

*Synthese und biologische Testung von Metallocen-
Peptidkonjugaten an humanen Karzinomzelllinien*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Biochemie
der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Apothekerin Annika Groß

geboren in Berlin

Bochum, März 2010

Diese Arbeit wurde in der Zeit von März 2006 bis März 2010 unter Leitung von Prof. Metzler-Nolte am Lehrstuhl für Anorganische Chemie I der Ruhr-Universität Bochum angefertigt.

Referent:	Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte
Koreferent:	Prof. Dr. William S. Sheldrick
Tag der mündlichen Prüfung:	14. Mai 2010

*Meinen Eltern
und Bella*

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Nils Metzler-Nolte für die Vergabe des interessanten Themas und der Möglichkeit dieses nach meinen eigenen Vorstellungen durchführen zu können. Danke, für die zu jeder Zeit vorhandene Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung.

Mein Dank gilt Prof. Stephan Hahn (Abteilung für Molekulare Gastroenterologische Onkologie), da ich in seinem Labor meine zellbiologischen Experimente durchführen konnte, für die gute Zusammenarbeit, das Interesse an den gemeinsamen Projekten und die zur Verfügung gestellten Zelllinien. Seinen Mitarbeitern, vor allem Abdel Maghnouj und Britta Redeker, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Einführung in die Zellkultur. Abdel danke ich vor allem für seine Diskussionsbereitschaft und Britta für die Messung der RT-PCR.

Ich danke meinen Vertiefungsstudenten Stefan Klink und Daniel Habig für ihren Beitrag zu dieser Arbeit und Konrad Meister vom Lehrstuhl für Physikalische Chemie II für die Messung der Raman-Spektren.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen Merja Neukamm und Srecko Kirin, die mir vor allem am Anfang den Einstieg in die bioanorganische Chemie erleichtert haben. Besonders möchte ich mich bei der gesamten AC I für die gute Arbeitsatmosphäre und für die erhaltene Unterstützung bedanken. Die vielen gemeinsamen Aktivitäten und die entstandenen Freundschaften haben meine Zeit hier in Bochum sehr bereichert.

Ferner danke ich Joachim Lügger für die Synthese der Ruthenocen-Carbonsäure, Andrea Ewald für die gelegentlichen ESI-Messungen, sowie Annegret Knüfer für die Unterstützung bei der Wartung des Peptidsynthesizers und der Synthese verschiedener Peptide. Klaus Merz möchte ich für die schnelle und praktische Hilfe bei sämtlichen Computerproblemen danken und Nicole Ray für die Unterstützung bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der RUBiospek für die Messung der NMR-Spektren. Vor allem möchte ich mich bei Martin Gartmann, für seine Hilfsbereitschaft und praktischen Tipps bedanken. Herrn Breuckmann vom Lehrstuhl für Organische Chemie I danke ich für die Messung der MALDI-Spektren.

Weiterhin gilt mein Dank der Research School der Ruhr-Universität Bochum und der Forschergruppe 630 für die finanzielle Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 <i>Medizinisch-anorganische Chemie</i>	<i>1</i>
1.1.1 Diagnostik	2
1.1.2 Zytostatika	6
1.2 <i>Peptide.....</i>	<i>15</i>
1.3 <i>Zielsetzung</i>	<i>23</i>
2 Synthese und Charakterisierung	24
2.1 <i>Einleitung</i>	<i>24</i>
2.2 <i>Synthese der Neurotensin-Biokonjugate</i>	<i>30</i>
2.3 <i>Synthese der Octreotat-Biokonjugate.....</i>	<i>35</i>
2.4 <i>Synthese der Polyarginin-Biokonjugate.....</i>	<i>42</i>
2.5 <i>Synthese der SS-Peptid-Biokonjugate</i>	<i>45</i>
2.6 <i>Synthese der MTS-Peptid-Biokonjugate.....</i>	<i>49</i>
3 Biologische Untersuchungen	52
3.1 <i>Experimente.....</i>	<i>52</i>
3.2 <i>RT-PCR</i>	<i>53</i>
3.3 <i>Untersuchung der Lipophilie</i>	<i>55</i>
3.4 <i>Untersuchung der Zellaufnahme.....</i>	<i>58</i>
3.4.1 <i>Zellaufnahme der Octreotat-Biokonjugate.....</i>	<i>59</i>
3.4.2 <i>Zellaufnahme der Neurotensin(8-13)-Biokonjugate</i>	<i>67</i>
3.4.3 <i>Zellaufnahme-Untersuchung der Polyarginin-Konjugate</i>	<i>77</i>
3.4.4 <i>Zellaufnahme der Szeto-Schiller Peptide</i>	<i>79</i>
3.4.5 <i>Zellaufnahme des MTS-Peptids</i>	<i>81</i>
3.5 <i>Untersuchung der Lokalisierung.....</i>	<i>81</i>
3.5.1 <i>Octreotat-Lokalisierung</i>	<i>82</i>
3.5.2 <i>Neurotensin-Lokalisierung.....</i>	<i>83</i>
3.5.3 <i>Polyarginin-Lokalisierung.....</i>	<i>84</i>
3.5.4 <i>MTS-Lokalisierung</i>	<i>86</i>
3.6 <i>Testung auf Hemmung der Zellproliferation.....</i>	<i>87</i>
3.6.1 <i>Ergebnisse der Untersuchung der Metallkomplexe</i>	<i>89</i>
3.6.2 <i>Ergebnisse der Untersuchung der Octreotat-Biokonjugate.....</i>	<i>90</i>
3.6.3 <i>Ergebnisse der Untersuchung der Neurotensin-Biokonjugate</i>	<i>91</i>
3.6.4 <i>Ergebnisse der Untersuchung der Polyarginin-Biokonjugate</i>	<i>92</i>
3.6.5 <i>Ergebnisse der Untersuchung der Mitochondrien-Peptid-Biokonjugate</i>	<i>93</i>
3.7 <i>Zusammenfassung der biologischen Ergebnisse.....</i>	<i>95</i>
4 Zusammenfassung	101

5. Experimenteller Teil	105
5.1 <i>Materialien und Methoden</i>	105
5.2 <i>Zellbiologische Methoden</i>	109
5.2.1 Materialien und Geräte	109
5.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften	111
5.2.3 Vorschriften der zellbiologischen Untersuchungen	112
5.3 <i>Synthese</i>	118
5.3.1 Literatur-Synthesen	118
5.3.2 Festphasensynthese	125
5.3.3 Charakterisierung der Biokonjugate	128
6 Literaturverzeichnis.....	175

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Ac	Acetyl
Acm	Acetamidomethyl
ACN	Acetonitril
atnDap	β -Anthraniloyl-L- α,β -diaminopropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>t</i> -Butoxycarbonyl
br	broad; breit
Carba	Carbamazepin
Cc	$\text{CpCo}^+\text{C}_5\text{H}_4^-$
CMIA	Carbonyl-Metallo-Immunoassay
Co-ASS	Hexacarbonyldicobalt-Aspirin-Komplex
Cp	Cyclopentadien
CPP	Cell-Penetrating Peptides
CV	Cyclovoltametrie
COX	Cyclooxygenase
d	Dublett
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dmt	Dimethyltyrosin
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
dppe	1,2-Bis(diphenylphosphino)ethan
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
δ	chemische Verschiebung
EI	Elektronenstoßionisation; electron impact
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAB	Schneller Atombeschuss; fast atom bombardment
Fc	$\text{CpFeC}_5\text{H}_4^-$, Ferrocenyl
FITC	Fluorescein 5-isothiocyanat Isomer I

Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
HATU	N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-ylmethylen]-N-methylmethanaminiumhexafluorophosphat-N-Oxid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hsp	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IL-10	Interleukin-10
J	Kopplungskonstante
KP46	Tris(8-chinolinolato)gallium(III)
KP1019	[Tetrachlorobis(1H-indazol) ruthenat(III)]-Indazolium
m	Multiplett, meta
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/Ionisation-time of flight
MeOH	Methanol
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MOPS-Puffer	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure-Puffer
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MTS	Mitochondria Targeting Sequenz
Mtt	4-Metyltrityl
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
NAMI-A	trans-Tetrachloro(dimethylsulfoxid)imidazol ruthenat(III)]-Imidazolium
NBu ₄ PF ₆	Tetrabutylammonium-hexafluorophosphat
NET	neuroendokrine Tumore
NMP	N-Metyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernresonanz
NT	Neurotensin
NTR	Neurotensin-Rezeptor
o	ortho
p	para

Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pent	Pentynyl
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pheno	Phenobarbital
Phenytoin	DPH
PolyR	Polyarginin
pos.	positiv
ppm	parts per million
PRRT	Peptid-Rezeptor Radionuklid Therapie
PTA	1,3,5-Triaza-7-phoshaadamantan
q	Quartett
RAPTA	Ruthenium-Aren-PTA
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time PCR
Rc	CpRuC ₅ H ₄ -, Ruthenocenyl
s	Singulett; stark
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
SS-Peptide	Szeto-Schiller Peptide
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
t	Triplett
tBu	<i>t</i> -Butyl
TBTU	2-(1H-Benzotiazol-1-yl)-1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester

Die Aminosäuren wurden im Dreibuchstaben- bzw. Einbuchstabencode angegeben, hierbei stehen Großbuchstaben für L-Aminosäuren und Kleinbuchstaben für D-Aminosäuren.

1 Einleitung

1.1 Medizinisch-anorganische Chemie

Die medizinisch-anorganische Chemie ist ein Teilgebiet der medizinischen Chemie mit stetig wachsender Bedeutung. Es ist die Schnittstelle zwischen Medizin und anorganischer Chemie mit Wurzeln, die bis in die Antike zurückreichen. Heutzutage ist die Anwendung von Metallkomplexen am Menschen immer noch mit vielen Vorurteilen behaftet, vor allem wegen ihrer vermeintlich hohen Toxizität und Instabilität. Diese Vorurteile treffen für einige Substanzen zu; dennoch gibt es viele anorganische Verbindungen, die stabil und ungefährlich sind. Darüber hinaus existieren diverse Metalle, die essenziell für den Menschen sind. Zu diesen gehören u.a. Eisen, Zink und Kupfer, die bei ungenügendem Vorhandensein zu schweren Mangelkrankungen führen. Ihre Relevanz ist bedingt durch ihr Vorhandensein in vielen lebensnotwendigen Verbindungen, zu denen u.a. Vitamin B12 und die prothetischen Gruppen von Enzymen und Proteinen gehören, wie die Häm-Gruppe des Hämoglobins und Cytochrom c. Aufgrund ihres artifiziellen Aufbaus und ihrer metallspezifischen Reaktivität haben anorganische Verbindungen in der medizinischen Chemie viele Vorteile gegenüber rein organischen Verbindungen. Infolge einer großen Anzahl an Möglichkeiten bezüglich ihrer Koordinationszahl (Kohlenstoff: 1-4 Bindungspartner; Metalle: 1-9 Bindungspartner) (Abb. 1.1) und daraus resultierender Geometrievielfalt zeichnen sie sich durch eine hohe strukturelle Vielfalt aus. Sie können sich in unterschiedlichen Redoxzuständen befinden und verschiedene thermodynamische und kinetische Charakteristika aufweisen. Demzufolge ist durch die Verknüpfung unterschiedlicher Metalle mit organischen Liganden eine Vielzahl von Kombinationen möglich. Zusätzlich bieten Metalle interessante spektroskopische Eigenschaften, die zur Untersuchung ihrer Komplexe herangezogen werden können, wie z.B. NMR verschiedener Metallkerne (^{195}Pt , ^{103}Rh , ^{59}Co u.a.) und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS).

In der klinischen Anwendung sind anorganische Arzneistoffe immer noch eine Seltenheit; dennoch gibt es vor allem im Bereich der Diagnostik viele wichtige anorganische Arzneimittel auf dem Markt. So sind in der Magnetresonanztomographie (MRT) Gadolinium-, in der Szintigraphie Technetium- und in der Tumorthherapie Platinverbindungen essenziell.

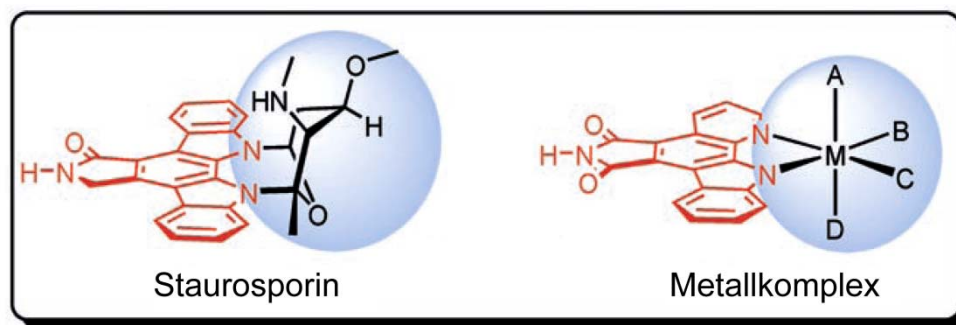


Abb.1.1: Staurosporin (links); metallhaltiges Staurosporin-Derivat (rechts): Austausch des organischen Pyranrings mit vier Stereozentren durch einen Metallkomplex mit vier Liganden. Diese können für eine selektive Inhibition der Enzymbindungstasche variiert werden.^[1]

Ein weiteres Teilgebiet der medizinisch-anorganischen Chemie ist die Bioorganometallchemie. Bioorganometall-Verbindungen weisen zwei essenzielle Charakteristika auf: Zum einen enthalten sie per definitionem mindestens eine kovalente Metall-Kohlenstoff-Bindung, und zum anderen muss der Komplex einen biologischen Hintergrund besitzen. Dieser erstreckt sich von pharmakologisch aktiven Verbindungen über Rezeptor- und Metalloenzym-Mimetika bis hin zur Verwendung als Sensor oder Sonde für Biomoleküle.^[2] Organometallische Verbindungen zeichnen sich häufig durch eine gute Stabilität, ferner durch eine oft relativ gute synthetische Zugänglichkeit aus. Das steht im Gegensatz zu vielen anorganischen Verbindungen, deren Instabilität oft ein Problem darstellt, und organischen Molekülen, die nicht selten eine komplizierte Stereochemie aufweisen und eine mehrstufige Synthese voraussetzen.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf Organometall-Konjugaten, die aus zwei Teilen aufgebaut sind, zum einen aus der metallischen Komponente, die der Verbindung zu einer antiproliferativen Aktivität verhelfen soll, und zum anderen aus der peptidischen Komponente, die das Metall selektiv in Tumorzellen einschleusen und die toxische Komponente zu ihrem Wirkort steuern soll.

1.1.1 Diagnostik

In der Diagnostik werden Metallverbindungen überwiegend als Radionuklide in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Szintigraphie bzw. Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) eingesetzt. Ferner werden anorganische Arzneimittel als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT) und bei Röntgenuntersuchungen verwendet. Als positives Röntgenkontrastmittel wird v.a. das Bariumsulfat (Falibaryt[®], Micropaque[®], Unibaryt[®]) verwendet.

Die Gammazintigraphie ist ein Verfahren zur Detektion von γ -Strahlen eines oder mehrerer Radionuklide mittels einer stationären (Szintillationskammer) oder bewegten (Scanner) Szintillationsdetektionssysteme. Anwendungsgebiete sind die Untersuchung von Organen, Tumoren und Gewebeabschnitten, die Radionuklide selektiv anreichern.^[3]

Die Radionuklide können ferner durch ein Schnittbildverfahren mittels einer rotierenden Szintillationskamera eingesetzt werden; dieses Verfahren wird SPECT genannt. Verwendete Radionuklide sind vor allem, $[^{123}\text{I}]\text{Iod}$, $[^{131}\text{I}]\text{Iod}$, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Technetium}$ und $[^{111}\text{In}]\text{Indium}$.

Aufgrund seiner günstigen Halbwertszeit und Strahlenenergie sowie seiner klinischen Verfügbarkeit wird bevorzugt Technetium eingesetzt. Kommerziell erhältliche Technetium-basierte Diagnostika sind u.a. Ceretec[®] zur Untersuchung von Hirnperfusionen, Solcoscint[®] MAA für die Lungenperfusions-Szintigraphie, Cardiolite[®] (Verb. 2, Abb. 1.2) zur Detektion von Myokardperfusionen und zur Tumordiagnostik, Nanocoll[®] für die Knochenmarks-Szintigraphie und Myoview[®] zur Detektion der Myokardperfusion. Indium-basierende Diagnostika sind Myoscint[®] für die Myokard-Szintigraphie, $[^{111}\text{In}]\text{-DTPA}$ für die Liquor-Szintigraphie und OctreoScan[®] (Verb. 1, Abb. 1.2) zur Diagnose endokriner Tumore.^[4-6] Die spezifische Anreicherung in Zielgeweben kann durch Rezeptorbindung (z. B. OctreoScan[®]) sowie durch eine Vielzahl aktiver und passiver Prozesse erfolgen. $[^{67}\text{Ga}]\text{Galliumcitrat}$ wird durch seine Ähnlichkeit zum Eisen an Transferrin gebunden und so zur Visualisierung von Entzündungen und Tumoren genutzt. Durch Immunszintigraphie können markierte Antikörper bzw. Antikörperfragmente spezifische Zellen und Gewebe sichtbar machen.^[7]

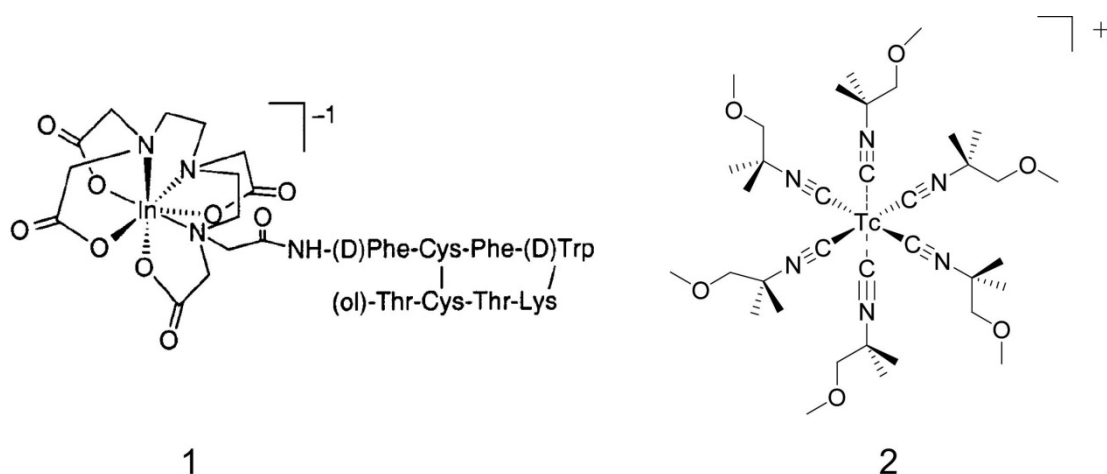


Abb. 1.2: OctreoScan[®] (1), Cardiolite[®] (2).

PET ist eine weitere Methode, in der Radionuklide eingesetzt werden. Geeignete metallische Positron-emittierende Nuklide (β^+) sind [^{64}Cu]Kupfer und [^{68}Ga]Gallium.^[8] Allerdings besitzen bei dieser Methode die metallfreien Radionuklidverbindungen, insbesondere die 2- ^{18}F -Fluor-2-deoxy-D-Glukose, eine weitaus größere Bedeutung.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine routinemäßig eingesetzte Technik in der modernen klinischen Medizin. Es ist eine nicht-invasive Methode, die keine Verwendung von radioaktiven Verbindungen voraussetzt und sich durch eine hervorragende Bildqualität, einen hohen Weichteilkontrast und eine hohe räumliche Auflösung auszeichnet. Paramagnetische MRT-Kontrastmittel sind in der Regel Gadolinium-basiert und werden zum Nachweis von Tumoren, zur Darstellung von Entzündungen, zum Nachweis der Perfusion von Geweben und zur Untersuchung der Ausscheidungsfunktion der Nieren eingesetzt. Die Gadolinium-Präparate Magnevist[®] (Verb. 4, Abb. 1.3), Omniscan[®] und Pro-Hance[®] werden als sichere Diagnostika routinemäßig in Kliniken verwendet. Um diese Arzneimittel weiter zu optimieren, wurde versucht, ihre Dosis zu reduzieren, ihren Kontrast zu erhöhen und sie zur spezifischen Diagnose von Krankheiten einzusetzen.^[9] Zu diesem Zweck wurde die Relaxation optimiert,^[10] die Anzahl an Gadolinium-Atomen innerhalb eines Moleküls erhöht^[11-14] oder die Gadolinium-Komplexe in eine Perfluorkohlenwasserstoff Emulsion eingebracht,^[15] die durch eine Biotin-Komponente einen Vektor besitzt (Verb. 3, Abb. 1.3). Ferner war es möglich, Gadolinium an ein Fibrin-bindendes Peptid zu koppeln, um Blutgerinnsel detektieren zu können.^[16]

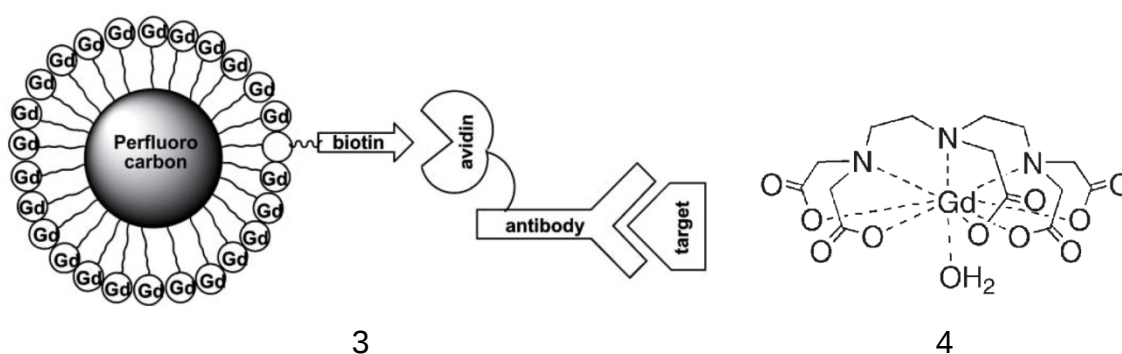


Abb. 1.3: Perfluorkohlenwasserstoff-Emulsion (3) und Magnevist[®] (4).

Eine ex situ metallbasierte diagnostische Methode wurde von Jaouen *et al.* entwickelt. Es handelt sich um den Carbonyl-Metall-Immunoassay (CMIA).^[17] In diesem Assay werden Metallcarbonyle an ein Hapten gebunden, um diese als Tracer zu verwenden. Die Detektion

erfolgt über Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR). Bei dieser Methode werden die spektralen Eigenschaften der Metallcarbonyl-Komplexe genutzt, deren sehr starke Absorptionsbanden zwischen 1800 und 2200 cm^{-1} liegen, und zwar in einem Bereich, in dem Proteine und organische Verbindungen nicht absorbieren. So konnte ein Multi-Immunoassay entwickelt werden, der bis zu drei antiepileptische Arzneistoffe (Carbamazepin (Carba), Phenobarbital (Pheno), Phenytoin (DPH)) quantitativ nebeneinander detektiert (Abb. 1.4). Das Detektionslimit liegt im pico-molaren bis femto-molaren Bereich mit einem Fehler von weniger als 5%.^[18]

Es wurden zusätzlich organometallische Komplexe von Steroiden wie Cortisol, Testosteron und Dihydrotestosteron hergestellt.^[19] Darüber hinaus wurde zur Signalverstärkung die Methode des Metallcarbonyl-Multilabelings entwickelt,^[20] indem Antikörper-Dendrimer-Verbindungen mit zehn Metallcarbonylen auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht wurden. Somit wurde CMIA sensitiv genug, die Pestizide Chlortoluron^[21] und Atrazin^[22] quantitativ detektieren zu können.

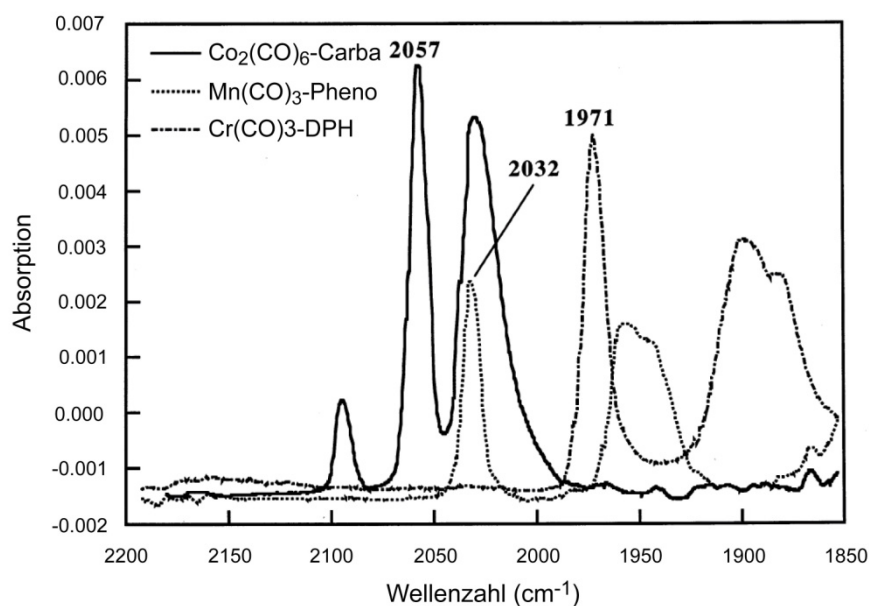


Abb. 1.4: FT-IR-Spektrum mit $\text{Co}_2(\text{CO})_6\text{-Cabamazepin}$, $\text{Mn}(\text{CO})_3\text{-Phenobarbital}$ und $\text{Cr}(\text{CO})_3\text{-Phenytoin}$ als Tracer. Die angegebenen Wellenzahlen innerhalb des Spektrums entsprechen den Detektionsbanden der drei Verbindungen.^[18]

1.1.2 Zytostatika

Die Synthese von Cisplatin wurde erstmalig (Verb. 5, Abb. 1.5) vor 150 Jahren von Michele Peyrone beschrieben.^[23] Aber erst durch Barnett Rosenbergs Entdeckung der antiproliferativen Eigenschaften von Cisplatin in den 1960er Jahren begann man, die wirkliche Bedeutung dieser Verbindung zu begreifen.^[24, 25] Heutzutage ist Cisplatin ein umsatzstarkes Antitumormittel und aus der Tumorthherapie nicht mehr weg zu denken. Es wird routinemäßig zur Therapie von Tumoren der Ovarien, von Hodenkarzinomen und Blasen-, Hals- und Nacken-Tumoren verwendet. Mit der Entdeckung der tumorhemmenden Eigenschaften von Cisplatin begann auch das Interesse an der bioanorganischen Chemie stark zu wachsen und führte zu der Erforschung vieler neuer antiproliferativ wirksamen Metallverbindungen.^[26-29] Die Zielstruktur von Cisplatin innerhalb der Zelle ist die DNA. Cisplatin reagiert nach der Hydrolyse der Cl-Pt Bindung unter Bildung eines reaktiven Aquaplatin(II)-Komplexes mit den DNA-Basen, vor allem durch Bindung an benachbarte Guaninbasen.^[30] Es kommt zu Quervernetzungen innerhalb desselben DNA-Stranges, was zum Zelltod führt. Cisplatin ist eine denkbar einfache Verbindung mit einer guten Wirksamkeit, die aber auch viele Nachteile besitzt, wie starke unerwünschte Nebenwirkungen (v.a. Nierentoxizität und Ototoxizität) und die zunehmende Resistenzentwicklung. Diese Nachteile veranlassten die Erforschung von Platinderivaten mit günstigeren Eigenschaften. So wurde die 2. Generation der Platinverbindungen in die Therapie eingeführt, zu denen Carboplatin, Nedaplatin und Oxaliplatin gehören. Diese Verbindungen zeichnen sich durch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aus und besitzen zusätzlich eine erhöhte Stabilität und Wasserlöslichkeit.^[31] Weitere interessante Platinderivate sind Lobaplatin, die Platin(IV)-Verbindung Satraplatin (Verb. 7, Abb. 1.5),^[32, 33] der sterisch gehinderte Platinkomplex Picoplatin,^[33] die multinukleare Platinverbindung BBR3464 (Verb. 8, Abb. 1.5),^[34, 35] Platin(IV) funktionalisierte Carbon-Nanotubes^[36] und die photochemisch aktivierbare Platin(IV)-Verbindung von Sadler *et al.* (Verb. 6, Abb. 1.5).^[37]

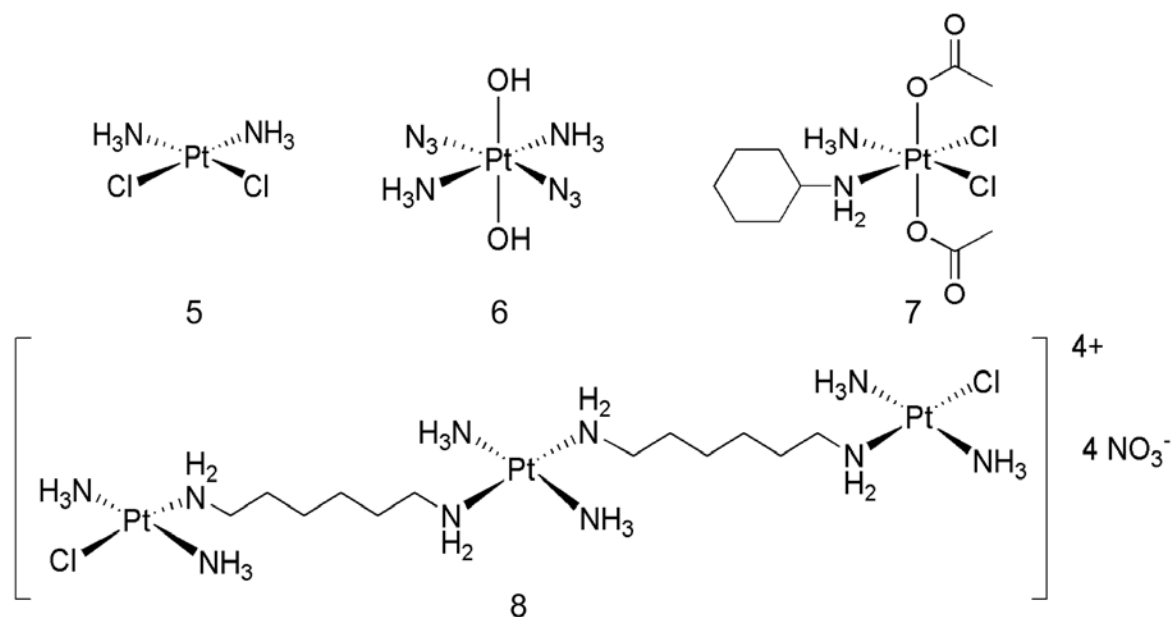


Abb. 1.5: *Cisplatin (5), Transplatin (6), Satraplatin (7), BBR3463 (8).*

Eine weitere Strategie, um Resistenzen und die starken Nebenwirkungen von Cisplatin zu umgehen, ist, andere Metalle auf ihre tumorhemmenden Eigenschaften zu untersuchen. Die Wirkung von Goldverbindungen, v.a. Auranofin (Verb. **9**, Abb. 1.6) gegen rheumatoide Arthritis,^[38] aber auch ihre starke systemische Toxizität, sind bekannt. Der Forschungsschwerpunkt liegt bei Gold(I)- und Gold(III)-Verbindungen. Gold(III)-Verbindungen sind isoelektronisch (d⁸) mit Platin(II) und bilden wie Cisplatin quadratisch-planare Komplexe. Die Bindung von Gold(III)-Verbindungen an die DNA unterscheidet sich deutlich von der Cisplatin-Bindung. Trotzdem scheint die Bindungsstelle für beide Klassen gleich zu sein.^[39-41] DNA-Interaktion ist aber wahrscheinlich weder für Gold(III)- noch Gold(I)-Verbindungen der Hauptwirk-mechanismus.^[42] Stattdessen werden die Inhibition der Thioredoxin-Reduktase,^[43] Proteasomen^[44] und Proteinkinasen^[45-47], sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert.^[48] Diese Wirkmechanismen führen zu Apoptose der Zellen. Ihr Wirkort scheinen die Mitochondrien und nicht die DNA zu sein.^[44] Für die Verbindung [Au(dppe)₂]Cl (Verb. **10**, Abb. 1.6) konnte die Erniedrigung des ATP-Spiegels und eine Permeabilitätserhöhung der mitochondrialen Membran beobachtet werden.^[49] Dieses macht sie hoch interessant in Bezug auf die Behandlung cisplatinresistenter Tumore.^[50] Vorteile der Verwendung von Goldverbindungen sind die jahrzehntelange klinische Erfahrung mit Goldverbindungen und ihr günstigeres Nebenwirkungsprofil im Vergleich zu Cisplatin.

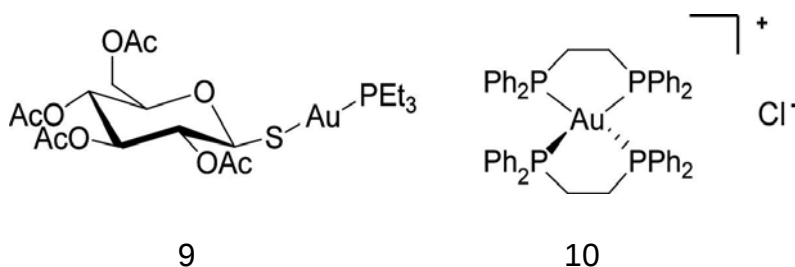


Abb. 1.6: Auranofin (**9**), [Au(dppe)₂]Cl (**10**).

Auch Galliumverbindungen wie Galliumchlorid und Galliumnitrat sind als tumorhemmende Metallverbindungen seit langer Zeit bekannt. Sie wirken über die Beeinflussung des Eisenmetabolismus und zeigen Aktivität an Lymphomen und Blasenkarzinomen.^[51-54] Heute wird Galliumnitrat zur Behandlung der tumorinduzierten Hypercalciämie eingesetzt.^[54] Momentan befinden sich zwei Gallium(III)-Verbindungen in der klinischen Prüfung, das KP46 (Verb. **11**, Abb. 1.7) und Gallium-Maltolat (Verb. **12**, Abb. 1.7).^[53, 55-58]

Der angenommene Wirkmechanismus ist die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase, was zu einer Störung der DNA-Synthese und schließlich zur Apoptose führt. In einer klinischen Studie zeigten die Verbindungen einen Hinweis auf die Wirksamkeit gegen Nierenkarzinome bei guter Verträglichkeit.^[59]

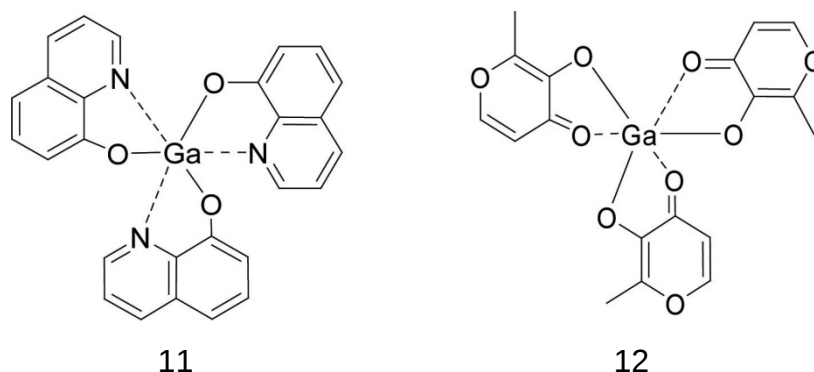


Abb. 1.7: KP46 (**11**), Gallium-Maltolat (**12**).

Weitere anorganische Verbindungen, die sich in der klinischen Prüfung befinden, sind die Rutheniumverbindungen NAMI-A (Verb. **13**, Abb. 1.8) und KP1019 (Verb. **14**, Abb. 1.8), die auf ihre tumorhemmenden Eigenschaften hin untersucht werden. Eine weitere wichtige Verbindung ist die Ruthenium-Organometallverbindung RAPTA-C (Verb. **15**, Abb. 1.8). Sie und NAMI-A wirken nicht bzw. wenig toxisch auf gesunde Zellen und Primärtumore, haben aber einen Metastasen-inhibierenden Effekt.^[58] Die Aktivität gegenüber Metastasen ist sehr

wichtig für den Krankheitsverlauf des Patienten, da der Primärtumor häufig operativ entfernt werden kann, die Metastasen hingegen sehr häufig zum Versterben des Patienten führen.

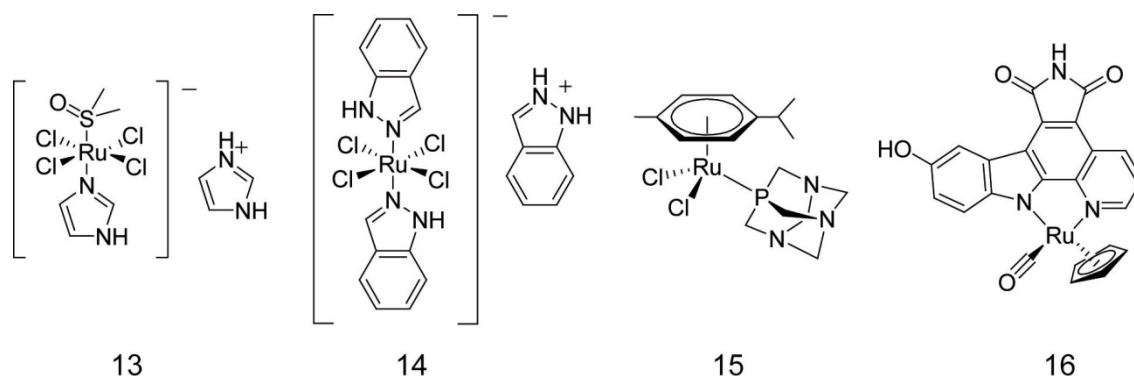


Abb. 1.8: Zytotoxisch aktive Ruthenium-Komplexe; NAMI-A (**13**), KP1019 (**14**), RAPTA-C (**15**), Ru-Staurosporin-Analogue (**16**).

KP1019 ist vor allem an Metastasen, aber zusätzlich auch am Primärtumor wirksam. Mit dieser Verbindung konnte in der klinischen Phase I bei Patienten mit fortschreitender Erkrankung eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs - bei guter Verträglichkeit - beobachtet werden.

Die Verbindungen weisen eine gewisse Selektivität gegenüber Tumorzellen auf, da es zu einer Akkumulation des Wirkstoffes im Tumor über das Transferrinsystem kommt. Zusätzlich werden sie durch das reduktive Milieu im Tumor aktiviert, und es kommt zur Induktion der Apoptose. Durch die Akkumulation in Tumorzellen und ihre Aktivierung in diesen besitzen die Ruthenium-Verbindungen eine wesentlich geringere systemische Toxizität als Platinverbindungen.

Der Wirkmechanismus von KP1019 scheint über die Bindung an die DNA und die Inhibition des DNA-Reparatursystems abzulaufen.^[60-64] Darüber hinaus spielt wahrscheinlich auch eine direkte Wirkung an den Mitochondrien eine Rolle.

NAMI-A, das strukturelle Ähnlichkeit mit KP1019 hat, besitzt eine andere biologische Aktivität. Es reduziert Metastasen, ist aber am Primärtumor weniger wirksam als KP1019. Die Verbindung erhöht die aktinabhängige Zelladhäsion,^[65, 66] inhibiert Matrix Metalloproteasen (MMP),^[67] reduziert die Zellinvasion und Migration^[67, 68] und weist einen antiangiogenetischen Effekt auf.^[69] Behandlung der Zellen mit NAMI-A resultiert in einem weniger malignen Zell-Phänotyp.

Auch die RAPTA-Komplexe haben nur eine geringe bis keine Toxizität gegenüber gesunden Zellen und nur eine geringe Aktivität gegenüber Primärtumoren; sie sind aber aktiv gegen Metastasen, v.a. Lungenmetastasen.^[70] RAPTA-Verbindungen sind organometallische Ruthenium(II)-Verbindungen mit dem monodentalen Phosphaadamantan (PTA) Ligand. Ihre Zytotoxizität wird vermutlich über ihre Wirkung an Mitochondrien und der Jun-N(terminalen) Kinase (JNK) über die Regulation von p53 erzielt.^[71] Die Leitstruktur von RAPTA wurde auf verschiedene Arten verändert. So wurde RAPTA-NH₂ (Verb. **17**, Abb. 1.9) durch Verknüpfung des Arensubstituenten mit dem Ruthenium stabilisiert;^[72] durch Einführung eines Dicarboxylat-Liganden (Verb. **18**, Abb. 1.9) kann die Aufnahme in den Tumor erhöht werden,^[73, 74] und durch Verwendung eines Ethylendiamin-Liganden kommt es zu einer Verstärkung der Zytotoxizität und einer Wirkung am Primärtumor. Die Ethylendiamin-Verbindung wirkt wie Cisplatin an der DNA.^[75] Mit dem Ziel, Resistenzen zu umgehen, wurden RAPTA-Komplexe wie Ru-Cymen-Phenoxazin^[76] (Verb. **19**, Abb. 1.9) und Ru-Cymen-Ethacrinsäure^[77] (Verb. **20**, Abb. 1.9) entwickelt. Es wurden Derivate bekannter Wirkstoffe, die wirksam gegen Resistenz-mechanismen sind, als Liganden in die RAPTA-Leitstruktur eingeführt. Die Wirkstoffe, die zur Blockierung der Resistenzmechanismen verwendet wurden, sind ein Phenoxazin-Derivat zur Hemmung des P-Glykoproteins und Ethacrinsäure zur Hemmung der Gluthation-S-Transferase.

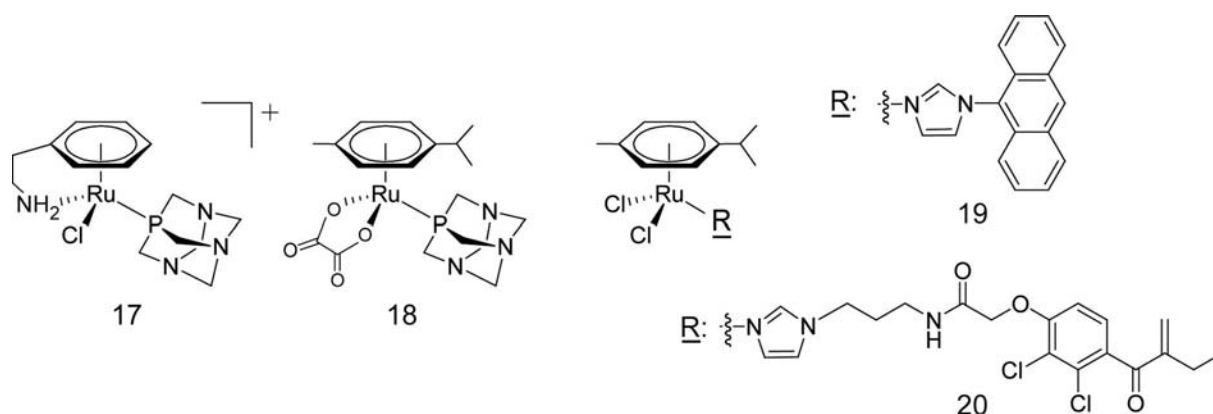
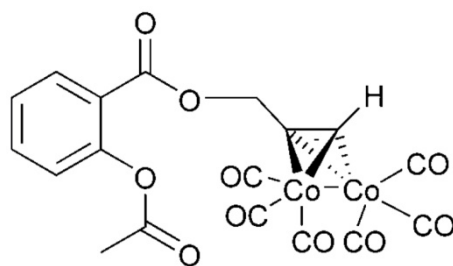


Abb. 1.9: RAPTA-Derivate; RAPTA-NH₂ (**17**), OxaliRAPTA-C (**18**), Ru-Cymen-Phenoxazin-Analogon (**19**), Ru-Cymen-Ethacrinsäure-Analogon (**20**).

Ein anderes Konzept verfolgen Meggers *et al.*^[78] Diese Verbindungen sind Organometall-Rutheniumkomplexe (Verb. **16**, Abb. 1.8), die organische Inhibitoren von Kinasen imitieren. Sie wirken nicht toxisch aufgrund der Metallkomponente, sondern das Ruthenium dient dazu, die strukturelle Variabilität zu erhöhen, was durch einfachen Austausch von Liganden erfolgen kann. Infolgedessen konnten Kinase-Inhibitoren konstruiert werden, die im nanomolaren bis picomolaren Bereich wirksam sind, ohne eine komplizierte Stereochemie

wie die organischen Leitstruktur aufzuweisen.^[79] Die Verbindungen besitzen eine hohe Toxizität gegenüber Melanom-Zellen.^[80]

Weitere Organometallverbindungen mit einer guten tumorhemmenden Aktivität sind Cobaltalkinkomplexe. Die Leitstruktur der cytotoxischen Cobaltalkinkomplexe ist ein Hexacarbonyldicobalt-Komplex des Propargylesters der Acetylsalicylsäure (Co-ASS) (Abb. 1.10).^[81] Veränderungen der organischen Komponente führten bisher nur zu einer Abschwächung der Wirksamkeit.^[82, 83] Die höchste tumorhemmende Aktivität zeigt diese Verbindung bemerkenswerterweise gegen die Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7,^[81, 82] obwohl Co-ASS eine relative Bindungsaffinität am Estrogenrezeptor von nur 0.05% aufweist.^[83] Auch DNA-Bindungsstudien konnten keine Relation zwischen Struktur und Wirkung der Cobaltalkinkomplexe zeigen. Interessanterweise zeigte sich eine Korrelation zwischen der Inhibition der Cyclooxygenase (COX) und der Cytotoxizität.^[83] Die COX-Inhibition durch Co-ASS ist stärker als durch Acetylsalicylsäure. Es konnte auch gezeigt werden, dass die COX-2 in unterschiedlichen Positionen von ASS und Co-ASS modifiziert wird.^[84, 85] Zusätzlich wurde eine Beeinflussung des IL-10 Levels und der Caspase-3-Aktivität gefunden, was zusammen auf einen apoptotischen Wirkmechanismus hinweist.^[84] In vivo konnte darüber hinaus eine Inhibition der Angiogenese beobachtet werden,^[86, 87] sowie eine Hemmung von MMP-7.^[84] Cobaltcarbonyl-Nukleoside zeigen eine zytotoxische Aktivität mit IC₅₀-Werten zwischen 5 und 50 µM, wobei hier bereits die Alkin-Vorstufen eine z.T. beachtliche Zytotoxizität zeigen.^[88, 89] Metzler-Nolte *et al.* untersuchten Cobaltcarbonyl-Enkephalin-Verbindungen, die aber eine wesentlich geringere tumorhemmende Aktivität als Co-ASS zeigen.^[90]



21

Abb. 1.10: Co-AAS (21).

Metallocen-dihalogenide d-elektronenarmer Übergangsmetalle (Cp₂MX₂, M = Ti, V, Nb, Mo, Ti) sind eine weitere Gruppe tumorhemmender Komplexe, wirksam gegen eine Vielzahl von Krebszelllinien wie Leukämiezellen (P388, L1210), Colon 38, Lewis Lungen Karzinom,

B16-Melanom und Ehrlich-Ascites-Tumor.^[23, 91-99] Die Aktivität der Metallocene scheint abhängig von ihrer Position im Periodensystem zu sein.^[94] Metallocene mit Ti, V, Nb, Mo als Zentralmetall haben ein vergleichbares tumorhemmendes Potential, wogegen Hf, Zr, Ta, W als Zentralmetall eine geringe bzw. keine Wirkung aufweisen.^[23, 91-99] Der vorgeschlagene Wirkmechanismus beinhaltet eine Metallocen-DNA-Interkalation^[100-103] und eine Inhibition der Topoisomerase II.^[104] Titanocendichlorid (Verb. **23**, Abb. 1.11) wurde als erste nicht platinhaltige Verbindung klinisch geprüft, erreichte sogar Phase II, zeigte aber nur eine geringe Wirksamkeit.^[105] Der Hauptnachteil dieser Verbindung ist ihre geringe Wasserlöslichkeit und ihre hydrolytische Instabilität unter physiologischen Bedingungen,^[106, 107] die mitverantwortlich für die geringe Wirksamkeit sind. Tacke *et al.* erreichten durch ein benzylsubstituiertes Titanocen-dichlorid bis zu 100-fach niedrigere IC₅₀-Werte als die Stammverbindung Titanocen-dichlorid.^[108]

Zu der Gruppe der Metallocene gehört ferner Ferrocen, einem sogenannten „Sandwichkomplex“ mit Eisen als Zentralatom zwischen zwei Cyclopentadien-Ringen. Ferrocen ist aufgrund seiner interessanten Eigenschaften seit seiner Strukturaufklärung durch Geoffrey Wilkinson und Ernst Fischer intensiv erforscht worden. Ferrocen selbst zeigt keinen zytotoxischen Effekt, allerdings wurde eine tumorhemmende Aktivität seiner oxidierten Form, dem Ferrocenium (Verb. **22**, Abb. 1.11), bereits 1984 als erste zytotoxische Eisenverbindung von Köpf-Mayer *et al.* entdeckt.^[109, 110] Der Wirkmechanismus wurde später von Osella *et al.*^[111, 112] untersucht und zeigte, dass Ferrocenium in der Lage ist, mit DNA zu interagieren und diese zu spalten.^[111, 113] Je nach Stabilität des Fe(III)-Kations werden IC₅₀-Werte von 10 - 400 µM erreicht.^[112] Ferrocen, gebunden an hydrophile Polymere, zeigt aufgrund der verbesserten Wasserlöslichkeit des Komplexes eine antiproliferative Aktivität,^[114] integriert in ein Nukleosid-Analogon zeigt Ferrocen einen apoptotischen Effekt.^[115]

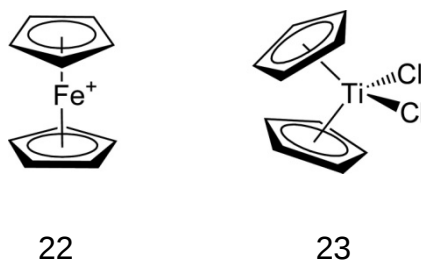


Abb. 1.11: Ferrocenium (**22**), Titanocendichlorid (**23**)

Die Zytotoxizität von Ferrocen-Verbindungen wurde von Jaouen *et al.* intensiv untersucht. Auf der Suche nach einem organometallischen Tamoxifenderivat mit verbesserten

Bindungseigenschaften entdeckte er das hochwirksame Ferrocifen (Abb. 1.12). Ferrocifen zeigt nicht nur eine gute Wirksamkeit gegen Estrogenrezeptor-positive MCF-7-Zellen, sondern auch einen hormonunabhängigen Effekt an der Estrogenrezeptor-negativen Zelllinie MDA-MB-231.^[116] Zur genaueren Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung wurden viele Derivate synthetisiert und vor allem auf ihre Estrogenrezeptor-Affinität, Zytotoxizität und Elektrochemie hin untersucht. Es zeigte sich, dass diese Verbindungen anscheinend über einem DNA-unabhängigen Mechanismus^[117] wirken, die Toxizität aber stark durch die redoxaktive Ferrocenyl-Gruppe beeinflusst wird.^[116] Ferrocen alleine ist nicht ausreichend, um eine zytotoxische Verbindung zu generieren;^[117] es scheint das Motiv [Fc]-[konjugierter Spacer]-[p-Phenol] entscheidend für einen starken zytotoxischen Effekt zu sein.^[118-122] Eine Ferrocen-vermittelte Oxidation läuft unter Bildung eines Quinon-Methid- (QM) Metaboliten ab (Abb. 1.12).

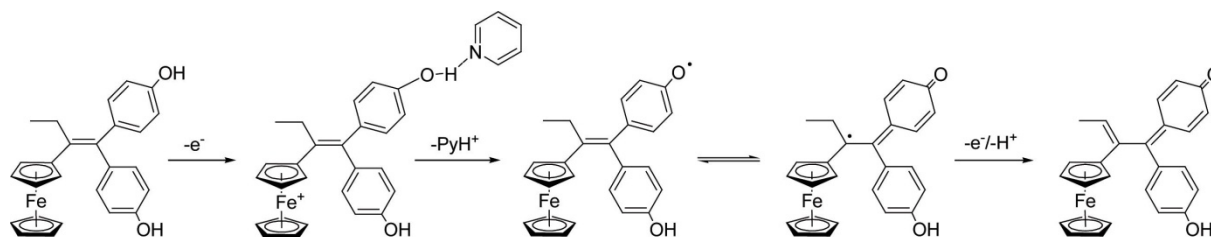
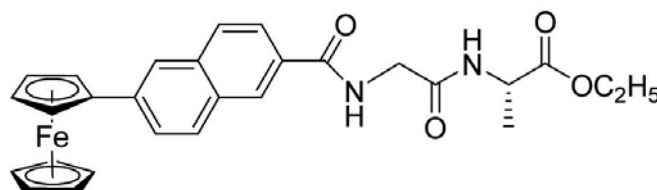


Abb. 1.12: Oxidation von Ferrocifen-Derivaten zum Quinon-Methid (QM).

Weiterhin weisen die Ferrocenyl-Benzoyl- und Ferrocenyl-Naphthoyl-Derivate (Abb. 1.13) mit kurzen Peptidsequenzen von Kenny *et al.* einen zytotoxischen Effekt auf.^[123-125] Diese Verbindungen sind vor allem gegen die Lungenkarzinom-Zelllinie H1299 aktiv.^[125] Ferrocenyl-Naphthoyl-Peptidkonjugate sind den analogen Ferrocenyl-Benzoyl-Derivaten in ihrer Aktivität überlegen,^[126] allerdings sind die Metallkomplexe ohne die Peptid-Komponente inaktiv. Es zeigte sich, dass Dipeptid-Konjugate die höchste Aktivität besitzen und eine Verlängerung oder Verkürzung der Peptidkette die Aktivität stark verringert.^[123]

Das Redoxpotential der Ferrocen-Verbindungen scheint eine wichtige Rolle für die Toxizität dieser Verbindungen zu spielen, zusätzlich hat die Wahl der Peptidsequenz einen großen Einfluss.^[123] Interessanterweise scheint auch eine Erhöhung der Lipophilie die Aktivität der Verbindungen zu erniedrigen,^[124] ferner erfolgt diese durch den Austausch eines Glycins in Nachbarposition zum Ferrocen. Bei diesen Verbindungen ist ein Zusammenspiel zwischen dem Metallkomplex und dem Peptid essenziell, weder die Metall- noch die Peptidkomponente führen für sich alleine genommen zu einer zytotoxischen Verbindung. Nur die Kombination beider Teile resultiert in hoch aktiven Verbindungen.



24

Abb. 1.13: *N*-(6-Ferrocenyl-naphthoyl)-Glycin-L-Alanin-ethylester (**24**).

In der Peptid-Rezeptor Radionuklid Therapie (PRRT) ist das Zusammenwirken der metallischen Komponente und des Peptidteils weit besser verstanden als bei Ferrocenyl-Dipeptidkonjugaten. Bei der Metallkomponente handelt es sich bei dieser Methode um ein toxisches Radionuklid. Es erfolgt eine selektive Aufnahme der Radionuklide über hochexprimierte Rezeptoren auf Tumoren mithilfe der Peptid-Komponente. Für diese Methode ist der Somatostatinrezeptor-2 (SSTR2) interessant, und zwar aufgrund seiner Überexpression auf der Oberfläche vieler Tumorzellen. Bei Verwendung von Verbindungen, bestehend aus einem zyklischen Octapeptid (z.B. Tyr³-Octreotid, Tyr³-Octreotat), einem Chelator (DTPA oder DOTA) und einem radioaktiven Element (¹¹¹In, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu), konnte mit allen drei Radionukliden eine Verbesserung der tumorinduzierten Symptome beobachtet werden. Mit der ersten Generation (¹¹¹In-Octreotid, ein β -Strahler) konnte nur selten eine Verkleinerung des Tumors erreicht werden.^[127-130] Folglich sind ¹¹¹In-Peptid-Konjugate nicht ideal für die PRRT.

Die zweite Generation, zu der ⁹⁰Y-DOTA-Tyr³-Octreotid (⁹⁰Y-DOTATOC, ein α - und β -Strahler) gehört, wurde in den klinischen Phasen I und Phase II untersucht.^[131-133] Ein objektives Ansprechen (Tumorregression über 50%) konnte für ⁹⁰Y-DOTATOC je nach Studie bei 9 bis 33% der Patienten erreicht werden.^[134-136]

Die dritte Generation von Octapeptid-basierten Arzneimitteln ist das ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tyr³-Octreotat (¹⁷⁷Lu-Octreotat). ¹⁷⁷Lu ist ein β -Strahler und ein leichter γ -Strahler; seine Eigenschaften als γ -Strahler können zum direkten Post-Therapie Imaging und zur Dosimetrie genutzt werden. Der Unterschied zwischen Octreotat und Octreotid besteht in einem C-terminalen Threonin im Octreotat anstelle des üblichen Threoninol. ¹⁷⁷Lu-Octreotat war im Tiermodell sehr erfolgreich in Bezug auf die Tumorregression und Überlebenszeit.^[137] Es zeigt im Vergleich zum ¹¹¹In-Octreotid eine vergleichbare Aufnahme

in Niere, Milz und Leber, aber eine drei- bis vierfache Anreicherung der Radioaktivität in vier von fünf Tumoren.^[138] Durch die Therapie mit ¹⁷⁷Lu-Octreotat kann beim Patienten eine Verlängerung der Überlebenszeit von dreieinhalb bis sechs Jahren erreicht werden.^[139-142] Ein objektives Ansprechen konnte mit ¹⁷⁷Lu-Octreotat bei 29% der Patienten mit endokrinen Tumoren erreicht werden und bei 16% der Fälle eine leichte Verbesserung (25 bis 50%ige Tumorregression).^[143, 144] Zusätzlich wurde eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität durch die Therapie erreicht.

Neben Octreotid bzw. Octreotat gibt es noch andere Peptide, die über einen überexprimierten Rezeptor in Tumore aufgenommen werden. Die für diese Arbeit interessanten Peptide werden im folgenden Kapitel 1.2 vorgestellt. Bei diesen handelt es sich um Peptide, die entweder rezeptorvermittelt oder über einen rezeptorunabhängigen Weg in Zellen aufgenommen werden, sowie Peptide, die ein spezifisches Organell als Ziel in der Zelle besitzen.

1.2 Peptide

Neurotensin:

Neurotensin (NT) ist ein aus 13 Aminosäuren aufgebautes Peptidhormon mit vielen zentralen und peripheren Funktionen.^[145-149] In der Peripherie hat es einen Effekt auf die gastrointestinale Motilität^[150-152] und die pankreatische und biläre Sekretion.^[153-155] Es erleichtert die Fettsäure-Translokation^[156-159] und hat einen immunprotektiven Effekt durch Interaktion mit Leukozyten. Im Zentralnervensystem (ZNS) bewirkt es Analgesie und Hypothermie und hat einen neuroleptischen Effekt.^[157, 158, 160] Außerdem stimuliert es die Proliferation von mehreren non-neoplastischen-gastroenteropankreatischen Geweben,^[161-164] verhält sich aber wie ein Wachstumshormon gegenüber Tumorzellen.^[161, 163, 165] NT wird effizient über drei Rezeptorsubtypen (NTR1-3) zeit- und temperaturabhängig internalisiert.^[166] Alle Subtypen erkennen die gleiche C-terminale Sequenz aus den Aminosäuren 8-13, die alle Bedingungen für eine vollständige Bindung am Neurotensin-Rezeptor (NTR) erfüllt.^[167, 168] Eine Vielzahl von Tumorgeweben exprimieren NTR, zu diesen gehören Brust-,^[169, 170] Lungen-^[171, 172] und Prostatakarzinome^[173-175] sowie Tumore des Gastrointestinaltrakts^[161] und der Bauchspeicheldrüse.^[176] So sind 90% der Pankreas-Karzinome NTR-positiv^[177], und 25% der Kolonkarzinome.^[175] NTR1 und NTR2 sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.^[178-180] NTR1 internalisiert NT effizient (die Internalisierung nach NT-Bindung beträgt 60%) und schnell (10 min),^[181, 182] der Rezeptor

wird aber nach Internalisierung nicht mehr zurück an die Zelloberfläche transportiert, sondern abgebaut (Abb. 1.14).^[183] Deswegen kommt es nach der Agonistbindung zu einer Desensibilisierung der Zelle.^[184] Die Mehrheit der bekannten Effekte von NT wird im ZNS und der Peripherie über den NTR1 vermittelt.^[185] NTR2 ist weniger leistungsstark (Effizienz der Internalisierung nach NT-Bindung beträgt 30 - 40%), aber der Rezeptor wird schnell wieder an die Zelloberfläche recycelt.^[183] NTR3 wird auch gp95 oder Sortilin genannt^[186] und gehört zu der neuen Familie der Vps10p-Rezeptoren.^[187] Der NTR3 kann neben NT eine Reihe anderer Liganden binden.^[186, 188-190] Nur ca. 5 - 10% des Rezeptors befindet sich an der Zelloberfläche.^[186] Trotzdem wird NT über den Rezeptor effektiv internalisiert, und durch Recycling des Rezeptors sind in der Regel konstante Level des Rezeptors an der Zelloberfläche vorhanden (Abb. 1.14).^[191] Die Aufgabe des NTR3 ist noch nicht eindeutig geklärt. Er dient eventuell dazu, Neurotensin aus der Zirkulation zu entfernen,^[192, 193] außerdem scheint er in proinflammatorischen Prozessen beteiligt zu sein^[194] oder als Corezeptor zu fungieren.^[195, 196] NTR3 wird von vielen menschlichen Krebszellen exprimiert^[161, 163, 165] und scheint in das NT-induzierte Zellwachstum involviert zu sein.^[197]

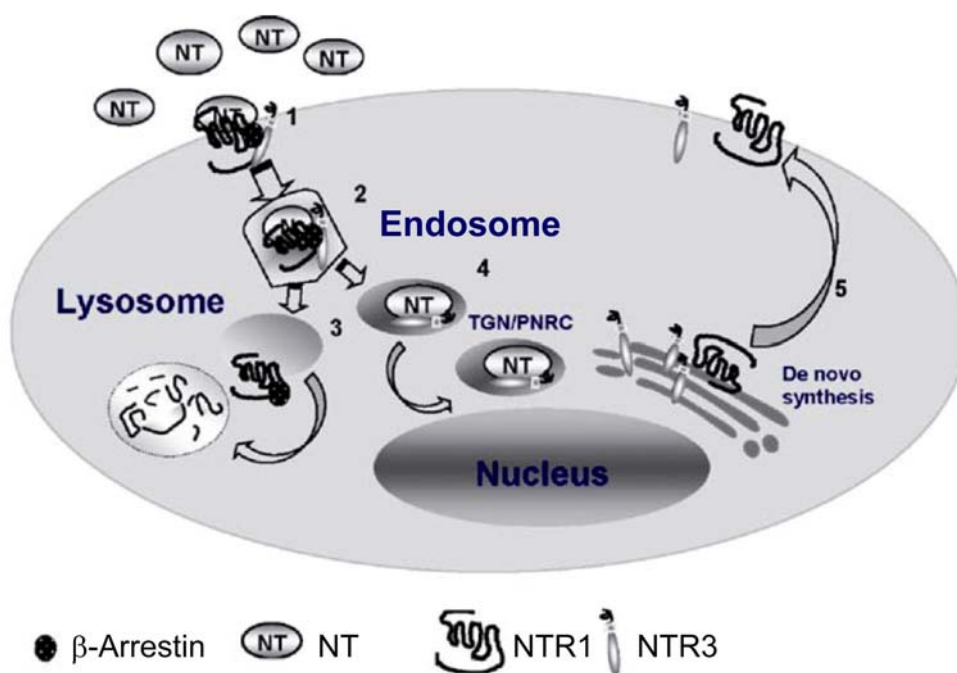


Abb. 1.14: Möglicher Mechanismus der Zellaufnahme von NT.^[185]

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete NT(8-13)-Sequenz lautet: Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu.

Somatostatin, Octreotid, Octreotat:

Somatostatin (SST) (Verb. 27, Abb. 1.15) inhibiert die Sekretion von Wachstumshormon, Insulin und Glucagon.^[198, 199] Es gehört zur Familie der Neuropeptide, ist aus 14 Aminosäuren aufgebaut^[200] und enthält eine Disulfidbindung. Somatostatin wird in der Zelle aus einem Präpro-Somatostatin, welches in das Pro-Somatostatin gespalten wird, gebildet. Das Pro-Somatostatin wird wiederum in zwei aktive Moleküle gespalten, eines ist SST, das andere ist die längere und potentere Form SST-28, bestehend aus 28 Aminosäuren.^[201] SST wirkt lokal und effektiv, bereits in nanomolaren Konzentrationen und wird danach rasch durch endosomale Endopeptidasen inaktiviert.^[202] SST wird über die membranständigen G-Protein gekoppelten Somatostatinrezeptoren (SSTR) aufgenommen,^[203] von denen es fünf Subtypen SSTR1-5 gibt. Ferner kommt SSTR2 in zwei gespleißten Varianten 2A und 2B vor. Alle fünf SSTR kommen im ZNS, Gastrointestinal-Trakt, in endokrinen und exokrinen Drüsen sowie auf Zellen des Immunsystems vor.^[204] Außerdem sind sie auf Tumoren, die aus SSTR-positivem Gewebe entstanden sind, vorhanden, wie z.B. neuroendokrine Tumore (NET), Tumore des bronchopulmonalen Systems, Tumore der Hypophysen, Meningiome, Medulloblastome, Brust- und Ovarienkarzinome sowie Adenokarzinome des Kolons.^[205]

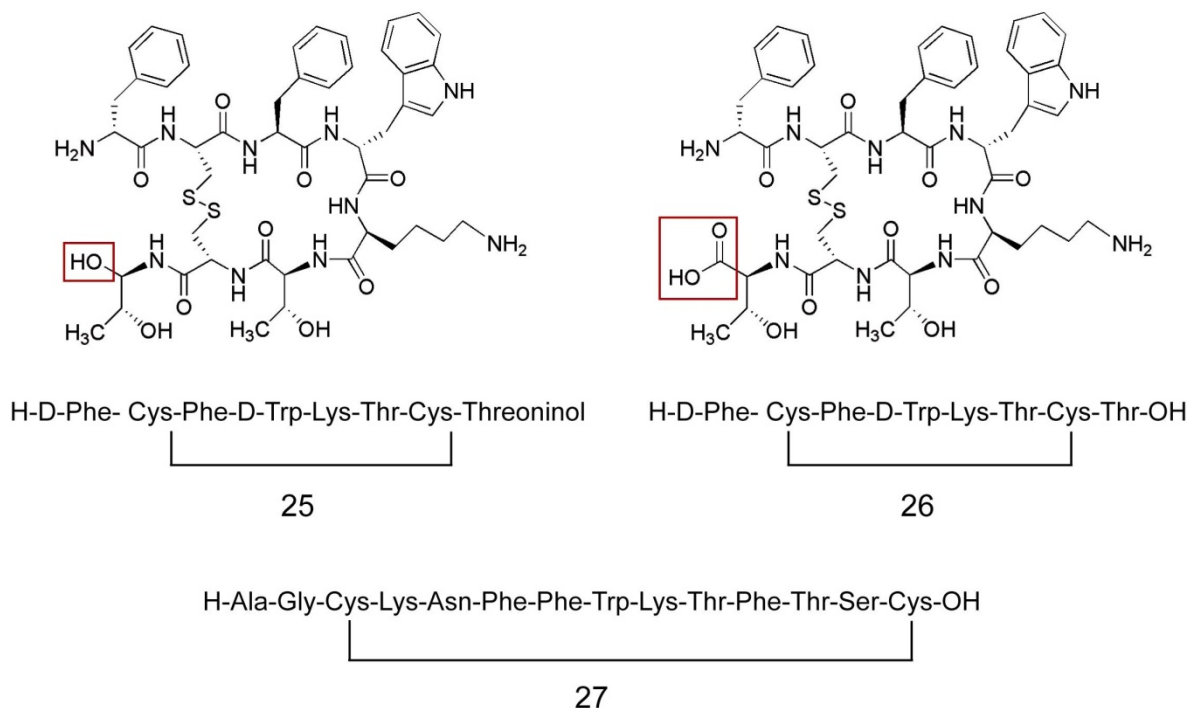


Abb. 1.15: Octreotid (25), Octreotat (26) und Somatostatin (27).

Somatostatin hat eine geringe Halbwertszeit von nur anderthalb bis drei Minuten; deswegen wurde für klinische Zwecke nach potenteren und langlebigeren Derivaten gesucht. Octreotid (Verb. 25, Abb. 1.15) ist das bekannteste und meist verwendete SST-Derivat mit einer Halbwertszeit von ca. zwei Stunden^[206] und einer zusätzlich verbesserten Wirkung.^[207] Es ist aus acht Aminosäuren aufgebaut, wobei zwei natürliche L-Aminosäuren gegen D-Aminosäuren ausgetauscht wurden und der C-Terminus eine Alkoholfunktion besitzt. Durch diese Veränderungen konnte das Peptid resistenter gegenüber enzymatischer Degradation gemacht werden.^[208] Ferner konnte die Wirkdauer von Octreotid durch Depot-Formulierungen (Octreotid-LAR) auf 28 Tage erhöht werden.^[209-211] Octreotid wird zur Verbesserung der Symptome eines Flush-Syndroms^[212] und Diarrhö bei pankreatischen endokrinen Tumoren verwendet.^[213] Es ist hauptsächlich für die symptomatische Therapie von Neuroendokrinen Tumoren und zur Stabilisierung des Krankheitsprozesses geeignet.

Octreotid hat eine hohe Affinität zu den Rezeptoren SSTR2 und SSTR5, eine mittlere Affinität zu SSTR3 und eine geringe Affinität zu SSTR1 und SSTR4.^[214] Es hat sich gezeigt, dass der Austausch der C-terminalen Alkoholfunktion gegen eine Säurefunktion die Tumorselektivität erhöht. Dieses Peptid wird Octreotate (Verb. 26, Abb. 1.15) genannt, dadurch konnte, im Vergleich zu Octreotid, eine bessere Bindung an SSTR-positive Gewebe erreicht werden. Octreotate hat zum SSTR2 eine sechs- bis neunfach höhere Affinität als Octreotid.^[215]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Octreotate-Sequenz verwendet.

Polyarginin: (Arg)₉-Phe-Phe:

Polyarginin gehört zu der Gruppe der „Cell Penetrating Peptides“ (CPP). CPPs können künstlich konzipiert oder aus natürlichen Peptidsequenzen abgeleitet sein. Sie sind in der Lage, rezeptorunabhängig in nahezu alle Zelltypen aufgenommen zu werden und darüber hinaus als Vektor für eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen, wie zum Beispiel niedermolekulare Arzneistoffe wie Aminoglycoside,^[216] makromolekulare Verbindungen wie Proteine, Antikörper, DNA und Antisense-Verbindungen, zu fungieren.^[217, 218] Für die Zellaufnahme sind die positiven Ladungen entscheidend.^[219] Eine effiziente Aufnahme wird durch sieben bis neun Ladungen erreicht, ferner werden Arginine gegenüber Lysin und Histidin bevorzugt.^[219, 220] Eine Kettenlänge von neun Argininen in der Sequenz zeigt eine optimale Aufnahme,^[221] die zusätzlich durch lipophile Aminosäuren verbessert wird. Ein

natürliches Peptidrückgrat ist für die Internalisierung nicht nötig, auch D-Aminosäuren,^[222] β -Peptide^[223, 224] und Peptide^[220] werden von Zellen aufgenommen.

