Beispiel für Biokonjugation an Antikörpern unter der Verwendung der endogenen Disulfidbrücken wurde von Spring *et al.*[12] vorgestellt, indem sie eine trifunktionale Verknüpfung zwischen Antikörpern und Fluorophoren bzw. pharmakologisch aktiven Substanzen zeigen.

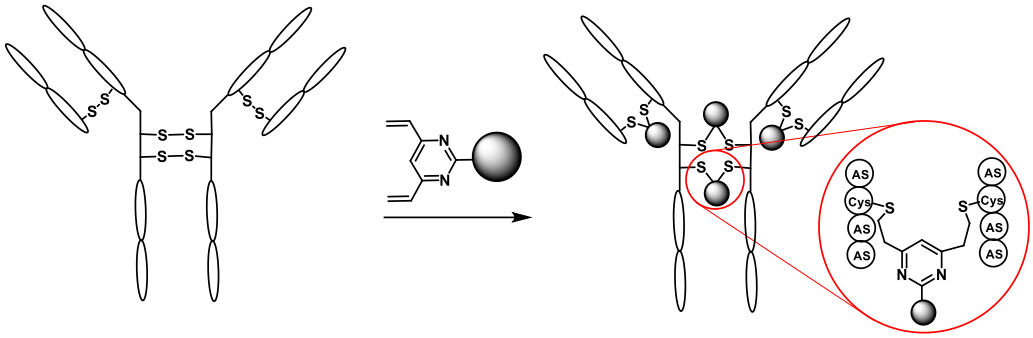


Abbildung 2 – Darstellung der Biokonjugationsreaktion eines Divinylpyrimidin-Linkers mit den endogenen Disulfidbrücken eines Antikörpers. Abbildung erstellt in Anlehnung an die Originalveröffentlichung.[12]

Großes Interesse besteht daran neue Biokonjugationselemente, wie das kürzlich vorgestellte Divinylpyrimidin, zu entwickeln, um effektiv medizinisch relevante Biomoleküle zu adressieren. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Biomolekülen handelt es sich um die biologisch aktiven Peptide RGD und Somatostatin, auf deren Eigenschaften und Konjugationsmöglichkeiten im Folgenden genauer eingegangen wird.

1.1.1 RGDC

Das Tripeptid RGD ist eine Signalsequenz von Proteinen der extrazellulären Matrix und dient der RGD-vermittelten Adhäsion an Zelloberflächen-Rezeptoren um Zellen mechanisch zu verankern und bestimmte Zellantworten zu aktivieren.[13] Diesen biochemischen Mechanismus macht sich die Medizin bereits in verschiedensten Gebieten zu Nutze und untersucht synthetische RGD-Derivate für Diagnostik und Therapie von Tumoren.[14][15] Die Peptidsequenz, die von Integrinen erkannt und gebunden wird, besteht aus Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D). Um Biokonjugation zu ermöglichen, kann die Sequenz auf verschiedene Weise modifiziert und verlängert werden.[13] Die biologische Aktivität von RGD-Peptiden basiert auf der aktiven Konformation des Peptid Rückgrats sowie der Orientierung der geladenen Seitenketten und hängt von der Ausrichtung der hydrophoben Reste ab (siehe Abbildung 3).[16] Wird das Peptid chemisch modifiziert ist es wichtig, dass die Signalsequenz, also die für die Rezeptorbindung relevante Konformation, nicht verändert wird.

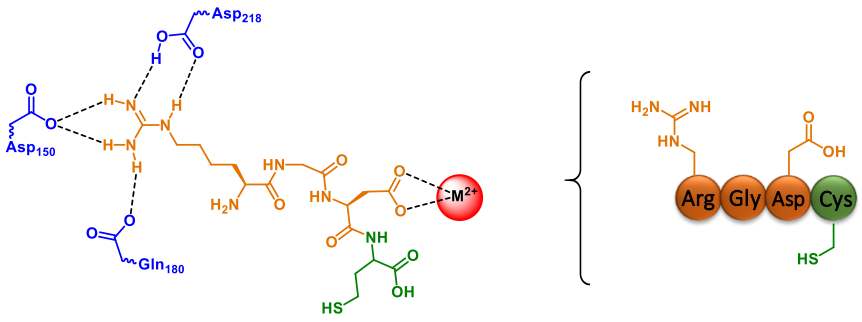


Abbildung 3 – Bindungsmotiv von RGDC (Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Cystein) in Integrinen.

Hierzu zählt die Stabilisierung der Guanidin-Gruppe über Aspatat bzw. Glutamat Aminosäuren und die Komplexierung eines Metallkations an die Asparaginsäure des RGDs im aktiven Zentrum der Integrine.[14] Eine beliebte Modifikation ist die C-terminale Verlängerung durch ein Cystein. Das resultierende RGDC-Peptid kann z.B. in biomimetischen Beschichtungen[17] oder in Hydrogelen zur Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen[18] verwendet werden. Bei der Aminosäure Cystein handelt es sich auf Grund ihres geringen endogenen Vorkommens um ein beliebtes ortsspezifisches Target. Aufgrund der einzigartigen Nukleophilie liegt die Thiolgruppe unter physiologischen Bedingungen als Thiolat-Anion vor und eignet sich daher optimal für Substitutionsreaktionen.[19] Die Thiol Funktionalität kann einfach in verschiedenen Biokonjugationsreaktionen eingesetzt werden. Häufig findet die Maleimid-Thiol-Click Reaktion Verwendung, um verschiedene Linker an Peptide zu konjugieren (Abbildung 4).

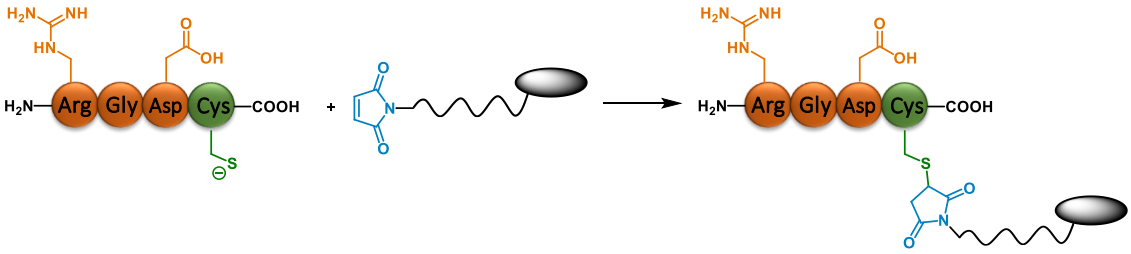


Abbildung 4 – Schematische Darstellung der Maleimid-Thiol-Reaktion von RGDC mit einem Maleimid-Derivat.

Bei der Reaktion handelt es sich um eine nukleophile Additionsreaktion des Thiolats an den elektronenarmen Michael-Akzeptor des Maleimid-Derivates. Die chemische Proteinmodifikation unter Verwendung von Maleimiden bietet den Vorteil einer schnellen Reaktionskinetik bei gleichzeitig großer Selektivität und die Möglichkeit, diese Transformation in wässrigen Medien in Abwesenheit von Katalysatoren durchzuführen.[19]

1.1.2 Somatostatin

Somatostatin-Rezeptoren (SSTRs), insbesondere SSTR-Subtyp-2, sind in verschiedenen Tumorzellen überexprimiert. Das endogene Peptid Somatostatin (SST) ist der Ligand des Somatostatin-Rezeptors. Das Hormon übt seine biologische Wirkung aus, indem es mit einer hohen Bindungsaffinität an seinen Rezeptor bindet. Bei Wirbeltieren wird es während der Verdauung von der Pankreas freigesetzt und hemmt die Ausschüttung von Glucagon. Es eignet sich daher sehr gut als Tumor-Target, um gezielt die Wirkstofffreisetzung in SSTR überexprimierten Krebszellen zu katalysieren.[20][21] Für die biomedizinische Anwendung von SST als Target muss es an einen Arzneistoff oder für bildgebende Verfahren an ein Chromophor konjugiert werden (siehe Abbildung 5).

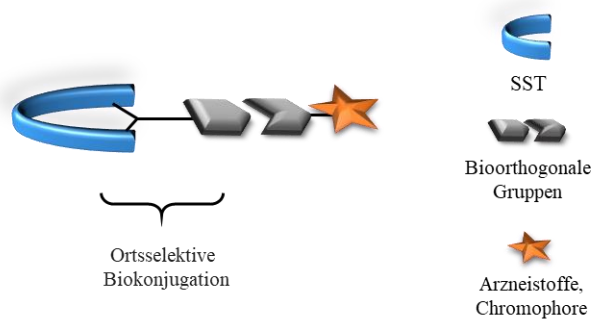


Abbildung 5 – Schematische Darstellung der ortspezifischen Biokonjugation von SST.

Somatostatin ist ein zyklisches Peptidhormon bestehend aus 14 Aminosäuren, einer Disulfidbrücke und einer Halbwertszeit von 1-3 Minuten. Aufgrund der Überexprimierung von SSTR vor allem auf Krebszellen im Margen-Darm-Trakt handelt es sich bei dem endogenen Liganden SST um ein beliebtes therapeutisches Target für Gastrointestinale-Tumore.

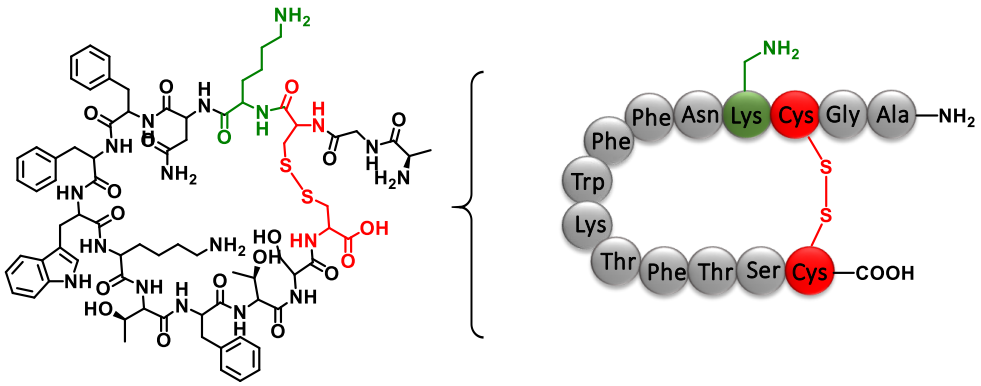


Abbildung 6 – Darstellung des endogenen Peptidhormons Somatostatin bestehend aus 14 Aminosäuren.

Für biomedizinische Anwendungen stellt sich demnach die Frage, wie das endogene Peptid am effizientesten ortsselektiv mit einem organischen Linker konjugiert werden kann. Hierzu ist es

sinnvoll die Primärstruktur des Peptids (siehe Abbildung 6) genauer zu untersuchen. Als Konjugationsstelle bietet SST zum einen die Aminogruppe des Lysins an Position 4 (grün markiert) und zum anderen die Disulfidbrücke (rot markiert) als attraktive Interkallationsposition an.

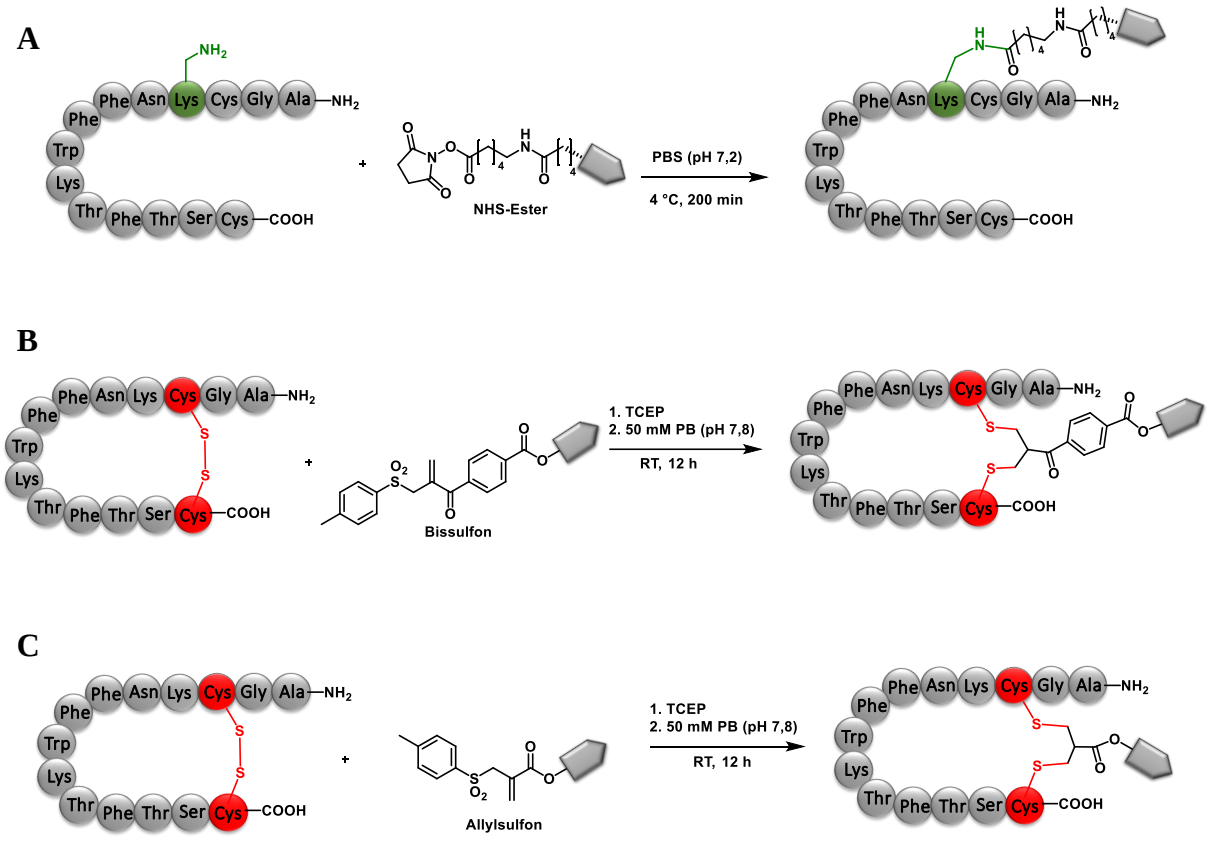


Abbildung 7 – Ortsspezifische Konjugationsmöglichkeiten von SST mit einem Linker über die Aminosäure Lysin (A) oder über die Disulfidbrücke (B,C). Abbildung gestellt in Anlehnung an die Originalveröffentlichungen.[6][22]

In der Abbildung 7 sind die drei bekanntesten Biokonjugationen am SST übersichtlich dargestellt. In **A** zeigen Weil *et al.* die Möglichkeit der Ligation von SST über die Aminosäure Lysin, die in einer Subsitutionsreaktion mit einem aktivierten NHS-Ester reagiert.[6][22] In Schema **B** und **C** wird die Disulfidbrücke adressiert, indem nach Reduktion die freien Thiole über eine doppelte Michael-Addition an das Bissulfon (**B**) bzw. Allylsulfon (**C**) konjugiert werden.

1.2 Bioorthogonale Chemie

Zelluläre Prozesse unterliegen koordinierten Aktionen, gesteuert von zahlreichen Biomolekülen und niedermolekularen Metaboliten. Um diese Prozesse zu untersuchen oder sie für gezielte Lokalisation von Arzneistoffen zu verwenden, muss auf bioorthogonale Systeme zurückgegriffen werden. Unter bioorthogonaler Chemie versteht man chemische Reaktionen in lebenden Zellen ohne in deren natürliche biochemische Prozesse einzugreifen.[23] Relevante Bedingungen für bioorthogonale Ligation sind hohe chemische Selektivität bezüglich des Reaktionspartners und schnelle Reaktionsraten. Die funktionellen Gruppen sowie bei der Reaktion auftretende Intermediate und Produkte müssen unter physiologischen Bedingungen stabil sein und sollten nicht mit den anwesenden Biomolekülen reagieren oder interagieren sowie nicht toxisch sein.[24] Die Reaktanten müssen zudem wässriges Medium, verschiedene Elektro- und Nucleophile sowie Sauerstoff tolerieren.

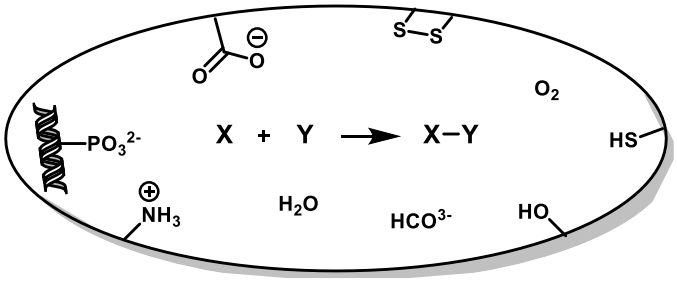


Abbildung 8 – Bioorthogonale Reaktionen sind selektiv unter physiologischen Bedingungen.

Aufgrund der Vielzahl an Einschränkungen in lebenden Zellen sind heute nur sehr wenige vollkommen bioorthogonale Reaktionen bekannt. Reaktionen, die im weiteren Sinn als bioorthogonal verstanden werden, sind zum Beispiel Reaktion zwischen organischen Sonden und modifizierten Biomolekülen außerhalb von Zellen. Sie müssen dennoch unreaktiv gegenüber Aminosäuren oder Nucleinsäuren sein, jedoch nicht gegen alle in Zellen vorhandenen Komponenten. Verglichen mit nichtkovalenten Bindungsmotiven ist die bioorthogonale Chemie eine schnelle, spezifische und kovalente Verbindung zwischen biologisch interessanten Biomolekülen und organischen Linkern.[25] Die Vorteile bioorthogonaler Reaktion liegen in der Diversität der einsetzbaren biologischen Komponenten wie zum Beispiel Proteine, Peptide, Lipide, Nucleinsäuren und der Sonden, die durch verschiedene Stimuli *in vivo* miteinander reagieren können ohne dabei aktiv in Zellvorgänge einzugreifen.[26] Üblicherweise lassen sich bioorthogonale Reaktionen, wie in Abbildung 9 schematisch gezeigt, in zwei Reaktionsschritte einteilen. Zunächst wird ein Biomolekül, z.B. ein Peptid, entweder durch einen nativen oder einen konstruierten biosynthetischen Weg chemisch modifiziert und anschließend in einer

bioorthogonalen Reaktion mit einer eingeführten chemischen Sonde, wie z.B. einem Fluorophor oder Affinitäts-Tag, verbinden.[27]

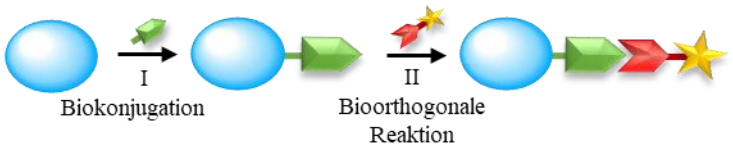


Abbildung 9 – Schematisch dargestellte bioorthogonale Reaktion. I. Chemische Modifikation eines Biomoleküls. II. Bioorthogonale Reaktion mit einem Chromophor, Arzneistoff oder Affinitätstag.

Applikationen der bioorthogonalen Chemie lassen sich beispielhaft im Bereich der molekularen Bildgebung, Zellerkennung und der Funktionalisierung von biologischen Materialien finden.[28] Im Folgenden werden daher die bekanntesten bioorthogonalen Reaktionen zusammengefasst und die aktuellen Forschungsergebnisse diskutiert.

1.2.1 Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf

Unter den Reaktionsklassen bioorthogonaler Reaktionen gehören Cycloadditionen zu den beliebtesten. Cycloadditionen kommen in natürlichen biochemischen Prozessen nicht vor, weshalb sie sich optimal als bioorthogonale Reaktion eignen. Die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA)[29] ist die bis heute schnellste bioorthogonale Transformation mit Geschwindigkeitskoeffizienten von 10^3-10^6 M^{-1} s^{-1} bei Raumtemperatur.[30] Die Reaktionsgeschwindigkeiten anderer Cycloadditionen wie der ringspannungsinduzierten oder der kupferkatalysierten Azid-Alkin Cycloaddition sind mit 10^{-2} M^{-1} s^{-1} [31] und 100 M^{-1} s^{-1} [32] im Vergleich deutlich langsamer. Nach der Grenzorbitaltheorie lassen sich Diels-Alder (DA) Reaktionen, wie in Abbildung 10 dargestellt, je nach Substitutionsmuster in drei Kategorien aufteilen.[33]

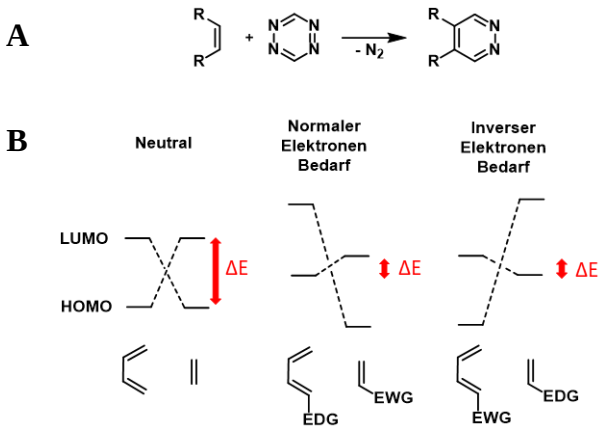


Abbildung 10 – A: Allgemeine Reaktionsgleichung einer IEDDA, B: Grenzorbitalmodel einer Diels-Alder Reaktion mit neutralen, normalen und inversem Elektronen Bedarf. (EDG = elektron-donating group, EWG = elektron-withdrawing group). Abbildung erstellt in Anlehnung an die Originalveröffentlichung.[33]

Bei der DA Reaktion mit inversem Elektronen Bedarf sind im Vergleich zur normalen DA die elektronischen Eigenschaften von En und Dien umgekehrt. Fox *et al.* beschreiben eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (IEDDA) am Beispiel einer bioorthogonalen Ligation eines Modelproteins zwischen einem *trans*-Cycloocten (TCO) und einem elektronenarmen Tetrazin in wässriger Lösung.[34] Ein Beispiel für molekulare Bildgebung ist das Immuno-PET-Imaging basierend auf der bioorthogonalen Reaktion zwischen ^{18}F-markierten Reppe-Anhydrid-Derivaten und Tetrazinkonjugaten der EGFR-spezifischen monoklonalen Antikörper Cetuximab® und Panitumumab®.[35]

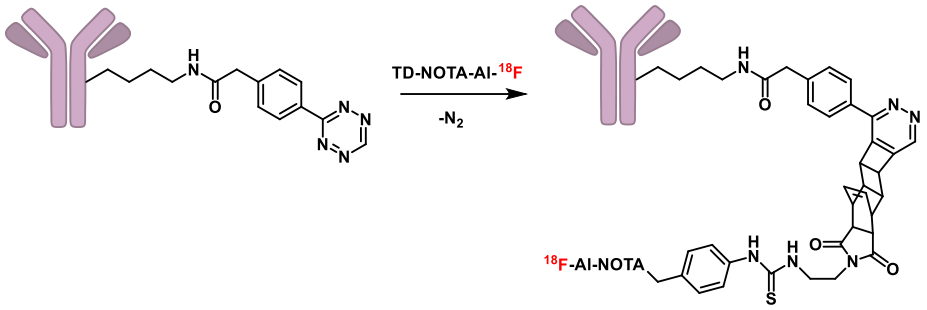


Abbildung 11 – Bioorthogonales ^{18}F-Lableing eines EGFR-spezifischen monoklonalen Antikörpers. Abbildung erstellt in Anlehnung an die Originalveröffentlichung.[35]

Shi *et al.* haben erfolgreich gezeigt, dass ihr System eine effiziente Methode der radioaktiven Bildgebung ist und durch die gezielte Lokalisation der Sonde die Gesamtstrahlenbelastung des umgebenden Gewebes und den Organen erheblich reduziert werden kann. Durch die bioorthogonale Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf zwischen dem Tetrazin (Dien) und dem gespannten Dienophil entsteht an der Tumorstelle ein stabiles Addukt der beiden Moleküle, ohne dabei die biochemischen Prozesse zu beeinflussen.[35]

Die IEDDA ist bezüglich ihrer schnellen Kinetik, der guten Biokompatibilität und ihrer katalysatorfreien Reaktionsführung heute als eine sehr effiziente bioorthogonale Reaktion etabliert. Nachteilig jedoch sind die typischerweise konjugierten elektronenziehenden Gruppen der Tetrazine, die anfällig für Hydrolyse sind und Reaktionen mit zellulären Thiolen zeigen.[36] In der Literatur finden sich neben der IEDDA weitere verschiedene bioorthogonale Reaktionen, um Proteine selektiv und kovalent zu modifizieren, auf die im Folgenden eingegangen wird.

1.2.2 Kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition

Die bekannteste metallkatalysierte bioorthogonale Reaktion in lebenden Zellen ist die kupferkatalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC). Die auch oft als „Klick Reaktion“ bezeichnete 1,3-dipolare Cycloaddition wurde erstmals von Huisgen 1963 beschrieben.[37] Sharpless prägte diesen Begriff maßgeblich, da er die Azid-Alkin-Cycloaddition, die ursprünglich nur unter harschen Bedingungen funktionierte, durch Kuper(I)-Katalyse beschleunigte, bei physiologischen Temperaturen und in einer funktionalisierten biologischen Umgebung zugänglich machte.[38] Unter dem Konzept Klick-Chemie versteht man im allgemeinen die Kombination komplexer Strukturelemente mittels einiger weniger besonderes effizient ablaufender Reaktionen.

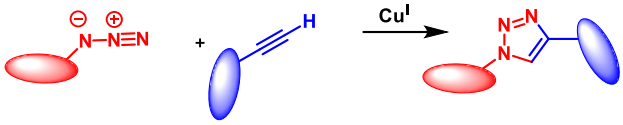


Abbildung 12 – Allgemeine Reaktionsgleichung der Cu(I) vermittelten Azid-Alkin Cycloaddition.

Der Mechanismus der Reaktion war lange Zeit nicht vollständig aufgeklärt, wobei heute davon ausgegangen wird, dass sich im Übergangszustand ein zweikerniger Kupferkomplex bildet. [39]

Ein aktuelles Beispiel aus der Literatur ist die von Hao *et al.* beschriebene Synthese eines cyclischen Pyrrolysin-Analogons mit Azid-Funktionalität und der Kodierung dieser nicht natürlichen Aminosäure sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryontischen Zellen.[40]

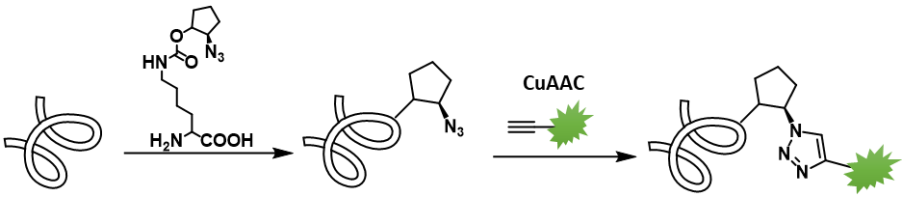


Abbildung 13 – Metabolischer Einbau Azid modifizierter Aminosäure in Protein und anschließender bioorthogonaler Reaktion mit Chromophor markiertem Alkin.

Durch CuAAC kann das Azid-modifizierte Protein mit einem Fluoreszenz-markierten Alkin schnell reagieren und zeigt somit einen hocheffizienten Ansatz für die ortsspezifische Proteinmarkierung auf. Die CuAAC ermöglicht es Virus-Partikel,[41] Nucleinsäuren[42] und Proteine[43] effizient zu modifizieren. Der bedeutendste Nachteil dieser ansonsten sehr selektiven und schnellen Reaktion ist das cytotoxische Kupfer.[44]

1.2.3 Kupferfreie Azid-Alkin Cycloaddition

Um den Nachteil des cytotoxischen Cu(I) zu umgehen wurde die ringspannungsinduzierte Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC) als bioorthogonale Reaktion erstmalig 2004 von Bertozzi *et al.*[45] beschrieben.

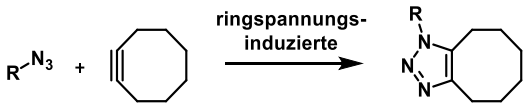


Abbildung 14 – Allgemeine Reaktionsgleichung einer ringspannungsinduzierte Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC).

Bei der SPAAC wird sich die Ringspannung des Systems zunutze gemacht. Gespannte Alkine, wie das hier dargestellte Cyclooctin, sind weniger stabil als nichtgespannte Alkine, woraus in der Reaktion mit Aziden eine deutliche Geschwindigkeitserhöhung folgt.[46] Daher kann bei SPAAC auf Hilfreagenzien wie Cu(I) verzichtet werden. Diese bioorthogonale Reaktion wird in der aktuellen Forschung vielseitig eingesetzt. 2017 berichten Heilshorn *et al.* zum Beispiel von SPAAC basierten Protein-Hydrogelen, die als künstliche extrazelluläre Matrixmaterialien für die 3D-Kultur von Stammzellen dienen können.[47]

Jewett *et al.* beschreiben die Synthese neuer ringgespannter Alkine und deren Verwendung für Lebendzellfluoreszenz-Abbildungen von Azid-markierten Glykanen. Der Zusatz elektronegativer Fluoratome an der Propargylposition von Cyclooctin kann die Reaktionsgeschwindigkeit mit Aziden deutlich erhöhen. Auch Biarylazacyclooctynone (BARAC), die eine außergewöhnliche Reaktionskinetik zeigen, erweisen sich hierbei als vielversprechendes Reagens für die *in vivo* Bildgebung.[48]

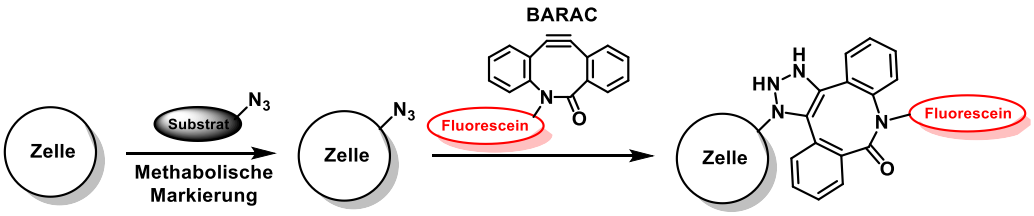


Abbildung 15 – Schematisch dargestellte bioorthogonale Reaktion von Cyclooctin-Sonden (BARAC) mit azid-markierten Biomolekülen. Abbildung wurde in Anlehnung an die Originalveröffentlichung erstellt.[48]

Die Zellen wurden zunächst mit Azid-funktionalisierten Stoffwechselsubstraten behandelt und anschließend mit einer Cyclooctin-funktionalisierten Sonde, z.B. Flourescein-markierten BARAC, nachgewiesen.

