

Multimodale radioaktive Konstrukte zur Diagnostik und Therapie von Mamma- und Prostatakarzinomen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Feodor Braun

aus Charkiv

2019

Berichtersteller:

Prof. Dr. Ines Neundorf

Prof. Dr. Fabian Mohr

Tag der mündlichen Prüfung:

29.10.2019

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente und Untersuchungen wurden im Zeitraum vom Februar 2015 bis zum Mai 2019 am Institut für Biochemie der Universität zu Köln unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Ines Neundorf statt.

Zusammenfassung

Prostata- und Brustkrebs gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Neben den konventionellen Behandlungsmethoden, wie der Resektion von lokalen Tumoren, Strahlen-, Hormon- und Chemotherapie, finden auf dem Tracerprinzip basierte, zielgerichtete Radionuklidbehandlungen immer mehr Anwendung. Durch die Entwicklung von neuen hochpotenten Vehikelmolekülen können Radionuklide noch wirksamer in das Tumorgewebe eingeschleust und je nach Radionuklid für Diagnose- bzw. Therapiezwecke verwendet werden.

Im Zuge dieser Arbeit sollen hochpotente biologisch aktive Substanzen (Liganden) für die Markierung mit therapeutischen bzw. diagnostischen Radionukliden modifiziert werden. Desweiteren sollten die so erhaltenen Vehikelmoleküle auf ihre Anwendbarkeit als Vektoren gegen prostata- bzw. brustkrebsspezifische Targets wie Androgen- (AR) bzw. Estrogenrezeptoren (ER) untersucht werden.

Als AR-Ligand wurde die nicht steroidale, irreversibel bindende Verbindung EPI-046 verwendet. Als ER-Ligand wurde das native Hormon 17β -Estradiol und eine hoch affine modifizierte Form desselben, 11α -Ethyl- 17β -estradiol verwendet. Die AR bzw. ER-Liganden wurden mit DOTA-Chelatoren gekoppelt, mit ^{177}Lu bzw. ^{68}Ga markiert und auf die Stabilität der Markierungsprodukte untersucht. Für die Affinitätsbeurteilung der radioaktiv markierten Estrogenkonstrukte erfolgte sowohl mittels eines speziell dafür entwickelten Bindungsassays, als auch mittels eines kommerziell erhältlichen Fluoreszenz-Depolarisationsassays (FD Assay). Für die Beurteilung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Radiotracer, wurde ein *in ovo* Assay etabliert.

Die Androgen- bzw. Estrogenliganden konnten über einen PEG₃-Spacer mit einem DOTA-Chelator gekoppelt werden. Die ^{177}Lu bzw. ^{68}Ga Markierung konnte mit einer chemischen Reinheit von >96% und einer spezifischen Aktivität von 40 MBq/nmol durchgeführt werden. Die Stabilität der neunten Radiovektoren im Humansrum betrug nach 48 h >92%. Im Fall der DOTA-modifizierten Estrogene konnten deutliche Affinitätsverluste zum ER festgestellt werden. Nichtsdestotrotz wies das hochaffine 11α -Ethyl- 17β -estradiol-PEG₃-DOTA eine ausreichend hohe Affinität mit einem K_d -Wert von 24 nM auf.

Die Untersuchung der Pharmakokinetik des EPI-PEG₃-DOTA *in ovo* ergab eine Anreicherung der Substanz im AR-positiven Tumorgewebe.

Die Verbindungen „EPI“ und 11 α -Ethyl-17 β -estradiol stellen vielversprechende Liganden für die zielgerichtete Radionuklidbehandlung dar. Die ersten Ergebnisse sind vielversprechend weisen allerdings noch viel Verbesserungspotential auf.

Abstract

Prostate and breast cancer are among the most common cancers worldwide. In addition to conventional treatments such as resection of local tumors, radiation, hormone and chemotherapy, targeted radionuclide treatments are finding increasing application. Through the development of new highly potent vehicle molecules, radionuclides can be more efficiently introduced into the tumor tissue and used, depending on the radionuclide, for diagnostic or therapeutic purposes.

In the course of this work highly potent biologically active substances (ligands) should be chemically modified for radionuclide labelling by therapeutic or diagnostic radionuclides. Furthermore, the vehicle molecules should be tested for their suitability as vectors against prostate or breast cancer specific targets such as androgen (AR) or estrogen receptors (ER).

As the AR ligand, the non-steroidal, irreversibly binding compound EPI-046 was used. As ER ligands were used the native hormone 17 β -estradiol and a highly affine modified form thereof, 11 α -ethyl-17 β -estradiol. The AR and ER ligands were coupled with DOTA chelators, labeled with ^{177}Lu and ^{68}Ga and assayed for their stability *in vitro*. The affinity assessment of the radiolabelled estrogen constructs was carried out by a binding assay specially developed for this purpose and by a commercially available fluorescence depolarization assay (FD assay). For the evaluation of the pharmacokinetic properties of radiotracers, an *in ovo* assay was established.

The androgen and estrogen ligands could be coupled via a PEG₃ spacer with a DOTA chelator. The ^{177}Lu or ^{68}Ga labeling could be performed with a chemical purity of >96% and a specific activity of 40 MBq / nmol. The stability of the radiolabelled estrogen constructs in the human serum was >92% after 48 h. In the case of the DOTA-modified estrogens, significant affinity losses to the ER were found. Nonetheless, the high affinity 11 α -ethyl-17 β -estradiol PEG₃ DOTA had a sufficiently high affinity with a K_d value of 24 nM.

The compounds EPI and 11 α -ethyl-17 β -estradiol are promising ligands for targeting radionuclide treatment. The first results are promising, but there is still much room for improvement.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Prostatakarzinom.....	1
1.1.1 Behandlung des PC	2
1.2 Mammakarzinom.....	3
1.2.1 Strategien zur Therapie des Mammakarzinoms.....	4
1.3 Targeted Radionuclide Therapy (TRT)	5
1.4.1 ⁶⁸ Ga.....	8
1.4.2 ¹⁷⁷ Lu	10
1.5 Estrogenrezeptor als mögliches Target für Brustkrebs	12
1.5.1 ER Liganden.....	13
1.6 Androgenrezeptor AR	15
1.6.1 AR Liganden	16
1.7 Affinität zum Rezeptor	17
1.7.1 IC ₅₀	18
1.8 Sättigungsexperiment	20
1.9 Chorion-Allantois Membran (CAM) von Hühnereiern (HE-CAM-Experiment)	22
2 Zielsetzung.....	23
3 Ergebnisse und Diskussion	25
3.1 Aufbau des Tracers	25
3.1.1 Liganden.....	26
3.1.2 Chelator und Spacer	29
3.2 Synthese	30