Der Mechanismus der Zellaufnahme ist im Detail noch unklar.^[225] Die meisten mechanistischen Untersuchungen wurden mit fixierten Zellen durchgeführt,^[219, 226, 227] was aber die Lokalisierung von kationischen Peptiden verändert.^[228, 229] Raines *et al.* und Gongaves (2005) zeigen, dass die Interaktion mit Glykosaminoglykanen wie Heparansulfat und Proteoglykane an der Zelloberfläche eine entscheidende Voraussetzung für die Zellaufnahme ist.^[221] Das Peptid wird vermutlich über einen energieabhängigen Mechanismus, wahrscheinlich über aktive Endocytose, in die Zelle aufgenommen und konnte auch in lebenden Zellen, in endocytotischen Vesikeln beobachtet werden.^[228] Um die Vesikel verlassen zu können, muss Heparansulfat von Heparanasen abgebaut werden,^[230, 231] anschließend wird Polyarginin aus den Vesikeln freigesetzt (Abb.1.16).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenz ist von Inversen *et al.* publiziert worden. Inversen konstruierte ein Polyarginin-Derivat, dessen Sequenz neun Arginine enthält, sowie zwei Phenylalanine, um die Lipophilie zu erhöhen. Es zeigte sich, dass durch die Addition der Phenylalanine die Interaktion mit der Zellmembran, die Aufreinigung mittels RP-HPLC^[232] und die Zellaufnahme verbessert werden konnten.^[233, 234]

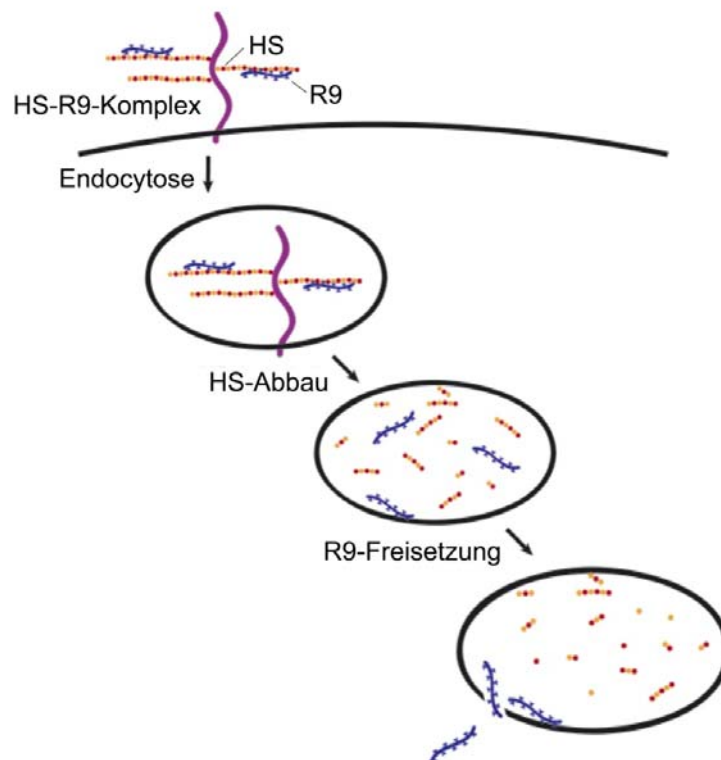


Abb. 1.16.: Endosomale Aufnahme mittels Heparansulfat (HS) und Freisetzung von Polyarginin (R9) ins Zytosol.^[221]

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sequenz lautet: (Arg)₉-Phe-Phe-Lys-NH₂.

Szeto-Schiller Peptide:

Szeto-Schiller (SS-) Peptide sind alternierend aus aromatischen und basischen Aminosäuren aufgebaut^[235, 236] und enthalten ein Tyrosin oder Dimethyltyrosin (Dmt). Sie sind bei physiologischem pH-Wert dreifach positiv geladen.^[237] Das intrazelluläre Ziel der Peptide sind die Mitochondrien (Abb. 1.17), in denen sie sich durch einen potentialabhängigen Mechanismus 1.000 bis 10.000-fach anreichern.^[235-239] 85% der in Mitochondrien aufgenommenen Peptide sind mit der inneren Membran assoziiert. In die Zelle gelangen sie durch Diffusion, ohne vesikuläre Lokalisierung,^[240] über einen energieunabhängigen Mechanismus. Das Gleichgewicht der Zellaufnahme ist in weniger als 30 Minuten erreicht.^[235, 240] Durch ihr Tyrosin/Dmt-Motiv sind sie in der Lage, die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Mitochondrien zu reduzieren, welches durch die Elektronenabgabe an ROS unter Bildung eines relativ unreaktiven Tyrosyl-Radikals geschieht. Durch Radikal-Radikal-Kopplung entsteht Dityrosin oder durch ein Superoxid bildet sich Tyrosin Hydroxyperoxid.^[238] Durch den Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin verliert das Peptid seine antioxidative Wirkung.

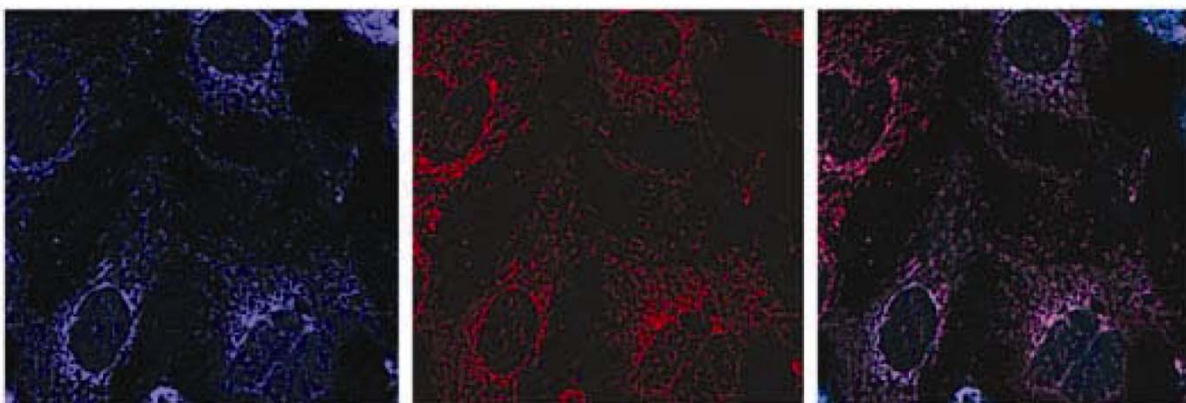


Abb. 1.17: Lokalisierung des fluoreszenzmarkierten SS-Peptids Dmt-D-Arg-Phe-atnDap-NH₂ in Caco-2-Zellen nach 30-minütiger Inkubation. SS-Peptids (links), in Mitochondrien lokalisierender Fluoreszenzfarbstoff: TMRM (Mitte), Overlay (rechts).^[240]

Die SS-Peptide haben ein interessantes pharmakokinetisches Profil. Sie sind klein, leicht zu synthetisieren, wasserlöslich und durch den Austausch von L-Arginin gegen D-Arginin in Position 1 oder 2 resistent gegenüber Peptidasen-Degradation. Zusätzlich ist es den Peptiden

möglich, die Blut-Hirnschranke zu überwinden und dort durch Bindung an den μ -Opioid-Rezeptor einen analgetischen Effekt zu bewirken. Die Peptide sind zur Therapie von Krankheiten entwickelt worden, bei denen die Bildung von ROS während des Krankheitsverlaufs einen entscheidenden Einfluss hat, wie z.B. bei neurodegenerativen Krankheiten, Diabetes,^[241] inflammatorischen Krankheiten, Arteriosklerose, Arthritis oder durch Arzneimittel induzierte Oxidation.^[240]

SS-Peptidsequenzen, die in der vorliegenden Arbeit als Leitstruktur benutzt wurden, sind:

- H-D-Arg – Phe – Arg – Tyr/Dmt-NH₂
- H-Phe – D-Arg – Tyr/Dmt – Arg-NH₂

MTS:

Mitochondria Targeting Sequenz oder auch Matrix Targeting Sequenz (MTS) ist eine N-terminale Präsequenz von mitochondrialen Proteinen, die aus 10-80 Aminosäuren besteht, mit der Aufgabe, Proteine in Mitochondrien zu transportieren. Sie sind reich an positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren, welche meist eine amphiphile α -Helix ausbilden.^[242] Für die Erkennung durch die mitochondriale Translokations-Maschinerie ist dieses Strukturmerkmal essentiell und enthält Informationen über den Bestimmungsort des Proteins innerhalb der Mitochondrien.

MTS verhelfen mitochondrialen Proteinen nach ihrer Synthese im Zytosol, in die Mitochondrien zu gelangen. Hierfür gibt es drei Wege: Die Translokation des Proteins in die Matrix, den Transport von Membranproteinen und der Transport in den Intermembran-Raum. Da der Hauptteil der Peptide die Matrix als Zielort hat, wird hier nur dieser Weg beschrieben. Nach der Translation des prämitochondrialen Proteins erfolgt die Translokation über einen Rezeptor, der sich an der Oberfläche von Mitochondrien befindet. Das Protein ist im Zytosol durch Hsp70 und Hsp90 stabilisiert und gelangt durch diese an die mitochondrialen Präprotein-Translokasen, den TOM Komplex in der äußeren Membran^[243-246] und den TIM23 Komplex in der inneren Membran.^[247-249] Die Komplexe interagieren während der Translokation miteinander. Die Translokation wird durch drei Komponenten ermöglicht: durch ein elektrisches Membranpotential-Gefälle und Hydrolyse von ATP und Hsp70.^[250, 251] Die N-terminale MT-Sequenz wird in den meisten Fällen von der mitochondrialen Protease MPP (mitochondrial processing peptidase) gespalten,^[252] wenn die Spaltstelle die Matrix erreicht, und verbleibt in der mitochondrialen Membran.

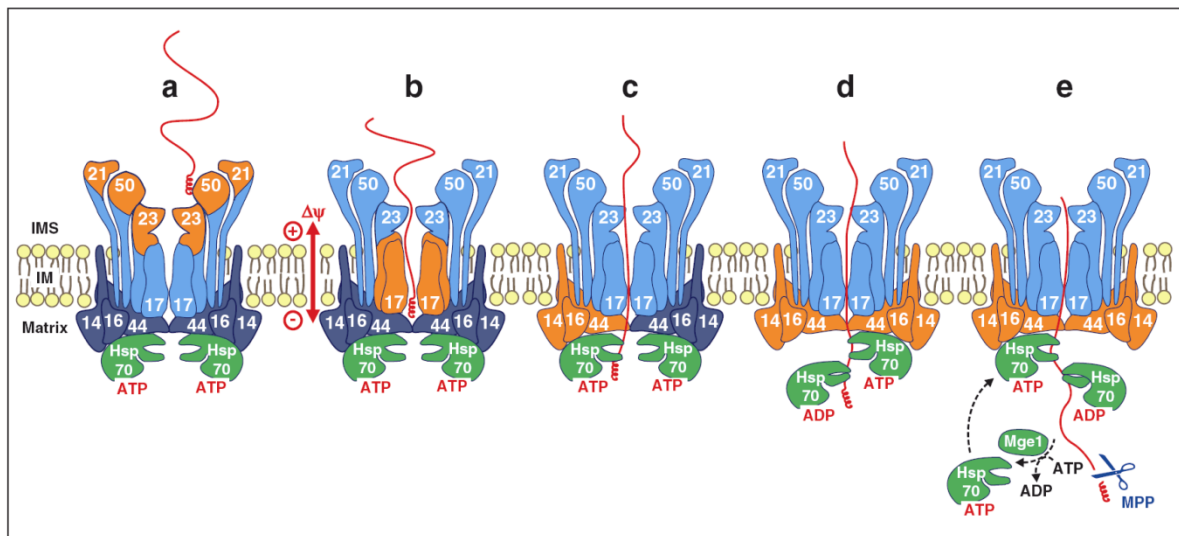


Abb. 1.18: (a) Bindung des Präproteins an den TIM-Komplex; (b) in einem membranpotential-abhängigem Schritt erreicht das Präprotein die Matrix; (c) das Präprotein bindet an das ATP-gebundene Hsp70; (d) durch ATP-Hydrolyse wird das Präprotein stark an das Hsp70 gebunden und vom TIM-Komplex befreit. (e) wiederholte Bindung von Hsp70, bis das Präprotein in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. (e) MTS-Sequenz wird durch MPP vom Protein abgetrennt.^[242]

Die in der vorliegenden Arbeit synthetisierte MTS-Sequenz wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Kawakami *et al.* verwendet.^[253]

H-Met-Leu-Ser-Leu Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-NH₂

1.3 Zielsetzung

Die Suche nach neuen Zytostatika mit neuen Wirkmechanismen hat die Forschung nach anorganischen Verbindungen vorangetrieben. Viele dieser Verbindungen sind sehr toxisch, weisen aber nur eine geringe Spezifität für Tumorzellen auf. Diese Spezifität wird meist durch vermehrte Generierung von ROS in Tumorzellen, Aktivierung der Verbindung unter den reduktiven Bedingungen des Tumors oder durch Transferrin-Bindung erreicht.

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese und Charakterisierung von potentiell zytotoxischen organometallischen-Peptidkonjugaten, um diese spezifisch in Tumorzellen einzuschleusen oder ausgesuchte Zellorganellen anzugreifen.

Es sollen Peptide synthetisiert werden, die über einen rezeptorvermittelten Prozess in die Zelle aufgenommen werden. Hierfür wurde Octreotat, das über die Somatostatin-Rezeptoren und Neurotensin(8-13), das über Neurotensin-Rezeptoren aufgenommen wird, ausgesucht, deren Rezeptoren auf verschiedenen Tumorzellen überexprimiert werden. Es werden Biokonjugate synthetisiert, die in Mitochondrien lokalisieren, sowie Biokonjugate von „Cell Penetrating Peptides“. Als Organometallkomponente sollen vor allem die Metallocene Ferrocen, Ruthenocen und Cobaltocenium verwendet werden, aber auch zusätzlich Cobaltcarbonyl-Spezies.

Die Biokonjugate sollen in einer guten Reinheit und Ausbeute erhalten und vollständig mittels ESI- bzw. MALDI-Massenspektrometrie (MS), HPLC und NMR charakterisiert werden. Neben den Metallocen-Peptidkonjugaten sollen diese für die biologischen Untersuchungen zusätzlich mit einem Fluorophor ausgestattet werden. Hierfür werden Metallocenoyl-Peptidkonjugaten mithilfe der Festphasen Peptidsynthese mittels der Fmoc-Strategie hergestellt. Die Metallkomponente soll am N-Terminus oder an einer Aminosäuren Seitenkette in das Biokonjugat eingeführt werden.

Biologische Tests und mikroskopische Untersuchungen sollen Aufschluss über die Zellaufnahme, Lokalisierung und antiproliferative Aktivität und einen möglicherweise vorhandene Relation zwischen Zellaufnahme, Wirkort und Zytotoxizität geben.

2 Synthese und Charakterisierung

2.1 Einleitung

Zur Synthese der Biokonjugate wurde die Festphasen-Peptidsynthese gewählt. Sie erfolgte manuell in einer Filterspritze oder mittels eines Mikrowellen-Peptidsynthesizers. Anschließend wurden die Verbindungen vom Harz gespalten, gereinigt und charakterisiert. Für die Charakterisierung wurden HPLC, Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und Cyclovoltammetrie genutzt.

Die Peptidsynthese erfolgte unter Verwendung der Fmoc-Strategie, d.h., die Aminosäuren waren N-terminal mit einer Fmoc-Gruppe geschützt. Als feste Phase wurde das Rink-Amid- oder Wang-Harz mit einem säurelabilen Linker verwendet. Je nach Art des Harzes erhielt man nach Spaltung des Peptids vom Harz C-terminal eine Säure- oder Amidfunktion. Bei nicht vorbeladenen Harzen wie dem Rink-Amid Harz ist die Kupplung der Aminosäure unmittelbar am Harz schwieriger; deswegen wurde hier die Kupplungszeit erhöht. Der Aufbau der Peptidsequenz beginnt mit dem Entschützen der Fmoc-Gruppe an der α -Aminogruppe der Aminosäure (bei einem vorbeladenen Harz) oder mit der Entschützung der funktionellen Gruppe des Harzes (z.B. Rink-Amid) durch Piperidin. Die Fmoc-Schutzgruppe wird dabei in der Position 9 des Fluorens deprotoniert, und es kommt in einer Gleichgewichtsreaktion zur Bildung eines Carbanions. Durch Abspaltung von Dibenzofulven und Kohlenstoffdioxid wird schließlich die freie α -Aminogruppe erhalten (Abb. 2.1).

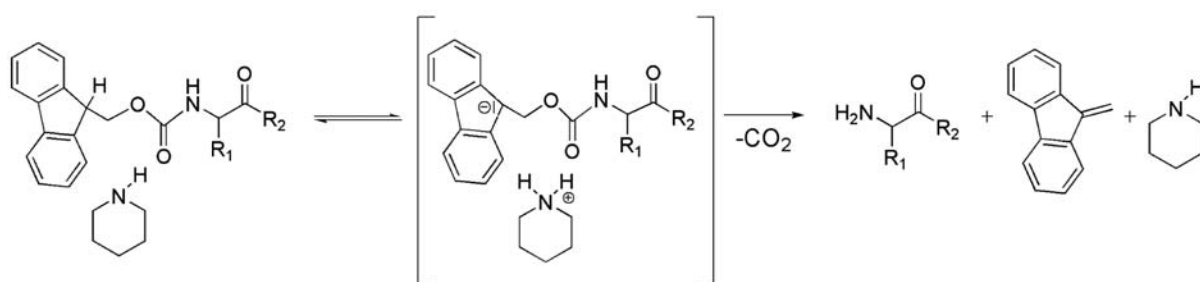


Abb. 2.1: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Die Carboxylfunktion der zu kuppelnden Fmoc-Aminosäuren wurde mit TBTU, HOBt und der Base DIPEA, unter Bildung eines Aktivesters, aktiviert (Abb. 2.2).

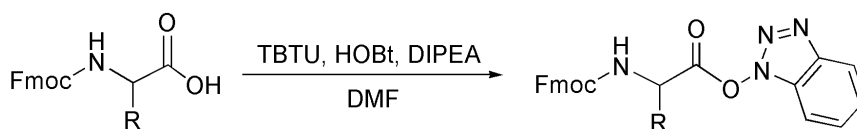
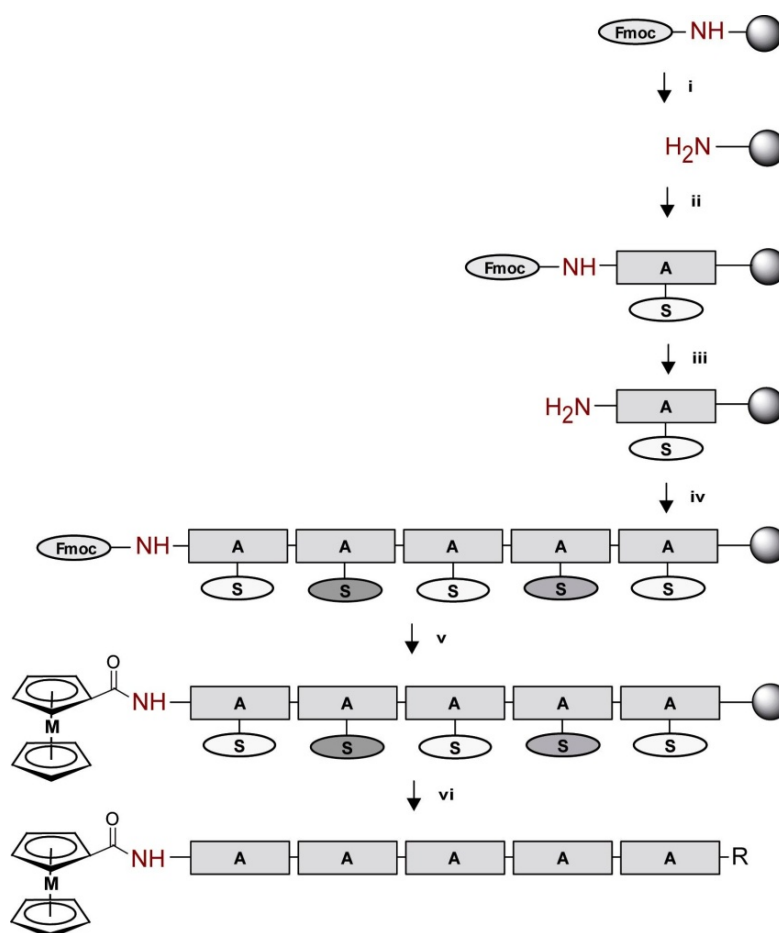


Abb. 2.2: Aktivierung einer Aminosäure mit TBTU, HOBT und DIPEA.

Die aktivierte Aminosäure wird an die freie α -Aminogruppe unter Ausbildung einer Peptidbindung gekuppelt. Durch Wiederholung dieses Kupplungs- und Entschützungs-kreislaufs wird die Aminosäuresequenz aufgebaut. Der N-Terminus der finalen Aminosäure bleibt frei, wird acetyliert oder mit Pentinsäure bzw. einer Metallocen-Carbonsäure umgesetzt (Abb. 2.3).



A : Aminosäure; S : Schutzgruppe; M : Fe, Ru, Co⁺; R : OH, NH₂

Abb. 2.3: Syntheschema der Festphasenpeptidsynthese: (i) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF; (ii) Kupplung einer Aminosäure: Fmoc-Aminosäure, TBTU, HOBT, DIPEA in DMF; (iii) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF; (iv) Bildung der Peptidkette; (v) Fmoc-Entschützung und Metallocen-Kupplung: Metallocen-Carbonsäure, TBTU, HOBT, DIPEA in DMF und (vi) Abspaltung vom Harz: 85% TFA, 10% Phenol, 5% TIS.

Die Acetylierung erfolgt durch ein Gemisch aus Acetanhydrid und DIPEA in DMF. Danach wird das Harz mit verschiedenen Lösemitteln gewaschen und getrocknet. Die Spaltung der Peptid-Derivate vom Harz erfolgt mit einer hochkonzentrierten TFA-Lösung für mindestens 90 Minuten, während simultan die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt werden. Nach dem Filtrieren der Lösung werden die Biokonjugate durch kalten Ether gefällt; durch Zentrifugation kann die Ether-Lösung abgetrennt und der Rückstand in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch gelöst werden. Anschließend wird die Lösung filtriert und mittels RP-HPLC analysiert und gegebenenfalls aufgereinigt.

Metalocen-Kupplung: Die Seitenketten-geschützten Peptide wurden an der festen Phase mit den Metalloenen funktionalisiert. Diese wurden als Metalloen-Carbonsäure an den N-Terminus oder an eine zuvor orthogonal entschützte Lysin-Seitenkette gebunden. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mithilfe des Kaisertests^[254] geprüft, wobei die Cobaltocenium-Carbonsäure- und die Seitenketten-Kupplung meist wiederholt werden mussten. Um eine Oxidation während der Abspaltung zu verhindern, wurde bei den Ruthenocen- und Ferrocen-Biokonjugaten der Abspatlösung Phenol zugesetzt.

FITC-Kupplung: Die Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-Kupplung erfolgt an die Seitenkette eines zusätzlich eingefügten Lysins. Um eine selektive Kupplung zu erreichen, wurde dieses Lysin mit der äußerst säurelabilen 4-Methyltrityl-Schutzgruppe (Mtt) verwendet.

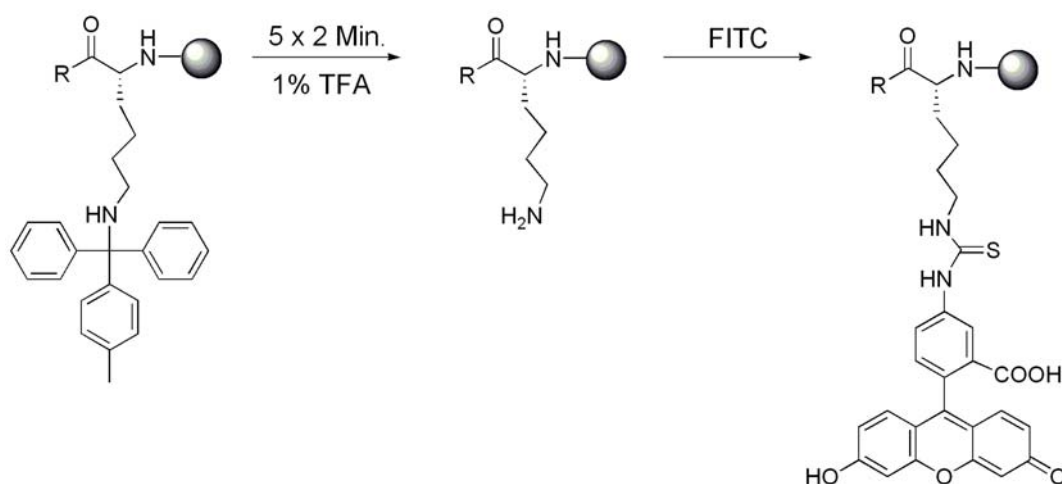


Abb. 2.4: Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe und anschließender Kupplung mit FITC.

Diese wurde selektiv nach der Synthese des Seitenketten-geschützten Peptids am Harz mit 1% TFA in DCM unter Zusatz von 5% TIS gespalten. Das Biokonjugat wurde unter diesen Bedingungen weder vom Harz gespalten, noch wurden die übrigen Seitenketten-Schutzgruppen entfernt. Im nächsten Schritt wurde der Fluoreszenzmarker FITC im fünffachen Überschuss in DMF für fünf Stunden unter Lichtausschluss an das Seitenketten-Amin gekoppelt (Abb. 2.4). Während der weiteren Synthese und Charakterisierung wurde unter Lichtausschluss gearbeitet. Aufgrund der Kupplung von FITC an der festen Phase konnten hohe Reinheiten erzielt werden.

Reinigung: Die acetylierten Peptide, Alkin-Peptide und Ruthenocenoyl-Biokonjugate konnten meist in ausreichender Reinheit erhalten werden, so dass eine Reinigung des Rohprodukts nicht nötig war. War allerdings eine Ferrocen-, FITC- oder Cobaltocenium-Gruppe im Biokonjugat vorhanden, mussten diese Verbindungen größtenteils mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden. Der Grund hierfür war entweder die teilweise Oxidation des Ferrocens während der Spaltung vom Harz oder eine unvollständige FITC- bzw. Cobaltocenium-Kupplung. Cobaltcarbonyl-Biokonjugate konnten, bedingt durch die Gefahr der Abspaltung der Carbonyl-Gruppen unter vermindertem Druck, nicht aufgereinigt werden und mussten deshalb möglichst rein hergestellt werden. Aus diesem Grund wurde der Verlauf der Cobaltcarbonyl-Kupplung mittels analytischer HPLC verfolgt. Das Biokonjugat wird durch Entfernen der THF-Lösung nach Trocknung im Stickstoffstrom erhalten.

Charakterisierung: Die Reinheit der synthetisierten Biokonjugate wurde mithilfe analytischer HPLC geprüft. Die Identität der Verbindungen wurde durch Massenspektrometrie (ESI und MALDI) und mit NMR-Experimenten (^1H und ^{13}C) bestätigt. Weiterhin wurde das elektrochemische Verhalten für ausgewählte Verbindungen mit Cyclovoltammetrie untersucht.

Die erfolgreich synthetisierten Verbindungen sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Fc, Cc, Rc, Co bzw. $\text{Co}_2(\text{CO})_6$ stehen für $\text{CpFeC}_5\text{H}_4^-$, $\text{CpCo}^+\text{C}_5\text{H}_4^-$, $\text{CpRuC}_5\text{H}_4^-$ und alkingebundenes Cobaltcarbonyl. NT steht für Neurotensin, Octreo für Octreotat, PolyR für Polyarginin, MTS für Mitochondria Targeting Sequenz und scr für eine veränderte Reihenfolge der Aminosäuresequenz. Pgl steht für Propargylglycin und Acm für die Acetamidomethyl-Schutzgruppe. Die Sequenz wurde im Einbuchstabencode angegeben, hierbei stehen Großbuchstaben für L-Aminosäuren und Kleinbuchstaben für D-Aminosäuren.

Tab. 2.1: Übersicht über die synthetisierten Verbindungen.

Nr.	Abkürzung	Sequenz
<u>1</u>	FcCOOH	$\text{CpFeC}_5\text{H}_4\text{COOH}$
<u>2</u>	RcH	Cp_2Ru
<u>3</u>	RcCOOH	$\text{CpRuC}_5\text{H}_4\text{COOH}$
<u>4</u>	CcCOOH	$\text{CpCo}^+\text{C}_5\text{H}_4\text{COOH PF}_6^-$
<u>5</u>	Ac-Octreo-OH	Ac-fCFwKTCT-OH
<u>6</u>	Ac-Lys(FITC)-Octreo-OH	Ac-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>7</u>	FcC(O)-Octreo-OH	FcC(O)-fCFwKTCT-OH
<u>8</u>	FcC(O)-Lys(FITC)-Octreo-OH	FcC(O)-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>9</u>	FcC(O)-Lys(FITC)-Octreo(Acm)-OH	FcC(O)-K(FITC)-fC(Acm)-FwKTC(ACM)-T-OH
<u>10</u>	RcC(O)-Octreo-OH	RcC(O)-fCFwKTCT-OH
<u>11</u>	RcC(O)-Lys(FITC)-Octreo-OH	RcC(O)-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>12</u>	CcC(O)-Octreo-OH	CcC(O)-fCFwKTCT-OH
<u>13</u>	CcC(O)-Lys(FITC)-Octreo-OH	CcC(O)-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>14</u>	Pent-Octreo-OH	Pentin-fCFwKTCT-OH
<u>15</u>	Co-Pent-Octreo-OH	$\text{Co}_2(\text{CO})_6$ -Pent-fCFwKTCT-OH
<u>16</u>	Ac-PolyR-Lys-NH ₂	Ac-RRRRRRRRRFFK-NH ₂
<u>17</u>	Ac-PolyR-Lys(FITC)-NH ₂	Ac-RRRRRRRRRFFK(FITC)-NH ₂
<u>18</u>	FcC(O)-PolyR-Lys-NH ₂	FcC(O)-RRRRRRRRRFFK-NH ₂
<u>19</u>	FcC(O)-PolyR-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-RRRRRRRRRFFK(FITC)-NH ₂
<u>20</u>	RcC(O)-PolyR-Lys-NH ₂	RcC(O)-RRRRRRRRRFF-K-NH ₂
<u>21</u>	RcC(O)-PolyR-Lys(FITC)-NH ₂	RcC(O)-RRRRRRRRRFF-K(FITC)-NH ₂
<u>22</u>	Ac-NT-Lys(FITC)-NH ₂	Ac-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>23</u>	FcC(O)-NT-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>24</u>	FcC(O)-NTscr-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-IPLRYRK(FITC)-NH ₂
<u>25</u>	FcC(O)-Lys(FITC)-NT-OH	FcC(O)-K(FITC)-RRPYIL-OH
<u>26</u>	RcC(O)-NT-Lys(FITC)-NH ₂	RcC(O)-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>27</u>	CcC(O)-NT-Lys(FITC)-NH ₂	CcC(O)-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>28</u>	RcC(O)-NT-OH	RcC(O)-RRPYIL-OH

<u>29</u>	RcC(O)-Pgl-NT-OH	RcC(O)-Pgl-RRPYILK-OH
<u>30</u>	RcC(O)-Pgl(Co)-NT-OH	RcC(O)-Pgl(Co ₂ (CO) ₆)-RRPYILK-OH
<u>31</u>	Ac-Phe-Arg-Phe-Lys-NH ₂	Ac-FRFK-NH ₂
<u>32</u>	FcC(O)-Arg-Phe-Lys-NH ₂	FcC(O)-RFK-NH ₂
<u>33</u>	FcC(O)-Phe-Arg-Phe-Lys-NH ₂	FcC(O)-FRFK-NH ₂
<u>34</u>	Ac-Phe-Arg-Phe-Lys(FITC)-NH ₂	Ac-FRFK(FITC)-NH ₂
<u>35</u>	FcC(O)-Arg-Phe-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-RFK(FITC)-NH ₂
<u>36</u>	FcC(O)-Phe-Arg-Phe-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-FRFK(FITC)-NH ₂
<u>37</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Phe-Lys-Lys(Ac)-NH ₂	NH ₂ -FrFKK(Ac)-NH ₂
<u>38</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Phe-Lys-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -FrFKK(FcC(O))-NH ₂
<u>39</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Phe-Lys-Lys(RcC(O))-NH ₂	NH ₂ -FrFKK(RcC(O))-NH ₂
<u>40</u>	NH ₂ -D-Arg-Phe-Lys-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -rFKK(FcC(O))-NH ₂
<u>41</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Lys(FcC(O))-Lys- NH ₂	NH ₂ -FrK(FcC(O))-K-NH ₂
<u>42</u>	NH ₂ -MTS-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFK-NH ₂
<u>43</u>	NH ₂ -MTS-Lys(Ac)-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(Ac)-NH ₂
<u>44</u>	NH ₂ -MTS-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(FcC(O))-NH ₂
<u>45</u>	NH ₂ -MTS-Lys(FITC)-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(FITC)-K(FcC(O))-NH ₂
<u>46</u>	NH ₂ -MTS-Lys(RcC(O))-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(RcC(O))-NH ₂

2.2 Synthese der Neurotensin-Biokonjugate

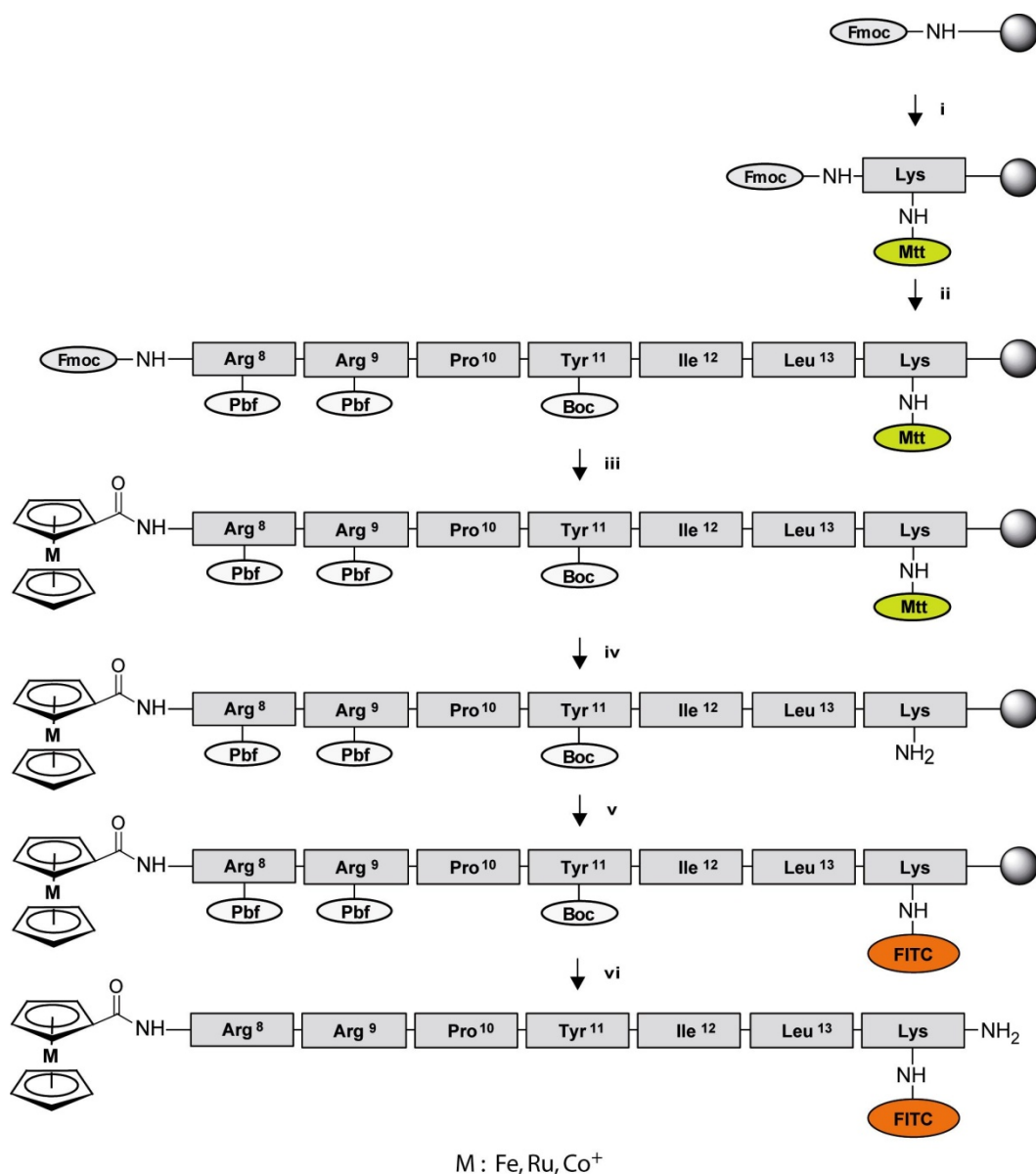


Abb. 2.5: Syntheschema von FITC markiertem Metalloceenoyl-NT: (i) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF, Kupplung von Fmoc-Lysin(Mtt)-OH: Fmoc-Lysin(Mtt)-OH, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (ii) schrittweise Bildung der Peptidkette; (iii) Fmoc-Entschützung und Metalloceen-Kupplung: Metalloceen-Carbonsäure, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF (iv) Mtt-Entschützung: 1% TFA, 5% TIS in DCM; (v) FITC-Kupplung: FITC, DIPEA in DMF und (vi) Abspaltung vom Harz: 85% TFA, 10% Phenol, 5% TIS.

Für die Synthese der Neurotensin-Biokonjugate wurde die verkürzte Neurotensin-Sequenz (Aminosäuren 8-13) aus sechs Aminosäuren mit der Sequenz Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu verwendet. Die Synthese des Peptidanteils wurde meist manuell, seltener am Synthesizer durchgeführt, und zwar aufgrund der z.T. unvollständigen Arginin-Kupplung am Synthesizer. Das Peptid wurde an einem Rink-Amid Harz aufgebaut, das nach Abspaltung ein Säureamid am C-Terminus besitzt. Die funktionellen Gruppen der Peptidseitenketten wurden während

der Synthese mit den Schutzgruppen Pbf (Arginin) und Boc (Tyrosin) geschützt. Die Einführung des Fluoreszenzfarbstoffes FITC erfolgte über ein zusätzliches C-terminales Lysin, ausgestattet mit der äußerst säurelabilen Mtt-Gruppe. Diese kann mit 1% TFA gespalten werden, ohne die Pbf- oder die Boc-Schutzgruppe zu entfernen.

Im ersten Schritt wurde die Peptidsequenz aufgebaut, anschließend am N-Terminus eine Metallocen-Carbonsäure gekuppelt (23-29) oder der N-Terminus acetyliert (22). Aufgrund der säurelabilen Mtt-Gruppe mussten während der Synthese basische Bedingungen sichergestellt werden. Im nächsten Schritt wurde die Mtt-Schutzgruppe der Verbindungen 22-27 entfernt und FITC an die freie Aminfunktion gekuppelt. Nach sorgfältigem Waschen des Harzes mit DMF, DCM und MeOH, wurde es unter vermindertem Druck getrocknet. Das Peptid wurde von dem getrockneten Harz durch eine 85 bis 95%ige TFA-Lösung gespalten und gleichzeitig die säurelabilen Pbf- und Boc-Schutzgruppen entfernt. Das Peptid wurde aufgrund der schwer spaltbaren Pbf-Gruppen über vier Stunden mit der Spalllösung inkubiert.

Die Synthese der Peptidsequenz war manuell einfach durchzuführen; allerdings kam es am Synthesizer häufiger zu einer unvollständigen Kupplung der Aminosäure Arginin. Bei der Kupplung der Metallocen-Carbonsäure traten hingegen keine Probleme auf. Die Cobaltocenium-Kupplung wurde vorsichtshalber wiederholt, da aufgrund der Spaltung der Mtt-Gruppe unter den Kaisertest-Bedingungen freie Amine entstehen und der Test somit zur Kontrolle der Kupplung ungeeignet ist. Die Ruthenocen- und Ferrocen-Funktionalisierung verliefen ohne Probleme, hier war eine einfache Kupplung ausreichend. Allerdings wurde Ferrocen durch die Abspaltbedingungen - trotz Phenolzugabe - zu einem kleinen Teil oxidiert.

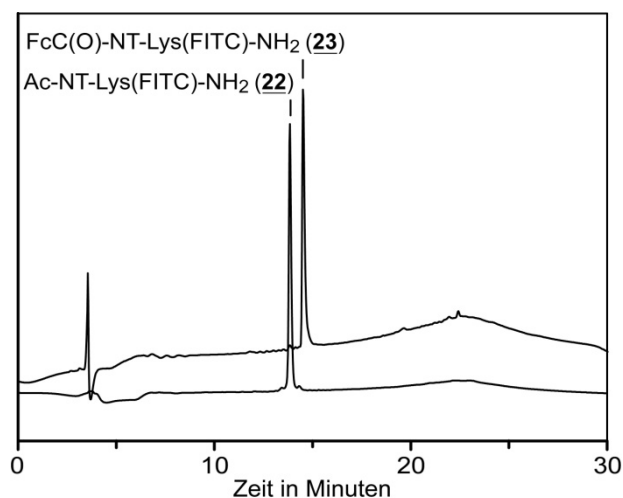


Abb. 2.6: Chromatogramm der Verbindungen 22 und 23 bei 220nm gemessen.

Auch die FITC-Kupplung verlief ohne Schwierigkeiten, wobei wegen der nicht vollständigen Kupplung die Produkte mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden mussten, was zu einer starken Reduktion (60-90%) der Ausbeute führte.

Ferrocen- und Ruthenocen-Derivate besitzen eine höhere Lipophilie im Vergleich zu **22** (Abb. 2.6) und **27** und zeigen daher eine höhere Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm. ESI- und MALDI-Untersuchungen bestätigen die Identität der Verbindungen und können bedingt zur Untersuchung der Reinheit herangezogen werden (Abb. 2.7). Die Untersuchung mittels MALDI-MS zeigt eine hohe Ungenauigkeit; vor allem bei der Messung FITC-markierter Konjugate, liegen die erhaltenen Massen deutlich über der errechneten. Eventuell könnte hier eine $[M+3H]^+$ -Spezies vorliegen.

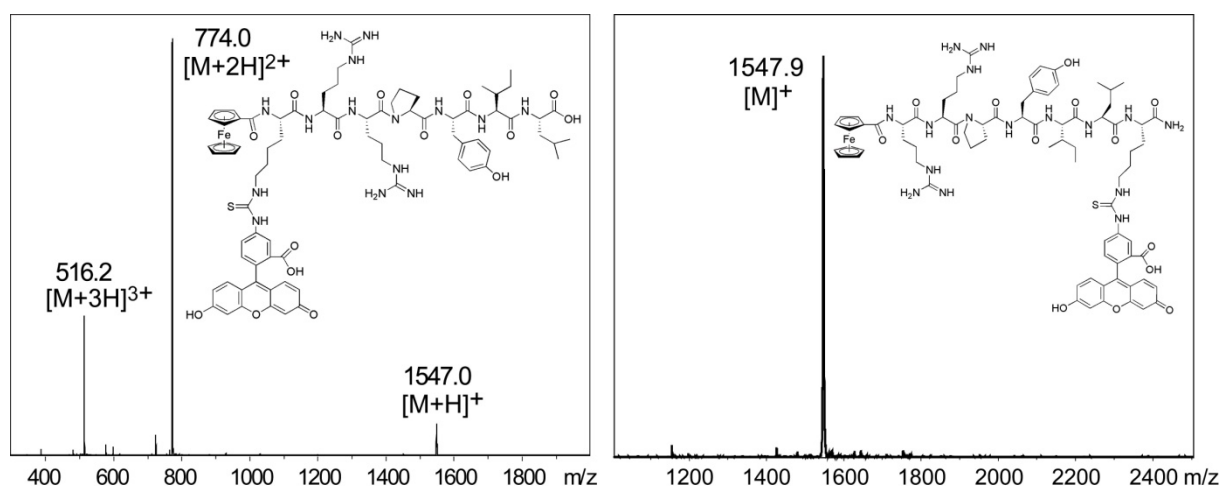


Abb. 2.7: ESI (pos.)-Spektrum der Verbindung **25** (links); MALDI-Spektrum der Verbindung **23** (rechts).

Die Synthese von $RcC(O)-Pgl-NT-OH$ (**29**) wurde an einem Leu-Wang Harz durchgeführt. Dieses resultiert nach Abspaltung vom Harz in einer C-terminalen Carbonsäure. Die NT(8-13)-Sequenz wurde am Harz aufgebaut, danach wurde Fmoc-Propargylglycine N-terminal gekuppelt und zuletzt der N-Terminus mit Ruthenocen-Carbonsäure funktionalisiert. Das Biokonjugat wurde vom Harz gespalten und entschützt. An die Alkinfunktion von **29** wurde im letzten Schritt mittels Schlenktechnik in Lösung selektiv Dicobaltoctacarbonyl gebunden (Abb. 2.8). Der Verlauf der Reaktion wurde mithilfe analytischer HPLC verfolgt (Abb. 2.9). Die Synthese des Ferrocenderivats ($FcC(O)Pgl(CO_2(CO)_6)-NT-OH$) wurde versucht; allerdings zersetzte sich die Ferrocen-Funktion des $FcC(O)-Pgl-NT-OH$ bereits in deuteriertem DMSO; aufgrund dessen wurde die Cobaltcarbonyl-Kupplung nur mit der stabileren Verbindung **29** durchgeführt.

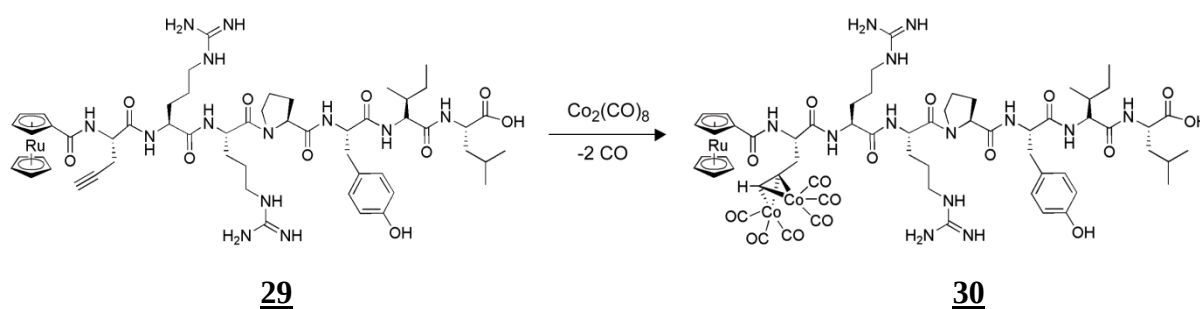


Abb. 2.8: Cobaltcarbonyl-Funktionalisierung; Reaktion von 29 zu 30.

Die Dicobaltoctacarbonyl-Kupplung an Pentin-NT-OH ist aufgrund der Polarität der Verbindung nicht in THF, sondern nur in MeOH durchführbar, führt aber zu einer schlechten Ausbeute. Es konnte auf diesem Weg nur eine Ausbeute von 9% erhalten werden.^[255] In 29 konnte durch die Funktionalisierung von Neurotensin mit Ruthenocen, das zusätzlich eine Alkinfunktion durch das Propargylglycin besitzt, die Lipophilie erhöht werden. Infolgedessen konnte die $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ Kopplung in wasserfreiem THF durchgeführt werden, wodurch die Ausbeute auf 73% erhöht werden konnte und sich die Reaktionszeit verkürzte. Bereits nach 20 Minuten hatte sich 29 zu 80% zu 30 umgesetzt.

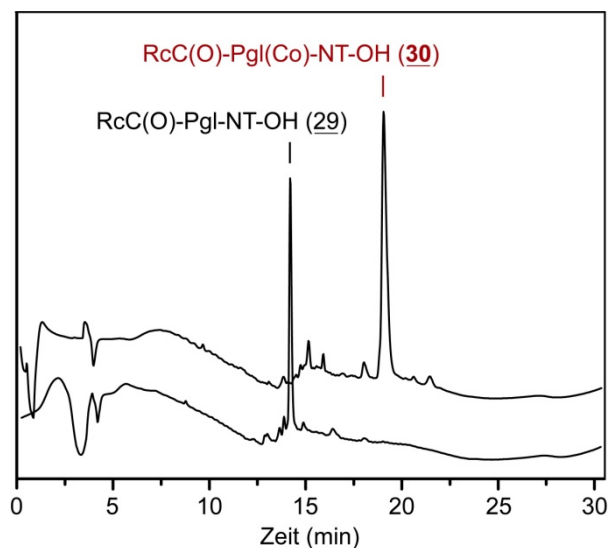


Abb. 2.9: Untersuchung der $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ -Kupplung mithilfe analytischer HPLC bei 220nm; Edukt 29 (unten); Produkt 30 nach 3 Stunden (oben).

Die Verbindung 29 wurde vollständig mit ESI-MS, HPLC und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Das analytische HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts zeigt eine Reinheit von 90%. Um die Ausbeute nicht zu verringern, wurde diese Verbindung nicht aufgereinigt, sondern das Rohprodukt mit $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ umgesetzt.

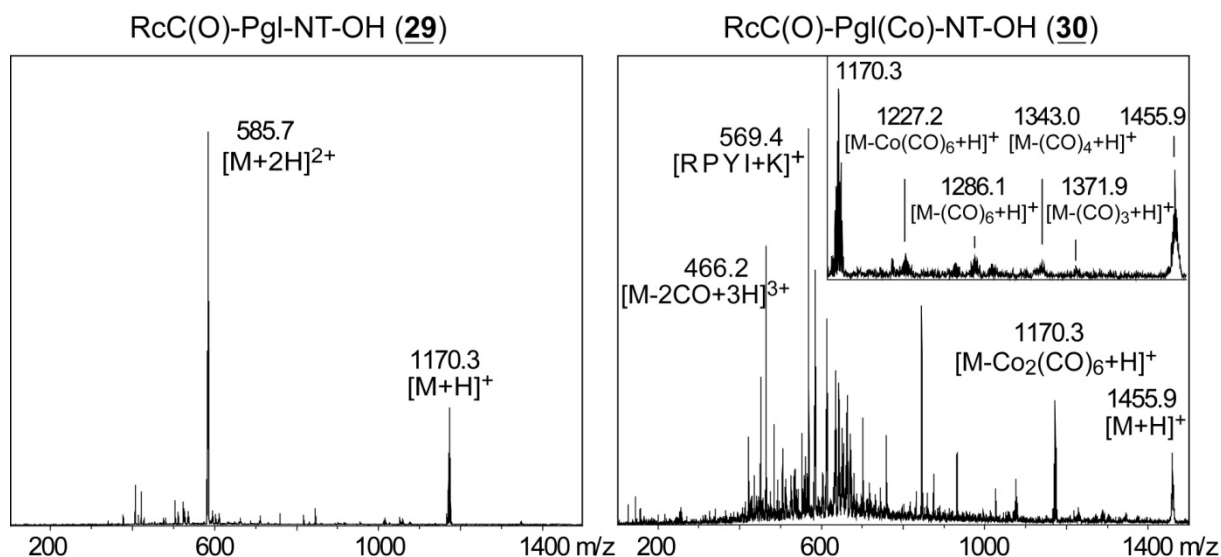


Abb. 2.10: ESI (pos.)-Spektrum: **29** (links), **30** (rechts).

Das ESI-Spektrum von **30** zeigt den Molekülpeak, sowie verschiedene Fragmente, die eine Co und CO Abspaltung zeigen (Abb. 2.10). Die Signale der Verbindung **30** können nur sehr schwach im ESI-Spektrum erhalten werden. Die ESI-Methode war aber im Gegensatz zur Untersuchung mittels MALDI in der Lage, den Massenpeak zu detektieren. Hier kam es in der Gasphase zum kompletten Verlust der Cobaltcarbonylgruppe. Trotz des schlechten Signal- zu Rausch-Verhältnisses konnten im ESI-Spektrum der Molekülpeak $[M+H]^+$, $[M+3H]^{3+}$, $[M-2CO+3H]^{3+}$, das Peptidfragment- $[Arg-Pro-Tyr-Ile+K]^+$ und $[M-Co_2(CO)_6+H]^+$ identifiziert werden. Weitere Signale, die Abspaltprodukte von **30** durch Fragmentierung der Cobaltcarbonylgruppe zeigen, sind äußerst schwach vorhanden. Das IR-Spektrum weist die charakteristischen Banden der CO-Schwingung einer Dicobalthexacarbonyl-Einheit bei 2095, 2053 und 2021 cm^{-1} auf.

2.3 Synthese der Octreotat-Biokonjugate

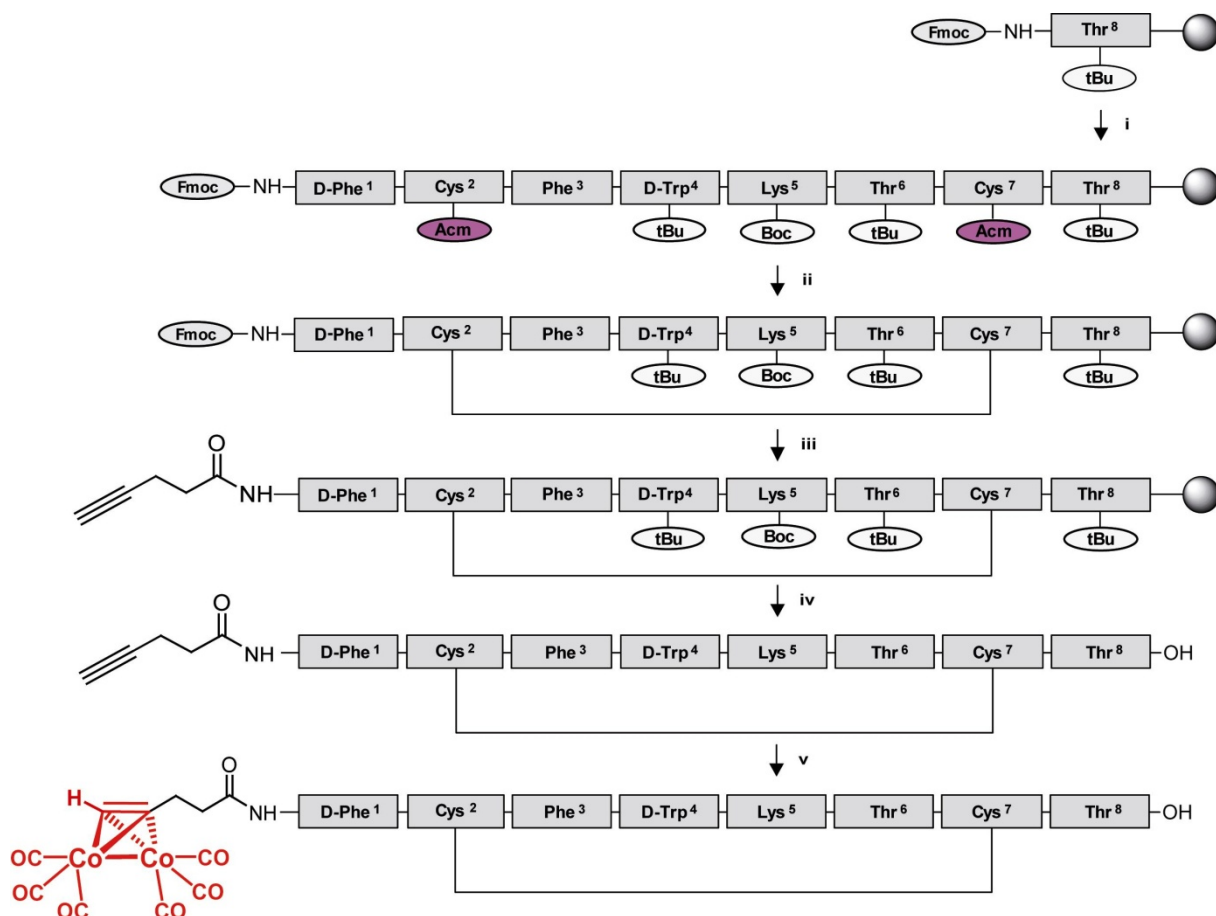


Abb. 2.11: Syntheschema des Cobaltcarbonyl-Octreotats: (i) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF; Schrittweise Bildung der Peptidkette: Fmoc-Aminosäure, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (ii) Bildung der Disulfidbindung: Tl(TFA)₃ in DMF; (iii) Fmoc-Entschützung und Pentinsäure-Kupplung: Pentinsäure, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (iv) Abspaltung vom Harz: 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS und (v) Dicobaltoctacarbonyl-Kupplung: Co₂(CO)₈ in THF.

Octreotat ist das Säurederivat des cyclischen Octapeptids Octreotids, das über eine intramolekulare Disulfidbrücke verfügt. Die Synthese erfolgte an einem mit der Aminosäure Threonin vorbeladenen Wang-Harz. Nach Abspaltung des Peptids vom Wang-Harz wurde C-terminal eine Säurefunktion erhalten. Nach dem Aufbau der Aminosäuresequenz (D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr) am Harz wurde die Disulfidbrücke eingeführt; hierfür mussten die Seitenkettenschutzgruppen orthogonal abspaltbar sein. Die Seitenketten der Cysteine wurden deshalb mit der thalliumsalzlabilen Acm-Gruppe geschützt, während für alle anderen Seitenketten säurelabile Schutzgruppen verwendet wurden. Die Acm-Schutzgruppe der Cysteine wurde mit einem Thallium(III)-trifluoracetat in einem Schritt abgespalten und die Thiolgruppe unter Bildung einer Disulfidbrücke oxidiert. Anschließend wurde das Peptid N-terminal acetyliert bzw. mit einer Alkin- oder Metallocen-

Carbonsäure gekuppelt. Danach wurde das Harz gewaschen, getrocknet und das entstandene Peptid mit einer hochkonzentrierten TFA-Lösung für 90 Minuten vom Harz gespalten, während gleichzeitig die säurelabilen Schutzgruppen der Seitenketten entfernt wurden. Durch die Verwendung des Wang-Harzes wurde C-terminal eine Säurefunktion erhalten. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die FITC-Derivate **6**, **8**, **9**, **11** und **13** synthetisiert. Der Fluoreszenzmarker FITC wurde über ein zusätzliches Lysin benachbart zum Metallozen ins Biokonjugat eingefügt, da ein freier C-Terminus an Thr⁸ für die Rezeptorbindung benötigt wird. Die Synthese verlief erfolgreich, es kam aber durch eine z.T. unvollständige Kupplung des Fluorescein-Isothiocyanats zu Nebenprodukten, was eine Reinigung mittels präparativer HPLC erforderte. Die nicht mit einem Fluorophor markierten Biokonjugate **5**, **10**, **14** und **15** konnten in 90-95%iger Reinheit erhalten und infolgedessen nicht präparativ gereinigt werden. Alle Octreotat-Biokonjugate wurden mithilfe HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert (Abb. 2.12).

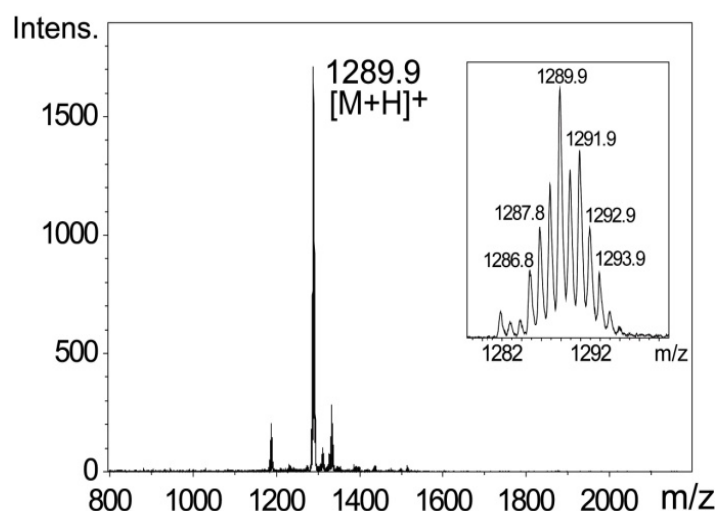


Abb. 2.12: MALDI-Spektrum des Rohprodukts **10** mit Vergrößerung der Isotopenaufspaltung des Molekülpeaks.

5, **7**, **10**, **12**, **14** wurden zusätzlich durch 1D- und 2D-NMR Spektroskopie untersucht. Abbildung 2.14 zeigt das HMBC-Spektrum, mithilfe dessen in Kombination mit dem H,H-TOCSY die Bestätigung der Peptidsequenz möglich war (Abb. 2.13).

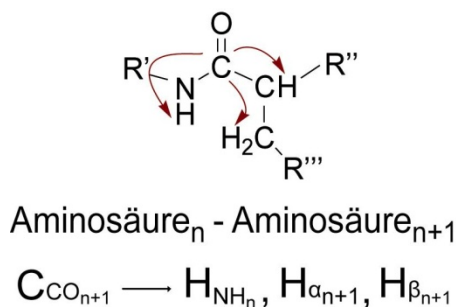


Abb. 2.13: Kopplung des Carbonylkohlenstoffs der Amidfunktion im HMBC zur Aufklärung der Peptidsequenz; (R' , R'' , R''' : Reste).

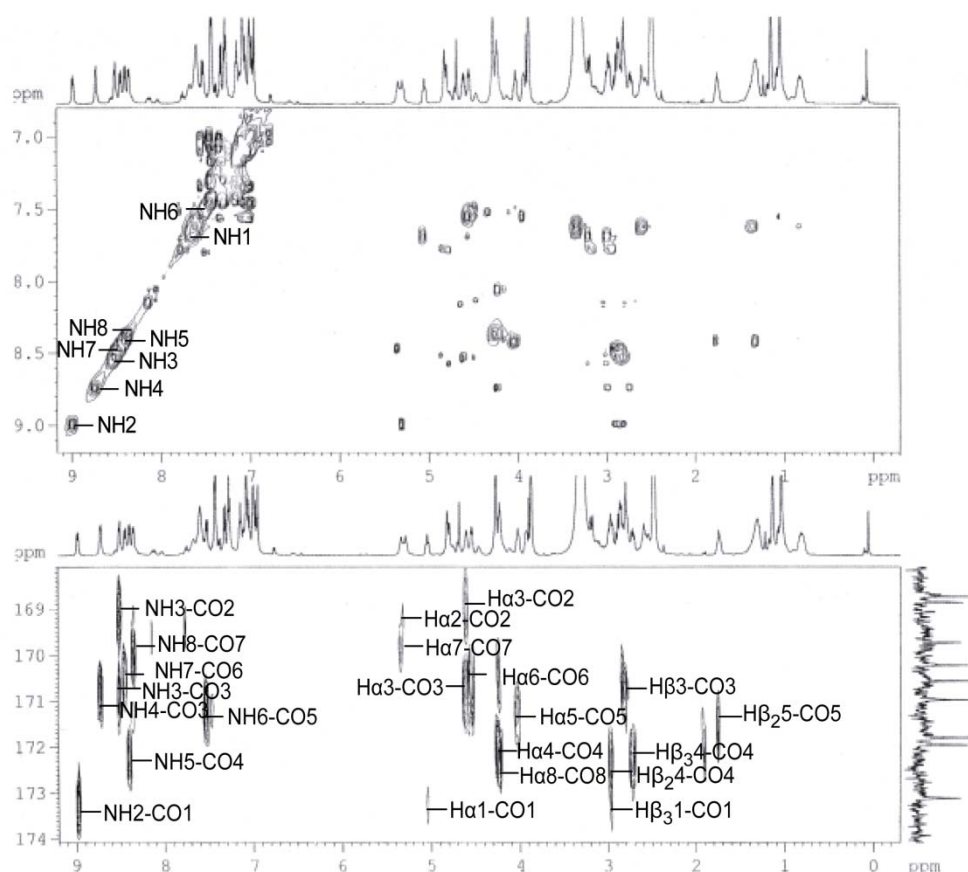


Abb. 2.14: NMR-Spektren H,H -TOCSY (oben), HMBC (unten) von **2** (600 MHz, $DMSO-d_6$).

Die Acm-Schutzgruppen konnten durch das Thallium-Salz vollständig entfernt und im Anschluss die freien SH-Gruppen erfolgreich, unter Bildung einer Disulfidbrücke, oxidiert werden. Bei einigen Octreotat-Biokonjugaten entspricht der Basispeak des ESI-MS- bzw. MALDI-Spektrums dem Peak mit der Masse $[M+3H]^+$. Die Auflösung, die mittels der MALDI-Experimente erhalten wird, ist nicht exakt genug, um mit Sicherheit die reduzierte Spezies $[M+3H]^+$ identifizieren zu können; dennoch liegen die gemessenen Massen über denen der $[M+H]^+$ Spezies. Der $[M+3H]^+$ Basispeak weist auf eine Reduktion der

Disulfidbindung hin. Um zu unterscheiden, ob es sich bei diesem Peak um ein Artefakt der MS-Messung handelt oder um eine Reduktion bzw. unvollständige Oxidation während der Synthese, wurden IR-, Raman- und NMR- Untersuchungen durchgeführt. Das NMR-Spektrum gibt mittels der chemischen Verschiebung der Cystein C_β -Signale Auskunft über das Vorhandensein einer SH- bzw. SS-Bindung. Durch die SH-Gruppe kommt es zu einer chemischen Verschiebung um 25 ppm der Cystein C_β -Signale. Durch das Vorhandensein der Disulfidbrücke wird das Signal Tieffeld zu Werten um 40 ppm verschoben;^[256] alle gemessenen Octreotat-Biokonjugate zeigen eine chemische Verschiebung der Cystein C_β -Signale größer 40 ppm (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: ^{13}C -NMR-Signal der C_β -Verschiebung der Cysteine im Octreotat bzw. Cystein und Cystin.

Verbindungen	Cys ₂ C_β	Cys ₇ C_β
Ac-Octreo-OH	46.5 ppm	45.2 ppm
FcC(O)-Octreo-OH	46.1 ppm	45.1 ppm
RcC(O)-Octreo-OH	44.1 ppm	44.9 ppm
CcC(O)-Octreo-OH	44.4 ppm	44.6 ppm
Pentin-Octreo-OH	45.4 ppm	44.3 ppm
Cystein	25.2 ppm	
Cystin	40.7 ppm	

Ein weiteres Indiz für das Vorhandensein einer Disulfidbrücke ist das Fehlen der charakteristischen SH-Schwingung im IR-Spektrum im Bereich von $2600\text{--}2550\text{ cm}^{-1}$ (Abb. 2.15) sowie das Vorhandensein der SS-Schwingung im Raman-Spektrum bei $450\text{--}600\text{ cm}^{-1}$.

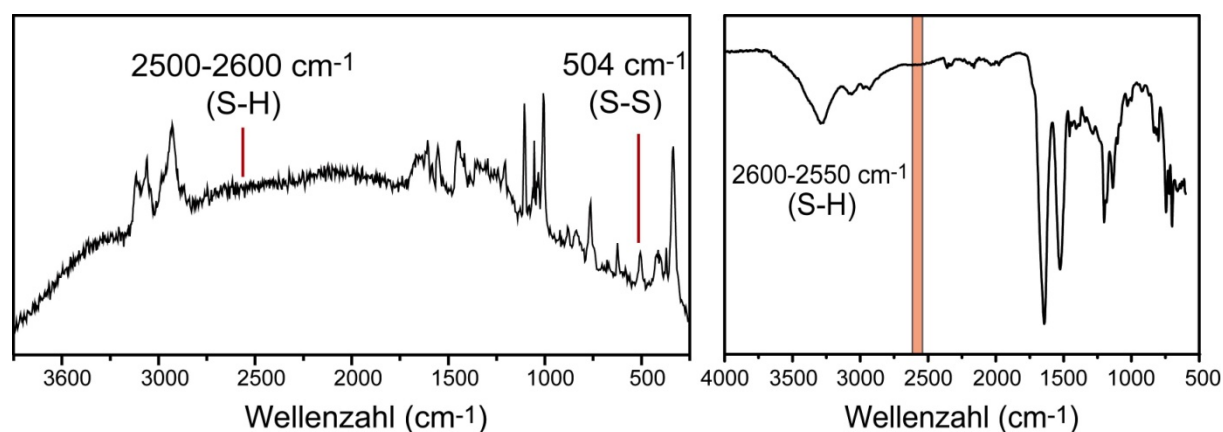


Abb. 2.15: Raman-Spektrum der Verbindung **10** (links); IR-Spektrum der Verbindung **10** (rechts).

Alle untersuchten Octreotat-Biokonjugate weisen ein Raman-Signal in diesem Bereich auf, und zusätzlich zeigen sie kein Signal der ThiolSchwingung im Bereich von $2500\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ (Abb. 2.15 und Tab. 2.3). Das Raman-Spektrum von **7** konnte nicht bestimmt werden, da sich die Verbindung durch die hohe Energie des Lasers während der Messung zersetzte. Aus den Ergebnissen der Messungen lässt sich folgern, dass die Reduktion der Disulfid-Bindung ein Artefakt der MS-Messung ist und die Oxidation der Thiol-Gruppen zur Disulfidbrücke während der Synthese vollständig verläuft.

Tab. 2.3: Gemessene Werte der Raman-Schwingungen der Disulfidbindungen von **5**, **10**, **12**, **14**, **15**.

Verbindung	S-S Bande
Ac-Octreo-OH (5)	503.9 cm^{-1}
RcC(O)-Octreo-OH (10)	503.9 cm^{-1}
CcC(O)-Octreo-OH (12)	508.5 cm^{-1}
Pent-Octreo-OH (14)	508.5 cm^{-1}
Co-Pent-Octreo-OH (15)	501.7 cm^{-1}

Die Kupplung der Metallocene konnte erfolgreich durchgeführt werden; dieses wird durch das Vorhandensein der Cp-Protonensignale im NMR-Spektrum deutlich (Abb. 2.16).

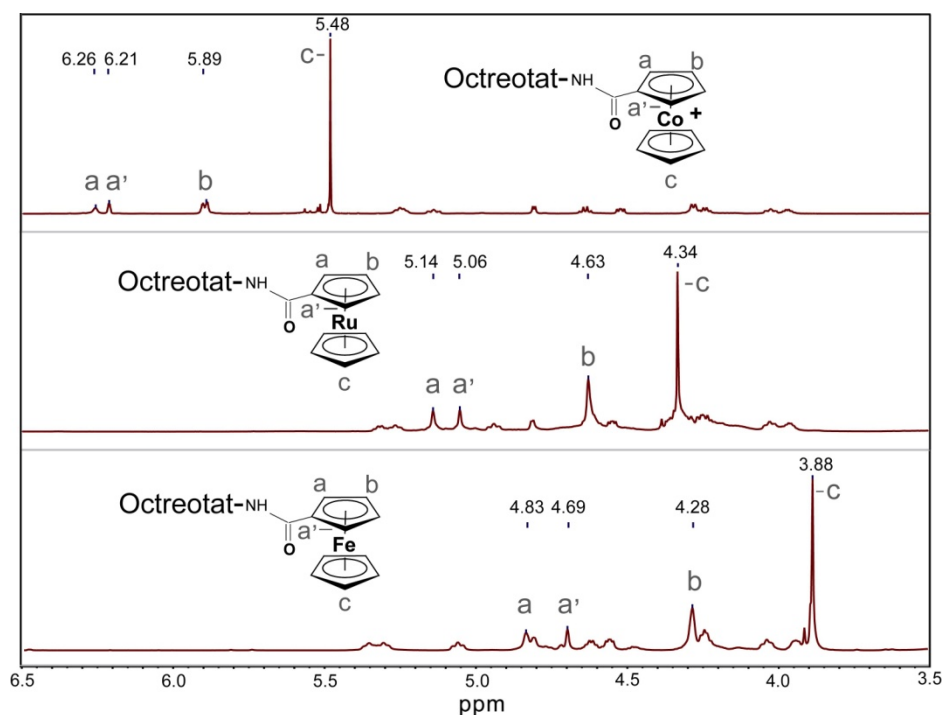


Abb. 2.16: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren der Biokonjugate **12**, **10** und **7**.

Aufgrund der verschiedenen Metalle haben die Metallocen-Protonen unterschiedliche chemische Verschiebungen. Diese liegen bei **12** zwischen 6.3 ppm und 5.5 ppm, bei **10** zwischen 5.1 ppm und 4.3 ppm und bei **7** zwischen 4.8 ppm und 3.9 ppm. Aufgrund ihrer Nähe zum chiralen C $_{\alpha}$ -D-Phenylalanin sind die Cp₂- und Cp₃-Signale (a- und a'-Signale in Abb. 2.16) magnetisch inäquivalent und spalten in zwei Signale mit jeweils einem Proton auf.

Die Metallocene unterscheiden sich hinsichtlich ihrer elektrochemischen Eigenschaften und konnten mittels Cyclovoltammetrie (CV) charakterisiert werden. Sie haben aber darüber hinaus auch sehr unterschiedliche Löslichkeitseigenschaften. So ist Ruthenocen-Octreotat für ein CV-Experiment nicht ausreichend in ACN löslich; zusätzlich liegt sein Oxidationsbereich nahe dem von Wasser. Deswegen musste die Messung in entgastem, wasserfreien DMSO durchgeführt werden, da nur in DMSO alle drei Biokonjugate (**7**, **10**, **12**) ausreichend löslich waren und somit die Messung unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden konnte.