Die SPAAC lässt sich somit gezielt und selektiv an bestimmten Zellen oder Biomolekülen durchführen, ist jedoch durch die geringe Wasserlöslichkeit einiger Substrate, wie die in 1.2.1 beschriebene langsame Reaktionskinetik und die zeitliche Kontrolle der Reaktion limitiert.[49] Trotz der Vorteile der SPAAC im Vergleich zu der ursprünglichen CuAAC, wie der katalysefreien Reaktionsführung, fehlt es der Reaktion an Regioselektivität des Reaktionsproduktes. Es wird häufig ein Gemisch aus 1,4-substituierten oder 1,3- substituierten Produkten erhalten. Auch die schlechte Wasserlöslichkeit, die vergleichsweise teuren Cyclooctinreagenzien und die fehlende räumliche und zeitliche Kontrolle der ursprünglichen SPAAC sind nachteilig.[50] Daher sind Wissenschaftler sehr daran interessiert neue Biokonjugationsmethoden zu entwickeln, um diese Nachteile zu umgehen. Dabei wird ein steigendes Interesse an photoinduzierten Ligationsmethoden beobachtet, da diese viele Nachteile der klassischen Methoden vermeiden. Durch eine vorgeschaltete photochemische Reaktion kann die SPAAC z.B. räumlich und zeitlich kontrolliert werden.[51]

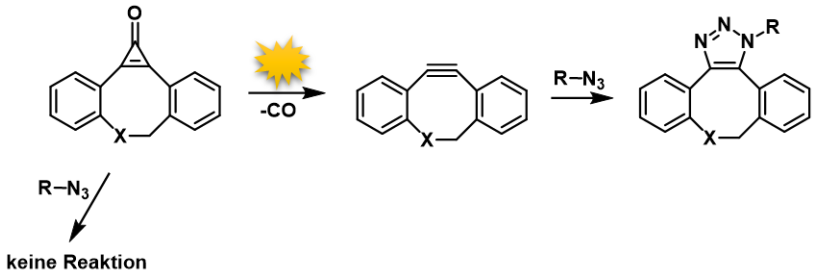


Abbildung 16 – Reaktionsschema einer photochemisch kontrollierten SPAAC. Abbildung wurde in Anlehnung an die Originalveröffentlichung erstellt.[51]

Dibenzocyclooctine mit Cyclopropenon-Schutzgruppe reagieren weder mit organischen bzw. anorganischen Aziden noch mit endogenen Nucleophilen und eignen sich daher hervorragend für bioorthogonale Reaktionen.[52] Die Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 350 nm des Cyclopropenons setzt Kohlenstoffmonoxid frei und erzeugt *in situ* ein reaktives Alkinintermediat, welches in einer SPAAC mit einem Azid-Derivat reagiert. Basierend auf der vorgeschalteten Photoreaktion kann die Konjugation durch gezielten Einsatz von Licht zeitlich und örtlich genau gesteuert werden.

1.3 Photoinduzierte Biokonjugation

Im Vergleich zu anderen bioorthogonalen Reaktionen (1.2) liegt der bedeutendste Vorteil der Verwendung von lichtinduzierter Biokonjugation in der räumlich-zeitlichen Kontrolle der gezielten Konjugation interessanter Biomoleküle.[53] Photochemische Aktivierung ist daher ein besonders attraktiver Mechanismus zur Erzeugung von Reaktivität „nach Bedarf".[54] Aufgrund der Komplexität und der vielseitigen Ansprüche an die chemischen Funktionalitäten solcher Reaktionen sind heute nur wenige photoinduzierte Biokonjugationsmethoden in der Literatur bekannt, wobei auf einige Beispiele nach der Einleitung in die Photochemie genauer eingegangen wird.

1.3.1 Photoreaktionen

Photoreaktionen sind im Gegensatz zu den klassischen thermischen Reaktionen chemische Umwandlungen, die durch Photonen bestimmter Energien ausgelöst werden. Allgemein können für solche Reaktionen unterschiedliche Bestrahlungswellenlängen von ultraviolettem über sichtbares Licht bis Infrarotstrahlung angewendet werden, wobei sich aufgrund der Zytotoxizität von hochenergetischer UV-Strahlung sichtbares Licht bzw. *near infrared* (NIR) Strahlung besser eignet.[55] Infolge der Bestrahlung findet ein Elektronenübertrag vom Grund- in einen angeregten Zustand statt, woraus das Molekül eine Änderung der Reaktivität erfährt und das Spektrum der Reaktionspartner verändert wird.[56] Die Verwendung von Licht ist eine wertvolle Methode, um Reaktionen zeitlich und örtlich zu kontrollieren und verfügt über einen breiten Bereich einstellbarer Parameter (z.B. Wellenlänge, Lichtintensität und Bestrahlungsdauer), die je nach Situation und Anwendungsbereich optimiert werden können.[57] Die wichtigsten Kriterien einer idealen Photoreaktion umfassen eine Aktivierung mit niedriger Energie, hohe Quantenausbeuten, katalysefreie Reaktionsführung und quantitative Umwandlung, die nur in wenigen Photoreaktionen erfüllt werden können.[58] Attraktive photoinduzierte Reaktionen sind vor allem Cycloadditionen wie die 1,3-dipolare Cycloadditionen, [2+2] Cycloadditionen oder (Hetero)-Diels-Alder-Reaktionen zwischen Dienen und elektronenarmen Enen. Für biomedizinische Anwendungen lässt sich ein wachsendes Interesse an solchen Photoreaktionen beobachten, weshalb im Folgenden auf bereits etablierte und neue potenzielle photoinduzierte Biokonjugationsmethoden genauer eingegangen wird.

1.3.2 Nitrilimin-vermittelte Tetrazol-En-Cycloaddition

Um eine reaktionsbasierte, bioorthogonale fluorogene Proteinmarkierung zu ermöglichen, die für bildgebende Experimente in lebenden Zellen genutzt werden kann, stehen zwei unterschiedliche Herangehensweisen zur Verfügung. Zum einen die häufig verwendete Unterdrückung der Fluoreszenz einer fluorogenen Markierung durch gezielte chemische Umwandlung und zum anderen die Bildung einer fluorophoren Verbindung durch eine bioorthogonale Reaktion. Die Erzeugung eines Fluorophors hat im Gegensatz zu Fluoreszenzquenchern den Vorteil, dass sich ein niedriges Hintergrundsignal ergibt, da das Konjugationsprodukt das einzige fluoreszierende Molekül der Gesamtreaktion ist.[59] Die bekannteste bioorthogonale photoinduzierte Ligationsmethode, die Nitrilimin-vermittelte Tetrazol-En-Cycloaddition (NITEC) macht sich diesen Vorteil zunutze. Die auch als Photo-Klick-Reaktion bekannte Cycloaddition lässt sich im wässrigen Medium durchführen, besitzt ein breites Substratspektrum, läuft mit hohen Quantenausbeuten ab und erzeugt ein fluoreszentes Cycloaddtionsprodukt.[53]

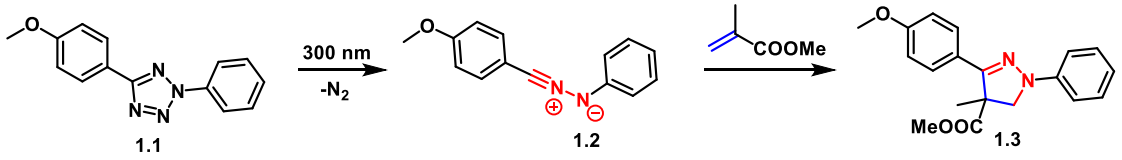


Abbildung 17 – Reaktionsschema einer Nitril Imin-vermittelte Tetrazol-En-Cycloaddition (NITEC).

Durch Photolyse der Tetrazolkomponente wird Stickstoff eliminiert und ein kurzlebiges und reaktives Nitrilimin-Intermediat erzeugt, welches in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition mit einem Alken ein fluorogenes Pyrazolinderivat (**1.3**) bildet.[60] Angewendet wird diese Reaktion zum Beispiel in der Protein-[59] oder Enzymmarkierung[61] in Zelllysaten oder lebenden Zellen. Lin *et al.* beschreiben z.B. den metabolischen Einbau eines Homoallylglycins in Säugetierzellen, der durch photoinduzierte Tetrazol-Alken-Cycloaddition für zeitgesteuerte Bildgebung sowie selektive Proteinfunktionalisierung *in vitro* angewendet werden kann.[62] Bei kritischer Auseinandersetzung mit der NITEC Reaktion wird deutlich, dass die Bioorthogonalität dieser Reaktion limitiert ist. Bereits 1961 hat Huisgen *et al.*[63] die nucleophile Addition von Thiophenolen und anderen Nukleophilen mit dem in der NITEC Reaktion intermediär entstehenden Nitrilimin beschrieben. Auch neuere Untersuchungen zeigen unter ähnlichen Bedingungen die Reaktivität von Tetrazolen gegenüber verschiedenen funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Thiolen, Aminen und Säuren.[64] Diese Beobachtungen sprechen gegen die Bioorthogonalität im klassischen Sinn, wobei sich die Methode weitergehend hervorragend zu Protein-Markierungen und bildgebenden Experimenten außerhalb von lebenden Zellen eignet.

1.3.3 Weitere Beispiele Photoinduzierter Biokonjugation

Durch den Einbau cysteinselektiver photoaktiver Maleimide an Modelpeptide und Proteine kann unter UV-Bestrahlung eine [2+2]-Photocycloaddition durchgeführt werden, wodurch eine Vernetzung zwischen den Cysteinresten erzeugt wird.[65]

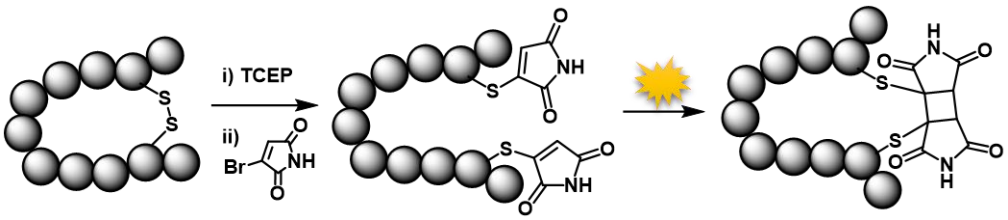


Abbildung 18 – Peptid Modifikation durch Disulfid-Reduktion und Konjugation mit photoaktivierten Gruppen. Unter UV-Bestrahlung kommt es zur [2+2] Cycloaddition.[65]

Basierend auf der Addition von Bromomaleimiden an zuvor reduzierte Disulfide kann photochemisch zum Beispiel eine Makrocylisierung zwischen leichten und schweren Ketten in Antikörperfragmenten generiert werden. Aufgrund der räumlichen und zeitlichen Kontrolle der photochemischen Reaktion, der Biokompatibilität und der schnellen Reaktionszeiten eignet sich diese Ligationsmethode zur gezielten Manipulation von Biomolekülen. Nachteilig ist jedoch die benötigte hochenergetische UV-Strahlung.[66] Die im Wässrigen ablaufende bioorthogonale Ligationsreaktion eines *in situ* durch Bestrahlung erzeugtem Chinolinonchinonmethids mit einem Alkenmodifizierten Biomolekül kann ebenfalls erfolgreich zur Proteinmarkierung sowie Abbildung bioaktiver Moleküle genutzt werden.[67] Das aktuellste Beispiel zur photoinduzierten Biokonjugation wurde 2018 von Li *et al.* publiziert.[68]

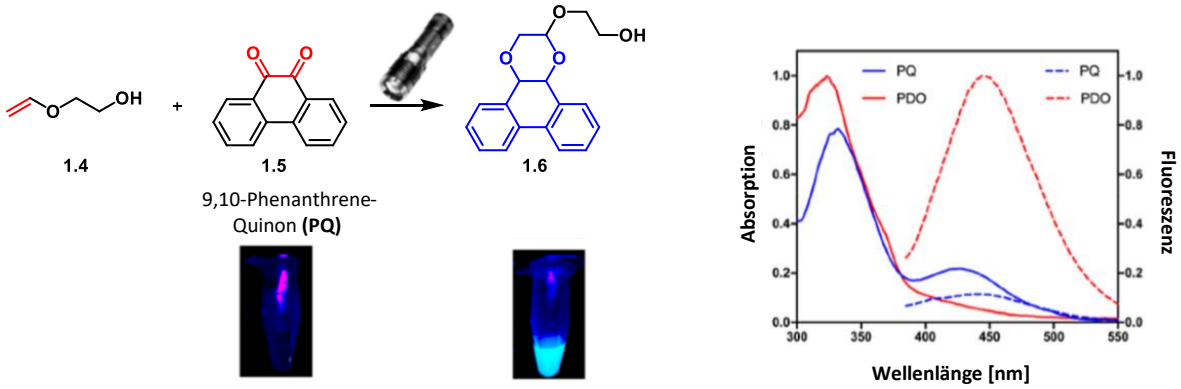


Abbildung 19 – Photoinduzierte Reaktion eines Phenantrenequinons mit einem elektronenreichen Vinylether, sowie die jeweiligen Absorption- und Fluoreszenzspektren.[68]

Sie berichten über eine katalysatorfreie bioorthogonale [4+2]-Photocycloaddtion zwischen einem Phenanthrenchinon und einem elektronenreichen Alken unter Bildung eines fluorogenen Addtionsproduktes.[68] Unter Verwendung von sichtbarem Licht, zum Beispiel durch eine LED-

Handlampe, kann die Reaktion unter biokompatiblen Bedingungen schnell und ohne Nebenreaktionen durchgeführt werden. Der Gruppe gelang es, den Ligationsprozess durch chemische Markierung von Biomolekülen auf Zelloberflächen zeitlich und räumlich zu steuern.[68] Durch Kombination dieser Ligationsmethode mit der NITEC Reaktion beschreiben die Autoren die Möglichkeit der λ-orthogonalen Markierung von BSA und Lysozym-Proteinen. Als Beweis für den Erfolg der λ-orthogonalen photoinduzierten Biokonjugation zeigen sie Fluoreszenzassays, die jedoch sehr stark bearbeitet worden sind, weshalb mögliche vorhandene Nebenprodukte nicht zu identifizieren wären. Dennoch handelt es sich bei der gezeigten photoinduzierten Reaktion um eine vielversprechende und neue Bioligationsmethode unter Verwendung von nicht zelltoxischer Strahlung, wobei die Bioorthogonalität und vor allem die λ-Orthogonalität nicht ausreichend gut beschrieben und untersucht worden sind.

1.3.4 *ortho*-Quinondimethane (*o*-QDM)

Eine weitere interessante Photoreaktion, die für Biokonjugationen genutzt werden kann, ist die Verwendung photoreaktitver Methylbenzaldehyde bzw. Ketone. Durch photoinduzierte Anregung von *ortho*-alkylaromatischen Ketonen und Aldehyden können Hydroxy-*o*-Quinondimethane (Abbildung 20) generiert werden, die als reaktive elektronenreiche Zwischenprodukte mit ausreichend langer Lebensdauer in chemischen Prozessen mit elektronenarmen Alkenen reagieren können.[57]

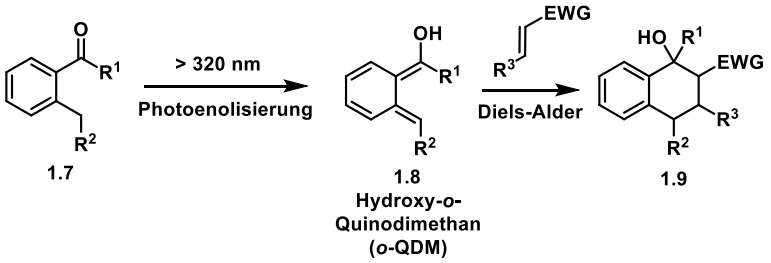


Abbildung 20 – Photoinduzierte Enolisierung von ortho-alkyaromatischen Ketonen und Aldehyden zu o-Quinondimethanen und anschließender Diels-Alder-Reaktion mit elektronenarmen Enen. (EWG= electon-withdrawing-group).

Das reaktive Intermediat *o*-QDM kann neben der Diels-Alder Reaktion mit elektronenarmen Enen auch Mannichreaktionen[69] mit Iminen oder Aldolreaktionen[70] eingehen. Die DA Reaktion wurde bereits in unterschiedlichsten Bereichen angewendet, wie zum Beispiel als funktionalisierte DNA mit anschließender Konjugation an Proteine zur räumlich kontrollierten Immunisierung auf Oberflächen.[71] Der Mechanismus zur Bildung des Photoenol-Intermediats (*o*-QDM) wurde intensiv erforscht und ist in der folgenden Abbildung übersichtlich zusammengefasst.[72]

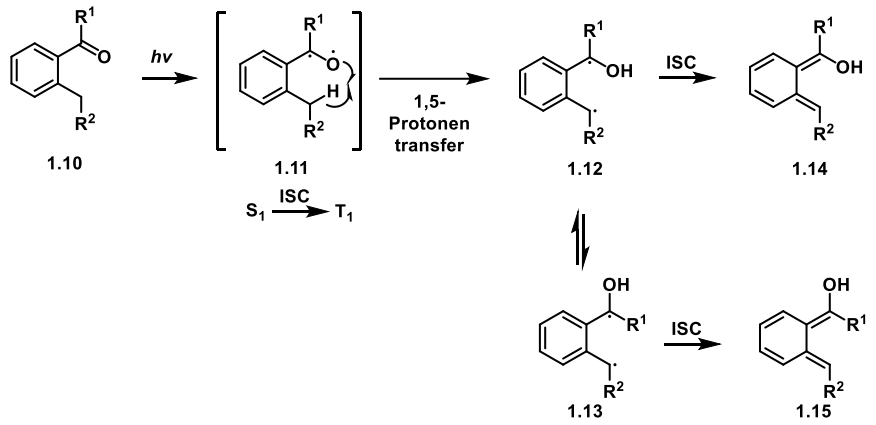


Abbildung 21 – Mechanismus der photoinduzierten Anregung von ortho-alkyaromatischen Ketonen und Aldehyden zu o-Quinondimethanen.[73]

Der *o*-MBA absorbiert die Photonen und wird dabei in den Singulettzustand S_1 angeregt, der anschließend durch *intersystem crossing* (ISC) in den Trippelttzustand T_1 übergeht. Durch 1,5-Protonenübertrag entsteht das 1,4-Diradikal Intermediat, welches im Gleichgewicht mit dem (E)-Konformer steht. Beide Konformere unterliegen einem weiteren ISC und resultieren in den *o*-Quinondimethanen.[73] Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die darauf folgende Diels-Alder Reaktion. Für biologische Anwendungen ist dieses System sehr interessant, problematisch ist lediglich die Verwendung von UV-Strahlung für z.B. lichtempfindliche Substrate oder Reaktionen in lebenden Zellen, weshalb es wünschenswert wäre, die Absorption in den sichtbaren Bereich zu verschieben. Dies ist 2018 Feist *et al.*[74] gelungen, indem der Ether-Sauerstoff des Photoenols durch einen Schwefel ausgetauscht wurde. Hierbei konnte die Absorption von unter 390 nm auf bis zu 430 nm verschoben werden.

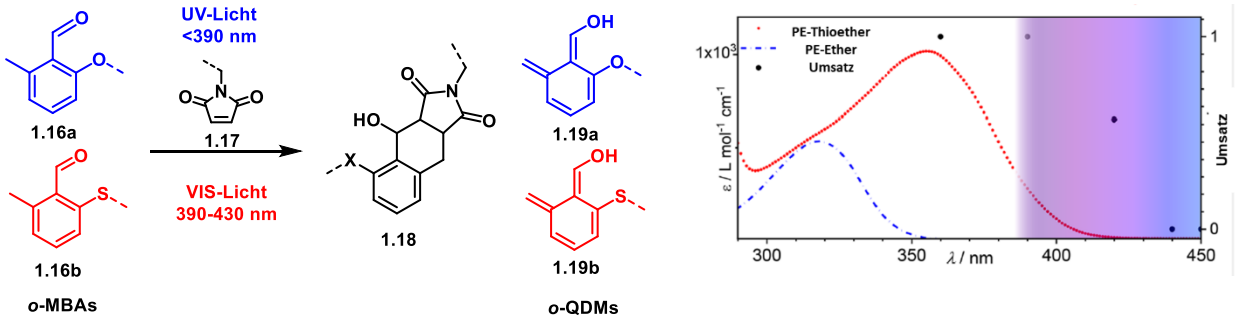


Abbildung 22 – Photoreaktion zwischen o-MBAs und Maleimid (1.17) mit zugehörigen Absorptionsspektren. Abbildung erstellt in Anlehnung an die Originalveröffentlichung.

Durch die Verschiebung der Bestrahlungswellenlänge in den sichtbaren Bereich eröffnen sich neue Anwendungsgebiete besonders im Bereich der Biomedizin und Pharmazie und das Potenzial, diese Reaktion zukünftig als photoinduzierte Biokonjugation anzuwenden.

2 Motivation und Zielsetzung

Moderne ortsspezifische, bioorthogonale Proteinmodifikationstechniken bieten großes Potential für biomedizinische Anwendungen wie der molekularen Bildgebung zur Aufklärung komplizierter biologischer Prozesse oder dem Aufbau selektiver und effizienter Proteintherapeutika. Um eine örtliche und zeitliche Kontrolle dieser Reaktionen zu ermöglichen, eignen sich photoinduzierte bioorthogonale Biokonjugationsmethoden, von denen bis heute nur wenige etabliert sind. Neben der Biokompatibilität der einzusetzenden photoreaktiven Funktionalitäten liegt das größte Problem der meisten Photoreaktionen in der schädlichen hochenergetischen UV-Strahlung, wodurch biologische Komponenten zersetzt werden oder ihre biologische Aktivität verlieren.[66] Daher besteht die Herausforderung Reaktionen zu entwickeln, welche über die Vorteile photoinduzierter Biokonjugation verfügen, jedoch mit niederenergetischer, nicht zellschädigender Strahlung zur Reaktion gebracht werden können. Das kürzlich von Feist *et al.*[74] vorgestellte photoinduzierte Diensystem auf der Basis von *ortho*-Methylbenzaldehyden (*o*-MBA) kann bereits mit sichtbarem Licht im wässrigen Medium aktiviert werden, weshalb es sich hervorragend als eine neue photoinduzierte Biokonjugations-methode eignen könnte.

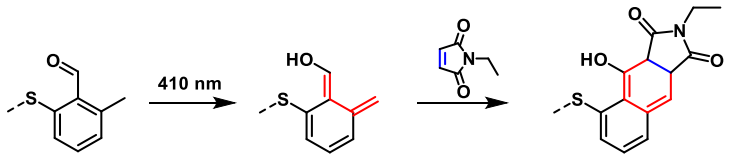


Abbildung 23 – Photoreaktion zwischen ortho-Methylbenzaldehyden (o-MBA) und N-Ethylmaleimid. Intermediär entsteht ein reaktiver ortho-Quinodimethanthioether (o-QDM), der als Dienophil fungiert.

Durch Kombination der *o*-MBA-basierten Photoreaktion mit bekannten Biokonjugations-methoden soll in dieser Arbeit ein neues System entwickelt werden, das photoinduzierte Biokonjugation mittels Bestrahlung mit sichtbarem Licht ermöglicht. Hiermit sollen verschiedene Biomoleküle katalysatorfrei und photochemisch an potenzielle Arzneistoffe, Farbstoffe oder Polymere selektiv konjugiert werden. Als Modelpeptide werden medizinisch relevante Peptide RGDC und Somatostatin (SST), die basierend auf ihren strukturellen Unterschiedenen über verschiedene Biokonjugationsmethoden adressiert werden können, gewählt. In Hinblick auf die spezifischen funktionellen Gruppen beider Peptide eignet sich die Maleimid-Thiol-Klickreaktion zur selektiven Konjugation des RGDCs und die Bissulfoninterkalation[75] zur Konjugation an die endogene Disulfidbrücke des SST.

Die Herausforderung dieser Arbeit besteht darin, ein Molekül zu entwickeln, dass zum einen eine biokonjugierbare Einheit wie ein Bissulfon oder ein reaktives Maleimid vorweist und zum anderen ein *ortho*-Methylbenzaldehyd Strukturelement besitzt. Diese organischen Linker sollen anschließend mit den Peptiden RGDC und SST selektiv konjugiert werden und in photoinduzierten Reaktionen mit Maleimidderivaten als Reaktionspartner auf ihre Photostabilität und Biokompatibilität hin untersucht werden.

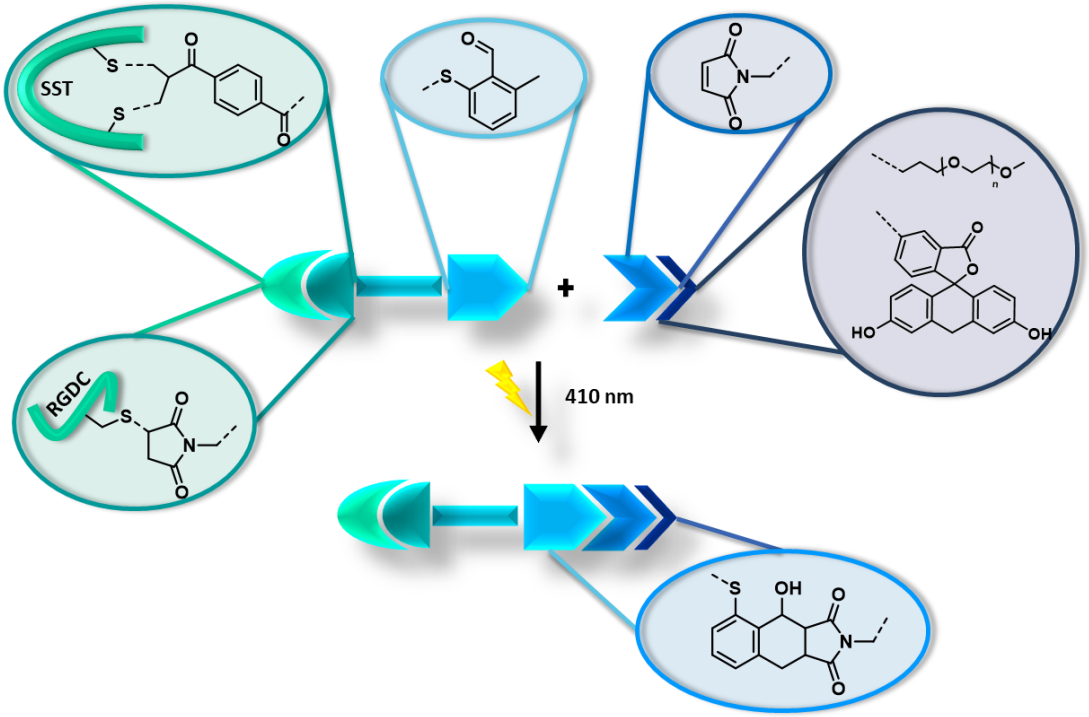


Abbildung 24 – Schematische Übersicht der photoinduzierten Biokonjugation, die in dieser Arbeit entwickelt werden soll. Ein organischer Linker, der einerseits über verschiedene Biokonjugationsmethoden an Peptide konjugierbar ist und zum anderen ein ortho-Methylbenzaldehyd Strukturelement vorweist. Durch Bestrahlung in Gegenwart von Maleimidderivaten bildet sich das Konjugationsprodukt.

Die Untersuchung dieses neuen und komplexen Systems soll mit der Entwicklung der Synthese zweier verschiedener Linkersysteme begonnen werden. Anschließend soll die Biokonjugation des Maleimid - Linkers an RGDC und des Bissulfon - Linkers an SST untersucht werden. Für die folgende Photoreaktion muss eine passende Apparatur zur Bestrahlung geringer Probenmengen aufgebaut werden und daraufhin optimale Kondiktionen in Hinsicht auf Lösemittel, Konzentrationen und Bestrahlungszeit gefunden werden. Die Photo- und Biostabilität des Systems soll abschließend anhand photoinduzierter [4+2]-Cycloaddition mit Fluorescein- und PEG-Maleimiden, wie in Abbildung 24 schematisch gezeigt, beispielhaft untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Maleimid - Linker

Es werden zunächst Maleimid tragende Linker designt und deren mögliche Syntheserouten entwickelt. Im darauffolgenden Teil wird genauer auf die synthetischen Herausforderungen und Ergebnisse der Syntheserouten eingegangen.

3.1.1 Strukturdesign und Syntheserouten des Maleimid - Linkers

Um einen heterobifunktionalen Maleimid - Linker herzustellen, muss zunächst ein passendes Strukturdesign gefunden und dessen Synthese entwickelt werden. Der Linker soll auf der einen Seite die photoreaktive Gruppe, hier ein *o*-Methylbenzaldehyd (*o*-MBA) tragen und auf der anderen Seite eine biokompatible Gruppe, um Biomoleküle zu adressieren. Als biokompatible Gruppe wurde ein Maleimid gewählt, um per Thiol-En Addition Biomoleküle, wie zum Beispiel Peptide oder Proteine, an den Linker zu konjugieren.

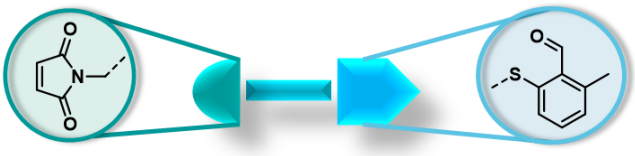


Abbildung 25 – Schematische Darstellung des Strukturdesigns des Maleimid - Linkers.

Für dieses Strukturdesign wurden verschiedene Synthesen entwickelt, wobei im Vordergrund stand, eine möglichst effiziente und kurze Syntheseroute zu finden. Zusätzlich wurde versucht, als Verbindung der beiden Gruppen möglichst polare Strukturen zu verwenden, um die Wasserlöslichkeit des Endmoleküls zu erhöhen. Bei der Suche nach einer geeigneten Syntheseroute wurde auf die Publikation von Feist *et al.*[74] zurückgegriffen, um passende *o*-MBA-Derivate zu finden. Hierbei wurden diejenigen ausgewählt, die in einer Folgereaktion über eine Amid- bzw. Esterkupplung reagieren können. Basierend auf folgenden Strukturen wurden anschließend die Syntheserouten entwickelt.

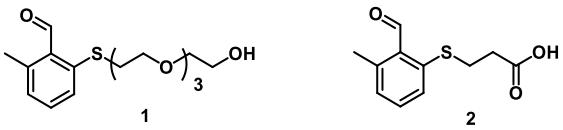


Abbildung 26 – Photoenol Derivate[74] als Basis für die Syntheserouten der Maleimid - Linker.