3.2.1	Synthese des EPI-046	30
3.2.2	Synthese des EsECl	32
3.2.3	Synthese der Ligand-PEG-DOTA Konstrukte.....	33
3.3	Markierungs- und Stabilitätsstudien	38
3.3.1	¹⁷⁷ Lu- und ⁶⁸ Ga-Markierung.....	38
3.3	Affinitätsstudien.....	44
3.3.1	Bindungsassay	44
3.3.1.1	Aufbau des neuen Bindungsassays	45
3.3.1.2	Sättigungsexperimente	45
3.3.3	Xenotransplantation an der Chorioallantoismembran (CAM)	51
3.3.4	PET Aufnahmen der Tumore auf der CAM des Hühnereis	54
3.3.5	Fazit	58
4	Materialien und Methoden	59
4.1	Organochemische Synthesen.....	59
4.1.1	Geräte und Chemikalien	59
4.1.2	Massenspektrometrische Analyse	59
4.1.3	Präparative Säulenchromatographie	60
4.1.4	Preparative Aufreinigung mittels HPLC	60
4.1.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)	60
4.2	Synthesen	61
4.2.1	Synthese des B_TBDMS	61
4.2.2	Synthese des BP.....	62
4.2.3	Synthese des BPE.....	64
4.2.4	Synthese des BPECl	66
4.2.5	Synthese des EPI-P	68
4.2.6	Synthese des BPD	70

4.2.7 Synthese des EsP	72
4.2.8 Synthese des EsPD	73
4.2.9 Synthese des EesP	76
4.2.10 Synthese des EesPD	78
4.2.11 Synthese des EesFL.....	80
4.2.12 Synthese des EesL	82
4.2.13 Synthese des EesFL.....	84
4.2.14 Synthese des EesL	86
4.2.15 Synthese des EsECl	88
4.3 Radionuklidmarkierungen und Stabilitätsuntersuchungen	90
4.3.1 ¹⁷⁷ Lu-Markierung	90
4.3.2 ⁶⁸ Ga-Markierung.....	90
4.3.3 Qualitätskontrolle der Markierungsprodukte	90
4.3.4 Stabilitätsstudien	91
4.4 Affinitätsstudien.....	91
4.4.1 Durchführung des Bindungsassays	91
4.4.2 Ermittlung der IC ₅₀ -Werte mittels Fluoreszenz-depolarisations-Spektroskopie....	92
4.5 Kultivierung der Tumorzellen.....	93
4.6 CAM-Kultur	94
4.7 PET Untersuchungen	94
5 Literaturverzeichnis	95
6 Anhang	107
6.1 Abkürzungsverzeichnis	107
6.2 Anhang der Abbildungen und Schemata	109
6.3 Anhang der ergänzenden NMR-Spektren	112

1. Einleitung

1.1 Prostatakarzinom

Prostatakrebs ist nach dem Lungenkrebs die zweithäufigste maligne Erkrankung des Mannes weltweit. Im Jahr 2014 wurde bei schätzungsweise 1,1 Millionen Männern Prostatakrebs diagnostiziert; 70 % dieser Erkrankungen (etwa 759.000) wurden in Industrieländern festgestellt. Die Neuerkrankungsrate des Prostatakrebses, innerhalb einer beobachteten Population während eines bestimmten Zeitraums (Inzidenz), variiert mehr als 25-fach weltweit und ist in entwickelten Gebieten der Erde um ein Vielfaches höher. Die höchste verzeichnete Inzidenz für das Jahr 2012 wurde in Australien bzw. Neuseeland (111,6 pro 100.000 Einwohner) und in Nordamerika (97,2 pro 100.000 Einwohner) registriert. Dieser hohe Unterschied in der Inzidenz ist unter anderem auf die standardisierten Früherkennungsuntersuchungen, wie das (prostataspezifisches Antigen) PSA-Screening, zurückzuführen. Allerdings bleiben die Inzidenzen in bestimmten, weniger entwickelten Gebieten der Erde, wie der Karibik (79,8 pro 100.000 Einwohner), Südafrika (61,8 pro 100.000 Einwohner) und Südamerika (60,1 pro 100.000 Einwohner), relativ hoch. In Ost- bzw. Süd-Zentral-Asien (10,5 bzw. 4,5 pro 100.000 Einwohner) dagegen bleiben die Inzidenzraten generell eher niedriger.¹

Mit schätzungsweise 307.000 Todesfällen im Jahr 2012 ist Prostatakrebs die fünfhäufigste krebbedingte Todesursache weltweit bei Männern (6,6 % Todesfälle). Die Schwankung der Sterberate fällt nicht so hoch aus wie die der Häufigkeit der Neuerkrankungen. Auffallend ist jedoch, dass die Sterberate unter der Bevölkerung afrikanischer Abstammung besonders hoch ist. Somit wurden die meisten verzeichneten Sterbefälle durch Prostatakrebs in der Karibik (29 pro 100.000 Einwohner) sowie in Afrika (24 pro 100.000 Einwohner) diagnostiziert. In asiatischen Ländern ist die Sterblichkeit hingegen besonders niedrig (2,9 pro 100.000 Einwohner).^{1,2}

In Deutschland stellt Prostatakrebs die häufigste Krebserkrankung des Mannes und die dritthäufigste Krebstodesursache dar.³ Wie in den meisten anderen Industrieländern, wurde in den letzten Jahren auch in Deutschland durch die standardisierten Früherkennungsuntersuchungen eine steigende Inzidenzrate verzeichnet. Im Jahr 2018 wurden 60.700 Neuerkrankungen diagnostiziert.²

Im Gegensatz zu der Inzidenz ist seit Mitte der 1990er Jahre ein stetiger Abfall der Sterberate zu verzeichnen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Prostatakrebs liegt zurzeit bei 90 %. Allerdings können Sterbefälle auch nach längerem Verlauf, wie etwa durch rezidivbedingte Neuerkrankung, auftreten.²

1.1.1 Behandlung des PC

Die Tumorerkrankung der Prostata tritt überwiegend im hohen Alter auf und wird daher „Krebs des alten Mannes“ genannt. Ab dem 80. Lebensjahr wird eine Inzidenz von etwa 80 % verzeichnet. Dennoch versterben die meisten Männer nicht *an* sondern *mit* Prostatakrebs.^{4,5}

Die Behandlung des Prostatakrebses ist sehr variabel. Unter Berücksichtigung der Lebenserwartung, der Begleiterkrankungen, des Tumorstadiums und der Begleiterscheinungen, sind palliative, beobachtende oder kurative Behandlungsansätze möglich.

Aufgrund des langsamen Tumorwachstums des Prostatakrebses kann bei lokal begrenzten, nicht metastasierenden Tumoren die Behandlungsstrategie *Active Surveillance*^{6,7} angewendet werden. Bei diesem Ansatz wird davon ausgegangen, dass ein diagnostizierter Tumor keine nennenswerten Symptome verursachen wird und daher nur überwacht werden muß, um eine spontane Progression auszuschließen. Dem *Active Surveillance* steht das *Watchful Waiting*⁸ gegenüber. Diese Behandlungsstrategie findet für Patienten mit einer Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren Anwendung. Bei Patienten, die noch keine Beschwerden aufweisen, wird von einer kurativen Therapie abgeraten. Erst nach Auftreten einer starken Symptomatik, wie z. B. Schmerzen durch Skelettmetastasen, werden palliative Behandlungsmethoden in Betracht gezogen.⁹ Als Palliativmaßnahmen bei fortschreitender Tumorbildung wird sowohl die Hormontherapie als auch die Strahlentherapie angeboten.