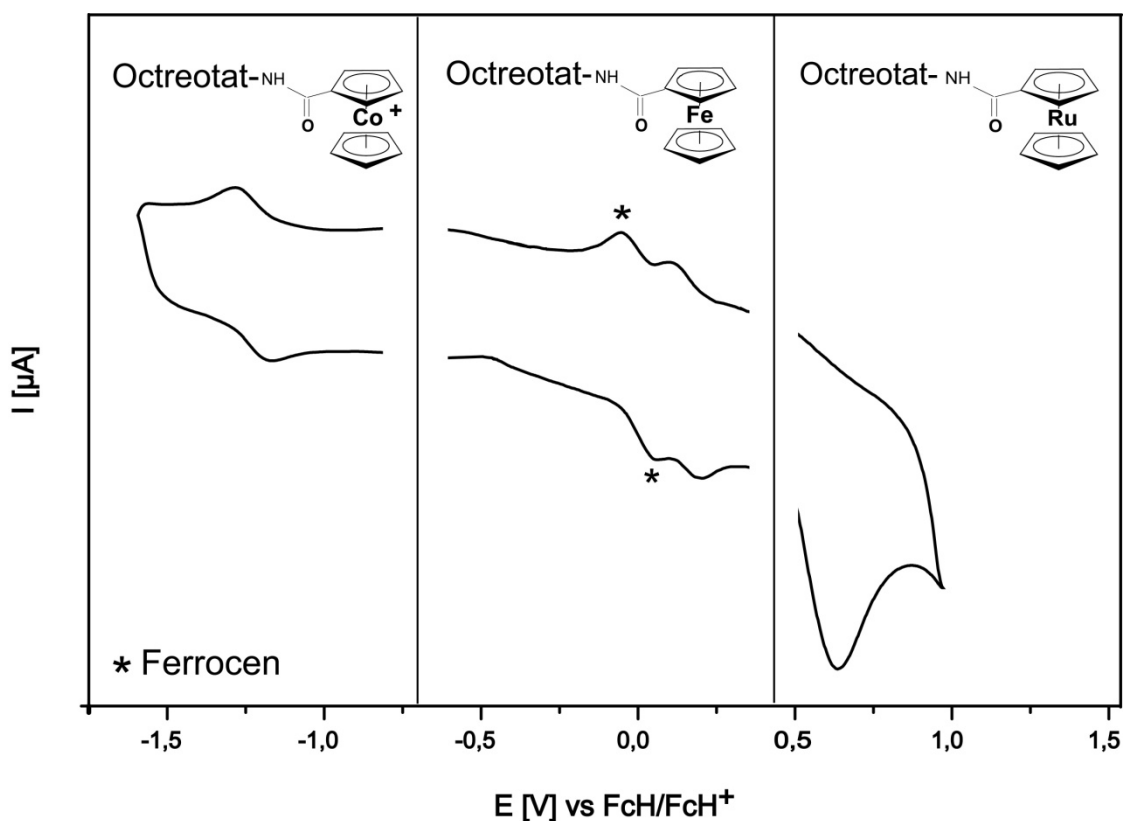


Abb. 2.17: Überlagerung der Cyclovoltammogramme von **7**, **10** und **12**, gemessen in DMSO bei 250 mV/s Scangeschwindigkeit.

Verbindung **10** weist mit einem Oxidationspotential von 0.53 V gegen Ferrocenium/Ferrocen kein reversibles Verhalten auf. Das Biokonjugat **7** ist unter den elektrochemischen Messbedingungen in DMSO nicht stabil und zeigt deswegen nur ein quasi-reversibles Verhalten mit einem Halbstufenpotential von 0.14 V. In DMSO sowie ACN zeigt **12** ein quasi-reversibles Verhalten. Sein Halbstufenpotential liegt bei -1.18 V in DMSO bei einer Scangeschwindigkeit von 250 mV/s (Abb. 2.17).

Die Synthese von **15** erforderte ein Octreotat mit einer Alkinfunktion; zu diesem Zweck wurde N-terminal Pentinsäure an Octreotat gekuppelt. Die Synthese von **14** erfolgte in guten Ausbeuten (89%) und Reinheiten ($> 90\%$), so dass eine Aufreinigung nicht notwendig war. Die Cobaltcarbonyl-Funktionalisierung von **14** gelang in Lösung mit $\text{Co}_2(\text{CO})_8$, welches selektiv an die Alkinfunktion bindet. Verbindung **14** ist in THF löslich, was für das Gelingen der Reaktion äußerst wichtig ist und in einer guten Umsetzung von **14** zu **15** resultiert. Die Cobaltcarbonyl-Kupplung war nach fünf Stunden erfolgreich abgeschlossen und das Produkt konnte ohne weitere Reinigung verwendet werden (Abb. 2.18).

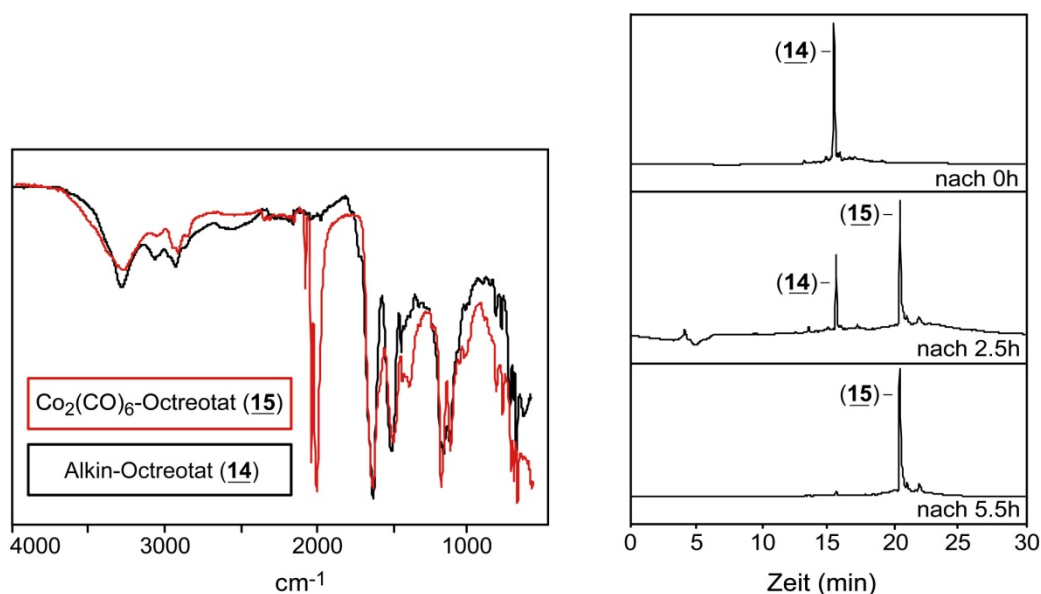


Abb. 2.18: Umsatzverfolgung der $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ -Kupplung von **14** zu **15** mittels HPLC (rechts); Überlagerung der IR-Spektren von **14** und **15** (links).

Das IR-Spektrum von **15** zeigt charakteristische Carbonyl-Banden, die im IR Spektrum von **14** (Alkin-Octreo) nicht vorhanden sind (siehe Abb. 2.18 (links))

2.4 Synthese der Polyarginin-Biokonjugate

Das in dieser Arbeit synthetisierte Polyarginin ist von der Polyarginin-Sequenz R₉F₂C von Inversen *et al.* abgeleitet. Um den Fluoreszenzmarker FITC in die Peptidsequenz einfügen zu können, wurde das Cystein, das in der Originalsequenz zur Bindung an Makromoleküle verwendet wurde, gegen ein Lysin ersetzt. Das Lysin wurde für die Synthese der Biokonjugate **16**, **18** und **20** mit der Boc-Gruppe geschützt, und bei den FITC-markierten Biokonjugaten **17**, **19** und **21** wurde diese Gruppe gegen eine Mtt-Schutzgruppe ausgetauscht. Für die Synthese der Polyargininderivate wurde ein Rink-Amid-Harz als feste Phase verwendet, das in einem C-terminalen Säureamid resultiert. Verwendet wurden die säurelabilen Schutzgruppen Pbf für die Aminosäure Arginin und die Boc- bzw. Mtt-Schutzgruppe für Lysin. Nach dem Entschützen der letzten Fmoc-Gruppe wurde bei **16** und **17** das endständige Arginin acetyliert. Für die Synthese der ruthenocenhaltigen- (**20**, **21**) bzw. ferrocenhaltigen Verbindungen (**18**, **19**) wurde Ruthenocen- bzw. Ferrocen-Carbonsäure an das terminale Arginin gekoppelt. Für die Synthese der Biokonjugate **17**, **19** und **21** wurde die Mtt-Gruppe des Lysins mit 1% TFA entschützt und FITC an die Lysin-Seitenkette gekuppelt. Da die Pbf-Schutzgruppe der Argininseitenketten bei einer vierstündigen Entschätzung nicht vollständig entfernt wurde, ist die Abspaltzeit auf sechs Stunden verlängert und das Volumen der Spalllösung um das fünffache erhöht worden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Biokonjugaten.

Nach Verlängerung der Abspaltzeit gelang die Synthese der Biokonjugate **16-21** ohne Schwierigkeiten. Ferrocen und Ruthenocen ließen sich unter den Standardbedingungen erfolgreich an Polyarginin kuppeln, im Gegensatz zur Cobaltocenium-Funktionalisierung. Diese gelang vermutlich nicht aufgrund der Größe der Pbf-Schutzgruppe und der Ladung am Cobaltocenium. Ebenso führte eine Veränderung der Polyarginin-Sequenz, durch die Cobaltocenium-Carbonsäure N-terminal nicht direkt an ein Arginin, sondern an ein Phenylalanin oder Lysin gekuppelt wurde, nicht zum Erfolg.

Die erhaltenen Polyarginin-Derivate wurden mittels RP-HPLC gereinigt und mit Hilfe von RP-HPLC-, ESI bzw. MALDI-TOF- (**16-21**), ¹H- und ¹³C-NMR-Experimenten charakterisiert (**16**, **18**, **20**).

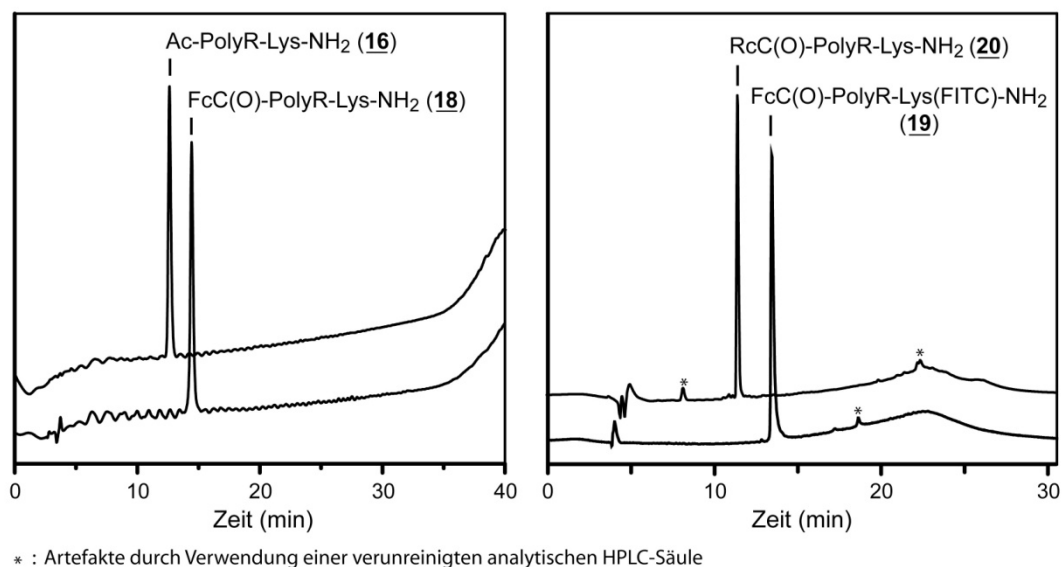


Abb. 2.19: HPLC-Chromatogramm der aufgereinigten Verbindungen **16** und **18** detektiert bei 220 nm (links); HPLC-Chromatogramm der aufgereinigten Verbindung **20** und **19** detektiert bei 254 nm (rechts).

Die HPLC-Chromatogramme zeigen nach präparativer Reinigung der Biokonjugate Reinheiten von > 97% (Abb. 2.19), mit geringen Retentionszeiten aufgrund ihrer Hydrophilie. Ac-PolyR-Lys(FITC)-NH₂ (**16**) hat, wie zu erwarten, die geringste Retentionszeit und ist auch in hohen Konzentrationen (200 mM) vollständig in Wasser löslich. Die Verbindungen **18** und **20** haben eine vergleichbare Retentionszeit und sind in hohen Konzentrationen nicht mehr in Wasser löslich, sondern erfordern einen Zusatz von organischen Lösemitteln, wie z.B. DMSO. Die längste Retentionszeit zeigen die FITC-markierten Metalloccen-Polyarginine.

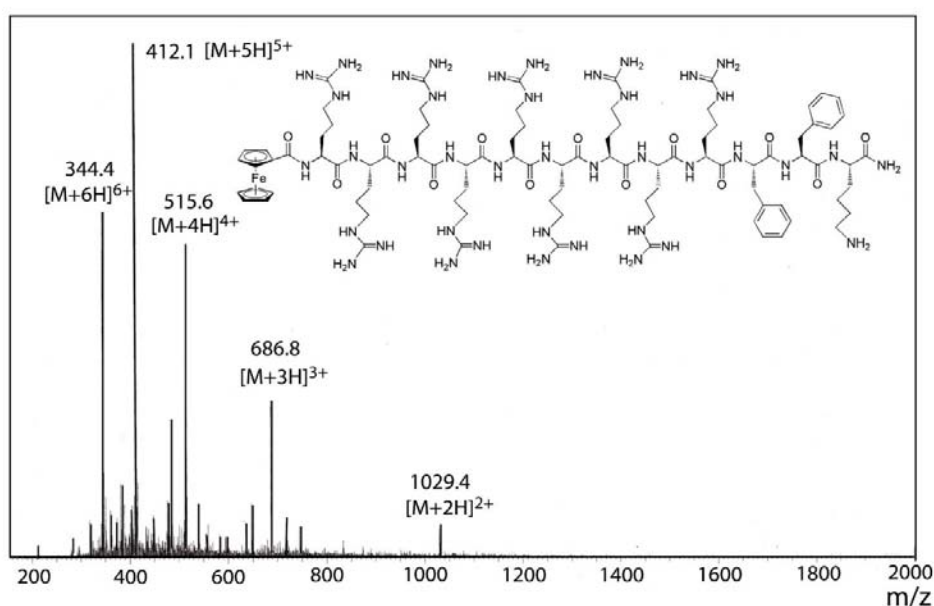


Abb. 2.20: ESI-Spektrum von Biokonjugat **18**.

Abbildung 2.20 zeigt das ESI-Massenspektrum der Verbindung **18**, die in der Gasphase des Massenspektrometers durch die Aminosäuren Lysin und Arginin hoch geladen vorliegt.

Die Charakterisierung der Substanzen mittels NMR-Spektroskopie erfolgte durch die Messung von 1D- (^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie) und 2D- (^1H , ^1H -TOCSY und ^1H , ^{13}C -COSY) Spektren.

2.5 Synthese der SS-Peptid-Biokonjugate

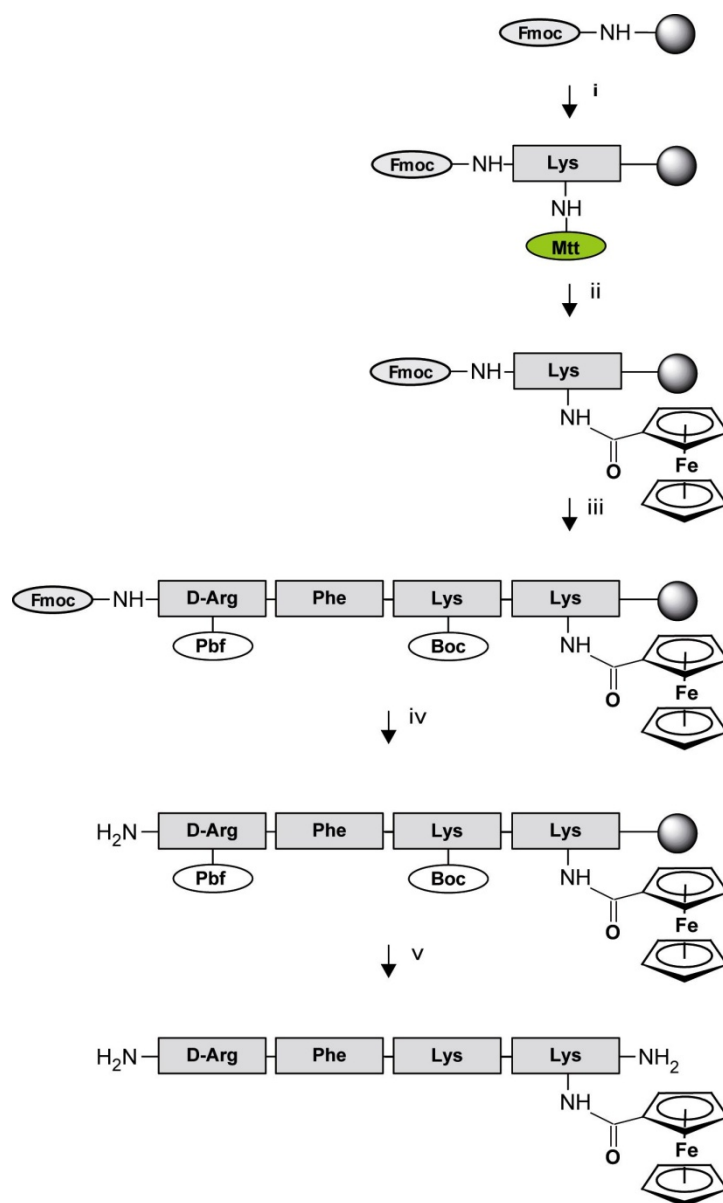


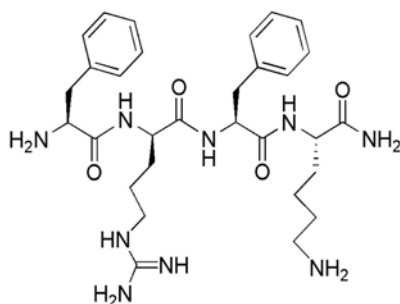
Abb. 2.21: Syntheseschema des Metallocenderivats eines SS-Peptids: (i) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF, Kupplung von Fmoc-Lysin(Mtt)-OH: Fmoc-Lysin(Mtt)-OH, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (ii) Mtt-Entschützung: 1% TFA, TIS in DCM, Metallocen-Kupplung: Metallocen-Carbonsäure, HATU, DIPEA in DMF; (iii) schrittweise Bildung der Peptidkette; (iv) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF; (v) Abspaltung vom Harz: 85% TFA, 10% Phenol, 5% TIS.

Szeto-Schiller (SS-) Peptide wurden zur Aufnahme in Mitochondrien konzipiert. Die Lokalisierung in diese wurde durch alternierende aromatische und basische Aminosäuren erreicht. Um eine bessere Stabilität unter physiologischen Bedingungen zu erreichen, wurde ein Rink-Amid-Harz verwendet, welches in einem C-terminalen Amid resultiert. Hauptsächlich wurde die SS-20-Sequenz (H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂) verwendet, die Phenylalanin anstatt des antioxidativ wirksamen Tyrosins enthält. Ferrocen-Carbonsäure wurde in der ersten Generation der SS-Peptidderivate an den N-Terminus der SS-20-Sequenz

gekuppelt oder N-terminal anstelle des lipophilen Phenylalanins (Phe¹) (Abb. 2.22). Das C-terminale Lysin der Verbindungen **31**, **32** und **33** wurde zur Untersuchung der Zellaufnahme mit einem Fluoreszenzmarker versehen, man erhielt so die Verbindung **34**, **35** und **36**. Durch Einführung des Fluorophors an dieser Stelle wurde von Szeto *et al.* eine erfolgreiche Aufnahme in Mitochondrien beobachtet.^[240] Sie verwendeten jedoch anstelle von FITC die kleinere β -Anthraniloyl-L- α,β -Diaminopropionsäure.

Die Biokonjugate der ersten Generation (**31-36**) haben aufgrund des funktionalisierten N-Terminus unter physiologischen Bedingungen keine drei positiven Ladungen. Deswegen wurde in der 2. Generation (**37-39**) die Metallocen-Carbonsäure an die Seitenkette eines zusätzlich eingeführten Lysins gekuppelt. Das Lysin wurde mit der Mtt-Gruppe verwendet und konnte, ohne den säurelabilen Linker des Harzes zu spalten, entfernt werden. Die erhaltene freie Aminfunktion wurde schließlich mit Metallocen-Carbonsäure funktionalisiert bzw. acetyliert (Abb. 2.21). Danach wurden die übrigen Aminosäuren der Sequenz gekuppelt und die terminale Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin abgespalten. Schließlich wurde das Peptid durch eine hochkonzentrierte TFA-Lösung für vier Stunden vom Harz gespalten und gleichzeitig die Pbf- und Boc-Schutzgruppen entfernt.

Diese Verbindungen (**37-39**) sind aber aufgrund der zusätzlich eingeführten, aromatischen Komponente eventuell für eine mitochondriale Lokalisierung zu lipophil. Deswegen wurde in der 3. Generation der SS-Peptid-Derivate (**40**, **41**) Ferrocen-Carbonsäure an die Seitenkette eines Lysins gekuppelt, das anstelle eines Phenylalanins bzw. Dmt in die Sequenz (SS-20 bzw. SS-31) eingeführt wurde.

SS-PeptidkonjugateSS-20: H-Phe - D-Arg - Phe - Lys-NH₂SS-01: H-Tyr - D-Arg - Phe - Lys-NH₂SS-31: H-D-Arg - Dmt - Lys - Phe-NH₂**Synthetisierte SS-Peptid Derivate:**

- **1. Generation:** FcC(O)-Arg - Phe - Lys-NH₂, (**32**)
FcC(O)-Arg - Phe - Lys(FITC)-NH₂, (**35**)

FcC(O)-Phe - Arg - Phe - Lys-NH₂, (**33**)
FcC(O)-Phe - Arg - Phe - Lys(FITC)-NH₂, (**36**)
- *N-terminale Kupplung:*
keine 3 positiven Ladungen
- **2. Generation:** H-Phe - D-Arg - Phe - Lys - Lys(FcC(O))-NH₂, (**38**)

H-Phe - D-Arg - Phe - Lys - Lys(RcC(O))-NH₂, (**39**)
- *Kupplung an die Seitenkette eines zusätzlich eingeführten Lysins* → evtl. zu lipophil
- **3. Generation:** H-D-Arg - Phe - Lys - Lys(FcC(O))-NH₂, (**40**)

H-Phe - D-Arg - Lys(FcC(O)) - Lys-NH₂, (**41**)
- *Ersetzen eines Phe durch Lys(FcC(O))*

Abb. 2.22: Übersicht über die synthetisierten SS-Peptid-Derivate.

In der zweiten und dritten Generation (**37-41**) wurde D-Arginin für eine höhere Stabilität unter physiologischen Bedingungen verwendet. Die Synthese der ersten Generation von SS-Peptid-Derivaten gelang ohne Schwierigkeiten. Aufgrund der Pbf-Schutzgruppe wurde die Abspaltzeit der Biokonjugate vom Harz auf vier Stunden erhöht. Die Metallocen-Kupplung an die Lysin-Seitenkette benötigte fünf Äquivalente der Metallocen-Carbonsäure. Aufgrund der schlechteren Kupplung an der Seitenkette wurde das aktivere HATU anstelle von TBTU verwendet und die Kupplungszeit auf drei Stunden erhöht. Die Vollständigkeit der Reaktion

wurde mit dem Kaisertest überprüft und die Kupplung bei Bedarf wiederholt. Die Biokonjugate wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt und mithilfe analytischer HPLC, MALDI- bzw. ESI-MS und NMR-Spektroskopie (Abb. 2.23) charakterisiert. Die Rohprodukte konnten in Ausbeuten von 75-90% mit einer guten Reinheit (80-95%) erhalten werden. Durch chromatographische Aufreinigung konnten die Reinheit von **34**, **35**, **36**, **38**, **39**, **40** und **41** auf über 95% erhöht werden. Die Verbindungen **31**, **32**, **33** und **37** konnten ohne weitere Reinigung verwendet werden.

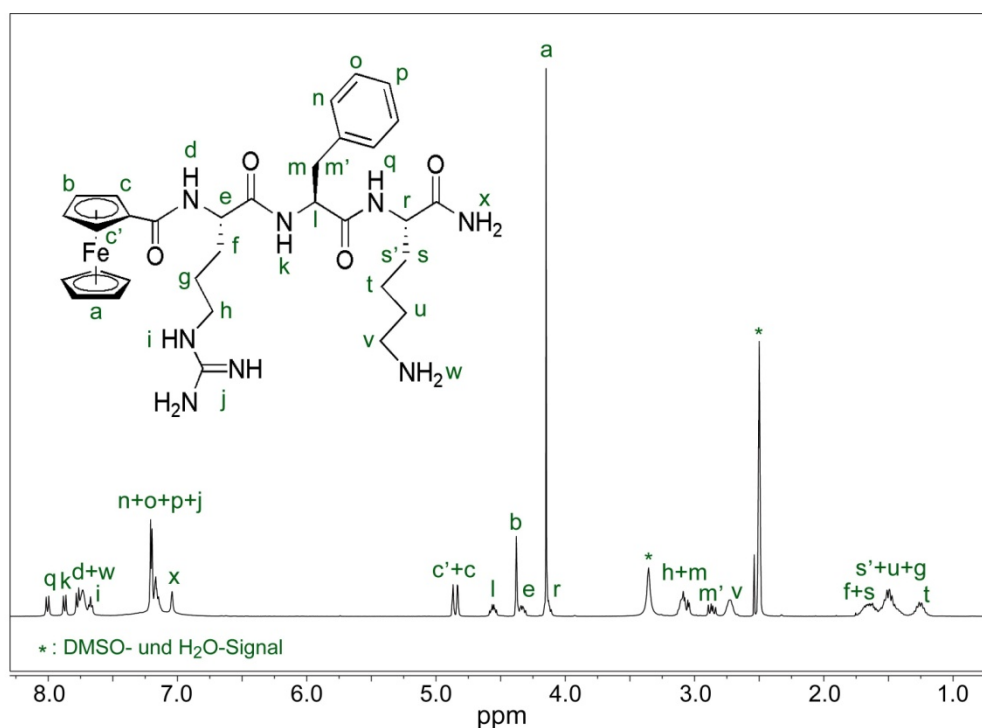


Abb.: 2.23: ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **32** in $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.

2.6 Synthese der MTS-Peptid-Biokonjugate



Abb. 2.24: Syntheschema der Sequenz $H\text{-MTS-Lys(FITC)-Lys(Fc)-NH}_2$: (i) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF; Kupplung von Fmoc-Lysin(Mtt)-OH: Fmoc-Lysin(Mtt)-OH, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (ii) Mtt-Entschützung: 1% TFA, TIS in DCM, Metallocen-Kupplung: Metallocen-Carbonsäure, HATU, DIPEA in DMF; (iii) Kupplung von Fmoc-Lysin(Mtt)-OH: Fmoc-Lysin(Mtt)-OH, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (iv) schrittweise Bildung der Peptidkette: Fmoc-Aminosäure, TBTU, HOBt, DIPEA in DMF; (v) Mtt-Entschützung: 1% TFA, TIS in DCM, FITC-Kupplung: FITC, DIPEA in DMF; (vi) Fmoc-Entschützung: 20% Piperidin in DMF; (vii) Abspaltung vom Harz: 85% TFA, 10% Phenol, 5% TIS.

MTS-Peptide benötigen für die Aufnahme in Mitochondrien in der Regel einen freien N-Terminus, daher konnten die Metallocen-Carbonsäuren nicht, wie üblich N-terminal, sondern müssen C-terminal oder an eine Seitenkette gekuppelt werden. Die in dieser Arbeit gewählte Variante ist die Metallocen-Kupplung an die Seitenkette. An ein nicht vorbeladenes Rink-Amid Harz wurde die Aminosäure Fmoc-Lys(Mtt)-OH für eine Stunde gekuppelt. Danach wurde mit 1% TFA die Lysin-Seitenkette entschützt und mit einer Metallocen-Carbonsäure funktionalisiert (**44-46**) oder acetyliert (**43**). Diese Metallocen-Kupplung wurde bei Unvollständigkeit wiederholt.

Für die Synthese des Biokonjugats **45** wurde für die FITC-Markierung nach der Metallocen-Kupplung eine weitere Aminosäure Fmoc-Lys(Mtt)-OH gebunden. Anschließend wurde bei allen MTS-Biokonjugaten die Sequenz Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Gly aufgebaut, in der Glycin als Linker fungiert und nicht direkt Teil der MTS-Sequenz ist. Die Verbindung **45** wurde danach mit dem Fluoreszenzmarker funktionalisiert und schließlich die terminale Fmoc-Gruppe der Verbindungen **42-46** entschützt (Abb. 2.24). Die Kupplung der Fmoc-Lysin(Mtt)-OH, die Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe und die Funktionalisierung mit der Metallocen-Carbonsäure erfolgten manuell und konnten daher mithilfe des Kaisertests auf Vollständigkeit kontrolliert werden. Die Seitenketten-Kupplung war schwieriger als die N-terminale Kupplung und musste bei Bedarf wiederholt werden.

Die Acetylierung sowie die Einführung von FITC gelangen ohne Schwierigkeiten. Die MTS-Sequenz wurde an das am Harz gebundene Metallocenoyl-Lysin bzw. an Fmoc-Lys(Mtt)-Lys(FcC(O))- Derivate am Peptidsynthesizer aufgebaut. Die Verbindungen **42** und **43** waren weder in Wasser, Wasser/ACN, Wasser/MeOH, noch in MeOH löslich und konnten deswegen nur schlecht filtriert und nur in geringen Konzentrationen mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden. Ferner wurden die MTS-Konjugate aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit möglichst nur mit MALDI-, nicht mittels ESI-MS charakterisiert. Verbindung **45** zeigt aber eine hohe Massenabweichung bei Verwendung von MALDI-MS, deswegen wurde diese Verbindung zusätzlich mittels ESI-MS untersucht. Durch die Metallocen-Kupplung der Biokonjugate **44-46** verbesserte sich die Löslichkeit hingegen erheblich. Die Verbindungen **42**, **44** und **45** wurden mithilfe präparativer HPLC erfolgreich aufgereinigt.

Die Abbildung 2.25 zeigt das Chromatogramme der analytischen HPLC und die zugehörigen MALDI-Spektren der Verbindungen **42**, **44**, **45** und **46**. Das MALDI-Spektrum der Verbindung **45** weist eine Verunreinigung, bedingt durch die nicht vollständige Kupplung von FITC, auf. Das Konjugat **46** enthält eine Verunreinigung, die aufgrund der ähnlichen Retentionszeit schlecht zu entfernen ist, **46** wurde deswegen nicht präparativ gereinigt. Die Verunreinigung beträgt weniger als 10% und weist eine höhere Masse als das Produkt auf. Diese Verunreinigung scheint eine Folge der TFA-Veresterung der Aminosäure Serin während des Abspaltvorgangs zu sein.

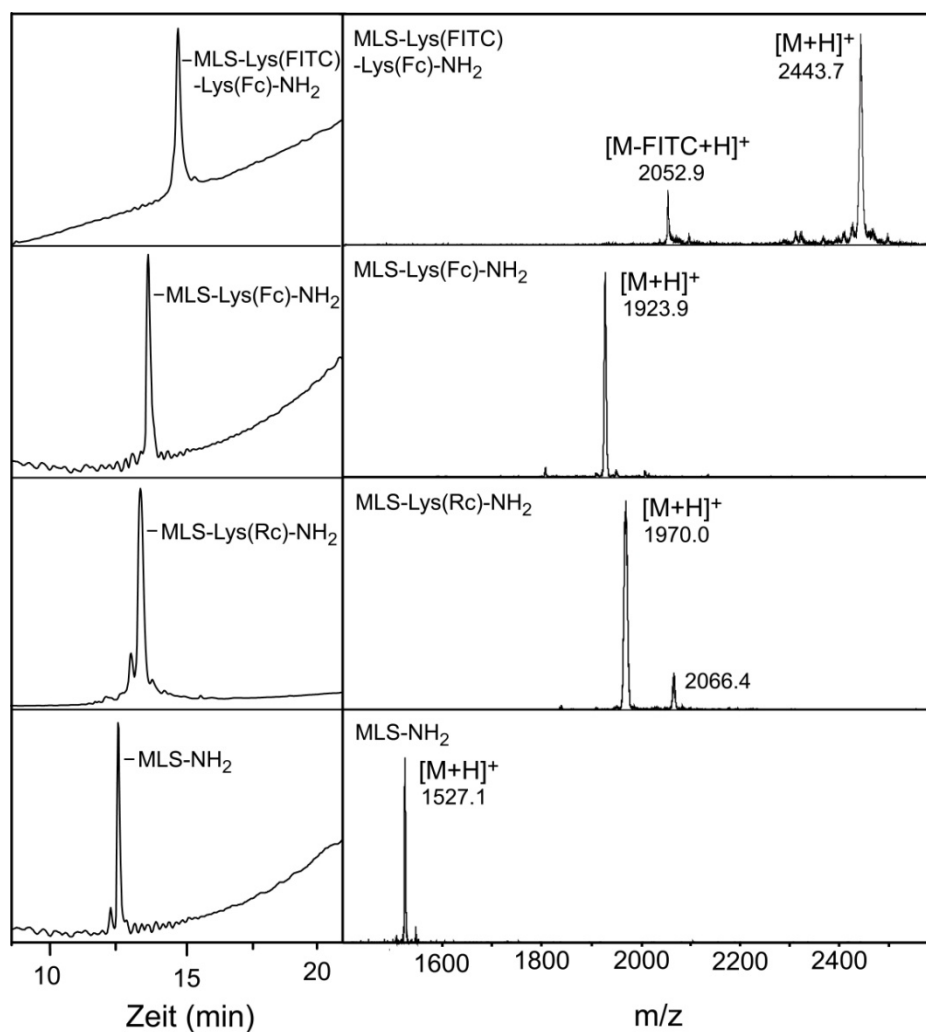


Abb. 2.25: HPLC-Chromatogramme der Verbindungen **45**, **44**, **46** und **42**, aufgenommen bei 220 nm (links); MALDI-Spektren der Verbindungen (rechts).

3 Biologische Untersuchungen

3.1 Experimente

- Zur Untersuchung der rezeptorvermittelten Aufnahme der Biokonjugate wurde die Rezeptor-mRNA-Expression in den für die Zellaufnahme interessanten Zelllinien quantitativ bestimmt.
- Zur Abschätzung der Lipophilie der Verbindungen unter physiologischen Bedingungen wurde der LogP-Wert bestimmt. Mit diesem lässt sich der Anteil einer unspezifischen Zellaufnahme abschätzen.
- Die Zellaufnahme verschiedener FITC-markierter Biokonjugate wurde in den Pankreaskarzinom-Zelllinien IMIM, PT45 und Panc1 sowie in der humanen Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops an lebenden Zellen untersucht.
- Zur Lokalisierung der markierten Biokonjugate in der Zelle wurden diese koinkubiert mit Farbstoffen, die spezifische Zellkompartimente anfärben. Nach Koinkubation mit lebenden Zellen wurden sie mithilfe eines konfokalen Mikroskops untersucht.
- Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde der Kristallviolett- und Resazurin-Assay durchgeführt. Es wurden die Zelllinien Hela, HepG2 und PT45 verwendet, und zur Quantifizierung der Zytotoxizität wurde der IC_{50} -Wert bestimmt.

Verwendete Zelllinien:

Die Hela Zelllinie wurde als erste immortalisierte, adhärent wachsende Krebszelllinie in der Forschung verwendet und während einer Biopsie aus dem Cervixkarzinom der Patientin Henrietta Lack isoliert. Die Zelllinie wurde von Prof. Hahn (Abteilung für Molekulare Gastroenterologische Onkologie der Ruhr-Universität Bochum) zu Verfügung gestellt.

HepG2 ist eine adhärent wachsende humane Leberkarzinom-Zelllinie, die aus einem Hepatoblastom eines 15 jährigen männlichen Patienten isoliert wurde. Die HepG2-Zelllinie wurden von der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ACC 180“ bezogen.

PT45, IMIM-PC2 und Panc1 sind adhärent wachsende Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zelllinien. Bauchspeicheldrüsenkrebs ist aggressiv, invasiv und höchst resistent gegenüber Chemotherapie. Die Zelllinien PT45, IMIM-PC2 und Panc1 wurden von Prof. Hahn (Abteilung für Molekulare Gastroenterologische Onkologie der Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt.

3.2 RT-PCR

Die quantitative Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der PCR (Polymerase Kettenreaktion) und wird als gängige Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren eingesetzt. Der Vorteil gegenüber der herkömmlichen PCR liegt in der Möglichkeit zur Quantifizierung der Expression eines Gens. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der doppelsträngige Nukleinsäuren bindet und dadurch seine Fluoreszenz um den Faktor 1000 steigert. Je mehr doppelsträngige Nukleinsäure gebildet wird, umso stärker ist die Fluoreszenz. Zur Quantifizierung der DNA-Expression wird der Ct-Wert berechnet. Dieser wird bestimmt aus der Anzahl an PCR Zyklen, die zur Überschreitung eines Fluoreszenz-Schwellenwertes benötigt werden (Abb. 3.1). Bei diesem Schwellenwert ist die Fluoreszenz signifikant stärker als die Hintergrundfluoreszenz. Die Ct-Werte werden in der exponentiellen Phase gemessen und liegen in einem Bereich von 20 bis 40 Zyklen. Bei niedrigen Ct-Werten ist die Nukleinsäure in der Probe hoch exprimiert; hingegen ist der Ct-Wert hoch, wenn die Nukleinsäure-Expression in der Probe gering ist.

Zur Bestimmung der Rezeptor-Expression wurde die gesamte mRNA der Zellen isoliert und durch eine Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Bestimmung der Rezeptor-Expression erfolgte unter Verwendung eines spezifischen Primers für die Amplifizierung der zu untersuchenden Rezeptor-cDNA. Als interne Kontrolle wurde ein Housekeeper Gen verwendet. Die RT-PCR wurde zur Untersuchung der Expression der Rezeptor-Subtypen des Neurotensin-Rezeptors (NT) und des Somatostatin-Rezeptors (SSTR) durchgeführt.

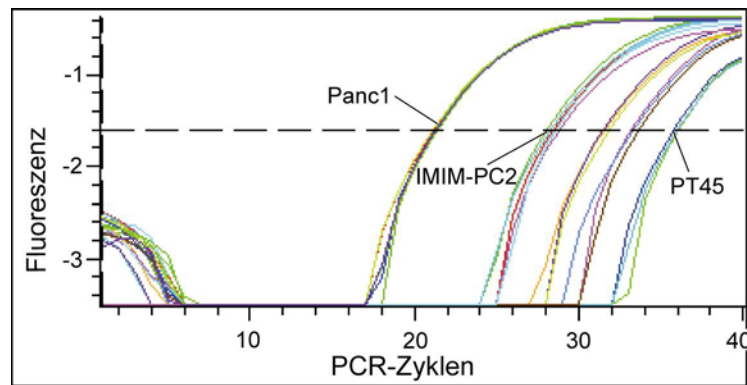


Abb. 3.1: Gemessene PCR-Kurven des *NTR1* verschiedener Pankreaskarzinom-Zelllinien (u.a. PT45, IMIM-PC2 und Panc1).

Untersucht wird die SSTR-mRNA-Expression in den Zelllinien Hela, HepG2 und PT45. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen eine moderate Expression der Rezeptor-mRNA. In Tabelle 3.1 ist die Expression der drei wichtigen SSTR-Typen für die Octrotat Aufnahme aufgelistet. Der wichtigste dieser Rezeptoren ist der SSTR2, welcher am stärksten von Hela-Zellen exprimiert wird, gefolgt von HepG2- und PT45-Zellen. Der Somatostatin-Rezeptor SSTR3 wird von Hela- und HepG2-Zellen vergleichbar exprimiert, jedoch weniger von der Zelllinie PT45. SSTR5 wird von allen drei Zelllinien wenig exprimiert. Die stärkste Expression mit einem Ct-Wert von 33.6 weisen die HepG2-Zellen auf; weniger Rezeptor-mRNA wird von den Hela Zellen gebildet, und PT45 zeigt eine minimale Expression dieses Rezeptors. Die geringe SSTR-Expression der HepG2-Zellen war unerwartet, da in der Literatur diese Zelllinie mehrfach aufgrund ihrer SSTR-Expression verwendet wurde.^[257-259] Dass Hela- eine moderate und PT45-Zellen eine geringe Rezeptor-Expression besitzen, entsprachen den Erwartungen.

Tab. 3.1: Ct-Werte der untersuchten SSTR in den Zelllinien Hela, HepG2 und PT45.

Zelllinie	SSTR2 Ct-Wert	SSTR3 Ct-Wert	SSTR5 Ct-Wert
Hela	27.5	32.8	35.8
HepG2	29.8	33.1	33.6
PT45	32.1	35.4	38.7

Die Untersuchung der mRNA-Expression der Neurotensin-Rezeptoren ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst. NTR2 wird bei keiner getesteten Zelllinie stark exprimiert, der NTR3 wird im Gegensatz dazu von allen getesteten Zelllinien in hohem Maße exprimiert. Die getesteten Pankreaskarzinom-Zelllinien unterscheiden sich vor allem in ihrer NTR1-mRNA-Expression.

Die Zelllinie PT45 zeigt eine geringe, IMIM-PC2 zeigt eine gute und Panc1 zeigt eine Überexpression des NTR1.

Tab. 3.2: Ct-Werte der NTR in den Zelllinien PT45, IMIM und Panc1.

Zelllinie	NTR1 Ct-Wert	NTR2 Ct-Wert	NTR3 Ct-Wert
PT45	35.9	38.2	21.0
IMIM	28.5	37.5	22.1
Panc1	21.3	32.9	21.4

3.3 Untersuchung der Lipophilie

Die Lipophilie ist ein wichtiger Parameter zur Untersuchung der Pharmakokinetik einer Substanz, mit deren Hilfe sich Aussagen über die Verteilung einer Substanz im Körper und ihre Membrangängigkeit treffen lassen. Diesem Diffusionsprozess liegt das Fick'sche Gesetz zugrunde, bei dem der Verteilungskoeffizient die substanzspezifische Größe darstellt. Der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten, logP-Wert genannt, wird als Maß für die Lipophilie einer Substanz herangezogen. Der logP-Wert muss hoch genug sein, um Membranen passieren zu können. Bei zu hohen logP-Werten gelangt die Substanz jedoch nicht in das hydrophile Zytoplasma bzw. Gefäßlumen und verbleibt in der Membran.

Der Verteilungskoeffizient P einer Substanz definiert sich durch sein Konzentrationsverhältnis in zwei nicht mischbaren Phasen.^[260] Bei der Untersuchung von neutralen Verbindungen werden als nicht mischbare Phasen n-Octanol und Wasser verwendet. Bei ionisierbaren Substanzen wird als hydrophile Phase ein Puffer mit einem physiologischen pH-Wert verwendet, um sein Ionisationsverhalten unter physiologischen Bedingungen zu berücksichtigen. Üblicherweise wird zur logP-Bestimmung die „Shake-Flask-Methode“ verwendet. Hierbei wird die zu untersuchende Substanz in einem Octanol-Wasser-Gemisch über einen bestimmten Zeitraum geschüttelt und die Konzentration der Substanz in beiden Phasen bestimmt. Untersuchungen mittels HPLC haben jedoch den Vorteil einer besseren Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der erhaltenen Werte.^[261] Die Verwendung der HPLC-Methode ist möglich, da man bei Gebrauch einer geeigneten mobilen und stationären Phase von der Retentionszeit einer Verbindung auf den Verteilungs-koeffizienten schließen kann. Als stationäre Phase kann eine unpolare Umkehrphase und Methanol/Wasser als mobile Phase verwendet werden.

Die charakteristische Kenngröße der Retention ist der Kapazitätsfaktor (k'). Dieser wird wie folgt ermittelt:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (\text{Gleichung 1})$$

t_R ist die Gesamtretentionszeit der gelösten Substanz und t_0 ist die Totzeit des Systems, die hier durch einen internen Standard ermittelt wurde. Durch die Änderung der MeOH/Wasser Zusammensetzung der mobilen Phase kommt es zu einer Änderung der Gesamtretentionszeit bzw. des Kapazitätsfaktors. Für jede Substanz wird der Kapazitätsfaktor gegen die Methanol-Konzentration aufgetragen (Abb. 3.2).

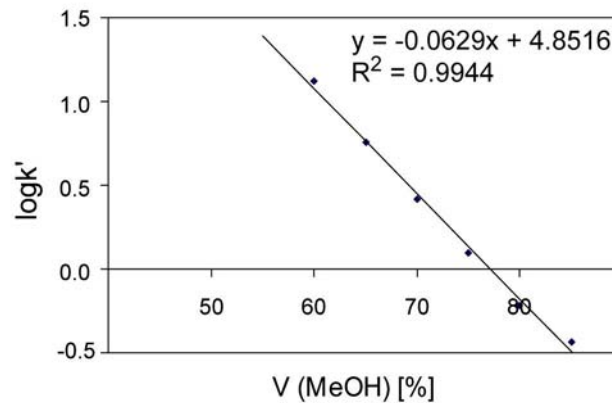


Abb. 3.2: Linearer Zusammenhang zwischen $\log k'$ und der MeOH-Konzentration, exemplarisch an 10 gezeigt.

Unter den verwendeten Bedingungen steht der Logarithmus des Kapazitätsfaktors mit der Methanol-Konzentration in einem linearen Zusammenhang.^[262] Durch Extrapolation der Geraden wird der Kapazitätsfaktor bei 100% Wasser ($\log k_w$) bestimmt. $\log k_w$ lässt sich aus dem Ordinaten-Achsenabschnitt der Regressionsgrade ermitteln und wird durch Gleichung 2 beschrieben.

$$\log k' = \log k_w + s \cdot V_{\text{MeOH}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$\log k_w$ = Kapazitätsfaktor bei 100% Wasser.

s = Steigung der Regressionsgraden.

Zusätzlich wurden die $\log k_w$ -Werte von Referenzsubstanzen mit bekanntem $\log P$ gemessen und ihre $\log k_w$ -Werte mit ihren bekannten $\log P$ -Werten korreliert (Abb. 3.3).

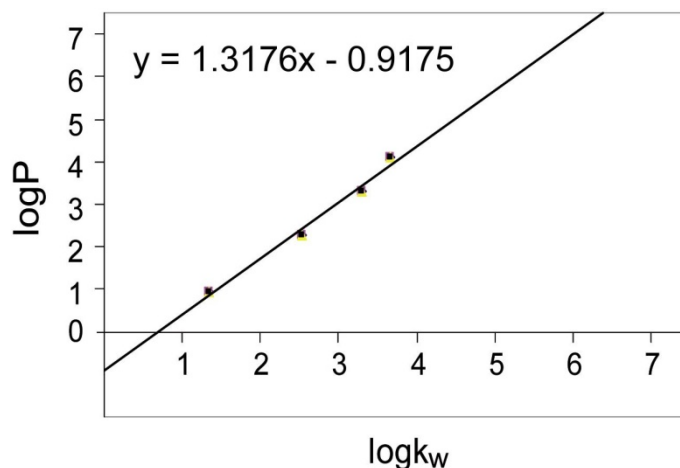


Abb. 3.3: Korrelation der logP-Werte von vier Referenzsubstanzen gegen ihren gemessenen $\log k_w$ -Wert. Tert-Butylbenzol ($\log P$: 4.11; $\log k_w$: 3.67), Naphthalin ($\log P$: 3.30; $\log k_w$: 3.29), 4-Bromanilin ($\log P$: 2.26; $\log k_w$: 2.53) und 4-Methoxyanilin ($\log P$: 0.95; $\log k_w$: 1.34).

Über die Regressionsgerade (Abb. 3.3) können die logP-Werte der getesteten Substanzen mithilfe des ermittelten $\log k_w$ -Werts bestimmt werden.^[263] Die Regressionsgerade führt zu folgender Gleichung (Gleichung 3):

$$\log P = 1.3176 \cdot \log k_w - 0.9175 \quad (\text{Gleichung 3})$$

Es wurden tert-Butylbenzol, Naphthalin, 4-Bromanilin und 4-Methoxyanilin als Referenzen und Uracil zur Bestimmung der Totzeit als Interner Standard verwendet. Die logP-Werte der gemessenen Biokonjugate sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.3: Ergebnisse der logP-Messung.

Nr.	Verbindung	$\log k_w$	logP
<u>5</u>	Ac-Octreo-OH	3.12	3.2
<u>7</u>	FcC(O)-Octreo-OH	4.72	5.3
<u>10</u>	RcC(O)-Octreo-OH	4.84	5.4
<u>12</u>	CcC(O)-Octreo-OH	nicht linear	nicht linear
<u>14</u>	Pent-Octreo-OH	3.72	4.0
<u>15</u>	Co-Pent-Octreo-OH	4.45	4.9

Außerdem wurden die hydrophilen Polyarginin-Biokonjugate 16, 18, 20 gemessen. Sie zeigten aber, wie auch 12, keinen linearen Zusammenhang zwischen dem $\log k'$ -Wert und der Methanolkonzentration in einem Bereich von 50-85% Methanol.

Von den gemessenen Octreotat-Biokonjugaten zeigt Ac-Octreo-OH den niedrigsten logP-Wert. Durch Substitution der Acetyl-Gruppe durch die Ferrocenoyl-Gruppe steigt der logP-Wert um zwei Einheiten. Der Austausch von Ferrocen durch Ruthenocen lässt den logP-Wert nur gering ansteigen (0.1 Einheiten). Der Austausch der Acetyl-Gruppe durch die Alkinfunktion der Pentinsäure lässt den logP-Wert um 0.8 Einheiten steigen. Die Kupplung des Dicobaltoctacarbonyls hat zur Folge, dass der logP-Wert um 0.9 Einheiten steigt. Der Vergleich der logP-Werte von Cobaltocenium-Biokonjugaten zu acetylierten Biokonjugaten lässt vermuten,^[264] dass der logP-Wert für **12** zwei bis drei Einheiten unter dem logP-Wert der Verbindung **5** (logP von 3.2) liegen sollte.

Die gemessenen logP-Werte entsprechen den erwarteten Ergebnissen. Die Ferrocenoyl- und Ruthenocenoyl-Gruppen unterscheiden sich nur in ihrem enthaltenen Metall und zeigen so eine sehr ähnliche Lipophilie. Cobaltocenium besitzt im Gegensatz zu Ferrocen und Ruthenocen eine positive Ladung und ist aus diesem Grund hydrophiler, was sich in den niedrigeren Retentionszeiten (siehe Experimenteller Teil, Kap. 5) zeigt. Die Acetylfunktion ist kleiner als die Ferroceneinheit, und daher besitzt **5** wie erwartet einen niedrigeren logP-Wert. Die Alkinfunktion ist größer und unpolarer als die Acetylfunktion und lässt den logP-Wert ansteigen. Die Cobaltcarbonyl-Kupplung (**14** zu **15**) erhöht die Lipophilie, da die unpolare Cobaltcarbonyl-Funktion als zusätzliche Gruppe den logP-Wert ansteigen lässt.

Für eine gute Bioverfügbarkeit werden nach der „Lipinski’s rule of five“ LogP-Werte von drei bis fünf benötigt. Da diese Werte allerdings durch Screening von Datenbanken mit niedermolekularen Verbindungen entstanden sind, wird davon ausgegangen, dass diese nicht unbedingt mit anderen Verbindungsklassen wie Peptiden vergleichbar sind.^[265] Außerdem geht man bei den verwendeten Peptiden von einer rezeptorvermittelten Zellaufnahme aus, bei der die Rezeptor-Effektor-Wechselwirkung, also die Pharmakodynamik, eine wichtigere Rolle spielen sollte als die Pharmakokinetik. Die ermittelten logP-Werte sind hingegen wichtig, um eventuelle unspezifische Zellaufnahme-Mechanismen diskutieren zu können.

3.4 Untersuchung der Zellaufnahme

Zur Untersuchung der Zellaufnahme wurden die Biokonjugate mit einem Fluorophor funktionalisiert um diese in der Zelle mittel Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Die Zellaufnahme wurde an Pankreaskarzinom- und Leberkarzinom-Zellen untersucht. Die verwendeten Pankreaskrebs-Zelllinien überexprimieren den NTR3 und in unterschiedlichem

Ausmaß NTR1. Die Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 wurde aufgrund ihrer Expression des SSTR 2 verwendet. Um eine Artefaktbildung zu verhindern, wurden die Zellen nicht fixiert, sondern die Experimente mit lebenden Zellen durchgeführt. Die Aufnahme der metallocenhaltigen Biokonjugate wurde mit den entsprechenden metallfreien Referenzverbindungen verglichen sowie mit Derivaten mit veränderter Peptidsequenz oder räumliche Struktur. Die Aufnahme der Konjugate wurde über das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen sowie über die Fluoreszenzintensität bestimmt.

Es wurden 24-Well-Mikrotiterplatten verwendet, in denen pro Well 8×10^4 Zellen ausgesät und nach Zugabe der Biokonjugate für 14 Stunden (**8** und **9** außerdem für zwei Stunden) im Brutschrank bei 37 °C und 5% bzw. 10% CO₂ inkubiert wurden. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde allen Biokonjugaten 0.5% DMSO (Endkonzentration im Zellmedium) zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in den 24-Well-Mikrotiterplatten im Medium (mit Zusatz A) an einem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines FITC-Filters untersucht. Es wurde mit einer 100-, 200- sowie 400-fachen Vergrößerung gemessen. In den Abbildungen 3.5-3.32 ist das Fluoreszenzbild mit dem zugehörigen Phasenkontrastbild - zum Vergleich der Zellaufnahme mit der tatsächlichen Zellverteilung - abgebildet. Das Phasenkontrastbild liefert zur Erkennung von morphologischen Veränderungen zusätzlich Informationen über die Form und Größe der Zellen.

3.4.1 Zellaufnahme der Octreotat-Biokonjugate

Es wurde die Zellaufnahme der Octreotat-Derivate **8**, **11** und **13** an der Zelllinie HepG2 im Vergleich zu PT45-Zellen untersucht. HepG2-Zellen weisen eine stärkere Expression von SSTR2 auf als PT45-Zellen. Aus diesem Grund wird bei Vorliegen eines rezeptorvermittelten Mechanismus eine höhere Zellaufnahme der Verbindungen in HepG2-Zellen als in PT45-Zellen erwartet. Verglichen wurden diese mit der metallocenfreien, acetylierten Verbindung **6**. Ferner wurden **8** und **9** untersucht, um zu ermitteln, ob die Aufnahme überwiegend unspezifisch oder rezeptorvermittelt verläuft. Verbindung **9** besitzt eine mit **8** vergleichbare Lipophilie und sollte im gleichen Ausmaß über einen unspezifischen Mechanismus aufgenommen werden.

Da aber im Biokonjugat **9** die Cysteine durch AcM-Gruppen geschützt sind, ist deshalb die Disulfidbrücke und somit die Struktur für eine optimale rezeptorvermittelte Aufnahme nicht vorhanden.

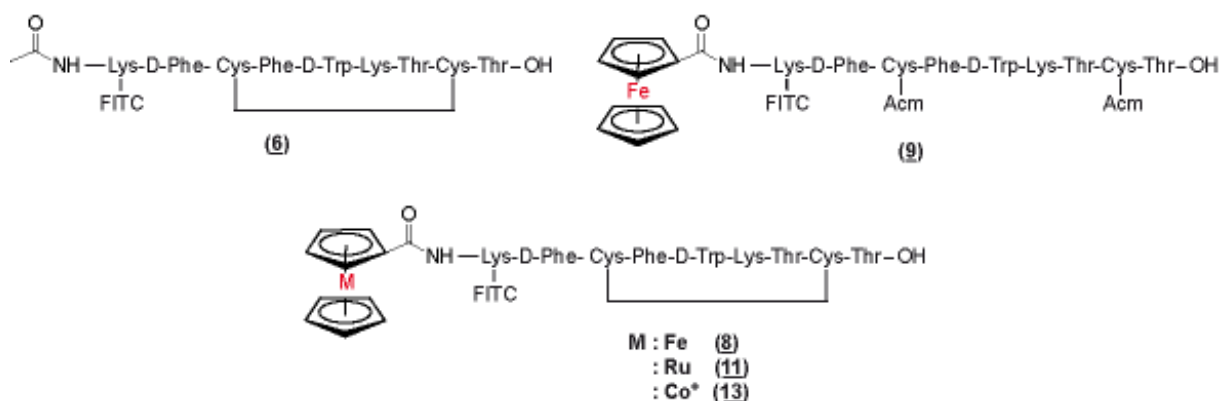


Abb. 3.4: Übersicht über die für die Zellaufnahme verwendeten Octreotat-Biotinkonjugate.

3.4.1.1 Ergebnisse der Aufnahme von Octreotat-Konjugaten

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellaufnahme der Verbindungen **6**, **8**, **9**, **11** und **13** vorgestellt.

- Verbindung **6** wird von PT45-Zellen bei einer Konzentration von 50 μM nicht bzw. kaum aufgenommen, außer in vereinzelte abgerundete Zellen, in denen **6** gleichmäßig verteilt vorliegt. Hier handelt es sich jedoch um bereits abgestorbene Zellen, erkennbar an der runden Form (Abb. 3.5).

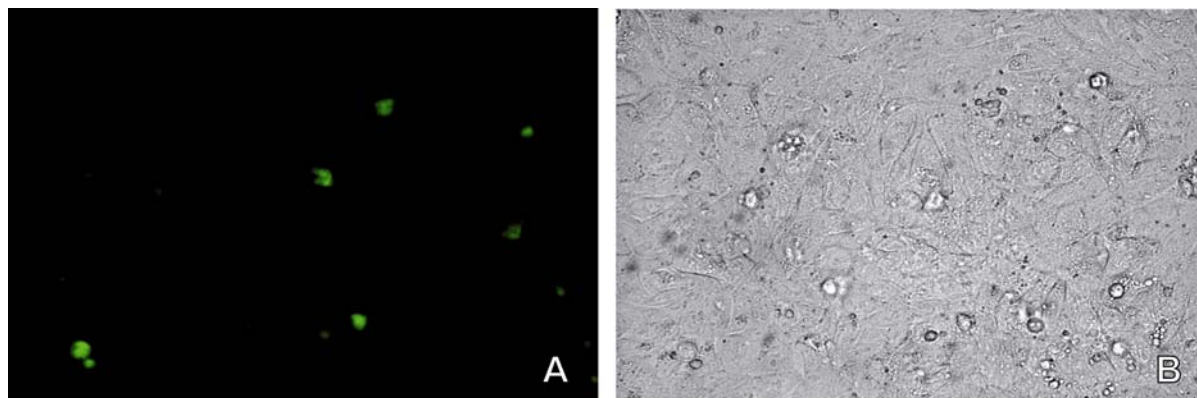


Abb. 3.5: Zellaufnahme von **6** (50 μM) in PT45-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

Die HepG2-Zellen zeigen bei einer 5 μM Konzentration von **6** nur eine geringe Aufnahme. Nur wenige Zellen weisen eine vesikuläre Verteilung auf, der Hauptteil der Verbindung ist in runden, toten Zellen gleichmäßig verteilt lokalisiert (Abb. 3.6). Wird dagegen die Konzentration auf 25 μM erhöht, kann eine sehr gute Zellaufnahme in ca. 90% der Zelle beobachtet werden. Vereinzelte runde, tote Zellen zeigen eine starke Fluoreszenz, die

gleichmäßig in der Zelle verteilt ist. Der überwiegende Anteil der Zellen hat **6** in einer vesikulären Struktur perinukleär aufgenommen (Abb. 3.7).

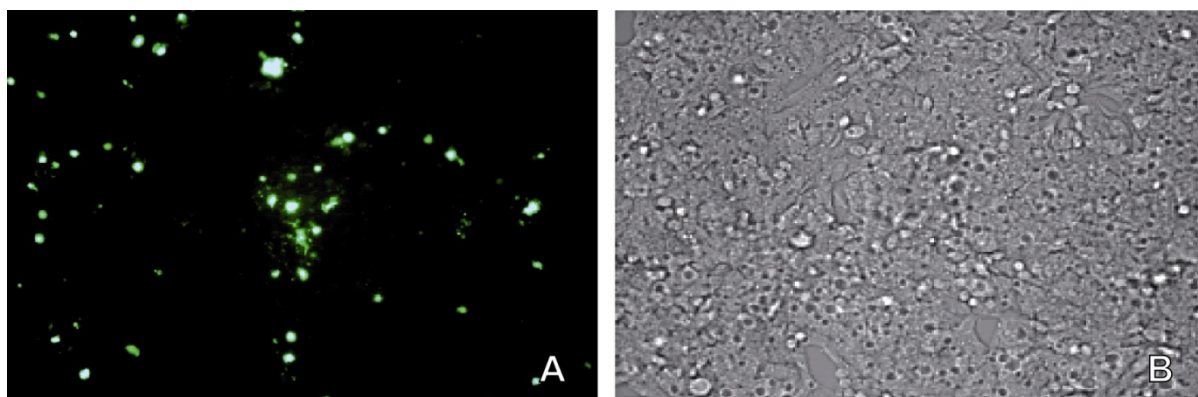


Abb. 3.6: Zellaufnahme von **6** (5 µM) in HepG2- Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

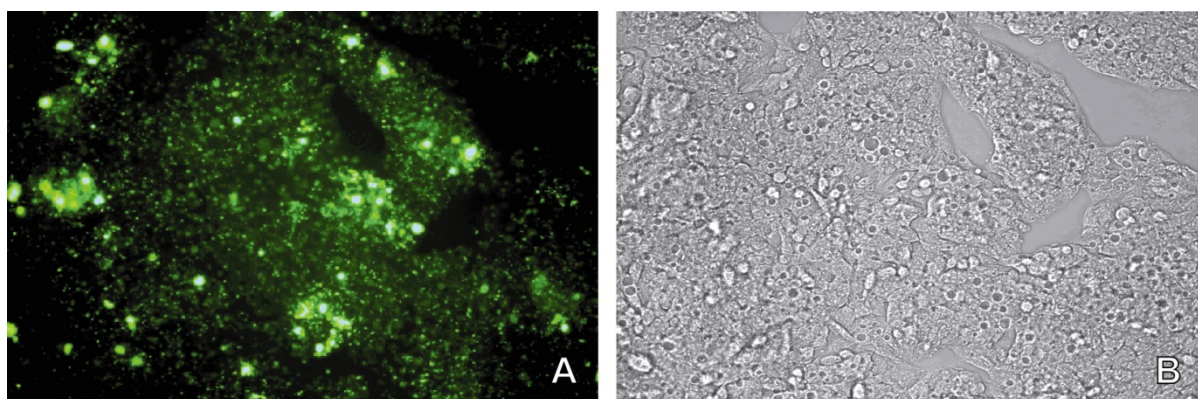


Abb. 3.7: Zellaufnahme von **6** (25 µM) in HepG2-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Das Biokonjugat **8** zeigt in PT45-Zellen (Abb. 3.8) eine wesentlich bessere Zellaufnahme als das nicht ferrocenhaltige, acetylierte Peptid (**6**) (Abb. 3.5). Die Verbindung **8** wird im Gegensatz zu **6** bei einer Konzentration von 50 µM gut (ca. 80%) aufgenommen. Es liegt in den Zellen wie auch **6** in einer vesikulären, perinukleären Struktur vor.

Die Zelllinie HepG2 zeigt für **8** bereits bei einer 5 µM Konzentration eine sehr gute Aufnahme. Auch hier liegt das Biokonjugat in den Zellen in einer perinukleären und vesikulären Verteilung vor (Abb. 3.9). Die Funktionalisierung mit Ferrocen an Octreotat verbessert die Zellaufnahme des Peptids in die SSTR2-positiven HepG2- sowie in PT45 Zellen erheblich.

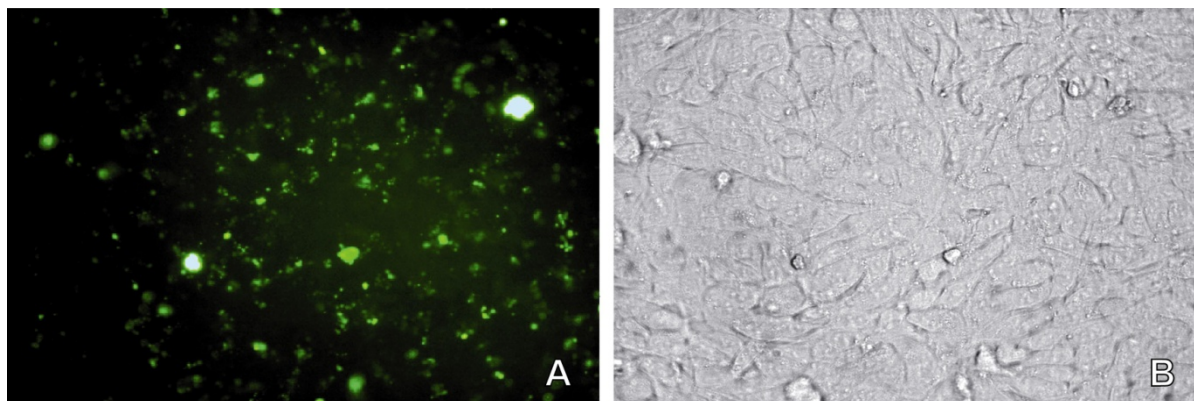


Abb. 3.8: Zellaufnahme von **8** ($50\ \mu\text{M}$) in PT45- Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

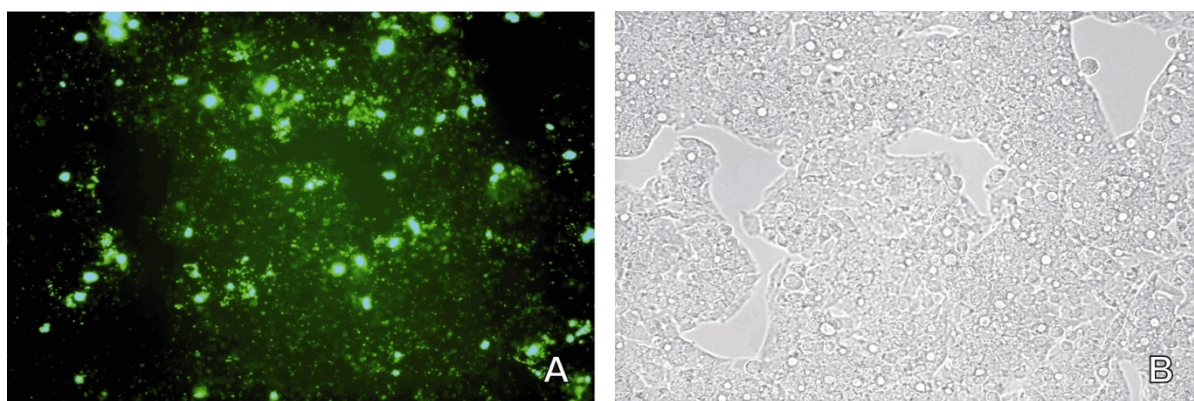


Abb. 3.9: Zellaufnahme von **8** ($5\ \mu\text{M}$) in HepG2-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

Der Vergleich des acetylierten Octreotats (**6**) mit dem Ferrocen-Konjugat (**8**) zeigt sowohl in die SSTR2-positiven HepG2- als auch in PT45 Zellen eine deutlich verbesserte Zellaufnahme. Um eine vergleichbare Akkumulation der beiden Verbindungen in HepG2-Zellen zu erreichen, benötigt man von **6** eine ungefähr fünffach höhere Konzentration als von **8**. In der Zelllinie PT45 zeigt **6** ($50\ \mu\text{M}$) selbst bei Verwendung der doppelten Konzentration von **8** ($25\ \mu\text{M}$) keine sichtbare Aufnahme, wogegen **8** in ca. 80% der Zellen akkumuliert.

- In Konjugat **9** ist durch die geschützten Cystein-Seitenketten keine Ausbildung der Disulfidbindung möglich. Im Vergleich zeigt die cyclische Form **8** (Abb. 3.10) gegenüber der „offenen“ Form **9** (Abb. 3.11) eine eindeutig bessere Zellaufnahme. Die Fluoreszenz von **9** ist in weniger Zellen vorhanden und zusätzlich deutlich weniger intensiv. Da beide Verbindungen eine vergleichbare Lipophilie besitzen, sollte der Anteil an unspezifischer

Aufnahme vergleichbar sein. Der Unterschied in der Höhe der Akkumulation sollte somit durch eine rezeptorvermittelte Aufnahme erfolgen. Da **8** deutlich besser in die HepG2-Zellen aufgenommen wird, kann folglich auf eine partielle rezeptorvermittelte Aufnahme von **8** geschlossen werden.

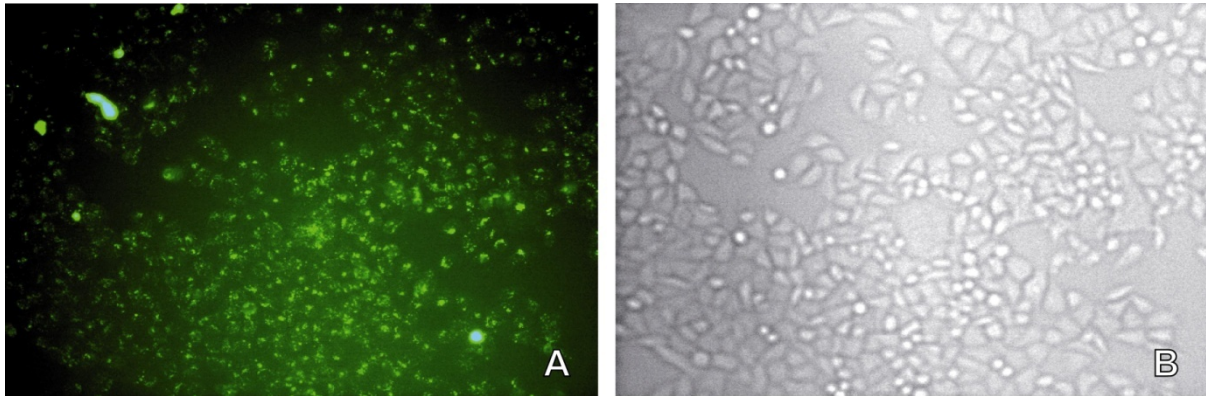


Abb. 3.10: Zellaufnahme von **8** (25 μM) in HepG2-Zellen nach zweistündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

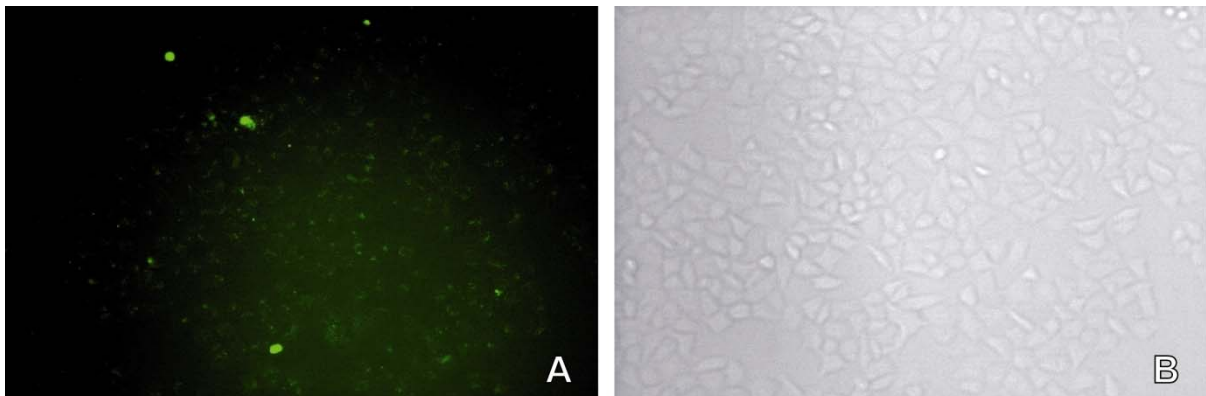


Abb. 3.11: Zellaufnahme von **9** (25 μM) in HepG2-Zellen nach zweistündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Die ruthenocenthaltigen Verbindung **11** zeigt bei Verwendung einer 25 μM Konzentration eine gute Zellaufnahme in ca. 80% der PT45-Zellen, aber mit einer geringen Fluoreszenzintensität (Abb. 3.12). In HepG2-Zellen kann bei der gleichen Konzentration eine Aufnahme in einen vergleichbaren Zellanteil (ca. 80%) beobachtet werden. Die höhere Akkumulation von **11** in HepG2-Zellen zeigt sich in einer stärkeren Fluoreszenzintensität (Abb. 3.13). In beiden Zelllinien ist das Konjugat in einer vesikulären Verteilung lokalisiert.