3.1.1.1 Syntheserouten des Maleimid - Linkers

Für die Synthese des Maleimid - Linkers 1 (**ML1**) wurde das Photoenol-Alkohol (**1**) Derivat ausgewählt, da es durch seine Triethylenglygol-Einheit bereits wasserlöslich ist und durch die terminale Alkoholgruppe mit einer Carbonsäure verestert werden kann. In Abbildung 27 ist das dazugehörige Syntheseschema dargestellt. Der *o*-MBA-Alkohol (**1**) reagiert dabei über eine Veresterung mit dem carbonsäurefunktionalisertem Maleimid. Das dabei resultierende photoreaktive, biokonjugierbare Molekül wird im Folgenden als Maleimid - Linker 1 (**ML1**) bezeichnet. Zur Synthese des Maleimid - Linkers 2 (**ML2**) wurde als PE-Derivat die *o*-MBA-Carbonsäure (**2**) ausgewählt. Diese kann mittels Amidierung bzw. Veresterung mit Aminen oder Alkoholen reagieren. Um die Wasserlöslichkeit für zukünftige biologische Anwendungen zu garantieren, wurde die Carbonsäure mit dem Maleimid Ethylenglykolamin (**4**) umgesetzt. Der Vorteil dieses Linkers sind die stabileren Amidbindungen, die anstelle der Esterbindung (vgl. **ML1**) verwendet werden. In biologischen Systemen könnten Esterbindungen zum Beispiel durch Esterasen oder im Wässrigen durch Nucleophile leicht gespalten werden. Der Maleimid - Linker 3 (**ML3**) kann unter Verwendung des kommerziell erhältlichen *Boc*-geschützten Amins, das wiederum über Ethylenglykoleinheit mit einem Maleimid verbunden durch TFA-Entschützung (**5**) und anschließender Amidierung erhalten werden. Diese Syntheseroute bietet den wesentlichen Vorteil, dass sie mit insgesamt drei Stufen im Vergleich zu den anderen Routen sehr kurz ist und zusätzlich über eine stabile Amidbindung verfügt.

In der folgenden Abbildung sind die entwickelten Syntheserouten dargestellt:

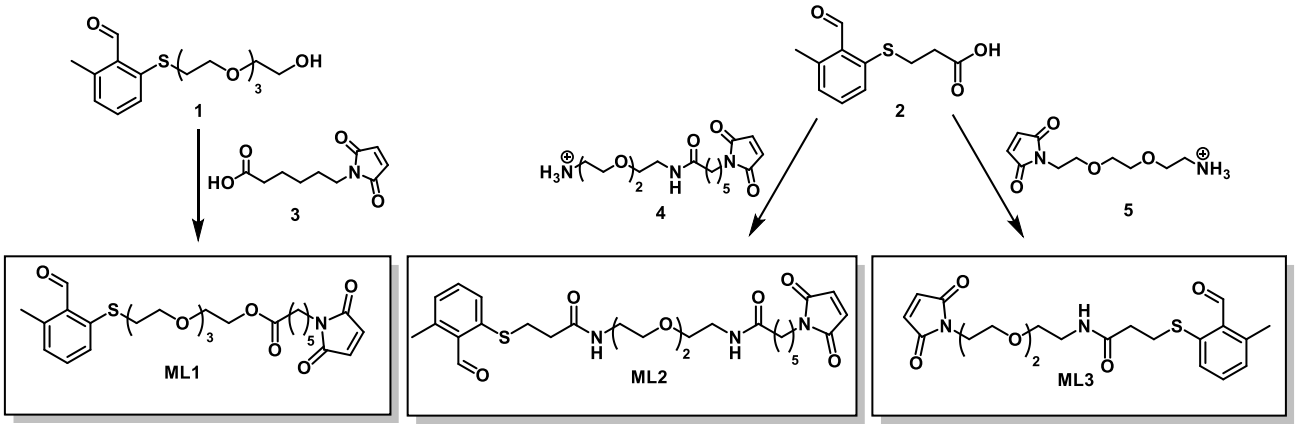


*Abbildung 27 – Syntheseroute der Maleimid - Linker **ML1**, **ML2**, **ML3**.*

3.1.2 Synthese der Maleimid - Linker

3.1.2.1 Übersicht der Syntheseergebnisse der drei vorgeschlagenen Syntheserouten

Im vorherigen Kapitel wurden drei verschiedene Linker vorgeschlagen, auf deren Synthese im Folgenden detailliert eingegangen wird. Aus Übersichtszwecken ist in der folgenden Abbildung dargestellt, durch welche Synthesestrategien erfolgreich heterobifunktionale Linker isoliert werden konnten und bei welchen Routen Probleme auftraten.

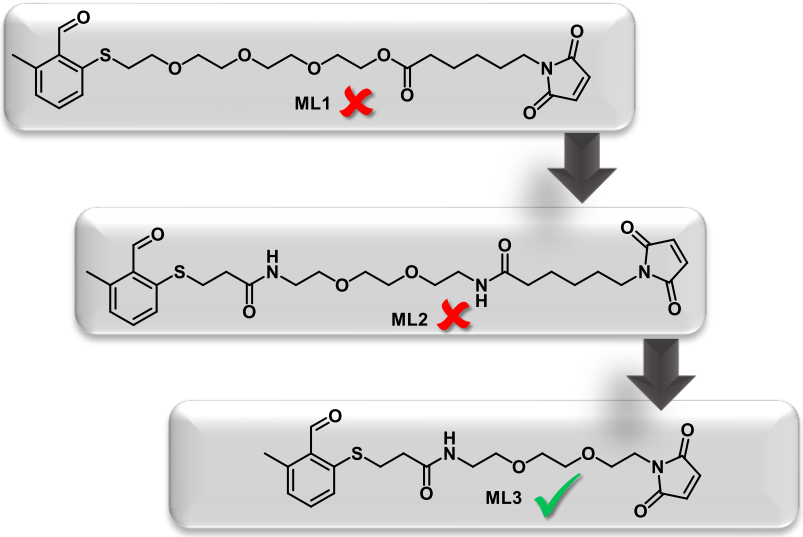


Abbildung 28 - Übersicht der Syntheseergebnisse der drei vorgeschlagenen Syntheserouten.

3.1.2.2 Synthese des Maleimid - Linkers 1

Das PE-Alkohol (**1**) Derivat wurde über verschiedene Reaktionsbedingungen (Abbildung 29) mit einem Maleimid - Linker umgesetzt, um **ML1** zu erhalten.

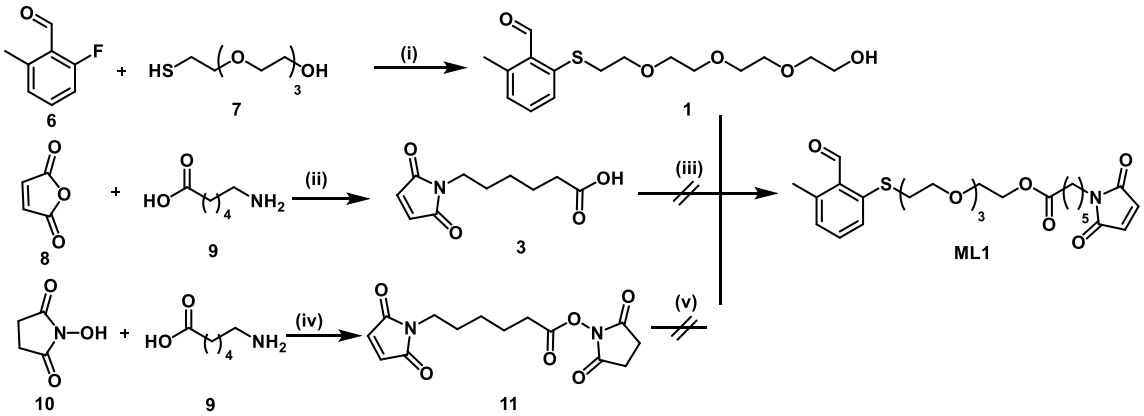


Abbildung 29 – Synthese eines Maleimid - Linkers 1 basierend auf dem PE-Alkohol Derivat. Reaktionsbedingungen: (i) K_2CO_3, DMF, 12 h, 85 °C, 79%; (ii) AcOH, 6 h, 120 °C, 55%; (iii) DCC, DIPEA, DMAP, DMF, 12 h, RT; (iv) 8, EDC, DMF, 24 h, RT, 77%; (v) NEt_3, DMF, 24 h, RT.

In der ersten Stufe reagiert 2-Fluor-6-methylbenzaldehyd (**6**) in einer nukleophilen aromatischen Substitution (S_NAr) mit einem Mercapto-PEG Derivat (**7**) zu dem *o*-MBA-Alkohol (**1**). Dieser

wird in einer Folgereaktion mit der zuvor hergestellten Maleimidhexansäure (**3**) bzw. dem Maleimid-NHS Ester (**11**) umgesetzt. Bei diesen Reaktionen traten jedoch einige Komplikationen auf. In ersten Versuchen wurde der *o*-MBA-Alkohol mit der Carbonsäure (**3**) in einer Steglich-Veresterung umgesetzt, wobei kein Produkt isoliert werden konnte. Grund hierfür ist womöglich die geringere Nukleophile des Alkohols, wodurch es nicht zur Esterbildung kommt. Um dieses Problem zu umgehen wurde, wie in Abbildung 29 gezeigt, der NHS Ester der Maleimidhexansäure (**11**) mit 77% Ausbeute synthetisiert. Jedoch wurde auch hier durch Umsetzung mit der Verbindung **1** keine Produktbildung beobachtet. Da es sich hierbei um eine Umesterung handelt und diese vor allem dann stattfindet, wenn der zu entstehende Ester stabiler als der NHS Ester ist, lässt vermuten, dass die Reaktivitätsunterschiede der beiden Ester zu gering sind. Mögliche Verbesserungen dieser Reaktion könnten die Verwendung eines Säurechlorids anstelle der Carbonsäure oder auch das Erhitzen der Reaktionslösung sein. Auch die Variation des Kupplungsreagenz sollte in Betracht gezogen werden.

3.1.2.3 Synthese des Maleimid - Linkers 2

Bei der Synthese des Maleimid - Linkers 2 wurde ebenfalls von dem kommerziell erhältlichen 2-Fluor-6-methylbenzaldehyd (**6**) ausgegangen, das in einer Substitutionsreaktion mit 3-Mercapto-propionsäure reagiert. Die resultierende *o*-MBA-Carbonsäure (**2**) wurde dabei in hohen Ausbeuten (82%) erhalten. In der Folgereaktion reagiert **2** mit der Amino-Gruppe des kommerziell erhältlichen, einseitig geschützten Diglycoldiamins (**12**) in einer Amidierung. Dabei wurde EDC als Kupplungsreagenz verwendet, welches nach der Reaktion per flüssig-flüssig-Extraktion entfernt wurde.

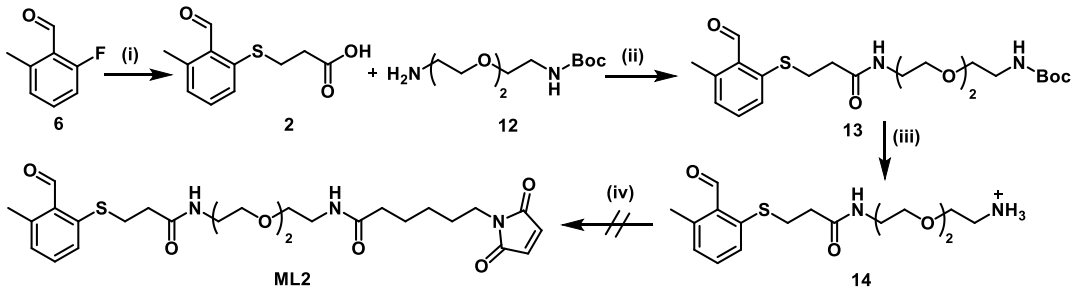


Abbildung 30 - Synthese eines Maleimid - Linkers 2 basierend auf dem PE-COOH Derivat. Reaktionsbedingungen: (i) K_2CO_3, 3-Mercaptopropionsäure, DMF, 12 h, 85 °C, 82%; (ii) EDC, DIPEA, DMAP, DCM, 12 h, RT, 60%; (iii) TFA, DCM, 2 h, RT, quant.; (iv) DCC, DIPEA, DMAP, 24 h, RT.

Anschließend wurde die *Boc*-Schutzgruppe des Amins **13** mittels Trifluoressigsäure in DCM entfernt und das entsprechende TFA-Salz (**14**) in quantitativer Ausbeute erhalten. Aus der darauffolgenden Amidkupplung mit Maleimidhexansäure konnte jedoch Maleimid - Linker 2 nicht erhalten werden. Grund hierfür sind höchstwahrscheinlich die Äquivalente an verwendeter

Base. Ammuniumsalze benötigen ein zusätzliches Äquivalent Base, um das nucleophilere Amin zu bilden, welches die Amidkupplung eingehen kann. Auch ein größerer Überschuss Base ist sinnvoll, um mögliche Rückstände an TFA in der Probe zu neutralisieren. Während der Reaktion wurde nach 12 h kein Umsatz beobachtet, weshalb entschieden wurde, ein weiteres Äquivalent DIPEA zugegeben. Die Isolation des Produkts war dennoch nicht möglich.

3.1.2.4 Synthese des Maleimid - Linkers 3

In der letztendlich erfolgreichen Syntheseroute zur Darstellung des Maleimid - Linkers 3 wurde von der kommerziell erhältlichen Substanz **15** ausgegangen. Die erste Stufe beinhaltet die Entschützung mittels TFA, wodurch das entsprechende Ammonium-Salz (**5**) in quantitativer Ausbeute erhalten wird. Wichtig bei der Entfernung des Lösemittels und der Trifluoressigsäure ist, dass die Temperatur nicht über Raumtemperatur steigt. Bei 40 °C Wasserbadtemperatur wurde festgestellt, dass durch Radikale bedingt eine Produktzersetzung stattfindet. Dies konnte verhindert werden, indem das Lösemittel unter Vakuum bei 25 °C entfernt wurde.

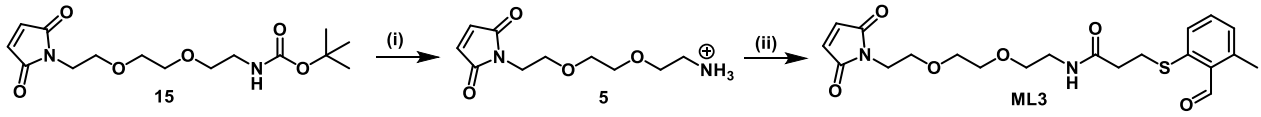


*Abbildung 31 – Synthese eines Maleimid - Linkers 3 basierend auf dem PE-COOH Derivat. Reaktionsbedingungen: (i) TFA, DCM, 2 h, RT, quant.; (ii) PE-COOH **(2)**, DCC, DIPEA, DMAP, 24 h, RT, 29%.*

In der letzten Stufe wurde das Ammonium-Salz (**5**) mit der zuvor hergestellten PE-Carbonsäure (**2**) umgesetzt, wobei *N*,*N′*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenz fungierte. Nach säulenchromatischer Aufreinigung mittels HPLC konnte **ML3** erfolgreich jedoch mit geringen Ausbeuten (29%) isoliert werden. Um diesen Reaktionsschritt zu optimieren und eine Erhöhung der Ausbeute zu erreichen, wurden mehrere Testreaktion durchgeführt, wobei diese in folgender Tabelle übersichtlich dargestellt sind.

*Tabelle 1 – Testreaktion zur Optimierung der Kupplungsreaktion für die Darstellung von **ML3**.*

	5 [Äq]	2 [Äq]	Kupplungs-reagenz [Äq]	Base [Äq]	Base [Äq]	LM
A	1,0	1,2	DCC 1,2	DIPEA 4,0	HOBt 1,1	DCM
B	1,0	1,2	DCC 1,2	DIPEA 4,0	HOBt 1,1	THF
C	1,0	1,2	HBTU 2,0	DIPEA 4,0	-	DCM
D	1,0	1,2	HBTU 2,0	DIPEA 4,0	-	DMF

Bei den Testreaktionen wurde sowohl Kupplungsreagenz, Lösemittel als auch die Base variiert. Die Äquivalente DIPEA wurden zusätzlich von 1,2 auf 4,0 erhöht, wodurch garantiert werden

sollte, dass das überschüssige TFA aus der vorherigen Entschützungsreaktion neutralisiert wird. Nach 12 Stunden Reaktionszeit wurden NMR-Spektren der Reaktionsgemische aufgenommen. Bei allen Reaktionen konnte **ML3** als ein Produkt der Reaktion identifiziert werden. Interessant war es daher herauszufinden, bei welchen Konditionen die größte Ausbeute und geringste Menge an Nebenprodukten entstehen. Hierzu wurden die Zusammensetzungen per LC-MS untersucht, die in der folgenden Abbildung dargestellt sind.

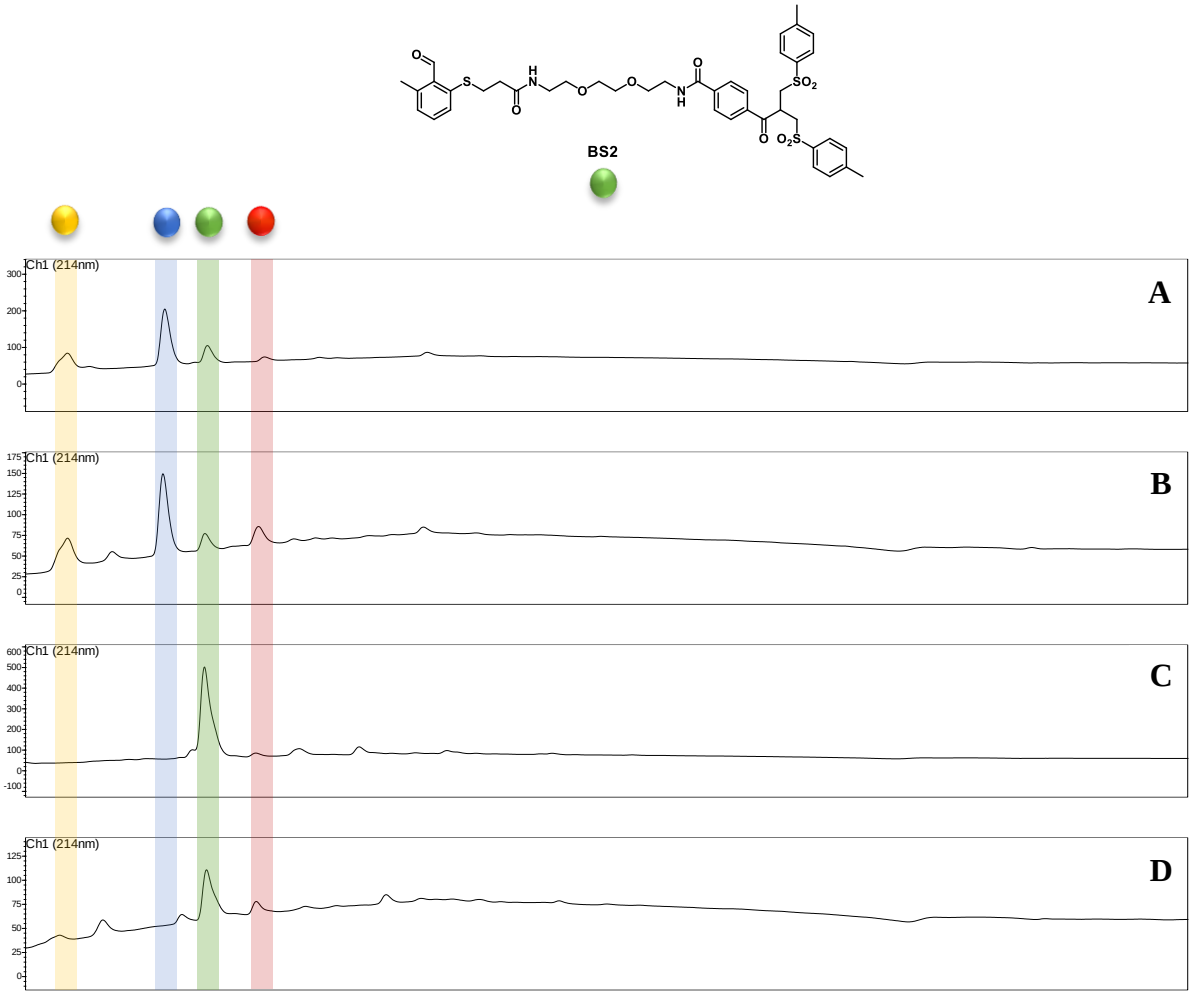


*Abbildung 32 – LC-MS Untersuchung der Testreaktion A-D zur Darstellung von **ML3**. Elugramm Auschnitt 3-17 min. Grün markiert ist das Produkt **ML3**, gelb, blau und rot sind unbekannte Nebenprodukte.*

Anhand der erhaltenen Masse der jeweiligen Signale lässt sich der Produkt Peak eindeutig identifizieren. Der grün markierte Peak zeigt eine Masse von *m/z* 435,20 $[M+H]^+$ und entspricht somit der berechneten Masse (435,51 $[M+H]^+$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die vorherigen Reaktionen mit DCC als Kupplungsreagenz nur mit geringem Umsatz zum Produkt abgelaufen sind (A und B) und daher die isolierte Ausbeute niedrig war. Bei der Reaktion mit HBTU (C und D) hingegen kann das gewünschte Produkt als Hauptprodukt identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen kann festgehalten werden, dass die Erhöhung der DIPEA Äquivalente von 1,2 auf 4,0 für die Reaktion sinnvoll und somit die Aminbildung garantiert. Ebenfalls wichtig ist

die Wahl des Kupplungsreagenzes. Hier ist es sehr entscheidend HBTU anstelle von DCC zu verwenden, um die Menge an Nebenprodukten zu reduzieren. Bei der Wahl des Lösemittels muss zwischen DCM und DMF entschieden werden. Basierend aus den LC-MS Ergebnissen (Abbildung 32) der Testreaktionen C und D erscheint DCM (Reaktion C) das vielversprechendere Lösemittel zu sein, da hierbei weniger Nebenprodukte zu erkennen sind. Die Reaktion wurde erneut in größerem Maßstab durchgeführt und das Produkt konnte nach Aufreinigung mittels präparativen HPLC mit 66% Ausbeute erhalten werden. Das NMR des sauberen Endprodukts **ML3** ist in Abbildung 33 dargestellt und die Resonanzen sind farblich markiert. Dabei sind besonders die Signale des Aldehyds und der Maleimid-Doppelbindung wichtig. Sowohl der Aldehyd als auch das Maleimid sind bei diesem Molekül die reaktivsten und sensibelsten Funktionalitäten. Es ist wichtig dieses Molekül unter Lichtausschluss zu handhaben, da es mit sich selbst einen lichtinduzierte [4+2] Cycloaddition eingehen kann.

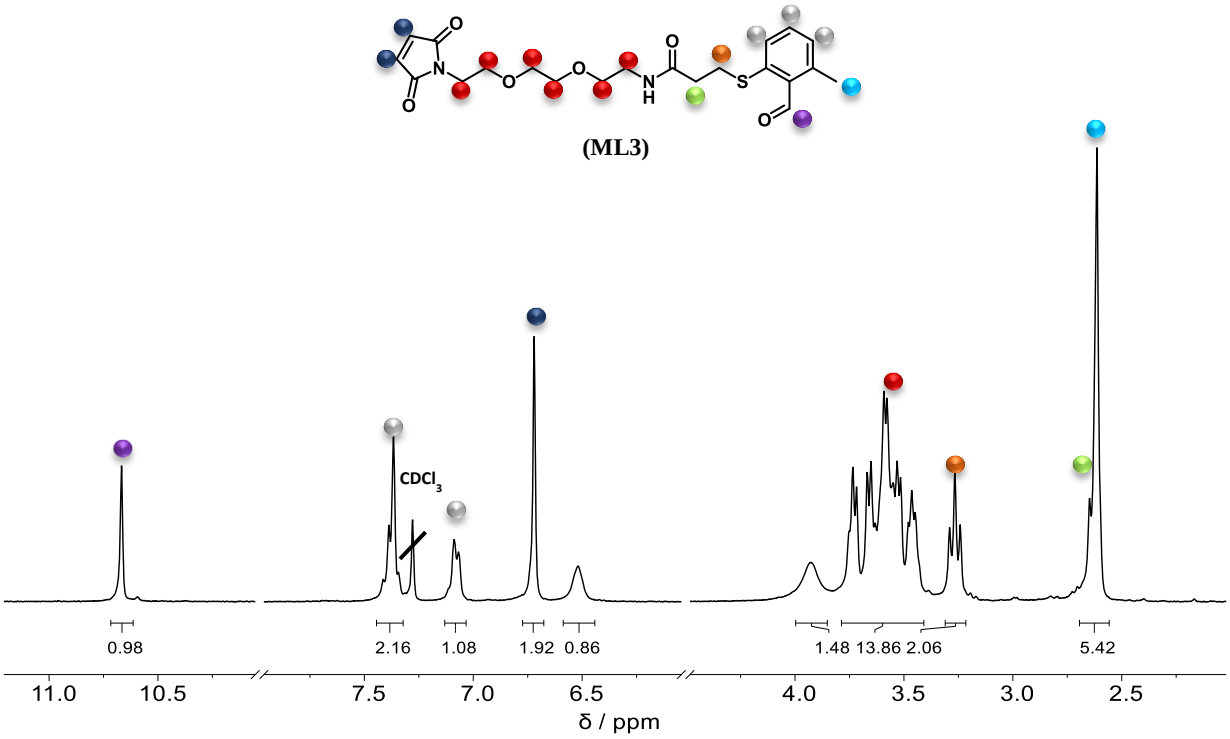


Abbildung 33 – NMR Spektrum des Maleimid - Linkers 3, gemessen in $CDCl_3$.

Der photoreaktive, biokonjugierbare Linker **ML3** konnte somit über eine dreistufige Syntheseroute mit einer Gesamtausbeute von 54% erfolgreich hergestellt werden. Charakterisiert wurde die Zielsubstanz durch ^{1}H-NMR und LC-MS. Nach dem Erfolg dieser Route und der begrenzten Zeit wurden die Syntheserouten des Maleimid - Linkers 1 und 2 nicht weiterverfolgt und optimiert.

3.2 Bissulfon - Linker

Disulfid-Verbrückungsreagenzien können leistungsfähige chemische Ligationsinstrumente bei der Herstellung von bioaktiven Hybridmakromolekülen mit präziser Architektur sein.[76] Sie bieten einen Zugang zu vielfältigen Strukturen mit einem hohen Maß an chemischer Selektivität. In diesem Kapitel werden diese Strukturelemente entwickelt und deren Synthese beschrieben. Als bereits in der Arbeitsgruppe *Weil* etablierte Vernetzungsreagenzien stehen das Bissulfon (**17**) und alternativ das Allylsulfon (**16**) zur Auswahl.[77]

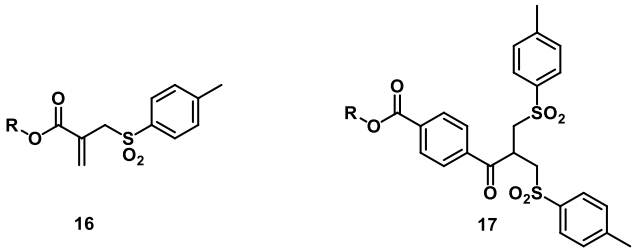


Abbildung 34 – Allylsulfon (16) und Bissulfon (17) als Vernetzungsreagenzien für trifunktionale Linker.

Verglichen mit dem Bissulfon bietet das Allylsulfon den Vorteil der Wasserlöslichkeit aufgrund der geringeren Anzahl an Aromaten und wäre demnach das präferierte Substrat, um einen biokonjugierten Linker zu synthetisieren. Dennoch wurde auf die Verwendung verzichtet, da die Synthese des Allylsulfons vorgibt, in der letzten Stufe das Sulfid mithilfe von Iod zum Sulfon zu oxidieren.[77] Durch diesen Reaktionsschritt wäre ebenfalls das Sulfid des **PE** zum Sulfoxid oder zum Sulfon oxidiert worden. Das oxidierte Photoenol ist ein unerwünschtes Nebenprodukt und mindert die Ausbeute der Photoreaktion.[74] Aus diesem Grund wurde entschieden, das Bissulfon als Vernetzungsreagenz zu verwenden.

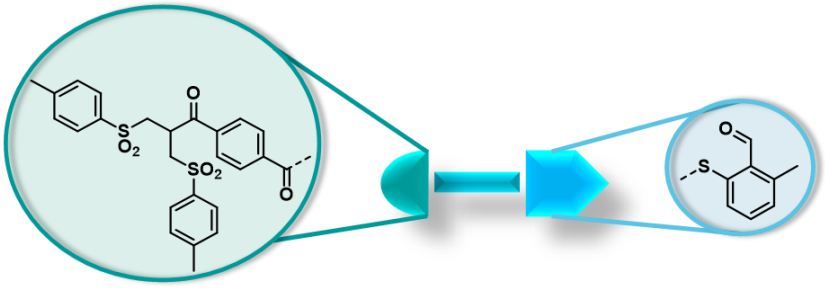


Abbildung 35 – Schematische Darstellung des Bissulfon – Linkers.

Das trifunktionale Strukturdesign bietet die Möglichkeit der Konjugation sowohl mit einem Disulfid verbrückten Peptid oder Protein als auch mit zwei unabhängigen Thiol Komponenten. Dabei können zum einen Affinität-*tags* oder verschiedene Wirkstoffe an den Linker konjugiert werden. Mittels freier Thiole können diese nach Eliminierung einer Tosylat-Gruppe über eine Michaeladdition an den Linker konjugiert werden.

3.2.1 Syntheserouten Bissulfon - Linker

Das Thiol-reaktive ortsselektive Konjugationsreagenz soll durch Kombination mit einer *o*-MBA Einheit einen neuen Linker hervorbringen, der durch zwei aufeinanderfolgende milde Michael-Additionen, wie in der Einleitung 1.1.2 beschrieben, unter physiologischen Bedingungen an Somatostatin konjugieren kann. Es wurden dahingehend drei unterschiedliche Strukturdesigns basierend auf verschiedenen Verlinkungsstrategien entwickelt, wobei als Photoenol Einheit auf die bereits in Kapitel 3.1 vorgestellten Strukturen (**1** und **2**) zurückgegriffen wird. Das einsetzte Bissulfon Strukturelement eliminiert *in situ* eine *p*-Toluolsulfonsäure sobald der pH-Wert alkalisch (pH 7,4 - 8,0) eingestellt wird (Abbildung 37).

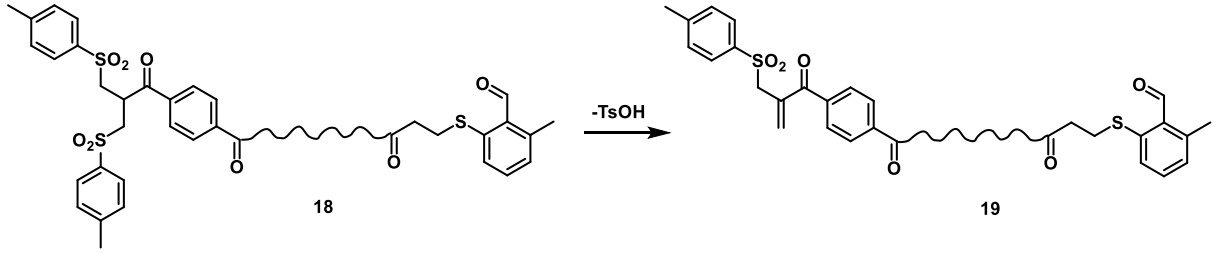


Abbildung 37 – Schematische Übersicht der Eliminierungsreaktion des Bissulfons.

Das bei der Reaktion entstehende Monosulfon **19** verfügt über eine hohe chemische Reaktivität und kann präzise an bereits reduzierte Disulfide verschiedener Biomoleküle konjugiert werden.