Hormontherapie

Da das Wachstum der meisten Prostatakarzinomzellen vom Angebot des Dihydrotestosterons (DHT) abhängig ist, ist es möglich die Tumorprogression durch eine Kastration chirurgischer oder chemischer Art erheblich zu verlangsamen. Praktisch findet die chemische (pharmakologische) Kastration häufiger Anwendung als die chirurgische. Dabei

kann der pharmakologische Ansatz auf verschiedene Weise die Wirkung des DHT minimieren.¹⁰

Strahlentherapie

Die Strahlentherapie gehört neben der chirurgischen und der medikamentösen Therapie zu den grundlegenden Strategien der Krebsbehandlung. Die bei dieser Form der Therapie verwendete Strahlung führt direkt oder indirekt zu Schäden am Erbgut. Die grundlegende Wirkung der therapeutischen Anwendung der Strahlungswirkung besteht in der Absorption und Interaktion ionisierender Strahlung mit den somatischen Zellen. Dabei wirkt sich die Strahlung überwiegend auf das intra- und interzelluläre Wasser aus, was zur Bildung von Radikalen führt. Diese Radikale führen letztendlich zu DNA-Schäden, dem Hauptgrund der Zelltoxizität der radioaktiven Strahlung. Da die Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen über eine geringere Reparaturfähigkeit der DNA verfügen, sind sie somit anfälliger für Radioaktivität. Dies kann ausgenutzt werden, um den therapeutischen Effekt durch längere Expositionszeiten bei geringerer Strahlendosis zu erhöhen.^{11,12}

Radikale Prostatektomie

Zu den chirurgischen Standardverfahren bei der kurativen Behandlung von lokal begrenztem Prostatakrebs gehört die radikale Prostatektomie. Die radikale Prostatektomie ist ein operativer Eingriff zur Entfernung der gesamten Prostata mit oder ohne umgebenden Lymphknoten. Es kann entweder als ein offenes Verfahren durchgeführt werden oder unter Verwendung traditioneller bzw. robotergestützter laparoskopischer Techniken.^{13,14}

1.2 Mammakarzinom

Brustkrebs ist die zweithäufigste Krebserkrankung in der Welt und bei weitem die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Allein 2012 wurden schätzungsweise 1,67 Millionen Neuerkrankungen diagnostiziert, was 25 % aller Krebserkrankungen weltweit ausmacht.¹⁵ Es ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen, sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern. Beim Mammakarzinom ist, wie im Falle des Prostatakrebses, ebenfalls eine Schwankung der Inzidenzraten festzustellen. Es ist eine regionsabhängige Schwankung der Inzidenzen um fast das Vierfache mit Differenzen von 27 pro 100.000 Einwohner in

Mitteleuropa bzw. Ostasien und bis zu 96 pro 100.000 Einwohner in Westeuropa festzustellen.

Brustkrebs gilt als die fünfthäufigste Todesursache durch Krebs. In weniger entwickelten Regionen stellt er die häufigste Todesursache durch Krebs bei Frauen mit 14,3 % aller Krebstodesfälle und den zweithäufigsten Todesgrund in stärker entwickelten Ländern mit 15,4 % aller Krebstodesfälle dar. Die Schwankung der Sterberate zwischen den Weltregionen ist im Vergleich zu den Inzidenzen aufgrund von guten Therapiemöglichkeiten und daraus resultierenden Überlebensraten deutlich geringer. Somit wurde 2012 eine Sterberate von 6 pro 100.000 Einwohner in Ostasien und 20 pro 100.000 Einwohner in Westafrika verzeichnet.¹⁶

In den letzten Jahren sind die Neuerkrankungen an Brustkrebs in Deutschland auf rund 71.900 (2018) gestiegen und stellen daher auch auf unseren Breitengraden die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar.¹⁷ Brustkrebs wird häufig in einem Alter diagnostiziert, in dem die meisten übrigen Krebserkrankungen kaum eine Rolle spielen. Bei der Diagnostizierung des Mammakarzinoms ist jede vierte Frau jünger als 55 und jede zehnte jünger als 45. Trotz der gestiegenen Erkrankungszahlen, ist die Sterblichkeit in den letzten Jahren gesunken. Die Überlebensrate konnte durch die in der Therapie erzielten Fortschritte erhöht werden. Derzeit beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 87 %. Zwischen 2005 und 2009 wurde in Deutschland das qualitätsgesicherte Mammographie-Screening-Programm eingeführt. Frauen zwischen 50 und 69 Jahren werden seitdem alle zwei Jahre zu einer Röntgenuntersuchung der Brust eingeladen. Dadurch soll eine bessere Früherkennung gewährleistet und dadurch die Genesungschancen deutlich erhöht werden.¹⁷

1.2.1 Strategien zur Therapie des Mammakarzinoms

Die Behandlung des Mamakarzinoms wird in den meisten Fällen sehr individuell gehandhabt. Die genaue Behandlungsstrategie hängt von unterschiedlichen Faktoren ab: von der Lokalisation und der Größe des Tumors, der Anzahl der befallenen Lymphknoten, dem Grad der Fernmetastasierung und dem Verhältnis zwischen dem Tumor und dem Brustdrüsenvolumen.

Die Präferenz bei der Behandlung von nicht-metastasierenden Mamakarzinomen ist die komplette Resektion des Tumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand zum umliegenden, nicht befallenen Gewebe. Anschließend erfolgt eine Therapie von eventuell nicht diagnostizierten Metastasen.^{18,19}

Um eine lokale Rezidivrate beim Patienten zu vermindern, bietet sich die Radiotherapie an. Da intramammäre Rezidive zu Metastasenbildung neigen und sich somit zu einer erneuten Krebserkrankung ausbilden können, stehen diese im Fokus von Nachbehandlungsverfahren. Es wurde festgestellt, dass die Rate durch Bestrahlung von lokalen Rezidiven von ~35 % auf ~7 % gesenkt werden kann.²⁰

Um das Risiko der Bildung eines kontralateralen Mamakarzinoms zu vermindern, stellt die Hormontherapie eine weitere Behandlungsmethode dar. Dadurch ist es außerdem möglich, die Entstehung von Metastasen zu vermindern. Die Hormontherapie besteht im Wesentlichen aus 4 Ansätzen, die Einfluss auf den Hormonzyklus nehmen: Antagonisten des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH), Antiestrogene, Progesterone und Aromatasehemmer.^{21,22}

Eine wichtige Behandlungsmethode des Brustkrebses stellt die Chemotherapie dar. Sie wird bei Patienten mit Mastektomie Inzidenz, bei inoperablen Tumoren oder bei solchen, die eine Resistenz gegenüber einer Hormontherapie zeigen, angewandt.²³

1.3 Targeted Radionuclide Therapy (TRT)

Als eine mögliche Strategie in der Krebsbehandlung, findet die "Targeted Radionuclide Therapy" (TRT) immer mehr Anwendung.²⁴

TRT bildet die wichtigste Alternative zu herkömmlichen Antikrebstherapien. Dabei werden radioaktiv markierte, "tumoraffine" Verbindungen (Radiopharmaka) verwendet, sog. Tracer, die die Strahlung spezifisch und zielgerichtet an das Krebsgewebe transportieren und somit zu einer selektiven Anreicherung der Strahlung im Zielort führen. Durch eine solche lokalisierte Einbringung der ionisierenden Strahlung wird die Wirkung des Therapeutikums auf einen Zielort konzentriert und die Beschädigung des gesunden Gewebes weitestgehend vermindert.²⁵

Für diese Art der zielgerichteten Therapie werden Vehikelmoleküle (Vektoren) verwendet, wie bspw. Peptide, Antikörper, Hormone oder synthetische, körperfremde Substanzen, die eine ausreichend hohe, spezifische "Tumoraffinität" aufweisen. Die TRT kombiniert somit die günstigen Targeting-Eigenschaften dieser Vektoren mit den biologischen Auswirkungen des hohen linearen Energietransfers (LET) der Strahlung von Radioisotopen²⁵.