Die Zellaufnahme von **11** in HepG2-Zellen ist jedoch deutlich geringer als die der Biokonjugate **6** und **8** bei gleicher Konzentration. In PT45-Zellen zeigen **11** und **8** eine ähnlich gute Aufnahme.

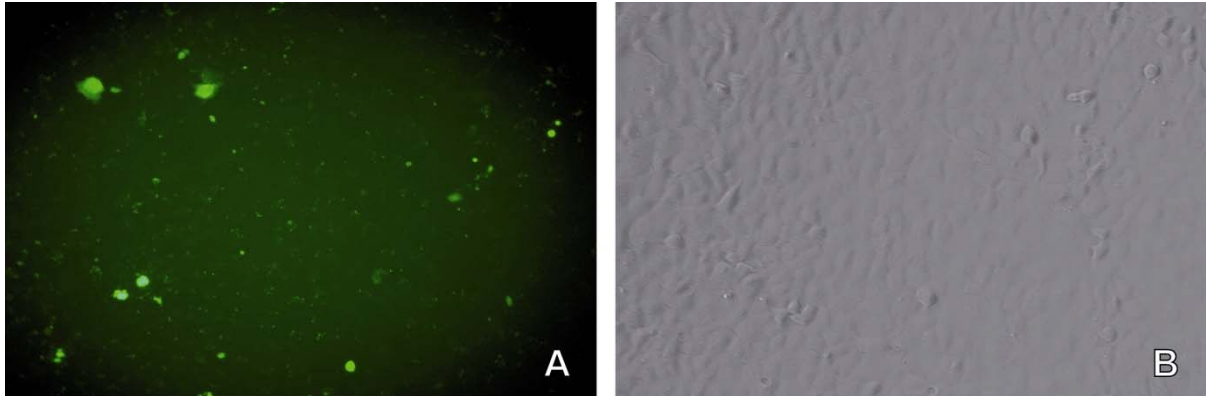


Abb. 3.12: Zellaufnahme von **11** (25 µM) in PT45-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

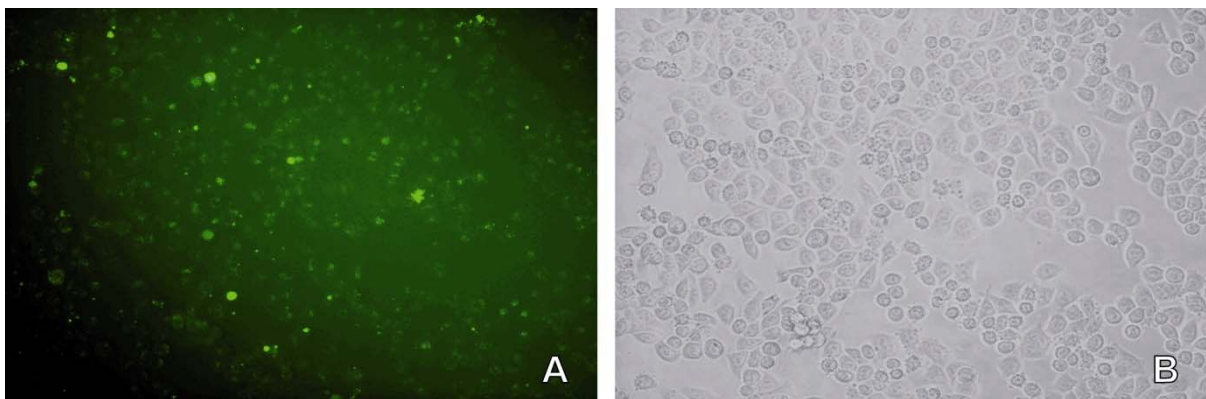


Abb. 3.13: Zellaufnahme von **11** (25 µM) in HepG2-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Die cobaltoceniumhaltige Verbindung **13** zeigt nach 14-stündiger Inkubation mit HepG2- und PT45-Zellen eine gute Aufnahme in HepG2- (Abb. 3.15) und nur eine geringe Aufnahme in PT45-Zellen (Abb. 3.14). In PT45-Zellen ist **13** überwiegend in abgestorbenen, abgerundeten Zellen vorhanden, andere Zellen scheinen das Biokonjugat nur in sehr geringem Maße (20-30%) aufgenommen zu haben. Die Bilder der Zellaufnahme von **13** in HepG2-Zellen zeigen im Gegensatz dazu eine starke Fluoreszenz in lebenden Zellen sowie Fluoreszenz in einigen abgestorbenen Zellen. Das Biokonjugat ist in den Zellen punktförmig in Vesikeln um den Zellkern lokalisiert und in der Mehrzahl (ca. 95%) der Zellen aufgenommen. Die Verbindung zeigt im Gegensatz zu den anderen Biokonjugaten ein

verstärktes Ausbleichen und darf daher für die Bildaufnahme dem Anregungslicht nur für sehr kurze Zeit ausgesetzt werden.

Konjugat **13** ist durch seine positive Ladung wesentlich hydrophiler als die übrigen Octreotat-Derivate. Folglich wird eine unspezifische Zellaufnahme für diese Verbindung eine untergeordnete Rolle spielen. Dieses zeigt sich in der deutlich besseren Aufnahme in HepG2, als in PT45-Zellen.

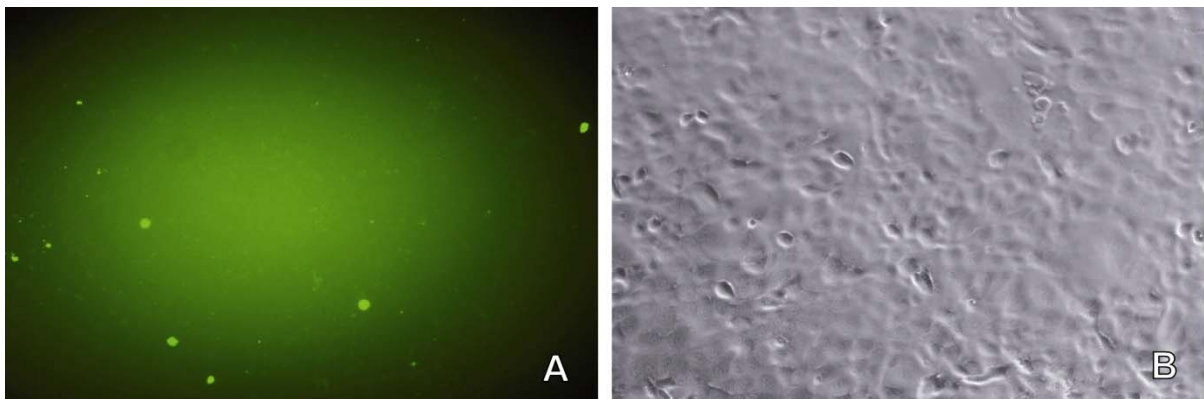


Abb. 3.14: Zellaufnahme von **13** (25 μ M) in PT45-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

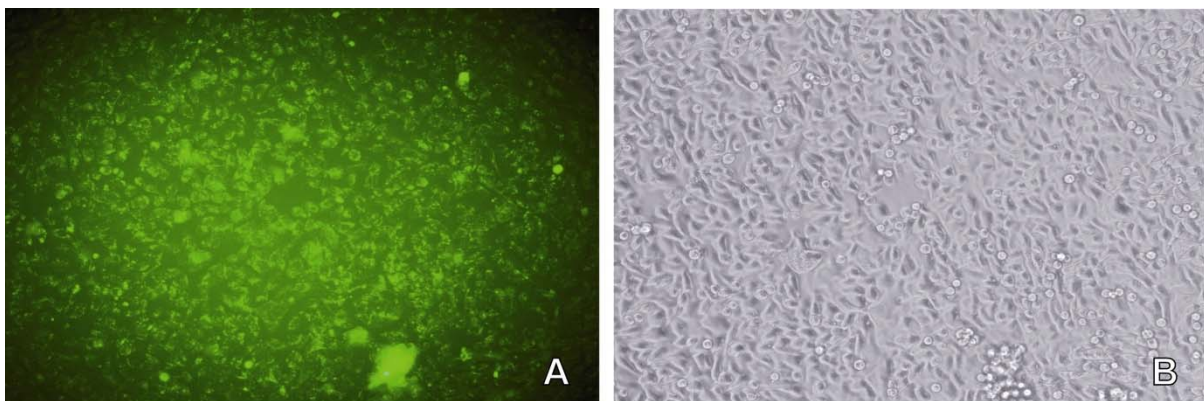


Abb. 3.15: Zellaufnahme von **13** (25 μ M) in HepG2-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

3.4.1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Octreotat-Aufnahme

Die Zellaufnahme der Biokonjugate **6**, **8**, **11** und **13** ist in HepG2-Zellen erheblich besser als in PT45-Zellen, was der Erwartung entspricht, da die HepG2-Zellen mehr SSTR2 exprimieren als PT45-Zellen. Der Unterschied der SSTR-Expression ist relativ gering; eventuell ist aber die RT-PCR für diesen Rezeptor nicht die geeignete Methode, da sie die Rezeptor-Expression nur indirekt über die mRNA-Expression quantifiziert.

Das Metallozen hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zellaufnahme, was sich in der unterschiedlich guten Zellaufnahme der Biokonjugate äußert. Das Ferrocen-Derivat **8** wird deutlich besser als das acetylierte Octreotat **6** aufgenommen. Evtl. wird **8** durch seine höhere Lipophilie in einem größeren Maße als **6** unspezifisch aufgenommen. Dass die Lipophilie nicht als einziger Faktor für eine gute Zellaufnahme entscheidend ist, zeigt sich darin, dass **8** bereits in geringen Konzentrationen sehr gut in HepG2-Zellen aufgenommen wird, Ruthenocenoyl-Octreotat (**11**) dagegen bei gleicher Lipophilie wesentlich schlechter. Die Lipophilie, und somit eine unspezifische Aufnahme, scheint vor allem bei der Zelllinie PT45 eine Rolle zu spielen, weniger bei HepG2-Zellen. Dieses zeigt sich in der besseren Aufnahme der lipophilen Ferrocen- und Ruthenocen-Verbindungen in PT45-Zellen im Vergleich zu den hydrophileren Verbindungen **6** und **13** (Abb. 3.16).

Für einen spezifischen Aufnahmemechanismus spricht die höhere Akkumulation der cyclischen Verbindung **8** in HepG2-Zellen im Vergleich zu **9**. Durch die lineare Struktur hat **9** nicht die optimale Struktur für die SSTR-Bindung und sollte daher weniger als **8** über einen spezifischen Mechanismus aufgenommen werden. Die Konjugate werden folglich vor allem unspezifisch in die Zelllinie PT45 aufgenommen; in HepG2-Zellen scheint aber ein spezifischer- und ein unspezifischer Mechanismus für die Zellaufnahme wichtig zu sein.

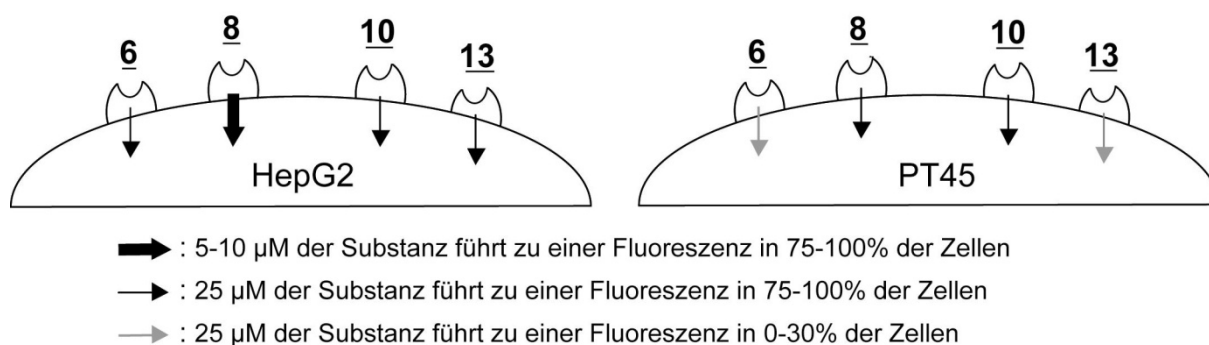


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Zellaufnahme der Konjugate **6**, **8**, **10** und **13**.

3.4.2 Zellaufnahme der Neurotensin(8-13)-Biokonjugate

Die Zellaufnahme der FITC-markierten NT(8-13)-Biokonjugate (Abb. 3.17) wurde in mehreren Pankreaskarzinom-Zelllinien mit unterschiedlicher NTR-Expression untersucht (Tab. 3.2). Vor allem sind die Neurotensin-Rezeptoren NTR1 und NTR3 vorhanden, wobei der NTR3 von allen getesteten Pankreaskarzinom-Zelllinien überexprimiert wird, aber starke Unterschiede im NTR1-Status gegeben sind. Es ist folglich zu erwarten, dass die Neurotensin-Derivate eher in Zelllinien mit hoher als mit geringer NTR1-Expression aufgenommen werden.

Die synthetisierten NT(8-13)-Derivate unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz, in der Position des Fluoreszenz-Markers, im C-Terminus und in der Wahl des Metallocens (Abb. 3.17). Konjugat **22** ist ein FITC-markiertes N-terminal acetyliertes Neurotensin-Derivat. Die Acetylgruppe von **22** wurde bei **23**, **26** und **27** gegen einen FcC(O)-, RcC(O)- bzw. CcC(O)- Rest ausgetauscht. Die Biokonjugate **22**, **23**, **24**, **26** und **27** besitzen keinen freien C-Terminus, da ein Lysin mit dem Fluoreszenz-Marker FITC an dieser Stelle funktionalisiert ist. Zusätzlich besitzt der C-Terminus anstelle der Säurefunktion eine Amidfunktion, im Gegensatz zu Verbindung **25**, die einen freien C-Terminus aufweist. Es wird deswegen angenommen, dass **25** besser als **23** in die NTR1-positiven Zellen aufgenommen wird, und zwar aufgrund des für die NTR1-Bindung wichtigen, freien C-Terminus. Das Konjugat **24** hat eine Sequenz, bei der die Aminosäuren der NT-Sequenz vertauscht wurden, so dass diese Sequenz möglichst verschieden von der ursprünglichen Sequenz ist. Die Ferrocenderivate **23** und **24** unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz so stark, dass davon auszugehen ist, dass **23** deutlich besser als **24** aufgenommen wird, da **24** nicht mehr an die Neurotensinrezeptoren binden, sondern nur über einen unspezifischen Mechanismus aufgenommen werden sollte.

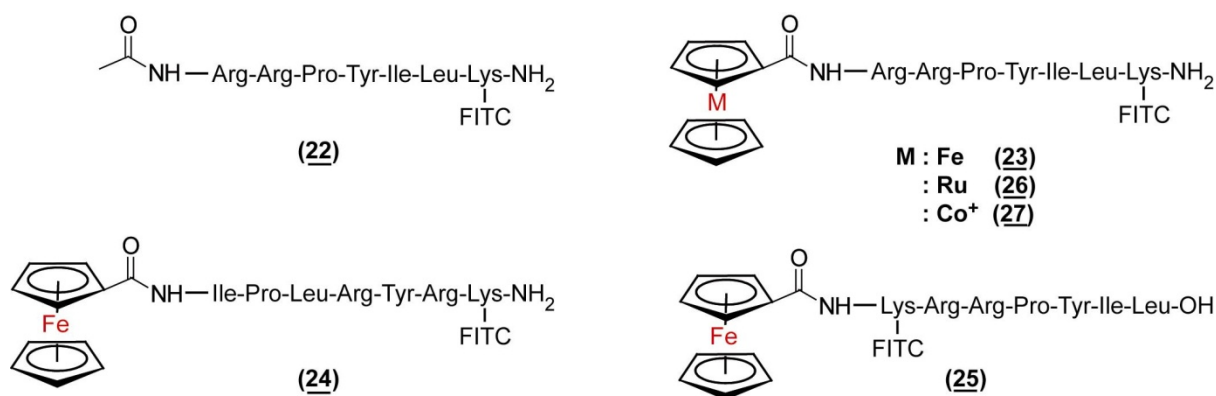


Abb. 3.17: Übersicht über die für die Zellaufnahme verwendeten NT(8-13)-Biokonjugate.

3.4.2.1 Ergebnisse der Aufnahme von Neurotensin-Konjugaten

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zellaufnahme der Verbindungen 22 bis 27 vorgestellt.

- Das acetylierte Neurotensin (22) wird in PT45-Zellen bei einer Konzentration von 10 μM schlecht aufgenommen (Abb. 3.18-A, D) und liegt in ca. 70% der Zellen nur in geringer Konzentration vor.

Nach Inkubation von 22 mit einer Konzentration von 10 μM weisen die IMIM-PC2-Zellen ebenfalls nur eine schwache Fluoreszenz auf (Abb. 3.18-B, E), die bei einer Konzentration von 25 μM noch an Intensität zunimmt. Die Zellaufnahme von 22 in die Zelllinien IMIM-PC2 und PT45 ist vergleichbar.

In den untersuchten Panc1-Zellen hat die Aufnahme von 22 bei einer Konzentration von 5 μM , 10 μM (Abb. 3.18-C, F) und 25 μM nur eine sehr geringe Effizienz. Nur ca. 10% der Zellen fluoreszieren nach der Inkubation mit 22; ferner lässt sich keine Intensivierung der Fluoreszenz mit steigender Konzentration bis 25 μM beobachten.

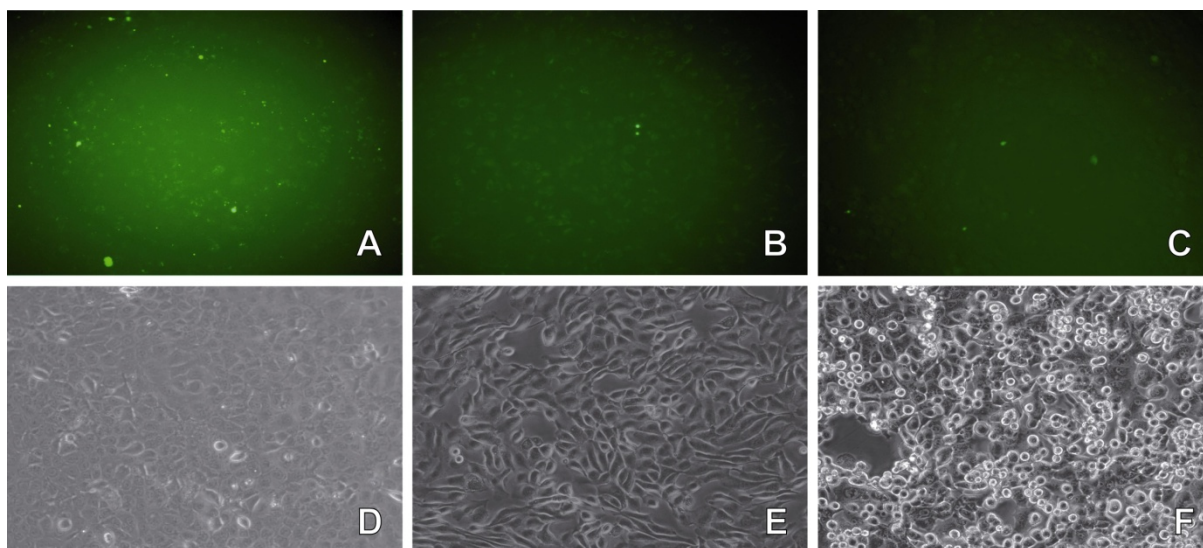


Abb. 3.18: Zellaufnahme: 22 (10 μM) nach 14-stündiger Inkubation; Fluoreszenzbild: A: PT45, B: IMIM-PC2, C: Panc1; Phasenkontrastbild: D: PT45, E: IMIM-PC2, F: Panc1; Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

Der Vergleich der Zellaufnahme von 22 in die Zelllinien PT45, IMIM-PC2 und Panc1 zeigt keine Abhängigkeit von der NTR1-Expression. Trotz stärkster NTR1-Expression ist sie in

Panc1-Zellen sogar am geringsten. Der Vergleich der Zellaufnahme in PT45- und IMIM-PC2-Zellen zeigt eine vergleichbare Effizienz der Zellaufnahme, obwohl IMIM-PC2-Zellen den NTR1 deutlich stärker exprimieren als die Zelllinie PT45. Die Verteilung von **22** ist in den Zellen aller drei Zelllinien punktförmig in Vesikeln um den Zellkern herum lokalisiert.

- Das Ferrocen-Derivat **23** zeigt bei einer Konzentration von 10 μM eine sehr gute Aufnahme in PT45-Zellen (Abb. 3.19-A, D, G). Die Fluoreszenz ist zu Beginn der Zellaufnahme punktförmig in Vesikeln lokalisiert (Abb. 3.19-A). Bei länger andauernder Bestrahlung der Zellen kam es während des Mikroskopierens nach wenigen Minuten zum Aufbrechen der vesikulären Struktur und dadurch zu einer gleichmäßigen Verteilung der Biokonjugate im Cytoplasma und einer verstärkten Lokalisierung im Zellkern (Abb. 3.19-D).

Die Inkubation von **23** mit IMIM-PC2-Zellen zeigt bei einer Konzentration von 5 μM nur eine schwache Fluoreszenz in den Zellen. Steigert man die Konzentration auf 10 μM , so beobachtet man eine stärkere Fluoreszenz und das Aufbrechen der Vesikel (Abb. 3.19-B, E, H). Durch Erhöhung der Konzentration auf 25 μM kann die Intensität der Fluoreszenz in den Zellen weiter erhöht und das Brechen der Vesikel beschleunigt werden. Die Fluoreszenzintensität in IMIM-PC2 ist schwächer als in PT45-Zellen.

Die Verbindung **23** zeigt eine effiziente Zellaufnahme in Panc1-Zellen mit Lokalisierung in einer vesikulären, perinukleären Struktur. Eine Konzentration von nur 5 μM ist ausreichend, um die Verbindung in fast 100% der Zellen aufzunehmen (Abb. 3.19-C, F, I). Durch Bestrahlung mit dem Anregungslicht bricht die vesikuläre Struktur bereits bei dieser niedrigen Konzentration auf. Bei Konzentrationen von 10 μM und 25 μM ist eine starke Hintergrundfluoreszenz zu beobachten. Es scheint, als würden die Panc1-Zellen die Verbindungen effektiv aufnehmen, aber mit der Zeit wieder ins Medium abgeben. Der Vergleich der Effizienz zeigt, dass **23** bei einer Konzentration von 5 μM eine etwas bessere Zellaufnahme in die Zelllinie Panc1 besitzt als in PT45 und IMIM-PC2. Bei einer Konzentration von 10 μM scheint hingegen die Aufnahme in Panc1- und IMIM-PC2-Zellen vergleichbar und in PT45 Zellen besser zu sein. Die Panc1-Zellen verhalten sich anders als PT45- und IMIM-PC2-Zellen, da ihre Vesikel leichter aufbrechen und sie die Verbindung **23** scheinbar wieder ans Medium abgeben; deswegen ist der Vergleich der Aufnahme in die unterschiedlichen Zelllinien hier schwierig.

Die stärkere Fluoreszenz im Nukleus nach dem Aufbrechen der Vesikel wird vermutlich durch die ringförmige Lokalisierung der aufbrechenden Vesikel um den Zellkern herum verursacht, sodass die gleichmäßige und ungehinderte Verteilung der Verbindung in alle Richtungen eine verstärkte Aufnahme in den Nukleus vortäuscht. Das Aufbrechen der Vesikel scheint vor allem peptidabhängig und konzentrationsabhängig zu sein.

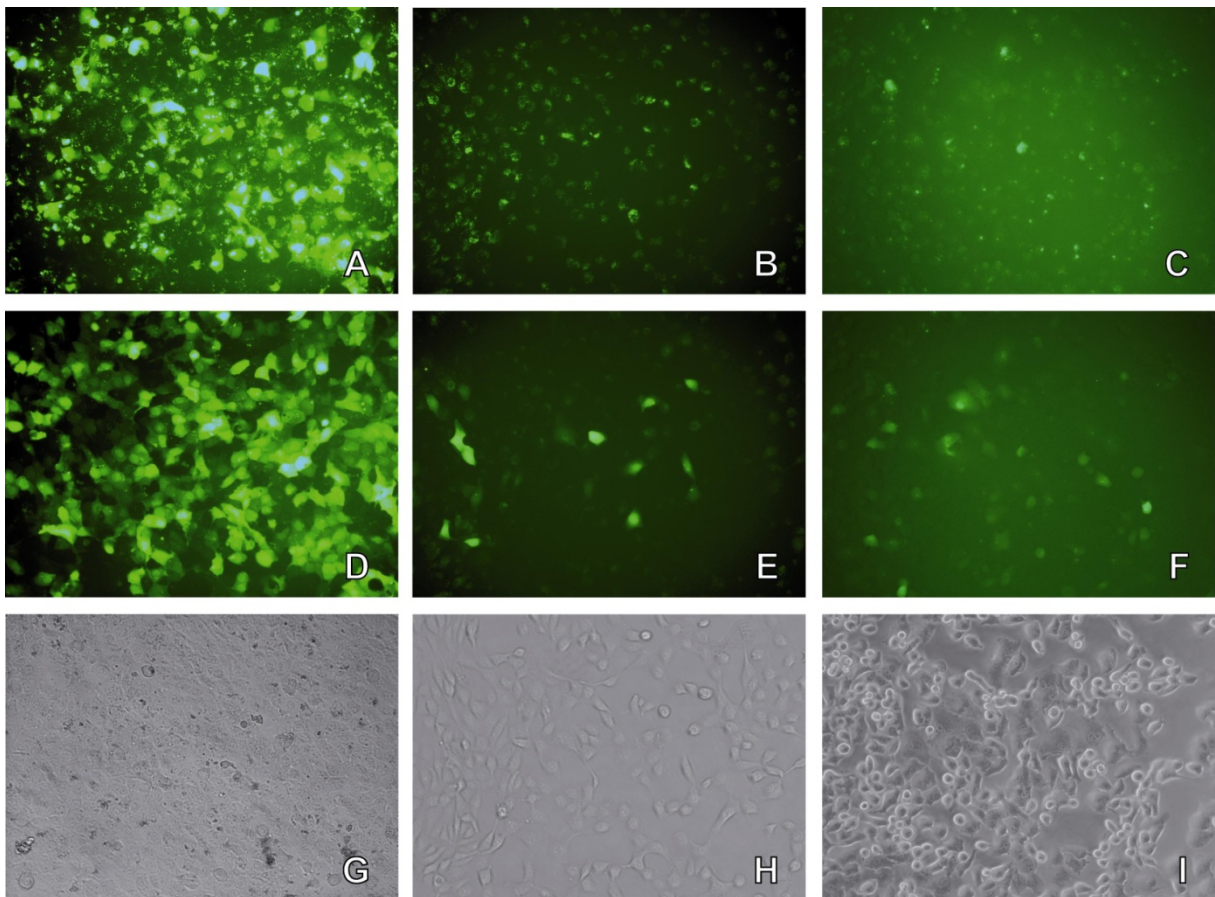


Abb. 3.19: Zellaufnahme: 23 nach 14-stündiger Inkubation; Fluoreszenzbild: A: PT45 (10 μ M), B: IMIM-PC2 (10 μ M), C: Panc1 (5 μ M); Fluoreszenz-Bild nach 3 Minuten Bestrahlung: D: PT45 (10 μ M), E: IMIM-PC2 (10 μ M), F: Panc1 (5 μ M); Phasenkontrastbild: G: PT45, H: IMIM-PC2, I: Panc1; Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Zur Untersuchung der Rezeptor-Spezifität wurde das Biokonjugat 24 synthetisiert. Hierfür wurde die Aminosäuresequenz des NT(8-13) stark variiert, ohne die Lipophilie zu verändern. Diese Sequenzänderung soll bewirken, dass der Peptidanteil nicht oder zumindest wesentlich schlechter an den Neurotensin-Rezeptor bindet und folglich das Biokonjugat in NTR-positive Zellen schlechter aufgenommen wird als Neurotensin selbst, dessen Internalisierung über einen rezeptorvermittelten Prozess abläuft. Die Untersuchung der Zellaufnahme von 24 mit einer Konzentration von 10 μ M zeigte eine gute Internalisierung in PT45-Zellen (Abb. 3.20-A, D, G). Die Zellaufnahme ist etwas geringer als die Aufnahme der Verbindung

23 in PT45-Zellen, was aus der schwächeren Fluoreszenz und dem langsameren und unvollständigerem Aufbrechen der Vesikel abzuleiten ist.

In IMIM-PC2-Zellen zeigt das Biokonjugat **24** bei einer Konzentration von 5 μM eine kaum wahrnehmbare Fluoreszenz. Durch die Erhöhung der Konzentration auf 10 μM (Abb. 3.20-B, E) beobachtet man eine schwache Fluoreszenz in perinukleären Vesikeln, wobei deren Aufbrechen ausbleibt. Durch die Erhöhung der Konzentration auf 25 μM intensiviert sich die Fluoreszenz innerhalb der Zellen, und es kommt zu einem Aufbrechen der vesikulären Struktur. Das Konjugat **24** wird besser in PT45- als in IMIM-PC2-Zellen aufgenommen. Bei gleicher Konzentration der Biokonjugate zeigt **23** eine deutlich bessere Zellaufnahme als **24**.

In Panc1-Zellen zeigt **24** keine effiziente Transduktion bei einer Konzentration 5 μM . Die Erhöhung der Konzentration auf 10 μM zeigt dagegen eine gute Aufnahme, und es kommt zusätzlich zu einem vollständigen lichtinduzierten Aufbrechen der Vesikel. Die Zellaufnahme von Panc1- und PT45-Zellen ist vergleichbar effizient; hingegen ist die Internalisierung in IMIM-PC2-Zellen deutlich geringer. Der Vergleich von **23** und **24** in Panc1-Zellen zeigt eine bessere Zellaufnahme von **23** bei einer Konzentration von 5 μM . Bei einer Konzentration von 10 μM scheint **24** besser aufgenommen zu werden. Dieses liegt aber eventuell daran, dass **23** bei dieser Konzentration aus der Zelle wieder in das Medium abgegeben wird.

Die Verbindung **24** liegt wie **22** und **23** perinukleär in Vesikeln lokalisiert vor. In allen drei Zelllinien ist die Zellaufnahme von **24** geringer als die Aufnahme von **23**, aber deutlich effizienter als die von **22**. Die Aufnahme-Effizienz von **24** scheint unabhängig von dem Vorhandensein des NTR1 zu sein, da es vergleichbar gut in NTR1-negative und NTR1-positive Zellen aufgenommen wird. Gründe für diese Beobachtung können eine nicht optimale Veränderung der Peptidsequenz sein, eine Aufnahme über den weniger spezifischen NTR3 oder dass **24** zu einem großen Teil unspezifisch aufgenommen wird.

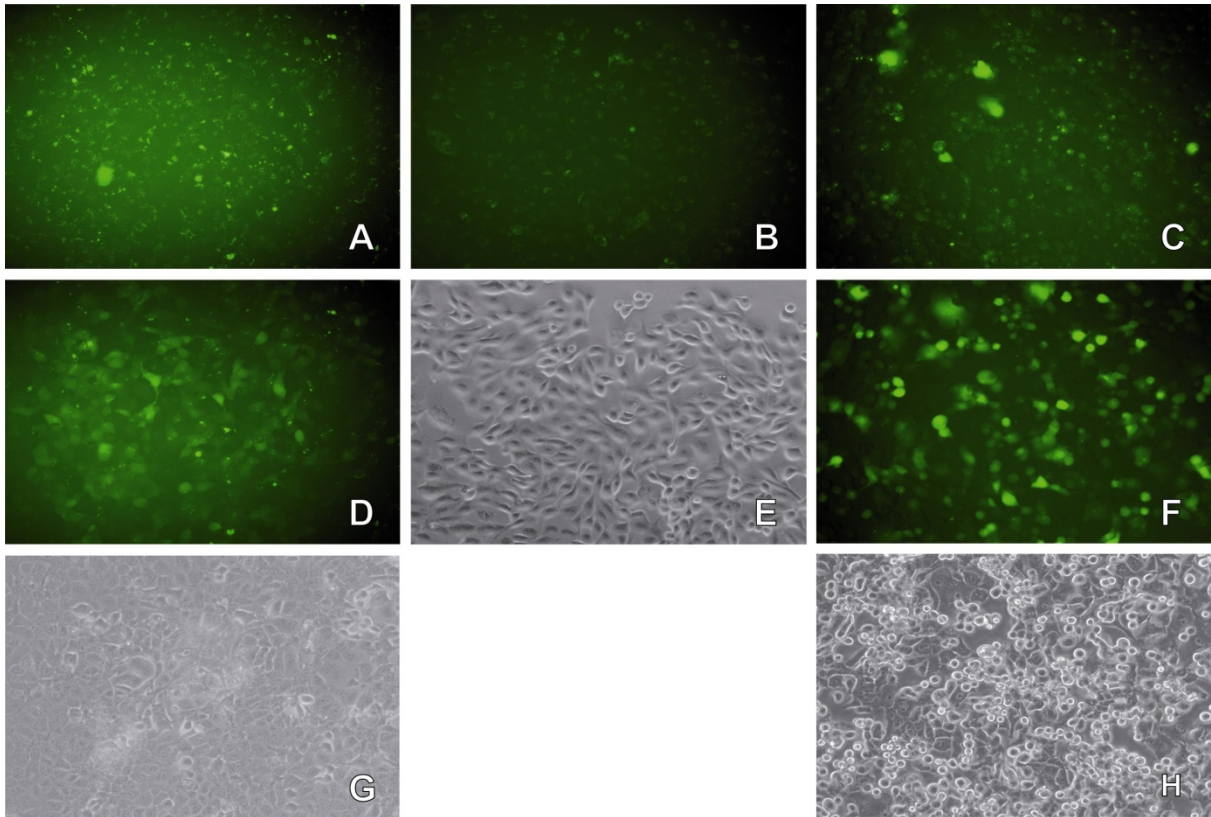


Abb. 3.20: Zellaufnahme: 24 ($10\ \mu\text{M}$) nach 14-stündiger Inkubation; Fluoreszenzbild: A: PT45, B: IMIM-PC2, C: Panc1; Fluoreszenzbild nach drei Minuten Bestrahlung: D: PT45, F: Panc1; Phasenkontrastbild: G: PT45, E: IMIM-PC2, H: Panc1; Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Der freie C-Terminus des Neurotensins(8-13) ist wichtig für die Bindung an den NTR1. Da sich in dem Biokonjugat 23 am C-Terminus der Fluoreszenzmarker und eine Amidfunktion befinden, wurde zum Vergleich Verbindung 25 hergestellt. Diese Verbindung besitzt einen freien C-Terminus, da der Fluoreszenz-Marker N-terminal über ein Lysin an die Neurotensin-Sequenz gebunden ist (Abb. 3.17).

In der Zelllinie PT45 zeigt die Verbindung 25 sogar bei einer Konzentration von $25\ \mu\text{M}$ eine schlechte Aufnahme mit einer vesikulären Verteilung (Abb. 3.21-A, D).

In IMIM-PC2-Zellen wird 25 sogar noch schlechter aufgenommen als in PT45-Zellen. Bei einer Konzentration von $25\ \mu\text{M}$ nehmen nur sehr wenige Zellen das Biokonjugat auf (Abb. 3.21-B, E).

In Panc1-Zellen wird 25 bei einer Konzentration von $25\ \mu\text{M}$ kaum aufgenommen (Abb. 3.21-C, F). Die Effizienz der Zellaufnahme ist vergleichbar mit der Aufnahme in IMIM-PC2- und schlechter als in PT45-Zellen. Es scheint, dass das Vorhandensein des NTR1

die Zellaufnahme nicht wie erwartet fördert. Der Vergleich der Zellaufnahme von **23** und **25** zeigt eine deutlich höhere Internalisierungseffizienz der Verbindung **23**, obwohl sie sogar geringfügig hydrophiler ist und keinen freien C-Terminus besitzt. Das Vorhandensein eines freien C-Terminus begünstigt die Zellaufnahme in diesem Fall nicht, obwohl die NTR1-Bindung stärker und folglich die Aufnahme von **25** besser sein sollte als die von **23**.

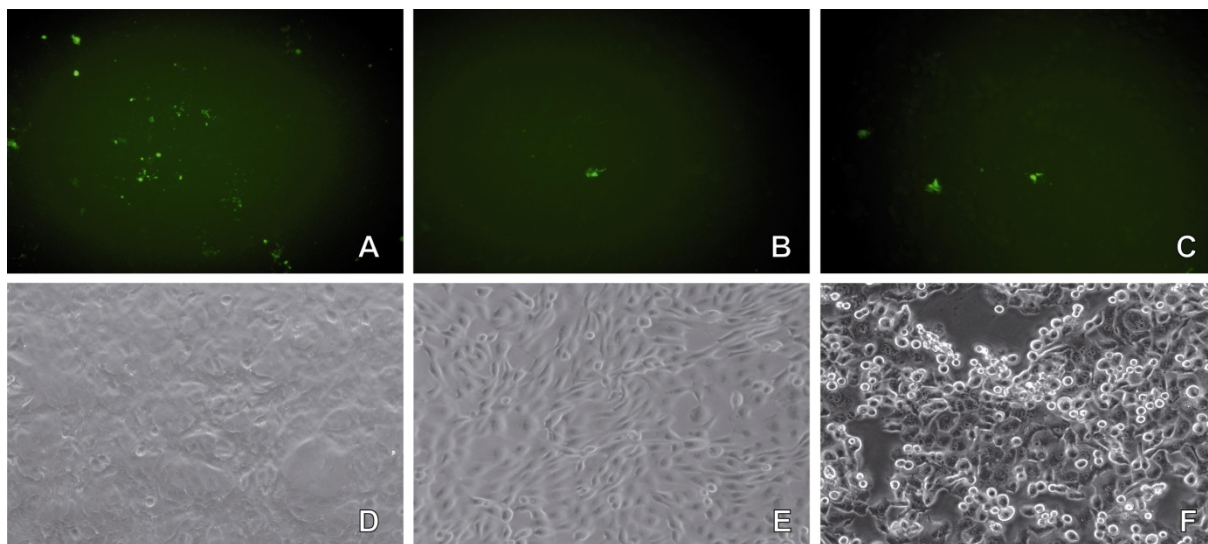


Abb. 3.21: Zellaufnahme: **25** (25 μM) nach 14-stündiger Inkubation; Fluoreszenzbild: A: PT45, B: IMIM-PC2, C: Panc1; Phasenkontrastbild: D: PT45, E: IMIM-PC2, F: Panc1; Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Das Cobaltocenium-Derivat (**27**) zeigt eine schlechtere Zellaufnahme als die Ferrocen-Verbindung (**23**). Bei Verwendung einer Konzentration von 5 μM von **27** konnte keine bzw. nur eine sehr geringe Zellaufnahme in PT45-Zellen beobachtet werden. Nach Erhöhung der Konzentration auf 10 μM ist eine leichte Fluoreszenz wahrnehmbar; zusätzlich kommt es zu einem schnellen Ausbleichen des Fluorophors. Die Inkubation mit 25 μM zeigt eine Aufnahme in fast alle untersuchten PT45-Zellen mit vereinzeltem Aufbrechen der Vesikel (Abb. 3.22-A, D, G). Ein Vergleich dieser Verbindung mit den anderen Neuropeptid-Derivaten ist aufgrund des Photobleachings schwierig.

Die Internalisierung von **27** in IMIM-PC2-Zellen bei einer Konzentration von 5 μM ist nicht ausreichend, um eine Zellaufnahme beobachten zu können.

Die Erhöhung der Konzentration auf 10 μM führt zu einer schwachen Fluoreszenz; eine Erhöhung auf 25 μM bewirkt eine gute Zellaufnahme mit vereinzeltem Aufbrechen der Vesikel (Abb. 3.22-B, E, H). Die Aufnahme in PT45- und IMIM-PC2-Zellen ist vergleichbar effizient.

Die Zellaufnahme von **27** in Panc1-Zellen ist bei einer Konzentration von 5 μM ineffektiv, wenig effizient (ca. 10%) bei 10 μM , und auch bei einer Konzentration von 25 μM bleibt die Aufnahme gering (ca. 30%) (Abb. 3.22-C, F). Auch **27** wird besser in NTR1 schwächer exprimierten PT45- und IMIM-PC2-Zellen aufgenommen als in die Panc1-Zellen, die den NTR1 überexprimieren. Die Zellaufnahme ist im Allgemeinen geringer als die der anderen Metalloce-Neurotensin-Biokonjugate; dieses kann in der Hydrophilie der Verbindung begründet sein.

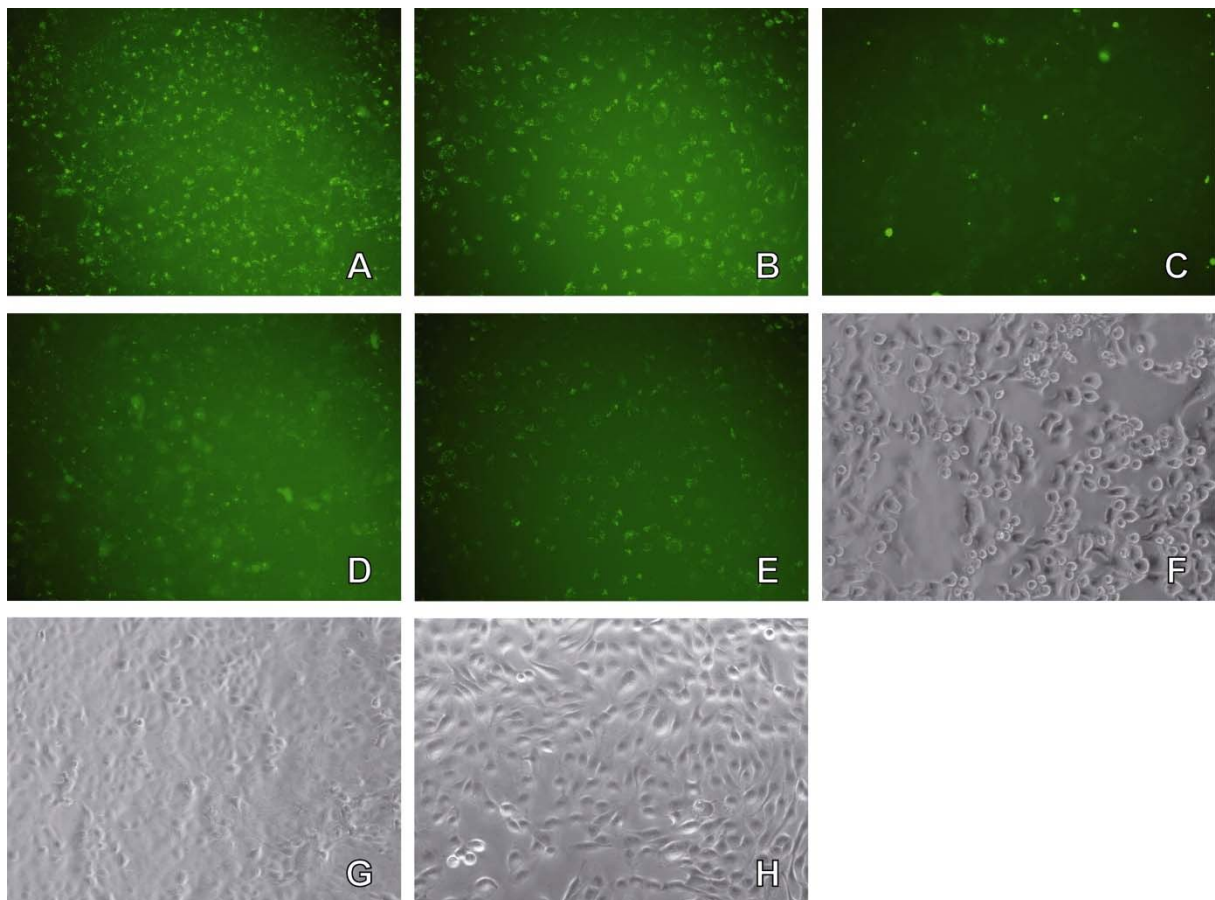


Abb. 3.22: Zellaufnahme: **27** (25 μM) nach 14-stündiger Inkubation; Fluoreszenzbild: A: PT45, B: IMIM-PC2, C: Panc1; Fluoreszenzbild nach fünf Minuten Bestrahlung: D: PT45, E: IMIM-PC2; Phasenkontrastbild: F: Panc1, G: PT45, H: IMIM-PC2; Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Verbindung **26** wird bereits bei einer Konzentration von 5 μM gut in PT45-Zellen aufgenommen; es kommt bei dieser Konzentration jedoch zu keinem vollständigen Brechen der Vesikel. Bei einer Konzentration von 10 μM kann eine effiziente Zellaufnahme beobachtet werden (Abb. 3.23-A, D, G), bereits bei einer Konzentration von 25 μM fällt die Substanz im Medium aus.

Die Zellaufnahme von **26** in IMIM-PC2-Zellen bei einer Konzentration von 5 μM zeigt nur in wenigen Zellen eine Internalisierung. Bei einer Konzentration von 10 μM beobachtet man bei stark vorhandener Hintergrundfluoreszenz eine gute Effizienz bezüglich der Zellaufnahme (Abb. 3.23-B, E, H). Bei der Inkubation von 25 μM fällt die Substanz im Medium aus.

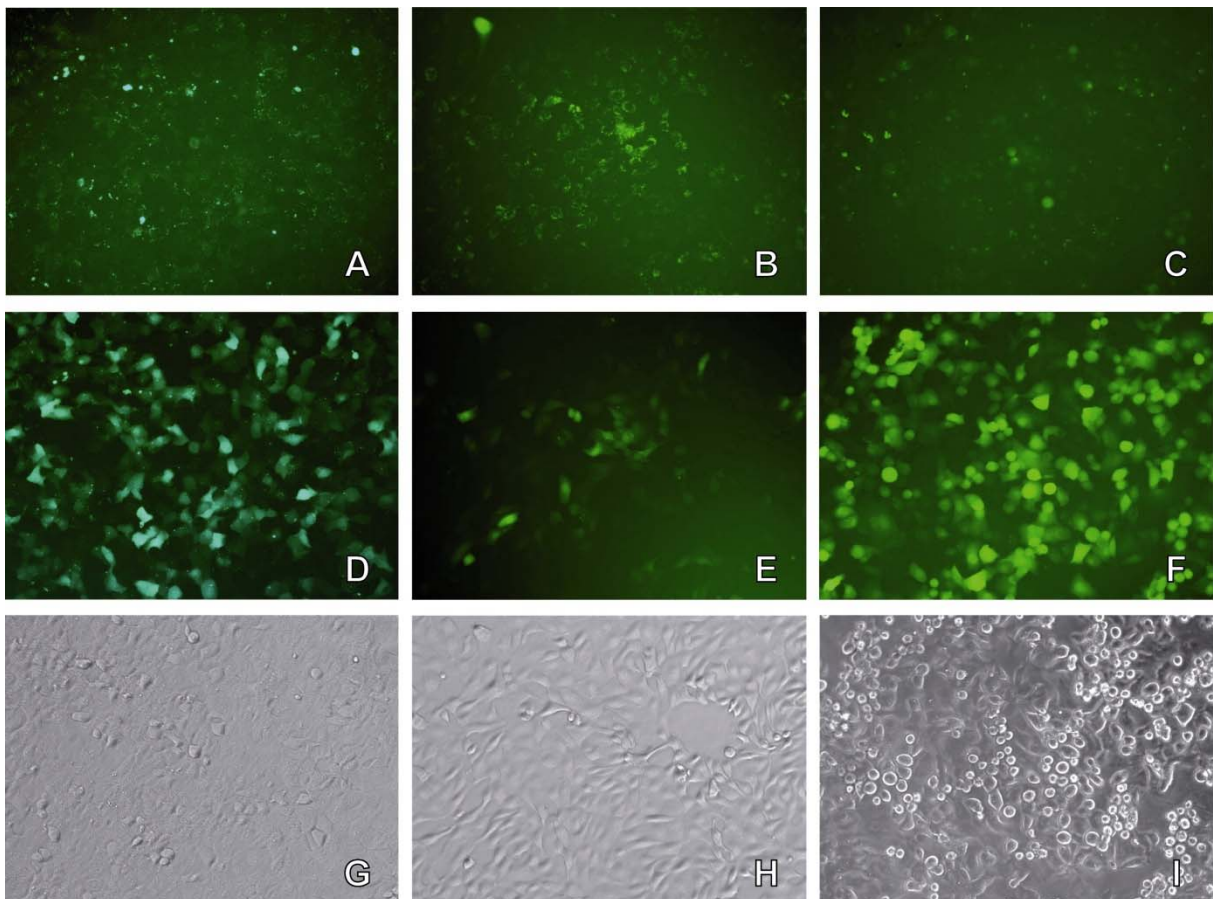


Abb. 3.23: Zellaufnahme: **26** (10 μM) nach 14-stündiger Inkubation; Fluoreszenzbild: A: PT45, B: IMIM-PC2, C: Panc1; Fluoreszenzbild nach 3 Minuten Bestrahlung: D: PT45, E: IMIM-PC2, F: Panc1; Phasenkontrastbild: G: PT45, H: IMIM-PC2, I: Panc1; Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

In die Zelllinie Panc1 wird **26** gut aufgenommen. Bei einer Konzentration von 5 μM kann in den meisten Zellen eine schwache Fluoreszenz mit einem teilweisen Aufbrechen der vesikulären Struktur beobachtet werden. Bei Verwendung einer 10 μM Konzentration beobachtet man eine Internalisierung in allen Zellen, wobei die Vesikel annähernd vollständig brechen (Abb. 3.23-C, F, I). Die Effizienz der Zellaufnahme verbessert sich durch eine Erhöhung der Konzentration nicht, während sich die Hintergrundfluoreszenz jedoch verstärkt. Die Zellaufnahme von **26** in IMIM-PC2 ist weniger effizient als in Panc1- und PT45-Zellen. Auch bei diesem Biokonjugat scheint die Aufnahme nicht über den NTR1 zu verlaufen.

3.4.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Neurotensin-Aufnahme

Die Neurotensin-Biokonjugate wurden an drei verschiedenen Zelllinien (PT45, IMIM-PC2 und Panc1) mit unterschiedlichem Rezeptorstatus untersucht. Die Zelllinie PT45 zeigt kaum eine Expression des NTR1; Die Zelllinie IMIM-PC2- zeigt eine gute Expression des Rezeptors, und in Panc1-Zellen wird NTR1 sogar überexprimiert (Abb. 3.24). Alle Zelllinien überexprimieren zusätzlich NTR3. Alle getesteten Biokonjugate werden in die Zelllinie PT45 effektiv internalisiert und zeigen eine deutlich schlechtere Aufnahme in die NTR1-positiven Panc1- und IMIM-PC2-Zellen. Die Aufnahme der Verbindungen scheint nicht von der Expression des NTR1 abhängig zu sein, sondern überwiegend über den NTR3 zu erfolgen, der aber nur zu einem geringen Anteil (5-10%) membranständig lokalisiert ist. Es wird diskutiert, dass NTR3 für die Aufnahme von überschüssigem Neurotensin im Körper zuständig ist,^[192, 193] was die effektive Aufnahme der Neurotensin-Biokonjugate erklären würde. Ferner wird der NTR1 nach seiner Internalisierung nicht wiederverwertet, sondern innerhalb der Zelle abgebaut und neu synthetisiert. Im Gegensatz dazu wird der NTR3 recycelt und steht folglich Agonisten nach der Internalisierung schneller wieder zur Verfügung. Die Rezeptormechanismen der drei NTRen sind aber noch nicht bis ins einzelne geklärt, außerdem scheinen sie zusätzlich abhängig von der Zelllinie zu variieren.

Es sollte davon ausgegangen werden, dass durch den freien C-Terminus Verbindung **25** gut an den überexprimierten NTR1 bindet und effektiv über diesen in die Zelle aufgenommen wird. Die Biokonjugate **22**, **23**, **24** und **26** besitzen keinen freien C-Terminus für eine starke Bindung an den NTR1. Demzufolge sollten sie schlechter in IMIM-PC2- und Panc1-Zellen aufgenommen werden als die Verbindung **25**. Es zeigte sich aber erstaunlicherweise, dass die Effizienz der Internalisierung in der Reihenfolge **23** > **26** > **24** > **22** > **25** abnimmt (Abb. 3.24). Zusätzlich wird **25** schlechter in Panc1- und IMIM-PC2- als in PT45-Zellen aufgenommen. Wichtiger als ein freier C-Terminus ist für eine gute Zellaufnahme die Amidfunktion oder der Fluoreszenzmarker am C-Terminus, da sogar Verbindung **24** mit veränderter Aminosäuresequenz effektiv von den Pankreaskarzinom-Zellen aufgenommen wird. Da die lipophilen Ferrocen- und Ruthenocen-Verbindungen deutlich besser aufgenommen werden als die acetylierte Verbindung, scheint die Metallocenkomponente für die Aufnahme eine große Rolle zu spielen. Der Vergleich des Biokonjugats **27** mit den übrigen NT(8-13)-Derivaten ist schwierig, da **27** schneller als die anderen Verbindungen durch das Anregungslicht ausgebleicht wird.

Die Neurotensin-Derivate zeigen insgesamt alle eine gute Zellaufnahme in den verwendeten Zelllinien. Aufgrund der besseren Zellaufnahme von 23 im Vergleich zu 24 liegt ein rezeptor-vermittelter Aufnahmemechanismus der Biokonjugate zumindest teilweise vor. Allerdings scheint eine unspezifische Aufnahme der Verbindungen zusätzlich gegeben zu sein. Es könnte bei niedrigen Konzentrationen eine rezeptorvermittelte Aufnahme erfolgen, die bei einem Überangebot an Substanz von einem unspezifischen Aufnahmemechanismus begleitet bzw. dominiert wird. Eine weitere Erklärung wäre eine unterschiedliche Aufnahmegeschwindigkeit, die zelltypabhängig ist. Es könnte der NTR3 je nach Zelllinie unterschiedlich stark membranständig lokalisiert sein und so die Internalisierung beeinflussen. Bei der Aufnahme über einen unspezifischen Mechanismus unterscheidet sich möglicherweise die Endozytose-Geschwindigkeit der Zelllinien.

Bei einer hohen Konzentration der Verbindungen in dem Vesikel kommt es zu einem Aufbrechen der vesikulären Struktur und zum Freisetzen der Konjugate in die gesamte Zelle. Dieses Aufbrechen kann durch Inkubation der Zellen im Brutschrank (37 °C und 10% CO₂) rückgängig gemacht werden.

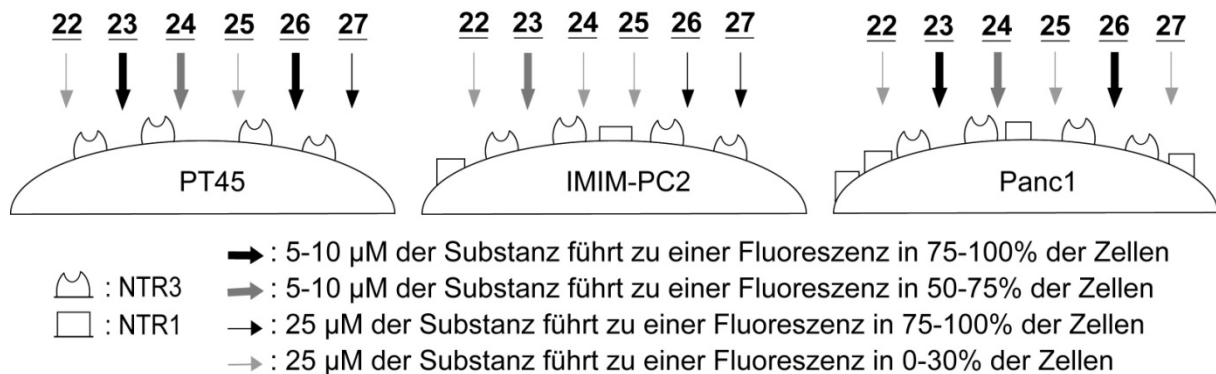


Abb. 3.24: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Zellaufnahme der Konjugate 22 bis 27.

3.4.3 Zellaufnahme-Untersuchung der Polyarginin-Konjugate

Polyarginin-Biokonjugate werden anscheinend mittels eines Rezeptor-unabhängigen Mechanismus aufgenommen. Vermutet wird, dass Polyarginin über seine positiv geladenen Seitenketten elektrostatisch an die Zellmembran bzw. Heparan bindet und durch aktive Endozytose aufgenommen wird.^[221] Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Polyarginin unabhängig vom Rezeptorstatus der verwendeten Zelle in der Lage ist, in eine Vielzahl von

verschiedenen Zelllinien aufgenommen zu werden. Die Verbindungen **17**, **19** und **21** (Abb. 3.25) wurden an HepG2-, IMIM-PC2- und PT45-Zellen getestet und werden in alle drei Zelllinien gut aufgenommen. In dieser Arbeit wird nur auf die Zellaufnahme in PT45-Zellen eingegangen, da die Aufnahme in die übrigen Zelllinien vergleichbar ist. Im folgenden Abschnitt wird die Zellaufnahme der Polyarginin-Konjugate **17**, **19** und **21** vorgestellt.

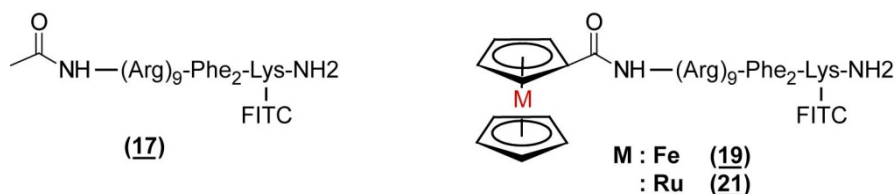


Abb. 3.25: Übersicht über die für die Zellaufnahme verwendeten Polyarginin-Biokonjugate.

- Ac-PolyR-Lys(FITC)-NH₂ (**17**) zeigt bei einer Konzentration von 10 µM eine gute Zellaufnahme in PT45-Zellen mit einer perinukleären und vesikulären Verteilung sowie ein konzentrations- und lichtinduziertes Aufbrechen der Vesikel. Bei einer Konzentration von 10 µM geschieht dieses nur teilweise (in ca. 30% der Zellen), kann aber durch eine Erhöhung der Konzentration verstärkt werden (Abb. 3.26).

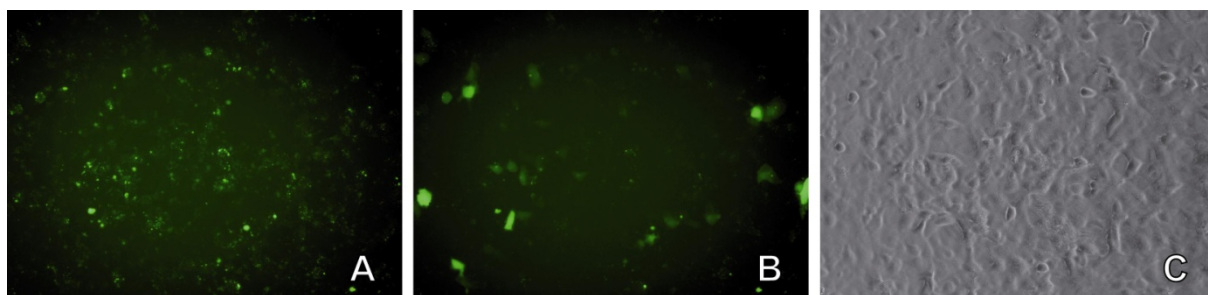


Abb. 3.26: Zellaufnahme von **17** (10 µM) in PT45-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- FcC(O)-PolyR-Lys(FITC)-NH₂ (**19**) zeigt bei einer Konzentration von 10 µM ebenso wie **17** eine vesikuläre Lokalisierung in PT45-Zellen (Abb. 3.27). Bei Verbindung **19** beobachtet man im Vergleich zu **17** eine bessere Zellaufnahme bei gleicher Konzentration. Dieses zeigt sich in der intensiveren Fluoreszenz der Zellen und dem stärkeren lichtinduzierten Aufbrechen der vesikulären Struktur.

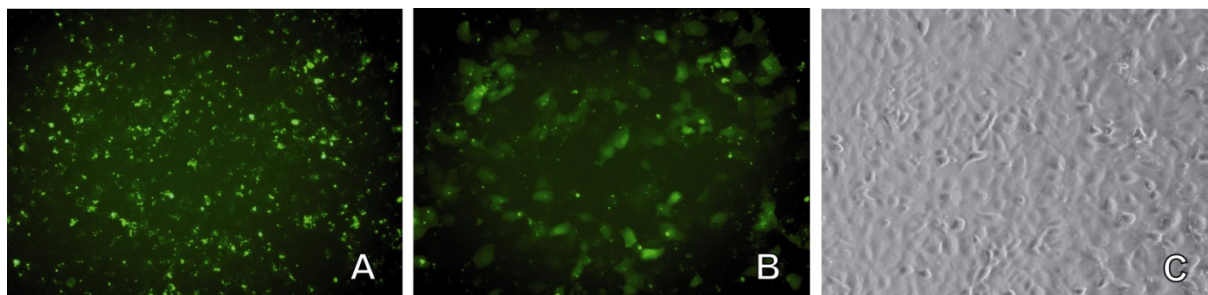


Abb. 3.27: Zellaufnahme von **19** ($10\ \mu\text{M}$) in PT45-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

- Bei der Inkubation von $10\ \mu\text{M}$ RcC(O)-PolyR-Lys(FITC)-NH₂ (**21**) wurde eine gute Zellaufnahme beobachtet (Abb. 3.28). Diese zeigt sich in einer intensiven Fluoreszenz und zeichnet sich durch ein nahezu komplettes Aufbrechen (90%) der Vesikel aus. Auch bei einer $5\ \mu\text{M}$ Konzentration konnte man eine gute Aufnahme (in ca. 75% der Zellen), aber mit einer geringen Fluoreszenz-Intensität beobachten. Bei Verwendung einer $25\ \mu\text{M}$ Konzentration sind die Vesikel größer und bilden Agglomerate.

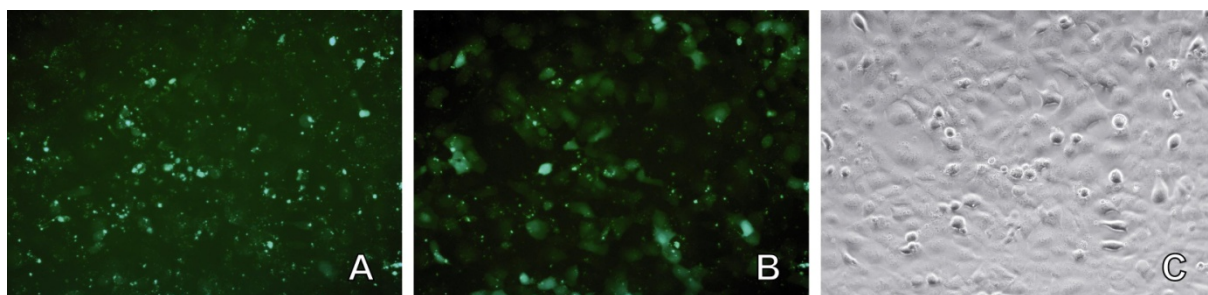


Abb. 3.28: Zellaufnahme von **21** ($10\ \mu\text{M}$) in PT45-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

3.4.4 Zellaufnahme der Szeto-Schiller Peptide

Die Szeto-Schiller Peptide (SS-Peptide) sind Peptide mit einer alternierenden Sequenz aus geladenen und aromatischen Aminosäuren. Sie sind für eine selektive Mitochondrien-Lokalisierung konzipiert.^[240]

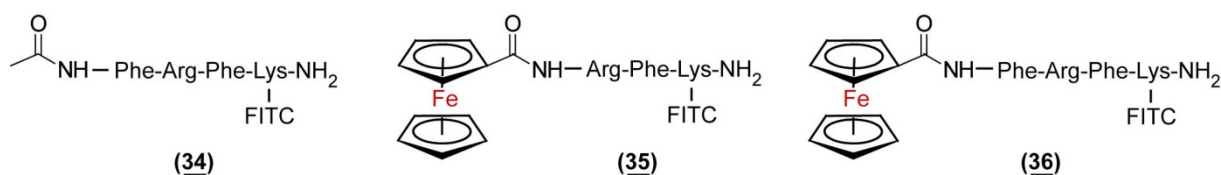


Abb. 3.29: Übersicht über die für die Zellaufnahme verwendeten SS-Peptid-Derivate.

Die Konjugate **34**, **35** und **36** wurden an IMIM-PC2-, PT45- und HepG2-Zellen getestet. Die Verbindungen konnten nicht in den Mitochondrien lokalisiert werden, vielmehr zeigten sie, wie auch die Neurotensin- und Polyarginin-Derivate, eine Lokalisierung in Vesikeln, die unter Lichteinfluss aufbrachen. Aufgrund der Tatsache, dass Mitochondrien eine Doppelmembran besitzen und diese stabiler ist als eine Einfachmembran, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den aufbrechenden Organellen nicht um Mitochondrien handelt, sondern um Lysosomen und Endosomen. Ferner besitzen die Vesikel optisch die runde Form von Endosomen bzw. Lysosomen und nicht die tubuläre Struktur der Mitochondrien. Ein Grund für die ausbleibende Lokalisierung in Mitochondrien kann das Fehlen eines freien N-Terminus sein (Abb. 3.29). Durch diesen besitzen die Konjugate keine drei positiven Ladungen unter physiologischen Bedingungen, die für eine Lokalisierung in Mitochondrien notwendig sind. Weiterhin ist der Fluoreszenzmarker eine relativ große und sterisch anspruchsvolle Gruppe, welche die Eigenschaften der kleinen SS-Peptide stark verändert. Es ist wahrscheinlich, dass die Verbindungen aufgrund ihrer veränderten Struktur und Ladung nicht in den Mitochondrien lokalisieren.

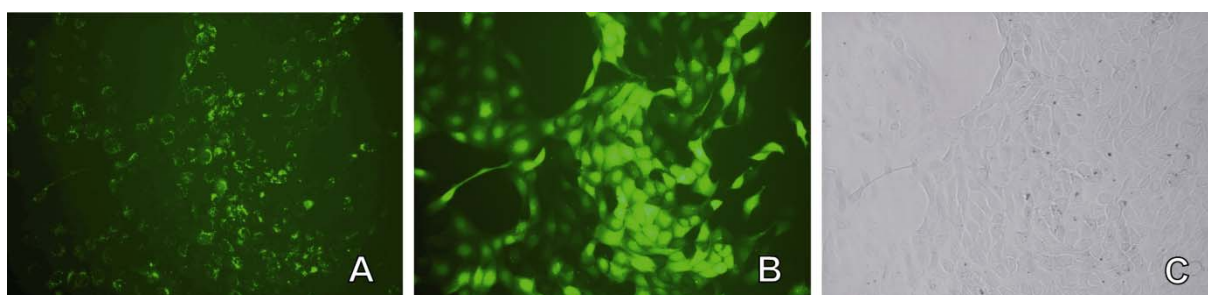


Abb. 3.30: Zellaufnahme von **36** ($10\ \mu\text{M}$) in IMIM-PC2-Zellen nach 14-stündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 200-fachen Vergrößerung.

Die allgemeine Zellaufnahme der Verbindungen in IMIM-PC2-Zellen ist sehr gut (Abb. 3.30); aber auch in die übrigen getesteten Zelllinien wurden die Biokonjugate effektiv internalisiert. Bei Verwendung einer $10\ \mu\text{M}$ Konzentration ist eine Aufnahme in nahezu alle (ca. 90%) IMIM-PC2-Zellen möglich. Aufgrund der starken Veränderung der Peptid-Eigenschaften durch den Fluoreszenz-Marker, wurde die Zellaufnahme der übrigen SS-Peptide nicht weiter verfolgt, sondern nur die Zytotoxizität der FITC-freien Verbindungen untersucht.

3.4.5 Zellaufnahme des MTS-Peptids

NH₂-MTS-Lys(FITC)-Lys(FcC(O))-NH₂ (**45**) wurde in einer Konzentration von 10 µM mit den Zellen für zwei Stunden inkubiert.

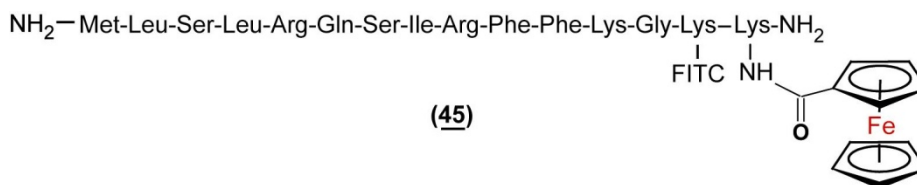


Abb. 3.31: Für die Zellaufnahme verwendetes MLS-Konjugat (**45**).

Die Verbindung **45** (Abb. 3.31) wurde effizient in HepG2-, Hela- und PT45-Zellen aufgenommen, sie zeigt eine gute Zellaufnahme bei einer Konzentration von 10 µM in HepG2-Zellen (Abb. 3.32). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte eine Struktur, die weniger punktförmig erscheint und weniger scharfe Ränder besitzt als die Vesikel der bereits vorgestellten Biokonjugate. Zusätzlich ist eine stärkere Hintergrundfluoreszenz im Zytoplasma zu beobachten, und es kommt zu keinem lichtinduzierten Aufbrechen der Vesikel. Die Verteilung von **45** in den Zellen unterscheidet sich von den bisher untersuchten Biokonjugaten.

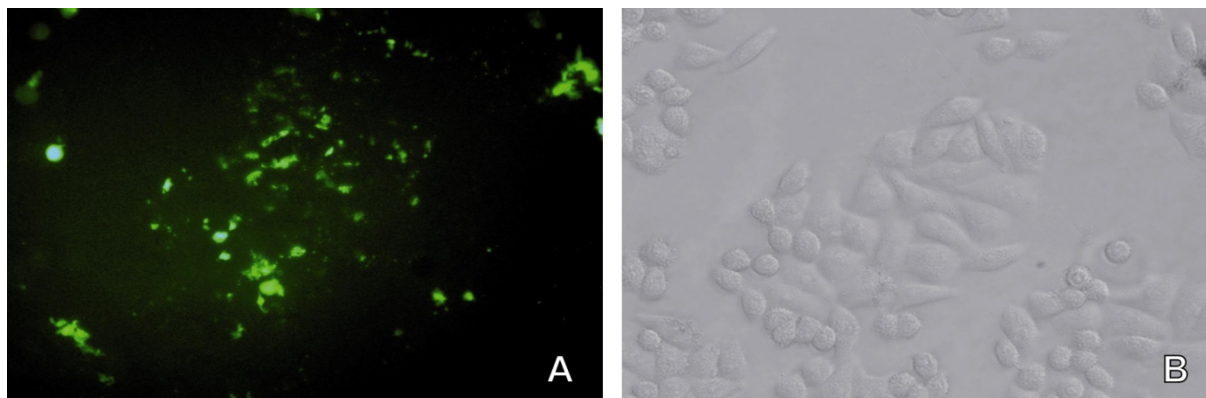


Abb. 3.32: Zellaufnahme von **45** (10 µM) in IMIM-PC2-Zellen nach zweistündiger Inkubation; A: Fluoreszenzbild; B: Phasenkontrastbild. Verwendet wurde ein FITC-Filter bei einer 400-fachen Vergrößerung.

3.5 Untersuchung der Lokalisierung

Die Lokalisierung der FITC-markierten Biokonjugate in der Zelle wurde mithilfe eines konfokalen Mikroskops untersucht. Um unterschiedliche Organellen in der Zelle sichtbar zu machen, wurden spezifische kommerziell erhältliche Farbstoffe (DRAQ5 (Färbung des

Zellkerns), FM4-64 (Färbung der Endosomen), LysoTracker Red (Färbung der Lysosomen) und MitoTracker Deep Red (Färbung der Mitochondrien) verwendet. Die Biokonjugate wurden an der humanen Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 getestet, weil diese relativ robust gegenüber zytotoxischen Verbindungen ist. Die Experimente wurden an lebenden Zellen durchgeführt, da es durch den Fixierungsvorgang zu einer starken Artefaktbildung kommt (Abb. 3.33). Die mikroskopische Messung der lebenden Zellen musste je nach Peptid innerhalb von 15 bis 30 Minuten beendet sein, da die Zellen sonst ihre Struktur verloren und es zu einer Blasenbildung im Zytosol sowie zu einem Verlust der Vesikel- und Zellkernstruktur kam.