3.2.1.1 Syntheseroute zur Darstellung des Bissulfon - Linkers 1

Der Bissulfon - Linker 1 (**BS1**) enthält als Photoenol Komponente den PE-Alkohol (**1**) welcher über eine Kupplungsreaktion an den Bissulfonbaustein (**17**) addiert wird.

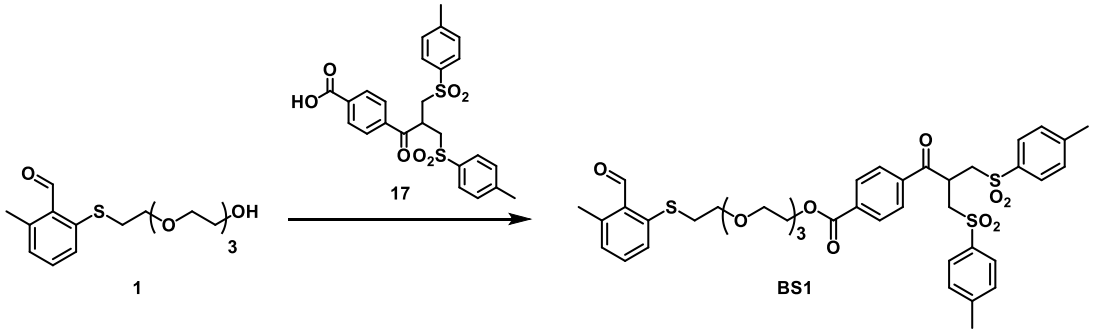


Abbildung 38 – Syntheseübersicht des Bissulfon - Linkers 1.

Diese Route besitzt den Vorteil, dass durch die gewählte Photoenol Komponente bereits ein polarer Linker verbaut ist und somit in wenigen Stufen das Produkt (**BS1**) erhalten werden kann.

3.2.1.2 Syntheseroute zur Darstellung des Bissulfon - Linkers 2 und 3

Die Bissulfon - Linker 2 und 3 (**BS2**, **3**) basieren hingegen auf der PE-Carbonsäure (**2**), welche ebenfalls in einer Kupplungsreaktion mit den in Abbildung 39 dargestellten Bissulfonbausteinen (**20**) und (**21**) reagieren. Die einzelnen Stufen sowie die Syntheseprobleme und Ergebnisse werden dabei im Folgenden genauer besprochen.

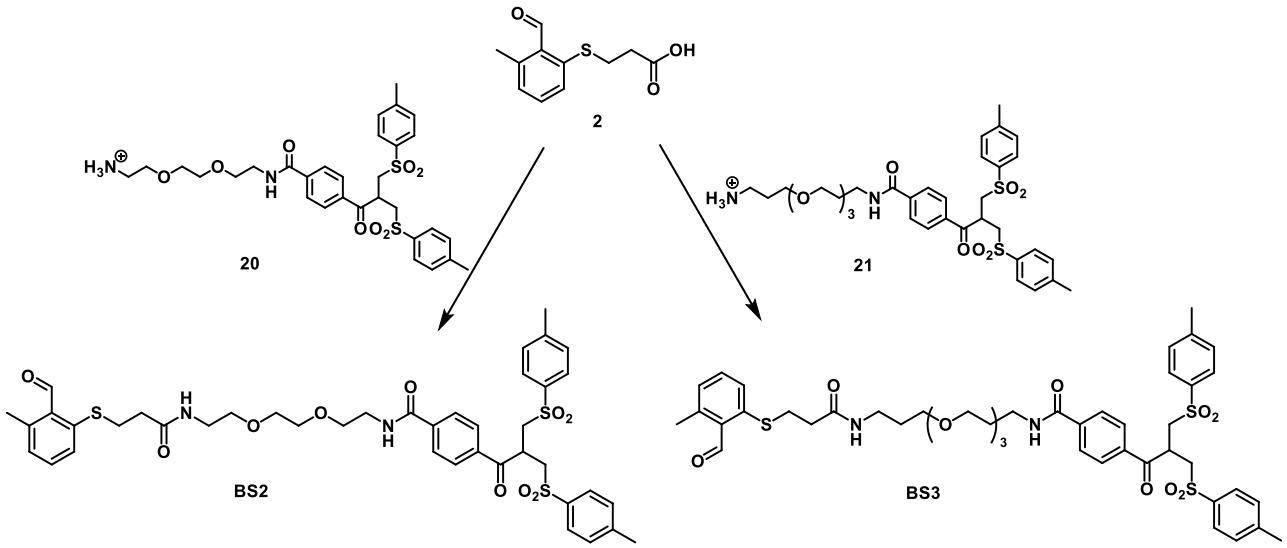


Abbildung 39 - Syntheseübersicht des Bissulfon - Linkers 2 und 3.

Interessant hierbei ist die Variation in der Glygolkettenlänge in den Bissulfon - Linkern 2 und 3. Zum einen besteht der Bissulfonblock **20** aus zwei Glykoleinheiten, während **21** aus drei besteht und somit polarer ist. Der Unterschied beider Linker zu **BS1** besteht in der Amidbindung anstelle einer Esterbindung, wodurch eine bessere Stabilität garantiert werden soll.

3.2.2 Syntheseergebnisse Bissulfon - Linker

3.2.2.1 Synthese des Bissulfon - Linker 1

Unter Verwendung von 2-Fluor-6-Methylbenzaldehyde (**6**) wird in einer Substitutionsreaktion das Photoenol (**1**) in guten Ausbeuten erhalten. Der Bissulfonbaustein (**17**) wird ausgehend von 4-Acetylbenzoesäure (**22**) synthetisiert, welche zunächst in das Piperidinium-Salz umgewandelt wird. Durch die anschließende Substitutionsreaktion wird das Bissulfid erhalten, welches mit Oxone zum Bissulfon oxidiert wird.[75] Beide Komponenten reagieren anschießend in einer Kupplungsreaktion **ii** zum **BS1**. Als Kupplungsreagenz wurde EDC verwendet.

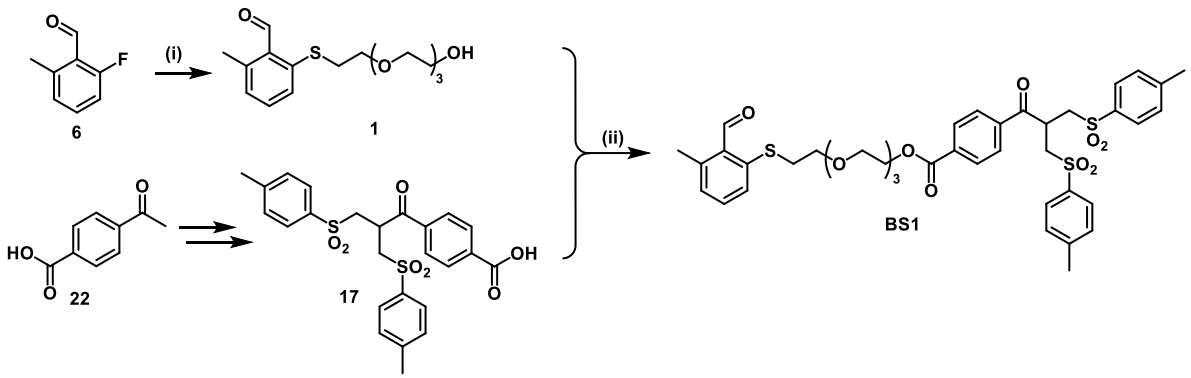


Abbildung 40 - Synthese des Bissulfon - Linkers 1 basierend auf dem PE-OH Derivat. Reaktionsbedingungen: (i) K_2CO_3, DMF, 12 h, 85 °C, 79%; (ii) EDC, DMAP, DCM, 12 h, RT.

Bei dieser Steglich-Veresterung konnte mittels LC-MS festgestellt werden, dass sich das Produkt (**BS1**) gebildet hat, jedoch besitzen Verunreinigung und Produkte ähnliche Retentionszeiten, was eine chromatographische Auftrennung schwierig machte. Bei der LC-MS Messung wurden drei Hauptsignale bei 7,5, 8,3 und 8,8 min beobachtet. Das erste Signal bei 489,21 g/mol lässt sich als Verunreinigung identifizieren, während Signal 2 mit 677,35 g/mol (654,83 $[M+Na]^+$) zu dem eliminierten Produkt passt. Das letzte Signal mit 833,34 g/mol entspricht dem Natrium-Addukt des nicht eliminierten Produkts. Wegen den Schwierigkeiten bei der Auftrennung und dem Erfolg der anderen Bissulfon - Linker wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Es lässt sich jedoch festhalten, dass diese Syntheseroute trotz ihrer Aufreinigungsprobleme relativ kurz und stringent ist und somit zukünftig optimiert werden könnte. Nachteilig ist lediglich die instabilere Esterbindung die im Folgenden durch eine Amidbindung ersetzt wird.

3.2.2.2 Synthese des Bissulfon - Linker 2

Wie bereits in Abbildung 39 übersichtlich dargestellt, basiert der Bissulfon - Linker 2 auf dem Photoenol Derivat (**2**), welches an ein zuvor synthetisiertes Bissulfonderivat (**20**) konjugiert wird. Dieser lässt sich in zwei Stufen aus dem kommerziell erhältlichen einseitig geschützten Glycolamin (**12**) und dem Bissulfon (**17**) mittels HBTU Kupplung darstellen. Der erste Syntheseschritt erfolgte in guten Ausbeuten und erzeugte den *Boc*-geschützten Bissulfon - Linker (**23**). Im Folgeschritt wurde die Schutzgruppe säurekatalysiert abgespalten und ergab in quantitativen Ausbeuten das TFA-Salz (**20**).

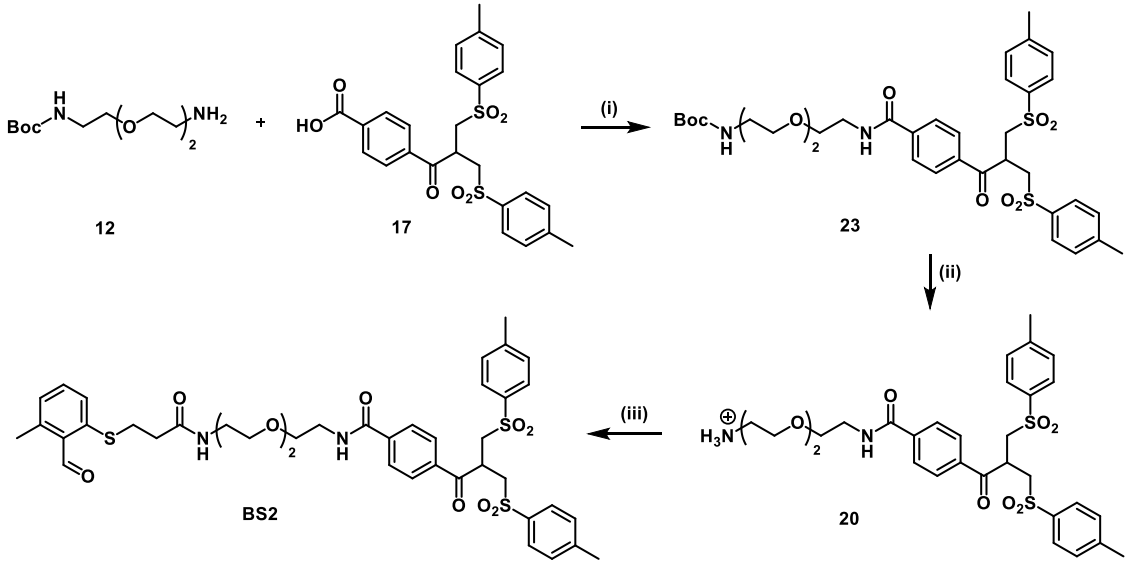


Abbildung 41 – Synthese des Bissulfon - Linkers 2 basierend auf dem PE-COOH Derivat. Reaktionsbedingungen: (i) HBTU, DIPEA, DMF, 12 h, RT, 67%, (ii) TFA, DCM, 2 h, RT, quant., (iii) HBTU, DIPEA, DMF, 12 h, RT, 15%.

In der anschließenden Kupplungsreaktion wurde Verbindung **2**, dessen Synthese bereits in Abbildung 30 beschrieben wurde, über eine HBTU vermittelte Kupplungsreaktion an das synthetisierte Bissulfonderivat (**20**) konjugiert. Bei dieser Reaktion traten eine Vielzahl an Nebenprodukten auf, weshalb entschieden wurde, diese Substanz über die präparative HPLC aufzureinigen. In der folgenden Abbildung ist die LC-MS Untersuchung des Reaktionsgemisches dargestellt, wobei markiert ist, bei welchen Signalen es sich basierend auf den dazugehörigen Massen um das Produkt handelt.

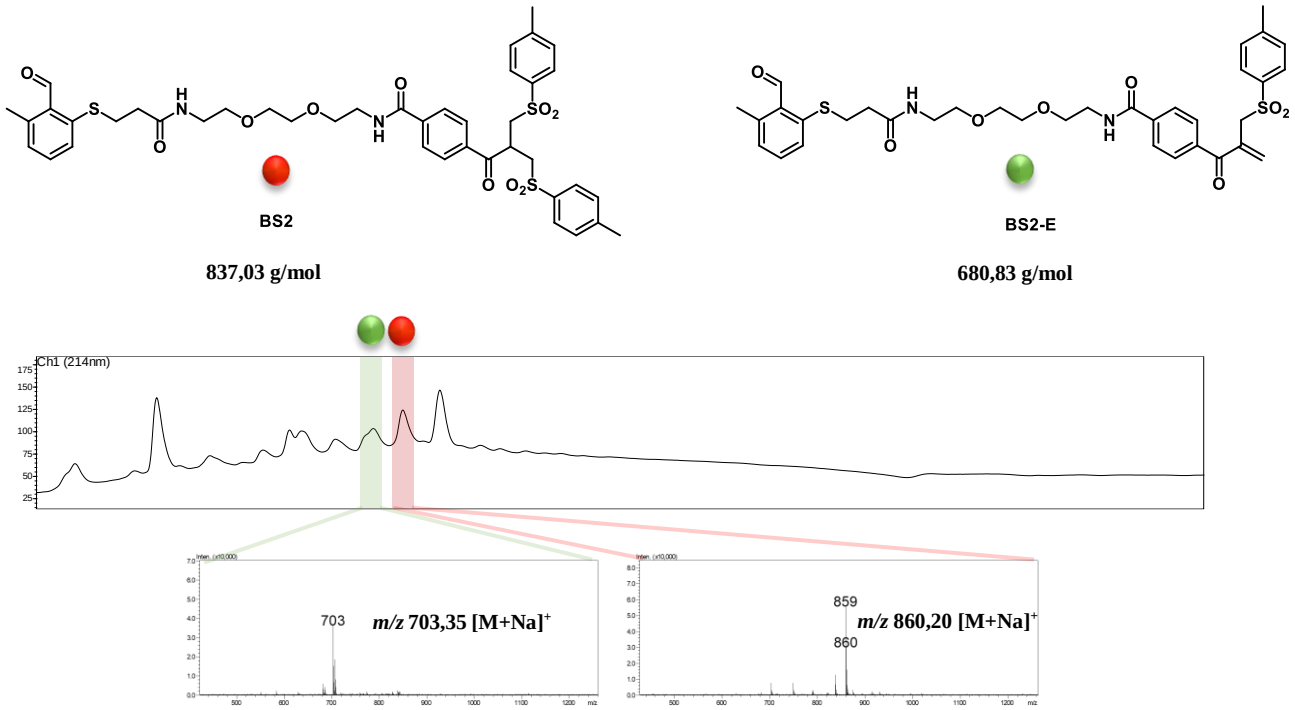


*Abbildung 42 – LC-MS Untersuchung der Kupplungsreaktion von **(2)** und **(14)** zur Darstellung des **BS2**. Ausschnitt des Elugramms (3-17 min).*

Das Elugramm zeigt, dass sich bei der Reaktion etwa sieben verschiedene Stoffe gebildet haben. Anhand der Masse lässt sich der grün markierte Peak dem eliminierten Bissulfon - Linker 2 **(BS2-E)** zuordnen und das rot markierte Signal entspricht laut Masse dem gewünschten Produkt **(BS2)**. Die chromatographische Auftrennung dieses Reaktionsgemisches war per Hand nicht möglich. Mittels präparativer HPLC konnte das Produkt jedoch isoliert werden. Wie nach den LC-MS Ergebnissen bereits zu erwarten war, ist die Ausbeute der Reaktion mit 15% sehr gering ausgefallen. Dennoch konnte das Produkt mittels ^{1}H-NMR und LC-MS charakterisiert werden.

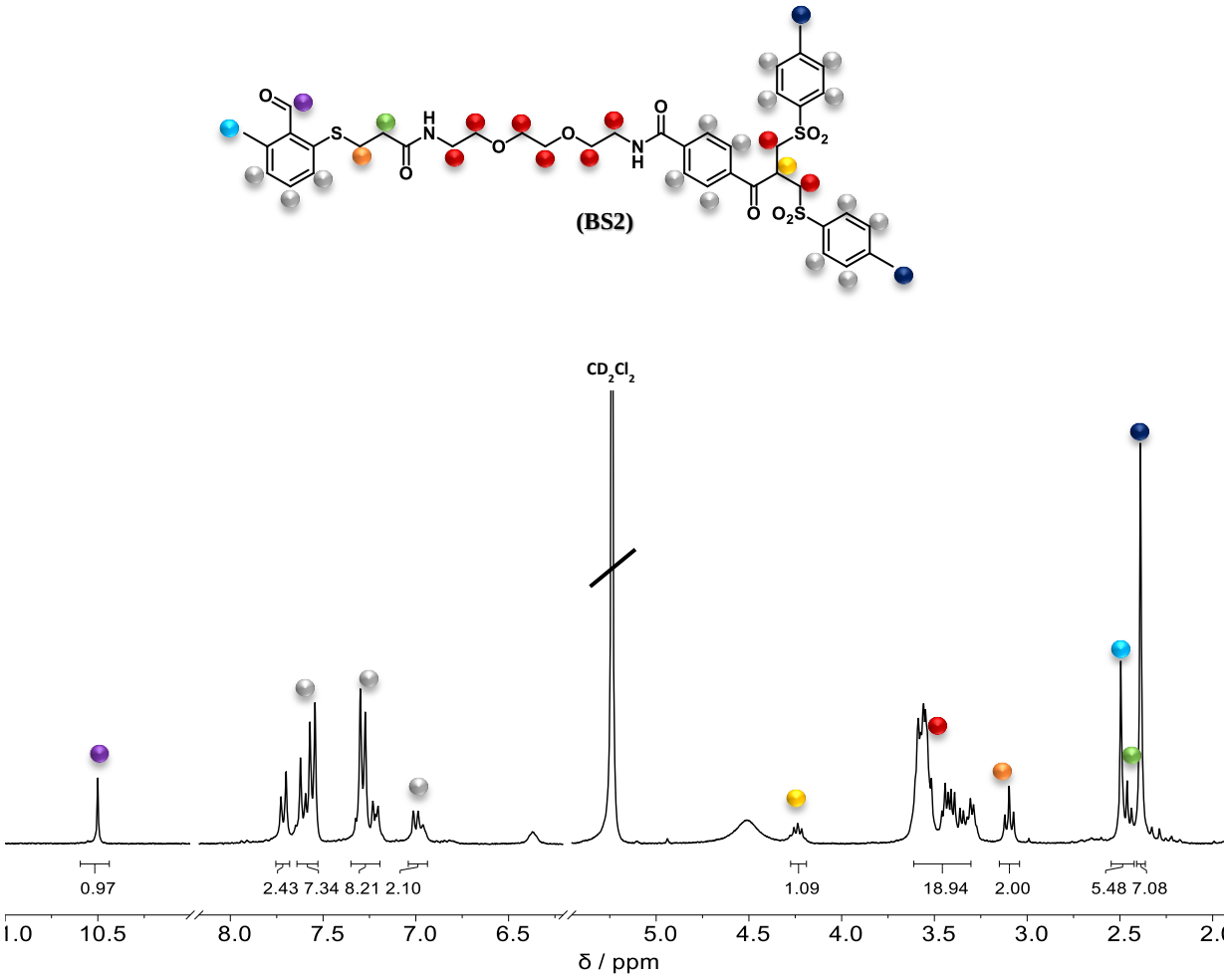


Abbildung 43 – NMR Spektrum des Bissulfon - Linkers 2. Gemessen in CD_2Cl_2.

In Abbildung 43 ist das saubere NMR des Bissulfon - Linkers 2 gemessen in CD_2Cl_2 abgebildet. Jedoch besteht Optimierungsbedarf bei der letzten Stufe. Die Reduzierung der Nebenprodukte könnte durch Änderung der Kupplungsreagenzien und des Lösemittels erreicht werden. Aufgrund der begrenzten Zeit und dem Erfolg bei der Synthese des **BS3** wurde diese Syntheseroute nicht weiter optimiert.

3.2.2.3 Synthese des Bissulfon - Linker 3

Als dritter Linker wurde basierend auf einer Triglycoleinheit der Bissulfon - Linker 3 designt. Dabei wurde als Photoenolkomponente die PE-Carbonsäure (**2**) gewählt. Diese lässt sich wie bereits in Abbildung 30 gezeigt, aus dem 2-Fluor-6-methylbenzaldehyd (**6**) darstellen oder kostengünstiger aus der entsprechenden Nitroverbindung (**24**), die freundlicherweise von *Florian Feist* zu Verfügung gestellt wurde. Über eine Substitutionsreaktion mit 3-Mercaptopropionsäure konnte die PE-Carbonsäure (**2**) in guten Ausbeuten erhalten werden. Anschließend wurde **2** in einer Kupplungsreaktion mit dem Bissulfonderivat (**21**) umgesetzt.

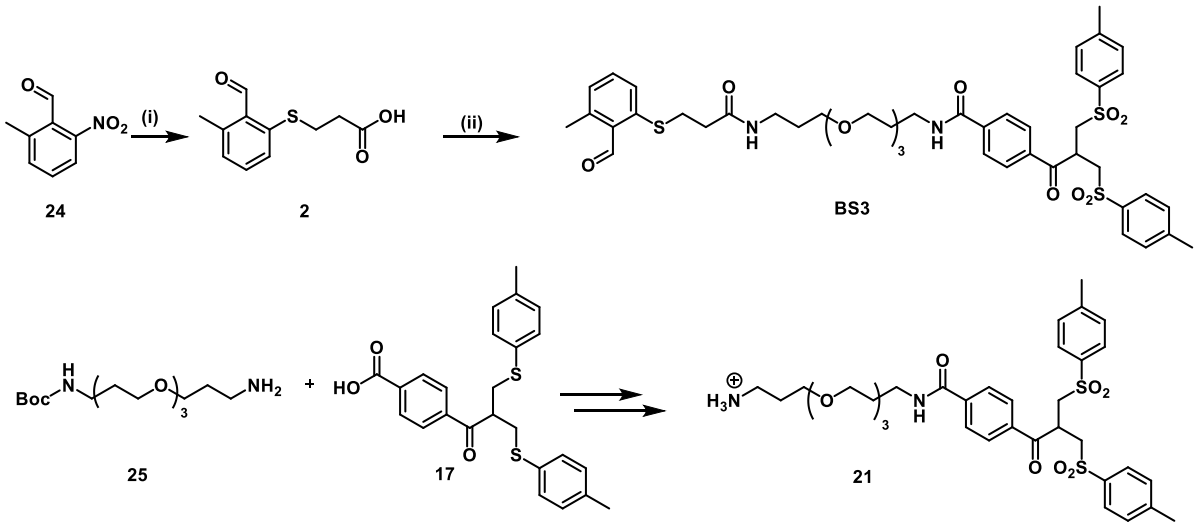


Abbildung 44 - Synthese des Bissulfon - Linkers 3 basierend auf dem PE-COOH Derivat. Reaktionsbedingungen: (i) 3-Mercaptopropionsäure, Cs_2CO_3, DMSO, 12 h, 35 °C, 80%, (ii) EDC, DIPEA, DMF, 12 h, RT, 22%,

Durchgeführt wurde die Reaktion **ii** mit EDC als Kupplungsreagenz und mit 1,2 Äquivalente DIPEA. Bei der Kupplungsreaktion traten einige Probleme auf. Aus dem NMR des Reaktionsgemisches kann anhand der auftretenden Aldehyd-Signale ermittelt werden, wie viele Nebenprodukte entstanden sind. Durch Vergleich mit den NMRs der Verbindungen, die bei dieser Reaktion vorhanden sein könnten, konnten Produkt- und Edukt- Signale identifiziert werden. Das Signal des Edukts (**2**) ist im Vergleich zum Produkt (**BS3**) deutlich größer, was für eine nicht beendete Reaktion spricht. Jedoch sind zusätzlich mehrere Nebenprodukte zu erkennen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es sich bei EDC als gewähltes Kupplungsreagenz nicht um das Optimale für diese Reaktion handelt. Daher wurden weitere Testreaktionen durchgeführt, um den Umsatz der Reaktion **ii** zu erhöhen. Es wurde auf die Ergebnisse (siehe Tabelle 1) zur Optimierung des Linkers **ML3** zurückgegriffen, HBTU als neues Kupplungsreagenz verwendet, Lösemittel (A,B: DCM und C: DMF) und Reaktionszeiten (A: 12 h und B,C: 36 h) variiert.

*Tabelle 2 - Testreaktion zur Optimierung der Kupplungsreaktion für die Darstellung von **BS3**.*

	21 [Äq]	2 [Äq]	Kupplungs-reagenz [Äq]	Base [Äq]	Reaktionszeit [h]	LM
A	1,0	1,2	HBTU 2,0	DIPEA 4,0	12	DCM
B	1,0	1,2	HBTU 2,0	DIPEA 4,0	36	DCM
C	1,0	1,2	HBTU 2,0	DIPEA 4,0	36	DMF

Die resultierenden Reaktionsgemische A-C wurden mittels LC-MS untersucht, um die optimalen Reaktionsbedingungen zu bestimmen. Die typischerweise bei dieser Reaktion entstehenden Produkte (BS3 und BS3-E) sind in der folgenden Abbildung farblich markiert.

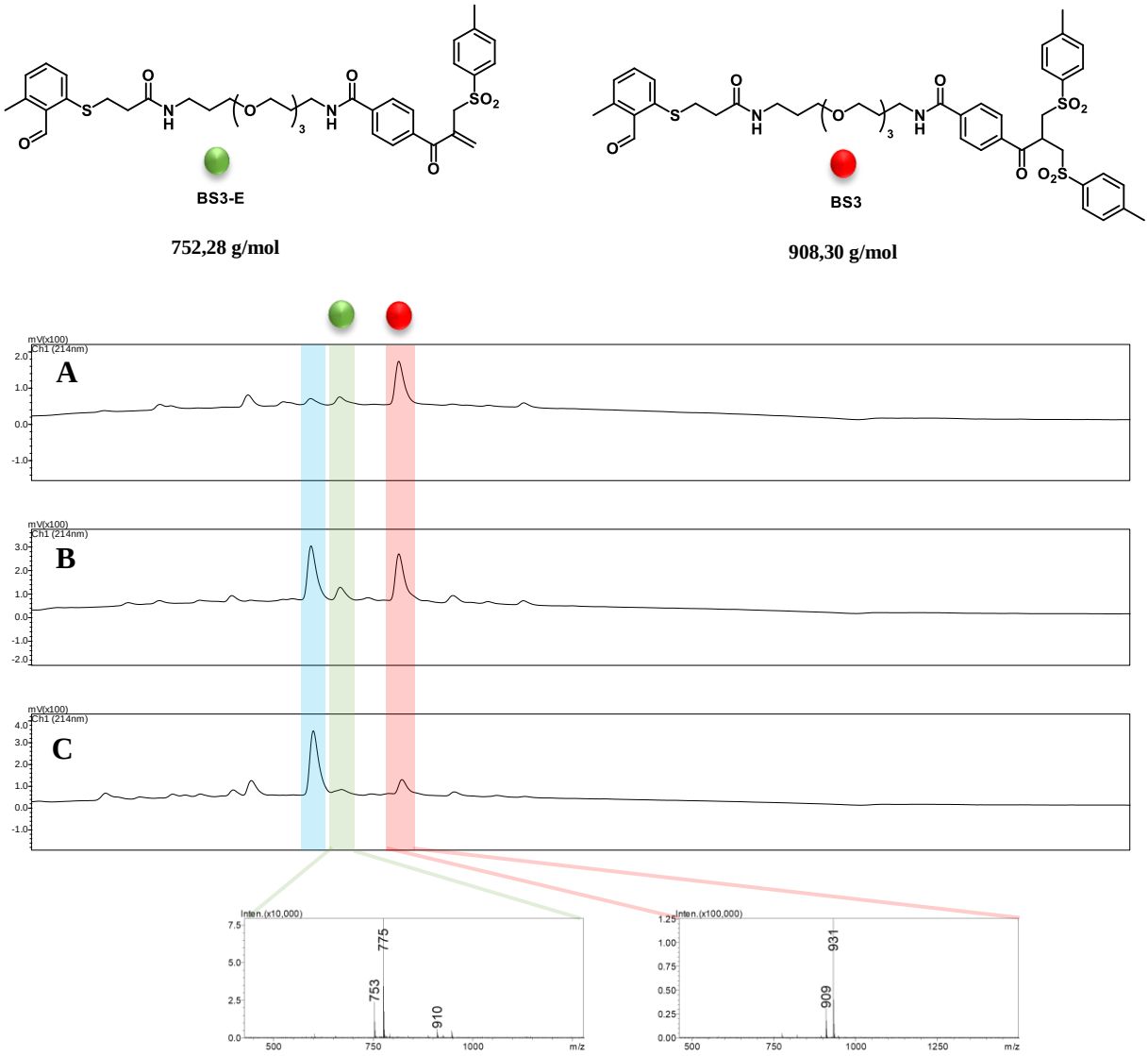


*Abbildung 45 – LC-MS Untersuchung der Kupplungsreaktion von **(2)** und **(15)** zur Darstellung des **BS3**. Ausschnitt des Elugramms (3-17 min). In grün ist das Elimationsprodukt **BS3-E** und rot der **BS3** markiert.*

Die Reaktionsbedingungen der Testreaktion A stellen sich nach LC-MS Untersuchungen als vielversprechend heraus, da im Vergleich zu B und C kaum Nebenprodukte entstanden sind. Die beiden Produkte (**BS3** und **BS3-E**) konnten isoliert und mittels ^{1}H-NMR und LC-MS charakterisiert werden. In der folgenden Abbildung sind die relevanten und charakteristischen Proton Resonanzen den Endsubstanzen zugeordnet. Aufgrund der begrenzten Zeit in dieser Arbeit steht das Upscaling dieser Reaktion noch aus.