Verglichen mit herkömmlichen Strahlen- bzw. Chemotherapieansätzen hat die TRT den Vorteil, dass lediglich geringere Substanzmengen des Arzneimittels mit einer hohen Spezifität eingesetzt werden. Dadurch werden wiederum die Nebenwirkungen, wie die Strahlenbelastung des Gesamtorganismus gesenkt. Ferner können diese Wirkstoffe nicht nur in therapeutischen Bereichen sondern auch in Diagnoseverfahren Verwendung finden²⁵.

Für die TRT eignen sich verschiedene Arten von Radionukliden. Allerdings kann durch die Wahl eines bestimmten Radionuklids, der Verlauf der Therapie erheblich beeinflusst werden. Es gibt drei Hauptgruppen von therapeutischen Radionukliden: β -Strahler (^{90}Y , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{186}Re und ^{188}Re) Auger-Elektronenemitter (^{67}Cu , ^{111}In , ^{123}I und ^{125}I) und α -Strahler (^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac , und ^{227}Ac). Die am häufigsten verwendeten Radionuklide sind ^{131}I , ^{177}Lu und ^{90}Y .²⁶ Die Eignung der Radionuklide für die TRT wird hierbei durch mehrere Faktoren bestimmt:

Reichweite der Strahlung

Die Wahl des Radionuklids mit einer bestimmten Reichweite der Strahlung richtet sich nach dem Ort des Radiopharmakons im Tumor. Wie in der **Abbildung 1** zu erkennen, hat der Auger-Emitter eine relativ kurze Reichweite. Das bedeutet, dass das Radionuklid in die unmittelbare Nähe der DNA gelangen bzw. in den Zellkern direkt transportiert werden muss. α - und β -Radionuklide eignen sich hingegen eher für Radiopharmaka, die in der Zelle oder an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Eine Strahlungsreichweite von mehreren Zelldurchmessern ermöglicht durch den sog. „Kreuzfeuereffekt“ eine höhere therapeutische Wirkung im Tumorbereich. Allerdings geht eine höhere Strahlungsreichweite mit einer höheren Schädigung des umliegenden, gesunden Gewebes und somit mit einer höheren Toxizität einher. Die α -Strahler sind aufgrund ihrer relativ kurzen Reichweite von 50-90 μm und einem hohen linearen Energietransfer für die Anwendung in der TRT sehr aussichtsreich.

Allerdings wird ihre Verwendung durch die relativ kurzen Halbwertszeiten und die Herstellung im Zyklotron auf Fachzentren eingeschränkt.²⁷

Reichweite der Strahlung

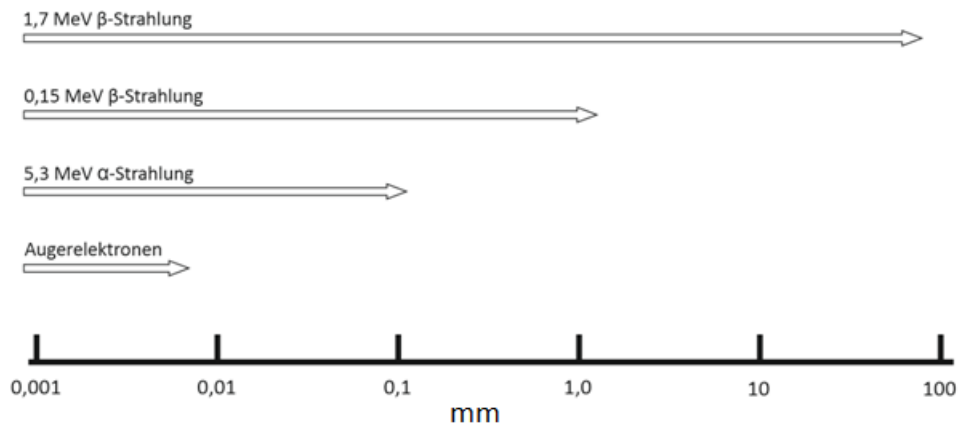


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reichweite einzelner Strahlungsarten.^{26,28}

Halbwertszeit

Im Wesentlichen bedingt die physikalische Halbwertszeit ($T_{1/2}$) eines Radionuklids die maximale Halbwertszeit des Radiopharmazeutikums im Tumor. Hinzu kommt, dass eine zu lange Halbwertszeit zu einer nicht optimierten Verteilung der Radioaktivität im Körper führen kann, wie z.B. durch frühzeitigen Abbau des Radiopharmakons.

Niedrige Gamma-Ausbeute

Die γ -Strahlung trägt zur Exposition des gesamten Organismus bei und wird daher nicht zur lokalen Tumorexposition genutzt. Allerdings können γ -Strahler zu diagnostischen Zwecken genutzt werden.

Chemie und Verfügbarkeit

Die chemische Form des Radionuklids ist entscheidend für seine Kupplung mit einem Tracermolekül. Dadurch ist die Verfügbarkeit dieser chemischen Form essentiell für die Bildung stabiler Radiopharmaka. Die Verfügbarkeit von Radionukliden und die damit verbundenen Kosten stellen somit einen wichtigen Betrachtungspunkt in der Herstellung von Radiopharmaka dar.^{26,27} Im Folgenden werden die Radionuklide ^{68}Ga und ^{177}Lu beschrieben, die aufgrund ihrer Verfügbarkeit und anderer nützlicher physikalischer Eigenschaften in Rahmen der Doktorarbeit verwendet wurden.

1.4.1 ^{68}Ga

Gallium ist ein selten vorkommendes Metall. Es kommt in der Natur überwiegend in Kombination mit Germanium-, Zink-, und Aluminiumerzen vor und setzt sich aus stabilen Isotopen ^{69}Ga mit 60,1 % und ^{71}Ga mit 39,9 % des Anteils im natürlichen Gallium zusammen.²⁹

In der medizinischen Anwendung kommt das ^{67}Ga als SPECT-Diagnostikum und das ^{68}Ga als PET-Diagnostikum zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur das ^{68}Ga verwendet.^{29,30}

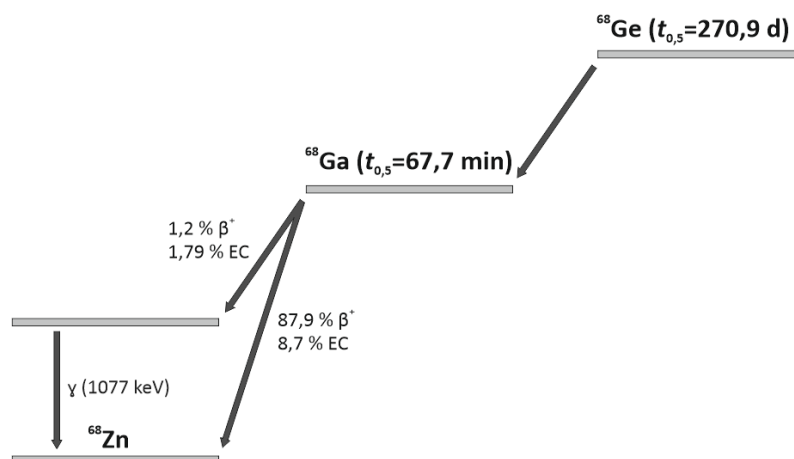


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Zerfalls von ^{68}Ge über ^{68}Ga zu ^{68}Zn .