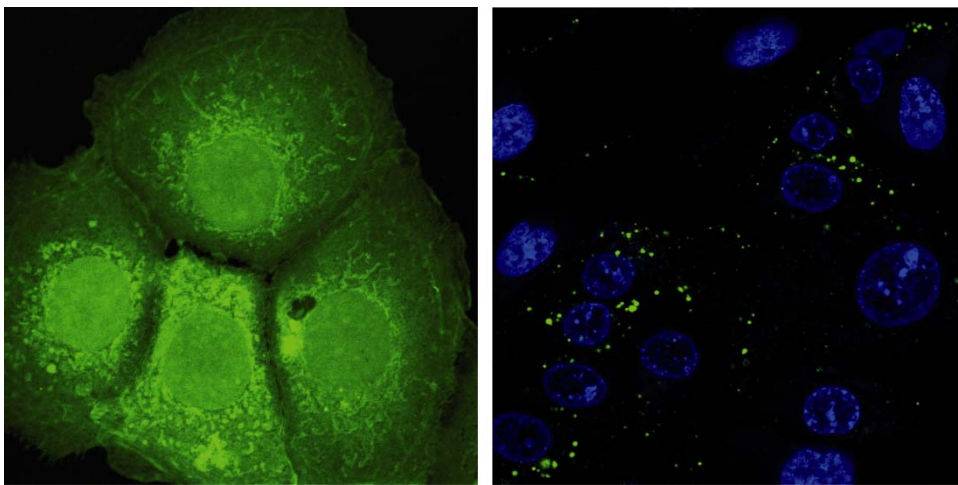


Abb. 3.33: Zellaufnahme: 23 ($10\ \mu\text{M}$) in HepG2 Zellen, durch die Fixierung kommt es zu einer Zerstörung der vesikulären Struktur (links); Aufnahme von 19 ($10\ \mu\text{M}$) in lebenden Zellen, Koinkubation mit dem Kernfarbstoff DRAQ5, die vesikuläre Struktur bleibt erhalten (rechts).

3.5.1 Octreotat-Lokalisierung

Da das Konjugat FcC(O)-Lys(FITC)-Octreo-OH (8) bei einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ eine Lokalisierung in einer vesikulären Struktur zeigte, wurden Farbstoffe zur Färbung von Lysosomen (LysoTracker Red) und Endosomen (FM 4-64) verwendet. Die Messung musste innerhalb von 20 bis 30 Minuten beendet sein, da die Zellen nach dieser Zeit bereits ihre Zellkern- und Vesikel-Integrität verloren und zusätzlich das Zytoplasma abgebaut wurde, das sich in einer Loch- bzw. Blasenbildung äußerte.

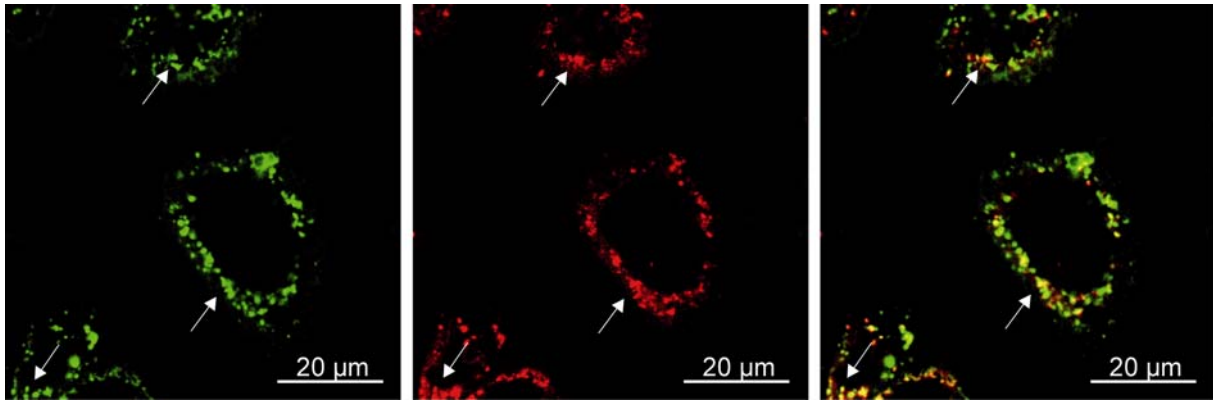


Abb. 3.34: Kolokalisierungsuntersuchung; links: 8 (10 μ M), Mitte: FM 4-64 (10 μ M), rechts: Overlay.

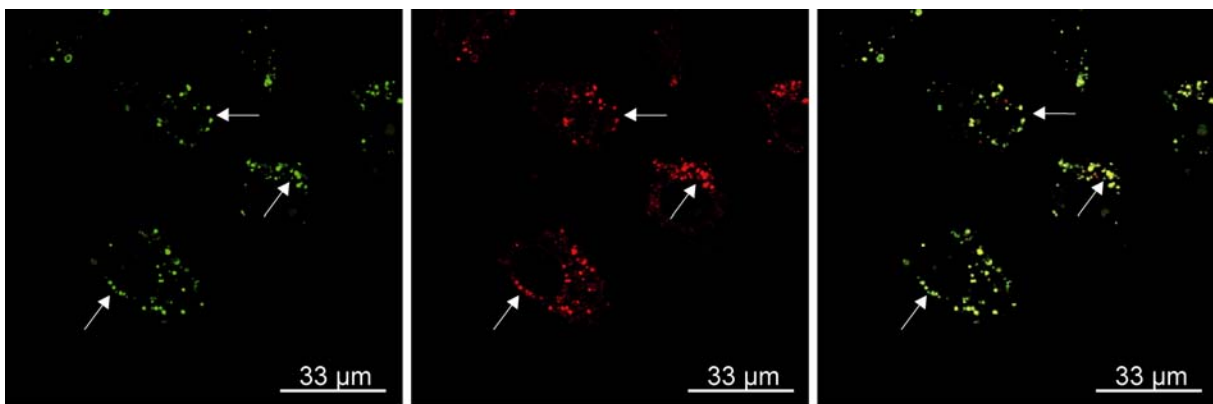


Abb. 3.35: Kolokalisierungsuntersuchung; links: 8 (10 μ M), Mitte: LysoTracker Red (75 nM), rechts: Overlay.

Die Kolokalisierung von 8 zeigt eine punktförmige Verteilung innerhalb der Zelle und ist weder im Zellkern, noch frei im Zytoplasma lokalisiert. Die punktförmige Verteilung lässt auf eine Aufnahme in Vesikel schließen. Die Gegenfärbung mit dem Endosomen-Farbstoff FM 4-64 zeigt eine partielle Kolokalisierung in den Endosomen (Abb. 3.34). Die Untersuchung von 8 mit dem Lysosomen-Farbstoff LysoTracker Red zeigt eine hohe Übereinstimmung bezüglich der Kolokalisierung (Abb. 3.35). Das Konjugat 8 scheint über einen aktiven Transport entweder unspezifisch oder zusammen mit dem SSTR über eine endosomale Aufnahme in die Zelle zu gelangen, um dann in den Lysosomen gespeichert und abgebaut zu werden.

3.5.2 Neurotensin-Lokalisierung

Die Untersuchung der Kolokalisierung des Biokonjugats 23 wurde entsprechend 8 durchgeführt, allerdings wurde hier die Inkubationszeit von zwei auf 12 Stunden erhöht, um die Aufnahme des Biokonjugats 23 zu optimieren. Die Lokalisierung von 23 in der Zelle

verändert sich dadurch jedoch nicht. Das Konjugat **23** zeigt eine ähnliche Verteilung wie **8**, folglich konnte keine Lokalisierung im Nukleus oder im Cytoplasma beobachtet werden. Es befindet sich in punktförmigen Vesikeln, die eine partielle Kolokalisierung mit FM 4-64 zeigen (Abb. 3.36), was auf einen endosomal Transport in die Zellen schließen lässt. Die Kolokalisierungsuntersuchung von **23** mit dem Lysosomen-Farbstoff LysoTracker Red weist eine höhere Übereinstimmung auf (Abb. 3.37), was auf eine Speicherung und Abbau in Lysosomen hinweist.

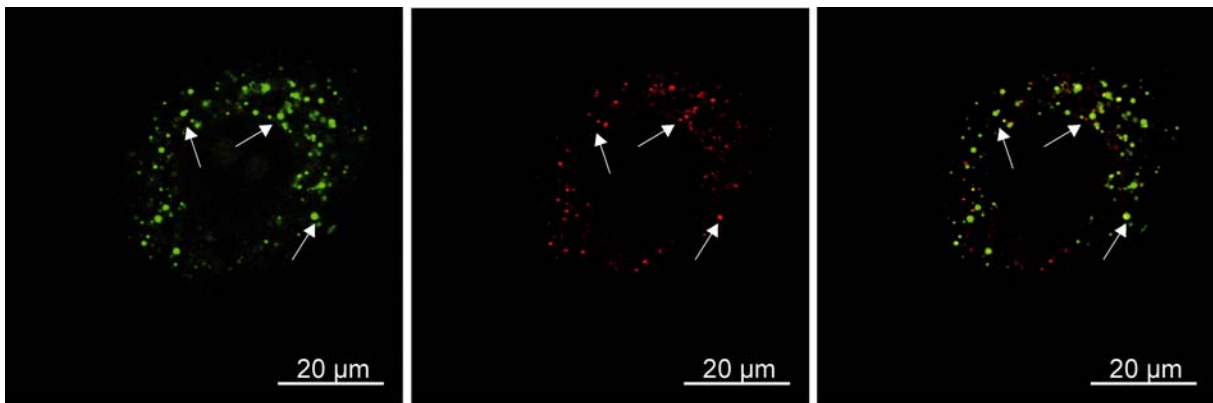


Abb. 3.36: Kolokalisierungsuntersuchung; links: **23** (10 μ M), Mitte: FM 4-64 (10 μ M), rechts: Overlay.

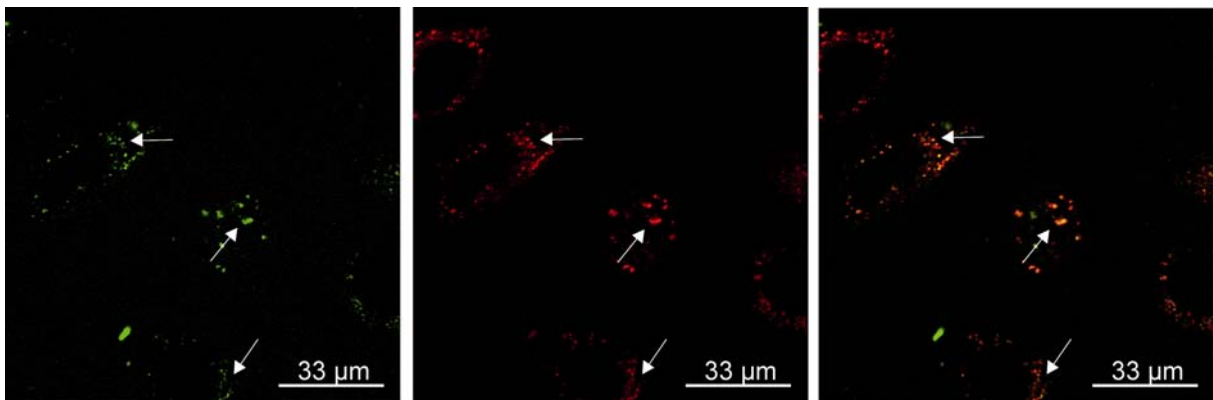


Abb. 3.37: Kolokalisierungsuntersuchung; links: **23** (10 μ M), Mitte: LysoTracker Red (75 nM), rechts: Overlay.

3.5.3 Polyarginin-Lokalisierung

Zur Untersuchung der Kolokalisierung wurde **19** in einer Konzentration von 10 μ M mit den Zellen für zwei Stunden inkubiert und eine Gegenfärbung mit dem LysoTracker Red und FM 4-64 durchgeführt. Auch **19** zeigt eine ähnliche Verteilung in der Zelle wie bereits **8** und **23**. Es ist nicht im Zellkern oder im Zytoplasma lokalisiert, sondern in Vesikeln. Das Konjugat **19** konnte mit FM 4-64 nicht zufriedenstellend untersucht werden, da FM 4-64 nur

eine gute Aufnahme in den Zellen zeigt, in denen die Vesikel mit dem Biokonjugat **19** aufgebrochen sind (Abb. 3.38). FM 4-64 besitzt für gewöhnlich eine gute Aufnahme in HepG2; daher wird **19** entweder die Aufnahme von FM 4-64 verhindern oder den Farbstoff quenchen. Wie schon die Zellaufnahme-Untersuchungen von **19** zeigten (Abb. 3.27), scheint **19** die Integrität der vesikulären Struktur, wahrscheinlich aufgrund der basischen Arginine, stark zu schwächen und die Struktur so durch äußere Einflüsse (Licht, Substanzeinwirkung) leicht zum Aufbrechen zu bringen. Die Struktur der mit FM 4-64 gefärbten Vesikel bleibt allerdings erhalten. Nur sehr wenige Vesikel zeigen eine Kolokalisierung mit FM 4-64 (Abb. 3.38).

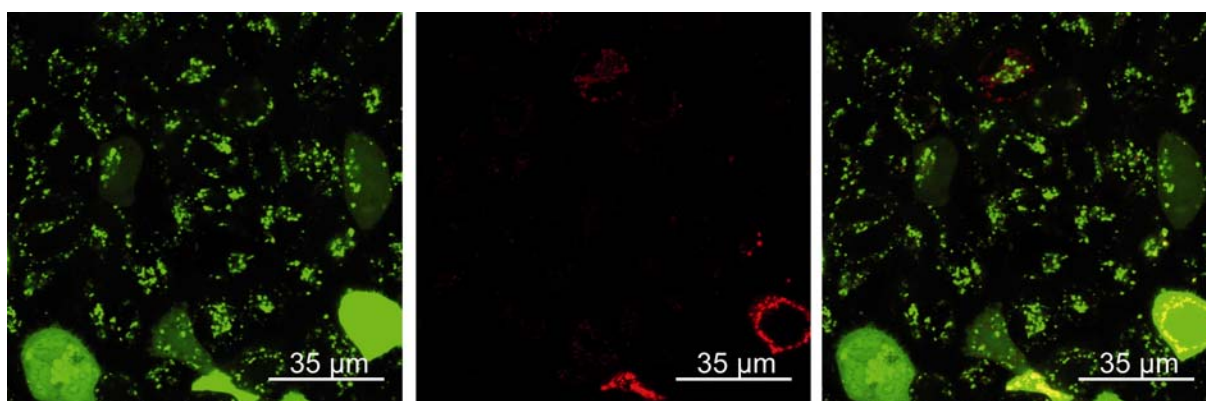


Abb. 3.38: Kolokalisierungsuntersuchung; links: **19** (10 μ M), Mitte: FM 4-64 (10 μ M), rechts: Overlay

Die Färbung der Zellen mit Verbindung **19** und LysoTracker Red zeigt eine partielle Kolokalisierung (Abb. 3.39). Die Färbung mit dem LysoTracker Red war ohne ein Aufplatzen der Vesikel möglich und zeigte eine gute partielle Kolokalisierung von **19** in Lysosomen, was eine Speicherung und Abbau von **19** in diesen vermuten lässt.

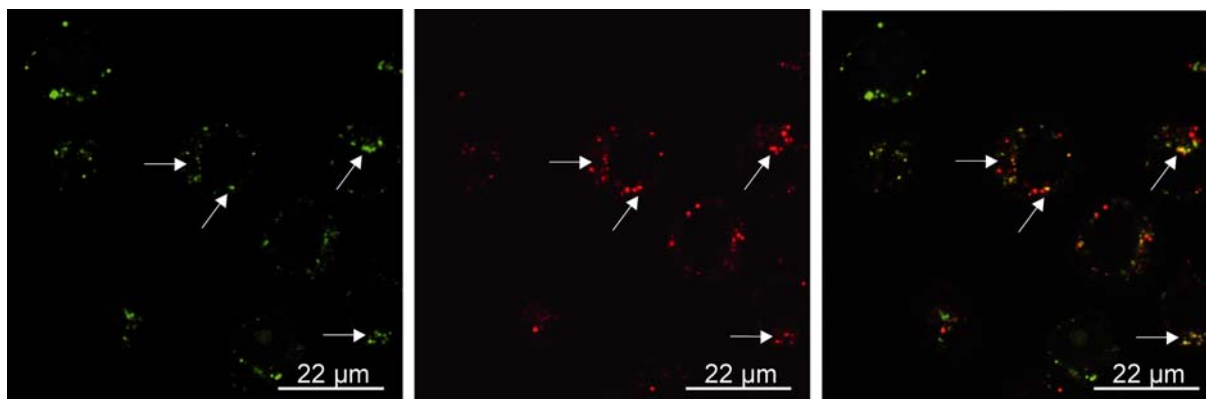


Abb. 3.39: Kolokalisierungsuntersuchung; links: **19** (10 μ M), Mitte: LysoTracker (75 nM), rechts: Overlay

3.5.4 MTS-Lokalisierung

Die Verbindung **45** ($10\ \mu\text{M}$) wurde für zwei Stunden mit HepG2-Zellen inkubiert. Die Kolokalisierungsuntersuchung erfolgte mit dem mitochondrialen Marker MitoTracker Deep Red ($100\ \text{nM}$). Die mikroskopische Untersuchung musste aufgrund der Toxizität von **45** nach 15 Minuten beendet sein. Das Konjugat **45** zeigt keine Lokalisierung im Zellkern oder Zytosol, ist aber in zwei unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert. Eines sind Vesikel, in denen das Biokonjugat eine starke Fluoreszenz besitzt, und ein weiteres, in dem **45** schwächer fluoresziert. Dieses schwächer fluoreszierende Kompartiment konnte mit dem mitochondrialen Marker angefärbt werden. Bei den stärker fluoreszierenden Vesikeln wird es sich um Endosomen und Lysosomen handeln, durch die das Biokonjugat in die Zelle transportiert und dort abgebaut wird. Ein Teil der Verbindung kolokalisiert mit dem MitoTracker Deep Red; folglich kann man auf eine partielle Lokalisierung in Mitochondrien schließen (Abb. 3.40).

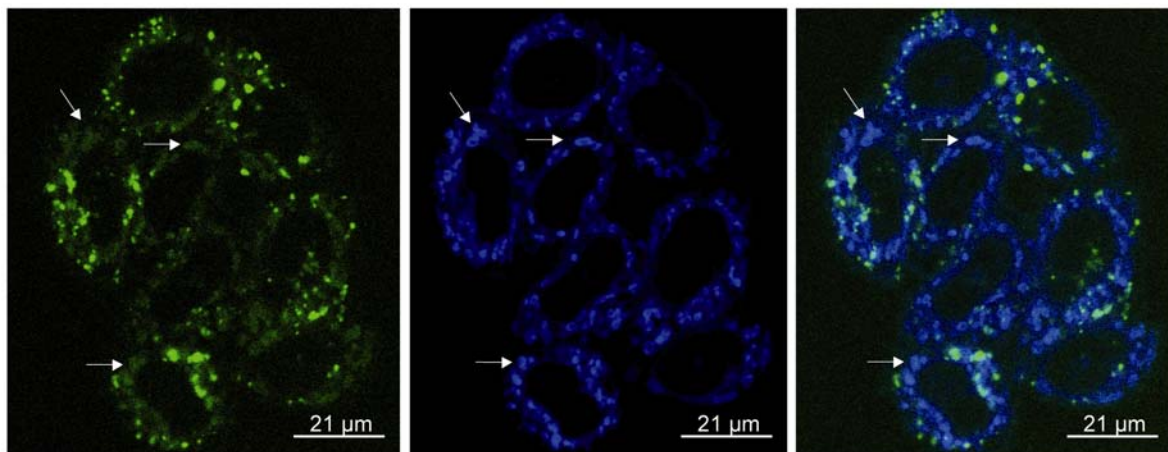


Abb. 3.40: Kolokalisierungsuntersuchung; links: **45** ($10\ \mu\text{M}$), Mitte: MitoTracker Deep Red ($100\ \text{nM}$), rechts: Overlay

Durch den MitoTracker Deep Red scheint die Fluoreszenzintensität der Verbindung **45** erniedrigt zu werden. Aus diesem Grund konnte man entweder keine oder nur eine schlechte Fluoreszenz von **45** innerhalb der Zelle bei Koinkubation beider Verbindungen beobachten. Vermutlich wird die Fluoreszenzintensität von **45** durch den MitoTracker direkt geschwächt und nicht über die Reduktion der Zellaufnahme beeinflusst, da auch bei der alleinigen Inkubation von **45** und anschließender Färbung mithilfe des MitoTrackers die Fluoreszenz reduziert ist. Eine Aussage, zu welchem Anteil sich die Verbindung in Vesikeln oder in Mitochondrien befindet, ist über den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten folglich nicht

möglich. Ferner muss berücksichtigt werden, dass die Fluoreszenz von FITC pH-abhängig ist und sich der pH-Wert der unterschiedlichen Organellen deutlich unterscheiden kann.

3.6 Testung auf Hemmung der Zellproliferation

Die Testung der Zellproliferation wurde mithilfe des Resazurin- und Kristallviolett-Assays durchgeführt. Mit diesen beiden Assays wurden die getesteten Verbindungen auf ihre Zytotoxizität untersucht und durch die Bestimmung des IC_{50} -Werts quantifiziert. Die Zytotoxizität wurde an drei unterschiedlichen Zelllinien mit unterschiedlicher Rezeptorexpression getestet. Dadurch konnte eine generelle sowie eine zelltypabhängige Untersuchung der Zytotoxizität durchgeführt werden.

- Resazurin-Assay

Zur Untersuchung der Zellviabilität wurde ein Proliferationsassay (Resazurin-Assay) durchgeführt. Basierend auf der Messung der metabolischen Aktivität lebender Zellen sollte der Einfluss der Testverbindungen auf die Viabilität der Zellen ermittelt werden. In metabolisch aktiven Zellen erfolgt die Reduktion von blauem Resazurin in Gegenwart von NADH zu der reduzierten Form, dem pinken Resorufin.^[266] Die Reduktion zum Resorufin wird durch beschädigte oder abgestorbene Zellen erniedrigt. Als Positivkontrolle diente Cisplatin, als Negativkontrolle wurde reines Medium verwendet.

Für die Durchführung des Resazurin-Assays wurden die Zellen in 96-Lochplatten ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Anwachszeit erfolgte die Zugabe der Testverbindungen in verschiedenen Konzentrationen. Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend der Resazurin-Assay durchgeführt. Die Resazurininlösung wurde dafür 1 : 9 mit farblosem Medium verdünnt und die Zellen für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Vor und nach der zweistündigen Inkubation wurde die Absorption mithilfe eines Microtiterplatten-Readers gemessen, um die Abnahme der Resazurin-Absorption zu bestimmen, die proportional zur Viabilität ist.

- Kristallviolett-Assay:

Für die Beurteilung der antiproliferativen Eigenschaften einer Verbindung kann die Bestimmung der Zellmasse herangezogen werden. Die Zellmasse ist proportional zur Zellzahl und wurde mithilfe eines kolorimetrischen Verfahrens (Kristallviolett-Assay) ermittelt. Dieses ist möglich, da eine lineare Korrelation zwischen DNA-Gehalt und Kristallviolett-Aufnahme

besteht.^[267] Kristallviolett bindet mit seinem positiv geladenen Ammonium-Ion und den drei aromatischen Ringen an das Phosphatrückgrat der DNA.^[268]

Um eine Aussage zur Antitumoraktivität treffen zu können, wird die Änderung der Zellmasse nach Substanzzugabe in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle ermittelt. Abgestorbene, nicht adhärente Zellen wurden aufgrund des wiederholten Waschens entfernt und mit diesem Assay nicht erfasst.

Der Kristallviolett-Assay wurde im Anschluss an den Resazurin-Assay durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach dem Resazurin-Assay fixiert, mit Kristallviolett inkubiert und das chromatingebundene Kristallviolett nach mehrmaligem Waschen mit 96% Ethanol extrahiert. Gemessen wird die Absorption bei 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 655 nm. Die Absorption der ethanolischen Kristallviolettlösung ist proportional zu der Zellmasse. Zur Bestimmung der Ausgangszellmasse wird eine t_0 -Platte bereits bei der Substanzzugabe fixiert und mit den anderen Platten angefärbt.

Der IC_{50} -Wert lässt sich durch das Auftragen der relativen Absorption, bezogen auf die Lösemittelkontrolle (100%), gegen den dekadischen Logarithmus der eingesetzten Konzentration bestimmen. Bei zytotoxischen Verbindungen, die in einem geeigneten Konzentrationsbereich getestet wurden, erhält man eine sigmoide Kurve. Zur Bestimmung des IC_{50} -Werts wurde die Konzentration bestimmt, die der relativen Absorption von 50% entspricht (Abb. 3.41).

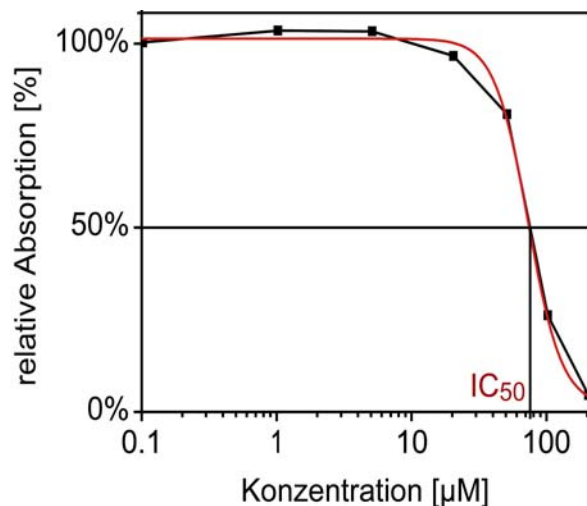


Abb. 3.41: Beispiel für eine IC_{50} -Kurve: schwarze Vierecke: gemessene Werte mit schwarzer Linie verbunden; rote Kurve: sigmoide Ausgleichsgerade.

Ergebnisse:3.6.1 Ergebnisse der Untersuchung der Metallkomplexe

Es wurden die für die Synthese verwendeten metallorganischen Verbindungen auf ihre Zytotoxizität untersucht. Ferrocen-Carbonsäure, Ruthenocen-Carbonsäure und Cobaltocenium-Carbonsäure Hexafluorophosphat (**1**, **3**, **4**) wurden in Konzentrationen von 5 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 500 μM und 1 mM getestet. Dicobaltoctacarbonyl wurde bedingt durch die schlechte Löslichkeit in polaren Lösemitteln nur in Konzentrationen von 0.1 μM , 1 μM , 5 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM getestet. Dicobaltoctacarbonyl wurde in DMSO gelöst, wobei es zu einer leichten Rauchentwicklung und Braunfärbung der Lösung kam. Alle Metall-Verbindungen wurden unter Zusatz von 0.5% DMSO gelöst. Cisplatin wurde als Positivkontrolle ohne DMSO-Zusatz verwendet. Die gemessenen IC_{50} -Werte für Dicobaltoctacarbonyl und Cisplatin sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: IC_{50} -Werte der Verbindungen **1**, **3**, **4**, $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ und Cisplatin.

Verbindung	Zelllinie	IC_{50} -Wert (Kristallviolett) [μM]	IC_{50} -Wert (Resazurin) [μM]
1 , 3 , 4	Hela	-	-
	PT45	-	-
	HepG2	-	-
Dicobaltoctacarbonyl	Hela	35.5 ± 8.1	18.8 ± 2.8
	PT45	-	-
	HepG2	-	-
Cisplatin	Hela	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1
	PT45	0.9 ± 0.2	2.3 ± 0.1
	HepG2	2.4 ± 0.4	2.1 ± 0.1

Die Ergebnisse der Testverbindungen zeigen, dass Dicobaltoctacarbonyl nur in Hela Zellen eine geringe Zytotoxizität aufweist. Die Zellen sind gegenüber Cisplatin sensibel, folglich kann es als Positivkontrolle verwendet werden. Die Metallocencarbonsäuren (**1**, **3**, **4**) zeigen bei keiner getesteten Konzentration eine Beeinflussung des Zellwachstums.

3.6.2 Ergebnisse der Untersuchung der Octreotat-Biokonjugate

Die Verbindung **5** wurde als nicht metallhaltige Referenzsubstanz in einer Konzentration von 1 mM getestet, es zeigte an den Zelllinien Hela, HepG2 und PT45 keinen zytotoxischen Effekt. Konjugat **14** wurde als Vorstufe von **15** in einer Konzentration von 500 μM als Referenzsubstanz für **15** verwendet. **10** wurde in Konzentrationen von 0.5 μM , 1 μM , 5 μM , 20 μM , 50 μM und 100 μM getestet. **7**, **12** und **15** wurden in Konzentrationen von 1 μM , 5 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM und 500 μM auf ihre Zytotoxizität hin untersucht. Bei den Referenzsubstanzen **5**, **14** sowie bei den Metallocenooctreotat-Verbindungen **7**, **10**, **12** wurde zur Verbesserung der Löslichkeit 0.5% DMSO, bezogen auf die Endkonzentration im Zellmedium, zugesetzt. Bei Konjugat **15** musste aufgrund der schlechten Löslichkeit die verwendete DMSO-Konzentration auf 1% erhöht werden.

Tab. 3.5: IC_{50} -Werte der Verbindungen **5**, **7**, **10**, **12**, **14** und **15**.

Verbindung	Zelllinie	IC_{50} -Wert (Kristallviolett) [μM]	IC_{50} -Wert (Resazurin) [μM]
5 , 7 , 10 , 12 , 14	Hela	-	-
	PT45	-	-
	HepG2	-	-
15	Hela	7.2 ± 1.8	12.8 ± 4.3
	PT45	22.3 ± 3.9	33.2 ± 5.5
	HepG2	59.2 ± 5.5	71.2 ± 8.8

Weder Acetyl-Octreotat, Pentin-Octreotat noch die Metallocenoyl-Octreotat-Konjugate zeigen eine Hemmung der Proliferation. Diese Verbindungen zeigten für keine der drei getesteten Zelllinien weder im Kristallviolett- noch im Resazurin-Assay einen wachstumshemmenden Effekt. Bei **7** und **10** kommt es vielmehr zu einem leichten Anstieg des Zellwachstums. Die Verbindung **15** weist in beiden Assays, an allen drei Zelllinien, einen antiproliferativen Effekt auf. Die IC_{50} -Werte liegen je nach Zelllinie, je nach Assay in einem Bereich von 7.2 μM bis 71.2 μM . Aus dem Kristallviolett-Assay erhält man niedrigere IC_{50} -Werte als aus dem Resazurin-Assay, und Hela-Zellen zeigen die höchste Sensitivität gegenüber **15** im Vergleich zu den übrigen getesteten Zelllinien. Sie weisen zwar die stärkste Rezeptor-Expression für SSTR2 und SSTR3 auf, verhalten sich aber auch im Allgemeinen gegenüber toxischen Verbindungen äußerst sensibel. PT45-Zellen zeigen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber **15** als HepG2-Zellen, obwohl diese kaum SSTR-mRNA

produzieren. Die Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber **15** scheint zumindest bei den verwendeten Konzentrationen rezeptorunabhängig zu sein. Möglicherweise spielt noch ein weiterer Mechanismus eine Rolle, oder die Zelllinien reagieren an sich unterschiedlich empfindlich auf toxische Substanzen.

3.6.3 Ergebnisse der Untersuchung der Neurotensin-Biokonjugate

FcC(O)-NT(8-13)-OH, CcC(O)-NT(8-13)-OH und Acetyl-NT(8-13)-OH wurden bereits in der Doktorarbeit von Fozia Noor und in der Masterarbeit von Antonio Pinto diskutiert.^[269, 270] In dieser Arbeit wurden die Ruthenocen-Derivate **28**, **29** und **30** auf ihre antiproliferative Wirkung hin untersucht. Das Konjugat **30** wurde in DMSO gelöst, so dass die Endkonzentration im Zellmedium 1% DMSO betrug. Es wurde in den Konzentrationen 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M getestet.

Tab. 3.6: IC_{50} -Werte der Verbindung **28**, **29** und **30**.

Verbindung	Zelllinie	IC_{50} -Wert (Kristallviolett) [μ M]	IC_{50} -Wert (Resazurin) [μ M]
28, 29	Hela	-	-
	PT45	-	-
	HepG2	-	-
30	Hela	26.4 ± 5.8	21.2 ± 2.3
	PT45	104.5 ± 0.3	110.1 ± 24.6
	HepG2	82.7 ± 27.1	65.8 ± 5.2

Die Verbindungen **28** und **29** zeigten bis zu der höchsten getesteten Konzentration von 200 μ M keinen zytotoxischen Effekt, im Gegensatz zu der Cobaltcarbonylverbindung **30** (siehe Tabelle 3.6). Die gemessenen IC_{50} -Werte für **30** liegen abhängig von der verwendeten Zelllinie und Assay zwischen 21 μ M und 110 μ M. Die Hela-Zellen zeigen die höchste Empfindlichkeit gegenüber Konjugat **30**, PT45-Zellen reagieren am unempfindlichsten.

Die gemessenen IC_{50} -Werte der Verbindung **30** zeigen eine geringere Toxizität als **15**. Beide Biokonjugate sind Cobaltcarbonyl-Verbindungen, sie unterschieden sich aber deutlich in ihrer Peptid-, Alkin- und Metallocen-Komponente und diese Unterschiede spiegeln sich in den IC_{50} -Werte wieder. Die geringe zytotoxische Aktivität gegenüber der Zelllinie PT45 ist überraschend, da aufgrund des Vorhandenseins des NTR3 eine gute Aufnahme und folglich eine höhere Toxizität erwartet wurde. Anscheinend ist aufgrund der Einführung zusätzlicher

Gruppen die Strukturveränderung zu stark, um die Verbindung effektiv über die Rezeptoren aufzunehmen. Eventuell sind aber auch Mechanismen innerhalb der Zelle für die geringe Zytotoxizität verantwortlich.

3.6.4 Ergebnisse der Untersuchung der Polyarginin-Biokonjugate

Die Verbindung **16** wurde als nicht metallhaltige Referenzsubstanz in Konzentrationen von 20 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM und 1 mM getestet. Es ist gut in H_2O löslich und wurde deswegen ohne Zusatz von DMSO verwendet. **18** und **20** wurden in Konzentrationen von 1 μM , 5 μM , 20 μM , 50 μM und 100 μM eingesetzt. Zusätzlich wurde **18** in einer Konzentration von 250 μM und **20** in einer Konzentration von 500 μM getestet. Beide Verbindungen weisen aufgrund der Metallocen-Gruppe eine höhere Lipophilie als **16** auf. Deswegen musste zur Verbesserung der Löslichkeit 0.5% DMSO zugesetzt werden.

Tab. 3.7: IC_{50} -Werte der Verbindungen **16**, **18** und **20**.

Verbindung	Zelllinie	IC_{50} -Wert (Kristallviolett) [μM]	IC_{50} -Wert (Resazurin) [μM]
16	Hela	178.6 ± 35.7	250.5 ± 19.0
	PT45	245.7 ± 39.0	289.9 ± 9.8
	HepG2	290.6 ± 38.3	307.2 ± 38.0
18	Hela	48.0 ± 9.1	62.2 ± 2.7
	PT45	91.8 ± 13.6	133.4 ± 17.6
	HepG2	69.3 ± 7.0	86.1 ± 12.8
20	Hela	70.0 ± 8.9	133.7 ± 15.0
	PT45	123.6 ± 22.4	215.1 ± 8.7
	HepG2	101.9 ± 11.6	195.0 ± 16.6

Die Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays (Abb. 3.7) zeigen, dass bereits das acetylierte Polyarginin (**16**) einen leicht Effekt besitzt. Dieser wird durch die Funktionalisierung von Polyarginin mit Ferrocen- und Ruthenocen-Carbonsäure (**18** und **20**) verstärkt.

Die Stärke des antiproliferativen Effekts ist abhängig vom verwendeten Metallocen, der Zelllinie und der Wahl des Assays. Die IC_{50} -Werte der Referenzverbindung **16** liegen zwischen 178 μM und 307 μM . Bedingt durch die Ferrocen-Kupplung (**18**) erhöht sich die antiproliferative Aktivität im Vergleich zu **16** um das Dreifache und erreicht IC_{50} -Werte von 48 μM bis 133 μM . Durch die Ruthenocen-Kupplung kann die Zytotoxizität der Verbindung **20** im Vergleich zu **16** allerdings nur um das Zweifache erhöht werden mit IC_{50} -Werten

zwischen 70 μM und 215 μM . Aufgrund der vorhandenen Zytotoxizität des metallfreien Polyarginins muss auf eine peptidabhängige Aktivität geschlossen werden, die wahrscheinlich durch die vielen Arginine in der Sequenz bedingt ist. Die Kupplung der Metallocene an das Polyarginin erhöht die Zytotoxizität des Peptids wahrscheinlich über die Verbesserung der Zellaufnahme.

3.6.5 Ergebnisse der Untersuchung der Mitochondrien-Peptid-Biokonjugate

SS-Peptide

Keines der getesteten SS-Peptide (**31-41**) zeigt einen antiproliferativen Effekt bis zu einer getesteten Konzentration von 200 μM (Tab. 3.8). Es ist davon auszugehen, dass eine Ferrocenverbindung, die in den Mitochondrien lokalisiert, eine gewisse zytotoxische Aktivität besitzt, da sie durch ihre elektrochemischen Eigenschaften in die physiologischen Mechanismen von Mitochondrien eingreifen sollte. Die Biokonjugate **31-36** besitzen unter physiologischen Bedingungen nicht die für die Wirkung essentiellen drei positiven Ladungen. Deswegen ist die Inaktivität der Verbindungen nicht verwunderlich. Durch die Kupplung der Metallocene an eine Lysin-Seitenkette besitzen die Verbindungen **37-39** diese drei positiven Ladungen. Sie sind aber durch das gebundene Ferrocen lipophiler als die original SS-Peptide (SS-20, SS-31); eventuell ist dies bereits ausreichend, um die Eigenschaften des Peptids so zu verändern, dass diese nicht mehr in den Mitochondrien lokalisieren können. Um die Lipophilie zu erniedrigen, wurde die Ferrocen-Carbonsäure an eine Lysin-Seitenkette gekuppelt und anstelle einer aromatischen Aminosäure in das Peptid eingeführt. Die Biokonjugate **40-41** sollten somit in den Mitochondrien lokalisieren und infolge dessen einen antiproliferativen Effekt besitzen. Aber auch diese Verbindungen zeigen keine zytotoxische Aktivität. Ob die Verbindungen wirklich nicht, wie vermutet, die Mitochondrien erreichen, müsste durch Kolokalisierungsuntersuchungen mit einem geeigneten Fluorophor geschehen oder durch AAS nach Isolierung der Mitochondrien. Aufgrund der fehlenden Aktivität der Verbindungen wurden diese Experimente allerdings nicht durchgeführt.

Tab. 3.8: IC_{50} -Werte der Verbindungen **31-41**.

Verbindung	Zelllinie	IC_{50} -Wert (Kristallviolett) [μM]	IC_{50} -Wert (Resazurin) [μM]
31-41	Hela	-	-
	PT45	-	-
	HepG2	-	-

MTS-Peptid

Als nicht metallhaltige Referenzverbindungen wurden das MTS-Peptid **42** und das acetylierte Peptid **43** in Konzentrationen von 5 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM und 500 μM auf ihre wachstumshemmenden Eigenschaften untersucht. Beide Verbindungen waren bei einer Konzentration von 500 μM nicht mehr komplett löslich und zeigten einen sichtbaren Niederschlag auf den Zellen. Die metallocenhaltigen Verbindungen **44** und **46** wurden in den Konzentrationen 1 μM , 5 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM und 200 μM auf ihre antiproliferativen Eigenschaften getestet. Den MTS-Biokonjugaten wurden zur Verbesserung der Löslichkeit 0.5% DMSO zugesetzt.

Tab. 3.9: IC_{50} -Werte der Verbindungen **42**, **43**, **44** und **46**.

Verbindung	Zelllinie	IC_{50} -Wert (Kristallviolett) [μM]	IC_{50} -Wert (Resazurin) [μM]
42, 43	Hela	-	-
	PT45	-	-
	HepG2	-	-
44	Hela	32.9 ± 1.0	32.0 ± 8.0
	PT45	47.0 ± 5.1	54.4 ± 5.6
	HepG2	57.9 ± 5.1	59.0 ± 3.0
46	Hela	32.7 ± 10.4	27.0 ± 13.7
	PT45	52.9 ± 5.8	57.5 ± 7.5
	HepG2	68.0 ± 11.5	73.0 ± 11.7

Die metallfreien Referenzverbindungen **42** und **43** zeigen keinen zytotoxischen Effekt bis zu der höchsten getesteten Konzentration von 500 μM . Die metallocenhaltigen Verbindungen **44** und **46** besitzen wachstumshemmende Eigenschaften mit einer vergleichbaren antiproliferativen Aktivität. Ihre Zytotoxizität nimmt von den HepG2- über PT45- zu den Hela-Zellen hin zu (Tab. 3.9). Das Biokonjugat **44** erreicht IC_{50} -Werte zwischen 32 μM und 59 μM , und bei der Verbindung **46** liegen die Werte zwischen 27 μM und 73 μM .

3.7 Zusammenfassung der biologischen Ergebnisse

Biologische Ergebnisse der Octreotat-Biokonjugate

Die Untersuchung der SSTR-mRNA-Expression zeigt, dass die verwendeten Zelllinien nicht optimal für die Untersuchung der Octreotat-Biokonjugate geeignet sind. Die HeLa- und HepG2-Zellen exprimieren den SSTR2 stärker als die PT45-Zellen, dennoch kommt es bei keiner der getesteten Zelllinien zu einer Überexpression. Die Bestimmung des LogP-Werts zeigt eine hohe peptidabhängige Lipophilie (**5**), die durch die Gruppen Ferrocen (**7**), Ruthenocen (**10**), Alkin (**14**) und Cobaltcarbonyl (**15**) weiter erhöht wird. Hohe LogP-Werte begünstigen in der Regel die unspezifische Aufnahme, dies muß bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Zellaufnahme-Untersuchung zeigt eine deutlich bessere Aufnahme der Octreotat-Biokonjugate in die SSTR2-stärker exprimierenden HepG2-Zellen als in PT45-Zellen. Ferner kommt es zu einer besseren Aufnahme des Ferrocen-Derivats (**8**) im Vergleich zu der acetylierten Verbindung (**6**) in beide Zelllinien. Die Verbindung **8** wird höchstwahrscheinlich aufgrund ihrer höheren Lipophilie bevorzugt aufgenommen. In der Literatur gibt es viele Beispiele toxischer Verbindungen eisenähnlicher Metalle (Ga, Ru), bei denen davon ausgegangen wird, dass sie an Transferrin binden und über dieses in Zellen aufgenommen werden. Da Ferrocen aber keinen typischen Eisenkomplex darstellt, ist die Bindung an Transferrin unwahrscheinlich. Zusätzlich wurde von Heinrich *et al.*^[271] die Transferrin-Bindung eines Trimethylhexanoyl-Ferrocen-Derivats untersucht, mit dem Ergebnis, dass diese Verbindung nicht an Transferrin bindet. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Ferrocen in vivo in der Leber stark angereichert wird.^[272, 273] Chrichton *et al.* fanden eine 20-fache höhere Eisenkonzentration in der Leber mit Ferrocen behandelte Ratten im Vergleich zu der nicht behandelten Kontrollgruppe, bei nur leichter Konzentrationserhöhung (max. fünffach) in den anderen Organen.^[274] Analog zu dieser Beobachtung konnte auch für das Ferrocen-Konjugats (**8**) eine bevorzugte Aufnahme in die (entartete) Leberzelllinie HepG2 gezeigt werden. Die hohe Anreicherung von Ferrocen in der Leber der Ratten wird aber möglicherweise nur durch einen hohen First-Pass-Effekt hervorgerufen.

Mit der ringoffenen Form **9** konnte eine schlechtere Aufnahme beobachtet werden als mit **8**; dieses ist ein Indiz für einen zumindest teilweise spezifischen Mechanismus. Einen weiteren Hinweis auf eine spezifische Zellaufnahme gibt das Cobaltocenium-Biokonjugat (**13**), da

aufgrund seiner Hydrophilie ein unspezifischer Mechanismus nur eine untergeordnete Rolle spielen sollte. Tatsächlich wird **13** schlechter in PT45-Zellen aufgenommen als in HepG2-Zellen; folglich liegt die Vermutung nahe, dass **13** zu einem großen Teil rezeptorvermittelt in die Zellen aufgenommen wird. Die Untersuchung der Lokalisierung in lebenden Zellen zeigt, dass **8** in Endosomen und Lysosomen aufgenommen wird. Die übrigen Octreotat-Biokonjugate zeigen bei der „Untersuchung der Zellaufnahme“ eine ähnliche Verteilung; daher liegt es nahe, dass auch sie sich in diesen Organellen anreichern. Die vesikuläre Lokalisierung könnte ein Grund für die fehlende Toxizität der Verbindungen sein, wenn sie in diesen verbleiben und nicht ihren Wirkort erreichen können. Das einzige Octreotat-Biokonjugat, das in den Proliferations-Assays einen toxischen Effekt gezeigt hat, ist die Cobaltcarbonyl-Verbindung **15**, wobei es aber dennoch eine deutlich geringere Toxizität besitzt als Co-ASS.^[83] Dieses kann möglicherweise zum einen durch einen anderen Wirkmechanismus begründet sein oder zum anderen, dass **15** eventuell nur zu einem geringen Teil aus den Vesikeln freigesetzt wird. Dieses Biokonjugat wurde nicht fluoreszenzmikroskopisch untersucht, gleichwohl sollte es bei einer rezeptorvermittelten Aufnahme durch die SSTRen in Endosomen und in Lysosomen vorliegen.

Biologische Ergebnisse der Neurotensin-Biokonjugate

Die Testung der Zelllinien PT45, IMIM-PC2 und Panc1 auf ihre NTR-mRNA-Expression zeigt, dass sie die NTR-Subtypen unterschiedlich stark exprimieren. Auf allen drei Zelllinien ist das Vorkommen des NTR2 äußerst gering, im Gegensatz dazu zeigen alle drei Zelllinien eine Überexpression des NTR3. Die Zellen unterscheiden sich in ihrer NTR1-Expression und sind folglich für die Untersuchung der NTR1-vermittelten Zellaufnahme geeignet. Die PT45-Zellen besitzen sehr wenig, IMIM-PC2 exprimiert den Rezeptor gut und Panc1-Zellen überexprimieren den NTR1. Dennoch zeigen die Zellaufnahme-Untersuchungen, dass alle NT-Biokonjugate am besten in PT45-Zellen aufgenommen werden. Daraus ist zu folgern, dass die Biokonjugate scheinbar unabhängig vom NTR1 in die Zellen gelangen. Weiterhin werden die NT(8-13)-Derivate mit einem C-terminalen Amid, das die NTR1-abhängige Aufnahme behindern sollte, effektiver in die Pankreaskarzinom-Zellen aufgenommen als **25** mit einer C-terminalen Carbonsäure. Die Verbindung **25** wird hingegen wesentlich schlechter aufgenommen als **23**, obwohl sie eine vergleichbare Lipophilie und eine identische Peptidsequenz besitzen. Die Verbindung **24** (mit veränderter Sequenz) wird entgegen den Erwartungen effektiv in alle drei Zelllinien aufgenommen. Sie besitzt zwar die gleiche Lipophilie wie Verbindung **23**, aber die Peptidsequenz ist so stark verändert, dass diese

Verbindung nicht an die Neurotensin-Rezeptoren binden sollte. Dass die Biokonjugate mit einer veränderten Peptidsequenz und einem C-terminalen Amid trotzdem gut in die Zellen aufgenommen werden, kann natürlich in einem unspezifischen Mechanismus begründet sein, aber auch in der Aufnahme durch den NTR3, da dieser nicht nur spezifisch für Neurotensin ist, sondern auch andere Verbindungen wie das Rezeptor-assoziierte Protein (RAP) und die Lipoproteinlipase (LpL) durch ihn aufgenommen werden. Wenn NTR3 in der Lage ist, verschiedene Verbindungen aufzunehmen, so liegt die Vermutung nahe, dass er auch Neurotensin mit einem C-terminalen Amid, einem Fluorophor und einer veränderten Sequenz binden und internalisieren kann. Die bessere Aufnahme in PT45-Zellen könnte in einer allgemein leichteren Aufnahme in diese Zelllinie begründet sein oder durch eine unterschiedliche Zugänglichkeit des Rezeptors, da nur ein geringer Anteil (5-10%) des NTR3-Vorkommen einer Zelle an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Außerdem könnten sich die Zelllinien in der Effizienz des Transports von internalisiertem NTR3 zurück an die Oberfläche unterscheiden, so dass bei einem schnelleren Rücktransport mehr Rezeptoren für eine Bindung und Aufnahme zur Verfügung stehen.

Ferrocenoyl- und Ruthenocenoyl-NT-OH (23 und 26) werden besser in Zelle aufgenommen als die hydrophileren Neurotensin-Biokonjugate, wahrscheinlich bedingt durch einen unspezifischen Aufnahmemechanismus. Die Acetyl- und Cobaltocenium-NT-Biokonjugate (22 und 27) werden schlechter aufgenommen als 23 und 26, aber besser als 25.

Wie auch die Octreotat-Verbindungen, zeigen die NT-Biokonjugate keine antiproliferative Aktivität, außer der Cobaltcarbonyl-Verbindung 30, die eine moderate Toxizität besitzt.

Die Aufnahme von Neurotensin und Neurotensin-Derivaten sollte endosomal durch Internalisierung des Agonisten mit dem Rezeptor erfolgen, um die Verbindungen in Lysosomen abzubauen. Wenn die Verbindungen die Vesikel nicht verlassen, erreichen sie folglich nicht ihren Wirkort, um antiproliferativ wirken zu können. Durch Licht können die Vesikel beschädigt werden. Es scheint, dass dieses durch Peptide mit einem hohen Arginin-Anteil begünstigt wird.

Die Synthese eines alkingebundenen Cobaltcarbonyl-Neurotensins konnte aufgrund der Erhöhung der Lipophilie durch die Ruthenocen-Funktionalisierung optimiert werden. Die Zytotoxizität von 30 im Vergleich zu 15 ist bei der NTR3-positiven Zelllinie PT45 interessanterweise auffällig schlechter. Das Neurotensin-Derivat sollte an den NTR3 binden

und über ihn selektiv in NTR-positive Zelllinien wie PT45 aufgenommen werden, ferner sind PT45-Zellen i.d.R. etwas empfindlicher gegenüber toxischen Substanzen als HepG2-Zellen. Das Konjugat **30** zeigt Parallelen zu der Verbindung **25**. Beide Biokonjugate besitzen eine Säurefunktion am C-Terminus und zusätzlich eine große Gruppe terminal der Neurotensin-Sequenz (Abb. 3.42). Möglicherweise behindern diese großen Gruppen wie der Fluoreszenzmarker und die Propargylglycin-Cobaltcarbonyl-Gruppe die Zellaufnahme und führen so zu einer geringeren Toxizität.

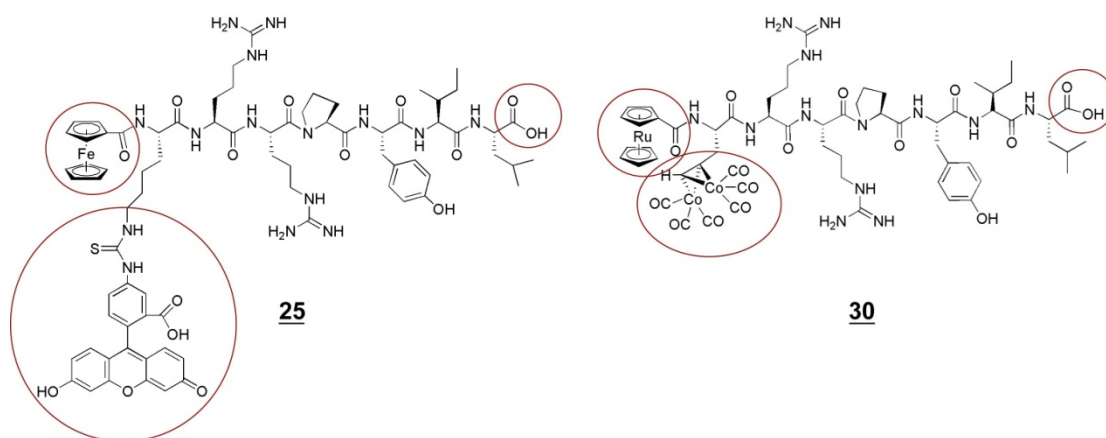


Abb. 3.42: Struktureller Vergleich der Verbindungen **25** und **30**.

Biologische Ergebnisse der Polyarginin-Biokonjugate

In aktuellen Veröffentlichungen wird diskutiert, dass Polyarginin durch einen rezeptor-unabhängigen Mechanismus aufgenommen wird.^[221] Die Verbindungen **17**, **19** und **21** zeigen eine gute Zellaufnahme trotz ihrer Hydrophilie. Die Ferrocen- und Ruthenocen-Biokonjugate (**19** und **21**) werden besser in die getesteten Zelllinien aufgenommen als das acetylierte Polyarginin (**17**). Die Polyarginin-Biokonjugate zeichnen sich durch die Förderung des Aufbrechens der Zellvesikel aus. Infolgedessen war keine Kolokalisierung mit FM 4-64 möglich. Die Vesikel verhalten sich hoch empfindlich gegenüber Polyarginin, vermutlich aufgrund ihres hohen Anteils an Arginin. In der Literatur wird angenommen, dass Polyarginin nach der Endozytose aus den Endosomen freigesetzt wird. Die Bilder der Aufnahmestudien lassen zwar eine vermehrte Hintergrundfluoreszenz vermuten, in den Konfokalbildern konnte dieses jedoch nicht beobachtet werden. Die Probenpräparation der mikroskopischen Untersuchung war für beide Methoden allerdings verschieden, so wurden die Zellen für die Aufnahmestudien 14 Stunden inkubiert und für die konfokale Mikroskopie nur zwei Stunden. Die kurze Inkubationszeit kann zur Folge haben, dass Heparan, an welches Polyarginin

während der Endozytose gebunden ist (siehe Einleitung: Polyarginin), noch nicht vollständig abgebaut wurde. Einen Hinweis darauf, dass die Derivate dennoch aus den Vesikeln freigesetzt werden, geben die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Untersuchung. Die Biokonjugate **18** und **20** besitzen eine antiproliferative Aktivität, aber bereits das metallfreie acetylierte Polyarginin (**16**) zeigt einen leichten Effekt. Durch die Funktionalisierung mittels Ferrocen- und Ruthenocen-Carbonsäure wird die Toxizität erhöht, aber der antiproliferative Effekt scheint vorwiegend peptidabhängig zu sein und nicht durch das Metall induziert. Das Metall verstärkt allerdings die peptidbedingte Toxizität, wahrscheinlich über die Verbesserung der Zellaufnahme. Interessanterweise besitzt das Ferrocen-Derivat (**18**) eine höhere antiproliferative Aktivität als das Ruthenocen-Konjugat. Wenn davon ausgegangen wird, dass eine höhere Toxizität durch eine bessere Zellaufnahme hervorgerufen wird, sollte das Ferrocen-Peptid (**18**) besser in die Zellen aufgenommen werden als das Ruthenocen-Derivat (**20**). Da Polyarginin-Konjugate unspezifisch aufgenommen werden, sollte die Verbindung mit der höheren Lipophilie folglich die höhere Zytotoxizität besitzen. Durch die Untersuchung der LogP-Werte wurde aber für Ferrocen- und Ruthenocen-Peptidkonjugate eine vergleichbare Lipophilie beobachtet. Die höhere Toxizität von **18** könnte aber auch mit einem zweiten metallabhängigen bzw. eisenabhängigen antiproliferativen Mechanismus erklärt werden.

Biologische Ergebnisse der SS-Peptid-Biokonjugate

Die synthetisierten SS-Peptid-Derivate (**34-36**) wurden effektiv in verschiedene Zelllinien aufgenommen, zeigten aber weder eine Lokalisierung in Mitochondrien noch eine vesikelfreie Zellaufnahme, wie es in der Literatur beschrieben ist. Die Derivate (**34-36**) sind deutlich in Vesikeln lokalisiert, die durch Licht aufgebrochen werden konnten. Die vesikuläre Lokalisierung ist wahrscheinlich durch eine zu starke Veränderung der Struktur, in Bezug auf die Ladung oder durch große und lipophile Gruppen (Fluorescein und Ferrocen), bedingt. Die Verbindungen **31-41** zeigen außerdem auch keine antiproliferative Aktivität. Auch diese ist eventuell die Folge einer zu starken Veränderung der Struktur und Lipophilie. Sie erreichen vermutlich die Mitochondrien nicht und besitzen möglicherweise deshalb keine Aktivität. Die Zellaufnahme der FITC-markierten Derivate der Biokonjugate **38-41** wurde aufgrund mangelnder antiproliferativer Aktivität der Verbindungen **38-41** nicht weiter verfolgt.

Biologische Ergebnisse der MTS-Biokonjugate

Die Zellaufnahme-Untersuchung der Verbindung **45** zeigte eine gute Zellaufnahme in verschiedene Krebszelllinien. Die Kolokalisierungs-Untersuchung deutet auf eine Aufnahme in Mitochondrien und Vesikeln hin. Ein weiteres Indiz für eine mitochondriale Lokalisierung ist die Toxizität der Biokonjugate **44** und **46**. Wahrscheinlich sind Ferrocen-Derivate in Mitochondrien aufgrund ihrer Redoxaktivität toxisch, indem sie ROS produzieren und in elektrochemische Prozesse der Mitochondrien eingreifen. Es wurde vermutet, dass das Ruthenocen-Biokonjugat **46** aufgrund seiner unterschiedlichen Redoxeigenschaften im Vergleich zu Ferrocen keine antiproliferative Aktivität besitzt. Diese Annahme wurde unterstützt durch die Untersuchungen von Jaouen *et al.* an Ferrocifen-Derivaten. Diese zeigten, dass Ferrocifen selber stark toxisch ist, aber sein Ruthenocen-Derivat eine antiproliferative Aktivität nur aufgrund seines antiestrogenen Effekts besitzt.^[275] In der Literatur ist keine toxische Ruthenocen-Verbindung bekannt, die aufgrund der Ruthenocen-Einheit aktiv ist. Dennoch zeigt die Verbindung **46** eine moderate Toxizität, die offenbar metallinduziert ist. Erstaunlicherweise ist die antiproliferative Aktivität für **44** und **46** gleich. Die IC₅₀-Werte der Verbindung **44** für PT45- und HepG2-Zellen liegen im erwarteten Bereich für ein nichtkonjugiertes Ferrocen-Derivat^[276, 277]

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 30 Metalloce-Peptid-Biokonjugate sowie zwei Cobaltcarbonyl-Peptidkonjugate synthetisiert. Die Verbindungen wurden vollständig charakterisiert und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst.

Es wurden Metalloce-Peptid-Biokonjugate der Peptide Octreotat, Neurotensin, Polyarginin, sowie der SS-Peptide und einer Mitochondrialen-Targeting-Sequenz erfolgreich mithilfe der Festphasen-Peptidsynthese hergestellt. Die Peptide Octreotat und Neurotensin wurden gewählt, da sie auf einem rezeptorvermittelten Weg in Zellen aufgenommen und ihre Rezeptoren auf den Zellen verschiedener häufig auftretender Tumore, mit zum Teil hoher Mortalität, überexprimiert werden, wie z.B. Brustkrebs, Pankreaskarzinome und neuroendokrine Tumore. Polyarginin wird unspezifisch in eine Vielzahl von Zellen aufgenommen, und die Mitochondriale-Targeting-Sequenz wurde als Signalpeptid für den Transport der Metalloce in Mitochondrien verwendet (Abb. 4.1).

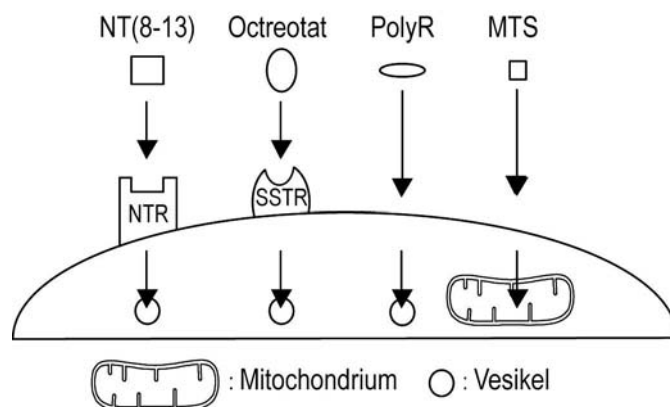


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der untersuchten Aufnahmemechanismen.

Die Metalloce konnten als Carbonsäure-Derivat direkt an der festen Phase an das Peptid gekuppelt werden. Dadurch war es möglich, diese im Überschuss einzusetzen, um so eine höhere Reinheit und Ausbeute der Konjugate zu erreichen. Die Peptide wurden erfolgreich mit den Metalloce entweder N-terminal oder über eine Aminosäure-Seitenkette funktionalisiert und das Konjugat in guter Ausbeute und mit einer hohen Reinheit erhalten. Weiterhin konnte die Alkylfunktion erfolgreich N-terminal durch die Einführung der Pentinsäure oder an der Seitenkette, durch die Verwendung der artifiziellen Aminosäure

Propargylglycin, in die Sequenz eingefügt werden. Die Synthese von Cobaltcarbonyl-Peptid-Konjugaten erfolgte in Lösung durch die Reaktion von $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ mit dem entschützten Peptid, selektiv an dessen Alkinfunktion. Die Cobaltcarbonyl-Peptide konnten in guter Reinheit erhalten werden, so dass sie, abgesehen von einem Filtrationsschritt, nicht weiter aufgearbeitet werden mussten. Als Referenzen zur Untersuchung der metallbasierten Aktivität wurden metallfreie Peptid-Konjugate mit einer Acetyl- bzw. Alkinfunktion synthetisiert.

Zur Synthese der cyclischen Octreotat-Konjugate konnte die Disulfidbrücke an der festen Phase mithilfe zweier Acm-geschützter Cysteine eingeführt werden. Die Acm-Schutzgruppe wurde orthogonal unter Erhalt der übrigen Schutzgruppen mit einem Thallium(III)-Salz entfernt und die freien Thiole zu einem Disulfid oxidiert. Für die mikroskopischen Untersuchungen konnten die Biokonjugate an der festen Phase mit einem Fluorophor funktionalisiert werden, indem der Fluoreszenzmarker FITC nach selektiver Entschützung einer Lysin-Seitenkette an diese gekuppelt wurde.

Es konnte das erste Ruthenocen-Peptidkonjugat dargestellt werden.^[278] Mithilfe der Einführung eines Ruthenocens war das Propargylglycin-funktionalisierte Neurotensin-Peptid für die Dicobaltoctacarbonyl-Kupplung synthetisch zugänglich. Aufgrund der hohen Polarität des Neurotensins und der damit verbundenen unzureichenden Löslichkeit in THF ist die Cobaltcarbonyl-Kupplung nur in schlechter Ausbeute und Reinheit möglich.^[255] Durch Einführung der Ruthenocen-Gruppe konnte die Lipophilie des Konjugats erhöht und dadurch die Cobaltcarbonyl-Kupplung in THF durchgeführt werden. Durch diese Veränderung konnte das Cobaltcarbonyl-Neurotensin-Biokonjugat in guter Ausbeute und Reinheit erhalten werden.

Die synthetisierten Biokonjugate wurden mithilfe von HPLC, Massenspektrometrie und ^1H -, ^{13}C - und 2D-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Zusätzlich wurden ausgewählte Verbindungen mittels IR- und Raman-Spektroskopie, Cyclovoltammetrie untersucht. Mithilfe einer HPLC-Methode wurde der LogP-Wert bestimmt. Somit konnten die Identität, Reinheit, Lipophilie und die elektrochemischen Eigenschaften der Verbindungen untersucht werden. Ferner ließ sich mit diesen Methoden der Nachweis über die Octreotat-Cyclisierung erbringen.

Die Metallocen-Biokonjugate zeigen eine sehr gute Stabilität, da auch nach Lagerung der Verbindungen (als Feststoff) über zwei Jahre bei RT keine Zersetzung beobachtet werden konnte. Getestet wurde die Stabilität mittels ESI-MS und HPLC.

Die Untersuchung der Zellaufnahme zeigt eine wesentlich effektivere Aufnahme der Ferrocen- und Ruthenocen-Biokonjugate im Vergleich zu den acetylierten Referenzpeptiden. Die Aufnahme scheint über einen unspezifischen Mechanismus zu verlaufen, eventuell bedingt durch die höhere Lipophilie. Es konnte eine verbesserte Internalisierung des agonistischen Biokonjugats in rezeptorpositive- als auch in rezeptornegative-Zellen beobachtet werden. Weiterhin deutet die bessere Aufnahme der unveränderten Peptidsequenz im Vergleich zu einer abgeänderten Sequenz (**24**) bzw. Struktur (**9**) auf einen rezeptorvermittelten Aufnahmemechanismus hin (Abb. 4.2).

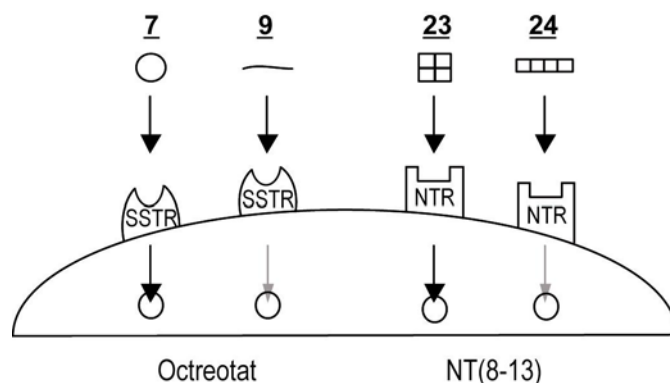


Abb. 4.2: Aufnahme der Biokonjugate **7**, **9**, **23** und **24**. Bei Verbindungen **7** und **23** erfolgt die Aufnahme über ihren Rezeptor. Bei Verbindung **9** und **24** kommt es infolge struktureller Veränderung zu einer reduzierten Zellaufnahme; (schwarzer Pfeil: gute Aufnahme; grauer Pfeil: reduzierte Aufnahme).

Die Biokonjugate der Octreotat-, Neurotensin- und SS-Peptide zeigen keinen zytotoxischen Effekt. Die Ursache hierfür scheint die vesikuläre Lokalisierung in der Zelle zu sein, die verhindert, dass die Biokonjugate ihren Wirkort erreichen.

Die Untersuchung der antiproliferativen Aktivität zeigt eine zytotoxische Wirkung der Cobaltcarbonyl-Biokonjugate, die offensichtlich metallabhängig ist, da die metallfreien Alkin-Peptide keine Aktivität zeigen. Die Cobaltcarbonyl-Biokonjugate besitzen IC_{50} -Werte zwischen 7 μ M und 110 μ M, abhängig von Peptid, Zelllinie und Assay.

Ferner konnte für die Polyarginin-Biokonjugate eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden. Eine sehr schwache Toxizität ist bereits bei der metallfreien Referenzverbindung

vorhanden, die aber durch Kupplung mit Metallocenen noch verstärkt wird. Es ist davon auszugehen, dass der Wirkmechanismus peptidabhängig ist, die Metallocene jedoch die Aufnahme des Peptids verbessern und somit die Zytotoxizität des Biokonjugats erhöhen. Die IC_{50} -Werte des acetylierten Polyarginins liegen zwischen $178\ \mu\text{M}$ und $307\ \mu\text{M}$, für Ferrocenoyl-Polyarginin zwischen $48\ \mu\text{M}$ und $133\ \mu\text{M}$ und für das Ruthenocenoyl-Polyarginin zwischen $70\ \mu\text{M}$ und $215\ \mu\text{M}$. Wenn man davon ausgeht, dass die Metallocene in diesem Fall selber keinen antiproliferativen Effekt besitzen, kann man darauf schließen, dass Ferrocenoyl-Polyarginin etwa dreimal besser und Ruthenocenoyl-Polyarginin etwa zweimal besser als Acetyl-Polyarginin in die Krebszellen aufgenommen wird.

Weiterhin zeigen die MTS-Biokonjugate mit den Gruppen Ferrocen und Ruthenocen eine zytotoxische Aktivität. Diese scheint metallbedingt zu sein, da weder die MTS-Sequenz selbst, noch das acetylierte Referenzpeptid einen antiproliferativen Effekt zeigt. Für das fluoreszenzmarkierte Ferrocenoyl-MTS-Biokonjugat konnte neben einer vesikulären Verteilung zusätzlich eine Aufnahme in die Mitochondrien beobachtet werden. Der Wirkmechanismus dieser Verbindungen scheint über einen mitochondrialen Prozess abzulaufen, der in Kombination mit den Metallocenen zum Zelltod führt. Die IC_{50} -Werte liegen zwischen $27\ \mu\text{M}$ und $73\ \mu\text{M}$, wobei die antiproliferative Aktivität beider Verbindungen gleich ist.

Die untersuchten Biokonjugate zeigen eine zum Teil vielversprechende zytotoxische Aktivität, die sowohl von dem Metallkomplex als auch von dem verwendeten Peptid abhängig ist. Die Derivatisierung der Ferrocen-Struktur zu einem konjugierten System mit einem veränderten Halbstufenpotential^[126, 279] sollte die Zytotoxizität der Verbindung weiter verstärken. Erste Experimente in diese Richtung wurden bereits durchgeführt und zeigen gute Ergebnisse. Ferner hat das Peptid einen hohen Einfluss auf die Toxizität. Am aussichtsreichsten für die antiproliferative Aktivität von Metallocen-Biokonjugaten scheint die MTS-Sequenz zu sein und sollte in zukünftigen Arbeiten weiter verfolgt werden.

5. Experimenteller Teil

5.1 Materialien und Methoden

Massenspektrometrie (MS):

Zur Aufnahme der Massenspektren wurden EI-, ESI- und MALDI-MS verwendet. Die EI-MS Messungen wurden an einem CH5 MAT der Firma Varian durchgeführt. Die ESI-Spektren wurden in Methanol oder Methanol-H₂O-Mischung an einem Bruker Esquire 6000 gemessen, und die MALDI-Spektren wurden an dem Bruker Daltonics flexAnalysis mit Sinapinsäure als Matrix aufgenommen. Es ist die exakte Masse der Verbindungen angegeben. Die gemessenen Massen der MALDI-Untersuchung weichen oft stark von der errechneten Masse ab (vor allem bei FITC-markierten Konjugaten), somit ist keine Differenzierung von $[M+H]^+$ und $[M+3H]^+$ möglich, deswegen werden sie mit $[M]^+$ angegeben. Massen mit einer starken Abweichung sind zusätzlich mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

NMR-Spektroskopie:

Die NMR Spektren wurden entweder an einem Bruker DRX 600, Bruker DRX 400 oder Bruker DPX 200 gemessen. Die ¹H-NMR-Spektren wurden bei einer Frequenz von 200.13, 400.13 oder 600.13 MHz und die ¹³C-Spektren bei einer Frequenz von 100.62 bzw. 150.92 MHz vermessen. Als interner Standard wurde das Restsignal des deuterierten Lösemittels verwendet. Die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben. Die Aufspaltung der Signale ist mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett) und m (Multiplett) abgekürzt. Die Signallage wird aus dem 1D-Spektrum abgelesen oder über den Mittelpunkt der Kreuzsignale der 2D-Spektren bestimmt. Die chemischen Verschiebung der Signale ist in ppm angegeben.

Elektrochemie:

Die Cyclovoltammogramme wurden in getrocknetem Acetonitril oder DMSO an einem Perkin Elmer BES Potentiostat/Galvanostat aufgenommen. Verwendet wurde NBu₄PF₆ als Leitsalz (0.1 M bei Verwendung von Acetonitril und 0.2 M bei Verwendung von DMSO als Lösemittel) in einer Drei-Elektroden Zelle mit einer Arbeitselektrode aus Grafit, einer Platin-Hilfselektrode und einer Ag/AgNO₃-Vergleichselektrode. Die Proben wurden in Konzentrationen von 0.5-1.0 mM mit Ferrocen als interner Standard gemessen.

Infrarotspektroskopie (IR):

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem FT-Spektrometer „Tensor27“ der Firma Bruker. Die Proben wurden als Feststoff an einer ATR-Einheit vermessen.

Raman-Spektroskopie:

Die Raman-Messungen wurden von Konrad Meister an dem konfokalen Raman Mikroskop CRM 300 der Firma Witec (Ulm, Deutschland) durchgeführt.

Mikrowellen-Peptidsynthesizer:

Für die automatisierte Peptidsynthese wurde ein Liberty Peptidsynthesizer der Firma CEM verwendet. Die Synthese wurde unter Nutzung der Standardprotokolle vom Hersteller durchgeführt. Die Standard-Kupplungsmethode wurde für alle Aminosäuren außer Arginin (Arginin-Kupplungsmethode) und Cystein (Cystein-Kupplungsmethode) (Tab. 5.1) verwendet. Die Aminosäure-Kupplung erfolgte mithilfe der Kupplungsreagenzien TBTU, HOBt und DIPEA. Die Fmoc-Entschützung wurde mittels 20%igem Piperidin in DMF durch die „Initial-Deprotection-Methode“ durchgeführt und wiederholt unter Verwendung der „Deprotection-Methode“. Die eingesetzten Lösungen sind mit ihren Konzentrationsangaben in Tabelle 5.2 aufgelistet.