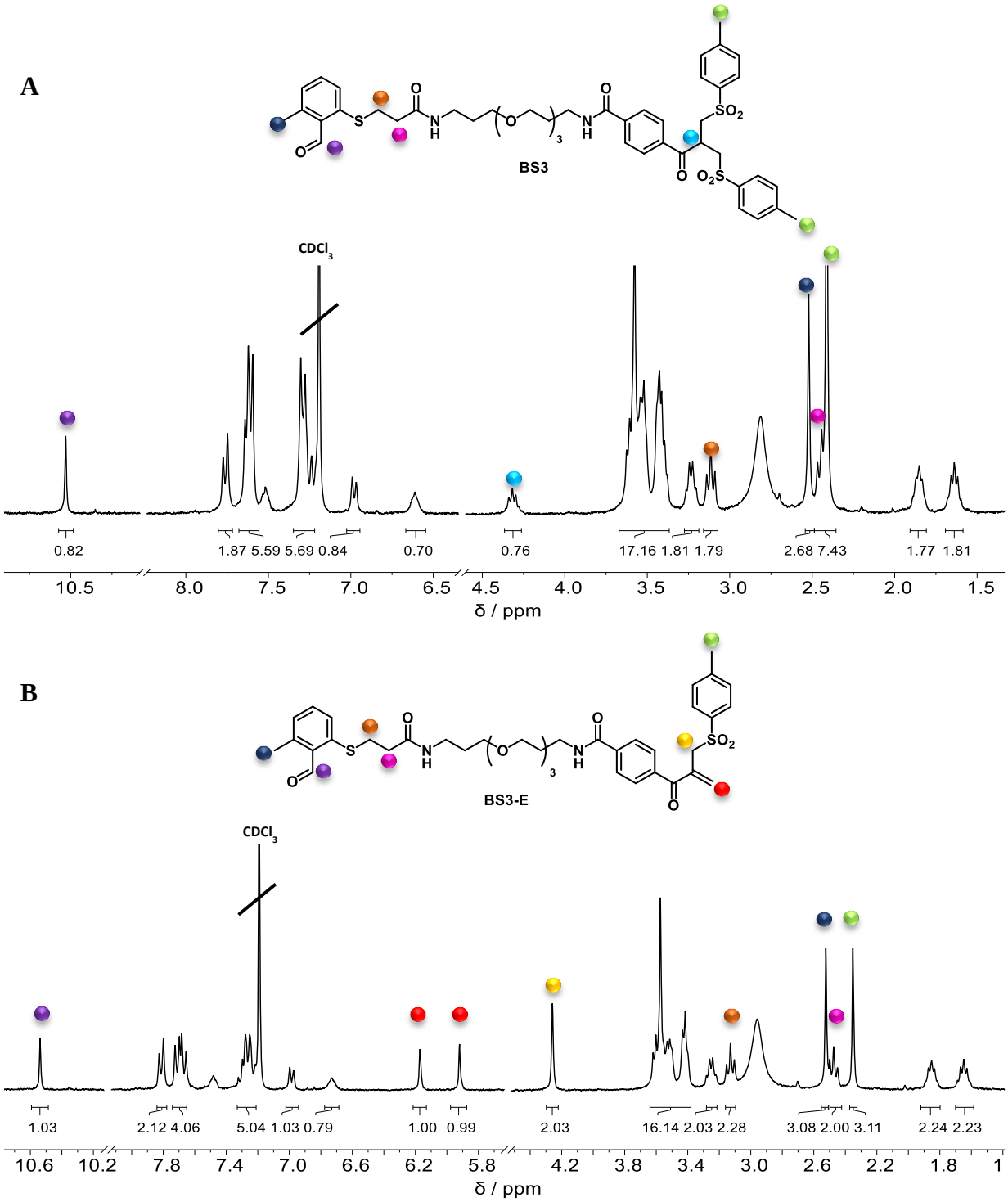


Abbildung 46 – Zugeordnetes NMR Spektrum des Bissulfon – Linkers 3 (A) und BS3-E (B). Gemessen in $CDCl_3$.

3.3 Biokonjugation

3.3.1 Peptid Konjugation - RGDC

Ziel dieser Arbeit ist photoinduzierte Biokonjugation. Hierzu muss der bereits synthetisierte photoreaktive Linker **ML3** an ein Biomolekül konjugiert werden. Als Modelprotein wurde RGDC ausgewählt. RGD ist ein Targeting Peptid, bestehend aus den Aminosäuren L-Arginin, Glycin und L-Aspartaraginsäure und ist eine Signalsequenz für Integrine (siehe Einleitung 1.1.2). Modifiziert mit einer zusätzlichen Aminosäure, dem Cystein, kann dieses über eine Thiol-Maleimid Reaktion an einen organischen Linker konjugiert werden. Bei dieser Reaktion wird üblicherweise ein Überschuss an Maleimid (1,5 bis 2,5 Äq) eingesetzt, da das Peptid oder Protein meist die kostenintensivere Komponente ist. In der folgenden Abbildung ist die Biokonjugation des **ML3** mit RGDC dargestellt.

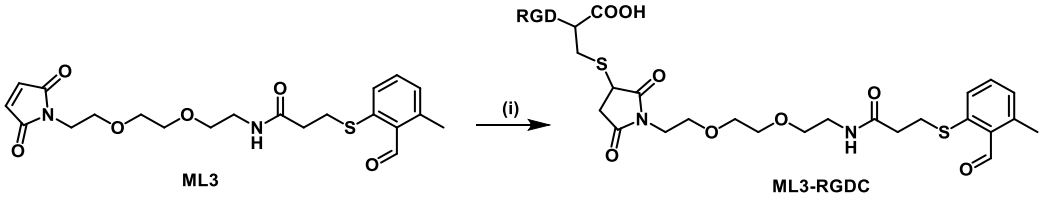


Abbildung 47 – Biokonjugation des ML3 mit dem Peptid RGDC. Reaktionsbedingungen: (i) RGDC, PP 50 mM pH 7,4, 12 h, RT, 58%.

Diese Reaktion wurde in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7,4 durchgeführt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des organischen Linkers in Wasser wurde dieser in ACN gelöst und anschließend der Reaktionslösung beigefügt. Die Reaktion wurde unter Lichtausschluss gehandhabt um intermolekulare Nebenreaktionen wie die photoinduzierte [4+2] Cycloaddition zwischen PE und Maleimid zu verhindern. Das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC aufgereinigt und erbrachte den biokonjugierten Linker (**ML3-RGDC**) in guten Ausbeuten. Charakterisiert wurde der Linker durch die folgende MALDI-Messung.

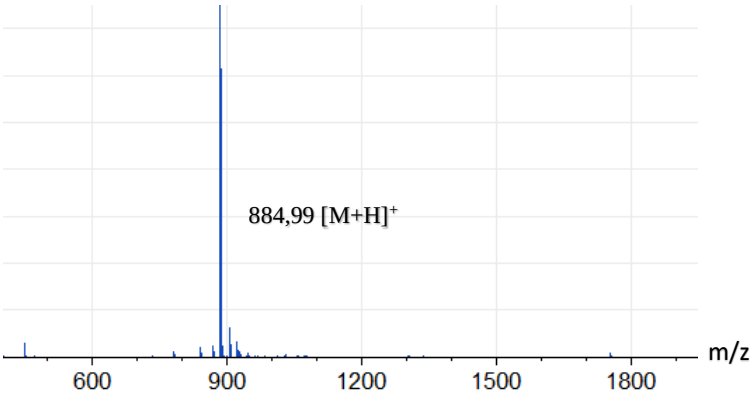


*Abbildung 48 – MALDI Spektrum des biokonjugierten Linkers **(ML3-RGDC)**.*

3.3.2 Peptid Konjugation - SST

Somatostatin SST ist ein beliebtes Target für biomedizinische Anwendungen. In Tumorzellen sind SST-Rezeptoren häufig überexprimiert, weshalb sich der endogene Peptid Ligand SST optimal zur gezielten Lokalisierung von z.B. Arzneistoffen eignet.[20] Wie bereits in 1.1.2 beschrieben, gibt es basierend auf der Primärstruktur des Peptids verschiedene Angriffspunkte für eine ortspezifische Biokonjugation. In dieser Arbeit wird die Konjugation des SST an der endogenen Disulfidbrücke unter Verwendung des bereits etablierten Bissulfons untersucht. Für die Interkalation muss zunächst eine Tosylatgruppe des Bissulfon eliminiert werden, um einen Michael-Akzeptor zu generieren.

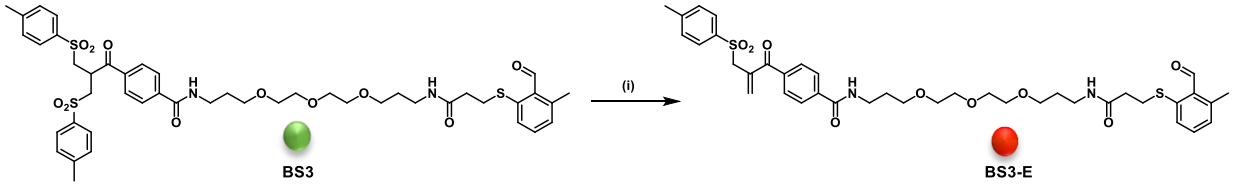


*Abbildung 49 – Eliminierung von **BS3** zu **BS3-E**. Reaktionsbedingungen: (i) 3:2 PP (50 mM, pH 7,8): ACN, RT, 1-3 d, 40%.*

In der Literatur wird beschrieben, dass die Eliminierungsreaktion eines Bissulfon-Derivats, analog zu **BS3**, innerhalb einer Nacht abgeschlossen sei.[78] Die Reaktion wird in einem PP:ACN Gemisch unter leicht alkalischen Bedingungen durchgeführt. Getestet wurde die Eliminierung mit dem zuvor auf der HPLC isoliertem reinen **BS3**. Mittels LC-MS wurde beobachtet, dass nach 24 Stunden nur ein geringer Anteil **BS3-E** entstanden ist. Die Reaktion wurde daraufhin für weitere 48 Stunden unter denselben Bedingungen fortgesetzt und ergab weiterhin keinen vollen Umsatz des Startmaterials.

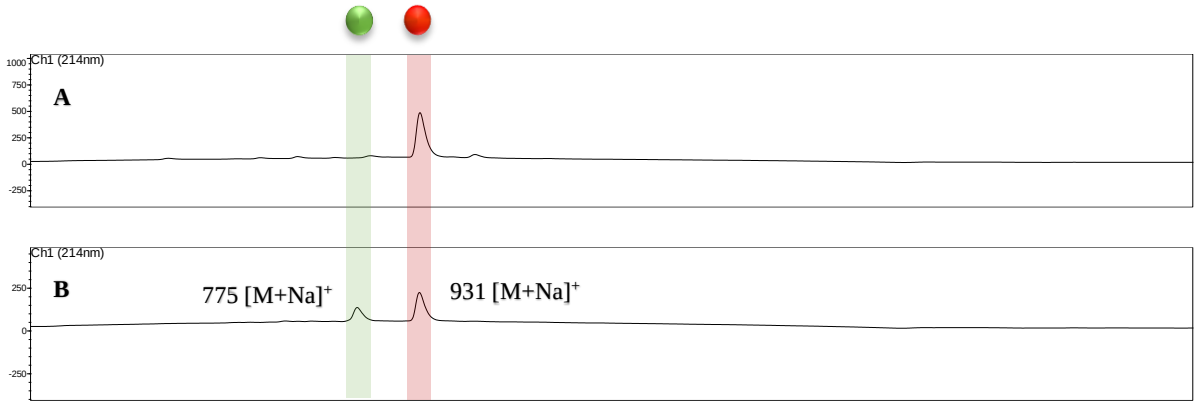


*Abbildung 50 – Ausschnitt des LC-MS Spektrums (3-17 min) von **BS3** (A) und der Eliminierungsreaktion nach 3 Tagen (B).*

Wie aus den LC-MS Spektren hervorgeht, sind nach 3 Tagen Reaktionszeit zwei Signale zu erkennen. Das Signal bei geringeren Eluationszeiten lässt sich dem eliminierten Produkt zuordnen, während das Hauptsignal dem nicht eliminierten Edukt entspricht. Interessant ist, dass

sich neben Edukt und Produkt keine Nebenprodukte während der beobachteten Reaktionszeit bilden. Die Hydrolyse der Doppelbindung ist eine zu erwartete Nebenreaktion, die basierend auf diesen Ergebnissen vermutlich erst nach längeren Reaktionszeiten einsetzt. In der Literatur wird bei der Bissulfon-Eliminierung das Reaktionsprodukt meist nicht genauer untersucht, sondern direkt in der Folgereaktion eingesetzt. Basierend auf den eigenen Beobachtungen wird vermutet, dass die folgenden Konjugationsreaktionen daher mit einem Gemisch aus eliminierten und nicht eliminierten Bissulfon durchgeführt wurden. In dieser Arbeit hingegen wurde mittels HPLC isoliertes reines eliminiertes Bissulfon (**BS3-E**) für die Biokonjugation mit SST eingesetzt.

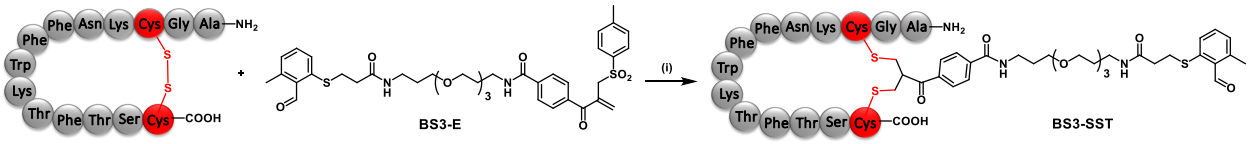


*Abbildung 51 – Biokonjugation von SST an **BS3-E**. Reaktionsbedingung: (i) TCEP, 3:2 PP (50 mM, pH 7,8): ACN, RT, 12 h.*

Die zweiteilige Reaktion setzt sich aus der Reduktion der Disulfidbrücken des SST und der anschließenden doppelten Michael-Addition zusammen. Der dazugehörige Reaktionsmechanismus ist im Folgenden dargestellt.

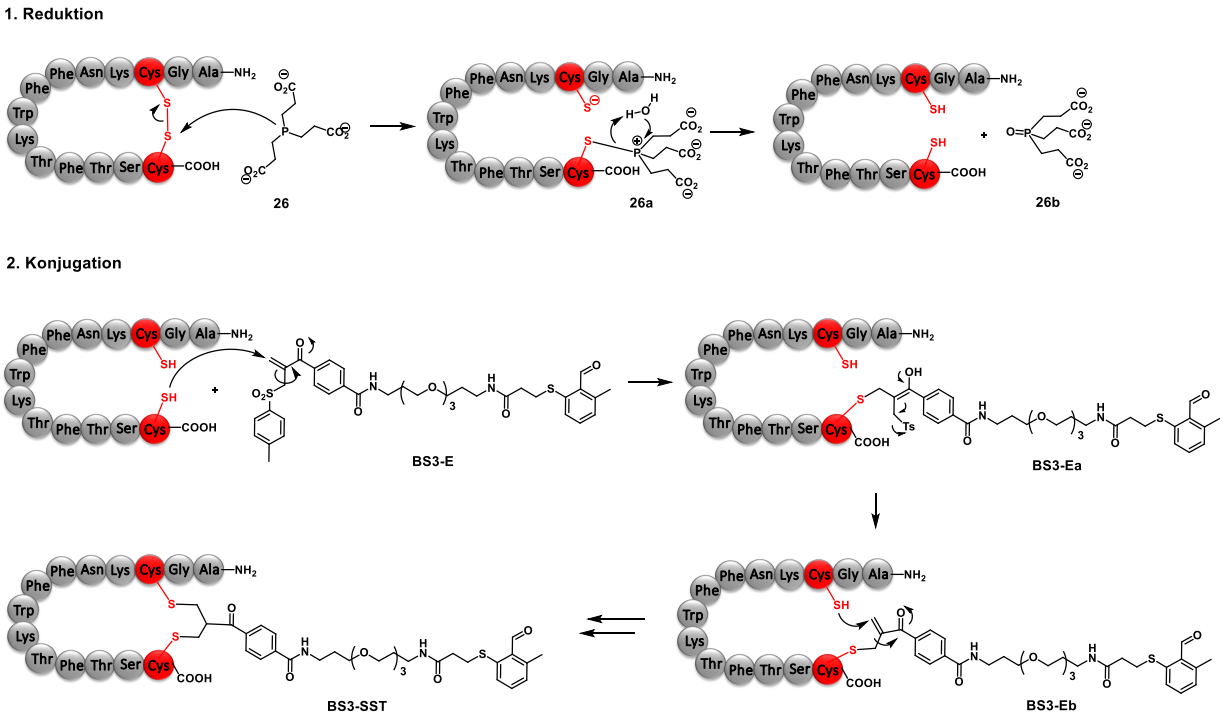


Abbildung 52 – Mechanismus der Reduktion von SST durch TCEP (1) und der anschließenden Konjugation (2) an den Bissulfon - Linker 3-E.

TCEP (**26**) reduziert im ersten Schritt die Disulfidbrücken, indem sich zunächst eine Phosphor-Schwefel Bindung ausbildet, die anschließend hydrolytisch das stabile Phosphanoxid erzeugt. Somatostatin und TCEP wurden daher für 20 min inkubiert bevor das **BS3-E** für die

Konjugationsreaktion zugegeben wurde. Die freien Thiole des SST reagieren mit dem Michael-Akzeptor des **BS3-E** unter Eliminierung der zweiten Tosylatgruppe. Bei diesem Reaktionsschritt wurde Präzipation beobachtet, welche durch zu starke Durchmischung der Probe und damit einhergehender Aggregation des SST über intermolekulare Disulfidbrücken verursacht wurde. Nach 12 Stunden Reaktionszeit wurden MALDI-ToF Messungen des Gemisches durchgeführt, wobei das Produkt eindeutig identifiziert werden konnte (2237,85 $[M+H]^+$), jedoch zwei Massensignale (847,25 g/mol und 1003,27 g/mol) unbekannten Ursprungs ebenfalls entstanden sind.

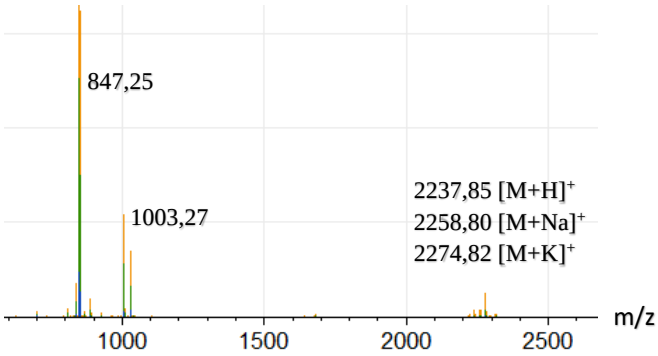


*Abbildung 53 – MALDI-Spektrum der Biokonjugationsreaktion zwischen SST und **BS3-E**.*

Die Intensitäten der Signale des MALDI-Spektrums sind bedingt durch das jeweilige Ionisationspotential der verschiedenen Moleküle, weshalb hieraus kein Rückschluss auf das Mengenverhältnis zwischen Produkt und Nebenprodukte gezogen werden kann. Anschließend wurde die Reaktion mittels HPLC aufgereinigt, wobei das Elugramm zwei Signale lieferte. Nach Isolation und Analyse dieser Signale wurde deutlich, dass es sich bei beiden Stoffen um Nebenprodukte der Reaktion handelte. Daraufhin wurde der Rückstand, der beim Lösen des Reaktionsgemisches in ACN für die HPLC-Aufreinigung zurückgeblieben ist, in DMF:H_2O erneut gelöst und mittels MALDI untersucht. Das Ergebnis der Messung bestätigt, dass das Produkt **BS3-SST** zusammen mit Nebenprodukten im Rückstand vorhanden ist. Die Aufarbeitung dieses Gemisches erweist sich jedoch als schwierig, da eine HPLC-Aufreinigung mit DMF: H_2O Gemisch mit den vorhandenen Instrumenten nicht möglich ist.

3.4 Photoreaktion

3.4.1 Optimierung der Photoreaktion

3.4.1.1 Reaktionssetup

Die Photoreaktionen wurden in einer, in Zusammenarbeit mit der Elektronikabteilung des MPIP entwickelten, Bestrahlungsapparatur durchgeführt. Bei dem Design der Apparatur mussten eine Vielzahl an Ansprüchen erfüllt werden, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird. Die Schwächung der Strahlungsintensität beim Durchdringen einer Probe ist nach dem Lambert-Beer´schen Gesetz sowohl von der Konzentration, Schichtdicke als auch vom Extinktionskoeffizienten der Substanz abhängig. Üblicherweise wird die Photoenol-Maleimidreaktion im niedrigen mM Bereich durchgeführt, besitzt einen geringen Extinktionskoeffizienten und sehr geringe Quantenausbeuten.[74] Eine hohe Bestrahlungsintensität ist demensprechend für die Reaktion wichtig, weshalb sechs 3 W high power LEDs an gegenüberliegenden Positionen in der Bestrahlungsapparatur eingebaut (siehe Abbildung 54) wurden. Weiterhin ist die Wahl des Bestrahlungsgefäßes von Bedeutung. Eine möglichst große Bestrahlungsoberfläche führt zu einer besseren räumlichen Verteilung der Lichtintensität und zur Beschleunigung der Photoreaktion. Am besten eignen sich üblicherweise rohrförmige Gefäße oder sogenannte *Tubes*, die bedingt durch ihren kreisförmigen Querschnitt eine größere Bestrahlungsoberfläche bieten. Daher wurde entschieden, die Photoreaktionen in gekürzten NMR-*Tubes* (Höhe 8,5 cm, Durchmesser 0,8 cm) durchzuführen. Diese können mittels Septums verschlossen und einfach entgast werden, um den für die Photoreaktion störenden Sauerstoff zu entfernen.

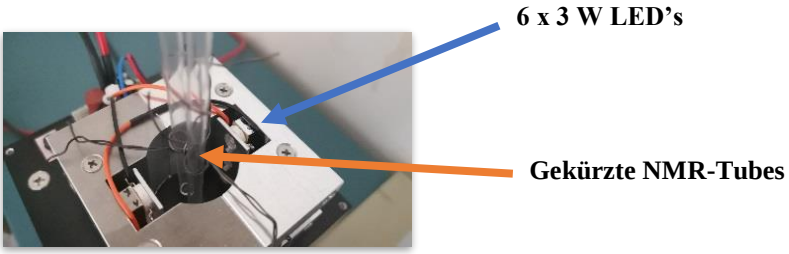


Abbildung 54 – Bestrahlungssetup mit 6 x 3 W high power LEDs.

Die Distanz zwischen den LEDs und Probe in der entwickelten Bestrahlungsapparatur beträgt 1,0 cm. Um die Strahlen effizienter zu bündeln, wäre hier der Einsatz von Linsen auf den LEDs möglich. Die durch die LEDs versurachte Wärmeentwicklung muss ebenfalls bedacht werden. Bei diesem Aufbau wurde eine geringe Wärmeentwicklung von ca. 45 °C nach fünf Stunden beobachtet, weshalb entschieden wurde keine zusätzliche Kühlung in die Apparatur einzubauen.

3.4.1.2 Optimierung der Reaktionsparameter

Zu den Parametern einer Photoreaktion gehören Lösemittel, Konzentration/Stöchometrie, durchstrahlte Schichtdicke, Bestrahlungswellenlänge, Strahlungsdichte und Reaktionszeit. Verschiedene Bedingungen wurden entsprechend getestet und optimiert. Die in dieser Arbeit verwendete Photoreaktion ist in Abbildung 55 übersichtlich dargestellt.

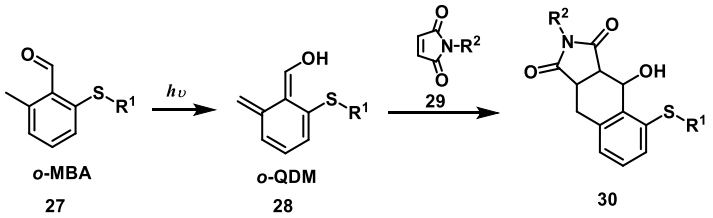


Abbildung 55 – Allgemeine Übersicht der Photoreaktion.

Wie in 1.3.4 beschrieben sorgen die Photonen einer bestimmten Wellenlänge für die Anregung des Photoenol vom π in den π* Zustand und durch Wasserstoffabstraktion wird das reaktive Intermediat *o*-QDM gebildet, welches anschließend in einer [4+2] Cycloaddition mit dem Maleimid reagiert. Die Wellenlänge, bei der die Anregung stattfindet, kann aus dem Absorptionsspektrums des Moleküls bestimmt werden. In Abbildung 56 ist das Absorptionsspektrum des Photoenols dargestellt und in grau hinterlegt, in welchem Wellenlängenbereich der Umsatz der Photoreaktion am höchsten sind. Wie von Feist *et al.* beschreiben, findet der optimale Umsatz nicht im Absorptionsmaximum, sondern im *tail* der Absorptionskurve statt.[74] Für das Bestrahlungssetup wurden dementsprechend LEDs mit der Wellenlänge von 410 nm gewählt.

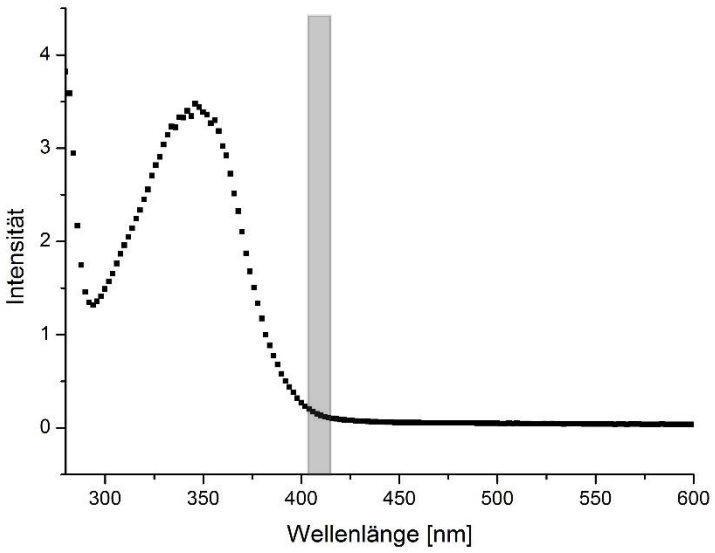


*Abbildung 56 – Absorptionskurve von PE-COOH **(2)** in ACN mit optimalem Bestrahlungsbereich in grau hinterlegt.*

Bei der Untersuchung der Lösemittel müssen verschiedene Punkte beachtet werden. Wichtig ist, dass das Lösemittel keine Absorption in dem für die Photoreaktion relevanten Wellenlängen Bereich hat. Zudem muss garantiert sein, dass sich beide Komponenten in dem Lösemittel gut lösen. Entsprechend diesen Bedingungen wurden MilliQ-Wasser mit mindestens 5% Acetonitril als Lösemittel der Photoreaktionen ausgewählt. Reaktionen mit biologischen Komponenten werden gewöhnlich im µM bis niedrigen mM Bereich durchgeführt, weshalb für die Photoreaktion eine Konzentration von 0,12 bis 0,24 mM verwendet wird. Die Konzentration darf nicht zu gering sein, da sonst die chemische Selektivität verloren geht, aber auch nicht zu hoch, da sonst die Eindringtiefe des Lichts zu gering ist. Als Volumen der Reaktion wurden 0,2 mL verwendet, da bei dieser Füllhöhe des NMR-*Tubes* in der Bestrahlungsapparatur garantiert ist, dass die komplette Probe bestrahlt wird.

Tabelle 3 – Optimierte Reaktionsparameter der Photoreaktion zwischen o-MBA und Maleimidderivaten.

Parameter	**Bedingung**
Lösemittel	MilliQ H_2O mit min. 5%ACN
Konzentration	0,12 - 0,24 mM
Reaktionsvolumen	200 -210 µL
Bestrahlungswellenlänge	410 nm

Zudem musste getestet werden, ob sich das Bissulfongrundgerüst unter den Bestrahlungsbedingungen zersetzt. Hierzu wurden 5 mg Bissulfon (**17**) 5 Stunden bestrahlt und die NMRs vor und nach Bestrahlung verglichen. Die Signale in den NMR-Spektren sind nach 5 Stunden Bestrahlung unverändert, woraus geschlossen wird, dass bei der Bestrahlungswellenlänge von 410 nm der Bissulfonblock keine Photonen absorbiert, daher weder angeregt noch zersetzt wird und problemlos für folgende Photoreaktionen verwendet werden kann.

3.4.2 Photoreaktionen

3.4.2.1 Einstieg in photoinduzierte Reaktion

Um den Umsatz der Photoreaktionen zu untersuchen gibt es verschiedene Möglichkeiten, die von den photoreaktiven Komponenten abhängig sind. Bei dem in dieser Arbeit verwendetem System der [4+2] Cycloaddtionen eines Photoenols mit einem Maleimidderivat eignen sich Absorptions- und Massenuntersuchungen, um den Erfolg der Reaktionen zu bestimmen. Das Photoenol absorbiert bei 350 nm, wohingegen das Reaktionsprodukt auf Grund der Verkleinerung des elektronisch konjugierten Systems in diesem Bereich keine Absorption zeigt. Durch Verringerung bzw. Verschwinden der Absorpionsbande zwischen 325-375 nm kann Rückschluss auf das Fehlen der Photoenolfunktionalität bzw. der Umwandlung zum Photoprodukt gezogen werden. Basierend auf dem zuvor untersuchten und optimierten Reaktionsparameten (vgl. 3.4.1) wurden verschiedene Photoreaktion durchgeführt, um das System zu testen. Zunächst wurde hierzu die Reaktion zwischen dem Photoenol (**2**) und unterschiedlichen Maleimiden untersucht.