Die Halbwertszeit von ^{68}Ga beträgt 67,7 min. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 89 % zerfällt das ^{68}Ga unter Positronenemission (β^+) und zu 11 % unter Elektroneneinfang (EC) zum stabilen ^{68}Zn (**Abb. 2**).

Das durch den Zerfallsmodus der Positronenemission freiwerdende Positron annihiliert unmittelbar nach dem Emissionsereignis mit einem Elektron. Diese Paarvernichtung bewirkt eine Photonenemission der Gammastrahlung, mit einem Energiegehalt von 511 keV, die in einem 180° Winkel zueinander emittiert werden (**Abb. 3**). Dieser Sachverhalt kann in einer Variante der Emissionscomputertomographie zu bildgebenden Diagnosezwecken, der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), verwendet werden.^{29,31,32}

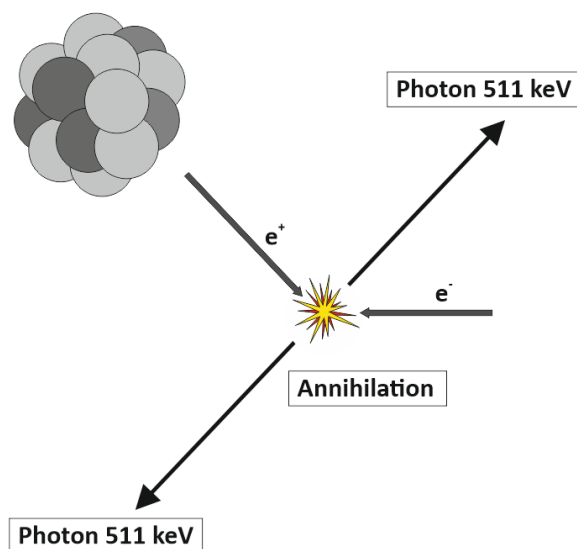


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Annihilation eines Positrons e^+ mit einem Elektron e^- zu zwei Gammaphotonen.

Aufgrund der geringen Halbwertszeit von 67,6 min ist eine Lieferung oder Lagerung des ^{68}Ga nur schwer möglich. Den Zugang zum ^{68}Ga bietet der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator. Hierbei wird das Tochternuklid ^{68}Ga aus dem Mutternuklid ^{68}Ge erzeugt. ^{68}Ge wird durch Protonenbestrahlung des stabilen Isotops ^{69}Ga , also über die $^{69}\text{Ga}(p,2n)$ -Reaktion hergestellt (**Abb. 4**).³¹

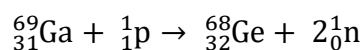


Abbildung 4: Kernreaktion der ${}^{68}\text{Ge}$ -Herstellung aus dem Tochternuklid ${}^{69}\text{Ga}$.

Mit einer Halbwertszeit von 270,9 Tagen liegt das ${}^{68}\text{Ge}$ im säkularen Gleichgewicht mit ${}^{68}\text{Ga}$ vor. Das gewährleistet eine gleichmäßige Menge des gebildeten ${}^{68}\text{Ga}$, die nach etwa 4 bis 5 h, nach einer ${}^{68}\text{Ga}$ -Entnahme, wieder den stationären Zustand erreicht. Allerdings ist die Maximalmenge des generierten Tochternuklids, von der Maximalmenge des vorliegenden Mutternuklids abhängig und nimmt mit der Halbwertszeit des Mutternuklids korrelativ ab.²⁹

Das ${}^{68}\text{Ge}$ liegt im Generator immobilisiert auf einer Trägermatrix vor. Das gebildete ${}^{68}\text{Ga}$ kann hingegen als ${}^{68}\text{Ga}^{3+}$ -Ion über eine HCl-Elution aus der Matrix gelöst werden. Mögliche co-eluierte Verunreinigungen wie Spuren von ${}^{68}\text{Ge}$ oder Matrixreste werden meist über einen Kationentauscher vom ${}^{68}\text{Ga}$ getrennt.

In wässriger Lösung ist die stabilste Oxidationszahl des Galliums +3. Wegen seiner amphoteren Eigenschaft liegt es im sauren als Ga^{3+} und als $\text{Ga}[\text{OH}]_4^-$ im Basischen vor. Als harte Lewis-Base bildet das dreiwertige Galliumion nach dem HSAB-Prinzip starke Komplexverbindungen mit Aminen und Carboxylaten, wobei es oktaedrisch von 6 Liganden koordiniert wird.^{33,34} Im komplexierten Zustand kann das Gallium mit organischen Verbindungen, wie bspw. Biomolekülen konjugiert werden.

1.4.2 ${}^{177}\text{Lu}$

Das ${}^{177}\text{Lu}$ spielt eine wesentliche Rolle in der therapeutischen Anwendung bspw. in der gezielten Radionuklidtherapie.

Es weist eine Halbwertszeit von 6,6 Tagen auf, eine niedrig energetische β^- -Strahlung von maximal 498 keV mit einer sehr geringen Reichweite von etwa zwei Millimetern und eine niedrige γ -Emission von maximal 113 keV; 6,2 % (**Abb. 5**).³⁵

Weitere Zerfallswahrscheinlichkeiten sind in

Tabelle 1 zusammengefasst.