Tab. 5.1: Kupplungs- und Entschützungsmethoden.

Kupplungsmethoden	Leistung in Watt	Zeit in Sekunden	Temperatur in °C
Standard-Kupplung	24	300	75
Arginin-Kupplung	0	1500	75
	25	300	75
Cystein-Kupplung	0	120	50
	25	240	50
Initial-Deprotection	30	30	75
Deprotection	50	180	75

Tab. 5.2: *Eingesetzte Reagenzien.*

Lösungen	Konzentrationen
Aminosäurelösung in DMF	0.2 M
TBTU in DMF	0.5 M
HOBt in DMF	0.5 M
DIPEA in NMP	2 M
Piperidin in DMF	20%

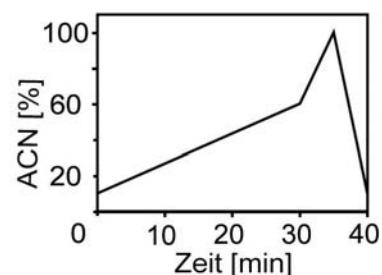
HPLC-Analytik und Aufreinigung:

Zur Reinigung der Biokonjugate wurden ein Varian Pro Star PDA Detektor (Modell 330) und ein Varian Pro Star Lösungsmittelverteiler (Modell 210) verwendet. Es wurden DynaMax C-18 Umkehrphasensäulen eingesetzt. Die HPLC-Lösemittel besaßen HPLC-Reinheit, außerdem wurde Acetonitril und H₂O 0.1% TFA zugesetzt. Die analytische Trennung erfolgte mit Hilfe einer Säule der Größe 250 x 4.6 mm (Partikelgröße 5 µm) und einer Flussrate von 1 ml/min. Für die präparative Trennung wurde eine Säule der Größe 250 x 10 mm (Partikelgröße 8 µm) mit einem Fluss von 4 ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte bei 220 nm und 254 nm, die gemessenen Retentionszeiten wurden in Minuten angegeben.

Die analytischen Läufe wurden für die Verbindungen **6** und **8** mit folgendem Gradienten gemessen (Methode A, Flussrate 1 ml/min) (Tab. 5.3):

Tab. 5.3: *Gradient der Methode A.*

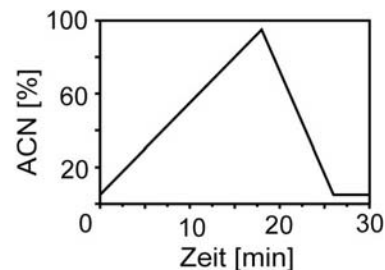
Zeit [min]	ACN [%]	H ₂ O [%]
0	10	90
30	60	40
35	100	0
40	10	90



Für die übrigen Verbindungen wurden die analytischen Läufe mit dem Gradienten der Methode B (Flussrate 1 ml/min) gemessen (Tab. 5.4):

Tab. 5.4: *Gradient der Methode B.*

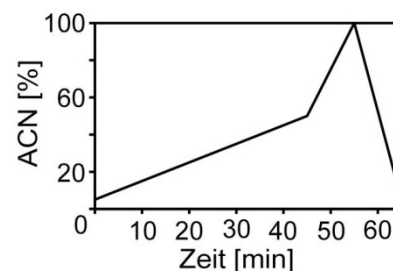
Zeit [min]	ACN [%]	H ₂ O [%]
0	5	95
18	95	5
26	5	95
30	5	95



Die Verbindungen wurden mit folgendem Gradient präparativ gereinigt (Flussrate 4 ml/min) (Tab. 5.5):

Tab. 5.5: *Gradient der präparativen Reinigung.*

Zeit [min]	ACN [%]	H ₂ O [%]
0	5	95
45	50	50
55	100	0
65	5	95



Bestimmung der logP-Werte:

Die Messung der logP-Werte wurde an der oben genannten HPLC-Anlage unter Verwendung der analytischen C-18 Umkehrphasensäule durchgeführt. Die mobile Phase setzt sich aus einer wässrigen und einer methanolischen Phase zusammen. Als wässrige Phase wurde eine auf pH 7.4 eingestellte 0.02 M MOPS-Puffer-Lösung verwendet. Dieser wurde Vol.- 0.15% n-Decylamin zugesetzt und mit n-Octanol gesättigt. Der methanolischen Phase wurde Vol.- 0.25% n-Octanol zugesetzt. Die Referenzsubstanzen und die zu messenden Proben wurden in Konzentrationen von 15 µg/ml in Methanol gelöst und mit 0.1 mg Uracil pro 1 ml Methanol als internem Standard versetzt. Die Substanzen wurden isokratisch gemessen und bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Die Konzentration der Methanolphase betrug 55% bis 80%.

Chemikalien:

Die verwendeten Chemikalien wurden von Acros (Geel, Belgien), Aldrich/Sigma/Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Precious Metals Online (Melbourne, Australien), CBL Patras (Patras, Griechenland), Novabiochem (Laufelfingen, Schweiz), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und IRIS Biotech (Marktredwitz, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Es wurden ausschließlich L-Aminosäuren benutzt, außer D-Tryptophan und D-Phenylalanin in Position 1 und 4 der Octreotat-Sequenz (**5-13**) und D-Arginin bei der Synthese der SS-Peptid-Derivate **37** bis **40**. „DMF für die Peptidsynthese“ wurde von Roth bezogen; alle Lösemittel waren analytisch rein bzw. besaßen HPLC-Reinheit. Das verwendete THF wurde über Alox getrocknet.

5.2 Zellbiologische Methoden5.2.1 Materialien und Geräte**Chemikalien:**

DMSO	JT Baker, NJ, USA
DRAQ5 TM	Biostatus Limited, Shepshed, UK
FBS Superior	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FM 4-64	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine	Merk, Darmstadt, Deutschland
Glutardialdehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LysoTracker Red	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MitoTracker Deep Red	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin 0.01%ige Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RPMI ohne Phenolrot	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Triton-X100	Acros, Geel, Belgien
TOX-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Von der Firma GIBCO (Grand Island, N.Y., USA) wurden RPMI 1640, DPBS (Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 0.05% Trypsin/EDTA, Pen Strep (Penicillin/Streptomycin-Lösung), Glutamin und Natriumpyruvat bezogen.

Geräte:

- Inkubator, Hera Cell, Heraeus
- Lyophilisator, Christ Alpha 1-4LD plus
- Mikroskope:
 - Olympus CK30
 - Olympus IX51 mit Olympus XC10 Kamera, Olympus U-RFL-T, Olympus L4, Software: Cell[^]F
 - Leica DMIRE2 mit Leica TCS SP2 und Leica CTRMIC
- Sterilbank, Hera Safe, Heraeus
- Tecan Microplate Platereader Sapphire²
- Zentrifuge, Multifuge3_{S-R}, Heraeus

Verbrauchsmaterialien:

- Kulturplatte mit 12 oder 24 Vertiefungen, Flachboden, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Ibidi μ -Slides 8-Well, Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
- Gewebekulturschalen, Ø10 cm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- NuncloTMn surface96-Well Platten, Flachboden, Nunc, Roskilde, Dänemark
- Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml sterile, FalconTM-Typ, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Pipetten 2-25 ml, Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

0,04%ige Kristallviolettlösung: 40 mg Kristallviolett, 4 ml Ethanol, 96 ml H₂O

Zellkulturmedium:

500 ml RPMI 1640 oder DMEM wurden 5 ml Natriumpyruvat, 6 ml L-Glutamin, 12 ml Pen Strep und 55 ml inaktiviertes FBS zugesetzt (Zusatz A). 500 ml RPMI 1640 oder DMEM jeweils ohne Phenolrot wurden mit 5 ml Natriumpyruvat, 6 ml L-Glutamin, 12 ml Pen Strep versetzt (Zusatz B). RPMI 1640 und DMEM wurden ohne Zusätze zum Einfrieren von Zellen verwendet.

Die Zelllinien PT45, IMIM-PC2 und Panc1 wurden in DMEM im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert. Hela- und HepG2-Zellen wurden in RPMI 1640 bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das sterile Arbeiten mit den Zelllinien wurde unter einer Sterilbank

durchgeführt. Alle Gegenstände zum Arbeiten unter der Sterilbank wurden vorher gründlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Zellen wurden wöchentlich auf die Abwesenheit von Mykoplasmen getestet.

5.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Auftauen von Zellen:

Die eingefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und bis zum Auftauen auf Eis gelagert. Das Auftauen erfolgte unter Schwenken im Wasserbad bei 37 °C, anschließend wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen mit 1 ml vorgelegtem Medium überführt. Nach kurzem Schwenken wurden weitere 9 ml Medium hinzugefügt und bei 1500 g für drei Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Mediums wurde das Zellsediment in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Ø 10 cm Gewebekulturschale überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, indem die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben wurde.

Passagieren von Zellen:

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 – 90% passagiert. Das Medium wurde aus der Ø 10 cm Gewebekulturschale entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden wurden diese mit 3 ml Trypsin/EDTA einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen vom Schalenboden wurden 7 ml Medium zur Trypsinsuspension gegeben und diese in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension drei Minuten bei 1500 g zentrifugiert, das Medium abgesaugt und das Zellpräzipitat in 10 ml Medium resuspendiert. Ein Aliquot dieser Suspension wurde in eine neue Ø 10 cm Gewebekulturschale mit vorgelegtem Medium ausplattiert.

Bestimmung der Zellzahl:

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Zwischen Zählkammer und Deckgläschen wurden 10 µl der gut durchmischten Zellsuspension pipettiert. Die Zählkammer setzte sich aus vier großen Quadraten zusammen. Die großen Quadrate waren in 16 kleinere Quadrate unterteilt. Es wurden die Zellen in den großen Quadraten gezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser wurde mit dem Verdünnungsfaktor 10^4 multipliziert und entsprach dann der Zellzahl in einem Milliliter.

Kryokonservierung von Zellen:

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen auf Ø 14.5 cm Gewebekulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70 – 90 % kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 15 ml PBS gewaschen, mit 5 ml Trypsin/EDTA versetzt und in einem Brutschrank bis zur Zellablösung inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml vorgelegtem Medium pipettiert und drei Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und in 5 ml Einfriermedium (11% DMSO, 25% FBS und 64% Medium ohne Zusätze) resuspendiert. In jedes Kryogefäß wurde 1 ml Zellsuspension gegeben und dieses langsam in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox auf –80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurde eine Auftaukontrolle durchgeführt, indem die Zellsuspension aus einem dieser Kryogefäße, aufgetaut wurde. Konnten die Zellen erfolgreich ausplattiert werden, wurden danach die übrigen Kryogefäße mit den eingefrorenen Zellen für eine längere Lagerungszeit unter Stickstoffkühlung aufbewahrt.

5.2.3 Vorschriften der zellbiologischen Untersuchungen**RT-PCR-Experiment:**

Die genaue Durchführung der Real Time PCR- (RT-PCR) Untersuchung findet sich bei Hahn *et al.*^[280]

Untersuchung der Zellaufnahme: M

Die Zellaufnahme der FITC-markierten Biokonjugate wurde an den Zelllinien HepG2, PT45, IMIM-PC2 und Panc1 mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit vieler Biokonjugate im Medium konnte auf einen DMSO-Zusatz nicht verzichtet werden. Alle Biokonjugate wurden mit einer maximalen DMSO-Endkonzentration von 0.5% im Zellmedium untersucht. Sie wurden in DMSO und PBS gelöst, so dass die Stammlösung eine Konzentration von 500 µM besaß. Es wurden verschiedene Konzentrationen (1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM) getestet. Die Zellen wurden mit den Substanzen für 14 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium (Zusatz A) entfernt und die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Wells mit 500 µl Kulturmedium (Zusatz A) aufgefüllt und die Zellaufnahme der Biokonjugate mit dem Olympus IX51 Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Untersuchung der Kolokalisierung:

Die Kolokalisierung wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Hierfür wurden kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die Kompartimente in der Zelle spezifisch anfärben. Lysosomen wurden mithilfe des LysoTracker Red, Endosomen durch FM 4-64, Mitochondrien durch den MitoTracker Deep Red und der Nukleus durch DRAQ5 angefärbt. Die Farbstoffe wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Aufgrund von Artefaktbildung durch die Fixierung der Zellen musste mit lebenden Zellen gearbeitet werden. Die Zellen wurden hierfür in 8-Well Slides der Firma Ibidi ausgesät, die vor Gebrauch mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden. Hierfür wurden die Wells mit einer 0.01%igen Poly-L-Lysin-Lösung für 30 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert, die Lösung entfernt und die Wells zehnmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. 2.5×10^4 Zellen wurden pro Well ausgesät und für 14 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Substanzen wurden zur Untersuchung der Kolokalisierung in Konzentrationen von 5-20 μM verwendet. Aufgrund der geringen Konzentration konnte hier außer bei **45** auf den Zusatz von DMSO verzichtet werden. Die Biokonjugate wurden direkt im Medium (mit Zusatz A) gelöst, bei Verbindung **45** wurde ein DMSO-Zusatz von 0.5% (bezogen auf die Endkonzentration im Medium) verwendet. Die Biokonjugate wurden für zwei Stunden inkubiert, und vor Beendigung der Inkubationszeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff zum Anfärben der Organellen (nach den Angaben des Herstellers, siehe Tab. 5.6) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen, die Wells mit 250 μl Medium ohne Phenolrot (Zusatz B) aufgefüllt und die Kolokalisierung mithilfe des konfokalen Mikroskops der Firma Leica untersucht. Die FITC-markierten Biokonjugate wurden bei 488 nm angeregt und die Emission zwischen 500-525 nm gemessen.

Die Bilder mit mehr als einem Farbstoff wurden als sequentielle Bildserie aufgenommen, somit konnte eine Kanaltrennung sichergestellt werden. Für ein Bild wurde jede Linie mindestens zweimal aufgenommen und der Mittelwert gebildet sowie jedes Bild mindestens dreimal aufgenommen und aus diesen der Mittelwert der Fluoreszenz in einem Bild angezeigt.

Tab. 5.6: *Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Anfärbung der Zellorganellen.*

Farbstoff	Konzentration	Inkubationszeit	Anregungs- wellenlänge	Detektionsband- breite
FM 4-64	10 μ M	30 min	514 nm	700-800 nm
LysoTracker Red	75 nM	30-120 min	543 nm	590-620 nm
MitoTracker Deep Red	100 nM	20-30 min	633 nm	665-700 nm
DRAQ5	5 μ M	3 min	633 nm	665-700 nm

Testung auf Hemmung der Zellproliferation:

Die Bestimmung des antiproliferativen Effekts der Verbindungen erfolgte an den Zelllinien PT45, HepG2 und Hela. Die 96-Well-Mikrotiterplatten - für die Zytotoxizitätsbestimmung an Hela Zellen - wurden vor Gebrauch mit 0.2%iger Gelatinelösung beschichtet. Die Aussaat erfolgt im Anschluss an das Passagieren. Die Aussaatdichte war abhängig von den Wachstumsparametern der jeweiligen Zelllinie, siehe Tab. 5.7.

Tab. 5.7: *Richtwerte für die Aussaat.*

Zelllinie	Aussaatdichte [Zellen pro Well]
HepG2	6000-7000
PT45	6000-7000
Hela	5000-6000

Die Zellsuspension wurde nach dem Passagieren mit der benötigten Menge Medium verdünnt. Pro Well wurden je 100 μ l der Suspension in 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Ausgangszellmenge wurde separat eine t_0 -Platte mit Hela, HepG2 und PT45-Zellen (jeweils 32 Wells) ausgesät.

Durch Lösen der zu untersuchenden Substanz in DMSO wurde eine Stammlösung hergestellt, mit Ausnahme von Konjugat **16**, welches in H₂O gelöst wurde. Aus der jeweiligen Stammlösung wurden durch Verdünnung mit DMSO und Wasser sechs weitere Konzentrationen hergestellt. Diese Konzentrationen lagen zwischen 0.05 mM und 100 mM. 30 μ l dieser Lösungen wurden mit 3 ml Medium verdünnt und gut durchmischt. Das

verbrauchte Medium wurde aus den Platten entfernt und mit 100 µl der jeweiligen Verdünnung ersetzt, wobei mit der niedrigsten Substanzkonzentration begonnen wurde.

Abb. 5.1: Beispiel für ein Pipettierschema.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medium						0.5% DMSO					
B	1 µM Substanz						5 µM Substanz					
C	20 µM Substanz						50 µM Substanz					
D	100 µM Substanz						200 µM Substanz					
E	0.5% DMSO						Medium					
F	0.5 µM Cisplatin						1 µM Cisplatin					
G	5 µM Cisplatin						10 µM Cisplatin					
H	20 µM Cisplatin						50 µM Cisplatin					

Medium wurde als Negativkontrolle und Cisplatin als Positivkontrolle verwendet. Für die Inkubation der Zellen mit den Biokonjugaten betrug der DMSO-Anteil im Medium 0.5%. Ausnahmen sind die Cobaltcarbonylverbindungen ([15](#), [30](#)), hier musste der DMSO-Anteil auf 1% erhöht werden, [16](#) wurde ohne einen DMSO Zusatz verwendet. Jede Konzentration wurde in sechs Wells getestet, Abbildung 5.1 zeigt beispielhaft ein verwendetes Pipettierschema. Zeitgleich mit der Substanzzugabe wurde die t_0 -Platte abgestoppt. Nach Beendigung der Substanzzugabe werden die Platten für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Resazurin-Assay:

Nach der Inkubation der Testsubstanzen wurde der Resazurin-Assay an lebenden Zellen durchgeführt. Hierfür wurde das Medium mit den Testsubstanzen entfernt und die Wells mit jeweils 100 µl PBS gewaschen. Die Resazurinlösung wurde 1:9 mit farblosem RPMI Medium (Zusatz B) verdünnt und 100 µl dieser Lösung in jedes Well gegeben. Vermessen wurden die Platten mit dem Microplate-Reader bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm. Anschließend wurden die Platten für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert und ein weiteres Mal mit dem Microplate-Reader vermessen.

Abstoppen:

Nach der Durchführung des Resazurin-Assays wurde das Medium entfernt. Die Fixierung der Zellen am Plattenboden erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 100 µl einer 0.2%igen Glutardialdehyd-Lösung für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Die Glutardialdehydlösung wurde entfernt und die Wells mit 100 µl PBS gefüllt und bis zur Durchführung der Kristallviolett-Färbung bei 4 °C aufbewahrt.

Kristallviolett-Assay:

PBS wurde von den Platten entfernt und mit 100 µl 0.1%iger Tritonlösung in PBS ersetzt. Die Tritonlösung wurde von den Platten abgeschüttelt und 100 µl einer 0.02%igen Kristallviolettlösung zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten unter leichtem Schütteln wurde die Kristallviolettlösung entfernt und die Zellen fünfmal mit Wasser gewaschen und diese für fünf Minuten mit Wasser überschichtet. Danach wurde das Wasser durch kräftiges Ausklopfen der Platten auf Zellstoff entfernt. In die möglichst trockenen Wells wurden jeweils 100 µl 96% Ethanol gegeben und die Platten bei Raumtemperatur für drei Stunden leicht geschüttelt. Mit Hilfe des Microplate-Readers wurde die Absorption der ethanolischen Lösung bei 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 655 nm bestimmt, die sich proportional zur Zellmasse verhält.

Berechnung der IC₅₀-Werte:**- Bestimmung der Zellviabilität:**

Die Zellviabilität wurde mithilfe des Resazurin-Assays bestimmt. Diese ist proportional zur metabolischen Aktivität, die aus der Umsetzung des Resazurins zum Resorufin bestimmt wurde. Gemessen wurde die Abnahme der Resazurin-Absorption nach zwei Stunden in bezug auf die Resazurin-Absorption vor Beginn der zweistündigen Inkubation, die proportional zur Zunahme der Resorufin-Konzentration steht. Die Zytotoxizität einer Substanzkonzentration wird als relativer Wert, bezogen auf die Lösemittelkontrolle, berechnet.

$$\text{Viabilität}_{\text{Res}}(\%) = \frac{S_{\text{Abs}}}{K_{\text{Abs}}} \cdot 100$$

S_{Abs} = Mittelwert der Absorption der Testsubstanz in einer der getesteten Konzentrationen

K_{Abs} = Mittelwert der Absorption des Lösemittelblindwertes (Medium, Medium mit 0.5 bzw. 1% DMSO)

Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde die relative Viabilität_{Res}(%) gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration aufgetragen. Mithilfe der Boltzmann-Funktion wurde der sigmoide Kurvenverlauf bestimmt (Software: Origin 7G). Am Wendepunkt der sigmoiden Kurve wurde der IC_{50} -Wert abgelesen und der Standardfehler berechnet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

- Bestimmung der Zellmasse:

Die Zellmasse wurde mithilfe des Kristallviolett-Assays bestimmt. Die Absorption der ethanolischen Lösung ist proportional zur Zellmasse. Aus den sechs Absorptionswerten der ethanolischen Lösungen pro Substanzkonzentration wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Außerdem wird durch Vermessen der t_0 -Platte die Ausgangszellmasse bestimmt, die als Korrekturwert berücksichtigt wurde.

$$\text{Zellmasse}_{KV}(\%) = \frac{(S_{Abs} - I_{Abs})}{(K_{Abs} - I_{Abs})} \cdot 100$$

S_{Abs} = Mittelwert der Absorption bei einer der getesteten Konzentrationen der Testsubstanz

K_{Abs} = Mittelwert der Absorption des Lösungsmittelblindwerts

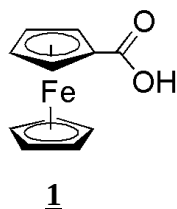
I_{Abs} = Mittelwert der Absorption zum Zeitpunkt der Substanzzugabe (t_0)

Die relative Zellmasse wurde graphisch gegen den dekadischen Logarithmus der Substanzkonzentration aufgetragen. Daraus wurde durch Verwendung der Boltzmann-Funktion der sigmoide Kurvenverlauf berechnet (Software: Origin 7G). Der IC_{50} -Wert wurde aus der sigmoiden Kurve bestimmt. Hierfür wurde die Konzentration abgelesen, bei der die relative Zellmasse_{KV}(%) 50% beträgt. Der Fehler wurde als Standardfehler angegeben. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten angegeben.

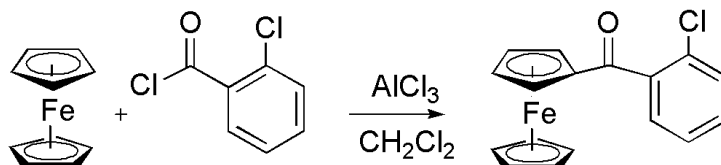
5.3 Synthese

5.3.1 Literatur-Synthesen

- Synthese der Ferrocen-Carbonsäure 1

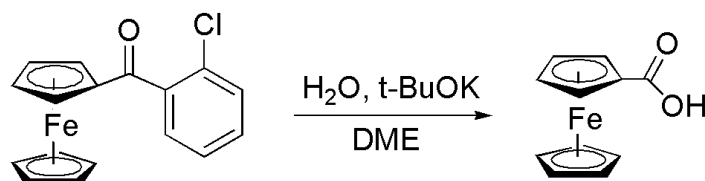


Die Synthese der Ferrocen-Carbonsäure wurde nach der Vorschrift von Reeves durchgeführt.^[281]



a.) (2-Chlorobenzoyl)ferrocen: Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. In einen Schlenkkolben wurden 9.30 g (50 mmol) Ferrocen, 8.75 g (50 mmol) 2-Chlorbenzoylchlorid in trockenem DCM vorgelegt und im Eisbad auf unter 5 °C gekühlt. Dann wurde 7.00 g (52.5 mmol) wasserfreies Aluminiumtrichlorid in kleinen Portionen dazugegeben, so dass die Temperatur nicht über 5 °C anstieg. Dabei wurde die Lösung blau. Nach Zugabe des Aluminiumtrichlorids wurde sie für 30 Minuten unter Eiskühlung und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

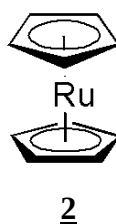
Darauf folgte die vorsichtige Zugabe von 100 ml Wasser unter Eiskühlung. Anschließend wurde 30 Minuten stark gerührt, wobei sich die Lösung rot färbte. Das Gemisch wurde dann im Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 ml) extrahiert. Die DCM-Phasen wurden vereinigt und zweimal mit 50 ml 10%iger Natronlauge gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 12.9 g (80%) einer rot-braunen, teilweise kristallisierenden, öligen Flüssigkeit erhalten.



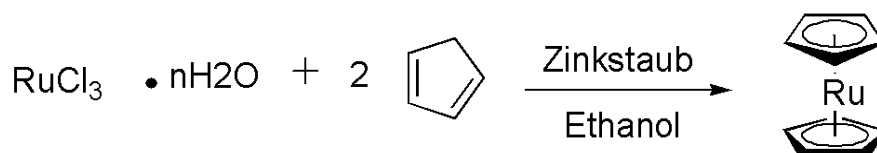
b.) Ferrocen-Carbonsäure **1**: In einem Dreihalskolben wurden 23.0 g (205 mmol) Kalium tert-butoxid in 160 ml 1,2-Dimethoxyethan (DME) gelöst und 1.1 ml Wasser langsam zugegeben. Anschließend wurde (2-Chlorbenzoyl)ferrocen als Rohprodukt in 30 ml DME gelöst und zu der Lösung gegeben. Die Lösung färbte sich rot und wurde für 90 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Während des Erhitzens ändert sich die Farbe der Lösung von rot nach hellbraun. Sie wurde abgekühlt und mit 500 ml Wasser versetzt. In einem Scheidetrichter wurde die Lösung dreimal mit 100 ml Ether gewaschen. Die vereinigten Etherphasen wurden dreimal mit 50 ml 10%iger Natronlauge gewaschen. Die gesamten wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit konzentrierter Salzsäure angesäuert. Es fiel Ferrocen-Carbonsäure als orange-brauner Feststoff aus. Dieser wurde abfiltriert und im Exikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 7.0 g (76% bezogen auf (2-Chlorbenzoyl)ferrocen)).

1: $C_{10}H_{10}FeO_2$ (230.00 g/mol): MS (EI, 70 eV): m/z 230 $[M]^+$. 1H -NMR ($CDCl_3$, 200.13 MHz): δ = 4.78 (m, 2H, $H_{Cp2,5}$), 4.46 (m, 2H, $H_{Cp3,4}$), 4.22 (s, 5H, $H_{Cp'}$).

-Synthese von Ruthenocen 2:



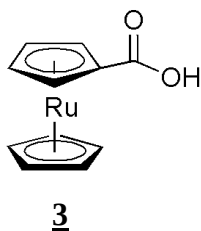
Die Ruthenocen-Synthese wurde nach der Vorschrift von Monnier durchgeführt.^[282]



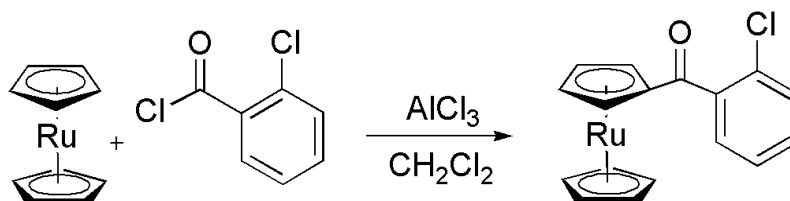
Ruthenocen 2: Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre durchgeführt. In einen Schlenkkolben wurden 2.60 g (0.01 mol) Rutheniumtrichlorid-Hydrat in 40 ml absolutem Ethanol vorgelegt. Nach Zugabe von 12.5 ml (0.15 mol) Cyclopentadien wurde die Lösung rot-schwarz. Nach der portionsweisen Zugabe von 6.50 g (0.1 mol) Zinkstaub verfärbte sich die Lösung dunkelblau und später dunkelgrau. Die Mischung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, der Rückstand abfiltriert und mit Toluol gewaschen. Das Lösemittel des Filtrats wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne entfernt und der dunkle Rückstand in 250 ml Toluol aufgenommen und mithilfe einer Kieselgelsäule gereinigt. Die ruthenocenhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Ruthenocen wurde als weißer kristalliner Feststoff erhalten. Die Ausbeute betrug 1.50 g (65%).

2: C₁₀H₁₀Ru (231.26 g/mol): MS (EI, 70 eV): m/z 231.9 [M]⁺, 166.9 [M-Cp]⁺. ¹H-NMR (CDCl₃, 200.13 MHz): δ = 4.49 (s, 10H, H_{Cp}).

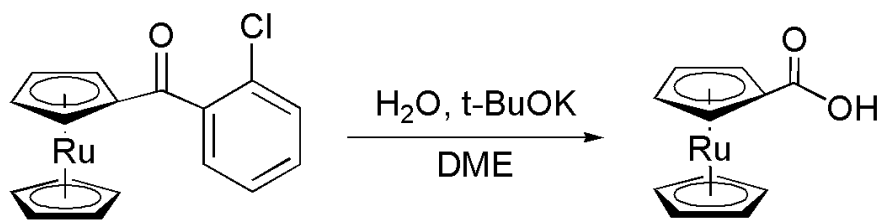
- Synthese der Ruthenocen-Carbonsäure **3**:



Die Synthese der Ruthenocen-Carbonsäure wurde wie die Synthese der Ferrocen-Carbonsäure nach der Vorschrift von Reeves durchgeführt.^[281, 283]

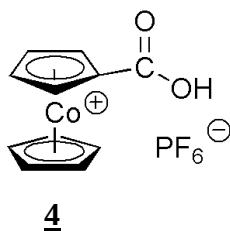


a.) (2-Chlorbenzoyl)ruthenocen: Es wurde unter Argonatmosphäre gearbeitet. In einen Schlenkkolben wurden 0.19 g (0.82 mmol) Ruthenocen, 0.14 g (0.82 mmol) 2-Chlorbenzoylchlorid und 10 ml Dichlormethan vorgelegt. Der Kolben wurde in einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und 0.11 g (0.82 mmol) wasserfreies Aluminiumtrichlorid in kleinen Portionen so zugegeben, so dass die Reaktionstemperatur nicht über 5 °C anstieg. Die Lösung verfärbte sich von hellgelb über orange nach rot. Anschließend wurde der Reaktionsansatz eine halbe Stunde im Eisbad und danach vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde unter Eiskühlung mit 2 ml Wasser gestoppt und der Reaktionsansatz ca. 30 Minuten sehr stark gerührt. Die wässrige Lösung wurde abgetrennt und mehrmals mit DCM (3 x 25 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und zweimal mit 10%iger Natriumhydroxidlösung (2 x 25 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 0.23 g (74%) des Produkts in Form eines braunen Feststoffs erhalten.

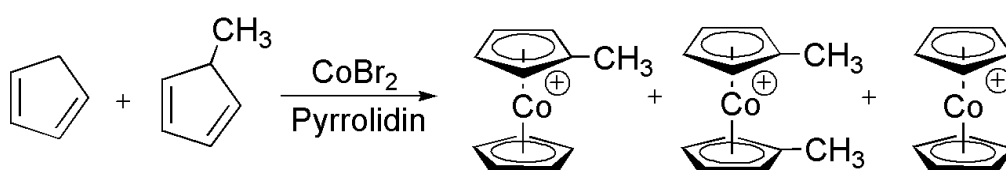


b.) Ruthenocen-Carbonsäure **3**: Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre durchgeführt. In einen Dreihalskolben wurden 2 ml DME und 0.42 g (3.78 mmol) Kalium-*tert*-butoxid vorgelegt. Nach Zugabe von 19 μ l Wasser unter ständigem Rühren wurde die Lösung von (2-Chlorbenzoyl)ruthenocen aus a.) in 5 ml DME zugetropft. Die Lösung wurde anschließend acht Stunden unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde die Reaktionsmischung mit 10 ml Wasser versetzt und dreimal mit 2 ml Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit einer 10%igen Natriumhydroxidlösung extrahiert. Die gesamten wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 1 angesäuert. Der Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Das Rohprodukt wurde mit Hilfe der Säulenchromatographie gereinigt. Ruthenocen-Carbonsäure wurde als beiger Feststoff erhalten. Die Ausbeute betrug 0.085 g (50% bezogen auf (2-Chlorbenzoyl)ruthenocen).

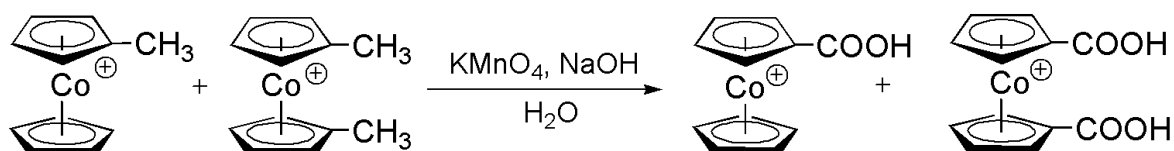
3: $C_{11}H_{10}RuO_2$ (275.27 g/mol); 1H -NMR ($CDCl_3$, 200.13 MHz): δ = 4.97 (m, 2H, $H_{Cp2,5}$), 4.78 (m, 2H, $H_{Cp3,4}$), 4.56 (s, 5H, $H_{Cp'}$).

- Synthese der Cobaltocenium-Carbonsäure **4**

Die Synthese wurde nach der Vorschrift von Sheats und Rausch durchgeführt.^[284]



a.) Methylcobaltocenium: In einem Dreihalskolben wurden 8.25 g (0.125 mol) Cyclopentadien und 10 g Methylcyclopentadien (0.125 mol) in 100 ml trockenem Pyrrolidin vorgelegt. Beide Edukte liegen als Dimer vor und wurden zuvor frisch gecrackt. Die Mischung wurde auf 0 °C abgekühlt und portionsweise 10.38 g (50 mmol) wasserfreies Cobalt(II)-bromid zugesetzt. Sie wurde dann für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 250 ml heißem Wasser unter Zurückbleiben eines grünen Feststoffs gelöst. Die Lösung wurde dreimal mit 25 ml Ether gewaschen und mit 1 g Aktivkohle gereinigt. Das Rohprodukt wurde mit Natriumhexafluorophosphat-Lösung (7.5 g in 40 ml Wasser) gefällt. Die Ausbeute betrug 2.9 g.



b.) Cobaltocenium-Carbonsäure **4**: 2.9 g der in a.) synthetisierten Mischung aus Cobaltocenium, Methylcobaltocenium und Dimethylcobaltocenium wurden in einer Lösung aus 3.9 g (24.6 mmol) Kaliumpermanganat, 0.66 g (17 mmol) Natriumhydroxid in 50 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde drei Stunden bei 95 °C erhitzt und der entstandene Braunstein durch Filtrieren über Celite abgetrennt. Der abgekühlten Lösung wurde

Natriumhexafluorophosphat zugesetzt und anschließend filtriert, um das Cobaltocenium als Hexafluorophosphat-Salz abzutrennen. Das Filtrat wurde mit Salzsäure versetzt, und es fielen Cobaltocenium-Monocarbonsäure und Cobaltocenium-Dicarbonsäure nebeneinander aus. Die Säuren wurden in einer Soxhlet-Apparatur mit Aceton extrahiert. Dabei löste sich die Monosäure in Aceton, die Disäure dagegen nicht. Das Aceton wurde unter vermindertem Druck entfernt und die Cobaltocenium-Carbonsäure als gelber Feststoff erhalten. Die Ausbeute betrug 1.22 g (6.5% bezogen auf Cobalt(II)-bromid).

4: $C_{11}H_{10}CoF_6O_2P$ (378 g/mol), $C_{11}H_{10}CoO_2^+$ (233 g/mol): MS (EI, 70 eV): m/z 233 $[M]^+$, 189 $[M-Cp]^+$.

5.3.2 Festphasensynthese

Die Festphasen-Peptidsynthese wurde mithilfe eines Mikrowellen-Peptidsynthesizers oder manuell in einer Einmal-Spritze mit Fritte durchgeführt. Die Angaben zu den Syntheseprotokollen des Peptidsynthesizers befinden sich im Abschnitt „Mikrowellen-Peptidsynthesizer“. Die Kupplungs- und Entschützungs-schritte der manuellen Synthese wurden auf einem mechanischen Schüttler durchgeführt.

Quellen: Zu Beginn der Peptidsynthese wurde das Harz direkt in die Spritze eingewogen. Das Quellen erfolgte in DMF und wurde für eine Stunde unter Schütteln durchgeführt.

Entschützen: Die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wurde durch eine 20%ige Lösung von Piperidin in DMF entschützt. Das Harz wurde dafür zweimal für fünf Minuten in dieser Lösung geschüttelt.

Waschen: Nach jedem Entschützungs- und Kupplungsschritt wurde das Harz fünfmal mit DMF gewaschen, um Reste der Reaktionsmischung zu entfernen. Vor dem Abspalten des Peptides vom Harz wurde das Harz fünfmal mit DMF, fünfmal mit DCM und anschließend fünfmal mit Methanol gewaschen.

Kupplung: Die Aminosäuren und Kupplungsreagenzien (TBTU/HOBt oder HATU) wurden in vierfachem Überschuss eingesetzt. Die Base DIPEA wurde zur Aktivierung in sechsfachem Überschuss verwendet. Die Aminosäuren wurden mit TBTU/HOBt und DIPEA in DMF gelöst und nach fünf Minuten in die Spritze zu dem Harz gegeben. Das Kuppeln der Aminosäuren wurde für 30 Minuten unter Schütteln durchgeführt. Bei Verwendung eines nicht vorbeladenen Harzes wurde die Kupplungszeit bei der ersten Aminosäure auf eine Stunde erhöht. Die Kupplung von Ferrocen- und Ruthenocen-Carbonsäure entsprach weitestgehend der Aminosäurekupplung. Die Kupplung der Ferrocen-Carbonsäure wurde für eine Stunde in DMF und die Ruthenocen-Funktionalisierung mit HATU als Kupplungsreagenz für drei Stunden in NMP als Lösemittel durchgeführt. Propargylglycin und 4-Pentinsäure wurden ebenfalls entsprechend der Aminosäure-Kupplung durchgeführt; die Kupplungszeit wurde hier auf eine Stunde erhöht. Die Kupplung wurde mithilfe des Kaisertests auf Vollständigkeit überprüft.^[254]

Cobaltcarbonyl-Kupplung: Die Cobaltcarbonyl-Kupplung erfolgte in Lösung unter Stickstoffatmosphäre. Das geschützte Peptid wurde in trockenem THF vorgelegt, und zu dieser Lösung wurde langsam in THF gelöstes $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ zugetropft. Die Reaktion wurde mittels analytischer HPLC verfolgt, nach erfolgreicher Umsetzung die Lösung filtriert und das Lösemittel des Filtrats im Stickstoffstrom entfernt.

Acetylieren: Die N-terminale Acetylierung wurde am Harz nach Entschützen der letzten Fmoc-Schutzgruppe durchgeführt. Hierfür wurde das Peptid mit einer Mischung aus 5% Acetanhydrid und 6% DIPEA in DMF für 10 Minuten geschüttelt. Die Acetylierung der Seitenkette erfolgte am geschützten Peptid an der festen Phase. Hierfür wurde orthogonal die Schutzgruppe der Seitenkette entfernt und die Acetylierung entsprechend der „N-terminalen Acetylierung“ durchgeführt.

Bildung der Disulfidbrücke: Die Entschützung der Acm-Schutzgruppe der Aminosäure Cystein und die gleichzeitige Thioloxydation zur Disulfidbrücke erfolgte durch zwei Äquivalente Thallium(III)trifluoracetat in DMF. Diese Reaktion wurde für eine Stunde unter Schütteln durchgeführt. Danach wurde das Peptid gewaschen, und die stark toxischen Thalliumreste wurden gesondert entsorgt.

FITC-Kupplung: Um das Seitenkettenamin des Lysins mit FITC zu funktionalisieren, wurde es mit der säurelabilen Mtt-Gruppe geschützt. Zur Entfernung der Mtt-Gruppe wurde das Harz mit 1% TFA in DCM (unter Zugabe von 5% TIS) fünfmal für zwei Minuten in der Spritze geschüttelt. Danach wurde es fünfmal mit DCM und DMF gewaschen. Fünf Äquivalente FITC wurden mit zehn Äquivalenten DIPEA in DMF gelöst und für fünf Stunden unter Schütteln an das Peptid gekuppelt.

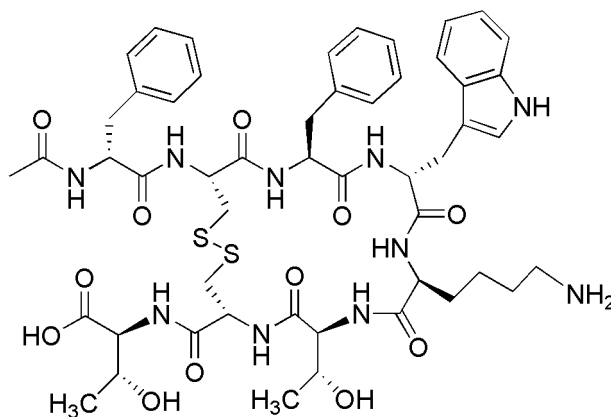
Shrinking: Vor dem Spalten des Peptids vom Harz wurde dieses jeweils fünfmal mit DMF, DCM und Methanol gewaschen. Danach wurde das Harz 30 Minuten mit Methanol inkubiert, wobei das Harz sichtbar an Volumen verlor. Schließlich wurde das Harz in der Spritze für 30 Minuten im Vakuum getrocknet.

Spalten: Nach dem Trocknen wurde das Peptid mit der Abspalllösung für 90 Minuten oder bei Anwesenheit der Schutzgruppe Pbf für vier bzw. bei Polyarginin sechs Stunden in der Spritze vom Harz abgespalten. Die Abspalllösung setzte sich aus 95% TFA, 2.5% H_2O und

2.5% TIS zusammen. In Gegenwart von Ferrocen- oder Ruthenocen-Verbindungen wurde der Abspaltlösung anstelle von Wasser Phenol zugesetzt, so dass die Abspaltlösung die Zusammensetzung 85% TFA, 10% Phenol und 5% TIS besaß.

Aufarbeitung: Über den Spritzen-Filter wurde die Abspaltlösung von dem Harz abgetrennt und das Harz mit 1 ml TFA gewaschen. Das Peptid wird aus dem Filtrat mit kaltem Ether gefällt und zweimal mit kaltem Ether gewaschen. Das Peptid wird durch Zentrifugation vom Ether abgetrennt und anschließend in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch gelöst, filtriert und mittels HPLC analysiert und aufgereinigt. Das Biokonjugat wurde aus der Wasser-Acetonitril-Lösung durch Lyophilisation erhalten.

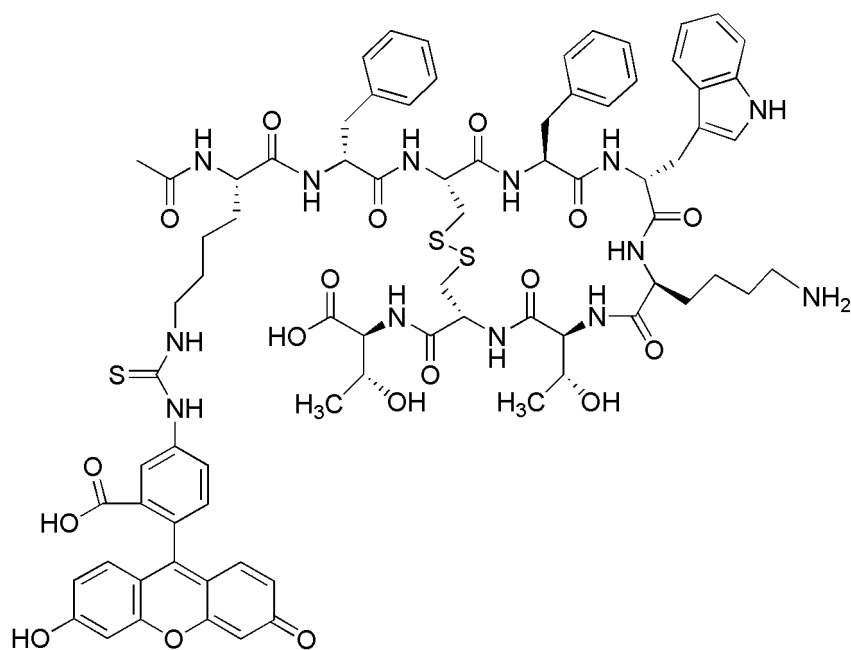
5.3.3 Charakterisierung der Biokonjugate

**5**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.1	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	1.5 h	86.0 mg 80%

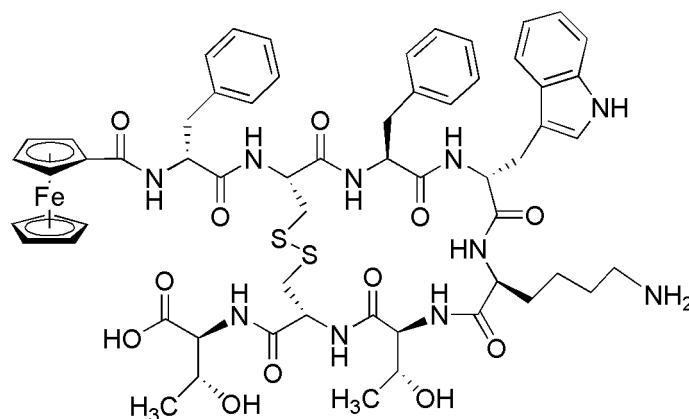
5: C₅₁H₆₆N₁₀O₁₂S₂ (1075.26 g/mol): MS (MALDI-TOF; Sinap.): m/z 1076.7 [M+H]⁺; MS (ESI, pos.): m/z 1078.2 [M+3H]⁺. R_t = 14.4 Minuten (analytische HPLC; Methode B). ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.13 MHz): δ = 12.59 (br, 1H, H_{Thr1}, COOH), 10.79 (s, 1H, H_{ε1}, Trp4), 9.05 (d, J = 9.3 Hz, 1H, H_{NH}, Cys2), 8.79 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H_{NH}, Trp4), 8.60 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H_{NH}, Phe3), 8.53 (d, J = 9.4 Hz, 1H, H_{NH}, Cys7), 8.48 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{NH}, Thr8), 8.44 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H_{NH}, Lys5), 7.83 (d, J = 6.3 Hz, 1H, H_{NH}, Phe1), 7.63 (m, 3H, H_ζ, Lys5), 7.58 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_{NH}, Thr6), 7.50 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H_{ε3}, Trp4), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{ζ2}, Trp4), 7.33 (m, 2H, H_δ, Phe1), 7.29 (m, 2H, H_ε, Phe1), 7.21 (m, 1H, H_{ζ2}, Phe1), 7.18 (m, 1H, H_{ζ2}, Phe3), 7.17 (m, 2H, H_ε, Phe3), 7.12 (m, 1H, H_{η2}, Trp4), 7.10 (m, 2H, H_δ, Phe3), 7.04 (m, 1H, H_{ζ3}, Trp4), 7.02 (m, 1H, H_{δ1}, Trp4), 5.50 (m, 1H, H_α, Cys7), 5.39 (m, 1H, H_α, Cys2), 4.86 (m, 1H, H_α, Phe1), 4.81 (m, 1H, H_{γ1}, Thr6), 4.66 (m, 1H, H_α, Phe3), 4.61 (m, 1H, H_α, Thr6), 4.34 (m, 1H, H_{γ1}, Thr8), 4.34 (m, 1H, H_β, Thr8), 4.30 (m, 1H, H_α, Thr8), 4.29 (m, 1H, H_α, Trp4), 4.09 (m, 1H, H_α, Lys5), 3.97 (m, 1H, H_β, Thr6), 3.18 (m, 1H, H_{β2}, Phe1), 3.03 (m, 1H, H_{β2}, Trp4), 2.92 (m, 1H, H_β, Phe3), 2.90 (m, 1H, H_{β2}, Cys7), 2.86 (m, 1H, H_{β2}, Cys2), 2.82 (m, 1H, H_{β3}, Cys2), 2.79 (m, 1H, H_{β3}, Phe1), 2.78 (m, 1H, H_{β3}, Trp4), 2.64 (m, 1H, H_{ε2}, Lys5), 2.62 (m, 1H, H_{ε3}, Lys5), 1.78 (m, 1H, H_{β2}, Lys5), 1.75 (m, 3H, H_{Acetyl}), 1.37 (m, 2H, H_δ, Lys5), 1.34 (m, 1H, H_{β3}, Lys5), 1.22 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H_{γ2}, Thr8), 1.10 (d, J = 6.2 Hz, 3H, H_{γ2}, Thr6), 0.98 (m, 1H, H_{γ2}, Lys5), 0.87 (m, 1H, H_{γ3}, Lys5). ¹³C-NMR

(DMSO-d₆, 150.92 MHz): δ = 173.6 (CON_{Phe1}), 172.6 (CON_{Trp5, Thr8}), 171.6 (CON_{Lys5}), 171.4 (CON_{Phe3}), 171.0 (CON_{Thr6}), 170.5 (CON_{Cys7}), 169.6 (CON_{Cys2}), 138.6 (C _{γ} , Phe1), 137.3 (C _{γ} , Phe3), 136.5 (C _{ϵ 2}, Trp4), 130.0 (C _{δ} , Phe1), 129.5 (C _{δ} , Phe3), 128.5 (C _{ϵ} , Phe1), 128.4 (C _{ϵ} , Phe3), 127.3 (C _{δ 2}, Trp4), 126.9 (C _{ζ} , Phe3), 126.8 (C _{ζ} , Phe1), 124.2 (C _{δ 1}, Trp4), 121.5 (C _{η 2}, Trp4), 118.8 (C _{ζ 3}, Trp4), 118.7 (C _{ϵ 3}, Trp4), 111.9 (C _{ζ 2}, Trp4), 109.6 (C _{γ} , Trp4), 68.1 (C _{β} , Thr6), 66.8 (C _{β} , Thr8), 58.8 (C _{α} , Thr8), 58.6 (C _{α} , Thr6), 55.8 (C _{α} , Trp4), 54.4 (C _{α} , Phe3), 53.9 (C _{α} , Phe1), 53.1 (C _{α} , Cys2), 53.0 (C _{α} , Lys5), 52.6 (C _{α} , Cys7), 46.5 (C _{β} , Cys2), 45.2 (C _{β} , Cys7), 39.9 (C _{β} , Phe1), 39.4 (C _{β} , Phe3), 31.2 (C _{β} , Lys5), 27.1 (C _{δ} , Lys5), 26.6 (C _{β} , Trp4), 23.2 (C_{Acetyl}), 22.7 (C _{γ} , Lys5), 21.0 (C _{γ} , Thr8), 20.2 (C _{γ} , Thr6).

**6**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	1.5 h	16.7 mg 21%

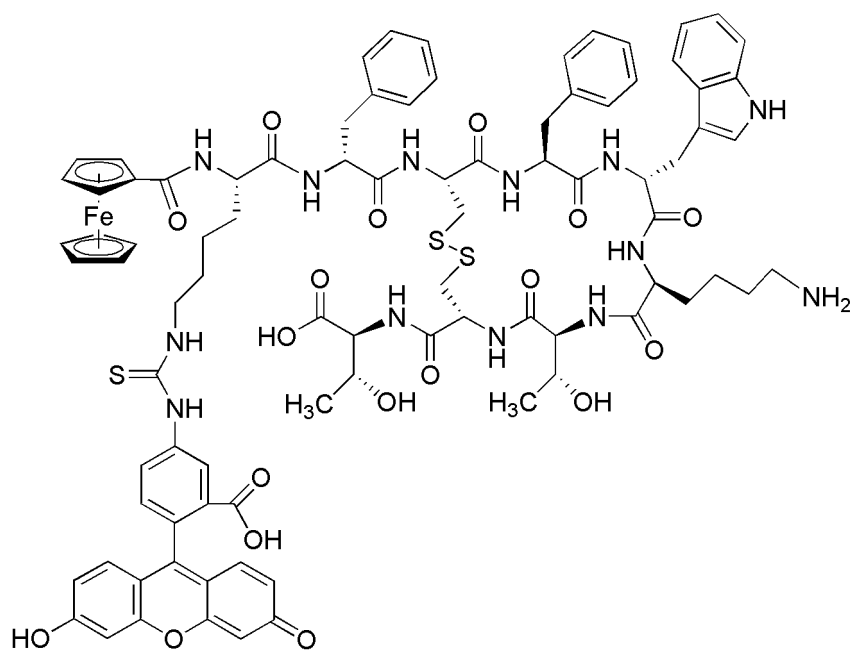
6: C₇₈H₈₉N₁₃O₁₈S₃ (1591.56 g/mol): MS (MALDI-TOF; Sinap.): *m/z* 1594.2 [M+3H]⁺, 1616.3 [M+2H+Na]⁺; MS (ESI, pos.): *m/z* 1592.2 [M+H]⁺, 796.7 [M+2H]²⁺. R_t = 17.3 Minuten (analytische HPLC; Methode A).

**7**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.1	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	1.5 h	37.3 mg 30%

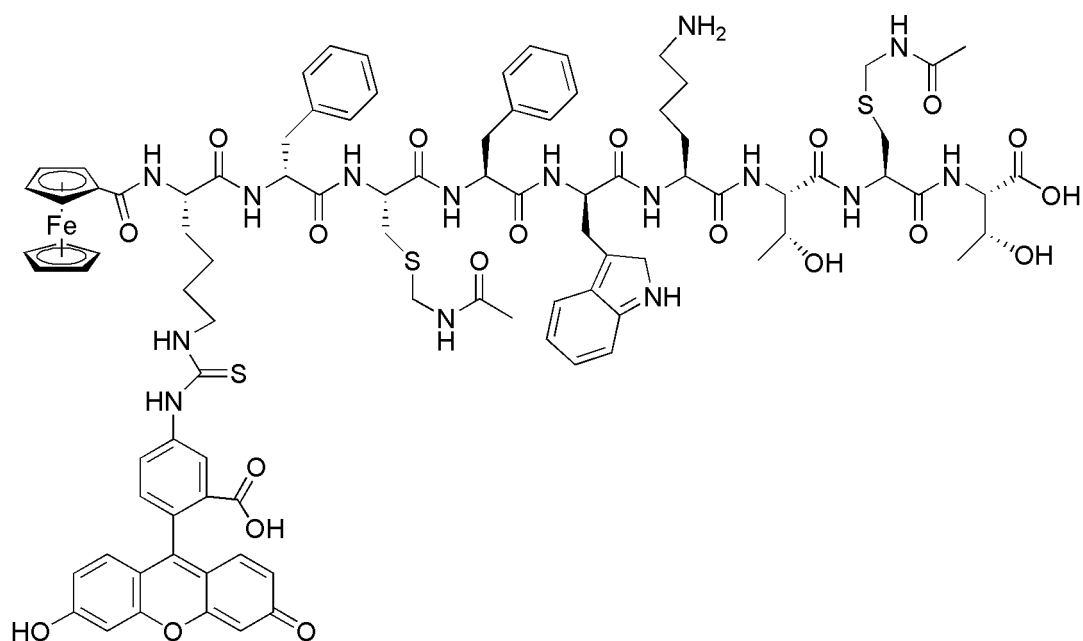
7: C₆₀H₇₂FeN₁₀O₁₂S₂ (1244.41 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1245.2 [M+H]⁺, 623.2 [M+2H]²⁺. R_t = 17.1 Minuten (analytische HPLC; Methode B). CV: E_{1/2} = 0.14 V in DMSO. ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.13 MHz): δ = 12.52 (br, 1H, H_{COOH}, Thr8), 10.75 (s, 1H, 1H_ε, Trp4), 8.98 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H_{NH}, Cys2), 8.73 (d, J = 5.1 Hz, 1H, H_{NH}, Trp4), 8.52 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H_{NH}, Phe3), 8.46 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H_{NH}, Cys7), 8.41 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H_{NH}, Lys5), 8.36 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H_{NH}, Thr8), 7.68 (m, 1H, H_{NH}, Phe1), 7.61 (br, 3H, H_ζ, Lys5), 7.54 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_{NH}, Thr6), 7.44 (m, 3H, 1H_{ε3}, Trp4, 2H_δ, Phe1), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{ζ2}, Trp4), 7.29 (m, 2H, H_ε, Phe1), 7.16 (m, 1H, H_{ζ2}, Phe1), 7.10 (m, 3H, 1H_{ζ2}, Phe3, 2H_ε, Phe3), 7.09 (m, 1H, H_{η2}, Trp4), 7.02 (m, 2H, H_δ, Phe3), 7.00 (m, 1H, H_{ζ3}, Trp4), 6.97 (m, 1H, H_{δ1}, Trp4), 5.35 (m, 1H, H_α, Cys7), 5.30 (m, 1H, H_α, Cys2), 5.05 (m, 1H, H_α, Phe1), 4.83 (m, 1H, H_{Cp2}), 4.80 (m, 1H, H_{γ1}, Thr6), 4.69 (m, 1H, H_{Cp5}), 4.62 (m, 1H, H_α, Phe3), 4.55 (m, 1H, H_α, Thr6), 4.31 (m, 1H, H_β, Thr8), 4.28 (m, 2H, H_{Cp3,4}), 4.24 (m, 2H, 1H_α, Thr8, 1H_α, Trp4), 4.13 (m, 1H, H_{γ1}, Thr8), 4.04 (m, 1H, H_α, Lys5), 3.94 (m, 1H, H_β, Thr6), 3.88 (s, 5H, H_{Cp}), 3.20 (m, 1H, H_{β2}, Phe1), 2.98 (m, 1H, H_{β2}, Trp4), 2.88 (m, 3H, 1H_{β2}, Cys7, 1H_{β2}, Cys2, 1H_{β2}, Phe3), 2.82 (m, 2H, 1H_{β3}, Cys2, 1H_{β3}, Phe3), 2.81 (m, 1H, H_{β3}, Cys7), 2.74 (m, 1H, H_{β3}, Trp4), 1.74 (m, 1H, H_{β2}, Lys5), 1.40 (m, 2H, H_δ, Lys5), 1.32 (m, 1H, H_{β3}, Lys5), 1.16 (d, J = 5.6 Hz, 3H, H_{γ2}, Thr8), 1.05 (d, J = 6.1 Hz, 3H, H_{γ2}, Thr6), 1.00 (m, 1H, H_{γ2}, Lys5), 0.82 (m, 1H, H_{γ3}, Lys5). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.92 MHz): δ = 171.9 (CON_{Phe1}), 171.8 (CON_{Trp4, Thr8}), 171.0 (CON_{Lys5}), 170.6 (CON_{Phe3}), 170.2 (CON_{Thr6}), 168.9 (CON_{Cys7}),

168.7 (CON_{Cys2}), 139.0 (C_γ, Phe3), 137.4 (C_γ, Phe1), 130.0 (C_δ, Phe3), 129.4 (C_δ, Phe1), 128.7 (C_ε, Phe3), 128.5 (C_ε, Phe1), 126.9 (C_ζ, Phe1), 126.8 (C_ζ, Phe3), 124.2 (C_{δ1}, Trp4), 121.5 (C_{η2}, Trp4), 118.8 (C_{ζ3}, Trp4), 118.7 (C_{ε3}, Trp4), 111.9 (C_{ε2}, Trp4), 74.5 (C_{Cp1}), 70.5 (C_{Cp3,4}), 69.9 (C_{Cp'}), 69.5 (C_{Cp5}), 68.1 (C_{Cp2}), 59.1 (C_α, Thr8), 58.7 (C_α, Thr6), 55.8 (C_α, Trp4), 54.5 (C_α, Phe3), 54.3 (C_α, Phe1), 53.1 (C_α, Lys5), 53.0 (C_α, Cys2), 52.6 (C_α, Cys7), 46.2 (C_β, Cys2), 45.1 (C_β, Cys7), 39.4 (C_β, Phe1), 39.2 (C_β, Phe3), 31.2 (C_β, Lys5), 27.1 (C_δ, Lys5), 26.6 (C_β, Trp4), 20.9 (C_γ, Thr8), 20.3 (C_γ, Thr6).

**8**

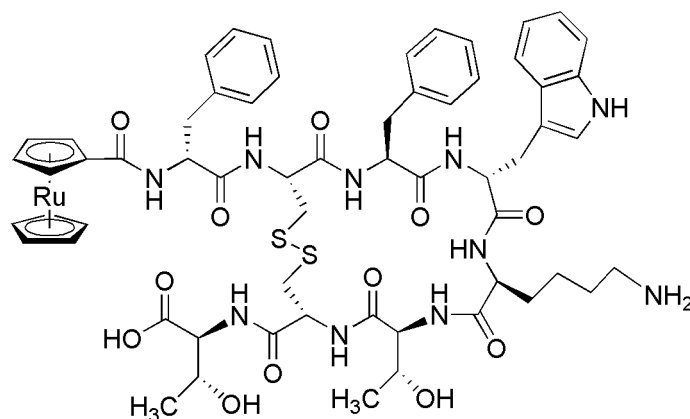
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	85 % TFA 5% Phenol 5% TIS	1.5 h	13.2 mg 15%

8: C₈₇H₉₅FeN₁₃O₁₈S₃ (1761.54 g/mol): MS (MALDI-TOF; Sinap.): m/z 1766.7 [M]⁺ (*); MS (ESI, pos.): m/z 1762.9 [M+H]⁺; 882.2 [M+2H]²⁺. R_t = 19.7 Minuten (analytische HPLC, Methode A).

**9**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	85 % TFA 5% Phenol 5% TIS	1.5 h	13.2 mg 14%

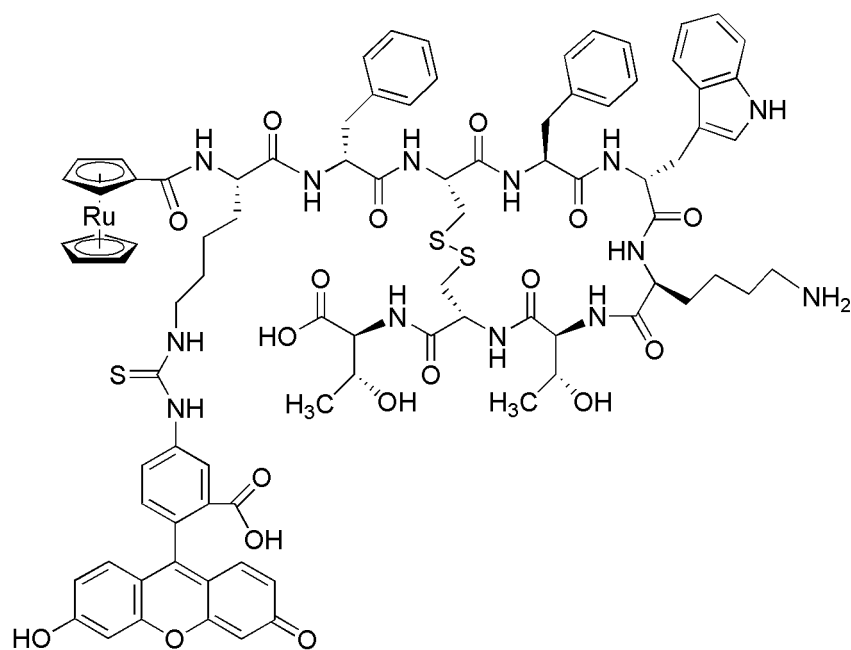
9: C₉₃H₁₀₈FeN₁₅O₂₀S₃ (1906.64 g/mol): MS (MALDI-TOF; Sinap.): m/z 1912.2 [M]⁺, 1934.4 [M+Na]⁺ (*); MS (ESI, pos.): m/z 1906.9 [M+H]⁺, 965.2 [M+H+Na]²⁺. R_t = 18.2 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**10**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.1	4 äq	85 % TFA 5% Phenol 5% TIS	1.5 h	96.3 mg 74%

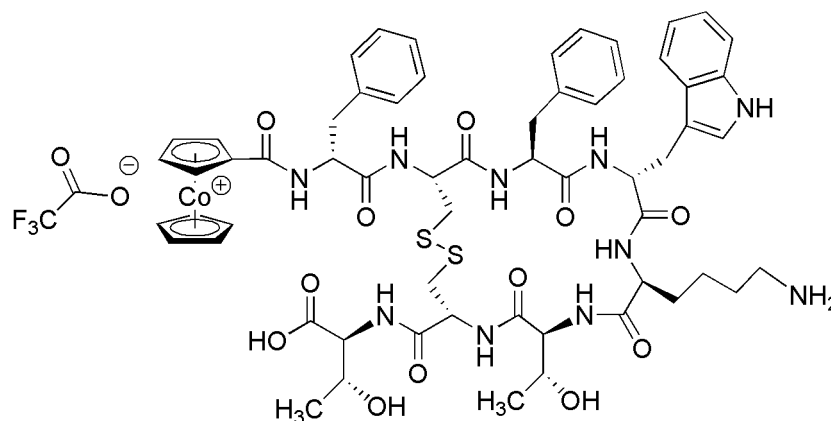
10: C₆₀H₇₂N₁₀O₁₂RuS₂ (1290.38 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1291.2 [M+H]⁺, 657.2 [M+H+Na]²⁺. R_t = 17.6 Minuten (analytische HPLC, Methode B). CV: E_{1/2} = 0.53 V in DMSO. ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.13 MHz): δ = 12.64 (br, 1H, H_{COOH}, Thr8), 10.77 (s, 1H, H_{ε1}, Trp4), 8.88 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H_{NH}, Cys2), 8.74 (d, J = 5.3 Hz, 1H, H_{NH}, Trp4), 8.52 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_{NH}, Phe3), 8.46 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H_{NH}, Cys7), 8.42 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H_{NH}, Lys5), 8.31 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{NH}, Thr8), 7.64 (br, 3H, H_ζ, Lys5), 7.57 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H_{NH}, Thr6), 7.48 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H_{NH}, Phe1), 7.46 (m, 1H, H_{ε3}, Trp4), 7.35 (m, 2H, H_δ, Phe1), 7.34 (m, 1H, H_{ζ2}, Trp4), 7.28 (m, 2H, H_ε, Phe1), 7.18 (m, 1H, H_ζ, Phe1), 7.12 (m, 3H, 2H_ε, Phe3, 1H_ζ, Phe3), 7.07 (m, 1H, H_{η2}, Trp4), 7.04 (m, 2H, H_δ, Phe3), 6.99 (m, 1H, H_{ζ3}, Trp4), 6.97 (m, 1H, H_{δ1}, Trp4), 5.32 (m, 1H, H_α, Cys7), 5.27 (m, 1H, H_α, Cys2), 5.14 (m, 1H, H_{Cp2}), 5.06 (m, 1H, H_{Cp5}), 4.94 (m, 1H, H_α, Phe1), 4.82 (m, 1H, H_{γ1}, Thr6), 4.63 (m, 3H, 2H_{Cp3,4}, 1H_{α,Phe3}), 4.55 (m, 1H, H_α, Thr6), 4.34 (m, 6H, 1H_β, Thr8, 5H_{Cp}), 4.26 (m, 2H, 1H_α, Thr8, 1H_α, Trp4), 4.12 (m, 1H, H_{γ1}, Thr8), 4.03 (m, 1H, H_α, Lys5), 3.97 (m, 1H, H_β, Thr6), 3.15 (m, 1H, H_{β2}, Phe1), 2.98 (m, 1H, H_{β2}, Trp4), 2.92 (m, 1H, H_{β3}, Phe1), 2.87 (m, 3H, 1H_{β2}, Cys2, 1H_{β2}, Cys7, 1H_{β2}, Phe3), 2.85 (m, 1H, H_{β3}, Phe3), 2.82 (m, 2H, 1H_{β3}, Cys2, 1H_{β3}, Cys7), 2.75 (m, 1H, H_{β3}, Trp4), 2.61 (m, 2H, H_ε, Lys5), 1.75 (m, 1H, H_{β2}, Lys5), 1.32 (m, 3H, 1H_{β3}, Lys5, 2H_δ, Lys5), 1.20 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H_{γ2}, Thr8), 1.06 (d, J = 6.2 Hz, 3H, H_{γ2}, Thr6), 0.83 (m, 2H, H_γ, Lys5). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.92 MHz): δ = 172.7 (CON_{Phe1}),

171.8 (CON_{Trp4}), 171.6 (COO_{Thr8}), 170.8 (CON_{Lys5}), 170.3 (CON_{Phe3}), 170.0 (CON_{Thr6}), 169.6 (CON_{Cys7}), 168.6 (CON_{Cys2}), 167.1 (CON_{Cp}) 138.0 (C_γ, Phe1), 136.4 (C_γ, Phe3), 135.8 (C_{ε2}, Trp4), 129.0 (C_δ, Phe1), 128.6 (C_δ, Phe3), 127.7 (C_ε, Phe1), 127.6 (C_ε, Phe3), 126.9 (C_{δ3}, Trp4), 126.0 (C_ζ, Phe1), 125.9 (C_ζ, Phe3), 123.3 (C_{δ1}, Trp4), 120.6 (C_{η2}, Trp4), 117.9 (C_{ζ3}, Trp4), 117.8 (C_{ε3}, Trp4), 111.0 (C_{ζ2}, Trp4), 108.8 (C_γ, Trp4), 71.5 (C_{Cp3,4}), 71.0 (C_{Cp'}), 70.2 (C_{Cp5}), 69.2 (C_{Cp2}), 67.4 (C_β, Thr8), 67.0 (C_β, Thr6), 58.1 (C_α, Thr8), 57.7 (C_α, Thr6), 54.9 (C_α, Trp4), 53.5 (C_α, Phe3), 53.2 (C_α, Phe1), 52.2 (C_α, Lys5), 52.1 (C_α, Cys2), 51.6 (C_α, Cys7), 44.9 (C_β, Cys7), 44.1 (C_β, Cys2), 38.5 (C_β, Phe3), 38.3 (C_ε, Lys5), 38.0 (C_β, Phe1), 30.2 (C_β, Lys5), 26.2 (C_δ, Lys5), 25.8 (C_β, Trp4), 21.7 (C_γ, Lys5), 20.1 (C_γ, Thr6), 20.0 (C_γ, Thr8).