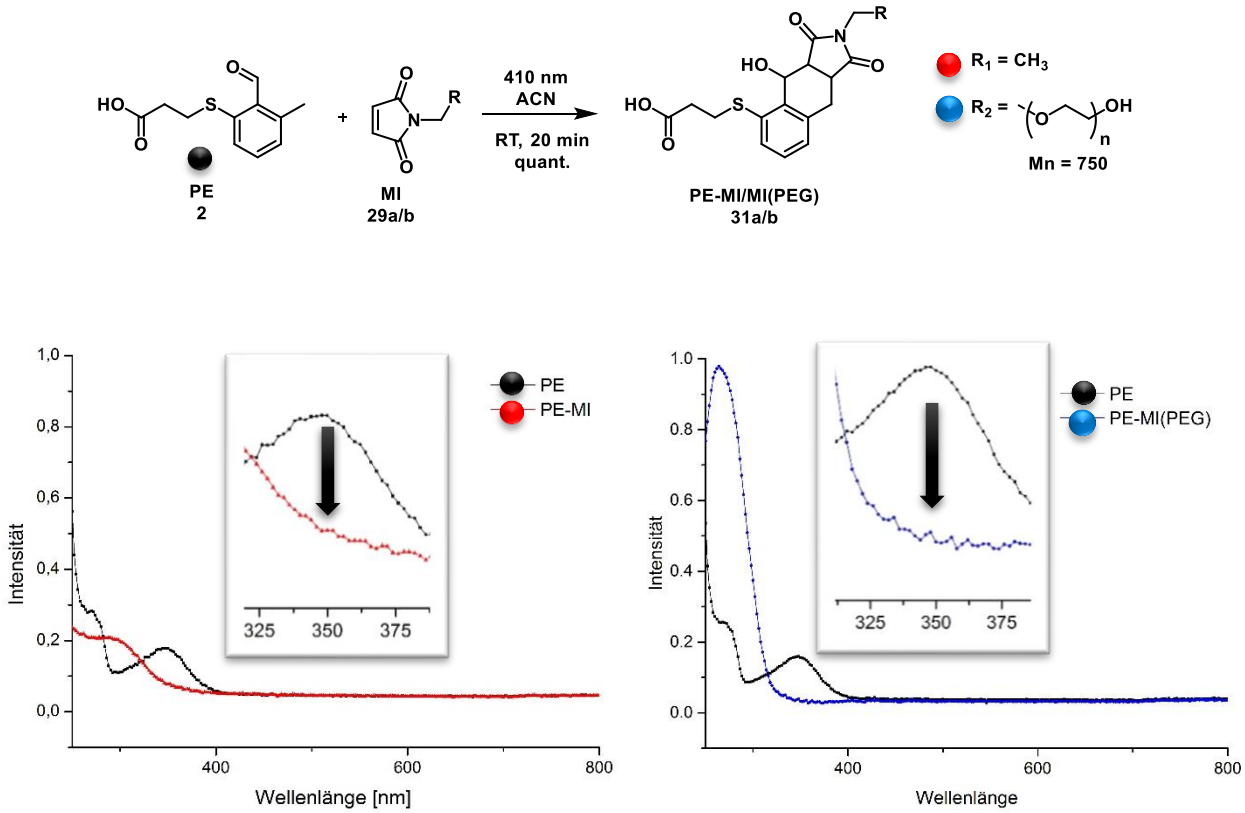


Abbildung 57 – Photoreaktion zwischen PE (2) und verschiedenen Maleimidderivaten. Absorptionsmessungen der jeweiligen Photoprodukte im Vergleich zum PE (2).

Sowohl die Reaktion mit dem *N*-Ethylmaleimid (rot markiert) als auch mit einem PEG-Maleimid (blau markiert) zeigen nach 20-minütiger Bestrahlung eine Verringerung der Absorptionsbande bei 350 nm und bestätigen somit den Erfolg der Photoreaktion.

Es wird festgehalten, dass die Photoreaktion des Photoenols (**2**) unter den genannten Bedingungen und der entwickelten Bestrahlungsapparatur sowohl mit *N*-Ethylmaleimid (**29a**) als auch mit einem Polymer (PEG-Maleimid (**29b**)) erfolgreich abläuft. Neu entwickelte Photoenolderivate wie das **BS2** wurden ebenfalls einer Photoreaktion mit *N*-Ethylmaleimid (**29a**) unterzogen, um mögliche Einflüsse eines Bissulfon derivatisierten PE auf die Reaktion zu untersuchen.

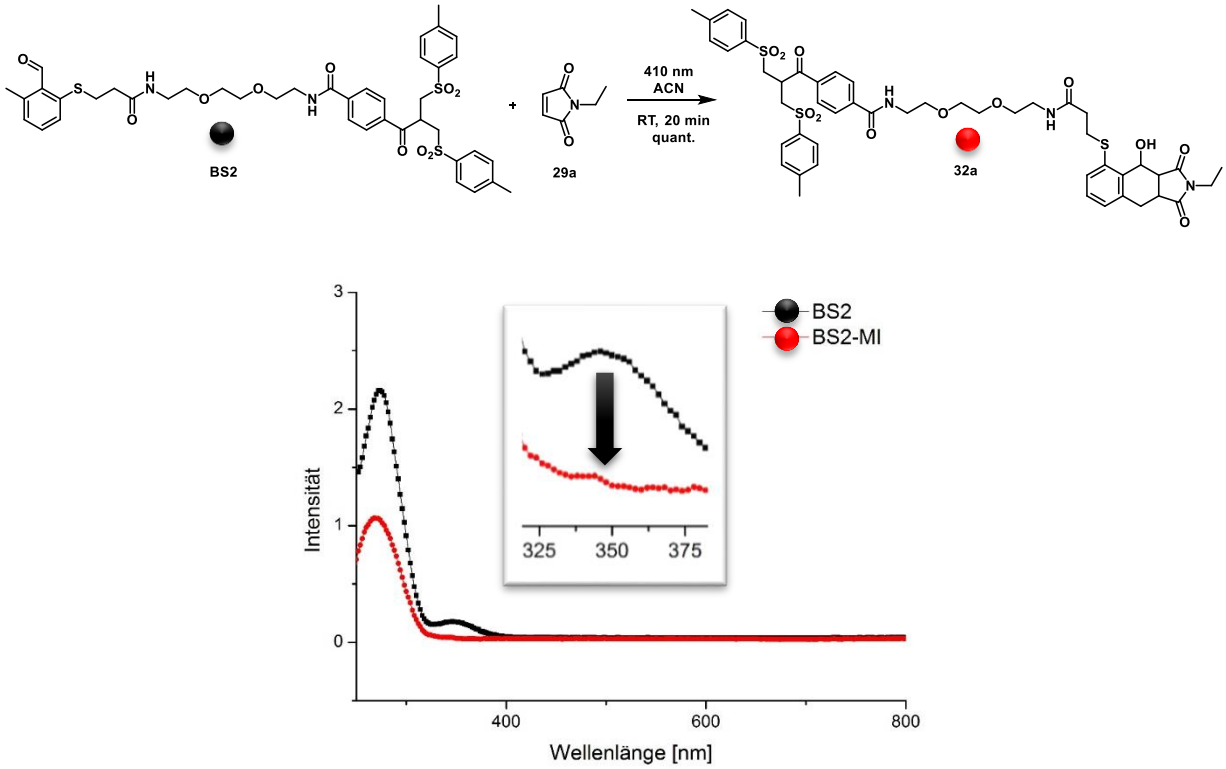


*Abbildung 58 – Photoreaktion zwischen **BS2** und mit N-Ethylmaleimid. Vergleich der Absorptionsmessung des **BS2** (schwarz markiert) mit dem Photoprodukt (rot markiert).*

Nach vollendeter Reaktion wird auch hier eine Abnahme der Absorption bei 350 nm festgestellt, was auf eine erfolgreiche Reaktion unter Ausbildung des **BS2-MI** schließen lässt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann festgehalten werden, dass die Bissulfonderivatisierung eines PE keine Auswirkungen auf die hier durchgeführte Photoreaktion hat und sich somit für folgende photoinduzierte Biokonjugation eignet.

3.4.2.2 Kinetische Untersuchungen

Um den kinetischen Verlauf der Photoreaktion zu untersuchen wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Anhand einer Modelreaktion zwischen dem Photoenol (**2**) und dem *N*-Ethylmaleimid (**29a**) wurde sowohl der zeitliche Verlauf der Reaktion im NMR-Spektrum verfolgt als auch mittels Absorptionsmessungen die genaue Reaktionszeit bestimmt.

Die NMR-Untersuchungen wurden in einem, freundlicherweise von *Sarah Backfisch* zu Verfügung gestellten, Bestrahlungssetup durchgeführt. Dabei wird das Reaktionsgemisch in einem NMR-*Tube* bestrahlt und in bestimmten Intervallen NMR-Messungen durchgeführt.

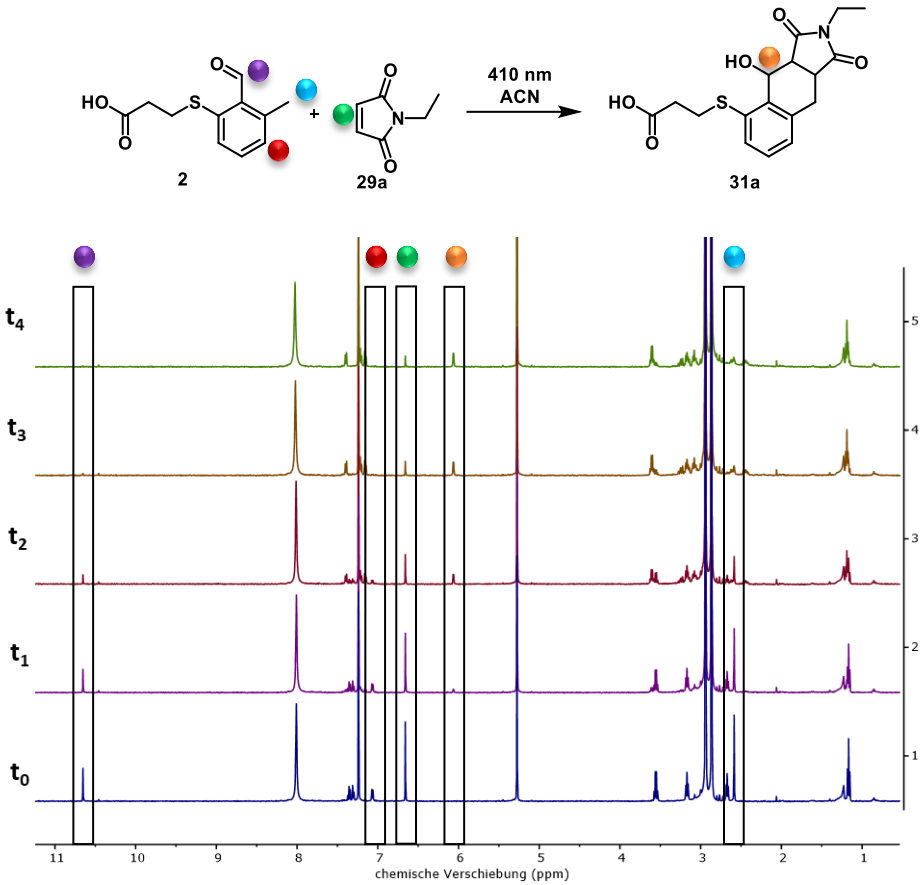


*Abbildung 59 – NMR-Messungen der Photoreaktion des Photoenols (**2**) mit N-Ethylmaleimid (**29a**). Bestrahlungszeit zum Zeitpunkt t_1=30 min, t_2=60 min, t_3=90 min, t_4=120 min. Als interner Standard wurde DMF verwendet.*

Die bei dieser Photoreaktion sich veränderten Resonanzen wurden farblich markiert und den entsprechenden Protonen zugeordnet. Im Verlauf der Reaktion (t_0=0 min bis t_4=120 min Bestrahlung bei 410 nm) sind verschwindende bzw. hinzukommende Signale deutlich zu erkennen. Bei der Reaktion wandelt sich z.B. das Aldehyd Proton (lila markiert) zu dem α-Proton der neuen Alkoholgruppe (orange markiert) um, was durch ein gegenläufiges Integral der jeweiligen Resonanzen bestätigt werden kann. Die Maleimiddoppelbindung und die

Methylgruppe des PE nehmen ebenfalls an der [4+2] Cycloaddition teil, weshalb ein Schrumpfen dieser Signale während der Reaktion zu erwarten war.

Diese Ergebnisse sind für das Verständnis des zeitlichen Verlaufs der Photoreaktion sehr interessant, liefern jedoch aufgrund des unterschiedlichen *Setups* keine Auskunft über die Reaktionszeiten dieser Cycloaddition in der hier entwickelten Bestrahlungsapparatur. Um die Kinetik dieses *Setups* zu untersuchen wurden daher mittels Absorptionsmessungen kinetische Studien durchgeführt. Hierzu wurden während der Bestrahlung an bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und die entsprechenden Absorptionsspektren bestimmt.

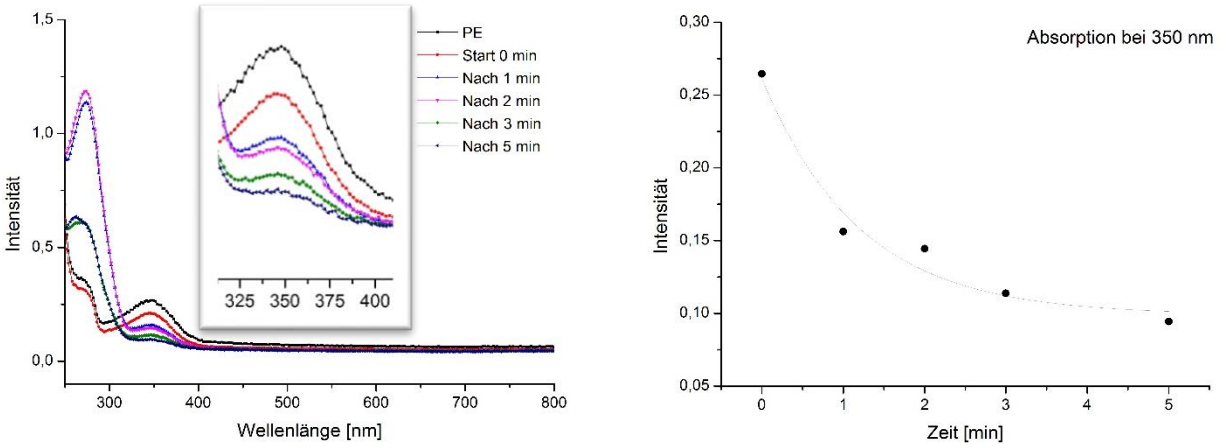


Abbildung 60 – (Links) Absorptionsmessungen zur kinetischen Untersuchung (0 bis 5 min) der Photoreaktion zwischen Photoenol (2) und N-Ethylmaleimid. (Rechts) Auftragung des zeitlichen Verlaufs der Intensitäten gegen die Zeit bei 350 nm.

Die Auftragung der Extinktionen bei 350 nm gegen die Zeit (rechte Abbildung) zeigt einen exponentiellen Abfall, der sich ab 5 min einem Grenzwert annähert. Unter Betrachtung der verschiedenen Absorptionsspektren im Verlauf der Photoreaktion wird deutlich, dass für Photoreaktion unter den verwendeten Bestrahlungsbedingungen zukünftig eine Bestrahlungszeit zwischen 5-10 min als ausreichend angesehen werden kann. Somit wird festgestellt, dass es sich bei dieser Photoreaktion um eine relativ schnelle Reaktion handelt, die sich für photoinduzierte Biokonjugation eignet.

3.4.2.3 Photoinduzierte Biokonjugation

Anhand des biokonjugierten Systems **ML3-RGDC** wird die photoinduzierte Konjugation genauer untersucht. Die folgenden Reaktionen wurden im wässrigen Medium durchgeführt. Aufgrund der schlechteren Löslichkeit einiger Maleimidkomponeten wurden diese in 10 µL ACN vorgelöst und der Reaktionslösung beigefügt. Das Reaktionsvolumen beträgt 200 µL, sodass eine optimale Bestrahlung ermöglicht wird. Als erste Maleimidkomponente wurde das *N*-Ethylmaleimid ausgewählt, da dieses sich bereits in der Literatur[74] als vielversprechender Reaktionspartner für das Photoenol erwiesen hat. Es reagiert unter Bestrahlung mit den angeregten Photoenol in einer Cycloaddition zu dem Photoprodukt (rot markiert).

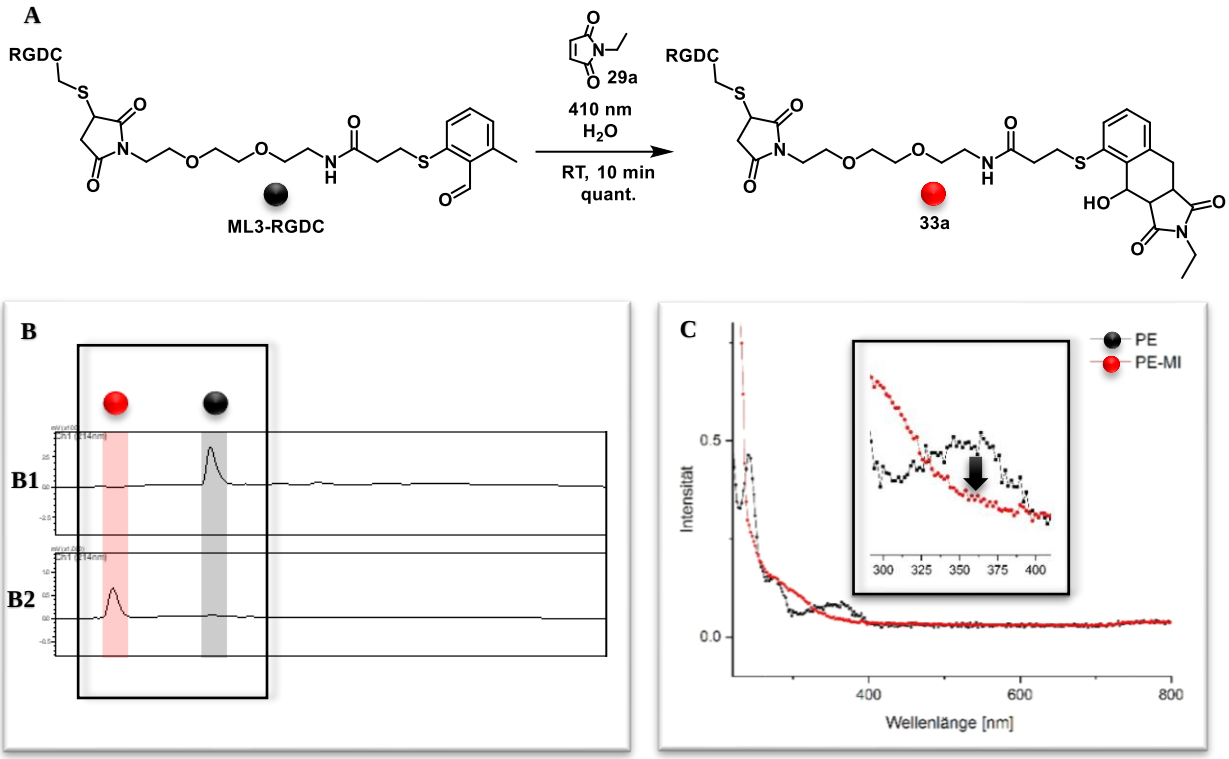


*Abbildung 61 – A: Photoreaktion zwischen **ML3-RGDC** und N-Ethylmaleimid. B: Ausschnitt der LC-MS Spektren (1-10 min) des ML3-RGDC (B1) und des Photoprodukts (B2). C: Absorptionsspektrum der Photoenolkomponente **ML3-RGDC** (schwarz) und des Photoprodukts (rot).*

Nach 10-minütiger Bestrahlung bei 410 nm wurde das Reaktionsgemisch mittels LC-MS (B2) und UV-Vis Messung untersucht. Dabei wird das Photoprodukt (**33a**) mit der entsprechenden Photoenolkomponente (**ML3-RGDC**) verglichen. Die LC-MS Messungen zeigen deutlich, dass nach der Bestrahlung (B2) das Signal des **ML3-RGDC** vollständig reagiert hat und das rot markierte Photoprodukt entstanden ist. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch das Verschwinden der charakteristischen Absorptionsbande des Photoenols bei 350 nm, wodurch eine erfolgreiche Reaktion bestätigt werden kann.

Um die Limitationen dieses Systems zu eruieren wurden weitere Maleimidderivate in dieser Photoreaktion eingesetzt und getestet. Zum einen wurde ein Maleimid-PEG (**MI(PEG)**, **29b**) Derivat (Abbildung 62) eingesetzt zum anderen wurde die Reaktion mit einem Maleimid-Fluorescein (**MI(Dye)**, **29c**) (Abbildung 63) untersucht.

Die photoinduzierte Biokonjugation zwischen **ML3-RGDC** und **MI(PEG)** wurde mittels LC-MS (B) und UV-Vis-Messungen (C) untersucht.

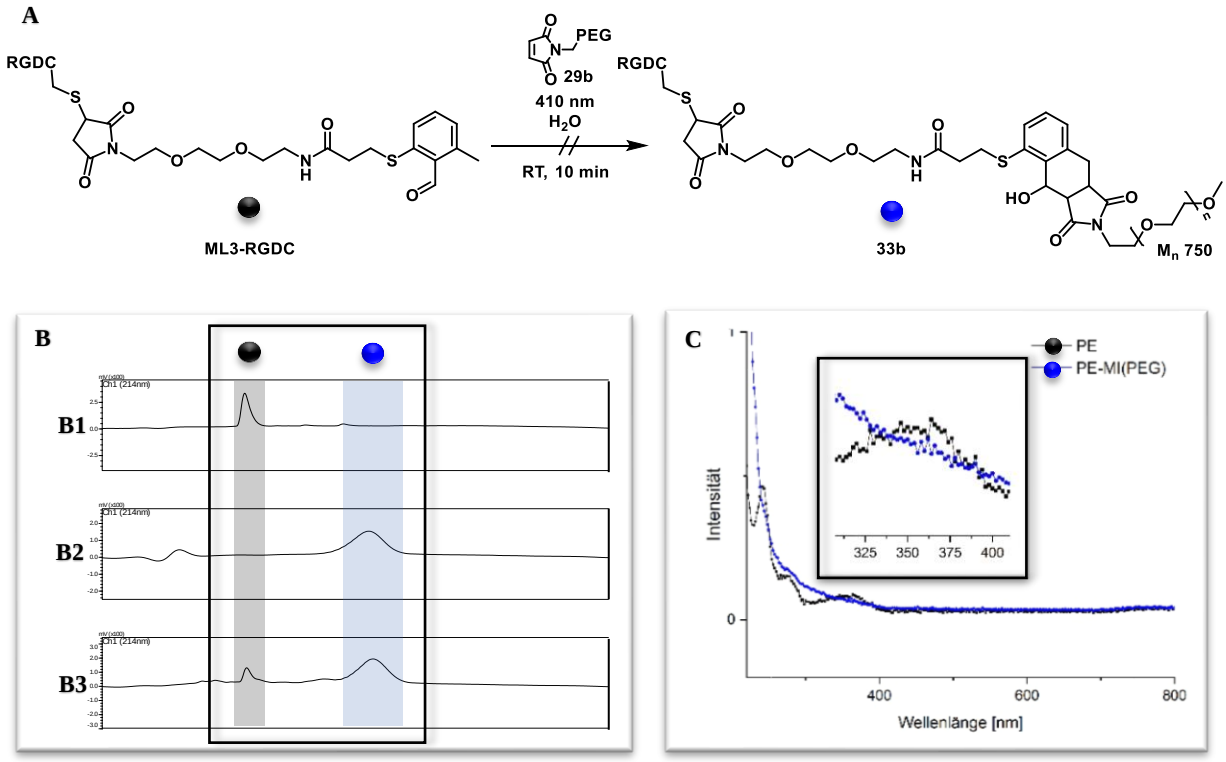


*Abbildung 62 – A: Photoreaktion zwischen ML3-RGDC und Maleimid-PEG. B: Ausschnitt der LC-MS Spektren (1-10 min) des **ML3-RGDC** (B1), des **MI-PEG**s (B2) und des Photoprodukts (B3). C: Absorptionsspektrum der Photoenolkomponente **ML3-RGDC** (schwarz) und des entsprechenden Photoprodukts (blau).*

Bei dem Vergleich der LC-MS Elugramme des Photoenolderivats (B1) und dem Maleimid-PEG (B2) mit dem resultierenden Photoprodukt (B3) fällt auf, dass im Reaktionsgemisch beide Edukte nebeneinander vorliegen und sich kein Produktsignal gebildet hat. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den Absorptionsmessungen wider, wo ebenfalls keine signifikante Verringerung der relevanten Absorptionsbande bei 350 nm beobachtet werden kann. Basierend auf diesen Untersuchungen kann festgehalten werden, dass die photoinduzierte Biokonjugation zwischen **ML3-RGDC** und **MI(PEG)** unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen nicht stattfindet. Da keine Zersetzung der Startmaterialien beobachtet wird (B3), könnte ein Grund für die fehlende Reaktion die zu geringe Bestrahlungsdauer von 10 min sein, die bei zukünftigen Optimierungsreaktionen genauer untersucht werden sollte.

Als letzte photoinduzierte Biokonjugation wurde die Reaktion zwischen **ML3-RGDC** und Maleimid-Fluorescein (**29b**) mittels LC-MS und UV-Vis Messungen untersucht.

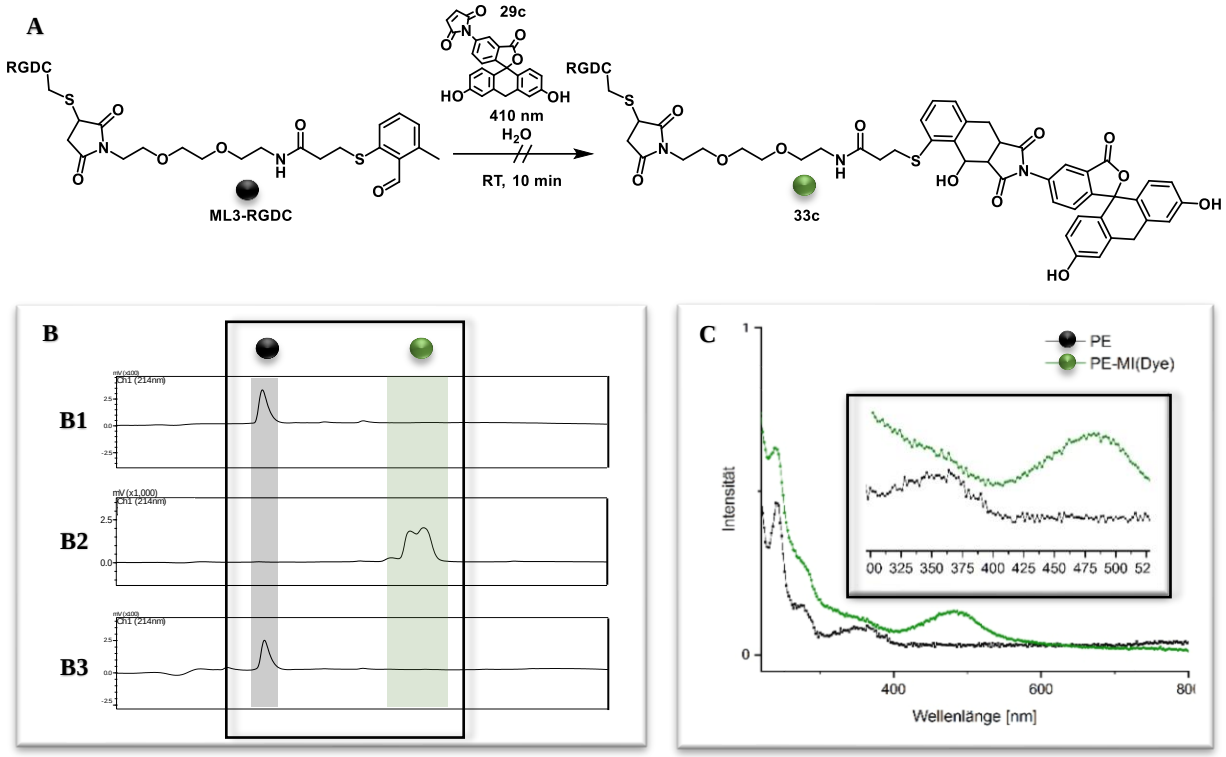


*Abbildung 63 - A: Photoreaktion zwischen **ML3-RGDC** und Maleimid-Fluorescein (**MI(Dye)**). B: Ausschnitt der LC-MS Spektren (1-10 min) des **ML3-RGDC** (B1), des **MI(Dye)** (B2) und des Photoprodukts (B3). C: Absorptionsspektrum der Photoenolkomponente **ML3-RGDC** (schwarz) und des entsprechenden Photoprodukts (grün).*

Basierend auf diesen Ergebnissen wird vermutet, dass die Photoreaktion ebenfalls kein Produkt hervorbrachte. Sowohl ein fehlendes LC-MS Signal (B3) als auch die Absorptionsbande (C-grün markiert) bei 350 nm lassen darauf schließen, dass die beschriebene Reaktion nicht funktioniert hat. Grund könnte hier ebenfalls die zu geringe Bestrahlungszeit aber auch die Wahl des Chromophors sein, weshalb diese zukünftig genauer untersucht werden sollten. Die Verwendung von Fluoreszenzmarkierungsmolekülen kann je nach Absorptionsspektrums des Farbstoffes störend für bestimmten Photoreaktionen sein, weshalb hier weitere Chromophore getestet werden sollten. Besonders die Wahl des Lösemittels ist ein relevanter Parameter und bedarf zukünftig weiterer Optimierung.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung neuer photoinduzierter bioorthogonaler Konjugationsmethoden, die mittels energiearmer, nicht zellschädlicher Strahlung aktiviert werden, bieten die Möglichkeit der örtlichen und zeitlichen Kontrolle der Reaktion und somit großes Potential für diverse biomedizinische Anwendungen. In dieser Arbeit konnte ein solches System, das basierend auf *ortho*-Methylbenzaldehyden (*o*-MBA) eine photoinduzierte Biokonjugation unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht ermöglicht, entwickelt und untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Linker bestehend aus der photoreaktiven Gruppe *o*-MBA, dem Abstandshalter und der biokonjugierbaren Gruppe designt und deren Synthesen getestet und optimiert. Per Biokonjugation konnten die Linker mit zwei Modelpeptiden ligiert und erhaltene Biokonjugate mittels Photoreaktion mit verscheidenen Maleimidderivaten funktionalisiert werden. Zur Darstellung der Linkerssysteme wurden jeweils drei unterschiedliche Strukturen (1-3) designt (siehe Abbildung 64) und passende Syntheserouten entwickelt.

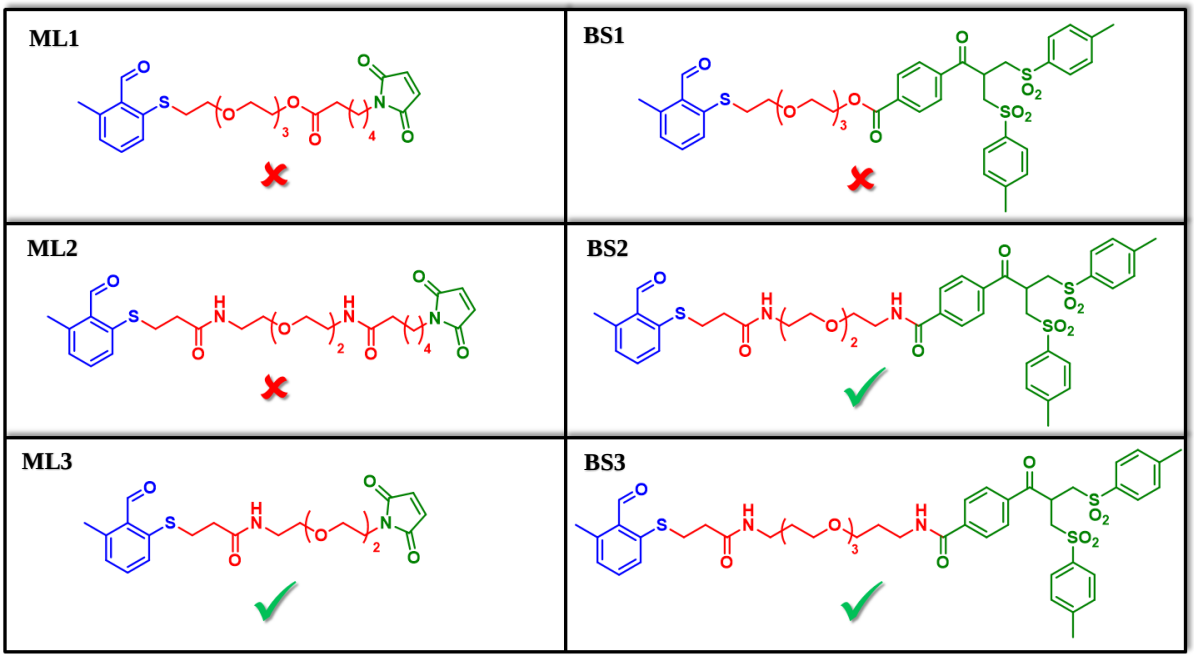


Abbildung 64 – Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Linkerstrukturen. Links sind die Maleimid - Linker 1-3 und rechts die Bissulfon - Linker 1-3 aufgeführt. In blau ist die photoreaktive Gruppe und in grün die biokonjugierbare Gruppe markiert. Die unterschiedlichen Verlinkungsmöglichkeiten sind rot markiert.