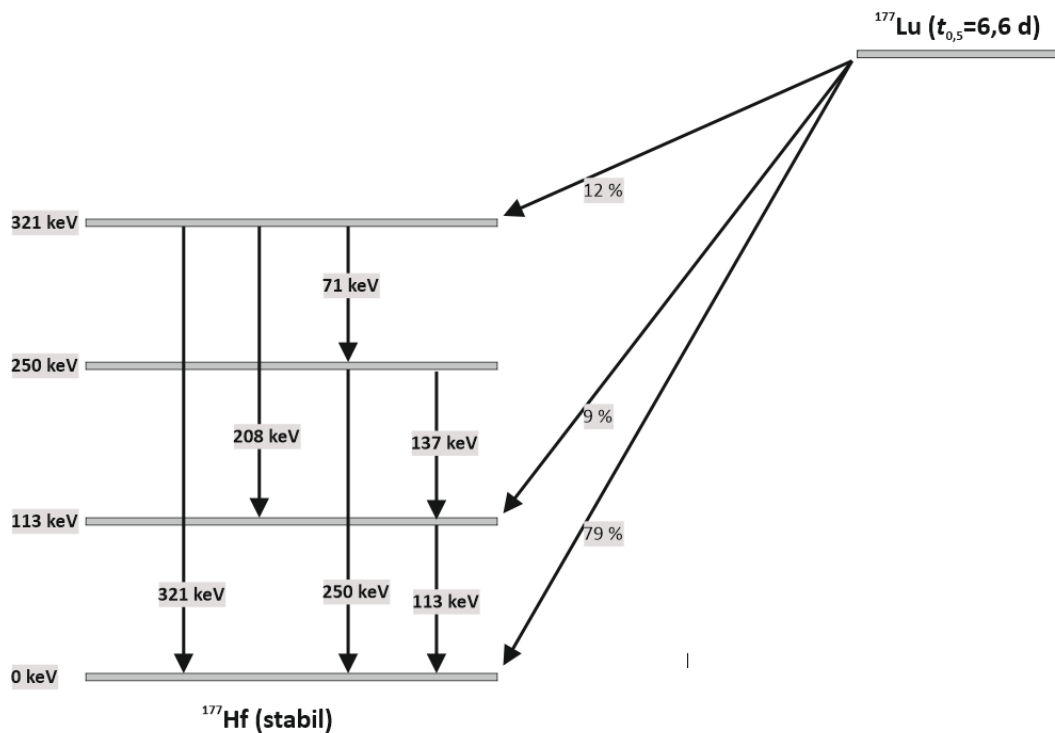


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Zerfalls von ^{177}Lu zu ^{177}Hf .

Tabelle 1: Die häufigsten Beta- und Gammaemissionen des ^{177}Lu .

β -Emission	γ -Emission
498 keV (79 %)	321,3 keV (0,22 %)
380 keV (9 %)	249,7 keV (0,21 %)
176 keV (12 %)	208,4 keV (11,00 %)
	112,95 keV (6,40 %)
	71,65 keV (0,15 %)

Aufgrund einer Gewebe-Penetrationsreichweite von ca. 2 mm eignet sich ^{177}Lu hervorragend zur Behandlung von kleineren Primärtumoren oder Metastasen von Prostata-, Brust-, Lungen- oder Pankreastumoren.^{36–38}

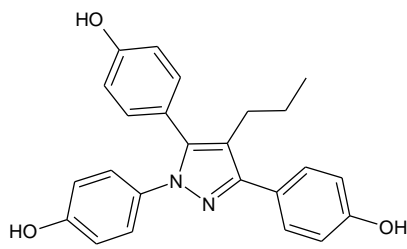
Die Herstellung des ^{177}Lu lässt sich hauptsächlich auf zwei Arten bewerkstelligen. Eine Methode sieht die Erzeugung des ^{177}Lu über die $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$ -Kernreaktion vor. Dabei wird das $^{176}\text{Lu}(\text{III})$ -Oxid unter Neutronenbeschuss zu ^{177}Lu umgewandelt. Als Nebenprodukt fällt bei dieser Methode das langlebige und aus medizinischer Sicht unerwünschte Isotop $^{177\text{m}}\text{Lu}$ mit einer Halbwertszeit von 160 Tagen an. Darüber hinaus liefert diese Methode immer ein geträgertes ^{177}Lu .³⁹

Eine moderne Methode zur Erzeugung des ^{177}Lu sieht eine $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb} \rightarrow ^{177}\text{Lu}$ - Kernreaktion vor. Dabei wird das ^{176}Yb durch Neutronenbeschuss zum kurzlebigen Radionuklid ^{177}Yb umgewandelt. Dieses zerfällt nach einer Halbwertszeit von 1,9 h zum gewünschten ^{177}Lu , welches anschließend vom ^{176}Yb und ^{177}Yb abgetrennt und Trägerfrei mit einer hohen Radionuklidreinheit eingesetzt werden kann.

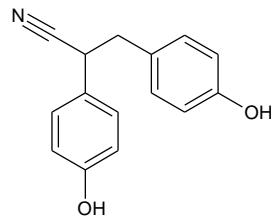
Die stabilste Oxidationszahl von Lutetium in Lösung ist +3. Das $\text{Lu}(\text{III})$ -Ion kann oktaedrisch von 6 Liganden und quadratisch-antiprismatisch von 8 Liganden koordiniert werden. Analog zum $\text{Ga}(\text{III})$, kann das $\text{Lu}(\text{III})$ in komplexierter Form mit organischen Verbindungen bspw. bioaktiven Liganden konjugiert werden.

1.5 Estrogenrezeptor als mögliches Target für Brustkrebs

Estrogenrezeptoren (ER) gehören zu der Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Als Steroidhormonrezeptoren sind ER an einer Vielzahl von pleiotropischen Vorgängen während verschiedener Entwicklungsstadien des Organismus von Säugetieren beteiligt.⁴⁰ Etwa 70-75 % aller beschriebenen Brustkrebsarten weisen eine ER-Expression auf.⁴¹⁻⁴³ Bis jetzt wurden bei Säugetieren zwei Arten von ERs entdeckt: $\text{ER}\alpha$ und $\text{ER}\beta$.⁴⁴⁻⁴⁶ Wobei $\text{ER}\beta$ in diversen weiteren isoformen Spleißvarianten ($\text{ER}\beta_{1-5}$) auftritt.⁴⁷ Die Funktionsweise der $\text{ER}\beta$ unterscheidet sich in einigen Fällen grundlegend von der der $\text{ER}\alpha$. Während $\text{ER}\alpha$ positive Brustkrebszellen, wie MCF7 oder T47D, eine eindeutig positive Abhängigkeit der Zellproliferation von $\text{ER}\alpha$ Agonisten, wie dem 17β -Estradiol aufweisen, führt die Einführung von $\text{ER}\beta 1$ in $\text{ER}\alpha$ positive Brustkrebszellen jedoch in der Regel zu einer Abnahme der Zellproliferation.⁴⁸ Es konnte gezeigt werden, dass durch gezielte $\text{ER}\alpha$ Agonisten (**Abb.6**), wie Propylpyrazoneatriol (**PPT**), die Zellproliferation angehoben und durch gezielte $\text{ER}\beta$ Agonisten, wie Diarylpropionitril (**DPN**), diese herabgesetzt werden kann.^{48,49}



Propylpyrazeletriol (**PPT**)



Diarylpropionitril (**DPN**)

Abbildung 6: Strukturformeln des ER α Agonisten Propylpyrazeletriol (**PPT**) und des ER β Agonisten, wie Diarylpropionitril (**DPN**).

Des weiteren ist ein stetiger Rückgang der Expressionsrate von ER β 1 während der Tumorgenese festgestellt worden.⁵⁰ Die genaue Funktion und die Rolle der einzelnen Isoformen des ER β bei der Kanzerogenese, sind bis zum heutigen Tag größtenteils unerforscht. Daher liegt der ER α im Fokus der klinischen Tumorbewertung und wird als ein entsprechendes Target angesehen.⁵¹ Es konnte in 20 % der Brustkrebstumoren eine Überexpression von ER α festgestellt werden.⁵² Zudem wurden die Ergebnisse für eine Korrelation von Brustkrebs und einer erhöhten ER α -Expression von vier weiteren Arbeitsgruppen bestätigt.⁵³⁻⁵⁶ Mit dem Alter erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der ER α -Überexpression.⁵⁷ Somit stellt der ER ein interessantes Target für die Brustkrebsbehandlung dar.