**11**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	85 % TFA 5% Phenol 5% TIS	1.5 h	17.2 mg 19%

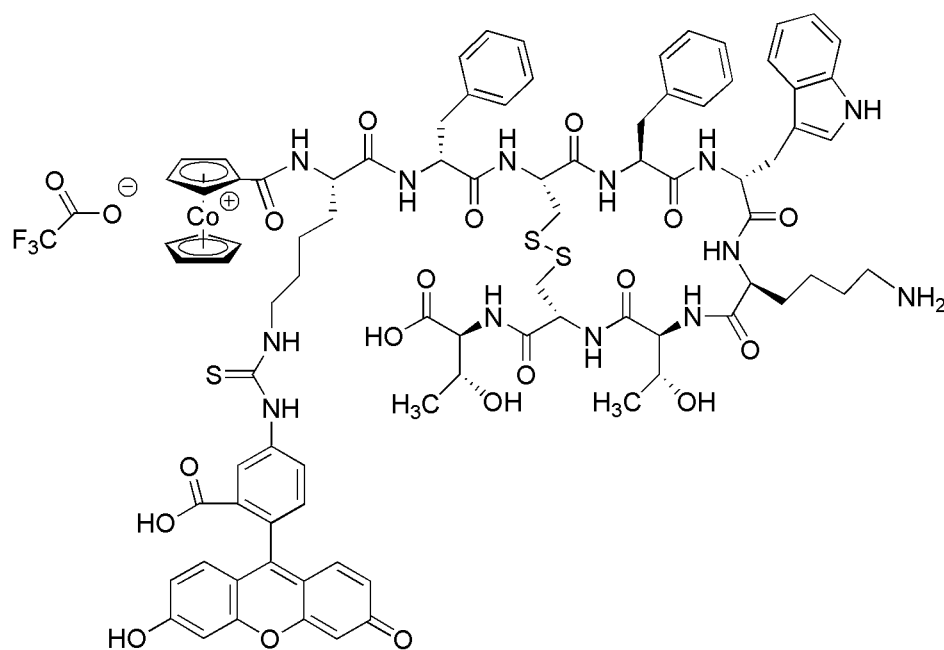
11: C₈₇H₉₅N₁₃O₁₈RuS₃ (1807.51 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1807.9 [M+H]⁺, 904.7 [M+2H]²⁺. R_t = 17.7 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**12**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	1.5 h	11.2 mg 16%

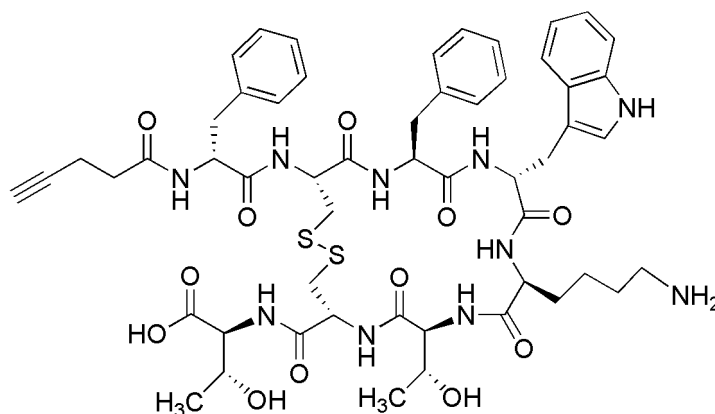
12: C₆₂H₇₂CoF₃N₁₀O₁₄S₂ (1360.40 g/mol); C₆₀H₇₂CoN₁₀O₁₂S₂⁺ (1247.41 g/mol): MS (ESI, pos.): *m/z* 1248.3 [M+H]⁺. R_t = 15.0 Minuten (analytische HPLC; Methode B). CV: E_{1/2} = -1.18 V in DMSO. ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.13 MHz): δ = 12.92 (1H, br, H_{COOH}, Thr8), 10.77 (s, 1H, H_{ε1}, Trp4), 9.09 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H_{NH}, Cys2), 8.73 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H_{NH}, Trp4), 8.59 (m, 1H, H_{NH}, Phe1), 8.51 (m, 1H, H_{NH}, Cys7), 8.50 (m, 1H, H_{NH}, Phe1), 8.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{NH}, Lys5), 8.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{NH}, Thr8), 7.61 (br, 3H, H_ζ, Lys5), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H_{NH}, Thr6), 7.46 (m, 2H, H_δ, Phe1), 7.45 (m, 1H, H_{ε3}, Trp4), 7.35 (m, 2H, H_ε, Phe1), 7.33 (m, 1H, H_{ζ2}, Trp4), 7.21 (m, 1H, H_ζ, Phe1), 7.12 (m, 3H, 2H_ε, Phe3, 1H_ζ, Phe3), 7.07 (m, 1H, H_{η2}, Trp4), 7.05 (m, 2H, H_δ, Phe3), 6.99 (m, 1H, H_{ζ3}, Trp4), 6.97 (m, 1H, H_{δ1}, Trp4), 6.26 (m, 1H, H_{Cp2}), 6.21 (m, 1H, H_{Cp5}), 5.89 (m, 2H, H_{Cp3,4}), 5.48 (s, 5H, H_{Cp'}), 5.25 (m, 2H, 1H_α, Cys7, 1H_α, Cys2), 5.14 (m, 1H, H_α, Phe1), 4.81 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, H_{γ1}, Thr6), 4.64 (m, 1H, H_α, Phe3), 4.52 (m, 1H, H_α, Thr6), 4.28 (m, 2H, 1H_β, Thr8, 1H_α, Thr8), 4.24 (m, 1H, H_α, Trp4), 4.09 (m, 1H, H_{γ1}, Thr8), 4.02 (m, 1H, H_α, Lys5), 3.97 (m, 1H, H_β, Thr6), 3.32 (m, 1H, H_{β2}, Phe1), 2.98 (m, 1H, H_{β2}, Trp4), 2.94 (m, 1H, H_{β3}, Phe1), 2.90 (m, 2H, 1H_{β2}, Cys2, 1H_{β2}, Cys7), 2.85 (m, 2H, 1H_{β3}, Cys2, 1H_{β3}, Cys7), 2.83 (m, 2H, H_β, Phe3), 2.76 (m, 1H, H_{β3}, Trp4), 2.59 (m, 2H, H_ε, Lys5), 1.75 (m, 1H, H_{β2}, Lys5), 1.34 (m, 1H, H_{β3}, Lys5), 1.32 (m, 2H, H_δ, Lys5), 1.09 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, H_{γ2}, Thr8), 1.06 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H_{γ2}, Thr6), 0.83 (2H, m, H_γ, Lys5). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.92 MHz): δ = 171.9 (CON_{Trp4}),

171.8 (COO_{Thr8}), 171.6 (CON_{Phe1}), 170.9 (CON_{Lys5}), 170.5 (CON_{Phe3}), 170.2 (CON_{Thr6}), 169.7 (CON_{Cys7}), 168.7 (CON_{Cys2}), 137.8 (C_γ, Phe1), 136.6 (C_γ, Phe3), 135.9 (C_{ε2}, Trp4), 129.0 (C_δ, Phe1), 128.6 (C_δ, Phe3), 127.9 (C_ε, Phe1), 127.7 (C_ε, Phe3), 126.7 (C_{δ2}, Trp4), 126.2 (C_ζ, Phe1), 126.0 (C_ζ, Phe3), 123.2 (C_{δ1}, Trp4), 120.5 (C_{η2}, Trp4), 117.8 (C_{ζ3}, Trp4, C_{ε3}, Trp4), 110.9 (C_{ζ2}, Trp4), 108.8 (C_γ, Trp4), 85.5 (C_{Cp3,4}), 85.3 (C_{Cp'}), 84.2 (C_{Cp5}), 82.4 (C_{Cp2}), 66.8 (C_β, Thr6), 66.2 (C_β, Thr8), 57.8 (C_α, Thr6, C_α, Thr8), 54.9 (C_α, Trp4), 53.6 (C_α, Phe1), 53.4 (C_α, Phe3), 52.3 (C_α, Lys5), 52.0 (C_α, Cys2, C_α, Cys7), 44.6 (C_β, Cys7), 44.4 (C_β, Cys2), 38.3 (C_β, Phe3, C_ε, Lys5, C_β, Phe1), 30.0 (C_β, Lys5), 26.0 (C_δ, Lys5, C_β, Trp4), 21.6 (C_γ, Lys5), 19.6 (C_γ, Thr8), 18.9 (C_γ, Thr6).

**13**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	1.5 h	9.7 mg 10%

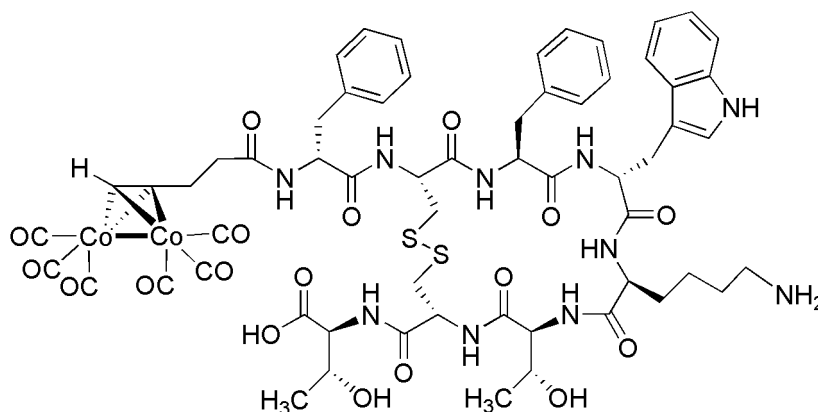
13: C₈₉H₉₅CoF₃N₁₃O₂₀S₃ (1877.53 g/mol); C₈₇H₉₅CoN₁₃O₁₈S₃⁺ (1764.54 g/mol): MS (MALDI-TOF; Sinap.): *m/z* 1765.7 [M+H]⁺. R_t = 16.1 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**14**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.1	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	1.5 h	99.0 mg 89%

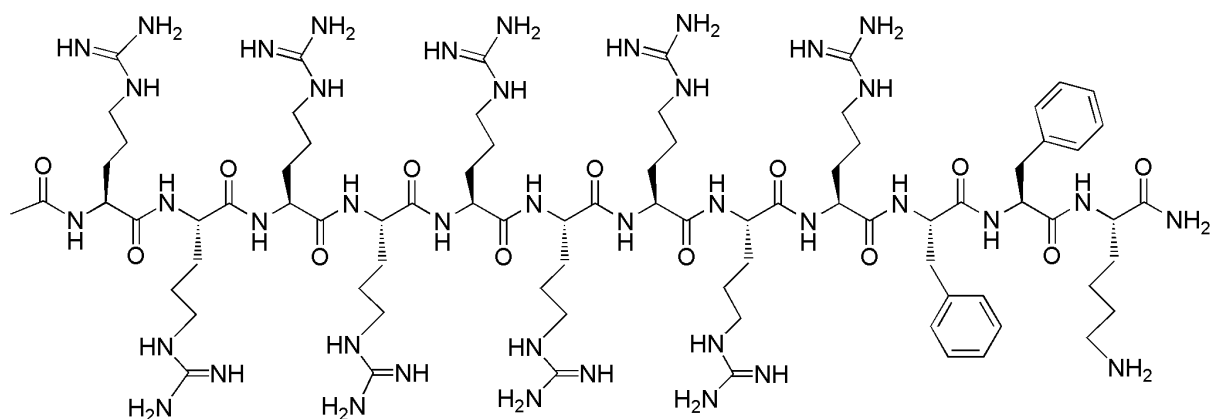
14: C₅₄H₆₈N₁₀O₁₂S₂ (1112.45 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1113.3 [M+H]⁺. R_t = 15.6 Minuten (analytische HPLC, Methode B). IR (cm⁻¹): 1638 (br, s) ν_{CONH} . ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400.13 MHz): δ = 12.72 (br, 1H, H_{Thr1}, COOH), 10.77 (s, 1H, H_{Trp4}), 9.01 (d, J = 9.4 Hz, 1H, H_{NH, Cys2}), 8.75 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H_{NH, Trp4}), 8.56 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_{NH, Phe3}), 8.51 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_{NH, Cys7}), 8.41 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{NH, Lys5}), 8.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H_{NH, Thr8}), 7.81 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_{NH, Phe1}), 7.60 (br, 3H, H_{ζ, Lys5}), 7.54 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H_{NH, Thr6}), 7.45 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_{ε3, Trp4}), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H_{ζ2, Trp4}), 7.27 (m, 2H, H_{δ, Phe1}), 7.24 (m, 2H, H_{ε, Phe1}), 7.17 (m, 1H, H_{ζ2, Phe1}), 7.15 (m, 1H, H_{ζ2, Phe3}), 7.14 (m, 2H, H_{ε, Phe3}), 7.07 (m, 3H, 1H_{η2, Trp4}, 2H_{δ, Phe3}), 6.99 (m, 1H, H_{ζ3, Trp4}), 6.97 (m, 1H, H_{δ1, Trp4}), 5.42 (m, 1H, H_{α, Cys7}), 5.33 (m, 1H, H_{α, Cys2}), 4.84 (m, 2H, 1H_{α, Phe1}, 1H_{γ1, Thr6}), 4.64 (m, 1H, H_{α, Phe3}), 4.58 (m, 1H, H_{α, Thr6}), 4.33 (m, 1H, H_{β, Thr8}), 4.31 (m, 1H, H_{γ1, Thr8}), 4.26 (m, 1H, H_{α, Thr8}), 4.25 (m, 1H, H_{α, Trp4}), 4.05 (m, 1H, H_{α, Lys5}), 3.95 (m, 1H, H_{β, Thr6}), 3.15 (m, 1H, 1H_{β2, Phe1}), 3.02 (m, 1H, H_{β2, Trp4}), 2.87 (m, 4H, 2H_{β, Phe3}, 2H_{β, Cys7}), 2.80 (m, 2H, H_{β, Cys2}), 2.74 (m, 1H, H_{β3, Trp4}), 2.72 (m, 1H, H_{β3, Phe1}), 2.66 (s, 1H, C≡CH), 2.58 (m, 2H, H_{ε, Lys5}), 2.24-2.20 (m, 2H, CO-CH₂), 2.18 (m, 2H, CH₂C≡CH), 1.76 (m, 1H, H_{β2, Lys5}), 1.34 (m, 2H, H_{δ, Lys5}), 1.31 (m, 1H, H_{β3, Lys5}), 1.20 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H_{γ2, Thr8}), 1.06 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H_{γ2, Thr6}), 0.83 (m, 2H, H_{γ, Lys5}). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.62 MHz): δ = 172.7, 171.9, 171.8, 170.9,

170.64, 170.4, 169.9, 169.6, 168.9 (COO, CON), 137.6 (C_{γ} , Phe1), 136.3 (C_{γ} , Phe3), 136.1 ($C_{\epsilon 2}$, Trp4), 129.0 (C_{δ} , Phe1), 128.8 (C_{δ} , Phe3), 127.9 (C_{ϵ} , Phe1), 127.8 (C_{ϵ} , Phe3), 126.9 ($C_{\delta 2}$, Trp4), 126.2 (C_{ζ} , Phe3), 126.1 (C_{ζ} , Phe1), 123.4 ($C_{\delta 1}$, Trp4), 120.7 ($C_{\eta 2}$, Trp4), 118.1 ($C_{\zeta 3}$, Trp4), 117.9 ($C_{\epsilon 3}$, Trp4), 111.1 ($C_{\zeta 2}$, Trp4), 109.2 (C_{γ} , Trp4), 83.6 ($C\equiv CH$), 71.2 ($C\equiv CH$), 67.1 (C_{β} , Thr6), 65.9 (C_{β} , Thr8), 57.9 (C_{α} , Thr8), 57.7 (C_{α} , Thr6), 54.9 (C_{α} , Trp4), 53.5 (C_{α} , Phe3), 53.1 (C_{α} , Phe1), 52.2 (C_{α} , Cys2), 52.1 (C_{α} , Lys5), 51.8 (C_{α} , Cys7), 45.4 (C_{β} , Cys2), 44.3 (C_{β} , Cys7), 38.6 (C_{β} , Phe1), 38.4 (C_{β} , Phe3), 38.2 (C_{ϵ} , Lys5), 33.8 (CO-CH₂), 30.1 (C_{β} , Lys5), 26.2 (C_{δ} , Lys5), 25.6 (C_{β} , Trp4), 21.8 (C_{γ} , Lys5) 20.0 (C_{γ} , Thr8), 19.3 (C_{γ} , Thr6), 13.9 (CH₂C $\equiv$ CH).

**15**

Die Synthese erfolgte unter Schlenkbedingungen mit getrocknetem THF. In einem Schlenkkolben wurden 24.0 mg (0.022 mmol) von **14** in 2.5 ml THF belöst. Über ein Septum wurde mit einer Spritze langsam 0.25 ml (0.022 mmol) einer Lösung von 71 mg $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ in 2.4 ml THF unter Rühren langsam zugetropft. Dabei änderte sich die Farbe von gelblich zu rotbraun. Die vollständige Umsetzung von **14** mit $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ wurde mittels HPLC beobachtet. Die Verbindung **14** hatte sich nach vier Stunden komplett mit $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ zu **15** umgesetzt. Die Lösung wurde filtriert und das Filtrat im Stickstoffstrom getrocknet. Das Produkt ist ein rotbrauner Feststoff. Die Ausbeute betrug 22.6 mg (73%).

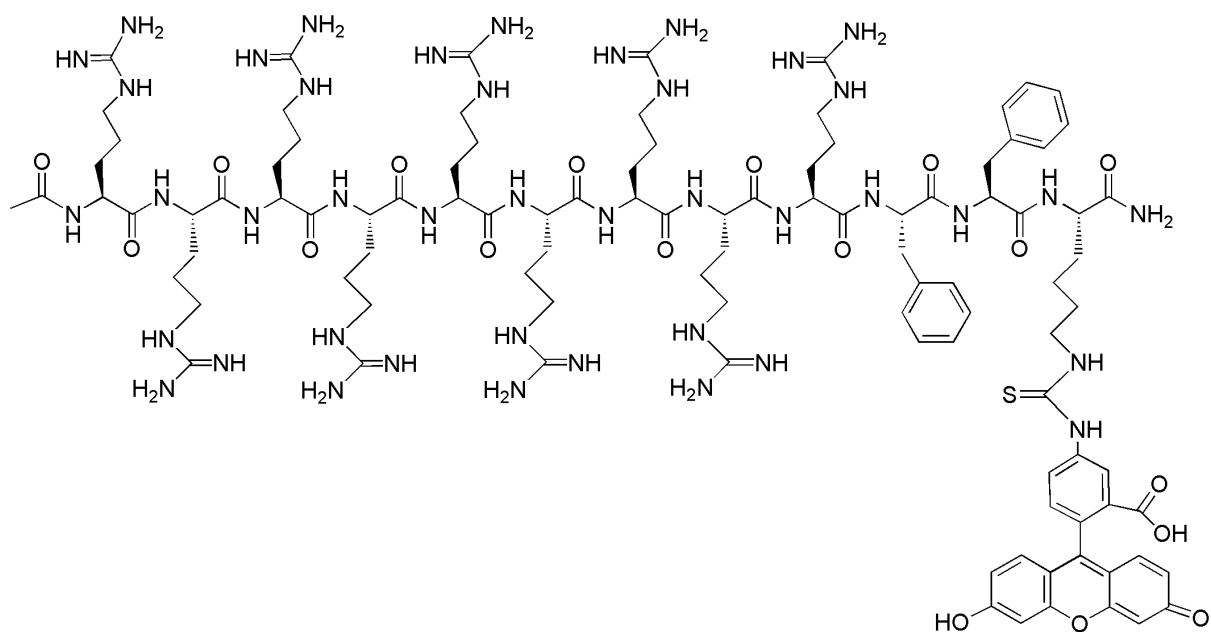
15: $\text{C}_{60}\text{H}_{68}\text{Co}_2\text{N}_{10}\text{O}_{18}\text{S}_2$ (1398.25 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1399.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1344.9 $[\text{M}+\text{H}-2\text{CO}]^+$, 1233.5 $[\text{M}+3\text{H}-6\text{CO}]^+$, 1172.6 $[\text{M}+\text{H}-\text{Co}-6\text{CO}]^+$, 1114.4 $[\text{M}+2\text{H}-2\text{Co}-6\text{CO}]^+$, 554.5 $[\text{M}+4\text{H}-2\text{Co}-6\text{CO}]^{2+}$. R_t = 20.5 Minuten (analytische HPLC, Methode B). IR (cm^{-1}): 2092, 2050, 2017 (br, s) $\nu_{\text{C}\equiv\text{O}}$, 1649 (br, s,) ν_{CONH} .

**16**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	6 h	160.4 mg 85%

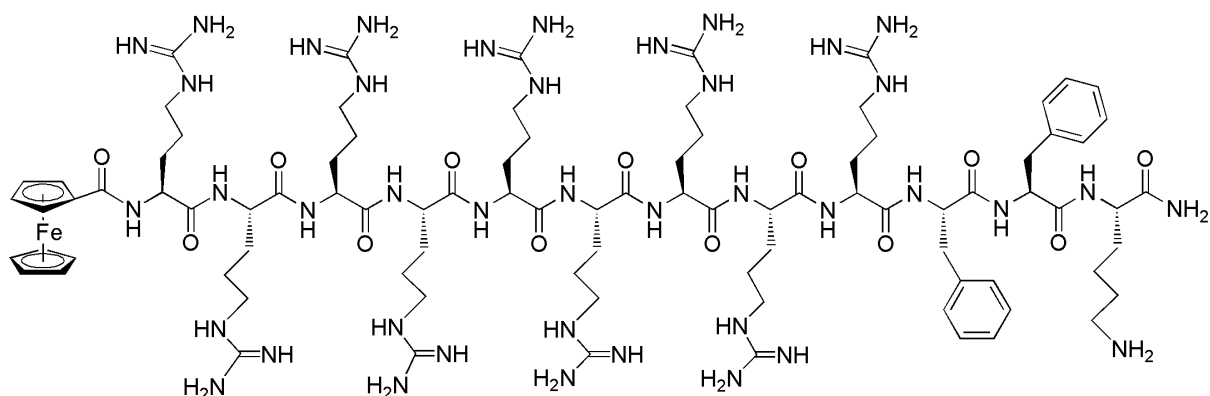
16: C₈₀H₁₄₃N₄₁O₁₃ (1887.26 g/mol): MS (MALDI-TOF): m/z 1888.0 [M+H]⁺, 1910.0 [M+Na]⁺. R_t = 10.5 Minuten (analytische HPLC, Methode B). ¹H-NMR (90% H₂O:10% D₂O, 600.13 MHz): δ = 8.49-8.42 (m, 6H, H_{NH}, Arg), 8.37-8.33 (m, 4H, H_{NH}, Arg), 8.33 (m, 1H, H_{NH}, Phe₁), 8.23 (m, 1H, H_{NH}, Lys), 8.21 (m, 1H, H_{NH}, Phe₂), 7.57 (br, 3H, H_ζ, Lys), 7.39 (m, 2H, H_{Aromat}, Phe_A), 7.38 (m, 2H, H_{Aromat}, Phe_B), 7.35 (m, 2H, 1H_{Aromat}, Phe_A, 1H_{Aromat}, Phe_B), 7.28 (m, 2H, H_{Aromat}, Phe_A), 7.27 (m, 2H, H_{Aromat}, Phe_B), 6.71 (br, 36H, H_η, Arg), 4.65 (m, 1H, H_α, Phe₁), 4.63 (m, 1H, H_α, Phe₂), 4.39-4.28 (m, 9H, H_α, Arg), 4.20 (m, 1H, H_α, Lys), 3.29-3.14 (m, 18H, H_δ, Arg), 3.11 (m, 1H, H_{β2}, Phe₁), 3.10 (m, 1H, H_{β2}, Phe₂), 3.06 (m, 1H, H_{ε2}, Lys), 3.04 (m, 1H, H_{ε3}, Lys), 3.03 (m, 1H, H_{β3}, Phe₁), 3.01 (m, 1H, H_{β3}, Phe₂), 2.10 (s, 3H, H_{Acetyl}), 1.90-1.84 (m, 9H, H_{β2}, Arg), 1.89-1.45 (m, 18H, H_γ, Arg), 1.83-1.75 (m, 9H, H_{β3}, Arg), 1.82 (m, 1H, H_{β2}, Lys), 1.74 (m, 1H, H_{γ2}, Lys), 1.72 (m, 1H, H_{β3}, Lys), 1.71 (m, 1H, H_{γ3}, Lys), 1.43 (m, 1H, H_{γ2}, Lys), 1.40 (m, 1H, H_{γ3}, Lys). ¹³C-NMR (90% H₂O:10% D₂O, 150.92 MHz): δ = 182.6, 175.9, 174.6, 174.3, 173.6, 173.5, 173.4, 173.3, 173.1, 172.7, 172.2, 172.1 (CON), 136.2, 136.1 (C_γ, Phe₁, C_γ, Phe₂), 129.3, 129.2, 128.8, 128.7 (C_δ, Phe₁, C_δ, Phe₂, C_ε, Phe₁, C_ε, Phe₂), 127.2, 127.1 (C_ζ, Phe₁, C_ζ, Phe₂), 54.8 (C_α, Phe₁, C_α, Phe₂), 54.6-53.1 (C_α, Arg), 53.5 (C_α, Lys), 40.9-40.7 (C_δ, Arg), 39.5 (C_ε, Lys), 37.5 (C_β, Phe_A, C_β, Phe_B), 30.5 (C_β, Lys), 28.5-27.6 (C_β, Arg), 26.6 (C_δ, Lys), 24.9-24.1 (C_γ, Arg), 22.1 (C_γ, Lys).

Die Phenylalanin-Signale lassen sich nicht eindeutig Phe¹⁰ oder Phe¹¹ zuordnen, sondern nur in die Gruppen Phe1 und Phe2 oder PheA oder PheB (für den aromatischen Bereich) einordnen.

**17**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	6 h	25.1 mg 22%

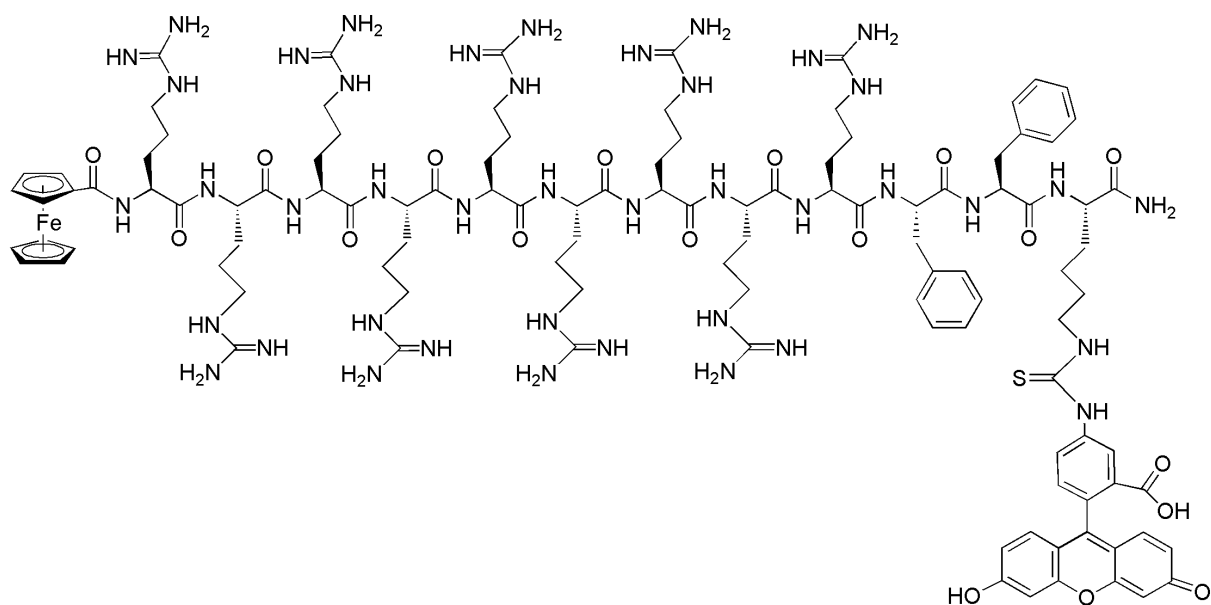
17: C₁₀₁H₁₅₄N₄₂O₁₈S (2275.21 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 2282.7 [M]⁺ (*); MS (ESI, pos.): m/z 1138.8 [M+2H]²⁺, 944.4 [M-FITC+3H]²⁺, 759.6 [M+3H]³⁺, 629.9 [M-FITC+4H]³⁺. R_t = 13.1 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**18**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	6 h	82.2 mg 40%

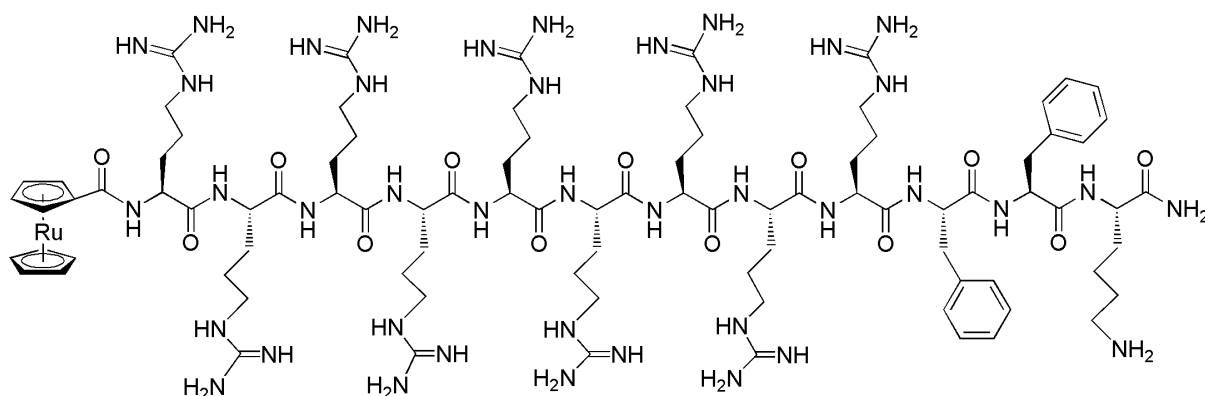
18: C₈₉H₁₄₉FeN₄₁O₁₃ (2056.16 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1029.4 [M+2H]²⁺, 686.8 [M+3H]³⁺, 515.6 [M+4H]⁴⁺, 412.9 [M+5H]⁵⁺, 344.4 [M+6H]⁶⁺. R_t = 11.4 Minuten (analytische HPLC, Methode B). ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.13 MHz): δ = 8.32 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H_{NH}, Phe1), 8.07 (m, 7H, 1H_{NH}, Lys, 6H_{NH}, Arg), 8.02 (m, 2H, 1H_{NH}, Arg, 1H_{NH}, Phe2), 7.97 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_{NH}, Arg), 7.92 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H_{NH}, Arg), 7.80-7.60 (m, 12H, 9H_ε, Arg, 3H_ζ, Lys), 7.60-6.80 (m, 46H, 36H_η, Arg, 10H_{Aromat}, Phe1, Phe2), 4.89 (m, 1H, H_{Cp2}), 4.87 (m, 1H, H_{Cp5}), 4.57 (m, 2H, 1H_α, Phe1, 1H_α, Phe2), 4.42 (m, 2H, H_{Cp3,4}), 4.42-4.17 (m, 9H, H_α, Arg), 4.23 (s, 5H, H_{Cp'}), 4.20 (m, 1H, H_α, Lys), 3.22-3.00 (m, 18H, H_δ, Arg), 3.08 (m, 1H, H_{β2}, Phe1), 3.03 (m, 1H, H_{β2}, Phe2), 2.88 (m, 1H, H_{β3}, Phe1), 2.79 (m, 2H, H_ε, Lys), 2.77 (m, 1H, H_{β3}, Phe2), 1.84-1.62 (m, 9H, H_{β2}, Arg), 1.71 (m, 1H, H_{β2}, Lys), 1.62-1.40 (m, 9H, H_{β3}, Arg), 1.57 (m, 2H, H_δ, Lys), 1.56 (m, 1H, H_{β3}, Lys), 1.33 (m, 2H, H_γ, Lys). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.92 MHz): δ = 174.1, 173.0, 172.3, 172.0, 171.8, 171.6, 171.0, 170.7 (CON), 130.1, 130.0, 129.0, 128.8 (C_δ, Phe1, C_δ, Phe2, C_ζ, Phe1, C_ζ, Phe2), 127.2, 121.4 (C_ε, Phe1, C_ε, Phe2), 70.8 (C_{Cp3,4}), 69.9 (C_{Cp'}), 69.9 (C_{Cp2,5}), 54.4 (C_α, Phe1, Phe2), 53.6-52.7 (C_α, Arg), 52.9 (C_α, Lys), 41.1 (C_δ, Arg), 39.3 (C_ε, Lys), 38.3 (C_β, Phe2), 38.1 (C_β, Phe1), 32.2 (C_β, Lys), 29.8 (C_β, Arg), 27.4 (C_δ, Lys), 25.6 (C_γ, Arg), 22.8 (C_γ, Lys).

Die Phenylalanin-Signale lassen sich nicht eindeutig Phe¹⁰ oder Phe¹¹ zuordnen, sondern nur in die Gruppen Phe1 und Phe2 oder PheA oder PheB (für den aromatischen Bereich) einordnen.

**19**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	6 h	25.7 mg 21%

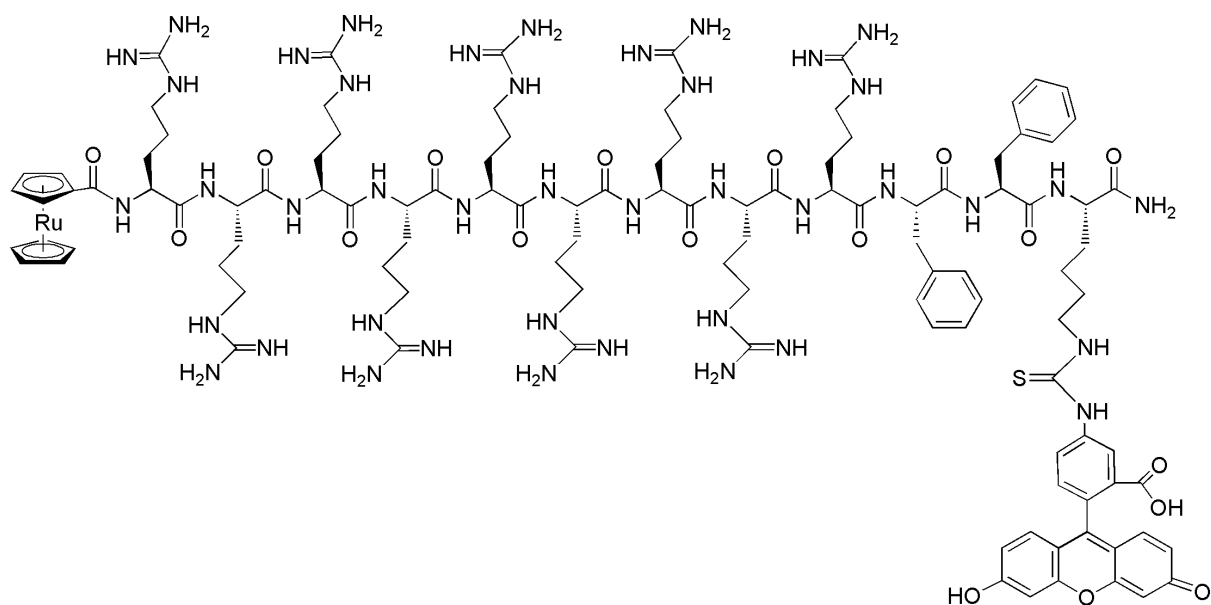
19: C₁₁₀H₁₆₀FeN₄₂O₁₈S (2445.20 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 2447.1 [M+H]⁺; MS (ESI, pos.): m/z 1223.8 [M+2H]²⁺, 1029.4 [M-FITC+2H]²⁺, 816.8 [M+3H]³⁺, 686.6 [M-FITC+3H]³⁺. R_t = 14.8 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**20**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	6 h	160.4 mg 76%

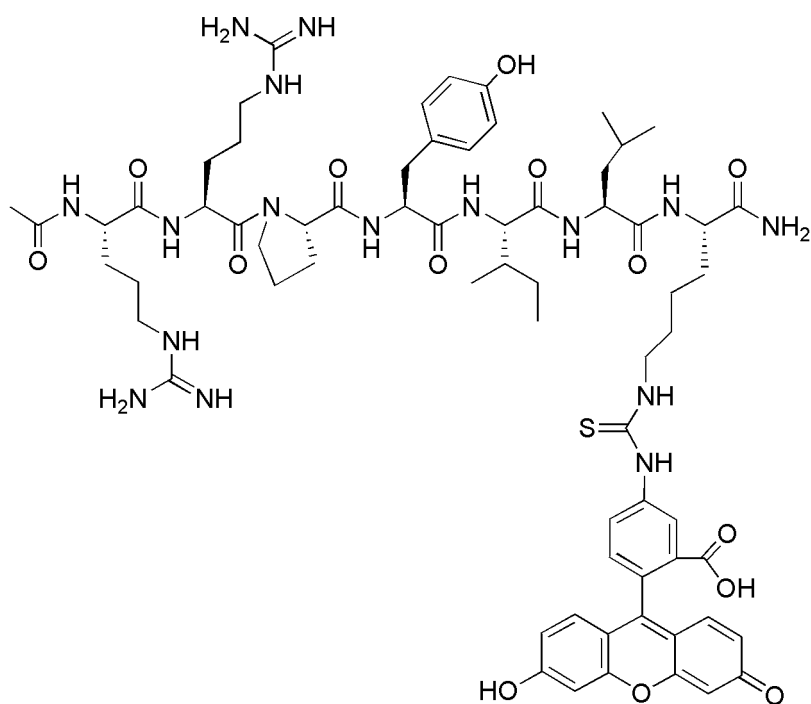
20: C₈₉H₁₄₉N₄₁O₁₃Ru (2102.0 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 2103.1 [M+H]⁺. R_t = 12.8 Minuten (analytische HPLC, Methode B). ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400.13 MHz): δ = 8.27 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H_{NH}, Phe₁), 8.16-8.11 (m, 2H, H_{NH}, Arg), 8.06 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_{NH}, Lys), 8.00-7.90 (m, 3H, H_{NH}, Arg), 7.98 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H_{NH}, Phe₂), 7.88-7.72 (m, 4H, H_{NH}, Arg), 7.85-7.72 (m, 12H, 9H _{ϵ} , Arg, 3H _{ζ} , Lys), 7.55-7.02 (m, 46H, 36H _{η} Arg, 4H _{δ} , Phe, 4H _{ϵ} , Phe, 2H _{ζ} , Phe), 5.23 (m, 1H, H_{Cp2}), 5.20 (m, 1H, H_{Cp5}), 4.70 (m, 2H, H_{Cp3,4}), 4.58 (s, 5H, H_{Cp'}), 4.52 (m, 1H, H _{α} , Phe₁), 4.50 (m, 1H, H _{α} , Phe₂), 4.33-4.14 (m, 9H, H _{α} , Arg), 4.16 (m, 1H, H _{α} , Lys), 3.15-2.69 (m, 18H, H _{δ} , Arg), 3.04 (m, 1H, H _{β 2}, Phe₁), 2.98 (m, 1H, H _{β 2}, Phe₂), 2.84 (m, 1H, H _{β 3}, Phe₁), 2.75 (m, 2H, H _{ϵ} , Lys), 2.72 (m, 1H, H _{β 3}, Phe₂), 1.69-1.58 (m, 18H, H _{β} , Arg), 1.67 (m, 2H, H _{β} , Lys), 1.57-1.33 (m, 18H, H _{γ} , Arg), 1.52 (m, 2H, H _{δ} , Lys), 1.29 (m, 2H, H _{γ} , Lys). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.62 MHz): δ = 173.3, 171.8, 171.7, 171.5, 171.4, 171.3, 171.1, 170.9, 170.7, 168.5 (CON), 137.6, 137.5 (C _{γ} , Phe₁, C _{γ} , Phe₂), 129.3, 128.8, 128.1, 128.0, 123.1, 120.6 (C _{δ} , Phe₁, C _{δ} , Phe₂, C _{ϵ} , Phe₁, C _{ϵ} , Phe₂, C _{ζ} , Phe₁, C _{ζ} , Phe₂), 72.1 (C_{Cp3,4}), 71.6 (C_{Cp'}), 70.5 (C_{Cp5}), 70.3 (C_{Cp2}), 54.1, 53.6 (C _{α} , Phe₁, C _{α} , Phe₂), 52.6-51.9 (C _{α} , Arg), 52.1 (C _{α} , Lys), 41.7-38.7 (C _{δ} , Arg), 38.4 (C _{ϵ} , Lys), 37.6 (C _{β} , Phe₂), 37.5 (C _{β} , Phe₁), 31.4 (C _{β} , Lys), 31.3 (C _{δ} , Lys), 29.4-28.3 (C _{β} , Arg), 25.3, 25.0-24.8 (C _{γ} , Arg), 22.0 (C _{γ} , Lys).

Die Phenylalanin-Signale lassen sich nicht eindeutig Phe¹⁰ oder Phe¹¹ zuordnen, sondern nur in die Gruppen Phe1 und Phe2 einordnen.

**21**

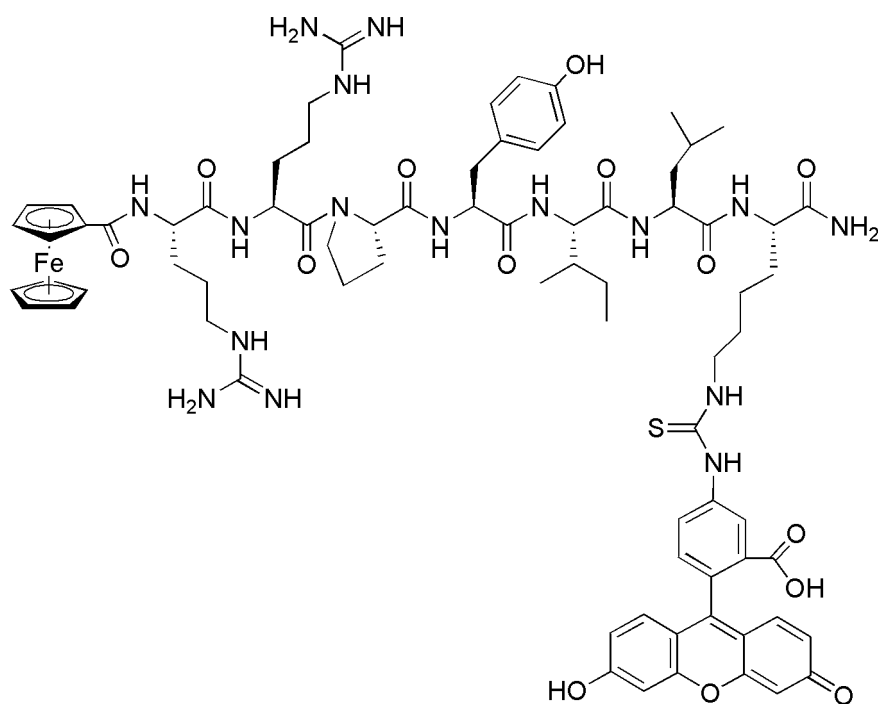
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5% H ₂ O 2.5% TIS	6 h	32.4 mg 26%

21: C₁₁₀H₁₆₀N₄₂O₁₈RuS (2491.17 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 831.5 [M+3H]³⁺, 701.7 [M-FITC+4H]³⁺, 390.0 [FITC+H]⁺. R_t = 14.9 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**22**

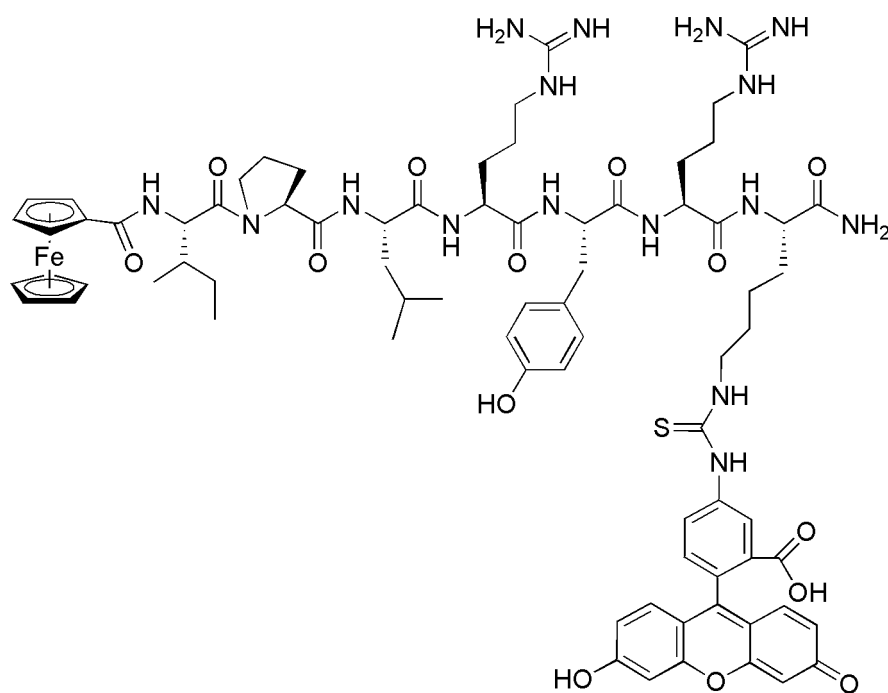
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5 % H ₂ O 2.5% TIS	4 h	24.8 mg 36%

22: C₆₇H₉₀N₁₆O₁₄S (1374.65 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1375.4 [M+H]⁺, 688.3 [M+2H]²⁺, 459.2 [M+3H]³⁺. R_t = 14.2 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**23**

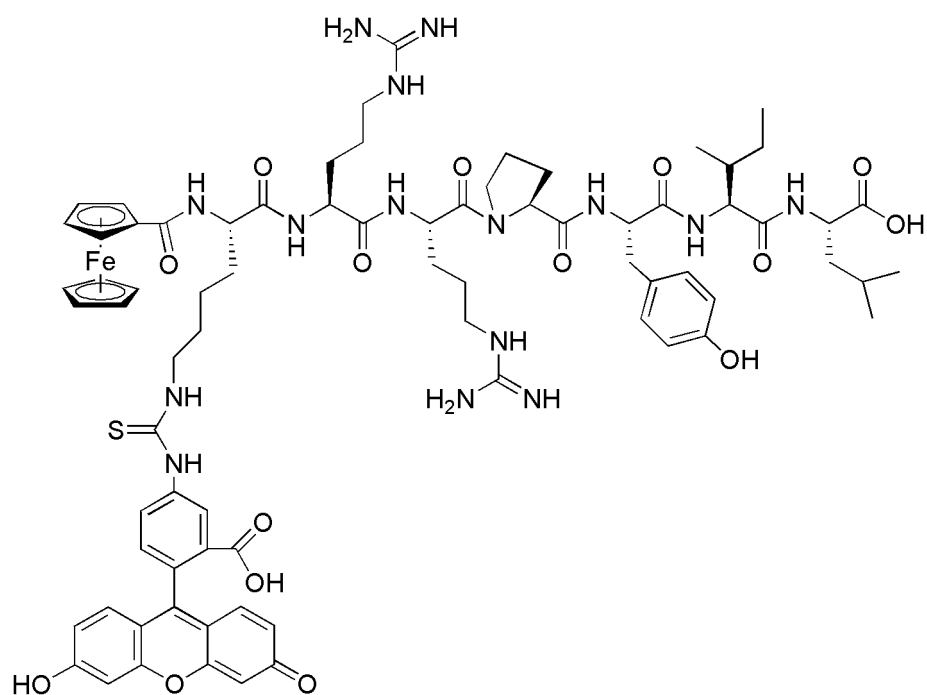
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	13.1 mg 17%

23: C₇₆H₉₆FeN₁₆O₁₄S (1544.64 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 1547.9 [M]⁺ (*); MS (ESI, pos.): m/z 1545.2 [M+H]⁺, 773.5 [M+2H]²⁺. R_t = 15.5 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**24**

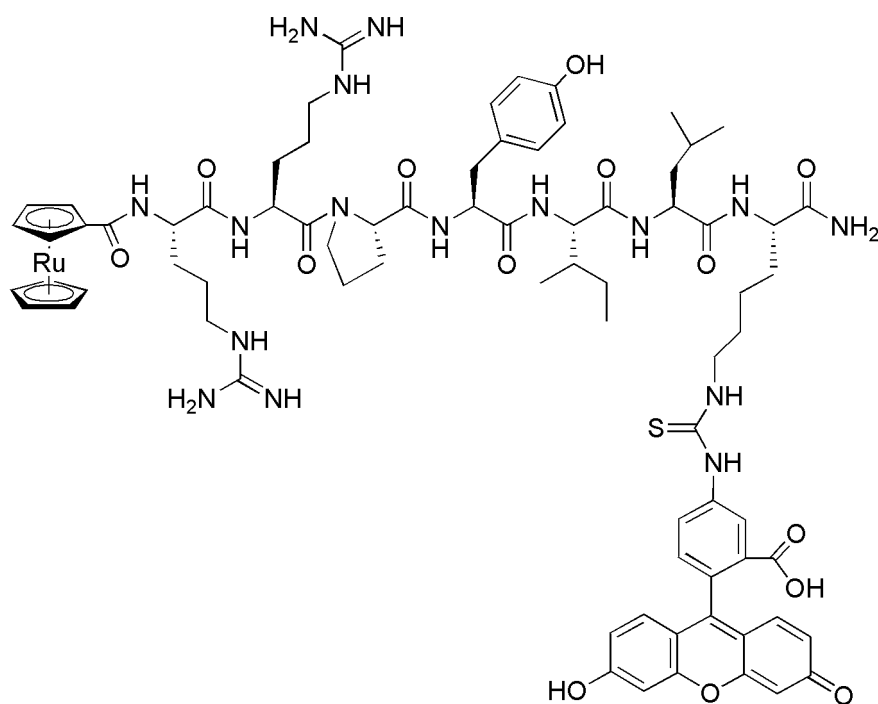
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	11.6 mg 15%

24: C₇₆H₉₆FeN₁₆O₁₄S (1544.64 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 1549.1 [M]⁺ (*); MS (ESI, pos.): m/z 1545.2 [M+H]⁺, 773.5 [M+2H]²⁺. R_t = 16.6 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**25**

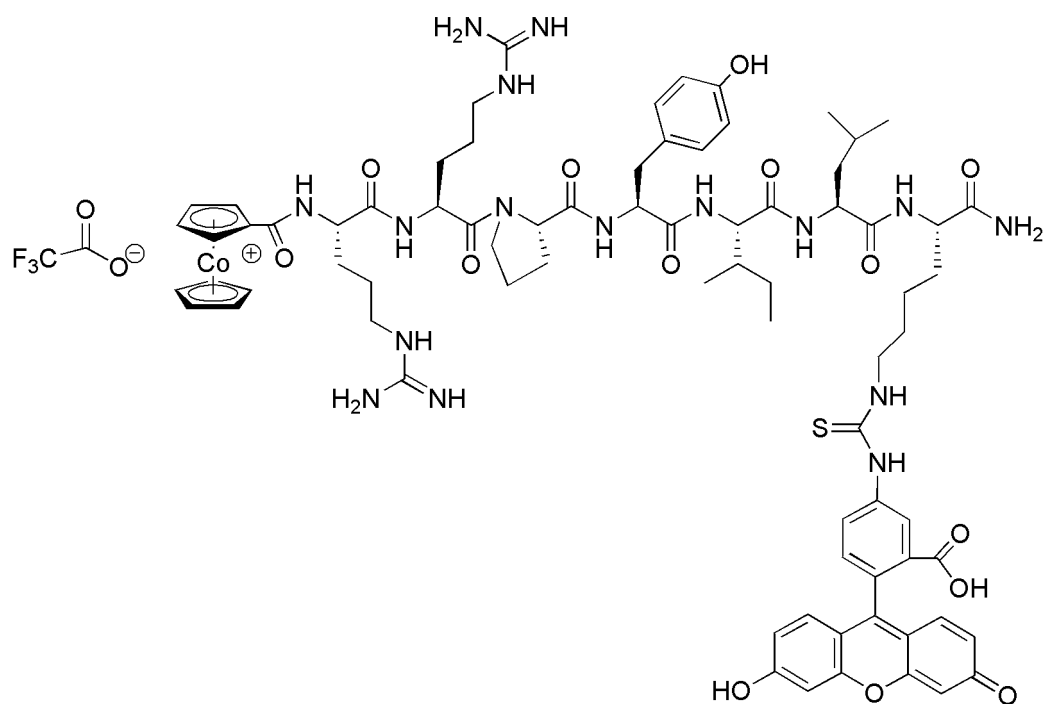
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	13.9 mg 18%

25: C₇₆H₉₅FeN₁₅O₁₅S (1545.62 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1547.0 [M+H]⁺, 774.0 [M+2H]²⁺, 516.2 [M+3H]³⁺. R_t = 16.6 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**26**

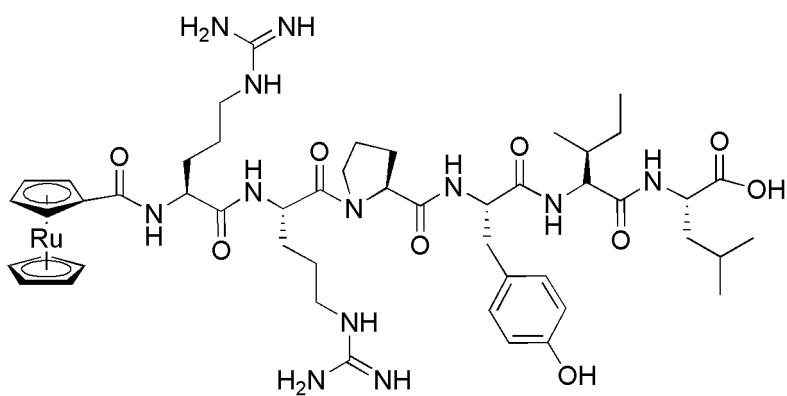
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	15.9 mg 20%

26: C₇₆H₉₆FeN₁₆O₁₄RuS (1590.61 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1591.0 [M+H]⁺, 796.2 [M+2H]²⁺. R_t = 16.1 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**27**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5 % H ₂ O 2.5% TIS	4 h	8.5 mg 10%

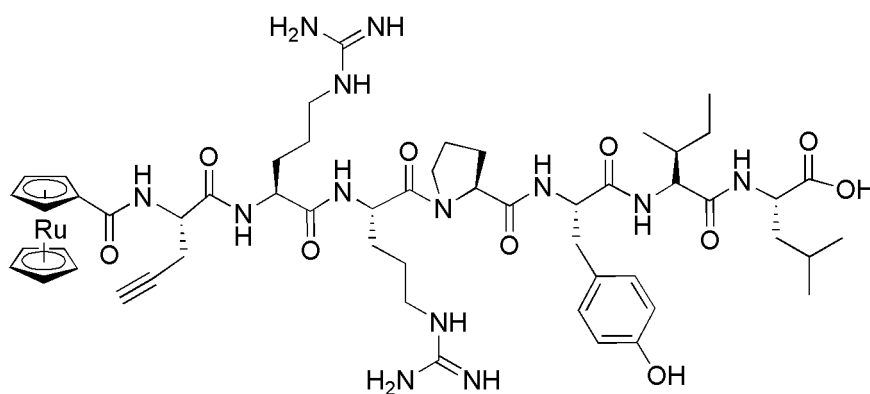
27: C₇₈H₉₆CoF₃N₁₆O₁₆S (1660.62 g/mol); C₇₆H₉₆CoN₁₆O₁₄S⁺ (1547.63 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): *m/z* 1549.8 [M]⁺. R_t = 14.8 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**28**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.1	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	92.4 mg 86%

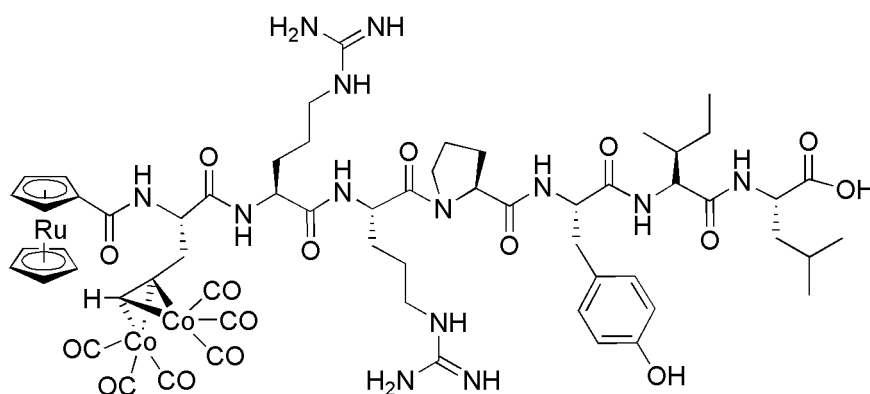
28: C₄₉H₇₂N₁₂O₉Ru (1074.46 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1075.1 [M+H]⁺, 538.1 [M+2H]²⁺.

R_t = 14.1 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**29**

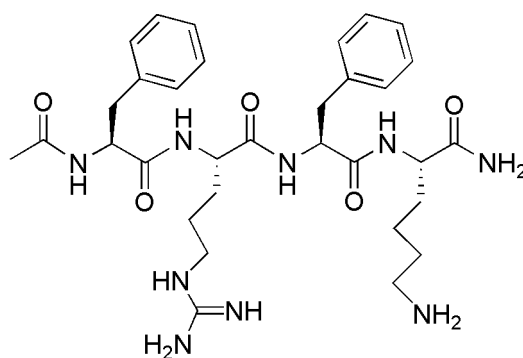
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Wang	0.68	0.05	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	53.8 mg 92%

29: C₅₄H₇₇N₁₃O₁₀Ru (1169.5 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1170.3 [M+H]⁺, 585.7 [M+2H]²⁺. R_t = 14.6 Minuten (analytische HPLC, Methode B). IR (cm⁻¹): 1650 (br, s) ν_{CONH} . ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400.13 MHz): δ = 12.35 (br, 1H, H_{COOH}, Leu6), 9.16 (s, 1H, H_N, Tyr4), 8.14 (m, 1H, H_{NH}, Leu6), 8.13 (m, 1H, H_{NH}, ArgA), 7.89 (m, 1H, H_{NH}, ArgB), 7.88 (m, 1H, H_{NH}, Tyr4), 7.81 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{NH}, Pgl), 7.70 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H_{NH}, Ile5), 7.55 (m, 2H, H_ε, ArgA, ArgB), 7.36-6.80 (br, 8H, 4H_N, ArgA, 4H_N, ArgB), 6.99 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_δ, Tyr4), 6.62 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_ε, Tyr4), 5.20 (m, 1H, H_{Cp2}), 5.17 (m, 1H, H_{Cp5}), 4.71 (m, 2H, H_{Cp3,4}), 4.60 (s, 5H, H_{Cp'}), 4.45 (m, 2H, 1H_α, ArgA, 1H_α, Pgl), 4.41 (m, 1H, H_α, Tyr4), 4.33 (m, 1H, H_α, Pro3), 4.30 (m, 1H, H_α, ArgB), 4.22 (m, 1H, H_α, Leu6), 4.21 (m, 1H, H_α, Ile5), 3.60 (m, 1H, H_{δ2}, Pro3), 3.50 (m, 1H, H_{δ3}, Pro3), 3.08 (m, 4H, 2H_δ, ArgA, 2H_δ, ArgB), 2.88 (m, 1H, H_{β2}, Tyr4), 2.68 (m, 1H, H_{β3}, Tyr4), 2.61 (m, 2H, H_β, Pgl), 1.97 (m, 1H, H_{γ2}, Pro3), 1.81 (m, 1H, H_{γ12}, Ile5), 1.80 (m, 1H, H_{γ3}, Pro3), 1.70 (m, 1H, H_β, Ile5), 1.68 (m, 2H, H_{β2}, ArgA, H_{β2}, ArgB), 1.63 (m, 1H, H_γ, Leu6), 1.52 (m, 2H, 1H_{β3}, ArgA, 1H_{β3}, ArgB), 1.51 (m, 4H, 2H_γ, ArgA, 2H_γ, ArgB), 1.46 (m, 1H, H_{γ13}, Ile5), 0.89 (d, J = 6.5, 3H, H_{δ1}, Leu6), 0.84 (m, 6H, 3H_{δ2}, Leu6, 3H_{γ2}, Ile5), 0.80 (m, 3H, H_{δ1}, Ile5). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.62 MHz): δ = 178.1, 178.0, 172.3 (CON), 171.5 (CON_{Pro4}), 171.3 (CON_{Ile5}), 171.2 (CON_{Tyr4}), 156.3 (C_ζ, Tyr4), 129.8 (C_δ, Tyr4), 128.2 (C_γ, Tyr4), 114.5 (C_ε, Tyr4), 71.7 (C_{Cp3,4}), 71.2 (C_{Cp'}), 69.9 (C_{Cp2,5}), 56.1 (C_α, Pro3), 53.9 (C_α, Ile5), 51.5 (C_α, Tyr4), 51.6 (C_α, ArgB), 51.5 (C_α, ArgA), 49.9 (C_α, Leu6, C_α, Pgl), 46.4 (C_δ, Pro4), 40.2 (C_δ, ArgA, C_δ, ArgB), 39.6 (C_β, Leu6), 36.8 (C_β, Ile5), 36.1 (C_β, Tyr4), 29.1 (C_β, Arg), 28.7 (C_γ, Pro3), 28.0 (C_β, Arg), 24.3 (C_γ, ArgA, C_γ, ArgB), 23.9 (C_γ, Leu), 23.8 (C_{γ1}, Ile5), 22.5 (C_{δ1}, Leu6), 21.0 (C_{δ2}, Leu6), 14.8 (C_{γ2}, Ile5), 10.7 (C_{δ1}, Ile5).

**30**

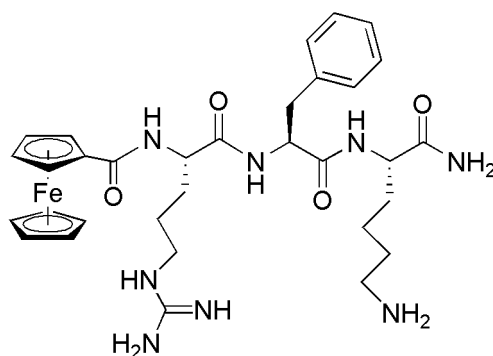
Die Synthese wurde unter Schlenkbedingungen in getrocknetem THF durchgeführt. In einem Schlenkkolben wurde 15.7 mg (0.013 mmol) von **29** in 3 ml THF belöst. Über ein Septum wurden mit einer Spritze langsam 0.25 ml einer Lösung von 68 mg (0.013 mmol) $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ in 3.7 ml THF unter Rühren langsam zugetropft. Dabei änderte sich die Farbe von gelb über dunkelgrün zu rotbraun. Die vollständige Umsetzung von **29** mit $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ wurde mittels HPLC beobachtet. Die Reaktion war nach 30 Minuten abgeschlossen, und die Lösung wurde weitere vier Stunden gerührt. Sie wurde filtriert und das Filtrat im Stickstoffstrom getrocknet. Das Produkt fiel als brauner Feststoff an. Die Ausbeute betrug 13.8 mg (73%).

30: $\text{C}_{60}\text{H}_{77}\text{Co}_2\text{N}_{13}\text{O}_{16}\text{Ru}$ (1455.33 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 1455.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1371.9 $[\text{M}-3\text{CO}+\text{H}]^+$, 1342.9 $[\text{M}-4\text{CO}+\text{H}]^+$, 1286.1 $[\text{M}-6\text{CO}+\text{H}]^+$, 1227.2 $[\text{M}-\text{Co}-6\text{CO}+\text{H}]^+$, 1170.5 $[\text{M}-2\text{Co}-6\text{CO}+\text{H}]^+$. R_t = 18.1 Minuten (analytische HPLC, Methode B). IR (cm^{-1}): 2095, 2053, 2021 (br, s) $\nu_{\text{C}\equiv\text{O}}$, 1649 (br, s,) ν_{CONH} .

**31**

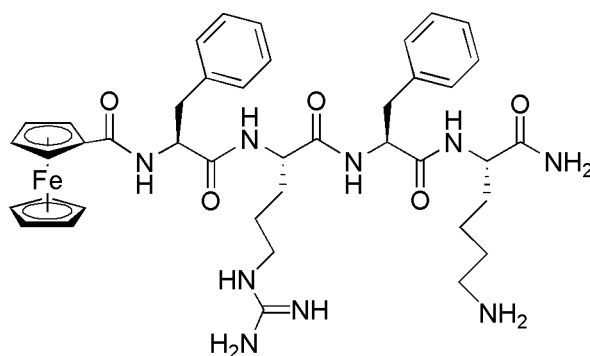
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	95 % TFA 2.5 % H ₂ O 2.5% TIS	4 h	56.7 mg 89%

31: C₃₂H₄₇N₉O₅ (637.37g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 638.3 [M+H]⁺, 319.6 [M+2H]²⁺. R_t = 12.3 Minuten (analytische HPLC, Methode B). ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 8.35 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H_{NH}, PheA), 8.37 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H_{NH}, Arg), 8.28 (m, 2H, 1H_{NH}, PheB, 1H_ε, Arg), 8.11 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{NH}, Lys), 7.90 (br, 3H, H_ζ, Lys), 7.35-7.11 (m, 4H, H_η, Arg), 7.02 (br, 2H, H_{NH2}), 7.28 (m, 4H, H_ε, Phe), 7.24 (m, 4H, H_δ, Phe), 7.17 (m, 2H, H_ζ, Phe), 4.45 (m, 1H, H_α, PheB), 4.37 (m, 1H, H_α, PheA), 4.22 (m, 1H, H_α, Arg), 4.15 (m, 1H, H_α, Lys), 3.05 (m, 2H, 1H_{β2}, PheB, 1H_{δ2}, Arg), 3.01 (m, 1H, H_{δ3}, Arg), 2.92 (m, 2H, 1H_{β3}, PheB, 1H_{β2}, PheA), 2.83 (m, 1H, H_{β3}, PheA), 2.76 (m, 2H, H_ε, Lys), 1.79 (s, 3H, H_{Acetyl}), 1.68 (m, 1H, H_{β2}, Lys), 1.66 (m, 1H, H_{β2}, Arg), 1.57 (m, 1H, H_{β3}, Arg), 1.56 (m, 1H, H_{β3}, Lys), 1.52 (m, 2H, H_δ, Lys), 1.38 (m, 2H, H_γ, Arg), 1.36 (m, 1H, H_{γ2}, Lys), 1.29 (m, 1H, H_{γ3}, Lys). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.62 MHz): δ = 173.4, 171.9, 168.8 (CON), 156.9 (C_ζ, Arg), 138.2, 137.7 (C_γ, Phe), 129.2, 129.1 (C_ε, Phe), 128.0, 127.9 (C_δ, Phe), 126.2, 126.1 (C_ζ, Phe), 54.7 (C_α, PheA), 54.3 (C_α, PheB), 52.0 (C_α, Lys), 51.8 (C_α, Arg), 39.9 (C_δ, Arg), 38.3 (C_ε, Lys), 36.8 (C_β, PheA), 36.6 (C_β, PheB), 30.7 (C_β, Lys), 28.4 (C_β, Arg), 26.2 (C_δ, Lys), 23.9 (C_γ, Arg), 22.1 (C_{Acetyl}), 21.7 (C_γ, Lys).

**32**

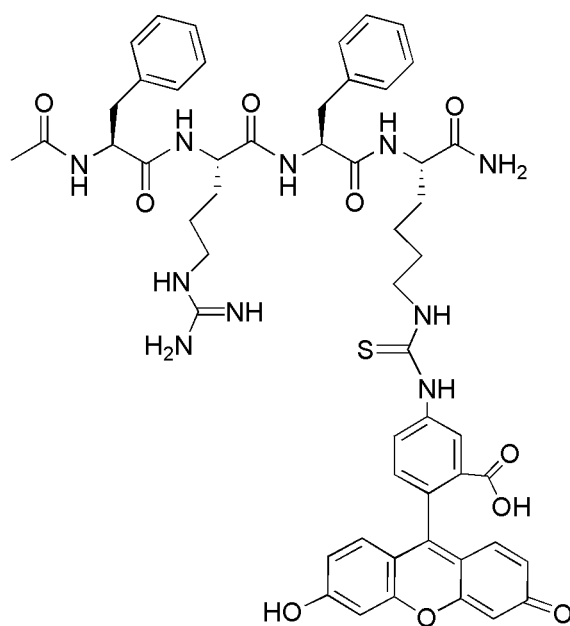
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	54.8 mg 83%

32: C₃₂H₄₄FeN₈O₄ (660.28 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 661.2 [M+H]⁺, 331.1 [M+2H]²⁺. R_t = 13.5 Minuten (analytische HPLC, Methode B). ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400.13 MHz): δ = 8.00 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{NH}, Lys), 7.88 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H_{NH}, Phe), 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H_{NH}, Arg), 7.74 (br, 3H, H_ζ, Lys), 7.68 (t, J = 5.2 Hz, 1H, H_ε, Arg), 7.34-6.84 (br, 4H, H_η, Arg), 7.21 (m, 2H, H_ε, Phe), 7.20 (m, 2H, H_δ, Phe), 7.15 (m, 1H, H_ζ, Phe), 7.04 (br, 2H, H_{NH2}), 4.87 (m, 1H, H_{Cp2}), 4.83 (m, 1H, H_{Cp5}), 4.57 (m, 1H, H_α, Phe), 4.38 (m, 2H, H_{Cp3,4}), 4.34 (m, 1H, H_α, Arg), 4.15 (m, 5H, H_{Cp'}), 4.13 (m, 1H, H_α, Lys), 3.10 (m, 2H, H_δ, Arg), 3.06 (m, 2H, H_{β2}, Phe), 2.87 (m, 1H, H_{β3}, Phe), 2.72 (m, 2H, H_ε, Lys), 1.69 (m, 1H, H_{β2}, Arg), 1.66 (m, 1H, H_{β2}, Lys), 1.60 (m, 1H, H_{β3}, Arg), 1.51 (m, 1H, H_{β3}, Lys), 1.50 (m, 2H, H_δ, Lys), 1.44 (m, 2H, H_γ, Arg), 1.26 (m, 2H, H_γ, Lys). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.62 MHz): δ = 173.1, 171.5, 170.3, 169.4 (CON), 156.6 (C_ζ, Arg), 137.3 (C_γ, Phe), 128.5 (C_ε, Phe), 127.7 (C_δ, Phe), 126.0 (C_ζ, Phe), 69.8 (C_{Cp3,4}), 69.0 (C_{Cp'}), 68.1 (C_{Cp5}), 67.9 (C_{Cp2}), 53.4 (C_α, Phe), 52.5 (C_α, Arg), 51.9 (C_α, Lys), 40.1 (C_δ, Arg), 38.3 (C_ε, Lys), 37.1 (C_β, Phe), 31.0 (C_β, Lys), 28.0 (C_β, Arg), 26.2 (C_δ, Lys), 24.9 (C_γ, Arg), 21.9 (C_γ, Lys).

**33**

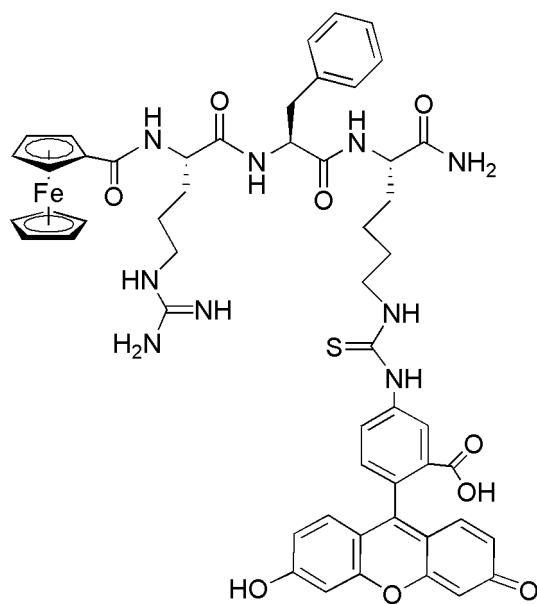
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	85 % TFA 10% Phenol 5% TIS	4 h	68.6 mg 85%

33: $C_{41}H_{53}FeN_9O_5$ (807.35 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 808.3 $[M+H]^+$, 404.6 $[M+2H]^{2+}$. R_t = 15.6 Minuten (analytische HPLC, Methode B). 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.13 MHz): δ = 8.20 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $H_{NH, Arg}$), 8.03 (d, J = 8.1 Hz, 1H, $H_{NH, Lys}$), 7.99 (d, J = 7.9 Hz, 1H, $H_{NH, PheA}$), 7.84 (d, J = 8.3 Hz, 1H, $H_{NH, PheB}$), 7.76 (br, 3H, $H_{\zeta, Lys}$), 7.57 (t, J = 5.57 Hz, 1H, $H_{\epsilon, Arg}$), 7.50–6.80 (br, 4H, $H_{\eta, Arg}$), 7.42 (m, 2H, $H_{\delta, Phe}$), 7.30 (m, 2H, $H_{\delta, Phe}$), 7.23 (m, 4H, $H_{\epsilon, Phe}$), 7.17 (m, 2H, $H_{\zeta, Phe}$), 7.06 (br, 2H, H_{NH2}), 4.83 (m, 1H, H_{Cp2}), 4.73 (m, 1H, H_{Cp5}), 4.69 (m, 1H, $H_{\alpha, PheB}$), 4.55 (m, 1H, $H_{\alpha, PheA}$), 4.31 (m, 2H, $H_{Cp3,4}$), 4.30 (m, 1H, $H_{\alpha, Arg}$), 4.16 (m, 1H, $H_{\alpha, Lys}$), 3.91 (s, 5H, $H_{Cp'}$), 3.08 (m, 2H, $H_{\delta, Arg}$), 3.07 (m, 1H, $H_{\beta2, PheA}$), 3.00 (m, 1H, $H_{\beta2, PheB}$), 2.93 (m, 1H, $H_{\beta3, PheB}$), 2.84 (1H, m, $H_{\beta3, PheA}$), 2.76 (m, 2H, $H_{\epsilon, Lys}$), 1.67 (m, 1H, $H_{\beta2, Lys}$), 1.68 (m, 1H, $H_{\beta2, Arg}$), 1.53 (m, 1H, $H_{\beta3, Arg}$), 1.52 (m, 1H, $H_{\beta3, Lys}$), 1.51 (m, 2H, $H_{\delta, Lys}$), 1.47 (m, 1H, $H_{\gamma2, Arg}$), 1.44 (m, 1H, $H_{\gamma3, Arg}$), 1.29 (m, 2H, $H_{\gamma, Lys}$). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.62 MHz): δ = 173.2, 171.9, 171.1, 170.5, 169.3 (CON), 156.7 ($C_{\zeta, Arg}$), 138.5, 137.3 ($C_{\gamma, Phe}$), 129.1, 129.0 ($C_{\delta, Phe}$), 128.0, 127.9 ($C_{\epsilon, Phe}$), 126.2, 126.1 ($C_{\zeta, Phe}$), 69.6 ($C_{Cp3,4}$), 69.0 ($C_{Cp'}$), 68.2 (C_{Cp5}), 67.4 (C_{Cp2}), 54.1 ($C_{\alpha, PheB}$), 53.4 ($C_{\alpha, PheA}$), 51.9 ($C_{\alpha, Lys}$), 51.8 ($C_{\alpha, Arg}$), 40.1 ($C_{\delta, Arg}$), 38.4 ($C_{\epsilon, Lys}$), 37.0 ($C_{\beta, PheA}$), 36.5 ($C_{\beta, PheB}$), 31.2 ($C_{\beta, Lys}$), 28.9 ($C_{\beta, Arg}$), 26.4 ($C_{\delta, Lys}$), 24.6 ($C_{\gamma, Arg}$), 21.8 ($C_{\gamma, Lys}$).