Bei der Synthese der unterschiedlichen Maleimid - Linker traten einige Schwierigkeiten auf, wobei nach Optimierungen **ML3** erfolgreich über eine dreistufige Syntheseroute mit guten Ausbeuten synthetisiert und mittels LC-MS und NMR charakterisiert werden konnte. Die Bissulfon - Linker 2 und 3 konnten ebenfalls erfolgreich synthetisiert und mithilfe von LC-MS und NMR charakterisiert werden.

Für die folgende Biokonjugation an die Modelpeptide RGDC und Somatostatin verfügen die Linker über einsprechende Funktionalitäten, um selektiv an die jeweiligen Biomoleküle zu binden. Sowohl die Biokonjugation des **ML3** an RGDC als auch die Darstellung des **BS3-SST** wurde erfolgreich durchgeführt und die Konjugationsprodukte mittels MALDI-ToF charakterisiert. Lediglich die Aufreinigung des **BS3-SST** steht aufgrund von Löslichkeitsproblemen noch aus. Anschließend wurde für die folgende Photoreaktion eine passende Bestrahlungsapparatur entwickelt, die kinetischen Eigenschaften der Reaktion mittels NMR und Absorptionsmessungen untersucht und Reaktionsparameter wie Lösemittel, Konzentration und Bestrahlungswellenlänge getestet und optimiert. Dabei ist die Photoreaktion zwischen *o*-MBA und Maleimidderivaten unter der eingestellten Bestrahlungsintensität bereits nach fünf Minuten beendet, wobei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Diels-Alder Reaktion ist. Die Anregung des Photoenols vom π in den π^* Zustand mit nachfolgender Wasserstoffabstraktion läuft verhältnismäßig schnell ab. Abschließend konnte das Biokonjugationsprodukt **ML3-RGDC** in Photoreaktionen mit verschiedenen Maleimidderivaten untersucht werden und erbrachte ein photoinduziertes Biokonjugationsprodukt, das mittels Absorptionsmessung und LC-MS charakterisiert wurde.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Entwicklung und Synthese neuer potenzieller biokompatibler Linker beschrieben werden, die anschließend an Modelpeptide konjugiert wurden und in Photoreaktionen bei sichtbarem Licht mit verschiedenen Maleimidderivaten reagierten (siehe Abbildung 65).

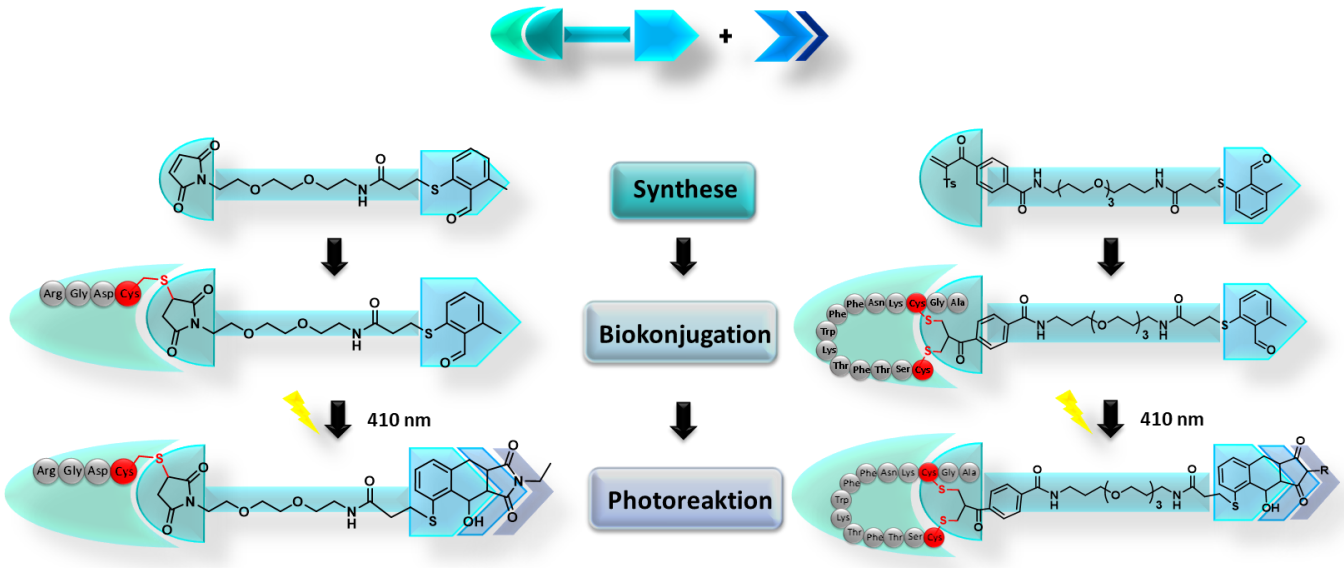


Abbildung 65 – Schematische Darstellung der in dieser Arbeit erfolgreich synthetisierten Linker, der entsprechenden Biokonjugation mit Modelpeptiden und der abschließenden Photoreaktion.

Für eine Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit sind noch einige weitere Experimente notwendig. Die Optimierung der Synthese des **BS3** sowie die Aufreinigung des **BS3-SST** Konjugats mit anschließender Photoreaktion sollten hierzu durchgeführt werden. Zusätzlich wäre es interessant, dieses System auf komplexere biologische Substanzen zu erweitern. Dabei eignen sich z.B. die Biokonjugation von Antikörpern oder Fab-Fragmenten an den Bissulfon - Linker und anschließender Photoreaktion mit verschiedenen Maleimidderivaten sowie die gelelektrophoretische Untersuchung der Konjugate. Untersuchungen bezüglich der Bioorthognalität der verwendeten Photoreaktion stehen ebenfalls noch aus. Sowohl die Reaktivität von endogenen Nucleophilen gegenüber Maleimiden als auch die für die Photoreaktion benötigte sauerstofffreie Umgebung könnte in Hinblick auf zukünftige biologische Anwendungen eine Herausforderung darstellen.

5 Experimentalteil

5.1 Materialien und Instrumente

5.1.1 Lösemittel und Chemikalien

Sofern nicht anderes beschrieben sind die verwendeten Chemikalien und Lösemittel kommerziell erworben und wurden unter inerter Atmosphäre gehandhabt. Als Schutzgas wurde Argon der Firma Linde verwendet

5.1.2 Dünnschichtchromatographie

Als Reaktionskontrolle und zur Überprüfung der Reinheit der Substanzen wurde die Dünnschichtschromatographie durchgeführt. Hierzu wurden Aluminiumfolien beschichtet mit Kiselgel (ALUGRAM SIL/GUV_{254}) der Firma Machery-Nagel verwendet. Untersucht wurden die Verbindungen mittels UV-Detektion bei 254 nm bzw. 366 nm.

5.1.3 Säulenchromatographie

Die hergestellten Substanzen wurden säulenchromatisch aufgereinigt. Das hierbei verwendete Kieselgel 60 besitzt einen Korndurchmesser von 0,063-0,200 mm und wurde von der Firma Machery-Nagel bezogen. Als Eluent wurden technische oder analysereine Lösemittel verwendet, die je nach Substanz in unterschiedlichen Mischverhältnissen (v:v) eingesetzt wurden.

5.1.4 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

5.1.4.1 Probenvorbereitung

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Gemisch aus ACN/Milli-Q-Wasser mit einer Konzentration von 0,5-3,0 mg/mL gelöst und mit einem Gradienten aus ACN/Milli-Q-Wasser mit jeweils 0,1% TFA aufgereinigt. Es wurden je nach Substanzmenge zwei verschiedene Geräte verwendet:

5.1.4.2 Semipräparative HPLC

Das Gerät der Semipräparativen HPLC der Firma Shimadzu besteht aus unterschiedlichen Einheiten: DGU-$20A_{5R}$, LC-20AP (2x), CBM-20A, SPD-M20A, SIL-10AP und FRC-10A. Als Säule wurde die Agilent Eclipse XDB-C16 verwendet. Die Porengröße beträgt 5 µm.

5.1.4.3 Präparative HPLC

Das Gerät der Präparativen HPLC der Firma Shimadzu besteht aus unterschiedlichen Einheiten: DGU-$20A_{5R}$, LC-20AT, CBM-20A, CTO-20AC, SPD-M20A, SIL-10AP und FRC-10A. Als Säule wurde die Atlantis T3 ODB mit einer Porengröße von 5 µm verwendet.

5.1.5 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren (^{1}H-, ^{13}C-NMR, COSY, HMBC, HSQC) wurden mit dem Spektrometer Avance 300 und Avance 250 der Firma Bruker aufgenommen. Zur Messung wurden deuterierte Lösemittel (CD_2Cl_2, $CDCl_3$ und MeOD) verwendet. Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben. Die gemessenen NMR-Spektren wurden mithilfe des Programms MestReNova-12.0.0 ausgewertet und bearbeitet.

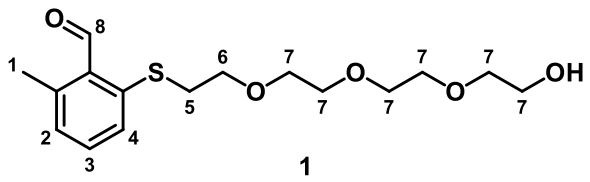
5.1.6 Massenspektroskopie

Zur massenspektroskopischen Untersuchung der Substanzen wurden verschiedene Geräte verwendet. Die LC-MS Messungen wurden an dem Gerät Shimadzu LCMS-2020 single Quadrupole MS durchgeführt. Die hier verwendete Säule ist die Kinetex 2,6 EVO C18. Die MALDI-ToF Messungen wurden an dem Gerät Bruker rapifleX durchgeführt. Als Matrix wurde α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure eingesetzt und als Lösemittel ACN/Milli-Q-Wasser mit jeweils 0,1% TFA verwendet.

5.2 Synthese

5.2.1 Synthese des Maleimid - Linkers

5.2.1.1 2-((2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)thio)-6-methylbenzaldehyd[74]



2-Flour-6-methylbenzaldehyd (200 mg, 1,45 mmol, 1,00 eq) wurde in einem trockenen Schlenkkolben in wasserfreiem DMF (5, mL) unter Argon Atmosphäre vorgelegt. Kaliumcarbonat (300 mg, 2,18 mmol, 1,50 eq) und 2-(2-(2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy)-ethoxy)ethan-1-ol (320 mg, 1,52 mmol, 1,05 eq) wurden zugegeben und anschließend auf 85 °C erhitzt. Nach 12 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die gelbe Lösung wurde in EA gelöst, mit Wasser (20 mL) und Natriumchlorid Lösung (20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das saubere Produkt wurde nach säulenchromatorischen Aufreinigung (DCM:MeOH 7%) als gelbes Öl erhalten.

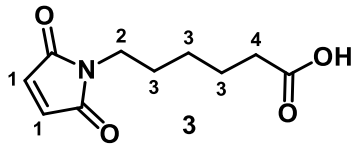
Ausbeute: 378 mg, 1,15 mmol, 79%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 10.69 (s, 1H, 8-H), 7.36 (d, J = 5.1 Hz, 2H, 3/4-H), 7.08 (d, J = 4.0 Hz, 1H, 2-H), 3.78 – 3.60 (m, 14H, 5/7-H), 3.14 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 6-H), 2.60 (s, 3H, 1-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 192.72, 132.91, 129.34, 127.23, 72.48, 70.68, 70.35, 69.37, 61.76, 33.48, 20.62.

LC-MS: *m/z* 351,15 $[M+Na]^+$ (berechnet: 328,42).

5.2.1.2 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexansäure[79]



Maleinanhydrid (165 mg, 1,68 mmol, 1,5 eq) wurde zu einer Lösung aus Aminohexansäure (147 mg, 1,12 mmol, 1,0 eq) und Essigsäure (10 mL) gegeben. Anschließend wurde das Gemisch auf 120 °C 6 Stunden unter Reflux gekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde Wasser (30 mL) zugegeben und mit EA (3 x 20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumchlorid (30 mL) gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und ergab das saubere Produkt als weißen Feststoff.

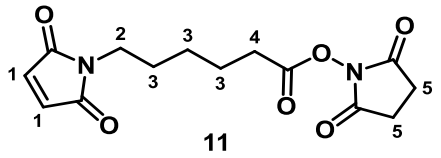
Ausbeute: 129 mg, 0,61 mmol, 55%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 6.69 (s, 2H, 1-H), 3.52 (t, J = 7.2 Hz, 2H, 4-H), 2.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 2-H), 1.64 (dt, J = 14.9, 7.6 Hz, 5H, 3-H), 1.34 (p, J = 10.1, 9.3 Hz, 3H, 3-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 170.81, 169.10, 168.36, 134.06, 37.45, 30.77, 28.03, 25.82, 25.58, 24.06.

ASAP-MS: *m/z* 212,10 $[M+H]^+$ (berechnet: 211,22).

5.2.1.3 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoat[80]



Maleinanhydrid (91 mg, 0,91 mmol, 1,0 eq) und Aminohexansäure (121 mg, 0,92 mmol, 1,0 eq) wurden in trockenen DMF (5 mL) gelöst. Anschließend wurden *N*-Hydroxysuccinimid (132 mg, 1,15 mmol, 1,0 eq) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochlorid (353 mg, 1,84 mmol, 2,0 eq) langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit DCM (20 mL) und Wasser (20 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (2 x 20 mL) und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung (10 mL) und Natriumchlorid Lösung (10 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und ergaben das saubere Produkt als weißes Pulver.

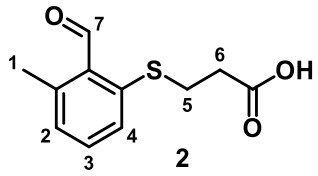
Ausbeute: 217 mg, 71 mmol, 77%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 6.68 (s, 2H, 1-H), 3.53 (t, J = 7.1 Hz, 2H, 2-H), 2.83 (s, 4H, 5-H), 2.60 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 4-H), 1.84 – 1.71 (m, 2H, 3-H), 1.64 (d, J = 4.4 Hz, 4H, 3-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 170.82, 169.27, 168.38, 162.60, 37.36, 36.49, 31.39, 30.69, 27.96, 25.73, 25.55, 24.00.

ASAP-MS: *m/z* 309,22 $[M+H]^+$ (berechnet: 308,29).

5.2.1.4 3-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)propansäure[74]



2-Flour-6-methylbenzaldehyd (500 mg, 3,62 mmol, 1,0 eq) und 3-Mercaptopropionsäure (461 mg, 4,34 mmol, 1,2 eq) wurden in trockenen DMF vorgelegt und mit Kaliumcarbonat (1251 mg, 9, 05 mmol, 2,5 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 85 °C erhitzt und 12 Stunden gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 50 mL EA zugegeben und die organische Phase mit 1 N HCl (20 mL), Natriumchlorid Lösung (2 x 20 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach säulenchromatischer Aufreinigung mit EA:CH:AcOH (1:1:0,5%) als Laufmittel wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten.

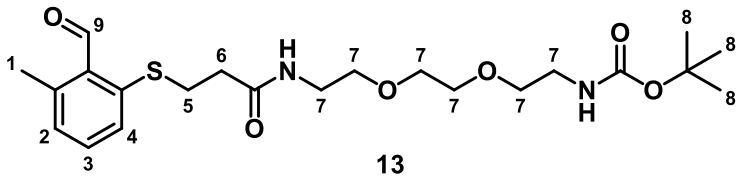
Ausbeute: 659 mg, 2,94 mmol, 82%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 10.67 (s, 1H, 1-H), 7.42 – 7.29 (m, 2H, 3/4-H), 7.10 (d, J = 7.4 Hz, 1H, 2-H), 3.18 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 5-H), 2.72 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 6-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 192.64, 177.19, 142.37, 140.79, 133.09, 132.86, 129.61, 127.17, 33.44, 28.59, 20.54.

LC-MS: *m/z* 225,00 $[M+H]^+$ (berechnet: 224,27).

5.2.1.5 tert-butyl-(2-(2-(2-(3-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)propanamido)ethoxy)-ethoxy)ethyl)carbamat[75]



13

3-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)propanoic acid (137 mg, 0,61 mmol, 1,0 eq) wurde in trockenen DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde EDC-HCl (140 mg, 0,73 mmol, 1,2 eq), DIPEA (94 mg, 0,73 mmol, 1,2 eq) und DMAP (9 mg, 0,07 mmol, 0,12 eq) zugegeben und die Reaktion für 20 min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von tert-butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamat (181,3 mg, 0,73 mmol, 1,2 eq) wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 1 N HCl (20 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung (20 mL) und Natriumchlorid Lösung (20 mL) gewaschen und anschließend das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Nach säulenchromatischer Aufreinigung (DCM+2% MeOH) wurde das Produkt als gelbes Öl erhalten.

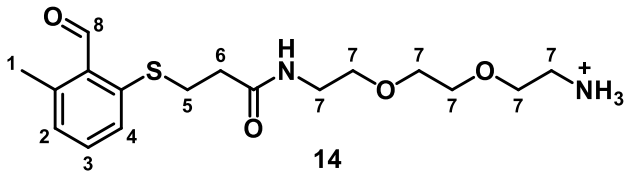
Ausbeute: 166 mg, 0,37 mmol, 60%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 10.64 (s, 1H, 9-H), 7.44 – 7.31 (m, 2H, 3/4-H), 7.13 – 7.01 (m, 1H, 2-H), 3.68 – 3.49 (m, 16H, 7-H), 3.22 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 5-H), 2.59 (s, 3H, 1-H), 2.52 (s, 2H, 6-H), 1.42 (s, 9H, 8-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 192.55, 133.14, 129.27, 126.85, 70.36, 63.27, 51.56, 40.43, 39.49, 28.52, 23.13, 20.66, 18.83.

LC-MS: *m/z* 477,25 $[M+Na]^+$ (berechnet: 454,58).

5.2.1.6 2-(2-(2-(3-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)propanamido)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ammonium



Unter Argon Atmosphäre wurde tert-butyl (2-(2-(2-(3-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)-propanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (66 mg, 0,13 mmol, 1,0 eq) in trockenem DCM vorgelegt. Die Lösung wurde mithilfe eines Eisbades auf 0 °C gekühlt, mit TFA (300 mg, 2,6 mmol, 20,0 eq) versetzt und für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter Vakuum bei 20 °C eingeengt und ergab das Produkt als orangenes Öl.

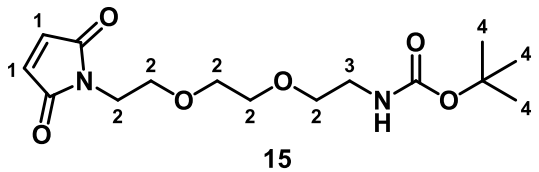
Ausbeute: 61,1 mg, 0,13 mmol, quant.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 10.41 (s, 1H, 8-H), 7.35 (d, J = 7.7 Hz, 2H, 3/4-H), 7.01 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 2-H), 3.80 – 3.52 (m, 16H, 7-H), 3.19 (t, J = 6.2 Hz, 2H, 5-H), 2.65 (d, J = 6.4 Hz, 2H, 6-H), 2.57 (s, 3H, 1-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 192.58, 133.15, 129.18, 126.85, 70.30, 63.27, 51.46, 40.43, 23.19, 20.66.

LC-MS: *m/z* 355,15 $[M+H]^+$ (berechnet: 354,47).

5.2.1.7 tert-butyl(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl) carbamat[81]



15

tert-Butyl (2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamat (300 mg, 1,2 mmol, 1,0 Äq) wurden in gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung (10 mL) gelöst und für 15 min bei 0 °C gekühlt. Anschließend wurde *N*-Methoxycarbonylmaleimid (244 mg, 1,6 mmol, 1,3 Äq) zugegeben, das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und für 45 Minuten gerührt. Das Gemisch wurde mit destilliertem Wasser (10 mL) versetzt und mit $CHCl_3$ (3 x 20 mL) extrahiert. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und ergab das saubere Produkt als gelbes Öl.

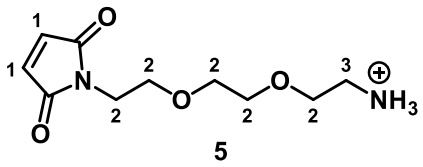
Ausbeute: 384,5 mg, 1,17 mmol, 98%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 6.70 (s, 2H, 1-H), 3.73 (t, J = 5.9 Hz, 2H, 2-H), 3.69 – 3.52 (m, 6H, 2-H), 3.49 (s, 2H, 2-H), 3.28(m, 2H, 3-H) 1.43 (s, 9H, 4-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 170.67, 162.34, 156.00, 134.16, 118.16, 70.26, 69.90, 67.82, 37.04, 28.42.

LC-MS: *m/z* 329,10 $[M+H]^+$ (berechnet: 328,37).

5.2.1.8 2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ammonium[81]



tert-Butyl(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (362 mg, 1,1 mmol, 1,0 Äq) wurde in DCM (3 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von TFA (3 mL) wurde die Lösung für 20 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und für eine weitere Stunde gerührt. Das Produkt wurde nach Entfernung der Lösemittel unter Vakuum als gelbes Öl erhalten.

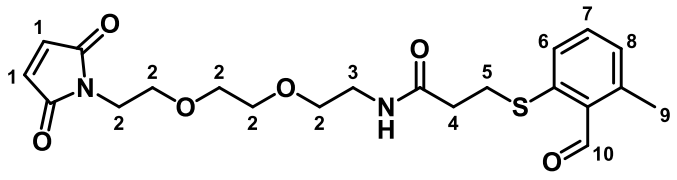
Ausbeute: 377 mg, 1,1 mmol, quant.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 6.74 (s, 2H, 1-H), 3.69 (dt, J = 30.3, 7.0 Hz, 10H, 2-H), 3.30 (q, J = 5.4 Hz, 2H, 3-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 171.51, 134.49, 70.16, 69.96, 69.01, 66.25, 51.66, 40.33, 37.59.

LC-MS: *m/z* 230,10 $[M+H]^+$ (berechnet: 229,26).

5.2.1.9 N-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)propanamide



ML3

In einem Schleckkolben wurden 2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy) ethan-1-ammonium (5 mg, 15 µmol, 1,0 Äq), das Photoenol **2** (4 mg, 18 µmol, 1,2 Äq) und HBTU (11 mg, 30 µmol, 2,0 Äq) unter Argon Atmosphäre in trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde die DIPEA (10 µL, 60 µmol, 4,0 Äq) langsam zugegeben. Nach 12 Stunden rühren bei RT ist die Reaktion beendet und das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und ergab den sauberen Linker als orangenes Öl.

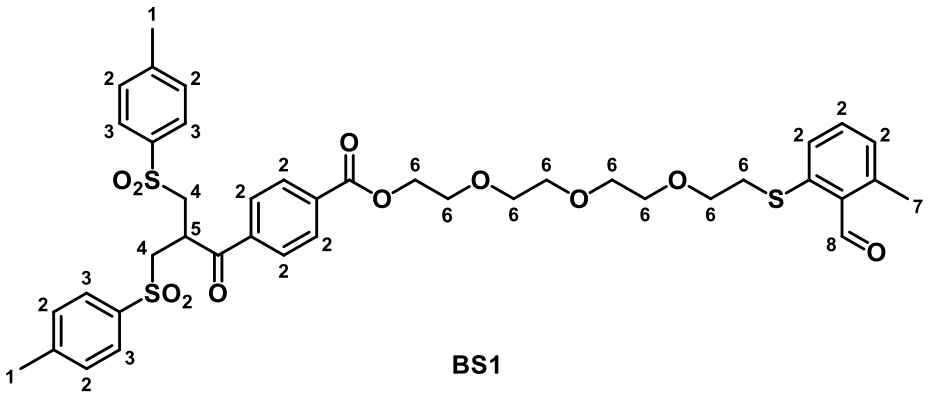
Ausbeute: 4,3 mg, 10 µmol, 66%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 10.67 (s, 1H, 10-H), 7.38 (d, J = 6.6 Hz, 2H, 6,7-H), 7.08 (d, J = 6.6 Hz, 1H, 8-H), 6.72 (s, 2H, 1-H), 6.52 (s, 1H), 3.99 – 3.85 (m, 2H), 3.81 – 3.41 (m, 13H, 2,3-H), 3.33 – 3.21 (m, 2H, 4-H), 2.72 – 2.53 (m, 5H, 5,9-H).

LC-MS: *m/z* 435,20 $[M+H]^+$ (berechnet: 434,15).

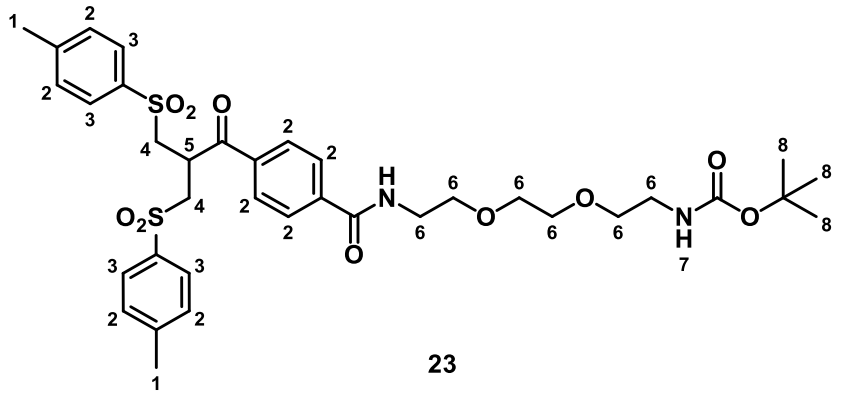
5.2.2 Synthese des Bissulfon - Linkers

5.2.2.1 2-(2-(2-(2-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl)benzoat[75]



Unter Argon Atmosphäre wurde das Bissulfon **17** (12,7 mg, 0,025 mmol, 1,0 Äq) in 1 mL trockenen DCM gelöst und mit EDC (5,8 mg, 0,030 mmol, 1,2 Äq), DMAP (0,4 mg, 0,003 mmol, 0,1 Äq) und PE-OH (10,0 mg, 0,030 mmol, 1,2 Äq) versetzt. Die Lösung wurde für 1 h auf 0 °C gekühlt und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingeengt und eine LC-MS der Mischung gemessen. Nebenprodukt und Produkt lagen zu nah beieinander, sodass keine Aufreinigung sowie Charakterisierung der Probe möglich waren.

5.2.2.2 tert-butyl(2-(2-(2-(4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl)benzamido)ethoxy) ethoxy)ethyl)carbamat



23

Unter Argon Atmosphäre wurde das Bissulfon **17** (200 mg, 0,4 mmol, 1,0 Äq) in 3 mL trockenen DMF gelöst und anschließend mit HBTU (243 mg, 0,64 mmol, 1,6 Äq) und DIPEA (103 mg, 0,8 mmol, 2,0 Äq) versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und für 10 min gerührt, bevor Boc-ethylenglycol (119 mg, 0,48 mmol, 1,2 Äq) zugegeben wurde. Die resultierende Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und das Produkt in DCM 10 mL gelöst. Die organische Phase wurde mit 10 mL gesättigter $NaHCO_3$, 10 mL gesättigter Natriumchlroid Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und das saubere Produkt wurde nach säulenchromatischer Aufreinigung ($CHCl_3$ + 5% MeOH) als gelbes Öl erhalten.

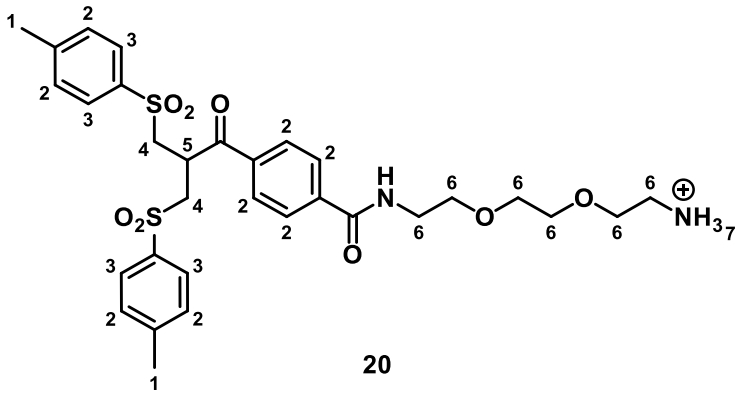
Ausbeute: 198 mg, 0,27 mmol, 67 %.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 7.88 – 7.56 (m, 8H, 2-H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 4H, 3-H), 4.33 (s, 1H, 5-H), 3.76 – 3.39 (m, 16H, 6-H, 4-H), 3.28 (d, J = 6.8 Hz, 1H, 7-H), 2.79 (s, 9H, 8-H), 2.47 (s, 6H, 1-H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 130.32, 128.44, 38.73, 36.60, 31.55, 28.52, 21.86.

LC-MS: *m/z* 753,25 $[M+Na]^+$ (berechnet: 730,89).

5.2.2.3 2-(2-(2-(4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ammonium



20

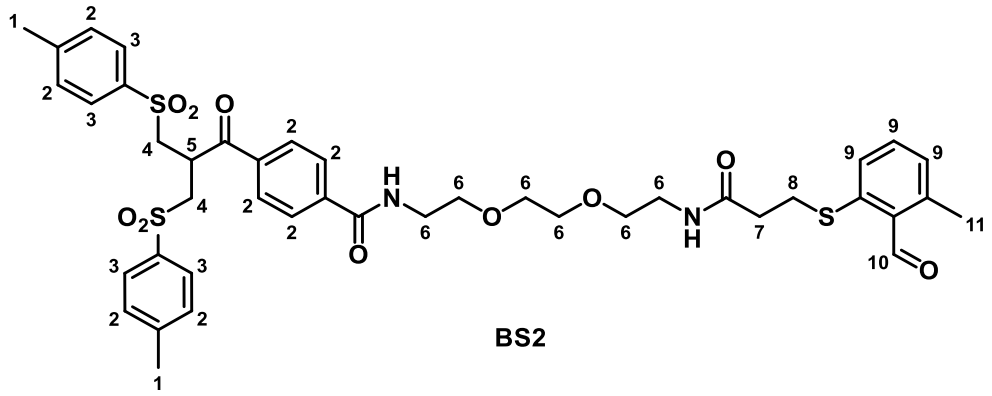
Unter Argon Atmosphäre wurde *tert*-butyl (2-(2-(2-(4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl) benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamat **23** (148 mg, 0,2 mmol, 1,0 eq) in trockenem DCM vorgelegt. Die Lösung wurde mithilfe eines Eisbades auf 0 °C gekühlt, mit TFA (462 mg, 4,0 mmol, 20,0 eq) versetzt und für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter Vakuum bei 20 °C eingeengt und ergab das Produkt als gelbes Öl.