1.5.1 ER Liganden

Obwohl Estrogene eine wichtige regulatorische Rolle in physiologischen Vorgängen spielen (wie im Fortpflanzungssystem, Knochenstoffwechsel und in der Aufrechterhaltung des kardiovaskulären- und zentralen Nervensystems), wurden sie auch mit einem erhöhten Risiko des Brust- und Gebärmutterkrebses in Verbindung gebracht.⁵⁸⁻⁶¹ Frühe Therapien des BC beinhalteten eine chirurgische Entfernung der Eierstöcke, um den Estrogenspiegel des

Patienten zu senken. Durch eine gezielte Anwendung von schon seit den 1970er Jahren beschriebenen kompetitiven Inhibitoren, die eine Estrogen-ER-Bindung verhindern, konnten ähnliche Effekte in der Krebsbehandlung des BC erzielt werden. Diese Verbindungen finden ihre Anwendung als selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERM), wie Tamoxifen oder Raloxifen.^{62,63} Die Behandlung von ER-positiven Brustkrebszellen mit Antiestrogenen führt in einigen Fällen zu Apoptose oder zum Stillstand des Zellzyklus.⁶⁴ Im Folgenden werden einige Liganden vorgestellt, die aufgrund ihrer spezifischen ER-Affinität als Pharmazeutika eingesetzt werden (**Abb. 7**).

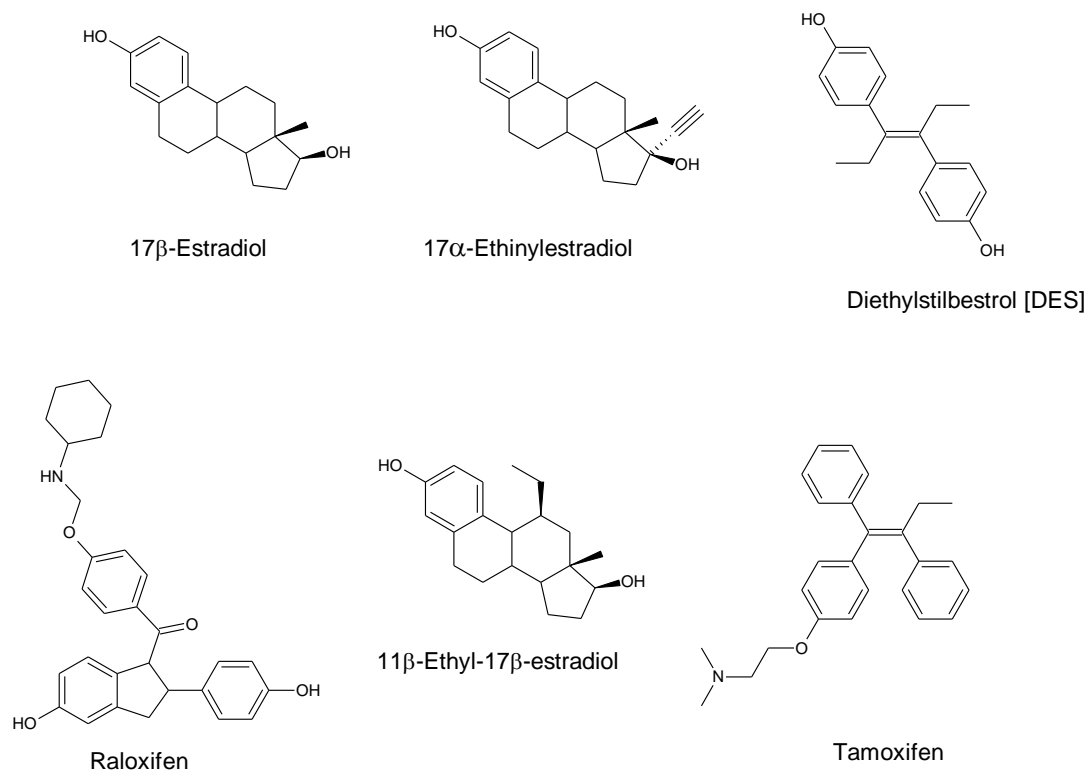


Abbildung 7: Strukturformeln der gängigen ER-Liganden: Agonisten oben; Antagonisten unten.

Zu den bekannten Estrogenen gehört das native steroidale Estrogen 17β-Estradiol. Es weist eine hohe und spezifische Affinität zum ER α auf. Das 17 α -Alkin-konjugierte 17 α -Ethinylestradiol ist ein sowohl in der Therapie als auch in der Forschung häufig verwendetes Estrogen. Aufgrund der terminalen Alkingruppe weist es zum einen eine höhere Affinität als das native 17β-Estradiol auf und zum anderen wird die Alkingruppe als eine kupplungsfähige

Domäne für weitere Modifikationen verwendet. Das Diethylstilbestrol [DES] ist ein nicht steroidaler, synthetischer Vertreter der Estrogene und wirkt ebenfalls als ein Agonist. Das 11 β -Ethyl-modifizierte 17 β -Estradiol (11 β -Ethyl-17 β -estradiol) ist im Gegensatz zu seinen steroidalen Analoga ein Antagonist. Durch die eingeführte Ethylgruppe in 11 β -Position, ist die Affinität des 11 β -Ethyl-17 β -estradiols 14 Mal höher als die des nativen 17 β -Estradiols.^{65,66} Die synthetischen Estrogene Raloxifen und Tamoxifen sind weitere Estrogenantagonisten mit einer hohen und spezifischen ER-Affinität, die als Pharmazeutika verwendet werden.

Außer dem physiologischen Einfluss der ER-Liganden über die Bindung zum ER, können hochaffine Liganden durch eine chemische Modifikation, als „Vehikel“ für bestimmte Wirkstoffe, wie bspw. Radioisotope eingesetzt werden.

1.6 Androgenrezeptor AR

Wie der ER, gehört der Androgenrezeptor (AR) ebenfalls zu der Steroid- und Nuklearrezeptor-Superfamilie und wird durch Androgene, wie bspw. die Steroidhormone Testosteron oder Dihydrotestosteron, aktiviert.^{67,68}

Wie andere Steroidrezeptoren ist AR ein lösliches Protein und fungiert als intrazellulärer Transkriptionsfaktor. Die Funktion des AR wird durch die Bindung von Androgenen reguliert. Diese lösen sequenzielle Konformationsänderungen des Rezeptors aus, die wiederum eine Translokation des Rezeptors in den Zellkern und eine Rezeptor-DNA-Wechselwirkung hervorrufen.^{69,70}

Es wurde gezeigt, dass durch eine AR-Überexpression, ein erhöhtes AR-Level in 30 % - 50 % aller kastrationsresistenter Prostatakrebstumore vorliegt.^{71,72} Darüber hinaus wurde ebenfalls berichtet, dass das Herabsenken des Androgenlevels auf ein Kastrationsniveau zu einer erhöhten AR-Expression in PC-Tumorzellen führt und somit weiterhin das Androgen-abhängige Tumorstadium ermöglicht.^{71,73} In Übereinstimmung damit konnte in LNCaP-Zellen, die in Androgen-armen Medien kultiviert wurden, eine Hochregulierung des AR-Levels und deren Transkriptionsaktivität beobachtet werden.⁷⁴ Somit stellt der AR, genauso wie der ER α ein interessantes Target für die Behandlung des Prostatakrebses dar.