**34**

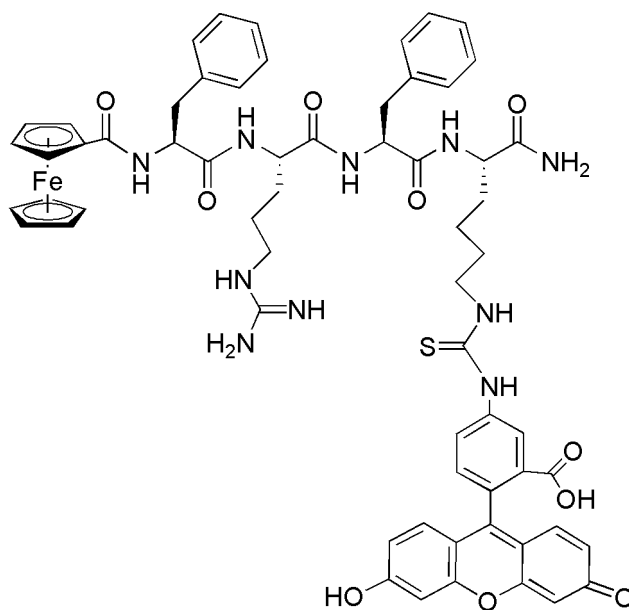
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	95 % TFA 2.5 % H ₂ O 2.5 % TIS	4 h	28.7 mg 56%

34: C₅₃H₅₈N₁₀O₁₀S (1026.41g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): *m/z* 1028.7 [M+H]⁺; MS (ESI, pos.): *m/z* 1027.3 [M+H]⁺, 514.1 [M+2H]²⁺. R_t = 15.0 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**35**

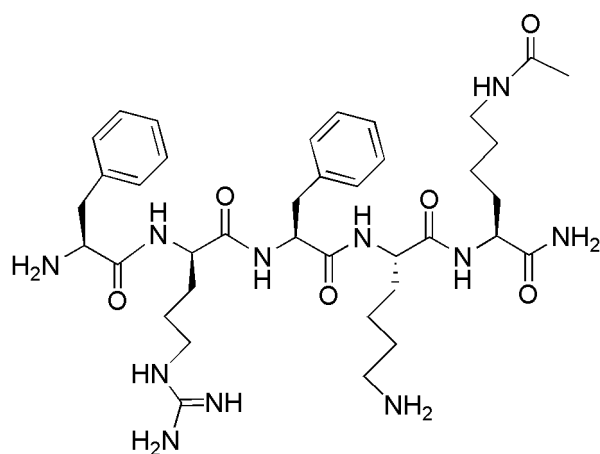
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	24.2 mg 46%

35: C₅₃H₅₅FeN₉O₉S (1049.32g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 1051.6 [M+H]⁺; MS (ESI, pos.): m/z 1050.2 [M+H]⁺, 525.6 [M+2H]²⁺. R_t = 16.2 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**36**

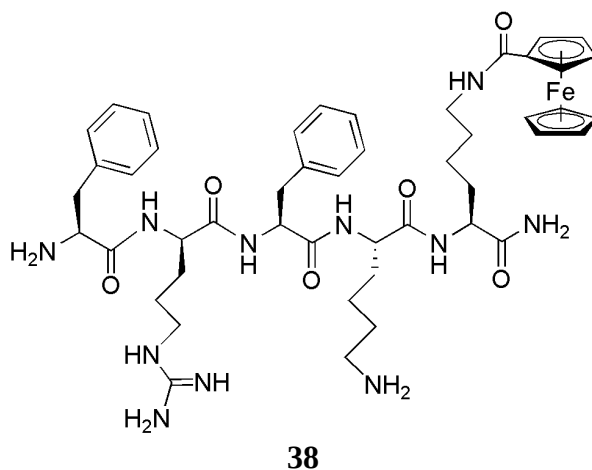
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	25.8 mg 43%

36: C₆₂H₆₄FeN₁₀O₁₀S (1196.39 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 1198.6 [M+H]⁺; MS (ESI, pos.): m/z 1197.3 [M+H]⁺, 599.1 [M+2H]²⁺. R_t = 17.5 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**37**

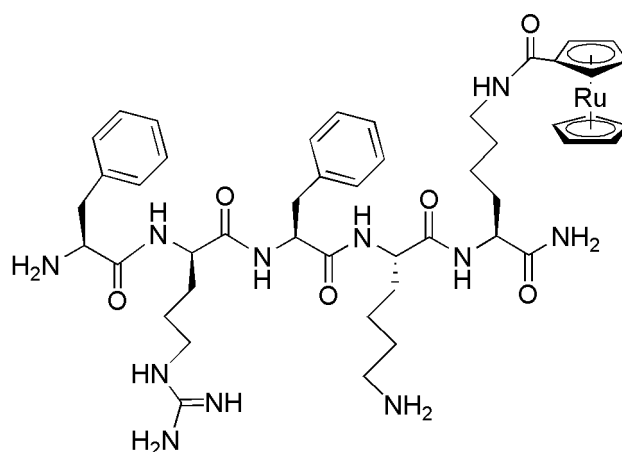
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	95 % TFA 2.5 % H ₂ O 2.5 % TIS	4 h	59.7 mg 78%

37: C₃₈H₅₉N₁₁O₆ (765.46 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 766.5 [M+H]⁺, 383.7 [M+2H]²⁺.
R_t = 11.9 Minuten (analytische HPLC, Methode B).



Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	16.8 mg 36%

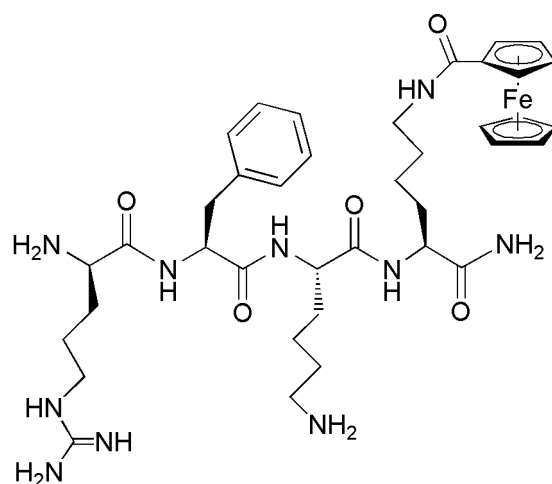
38: C₄₇H₆₅FeN₁₁O₆ (935.45 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 936.4 [M+H]⁺, 724.5 [M-FcC(O)+2H]⁺, 468.7 [M+2H]²⁺. R_t = 12.8 Minuten (analytische HPLC, Methode B). ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400.13 MHz): δ = 8.49 (m, 1H, H_{NH}, Lys5), 8.42 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H_{NH}, Phe1), 8.29 (m, 1H, H_{NH}, Phe3), 7.97-7.70 (br, 3H, H_ζ, Lys4), 7.93 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H_{NH}, Lys4), 7.88 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_{NH}, Arg2), 7.76 (t, J = 5.8 Hz, 1H, H_ε, Arg), 7.55 (m, 1H, H_ζ, Lys5), 7.41-6.90 (m, 4H, H_η, Arg), 7.30 (m, 4H, H_δ, Phe), 7.25 (m, 4H, H_ε, Phe), 7.17 (m, 2H, H_ζ, Phe), 7.06 (br, 1H, H_{NH2}), 4.77 (pseudo-t, J = 1.8 Hz, 2H, H_{Cp2,5}), 4.61 (m, 1H, H_α, Phe1), 4.33 (m, 1H, H_α, Lys5), 4.32 (pseudo-t, J = 1.8 Hz, 2H, H_{Cp3,4}), 4.24 (m, 1H, H_α, Phe3), 4.17 (m, 1H, H_α, Arg2), 4.13 (s, 5H, H_{Cp'}), 4.12 (m, 1H, H_α, Lys4), 3.14 (m, 2H, H_δ, Arg2), 3.08 (m, 1H, H_{β2}, Phe1), 2.97 (m, 2H, H_ε, Lys4), 2.81 (m, 2H, H_ε, Lys5), 2.76 (m, 2H, H_β, Phe3), 2.68 (m, 1H, H_{β3}, Phe1), 1.68 (m, 1H, H_{β2}, Arg2), 1.53 (m, 1H, H_{β3}, Arg2), 1.52 (m, 2H, H_β, Lys4), 1.32 (m, 2H, H_γ, Arg2), 1.30 (m, 2H, H_δ, Lys4), 1.16 (m, 2H, H_β, Lys5), 1.08 (m, 2H, H_δ, Lys5), 0.83 (m, 2H, H_γ, Lys5). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.62 MHz): δ = 174.2 (CON_{Arg2}), 172.0 (CON_{Phe3}), 171.8 (CON_{Phe1}), 170.9 (CON_{Lys5}), 168.6 (CON_{Lys4}), 156.6 (C_ζ, Arg), 137.6, 134.8 (C_γ, Phe), 129.3, 129.1 (C_δ, Phe), 128.2, 127.8 (C_ε, Phe), 126.1 (C_ζ, Phe), 69.4 (C_{Cp3,4}), 68.8 (C_{Cp'}), 67.6 (C_{Cp2,5}), 53.3 (C_α, Phe1), 52.6 (C_α, Lys4), 52.3 (C_α, Phe3), 51.8 (C_α, Arg), 51.4 (C_α, Lys5), 39.9 (C_ε, Lys5), 38.4 (C_β, Phe3), 38.2 (C_δ, Arg2), 37.8 (C_β, Phe1), 37.0 (C_ε, Lys4), 31.0 (C_β, Lys4, C_β, Arg2), 29.2 (C_δ, Lys5, C_β, Lys5), 26.3 (C_δ, Lys4), 23.8 (C_γ, Lys5), 22.1 (C_γ, Arg2), 22.0 (C_γ, Lys4).

**39**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	15.2 mg 31%

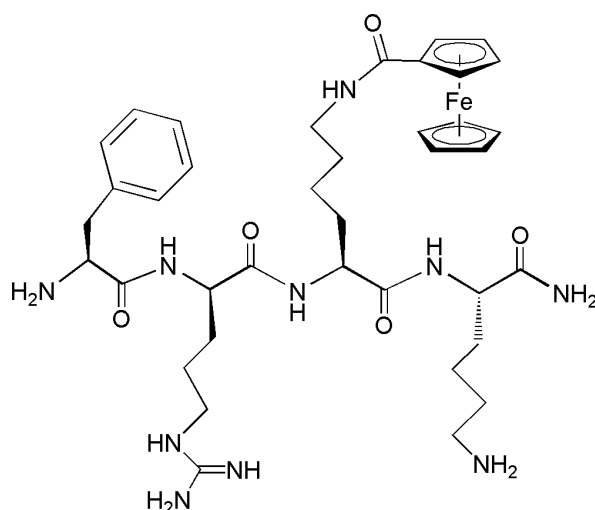
39: C₄₇H₆₅N₁₁O₆Ru (981.42 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 491.7 [M+2H]²⁺, 328.1 [M+3H]³⁺.

R_t = 12.8 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**40**

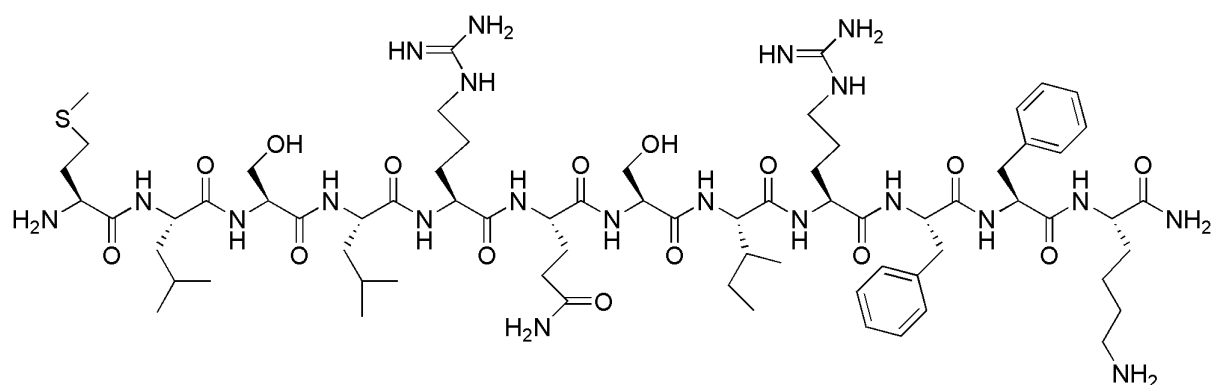
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	15.4 mg 39%

40: $C_{38}H_{56}FeN_{10}O_5$ (788.38 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 789.3 $[M+H]^+$, 577.3 $[M-FcC(O)+2H]^+$, 395.1 $[M+2H]^{2+}$. R_t = 12.7 Minuten (analytische HPLC, Methode B). 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400.13 MHz): δ = 8.54 (br, 1H, H_{NH} , Phe), 8.40 (br, 1H, H_{NH} , Lys3), 7.83 (m, 2H, $1H_{NH}$, Lys4, $1H_{NH}$, Arg), 7.76 (t, J = 5.7 Hz, 1H, H_ζ , Lys4), 7.6-7.5 (br, 3H, H_ζ , Lys3), 7.4-6.9 (m, 10H, $1H_\epsilon$, Arg, $4H_\eta$, Arg, $2H_\delta$, Phe, $2H_\epsilon$, Phe, $1H_\zeta$, Phe), 7.03 (br, 2H, H_{NH2}), 4.76 (m, 2H, $H_{Cp2,5}$), 4.71 (m, 1H, H_α , Phe), 4.32 (m, 2H, $H_{Cp3,4}$), 4.27 (m, 2H, $1H_\alpha$, Lys3, $1H_\alpha$, Lys4), 4.21 (m, 1H, H_α , Arg), 4.13 (s, 5H, $H_{Cp'}$), 3.16 (m, 2H, H_ϵ , Lys4), 3.11 (m, 1H, $H_{\beta2}$, Phe), 2.92 (m, 2H, H_δ , Arg), 2.78 (m, 2H, H_ϵ , Lys3), 2.73 (m, 1H, $H_{\beta3}$, Phe), 1.72 (m, 1H, $H_{\beta2}$, Lys4), 1.71 (m, 2H, H_β , Lys3), 1.58 (m, 1H, $H_{\beta3}$, Lys4), 1.56 (m, 2H, H_δ , Lys3), 1.50 (m, 2H, H_δ , Lys4), 1.47 (m, 1H, $H_{\beta2}$, Arg), 1.36 (m, 1H, $H_{\beta3}$, Arg), 1.34 (m, 4H, $2H_\gamma$, Lys3, $2H_\gamma$, Lys4), 1.16 (m, 1H, $H_{\gamma2}$, Arg), 1.06 (m, 1H, $H_{\gamma3}$, Arg). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100.62 MHz): δ = 173.3, 170.8, 170.7, 168.9 (CON), 156.5 (C_ζ , Arg), 137.2 (C_γ , Phe), 129.0 (C_δ , Phe), 127.8 (C_ϵ , Phe), 126.1 (C_ζ , Phe), 69.4 ($C_{Cp3,4}$), 69.0 ($C_{Cp'}$), 67.6 ($C_{Cp2,5}$), 54.1 (C_α , Phe), 53.2 (C_α , Lys3, C_α , Lys4), 52.8 (C_α , Arg), 40.8 (C_δ , Arg), 39.2 (C_ϵ , Lys3), 39.1 (C_ϵ , Lys4), 38.6 (C_β , Phe), 32.2 (C_β , Lys4), 32.1 (C_β , Lys3), 29.9 (C_δ , Lys4), 29.7 (C_β , Arg), 27.2 (C_δ , Lys3), 24.3 (C_γ , Arg), 23.0 (C_γ , Lys4, C_γ , Lys3).

**41**

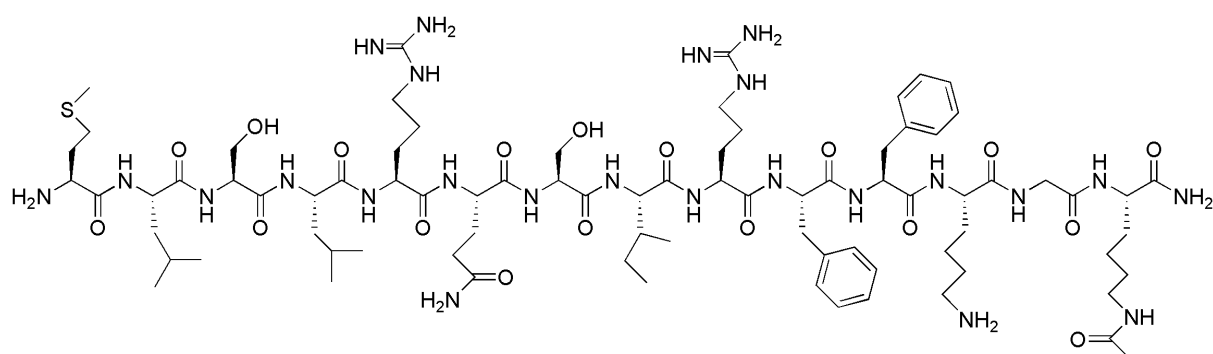
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	9.9 mg 25%

41: C₃₈H₅₆FeN₁₀O₅ (788.38 g/mol): MS (ESI, pos.): m/z 789.3 [M+H]⁺, 577.3 [M-FcC(O)+2H]⁺, 395.1 [M+2H]²⁺. R_t = 11.8 Minuten (analytische HPLC, Methode B). ¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 8.61 (br, 1H, H_{NH}, Lys4), 8.32 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H_{NH}, Lys3), 8.06-7.65 (br, 4H, 3H_ζ, Lys4, 1H_{NH}, Phe), 7.90 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H_{NH}, Arg), 7.81 (m, 1H, H_ζ, Lys3), 7.45-7.10 (m, 4H, H_η, Arg), 7.35 (m, 1H, H_ζ, Phe), 7.31 (m, 2H, H_ε, Phe), 7.25 (m, 2H, H_δ, Phe), 7.02 (s, 2H, H_{NH2}), 4.78 (m, 2H, H_{Cp2,5}), 4.71 (m, 1H, H_α, Phe), 4.37 (m, 1H, H_α, Lys4), 4.33 (m, 2H, H_{Cp3,4}), 4.24 (m, 1H, H_α, Lys3), 4.15 (s, 5H, H_{Cp'}), 4.14 (m, 1H, H_α, Arg), 3.14 (m, 2H, H_ε, Lys3), 3.02 (m, 3H, 2H_ε, Lys4, 1H_{β2}, Phe), 2.99 (m, 1H, H_{β3}, Phe), 2.75 (m, 2H, H_δ, Arg), 1.72 (m, 2H, H_β, Lys3), 1.65 (m, 1H, H_{β2}, Arg), 1.53 (m, 1H, H_{β2}, Lys4), 1.52 (m, 1H, H_{δ2}, Lys4), 1.51 (m, 1H, H_{β3}, Lys4), 1.48 (m, 2H, H_δ, Lys3), 1.47 (m, 1H, H_{δ3}, Lys4), 1.54 (m, 1H, H_{β3}, Arg), 1.32 (m, 2H, H_γ, Lys3), 1.30 (m, 2H, H_γ, Arg), 1.26 (m, 1H, H_{γ2}, Lys4), 1.22 (m, 1H, H_{γ3}, Lys4). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 100.62 MHz): δ = 172.2 (CON_{Lys3}), 171.8 (CON_{Arg}), 171.1 (CON_{Lys4}), 156.6 (C_ζ, Arg), 134.3 (C_γ, Phe), 129.1 (C_δ, Phe), 128.1 (C_ε, Phe), 126.6 (C_ζ, Phe), 70.3 (C_{Cp3,4}), 69.7 (C_{Cp'}), 68.6 (C_{Cp2,5}), 53.9 (C_α, Phe), 53.2 (C_α, Lys3), 52.7 (C_α, Lys4), 52.8 (C_α, Arg), 40.8 (C_ε, Lys4), 39.2 (C_δ, Arg), 39.1 (C_ε, Lys3), 38.0 (C_β, Phe), 32.2 (C_β, Lys3), 31.7 (C_β, Lys4), 31.8 (C_β, Arg), 30.0 (C_δ, Lys4), 29.7 (C_δ, Lys3), 25.3 (C_γ, Lys4), 23.0 (C_γ, Arg, C_γ, Lys3).

**42**

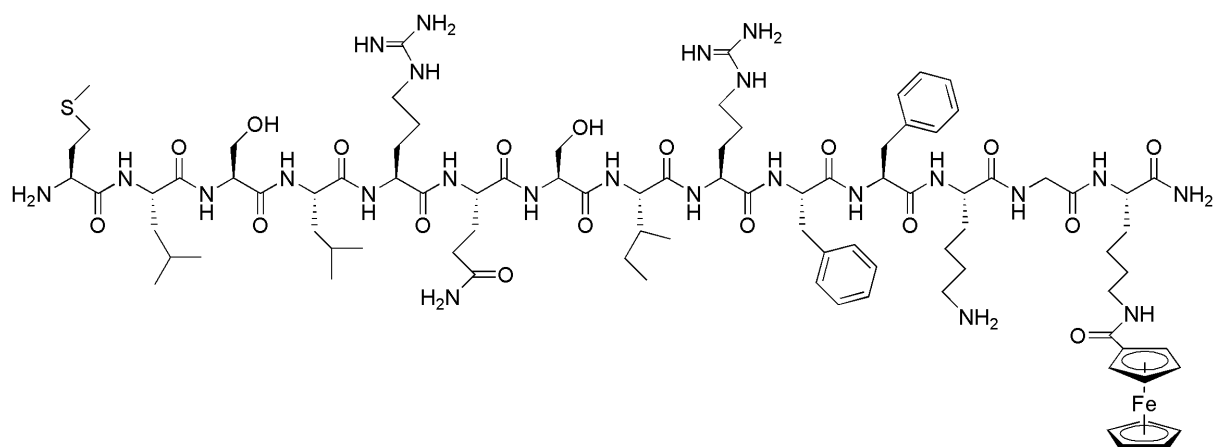
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	95 % TFA 2.5 % H ₂ O 2.5 % TIS	4 h	68.6 mg 45%

42: C₇₀H₁₁₇N₂₁O₁₅S (1524.9 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): *m/z* 1527.1 [M+H]⁺.
R_t = 12.5 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**43**

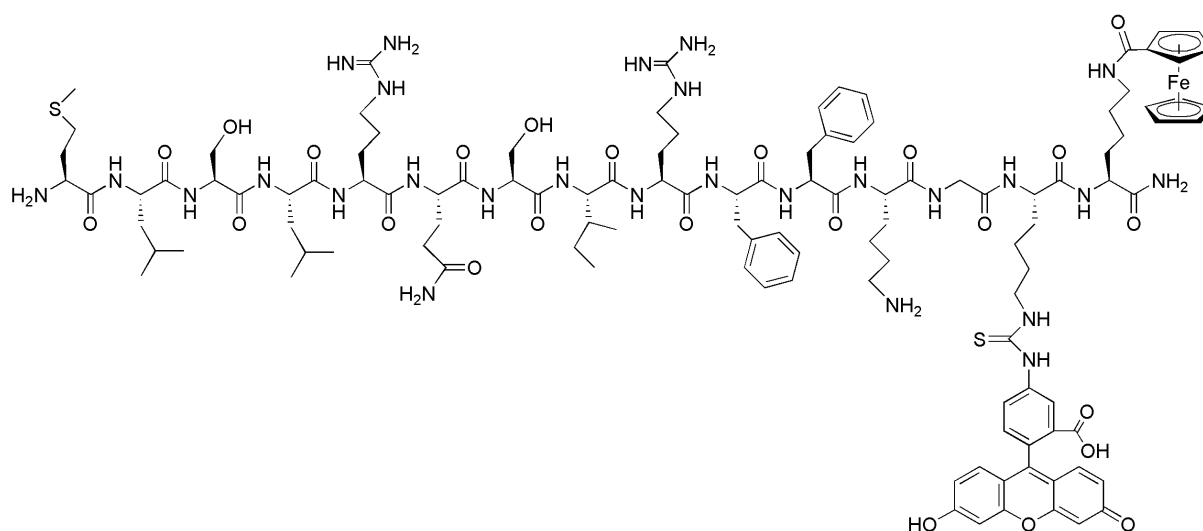
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	95 % TFA 2.5 % H ₂ O 2.5 % TIS	4 h	98.1 mg 56%

43: C₈₀H₁₃₄N₂₄O₁₈S (1752.1 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): *m/z* 1753.8 [M+H]⁺.
R_t = 12.3 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**44**

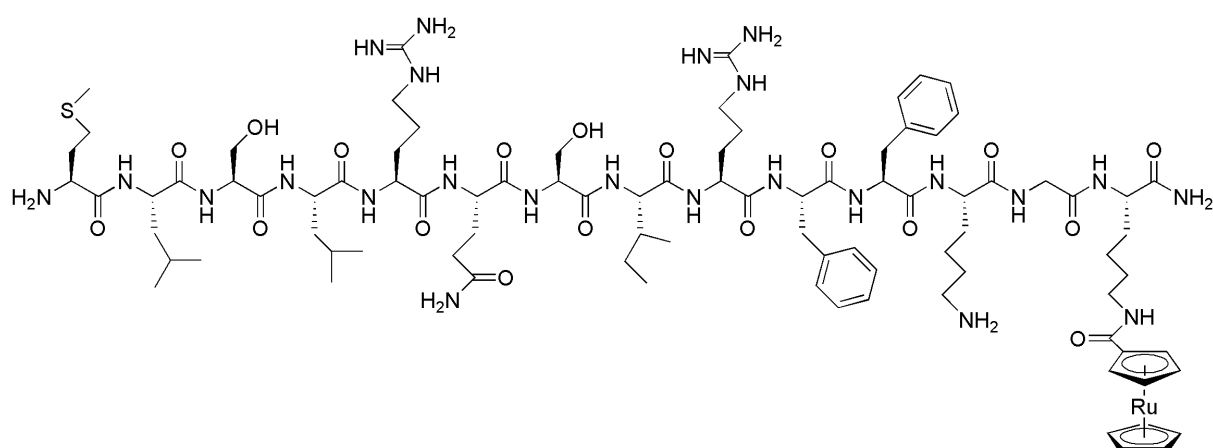
Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	42.3 mg 22%

44: C₈₉H₁₄₀FeN₂₄O₁₈S (1922.1 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): *m/z* 1923.9 [M+H]⁺.
R_t = 13.8 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**45**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.05	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	13.4 mg 11%

45: C₁₁₆H₁₆₃FeN₂₇O₂₄S₂ (2438.12 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap.): m/z 2443.7 [M]⁺ (*); MS (ESI, pos.): m/z 2438.7 [M+H]⁺, 1220.3 [M+2H]²⁺, 814.0 [M+3H]³⁺. R_t = 15.0 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

**46**

Harz	Beladung (mmol/g)	Einsatz (mmol)	AS Überschuss	Abspalt- lösung	Abspalt- zeit	Ausbeute
Rink-Amid	0.71	0.1	4 äq	85 % TFA 10 % Phenol 5 % TIS	4 h	51.2 mg 26%

46: C₈₉H₁₄₀N₂₄O₁₈RuS (1967.4 g/mol): MS (MALDI-TOF, Sinap): *m/z* 2066.4 [M+CF₃CO]⁺, 1970.0 [M+H]⁺. R_t = 13.6 Minuten (analytische HPLC, Methode B).

6 Literaturverzeichnis

- [1] J. E. Debreczeni, A. N. Bullock, G. E. Atilla, D. S. Williams, H. Bregman, S. Knapp, E. Meggers, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1580-1585.
- [2] H.-B. Kraatz, N. Metzler-Nolte, Editors, *Concepts and Models in Bioinorganic Chemistry*, **2006**.
- [3] R. H. Müller, G. E. Hildebrand, *Pharmazeutische Technologie: moderne Arzneiformen*, 2nd ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1998**.
- [4] W. Brandau, in *Nuklearmedizin* (Ed.: U. Büll), Thieme, Stuttgart, **1994**, p. 79ff.
- [5] E. K. J. Pauwels, in *Nuclear Medicine in Clinical Oncology* (Ed.: C. Winkler), Springer, Berlin, **1986**, p. 115ff.
- [6] K. zum Winkel, *Nuklearmedizin*, Springer, Berlin, **1990**.
- [7] D. L. Munz, D. Emrich, in *International Symposium on Immunoscinigraphy: Facts and Fiction*, Elsevier, Göttingen, **1990**.
- [8] C. J. Anderson, M. J. Welch, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2219-2234.
- [9] P. Caravan, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 512-523.
- [10] D. H. Powell, O. M. Ni Dhubhghaill, D. Pubanz, L. Helm, Y. S. Lebedev, W. Schlaepfer, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9333-9346.
- [11] C. Casali, M. Janier, E. Canet, J. F. Obadia, S. Benderbous, C. Corot, D. Revel, *Acad. Radiol.* **1998**, *5 Suppl 1*, S214-218.
- [12] M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt, H.-J. Weinmann, *Invest. Radiol.* **2005**, *40*, 715-724.
- [13] M. Port, C. Corot, I. Raynal, J.-M. Idee, A. Dencausse, E. Lancelot, D. Meyer, B. Bonnemain, J. Lautrou, *Invest. Radiol.* **2001**, *36*, 445-454.
- [14] J. B. Livramento, E. Toth, A. Sour, A. Borel, A. E. Merbach, R. Ruloff, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1480-1484.
- [15] S. Flacke, S. Fischer, M. J. Scott, R. J. Fuhrhop, J. S. Allen, M. McLean, P. Winter, G. A. Sicard, P. J. Gaffney, S. A. Wickline, G. M. Lanza, *Circulation* **2001**, *104*, 1280-1285.
- [16] E. Spuentrup, A. Buecker, M. Katoh, A. J. Wiethoff, E. C. Parsons, R. M. Botnar, R. M. Weisskoff, P. B. Graham, W. J. Manning, R. W. Guenther, *Circulation* **2005**, *111*, 1377-1382.
- [17] A. Vessieres, M. Salmain, P. Brossier, G. Jaouen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 625-633.
- [18] A. Varenne, A. Vessieres, M. Salmain, S. Durand, P. Brossier, G. Jaouen, *Anal. Biochem.* **1996**, *242*, 172-179.
- [19] V. Philomin, A. Vessieres, M. Gruselle, G. Jaouen, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 419-424.
- [20] N. Fischer-Durand, M. Salmain, B. Rudolf, A. Vessieres, J. Zakrzewski, G. Jaouen, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 519-525.
- [21] A. Vessieres, N. Fischer-Durand, F. Le Bideau, P. Janvier, J.-M. Heldt, S. B. Rejeb, G. Jaouen, *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, *16*, 669-674.
- [22] N. Fischer-Durand, A. Vessieres, J.-M. Heldt, F. le Bideau, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2003**, *668*, 59-66.
- [23] P. Koepf-Maier, W. Wagner, B. Hesse, H. Koepf, *Eur. J. Cancer* **1981**, *17*, 665-669.
- [24] M. A. Jakupec, M. Galanski, B. K. Keppler, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2003**, *146*, 1-54.
- [25] D. Lebwohl, R. Canetta, *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1522-1534.
- [26] T. W. Hambley, *Science* **2007**, *318*, 1392-1393.
- [27] P. J. Sadler, *Metals in medicine*, University Science Books, **2007**.

- [28] H. R. Hansen, O. Farver, *Metals in medicine: inorganic medicinal chemistry*, **2010**.
- [29] T. Storr, K. H. Thompson, C. Orvig, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 534-544.
- [30] M. Galanski, *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discovery* **2006**, *1*, 285-295.
- [31] I. Ott, R. Gust, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35*, 124-133.
- [32] H. Choy, C. Park, M. Yao, *Cancer Res.* **2008**, *14*, 1633-1638.
- [33] L. Kelland, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, *16*, 1009-1021.
- [34] P. Perego, C. Caserini, L. Gatti, N. Carenini, S. Romanelli, R. Supino, D. Colangelo, I. Viano, R. Leone, S. Spinelli, G. Pezzoni, C. Manzotti, N. Farrell, F. Zunino, *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 528-534.
- [35] P. Perego, L. Gatti, C. Caserini, R. Supino, D. Colangelo, R. Leone, S. Spinelli, N. Farrell, F. Zunino, *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 59-64.
- [36] P. Feazell Rodney, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, J. Lippard Stephen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8438-8439.
- [37] F. S. Mackay, J. A. Woods, H. Moseley, J. Ferguson, A. Dawson, S. Parsons, P. J. Sadler, *Chem.-Eur. J.* **2006**, *12*, 3155-3161.
- [38] C. F. Shaw, III, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2589-2600.
- [39] S. T. Crooke, C. K. Mirabelli, *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 109-113.
- [40] F. Novelli, M. Recine, F. Sparatore, C. Juliano, *Farmaco* **1999**, *54*, 232-236.
- [41] L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanello, M. Corsini, G. Miolo, C. Macca, A. Trevisan, D. Fregona, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1648-1657.
- [42] P. Shi, Q. Jiang, Y. Zhao, Y. Zhang, J. Lin, L. Lin, J. Ding, Z. Guo, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 745-752.
- [43] S. Urig, K. Fritz-Wolf, R. Reau, C. Herold-Mende, K. Toth, E. Davioud-Charvet, K. Becker, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1881-1886.
- [44] A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692-1707.
- [45] A. P. Fields, R. P. Regala, *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 487-497.
- [46] E. Erdogan, T. Lamark, M. Stallings-Mann, L. Jamieson, M. Pellechia, E. A. Thompson, T. Johansen, A. P. Fields, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 28450-28459.
- [47] M. Stallings-Mann, L. Jamieson, R. P. Regala, C. Weems, N. R. Murray, A. P. Fields, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1767-1774.
- [48] Y. Wang, Q.-Y. He, R. W.-Y. Sun, C.-M. Che, J.-F. Chiu, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11553-11564.
- [49] M. J. McKeage, L. Maharaj, S. J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 127-135.
- [50] P. J. Barnard, S. J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1889-1902.
- [51] C. R. Chitambar, *Curr. Opin. Oncol.* **2004**, *16*, 547-552.
- [52] M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1575-1583.
- [53] M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Met. Ions Biol. Syst.* **2004**, *42*, 425-462.
- [54] L. R. Bernstein, *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 665-682.
- [55] L. R. Bernstein, T. Tanner, C. Godfrey, B. Noll, *Met.-Based Drugs* **2000**, *7*, 33-47.
- [56] P. Collery, F. Lechenault, A. Cazabat, E. Juvin, L. Khassanova, A. Evangelou, B. Keppler, *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 955-958.
- [57] M.-S. Chua, L. R. Bernstein, S. K. S. So, *Anticancer Res.* **2006**, *26*, 1739-1744.
- [58] M. Galanski, B. K. Keppler, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *2*, 118-123.
- [59] R. D. Hofheinz, C. Dittrich, M. A. Jakupec, A. Drescher, U. Jaehde, M. Gneist, N. Graf von Keyserlingk, B. K. Keppler, A. Hochhaus, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2005**, *43*, 590-591.
- [60] P. Schluga, C. G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Dalton Trans.* **2006**, 1796-1802.

- [61] C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 891-904.
- [62] A. Kung, T. Pieper, B. K. Keppler, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *759*, 81-89.
- [63] J. Malina, O. Novakova, B. K. Keppler, E. Alessio, V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 435-445.
- [64] A. Egger, V. B. Arion, E. Reisner, B. Cebrian-Losantos, S. Shova, G. Trettenhahn, B. K. Keppler, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 122-132.
- [65] G. Sava, F. Frausin, M. Cocchietto, F. Vita, E. Podda, P. Spessotto, A. Furlani, V. Scarcia, G. Zabucchi, *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 1383-1396.
- [66] F. Frausin, V. Scarcia, M. Cocchietto, A. Furlani, B. Serli, E. Alessio, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp.* **2005**, *313*, 227-233.
- [67] S. Pacor, S. Zorzet, M. Cocchietto, M. Bacac, M. Vadori, C. Turrin, B. Gava, A. Castellarin, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp.* **2004**, *310*, 737-744.
- [68] G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa, *Cancer Res.* **2003**, *9*, 1898-1905.
- [69] A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, G. Sava, *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 993-998.
- [70] A. Bergamo, A. Masi, P. J. Dyson, G. Sava, *Int. J. Oncol.* **2008**, *33*, 1281-1289.
- [71] S. Chatterjee, S. Kundu, A. Bhattacharyya, C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1149-1155.
- [72] C. Scolaro, T. J. Geldbach, S. Rochat, A. Dorcier, C. Gossens, A. Bergamo, M. Cocchietto, I. Tavernelli, G. Sava, U. Rothlisberger, P. J. Dyson, *Organometallics* **2006**, *25*, 756-765.
- [73] W. H. Ang, E. Daldini, C. Scolaro, R. Scopelliti, L. Juillerat-Jeanneret, P. J. Dyson, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 9006-9013.
- [74] C. A. Vock, A. K. Renfrew, R. Scopelliti, L. Juillerat-Jeanneret, P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 1661-1671.
- [75] M. Melchart, P. J. Sadler, in *Bioorganometallics*, **2006**, pp. 39-64.
- [76] C. A. Vock, W. H. Ang, C. Scolaro, A. D. Phillips, L. Lagopoulos, L. Juillerat-Jeanneret, G. Sava, R. Scopelliti, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2166-2175.
- [77] H. Ang Wee, A. De Luca, C. Chapuis-Bernasconi, L. Juillerat-Jeanneret, M. Lo Bello, J. Dyson Paul, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1799-1806.
- [78] E. Meggers, G. E. Atilla-Gokcumen, H. Bregman, J. Maksimoska, S. P. Mulcahy, N. Pagano, D. S. Williams, *Synlett* **2007**, 1177-1189.
- [79] H. Bregman, P. J. Carroll, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 877-884.
- [80] S. M. Smalley Keiran, R. Contractor, K. Haass Nikolas, N. Kulp Angela, G. E. Atilla-Gokcumen, S. Williams Douglas, H. Bregman, T. Flaherty Keith, S. Soengas Maria, E. Meggers, M. Herlyn, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 209-217.
- [81] M. Jung, D. E. Kerr, P. D. Senter, *Arch. Pharm.* **1997**, *330*, 173-176.
- [82] K. Schmidt, M. Jung, R. Keilitz, B. Schnurr, R. Gust, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *306*, 6-16.
- [83] I. Ott, K. Schmidt, B. Kircher, P. Schumacher, T. Wiglenda, R. Gust, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 622-629.
- [84] I. Ott, B. Kircher, C. P. Bagowski, D. H. W. Vlecken, E. B. Ott, J. Will, K. Bensdorf, W. S. Sheldrick, R. Gust, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1160-1163.
- [85] A. L. Blobaum, L. J. Marnett, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1425-1441.
- [86] H. Habeck, J. Odenthal, B. Walderich, H.-M. Maischein, S. Schulte-Merker, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1405-1412.
- [87] N. D. Lawson, B. M. Weinstein, *Dev. Biol.* **2002**, *248*, 307-318.

- [88] C. D. Sergeant, I. Ott, A. Sniady, S. Meneni, R. Gust, A. L. Rheingold, R. Dembinski, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 73-80.
- [89] S. Meneni, I. Ott, C. D. Sergeant, A. Sniady, R. Gust, R. Dembinski, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3082-3088.
- [90] M. A. Neukamm, A. Pinto, N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.* **2008**, 232-234.
- [91] P. Koepf-Maier, F. Preiss, T. Marx, T. Klapoetke, H. Koepf, *Anticancer Res.* **1986**, *6*, 33-37.
- [92] P. Kopf-Maier, H. Kopf, *Anticancer Res.* **1986**, *6*, 227-233.
- [93] P. Koepf-Maier, H. Koepf, *Struct. Bonding* **1988**, *70*, 103-194.
- [94] P. Koepf-Maier, M. Leitner, H. Koepf, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1980**, *42*, 1789-1791.
- [95] P. Koepf-Maier, B. Hesse, H. Koepf, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1980**, *96*, 43-51.
- [96] P. Kopf-Maier, B. Hesse, R. Voigtlander, H. Kopf, *J. Cancer Res.* **1980**, *97*, 31-39.
- [97] P. Koepf-Maier, H. Koepf, *Naturwissenschaften* **1980**, *67*, 415-416.
- [98] P. Koepf-Maier, W. Wagner, H. Koepf, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1981**, *5*, 237-241.
- [99] P. Koepf-Maier, S. Grabowski, J. Liegener, H. Koepf, *Inorg. Chim. Acta* **1985**, *108*, 99-103.
- [100] M. M. H. J. H. Murray, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1936-1941.
- [101] M. M. Harding, G. J. Harden, L. D. Field, *FEBS Lett.* **1993**, *322*, 291-294.
- [102] P. Koepf-Maier, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1-16.
- [103] C. V. Christodoulou, A. G. Eliopoulos, L. S. Young, L. Hodgkins, D. R. Ferry, D. J. Kerr, *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 2088-2097.
- [104] G. Mokdsi, M. M. Harding, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *83*, 205-209.
- [105] N. Kroeger, U. R. Kleeberg, K. Mross, L. Edler, D. K. Hossfeld, *Onkologie* **2000**, *23*, 60-62.
- [106] M. M. Harding, G. Mokdsi, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1289-1303.
- [107] E. Melendez, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 309-315.
- [108] K. Strohfeldt, M. Tacke, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1174-1187.
- [109] P. Koepf-Maier, H. Koepf, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1137-1152.
- [110] P. Koepf-Maier, H. Koepf, E. W. Neuse, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 446-447.
- [111] D. Osella, M. Ferrali, P. Zanello, F. Laschi, M. Fontani, C. Nervi, G. Cavigliolo, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *306*, 42-48.
- [112] G. Tabbi, C. Cassino, G. Cavigliolo, D. Colangelo, A. Ghiglia, I. Viano, D. Osella, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5786-5796.
- [113] H. Tamura, M. Miwa, *Chem. Lett.* **1997**, 1177-1178.
- [114] G. Caldwell, M. G. Meirim, E. W. Neuse, C. E. J. Van Rensburg, *Appl. Organomet. Chem.* **1998**, *12*, 793-799.
- [115] P. James, J. Neudoerfl, M. Eissmann, P. Jesse, A. Prokop, H.-G. Schmalz, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2763-2766.
- [116] A. Vessieres, S. Top, P. Pigeon, E. Hillard, L. Boubeker, D. Spera, G. Jaouen, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3937-3940.
- [117] A. Nguyen, A. Vessieres, E. A. Hillard, S. Top, P. Pigeon, G. Jaouen, *Chimia* **2007**, *61*, 716-724.
- [118] E. Hillard, A. Vessieres, F. Le Bideau, D. Plazuk, D. Spera, M. Huche, G. Jaouen, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 551-559.
- [119] A. Hillard Elizabeth, P. Pigeon, A. Vessieres, C. Amatore, G. Jaouen, *Dalton Trans.* **2007**, 5073-5081.
- [120] A. Vessieres, S. Top, W. Beck, E. Hillard, G. Jaouen, *Dalton Trans.* **2006**, 529-541.
- [121] E. A. Hillard, A. Vessieres, S. Top, P. Pigeon, K. Kowalski, M. Huche, G. Jaouen, *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 1315-1326.

- [122] E. Hillard, A. Vessieres, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 285-290.
- [123] A. J. Corry, A. Mooney, D. O'Sullivan, P. T. M. Kenny, *Inorg. Chim. Acta* **2009**, *362*, 2957-2961.
- [124] A. J. Corry, N. O'Donovan, A. Mooney, D. O'Sullivan, D. K. Rai, P. T. M. Kenny, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 880-885.
- [125] A. J. Corry, A. Goel, S. R. Alley, P. N. Kelly, D. O'Sullivan, D. Savage, P. T. M. Kenny, *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 1405-1410.
- [126] A. Mooney, A. J. Corry, D. O'Sullivan, D. K. Rai, P. T. M. Kenny, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 886-894.
- [127] R. Valkema, M. De Jong, W. H. Bakker, A. Breeman Wout, P. Kooij, P. Lugtenburg, J., H. De Jong Frank, A. Christiansen, L. Kam Boen, W. De Herder Wouter, M. Stridsberg, J. Lindemans, G. Ensing, P. Krenning Eric, *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32*, 110-122.
- [128] B. Anthony Lowell, A. Woltering Eugene, D. Espenan Gregory, D. Cronin Michele, J. Maloney Tom, E. McCarthy Kevin, *Semin. Nucl. Med.* **2002**, *32*, 123-132.
- [129] J. R. Buscombe, M. E. Caplin, A. J. W. Hilson, *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 1-6.
- [130] M. P. M. Stokkel, R. B. T. Verkooijen, H. Bouwsma, J. W. A. Smit, *Nucl. Med. Commun.* **2004**, *25*, 683-690.
- [131] A. Otte, R. Herrmann, A. Heppeler, M. Behe, E. Jermann, P. Powell, H. R. Maecke, J. Muller, *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 1439-1447.
- [132] C. Waldherr, M. Pless, H. R. Maecke, A. Haldemann, J. Mueller-Brand, *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 941-945.
- [133] C. Waldherr, M. Pless, R. Maecke Helmut, T. Schumacher, A. Crazzolar, U. Nitzsche Egbert, A. Haldemann, J. Mueller-Brand, *J. Nucl. Med.* **2002**, *43*, 610-616.
- [134] G. Paganelli, L. Bodei, D. Handkiewicz Junak, P. Rocca, S. Papi, M. Lopera Sierra, M. Gatti, M. Chinol, M. Bartolomei, M. Fiorenza, C. Grana, *Biopolymers* **2002**, *66*, 393-398.
- [135] L. Bodei, M. Cremonesi, S. Zoboli, C. Grana, M. Bartolomei, P. Rocca, M. Caracciolo, H. R. Maecke, M. Chinol, G. Paganelli, *Eur. J. Nucl. Med. Mol.* **2003**, *30*, 207-216.
- [136] R. Valkema, S. Pauwels, K. Kvols Larry, R. Barone, F. Jamar, H. Bakker Willem, J. Kwekkeboom Dik, H. Bouterfa, P. Krenning Eric, *Semin. Nucl. Med.* **2006**, *36*, 147-156.
- [137] M. de Jong, W. A. Breeman, B. F. Bernard, W. H. Bakker, M. Schaar, A. van Gameren, J. E. Bugaj, J. Erion, M. Schmidt, A. Srinivasan, E. P. Krenning, *Int. J. Cancer* **2001**, *92*, 628-633.
- [138] D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, P. P. M. Kooij, M. W. Konijnenberg, A. Srinivasan, J. L. Erion, M. A. Schmidt, J. L. Bugaj, M. de Jong, E. P. Krenning, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28*, 1319-1325.
- [139] T. E. Clancy, T. P. Sengupta, J. Paulus, F. Ahmed, M.-S. Duh, M. H. Kulke, *Dig. Dis. Sci.* **2006**, *51*, 877-884.
- [140] E. T. Janson, L. Holmberg, M. Stridsberg, B. Eriksson, E. Theodorsson, E. Wilander, K. Oberg, *Ann. Oncol.* **1997**, *8*, 685-690.
- [141] P. F. Quaedvlieg, O. Visser, C. B. Lamers, M. L. Janssen-Heijen, B. G. Taal, *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 1295-1300.
- [142] J. Mazzaglia Peter, E. Berber, M. Milas, E. Siperstein Allan, *Surgery* **2007**, *142*, 10-19.
- [143] M. van Essen, P. Krenning Eric, H. Bakker Willem, W. de Herder Wouter, O. van Aken Maarten, J. Kwekkeboom Dik, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 1219-1227.

- [144] D. J. Kwekkeboom, W. W. de Herder, B. L. Kam, C. H. van Eijck, M. van Essen, P. P. Kooij, R. A. Feelders, M. O. van Aken, E. P. Krenning, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 2124-2130.
- [145] P. Kitabgi, F. Checler, J. Mazella, J. P. Vincent, *Rev. Clin. Basic Pharm.* **1985**, *5*, 397-486.
- [146] J. P. Vincent, *Cell. Mol. Neurobiol.* **1995**, *15*, 501-512.
- [147] W. H. Rostene, M. J. Alexander, *Front. Neuroendocrinol.* **1997**, *18*, 115-173.
- [148] E. Hermans, J. M. Maloteaux, *Pharmacol. Ther.* **1998**, *79*, 89-104.
- [149] P. Kitabgi, C. B. Nemeroff, Editors, *The Neurobiology of Neurotensin. [In: Ann. N. Y. Acad. Sci.]*, **1992**.
- [150] S. Andersson, S. Rosell, U. Hjelmquist, D. Chang, K. Folkers, *Acta. Physiol. Scand.* **1977**, *100*, 231-235.
- [151] K. Thor, S. Rosell, *Gastroenterology* **1986**, *90*, 27-31.
- [152] B. Kihl, A. Rokaeus, S. Rosell, L. Olbe, *Scand. J. Gastroenterol.* **1981**, *16*, 513-526.
- [153] I. Baca, G. E. Feurle, A. Schwab, U. Mittmann, W. Knauf, T. Lehnert, *Digestion* **1982**, *23*, 174-183.
- [154] S. Andersson, D. Chang, K. Folkers, S. Rosell, *Life Sci.* **1976**, *19*, 367-370.
- [155] P. S. Olsen, J. H. Pedersen, P. Kirkegaard, H. Been, F. Stadil, J. Fahrenkrug, J. Christiansen, *Gut* **1984**, *25*, 481-484.
- [156] M. J. Armstrong, M. C. Parker, C. F. Ferris, S. E. Leeman, *Am. J. Physiol.* **1986**, *251*, 823-829.
- [157] P. Kitabgi, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2002**, *5*, 764-776.
- [158] M. Slogoff, B. M. Evers, *Encyclopedia of Hormones* **2003**, 45-53.
- [159] R. P. Thomas, M. R. Hellmich, C. M. Townsend, Jr., B. M. Evers, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 571-599.
- [160] E. B. Binder, B. Kinkead, M. J. Owens, C. B. Nemeroff, *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 454-486.
- [161] B. M. Evers, M. Izukura, D. H. Chung, D. Parekh, K. Yoshinaga, G. H. Greeley, Jr., T. Uchida, C. M. Townsend, Jr., J. C. Thompson, *Gastroenterology* **1992**, *103*, 86-91.
- [162] B. M. Evers, M. Izukura, C. M. Townsend, Jr., T. Uchida, J. C. Thompson, *Ann. Surg.* **1990**, *211*, 630-638.
- [163] G. E. Feurle, B. Mueller, E. Rix, *Gut* **1987**, *28*, 19-23.
- [164] J. G. Wood, H. D. Hoang, L. J. Bussjaeger, T. E. Solomon, *Am. J. Physiol.* **1988**, *255*, G813-817.
- [165] J.-P. Vincent, J. Mazella, P. Kitabgi, *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 302-309.
- [166] J. Mazella, K. Leonard, J. Chabry, P. Kitabgi, J. P. Vincent, A. Beaudet, *Brain Res.* **1991**, *564*, 249-255.
- [167] C. Granier, J. van Rietschoten, P. Kitabgi, C. Poustis, P. Freychet, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 117-124.
- [168] P. Kitabgi, C. Poustis, C. Granier, J. Van Rietschoten, J. Rivier, J. L. Morgat, P. Freychet, *Mol. Pharmacol.* **1980**, *18*, 11-19.
- [169] J. Elek, W. Pinzon, K. H. Park, R. Narayanan, *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 53-58.
- [170] S. Somai, A. Gompel, W. Rostene, P. Forgez, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295*, 482-488.
- [171] T. W. Moody, D. N. Carney, L. Y. Korman, A. F. Gazdar, J. D. Minna, *Life Sci.* **1985**, *36*, 1727-1732.
- [172] T. W. Moody, D. Chan, J. Fahrenkrug, R. T. Jensen, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 495-509.
- [173] L. Seethalakshmi, S. P. Mitra, P. R. Dobner, M. Menon, R. E. Carraway, *Prostate* **1997**, *31*, 183-192.

- [174] I. Sehgal, S. Powers, B. Huntley, G. Powis, M. Pittelkow, N. J. Maihle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 4673-4677.
- [175] B. M. Evers, Z. Zhou, V. Dohlen, S. Rajaraman, J. C. Thompson, C. M. Townsend, Jr., *Ann. Surg.* **1996**, *223*, 461-470.
- [176] S. Sumi, B. M. Evers, C. M. Townsend, Jr., K. Yoshinaga, T. Uchida, M. Murakami, K. Sato, J. Ishizuka, J. C. Thompson, *Surg. Oncol.* **1993**, *2*, 267-272.
- [177] R. A. Ehlers, S. Kim, Y. Zhang, R. T. Ethridge, C. Murrilo, M. R. Hellmich, D. B. Evans, C. M. Townsend, Jr., B. Mark Evers, *Ann. Surg.* **2000**, *231*, 838-848.
- [178] P. Chalon, N. Vita, M. Kaghad, M. Guillemot, J. Bonnin, B. Delpech, G. Lefur, P. Ferrara, D. Caput, *FEBS Lett.* **1996**, *386*, 91-94.
- [179] J. Mazella, J.-M. Botto, E. Guillemare, T. Coppola, P. Sarret, J.-P. Vincent, *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 5613-5620.
- [180] K. Tanaka, M. Masu, S. Nakanishi, *Neuron* **1990**, *4*, 847-854.
- [181] J. Chabry, C. Labbe-Jullie, D. Gully, P. Kitabgi, J. P. Vincent, J. Mazella, *J. Neurochem.* **1994**, *63*, 19-27.
- [182] E. Hermans, J. N. Octave, J. M. Maloteaux, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 89-91.
- [183] J.-M. Botto, J. Chabry, P. Sarret, J.-P. Vincent, J. Mazella, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 585-590.
- [184] F. Souaze, W. Rostene, P. Forgez, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10087-10094.
- [185] F. Souaze, P. Forgez, *Peptides* **2006**, *27*, 2493-2501.
- [186] C. M. Petersen, M. S. Nielsen, A. Nykjaer, L. Jacobsen, N. Tommerup, H. H. Rasmussen, H. Roigaard, J. Gliemann, P. Madsen, S. K. Moestrup, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3599-3605.
- [187] J. Mazella, *Cell. Signalling* **2001**, *13*, 1-6.
- [188] M. S. Nielsen, C. Jacobsen, G. Olivecrona, J. Gliemann, C. M. Petersen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8832-8836.
- [189] C. Munck Petersen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, J. Tauris, L. Jacobsen, J. Gliemann, S. K. Moestrup, P. Madsen, *EMBO J.* **1999**, *18*, 595-604.
- [190] A. Nykjaer, R. Lee, K. Teng Kenneth, P. Jansen, P. Madsen, S. Nielsen Morten, C. Jacobsen, M. Kliemannel, E. Schwarz, E. Willnow Thomas, L. Hempstead Barbara, M. Petersen Claus, *Nature* **2004**, *427*, 843-848.
- [191] V. Navarro, S. Martin, P. Sarret, M. S. Nielsen, C. M. Petersen, J. P. Vincent, J. Mazella, *FEBS Lett.* **2001**, *495*, 100-105.
- [192] B. Z. Lin, P. F. Pilch, K. V. Kandror, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24145-24147.
- [193] N. J. Morris, S. A. Ross, W. S. Lane, S. K. Moestrup, C. M. Petersen, S. R. Keller, G. E. Lienhard, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3582-3587.
- [194] E. Dicou, J.-P. Vincent, J. Mazella, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *78*, 92-99.
- [195] S. Martin, J. M. Botto, J. P. Vincent, J. Mazella, *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 210-215.
- [196] S. Martin, V. Navarro, J. P. Vincent, J. Mazella, *Gastroenterology* **2002**, *123*, 1135-1143.
- [197] C. Dal Farra, P. Sarret, V. Navarro, J.-M. Botto, J. Mazella, J.-P. Vincent, *Int. J. Cancer* **2001**, *92*, 503-509.
- [198] S. Reichlin, *J. Lab. Clin. Med.* **1987**, *109*, 320-326.
- [199] L. Mandarino, D. Stenner, W. Blanchard, S. Nissen, J. Gerich, N. Ling, P. Brazeau, P. Bohlen, F. Esch, R. Guillemin, *Nature* **1981**, *291*, 76-77.
- [200] R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, R. Guillemin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 684-688.
- [201] T. Reisine, G. I. Bell, *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 427-442.
- [202] D. Roosterman, C. Kempkes, G. S. Cottrell, B. E. Padilla, N. W. Bunnett, C. W. Turck, M. Steinhoff, *Endocrinology* **2008**, *149*, 2200-2207.

- [203] O. Nilsson, L. Kolby, B. Wangberg, A. Wigander, H. Billig, L. William-Olsson, M. Fjalling, E. Forssell-Aronsson, H. Ahlman, *Br. J. Cancer* **1998**, 77, 632-637.
- [204] S. Krantic, I. Goddard, A. Saveanu, N. Giannetti, J. Fombonne, A. Cardoso, P. Jaquet, A. Enjalbert, *Eur. J. Endocrinol.* **2004**, 151, 643-655.
- [205] J. C. Reubi, *Neuroendocrinology* **2004**, 80, 51-56.
- [206] S. W. J. Lamberts, A.-J. van Der Lely, W. W. de Herder, L. J. Hofland, *N. Engl. J. Med.* **1996**, 334, 246-254.
- [207] W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, Pless, *Life Sci.* **1982**, 31, 1133-1140.
- [208] A. G. Harris, *Gut* **1994**, 35, S1-S4.
- [209] P. M. Stewart, K. F. Kane, S. E. Stewart, I. Lancranjan, M. C. Sheppard, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1995**, 80, 3267-3272.
- [210] E. Bajetta, G. Procopio, L. Catena, A. Martinetti, S. De Dosso, S. Ricci, A. S. Lecchi, P. F. Boscani, S. Iacobelli, G. Carteni, F. De Braud, P. Loli, A. Tartaglia, R. Bajetta, L. Ferrari, *Cancer* **2006**, 107, 2474-2481.
- [211] S. Ricci, A. Antonuzzo, L. Galli, C. Orlandini, M. Ferdeghini, G. Boni, M. Roncella, F. Mosca, P. F. Conte, *Am. J. Clin. Oncol.* **2000**, 23, 412-415.
- [212] R. G. Long, J. R. Peters, S. R. Bloom, M. R. Brown, W. Vale, J. E. Rivier, D. G. Grahame-Smith, *Gut* **1981**, 22, 549-553.
- [213] S. M. Wood, M. E. Kraenzlin, T. E. Adrian, S. R. Bloom, *Gut* **1985**, 26, 438-444.
- [214] C. Bruns, G. Weckbecker, F. Raulf, K. Kaupmann, P. Schoeffter, D. Hoyer, H. Lubbert, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1994**, 733, 138-146.
- [215] J. C. Reubi, J.-C. Schar, B. Waser, S. Wenger, A. Heppeler, J. S. Schmitt, H. R. Macke, *Eur. J. Nucl. Med.* **2000**, 27, 273-282.
- [216] A. Berchanski, A. Lapidot, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1896-1906.
- [217] S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S. F. Dowdy, *Science* **1999**, 285, 1569-1572.
- [218] J. B. Rothbard, E. Kreider, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, C. L. VanDeusen, L. Wright, B. L. Wylie, P. A. Wender, *Cell-Penetrating Pept.* **2002**, 141-160.
- [219] D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, *J. Pept. Res.* **2000**, 56, 318-325.
- [220] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 13003-13008.
- [221] S. M. Fuchs, R. T. Raines, *Biochemistry* **2004**, 43, 2438-2444.
- [222] A. Wender Paul, B. Rothbard Jonathan, C. Jessop Theodore, L. Kreider Erik, L. Wylie Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13382-13383.
- [223] M. Rueping, Y. Mahajan, M. Sauer, D. Seebach, *ChemBioChem* **2002**, 3, 257-259.
- [224] N. Umezawa, M. A. Gelman, M. C. Haigis, R. T. Raines, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 368-369.
- [225] S. M. Fuchs, R. T. Raines, *Protein Science* **2005**, 14, 1538-1544.
- [226] T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 2437-2443.
- [227] P. A. Wender, J. B. Rothbard, T. C. Jessop, E. L. Kreider, B. L. Wylie, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13382-13383.
- [228] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 585-590.
- [229] M. Lundberg, M. Johansson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 291, 367-371.
- [230] M. Belting, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 145-151.
- [231] M. Yanagishita, V. C. Hascall, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 10270-10283.
- [232] M. Moulton Hong, H. Nelson Michelle, A. Hatlevig Susie, T. Reddy Muralimohan, L. Iversen Patrick, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 290-299.

- [233] S. Futaki, W. Ohashi, T. Suzuki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, H. Harashima, Y. Sugiura, *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 1005-1011.
- [234] L. Chen, L. R. Wright, C. H. Chen, S. F. Oliver, P. A. Wender, D. Mochly-Rosen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1123-1129.
- [235] K. Zhao, G.-M. Zhao, D. Wu, Y. Soong, A. V. Birk, P. W. Schiller, H. H. Szeto, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34682-34690.
- [236] H. H. Szeto, *AAPS J.* **2006**, *8*, E277-E283.
- [237] K. Zhao, G. Luo, G.-M. Zhao, P. W. Schiller, H. H. Szeto, *J. Pharmacol. Exp.* **2003**, *304*, 425-432.
- [238] C. C. Winterbourn, H. N. Parsons-Mair, S. Gebicki, J. M. Gebicki, M. J. Davies, *Biochem. J.* **2004**, *381*, 241-248.
- [239] K. Zhao, G. Luo, S. Giannelli, H. H. Szeto, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 1796-1806.
- [240] H. H. Szeto, *AAPS Journal* **2006**, *8*, E277-E283.
- [241] D. A. Thomas, C. Stauffer, K. Zhao, H. Yang, V. K. Sharma, H. H. Szeto, M. Suthanthiran, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 213-222.
- [242] W. Neupert, J. M. Herrmann, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 723-749.
- [243] A. Mayer, W. Neupert, R. Lill, *Cell* **1995**, *80*, 127-137.
- [244] K. Hill, K. Model, M. T. Ryan, K. Dietmeier, F. Martin, R. Wagner, N. Pfanner, *Nature* **1998**, *395*, 516-521.
- [245] T. Stan, U. Ahting, M. Dembowski, K.-P. Kunkele, S. Nussberger, W. Neupert, D. Rapaport, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4895-4902.
- [246] U. Ahting, M. Thieffry, H. Engelhardt, R. Hegerl, W. Neupert, S. Nussberger, *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 1151-1160.
- [247] C. Sirrenberg, M. Endres, H. Folsch, R. A. Stuart, W. Neupert, M. Brunner, *Nature* **1998**, *391*, 912-915.
- [248] C. Sirrenberg, M. F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert, M. Brunner, *Nature* **1996**, *384*, 582-585.
- [249] C. M. Koehler, E. Jarosch, K. Tokatlidis, K. Schmid, R. J. Schweyen, G. Schatz, *Science* **1998**, *279*, 369-373.
- [250] J. C. Young, N. J. Hoogenraad, F. U. Hartl, *Cell* **2003**, *112*, 41-50.
- [251] A. Matouschek, N. Pfanner, W. Voos, *EMBO Rep.* **2000**, *1*, 404-410.
- [252] H.-P. Braun, U. K. Schmitz, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 1043-1045.
- [253] S. Asayama, E. Kawamura, S. Nagaoka, H. Kawakami, *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 468-470.
- [254] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [255] M. Neukamm, Ruhr-Universität Bochum (Bochum), **2007**.
- [256] W. Mier, R. Eritja, A. Mohammed, U. Haberkorn, M. Eisenhut, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 855-860.
- [257] H.-I. Liu, L. Huo, L. Wang, *Acta Pharmacol. Sin.* **2004**, *25*, 1380-1386.
- [258] S. Chen, Y. Xie, C. Wang, C. Tang, *Aizheng* **2009**, *28*, 673-678.
- [259] Y. Xie, S. Chen, C.-H. Wang, C.-W. Tang, *Chinese journal of hepatology* **2009**, *17*, 759-764.
- [260] C. Hansch, *Accounts Chem. Res.* **1969**, *2*, 232-239.
- [261] D. A. Brent, J. J. Sabatka, D. J. Minick, D. W. Henry, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1014-1020.
- [262] L. R. Snyder, J. W. Dolan, J. R. Gant, *J. Chromatogr.* **1979**, *165*, 3-30.
- [263] M. S. Mirrlees, S. J. Moulton, C. T. Murphy, P. J. Taylor, *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 615-619.
- [264] U. Hoffmanns, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Heidelberg), **2004**.

-
- [265] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3-26.
- [266] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5421-5426.
- [267] R. J. Gillies, N. Didier, M. Denton, *Anal. Biochem.* **1986**, 159, 109-113.
- [268] Y. Yang, D. W. Jung, D. G. Bai, G. S. Yoo, J. K. Choi, *Electrophoresis* **2001**, 22, 855-859.
- [269] F. Noor, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Heidelberg), **2005**.
- [270] A. Pinto, Ruhr-Universität Bochum (Bochum), **2007**.
- [271] P. Nielsen, H. C. Heinrich, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 45, 385-391.
- [272] H. Kief, R. R. Crichton, H. Baehr, K. Engelbart, R. Lattrell, *Proteins Iron Metab.* **1977**, 107-114.
- [273] R. A. Yeary, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1969**, 15, 666-676.
- [274] R. J. Ward, L. C. Kuhn, P. Kaldy, A. Florence, T. J. Peters, R. R. Crichton, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 220, 927-931.
- [275] P. Pigeon, S. Top, A. Vessieres, M. Huche, E. A. Hillard, E. Salomon, G. Jaouen, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2814-2821.
- [276] O. Payen, S. Top, A. Vessieres, E. Brule, M.-A. Plamont, M. J. McGlinchey, H. Mueller-Bunz, G. Jaouen, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1791-1799.
- [277] A. Nguyen, S. Top, P. Pigeon, A. Vessieres, E. A. Hillard, M.-A. Plamont, M. Huche, C. Rigamonti, G. Jaouen, *Chem.-Eur. J.* **2009**, 15, 684-696.
- [278] A. Gross, N. Metzler-Nolte, *J. Organomet. Chem.* **2009**, 694, 1185-1188.
- [279] E. A. Hillard, F. C. de Abreu, D. C. M. Ferreira, G. Jaouen, M. O. F. Goulart, C. Amatore, *Chem. Commun.* **2008**, 2612-2628.
- [280] M. W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, e45.
- [281] P. C. Reeves, *Org. Synth.* **1977**, 56, 28-31.
- [282] P. E. Kündig, Monnier, Florian R., *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 901-904.
- [283] K. Schlotter, F. Boeckler, H. Huebner, P. Gmeiner, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3628-3635.
- [284] J. E. Sheats, M. D. Rausch, *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 3245-3249.

Tab. 2.1: Übersicht über die synthetisierten Verbindungen.

Nr.	Abkürzung	Sequenz
<u>1</u>	FcCOOH	CpFeC ₅ H ₄ COOH
<u>2</u>	RcH	Cp ₂ Ru
<u>3</u>	RcCOOH	CpRuC ₅ H ₄ COOH
<u>4</u>	CcCOOH	CpCo ⁺ C ₅ H ₄ COOH PF ₆ ⁻
<u>5</u>	Ac-Octreo-OH	Ac-fCFwKTCT-OH
<u>6</u>	Ac-Lys(FITC)-Octreo-OH	Ac-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>7</u>	FcC(O)-Octreo-OH	FcC(O)-fCFwKTCT-OH
<u>8</u>	FcC(O)-Lys(FITC)-Octreo-OH	FcC(O)-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>9</u>	FcC(O)-Lys(FITC)-Octreo(Acm)-OH	FcC(O)-K(FITC)-fC(Acm)-FwKTC(ACM)-T-OH
<u>10</u>	RcC(O)-Octreo-OH	RcC(O)-fCFwKTCT-OH
<u>11</u>	RcC(O)-Lys(FITC)-Octreo-OH	RcC(O)-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>12</u>	CcC(O)-Octreo-OH	CcC(O)-fCFwKTCT-OH
<u>13</u>	CcC(O)-Lys(FITC)-Octreo-OH	CcC(O)-K(FITC)-fCFwKTCT-OH
<u>14</u>	Pent-Octreo-OH	Pentin-fCFwKTCT-OH
<u>15</u>	Co-Pent-Octreo-OH	Co ₂ (CO) ₆ -Pent-fCFwKTCT-OH
<u>16</u>	Ac-PolyR-Lys-NH ₂	Ac-RRRRRRRRRFFK-NH ₂
<u>17</u>	Ac-PolyR-Lys(FITC)-NH ₂	Ac-RRRRRRRRRFFK(FITC)-NH ₂
<u>18</u>	FcC(O)-PolyR-Lys-NH ₂	FcC(O)-RRRRRRRRRFFK-NH ₂
<u>19</u>	FcC(O)-PolyR-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-RRRRRRRRRFFK(FITC)-NH ₂
<u>20</u>	RcC(O)-PolyR-Lys-NH ₂	RcC(O)-RRRRRRRRRFF-K-NH ₂
<u>21</u>	RcC(O)-PolyR-Lys(FITC)-NH ₂	RcC(O)-RRRRRRRRRFF-K(FITC)-NH ₂
<u>22</u>	Ac-NT-Lys(FITC)-NH ₂	Ac-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>23</u>	FcC(O)-NT-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>24</u>	FcC(O)-NTscr-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-IPLRYRK(FITC)-NH ₂
<u>25</u>	FcC(O)-Lys(FITC)-NT-OH	FcC(O)-K(FITC)-RRPYIL-OH
<u>26</u>	RcC(O)-NT-Lys(FITC)-NH ₂	RcC(O)-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>27</u>	CcC(O)-NT-Lys(FITC)-NH ₂	CcC(O)-RRPYILK(FITC)-NH ₂
<u>28</u>	RcC(O)-NT-OH	RcC(O)-RRPYIL-OH
<u>29</u>	RcC(O)-Pgl-NT-OH	RcC(O)-Pgl-RRPYILK-OH
<u>30</u>	RcC(O)-Pgl(Co)-NT-OH	RcC(O)-Pgl(Co ₂ (CO) ₆)-RRPYILK-OH
<u>31</u>	Ac-Phe-Arg-Phe-Lys-NH ₂	Ac-FRFFK-NH ₂
<u>32</u>	FcC(O)-Arg-Phe-Lys-NH ₂	FcC(O)-RFFK-NH ₂
<u>33</u>	FcC(O)-Phe-Arg-Phe-Lys-NH ₂	FcC(O)-FRFFK-NH ₂
<u>34</u>	Ac-Phe-Arg-Phe-Lys(FITC)-NH ₂	Ac-FRFFK(FITC)-NH ₂
<u>35</u>	FcC(O)-Arg-Phe-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-RFFK(FITC)-NH ₂
<u>36</u>	FcC(O)-Phe-Arg-Phe-Lys(FITC)-NH ₂	FcC(O)-FRFFK(FITC)-NH ₂
<u>37</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Phe-Lys-Lys(Ac)-NH ₂	NH ₂ -FrFFK(Ac)-NH ₂
<u>38</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Phe-Lys-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -FrFFK(FcC(O))-NH ₂
<u>39</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Phe-Lys-Lys(RcC(O))-NH ₂	NH ₂ -FrFFK(RcC(O))-NH ₂
<u>40</u>	NH ₂ -D-Arg-Phe-Lys-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -rFFK(FcC(O))-NH ₂
<u>41</u>	NH ₂ -Phe-D-Arg-Lys(FcC(O))-Lys-NH ₂	NH ₂ -FrK(FcC(O))-K-NH ₂
<u>42</u>	NH ₂ -MTS-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFK-NH ₂
<u>43</u>	NH ₂ -MTS-Lys(Ac)-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(Ac)-NH ₂
<u>44</u>	NH ₂ -MTS-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(FcC(O))-NH ₂
<u>45</u>	NH ₂ -MTS-Lys(FITC)-Lys(FcC(O))-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(FITC)-K(FcC(O))-NH ₂
<u>46</u>	NH ₂ -MTS-Lys(RcC(O))-NH ₂	NH ₂ -MLSLRQSIRFFKG-K(RcC(O))-NH ₂