Ausbeute: 149 mg, 0,2 mmol, quant.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 8H, 2-H), 7.36 (dd, J = 8.1, 3.7 Hz, 4H, 3-H), 4.34 (s, 1H, 5-H), 3.66 (td, J = 13.0, 7.6 Hz, 16H, 4-H, 6-H), 2.89 (s, 6H, 1-H).

ASAP-MS: *m/z* 631,10 $[M+H]^+$ (berechnet: 630,77).

5.2.2.4 N-(2-(2-(2-(3-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)propanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl)benzamid



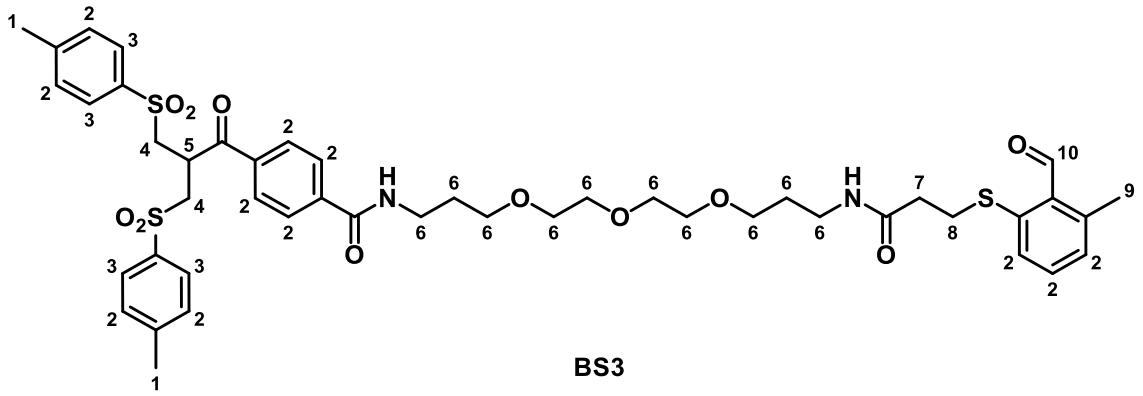
Das Photoenol **2** (37 mg, 0,17 mmol, 1,0 Äq) wurde in 2 mL trockenen DMF gelöst. Dann wurde HBTU (101 mg, 0,27 mmol, 1,6 Äq) und DIPEA (43 mg, 0,33 mmol, 2,0 Äq) unter Argon Atmosphäre der Lösung beigefügt und für 10 min gerührt. Anschließend wurde das Bissulfon **20** (148 mg, 0,20 mmol, 1,2 Äq) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 12 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit 10 mL gesättigter $NaHCO_3$, 10 mL gesättigter Natriumchlroid Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und das saubere Produkt wurde nach säulenchromatischer Aufreinigung ($CHCl_3$ + 5% MeOH) als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 21 mg, 0,03 mmol, 15%.

^{1}H NMR: (300 MHz, CD_2Cl_2) δ / ppm = 10.50 (s, 1H, 10-H), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 3H), 7.65 – 7.53 (m, 8H, 2-H), 7.29 (d, J = 7.9 Hz, 4H, 3-H), 7.26 – 7.18 (m, 2H, 9-H), 7.00 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 9-H), 4.30 – 4.18 (m, 1H, 5-H), 3.64 – 3.48 (m, 14H, 4-H, 6-H), 3.42 (dd, J = 10.0, 5.5 Hz, 2H, 4-H), 3.09 (d, J = 7.1 Hz, 2H, 8-H), 2.45 (d, J = 7.2 Hz, 2H, 7-H), 2.39 (s, 6H, 1-H).

LC-MS: *m/z* 838,30 $[M+H]^+$ (berechnet: 837,03).

5.2.2.5 N-(17-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaheptadecyl)-4-(3-tosyl-2-(tosylmethyl)propanoyl)benzamid



Der Bissulfonbaustein **21** (5 mg, 6 µmol, 1,0 Äq), das Photoenol **2** (2 mg, 7 µmol, 1,2 Äq) und HBTU (5 mg, 12 µmol, 2,0 Äq) wurden unter Argonatmosphäre in trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde DIPEA (3 mg, 24 µmol, 4,0 Äq) langsam zugetropft und die Reaktion für 12 Stunden bei RT gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt, das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC aufgereinigt und ergab das Produkt als gelbes Öl.

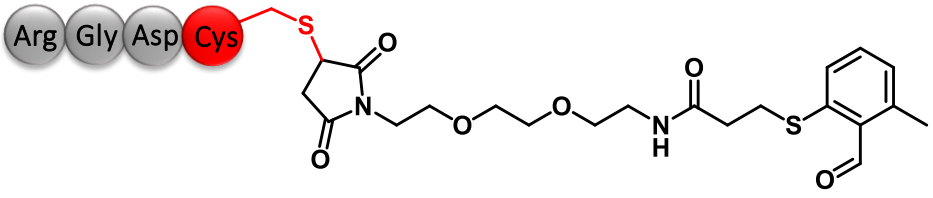
Ausbeute: 2 mg, 2 µmol, 30%.

^{1}H NMR: (300 MHz, $CDCl_3$) δ / ppm = 10.53 (s, 1H, 10-H), 7.76 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2,3-H), 7.67 – 7.54 (m, 7H, 2,3-H), 7.36 – 7.23 (m, 7H, 2,3-H), 6.98 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 2-H), 6.63 – 6.58 (m, 1H), 4.38 – 4.26 (m, 1H, 5-H), 3.65 – 3.37 (m, 22H, 6-H), 3.23 (d, J = 6.1 Hz, 2H, 6-H), 3.11 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 7-H), 2.52 (s, 3H, 9-H), 2.49 – 2.36 (m, 8H, 1,8-H), 1.91 – 1.81 (m, 2H, 6-H), 1.69 – 1.59 (m, 2H, 6-H).

LC-MS: *m/z* 909,40 $[M+H]^+$ (berechnet: 908,30).

5.2.3 Biokonjugations Reaktionen

5.2.3.1 Maleimid - Linker 3 - RGDC[75]



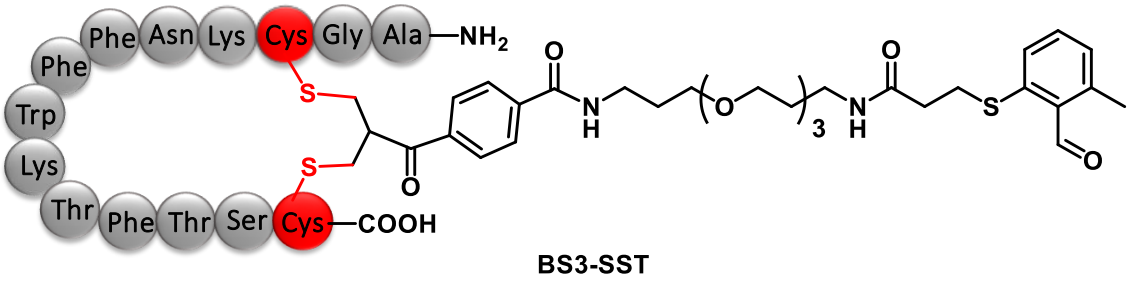
ML3-RGDC

Der Linker ML3 (4,5 mg, 0,01 mmol, 1,5 Äq) wurde in 2 mL ACN gelöst und mit RGDC (3,1 mg, 0,007 mmol, 1,0 Äq) gelöst in 8 mL 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7,4 vereinigt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Lichtausschluss über Nacht rühren gelassen. Anschließend wurde das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt und ergab das saubere Biokonjugationsprodukt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 3,5 mg, 0,004 mmol, 58%.

MALDI-ToF: *m/z* 884,99 $[M+H]^+$ (berechnet: 883,99).

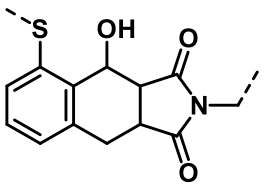
5.2.3.2 Bisssulfon Linker 3 - Somatostatin[6]



Somatostatin (1,5 mg, 0,8 µmol, 1,0 Äq) wurde in 1 mL 50 mM Phosphatpuffer pH 7,8 gelöst und mit TCEP (0,5 mg, 0,8 µmol, 2,0 Äq) versetzt.und für 30 min bei RT vorsichtig gerührt. Der Bissulfon - Linker 3 (1,0 mg, 1,3 µmol, 1,5 Äq) wurde in 500 µL ACN gelöst und dem Gemisch langsam zugegeben. Die Reaktion wurde für 12 h gerührt und anschließend mittels analytischer HPLC aufgereinigt. Dies erwies sich aufgrund von Löslichkeitsproblemen als schwierig und muss wiederholt werden.

MALDI-ToF: *m/z* 2237,85 $[M+H]^+$ (berechnet: 2236,41).

5.2.4 Photoreaktionen[74]



30-33

Alle Photoreaktionen wurden sofern nicht anderes beschrieben in 0,2 mL MilliQ H_2O mit 5% ACN durchgeführt und einer Konzentration von 0,1 mM. Dabei wurde die Maleimidkomponente jeweils mit 1,05 Äq eingesetzt und die Photoenolkomponente mit 1,00 Äq. Das Reaktionsgemisch wurde mit 410 nm für 10 min bestrahlt und mittels LC-MS und UV-Vis Messungen untersuch (vgl.3.4.2).

Tabelle 4 – Reaktionsparameter der Photoreaktion zwischen o-MBA und Maleimidderivaten

Parameter	Bedingung
Lösemittel	MilliQ H_2O mit min. 5%ACN
Konzentration	0,12 - 0,24 mM
Reaktionsvolumen	200 -210 µL
Bestrahlungswellenlänge	410 nm

6 Literaturverzeichnis

[1] M. B. Francis, I. S. Carrico, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 771–773.

[2] Q. Y. Hu, F. Berti, R. Adamo, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1691–1719.

[3] G. T. Hermanson, *Introduction to Bioconjugation*, **2013**.

[4] C. R. Bagshaw, D. Cherny, *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34*, 979–982.

[5] D. W. P. M. Löwik, I. O. Shklyarevskiy, L. Ruizendaal, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, J. C. M. Van Hest, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1191–1195.

[6] X. Chen, K. Muthoosamy, A. Pfisterer, B. Neumann, T. Weil, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 500–508.

[7] C. Remzi Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 4900–4908.

[8] S. S. Van Berkel, M. B. Van Eldijk, J. C. M. Van Hest, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806–8827.

[9] M. Gregoritza, F. P. Brandl, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 438–453.

[10] J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. - An Asian J.* **2009**, *4*, 630–640.

[11] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074.

[12] S. Walsh, S. Omarjee, W. Galloway, T. Kwan, H. Sore, J. Parker, M. Hyvönen, J. S. Carroll, D. R. Spring, *Chem. Sci.* **2019**, 694–700.

[13] M. H. Ginsberg, E. Plow, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 246–250.

[14] S. Liu, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1413–1438.

[15] S. Kim, Z. K. Cui, J. Fan, A. Fartash, T. L. Aghaloo, M. Lee, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 5289–5298.

[16] P. Schaffner, M. M. Dard, *C. Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 119–132.

[17] L. Cao, L. Wang, L. Fan, W. Xiao, B. Lin, Y. Xu, J. Liang, B. Cao, *Materials (Basel).* **2017**, *10*, DOI 10.3390/ma10040358.

[18] R. Yang, C. Xu, T. Wang, Y. Wang, J. Wang, D. Quan, D. Y. B. Deng, *RSC Adv.* **2017**,

7, 41098–41104.

[19] S. B. Gunnoo, A. Madder, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 529–553.

[20] J. C. Reubi, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 389–427.

[21] T. Wang, N. Zabarska, Y. Wu, M. Lamla, S. Fischer, K. Monczak, D. Y. W. Ng, S. Rau, T. Weil, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12552–12555.

[22] T. Wang, Y. Wu, S. L. Kuan, O. Dumele, M. Lamla, D. Y. W. Ng, M. Arzt, J. Thomas, J. O. Mueller, C. Barner-Kowollik, et al., *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 228–238.

[23] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.

[24] T. Kurpiers, H. D. Mootz, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 1757–1760.

[25] K. S. Chandrasekaran, A. Rentmeister, *Biochemistry* **2018**, *58*, 24–30.

[26] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.

[27] R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589–1600.

[28] Q. Lin, C. P. Ramil, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007–11022.

[29] X. Jiang, R. Wang, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5515–5546.

[30] R. Selvaraj, J. M. Fox, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 753–760.

[31] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 1–20.

[32] S. I. Presolski, V. Hong, S. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 14570–14576.

[33] T. Review, *Chem. Soc.* **2013**, 5131–5142.

[34] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.

[35] X. Shi, K. Gao, H. Huang, R. Gao, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 250–254.

[36] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605.

[37] R. Huisgen, *Angew. Chemie* **1963**, *2*, 633–696.

[38] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.

[39] V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–461.

[40] Z. Hao, Y. Song, S. Lin, M. Yang, Y. Liang, J. Wang, P. R. Chen, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4502–4504.

[41] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.

[42] A. Jl, P. Wr, S. Dm, *Clin. Orthod. Res.* **1999**, *2*, 49–52.

[43] A. E. Speers, Cravatt Benjamin F., *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535–546.

[44] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.

[45] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

[46] K. J. Shea, J. S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4846–4855.

[47] C. M. Madl, S. C. Heilshorn, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 724–730.

[48] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690.

[49] J. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 2182–2184.

[50] C. J. Pickens, S. N. Johnson, M. M. Pressnall, M. A. Leon, C. J. Berkland, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 686–701.

[51] C. D. Mcnitt, H. Cheng, S. Ullrich, V. V Popik, M. Bjerknes, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 14029–14032.

[52] A. A. Poloukhtine, N. E. Mbua, M. A. Wolfert, G. Boons, V. V Popik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769–15776.

[53] R. K. V Lim, Q. Lin, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 828–830.

[54] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832–2835.

[55] D. Bléger, S. Hecht, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 11338–11349.

[56] N. Hoffmann, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1052–1103.

[57] M. A. Tasdelen, Y. Yagci, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *53*, 5930–5938.

[58] G. Delaittre, A. S. Goldmann, J. O. Mueller, C. Barner-, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 11388–11403.

[59] X. Shang, R. Lai, X. Song, H. Li, W. Niu, J. Guo, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 2859–2864.

[60] Y. Wang, C. I. Rivera Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155–4158.

[61] S. Zhao, J. Dai, M. Hu, C. Liu, R. Meng, X. Liu, C. Wang, T. Luo, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4702–4705.

[62] W. Song†, Y. Wang†, Z. Yu†, C. I. R. Vera†, J. Qu‡, Q. Lin, **2010**, *5*, 875–885.

[63] R. Huisgen, J. Sauer, M. Seidel, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 2503–2509.

[64] Z. Li, L. Qian, L. Li, J. C. Bernhammer, H. V. Huynh, J. S. Lee, S. Q. Yao, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 2002–2006.

[65] L. Tedaldi, V. Chudasama, J. R. Baker, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 455–459.

[66] A. Sesto, M. Navarro, F. Burslem, L. Jorcano, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 2965–2970.

[67] Q. Li, T. Dong, X. Liu, X. Lei, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4996–4999.

[68] J. Li, H. Kong, L. Huang, B. Cheng, K. Qin, M. Zheng, Z. Yan, Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14542–14546.

[69] L. D. Amico, V. M. Fern, F. Maseras, P. Melchiorre, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*, 3304–3308.

[70] S. Cuadros, L. D. Amico, P. Melchiorre, *Angew. Chemie* **2017**, *129*, 12037–12041.

[71] A. Vigovskaya, D. Abt, I. Ahmed, C. M. Niemeyer, C. Barner-kowollik, L. Fruk, *Mater. Chem.* **2016**, *4*, 442–449.

[72] T. Suzuki, T. Omori, T. Ichimura, *J. Phys. Chem.* **2000**, *104*, 11671–11676.

[73] S. Cuadros, P. Melchiorre, *European J. Org. Chem.* **2018**, 2884–2891.

[74] F. Feist, J. P. Menzel, T. Weil, J. P. Blinco, C. Barner-Kowollik, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 11848–11854.

[75] T. Wang, A. Pfisterer, S. L. Kuan, Y. Wu, O. Dumele, M. Lamla, K. Müllen, T. Weil, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1889–1894.

[76] S. L. Kuan, T. Wang, T. Weil, *Chem. Biol.* **2016**, *22*, 17112–17129.

[77] T. Wang, A. Riegger, M. Lamla, S. Wiese, P. Oeckl, M. Otto, Y. Wu, S. Fischer, H. Barth, S. L. Kuan, et al., *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3234–3239.

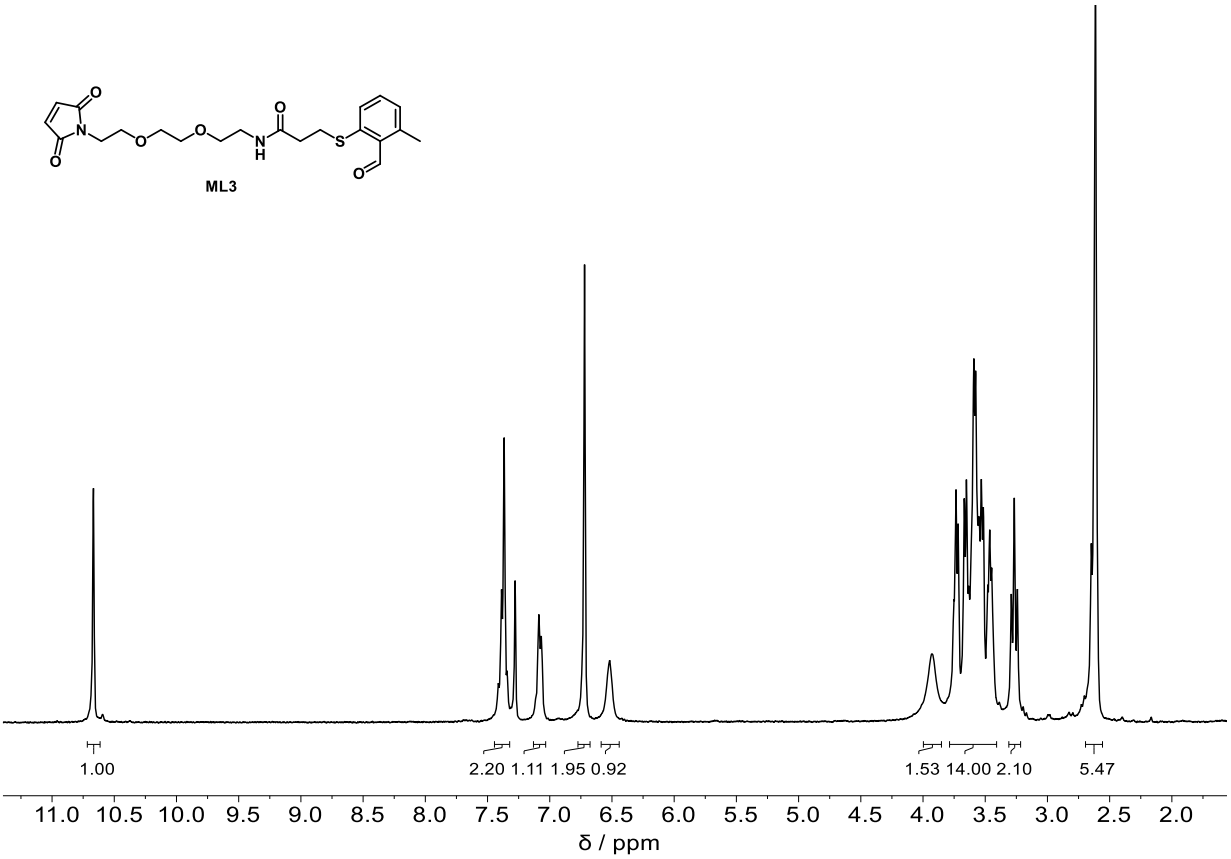
[78] T. Wang, D. Y. W. Ng, Y. Wu, J. Thomas, T. Tamtran, T. Weil, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1116–1118.

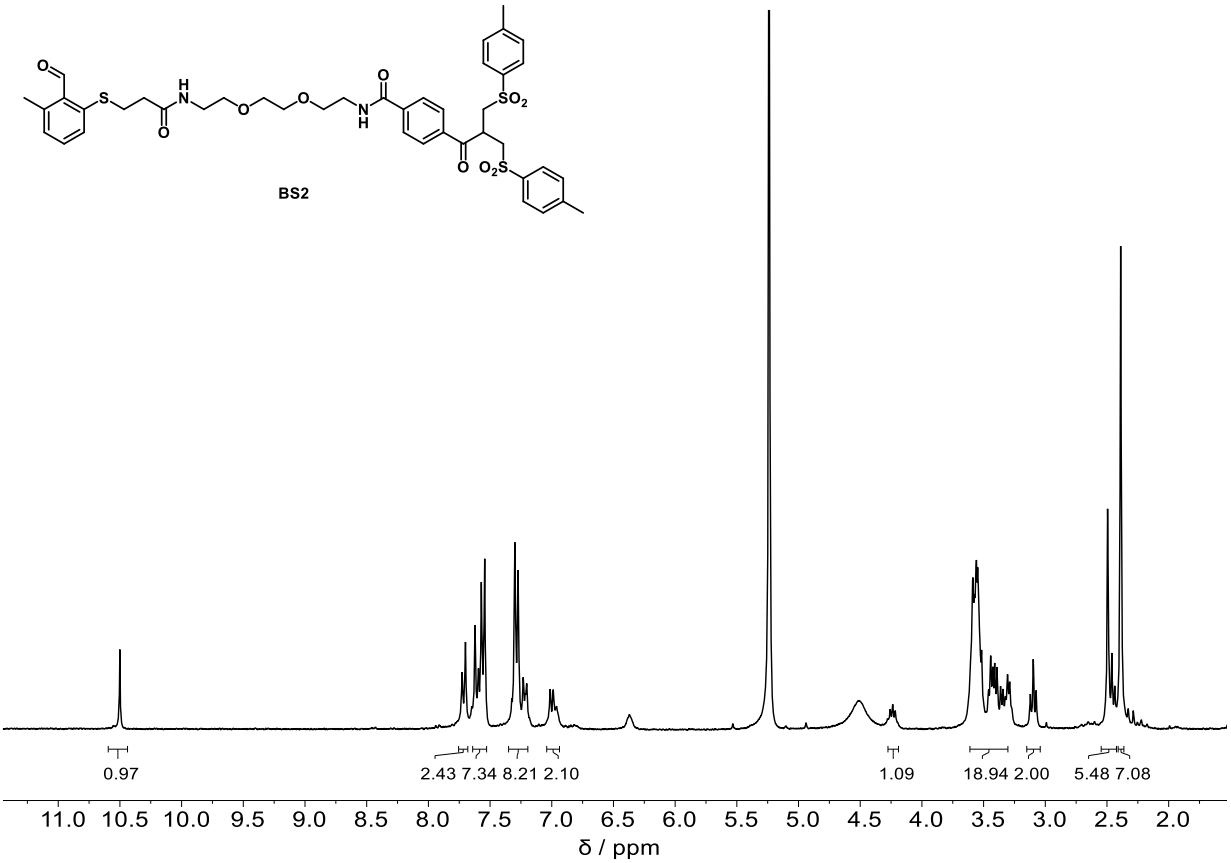
[79] W. Yanming, L. Song, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1860.

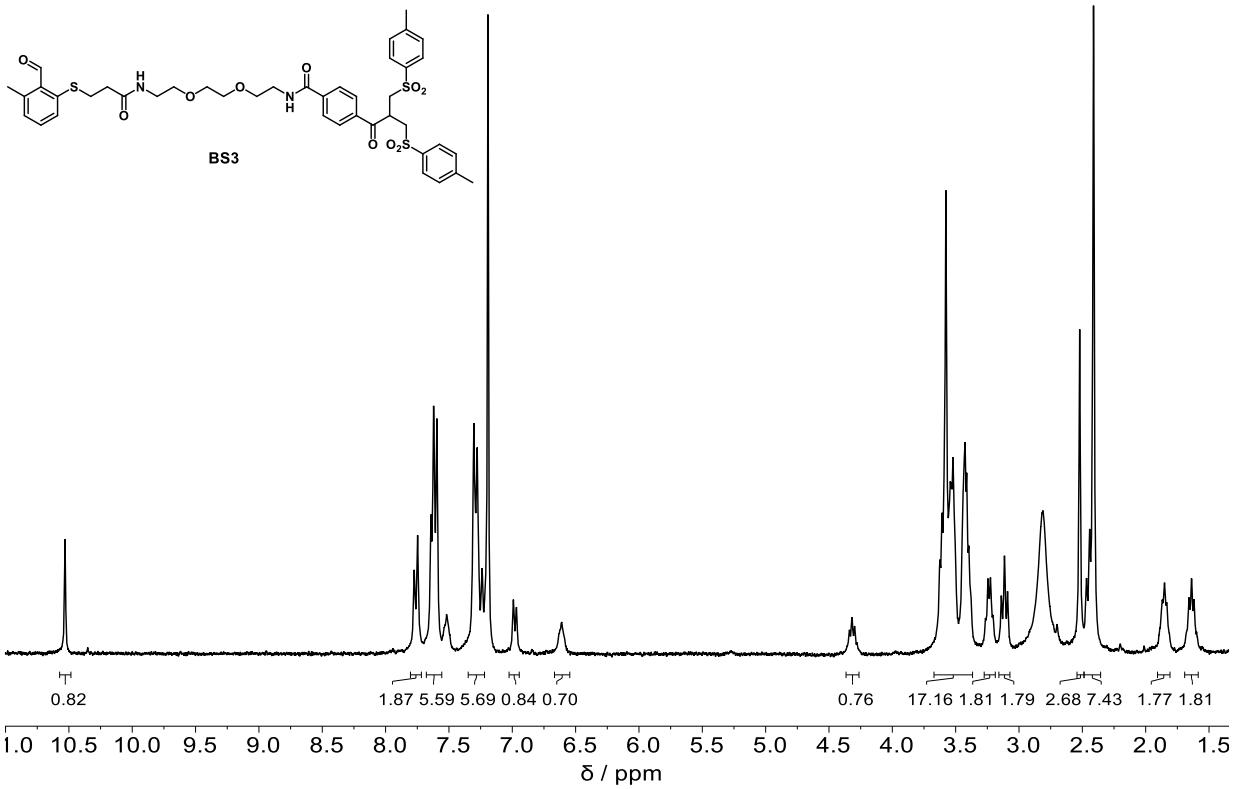
[80] W. H. Parsons, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10582–10585.

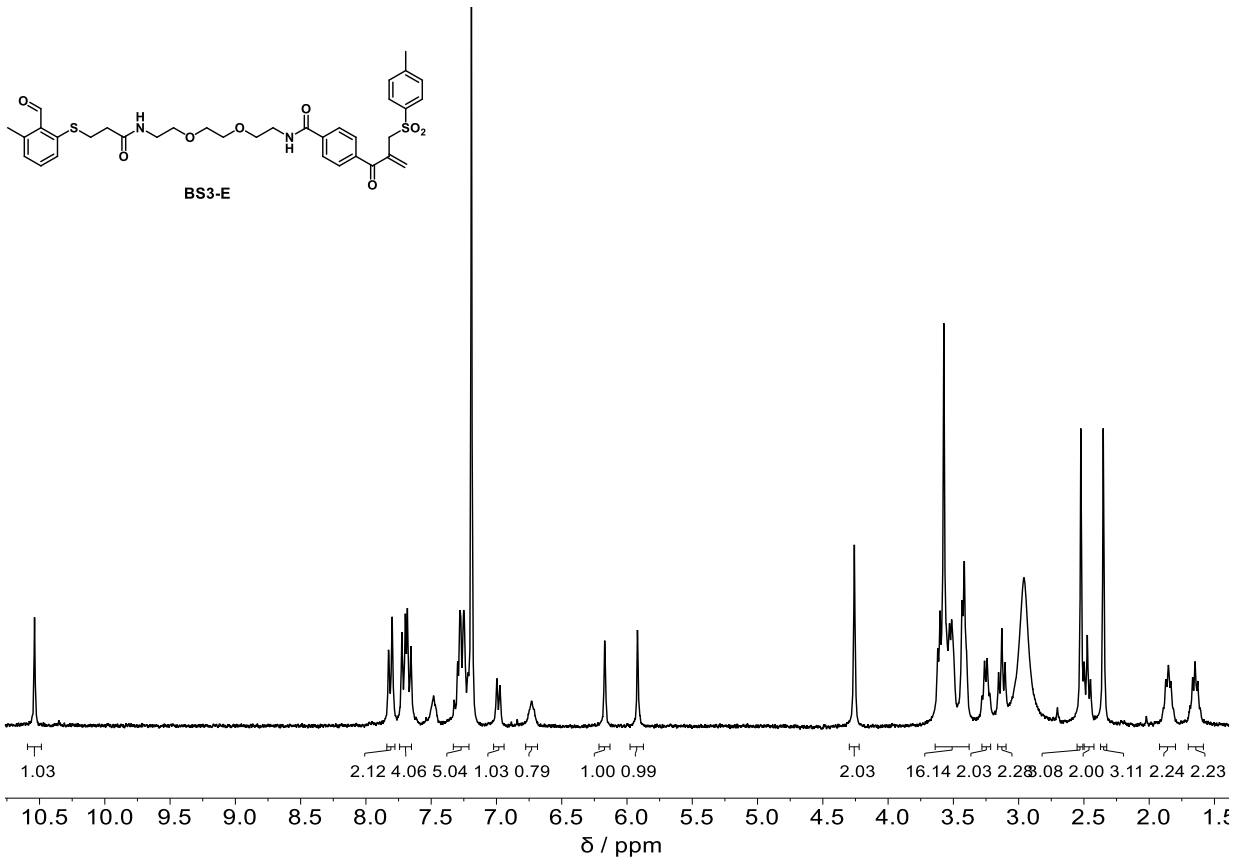
[81] B. Chemistry, E. Klein, C. Dosche, P. Kerth, L. Lebeau, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 5259–5270.

7 Anhang


ML3
1.00
2.20 1.11 1.95 0.92
1.53 14.00 2.10
5.47
11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
δ / ppm


BS2
0.97
2.43 7.34 8.21 2.10
1.09
18.94 2.00
5.48 7.08
11.0 10.5 10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
δ / ppm


BS3
0.82
1.87 5.59 5.69 0.84 0.70
0.76
17.16 1.81 1.79 2.68 7.43 1.77 1.81
δ / ppm


BS3-E
1.03
2.12 4.06 5.04 1.03 0.79 1.00 0.99
2.03
16.14 2.03 2.28 8.08 2.00 3.11 2.24 2.23
δ / ppm