1.6.1 AR Liganden

Androgene kontrollieren die sexuelle Funktion des Mannes und sind zentral für die anabolen Prozesse und die zugrunde liegende Entwicklung der männlichen sexuellen und physiologischen Eigenschaften, wie Muskel- und Knochenaufbau.⁷⁵ Die natürlichen Androgene Testosteron und dessen hydrierte Form Dihydrotestosteron (**DHT**) weisen eine hohe und spezifische AR Affinität auf, und werden daher sehr häufig als Pharmazeutika eingesetzt (**Abb. 8**). Wie im Fall des ER, wurden auch für den AR steroidale und nicht steroidale Liganden mit verbesserter spezifischer Affinität und *in vivo*-Stabilität für den Einsatz als pharmazeutische Mittel entwickelt.⁷⁶ Ein weit verbreiteter Vertreter von synthetischen nicht steroidal Androgenen ist das aus der Gruppe der Diphenylmethan-Derivate stammende Bisphenol A (PBA). Ursprünglich kam diese Verbindung in Kunststoffen oder Kunstharzen zum Einsatz. Allerdings weist das BPA nachweislich eine hohe androgene Wirkung auf, wodurch eine unkontrollierte Exposition zu einer Reihe von Dysfunktionen und Erkrankungen führen kann.^{77,78}

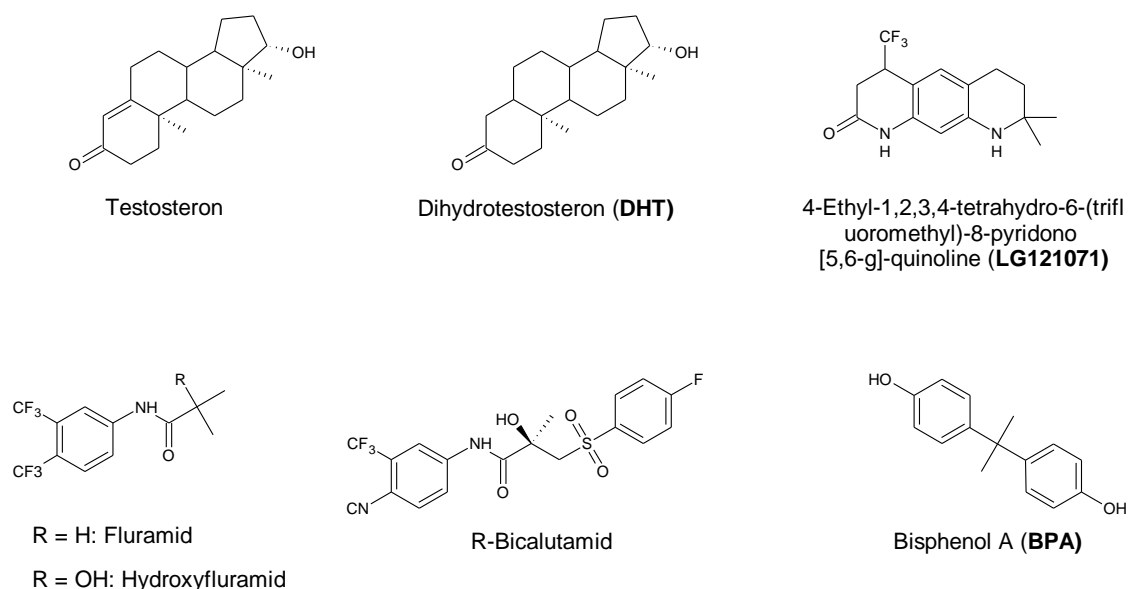


Abbildung 8: Strukturformeln der gängigen AR-Liganden: Agonisten oben; Antagonisten unten.

Eins der ersten androgenen Agonisten ist das LG121071. Es wurde genauso wie die synthetischen Antiandrogene Fluramid bzw. Hydroxyfluramid und R-Bicalutamid für die

Anwendung als selektiver Androgenrezeptormodulator (SARM) für klinische Anwendungen entwickelt.

Aufgrund ihrer hohen und selektiven Affinität, können diese Verbindungen genauso wie die ER-Liganden als „Vehikel“ für Wirkstoffe, wie bspw. Radioisotope, eingesetzt werden.

1.7 Affinität zum Rezeptor

Für die Beurteilung und den direkten Vergleich der Affinitätsstärken verschiedener Substanzen wird in der Regel die Dissoziationskonstante K_d [M] herangezogen. Dieser Wert ist ein versuchsspezifischer Kinetikparameter und beschreibt die Bindungsstärke zwischen dem Liganden und dem jeweiligen Rezeptor im Gleichgewichtszustand. Konventionsgemäß ist der Wert K_d definiert als die Ligandkonzentration, bei der 50 % aller Rezeptoren besetzt sind. Die mathematische Herleitung von K_d ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz:



Die Rezeptor-Ligand-Assoziation bzw. Dissoziation ist ein stochastischer Vorgang. Somit binden freie Liganden **L** mit einer Assoziationsgeschwindigkeit k_a an den Rezeptor **R** und es entsteht ein Rezeptor-Ligand-Komplex **RL**. Darüber hinaus dissoziiert **RL** mit einer Dissoziationsgeschwindigkeit k_d zu **R + L**. Dadurch stellt sich ein stationärer Zustand ein, der auch als Gleichgewichtszustand bezeichnet wird.

Der Gleichgewichtszustand kann durch die Assoziationskonstante K_a [M⁻¹] beschrieben werden. Diese ergibt sich aus dem Quotienten der Konzentration des Produktes [**RL**], bzw. der Assoziationswahrscheinlichkeit k_a und der Summe der Konzentrationen der Edukte [**R**] + [**L**], bzw. der Dissoziationswahrscheinlichkeit k_d . Die Assoziationskonstante K_a ist der reziproke Wert der Dissoziation und wird seinerseits durch $1/K_d$ [M] beschrieben.

$$K_a = \frac{[RL]}{[R] + [L]} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{1}{K_d} \quad (2)$$

Über den Zusammenhang des maximal besetzbaren Zustandes, also der maximal möglichen Anzahl bzw. der höchstmöglichen Konzentration des RL-Komplexes $B_{max} = [R] + [RL]$, lässt sich **Gleichung 2** zu

$$[RL] = \frac{B_{\max}[L]}{K_d + [L]} \quad (3)$$

umformen. Damit kann eine genaue Besetzung der Rezeptoren berechnet werden. Die maximale Rezeptordichte unterscheidet sich von System zu System und muss empirisch ermittelt werden. Aus diesem Grund wird B_{\max} in der Regel zu Vergleichszwecken normiert und in % als gebundene Menge des Rezeptors pro mg des eingesetzten Proteins angegeben.

$$[RL] = \frac{[L]}{K_d + [L]} \quad (4)$$

Somit würde bspw. ein Ligand mit einem K_d -Wert von 0,3 nM, bei einer Konzentration von 0,02 nM, eine 6,25 %ige Rezeptorbesetzung bewirken.

Betrachtet man nun einen Spezialfall, in dem nur 50 % der Rezeptoren besetzt werden sollen, also $[RL] = 0,5 B_{\max}$, so wird dafür eine bestimmte Konzentration an Liganden $[A]_{50}$ benötigt. Werden diese Spezialparameter in die **Gleichung 3** eingesetzt, so ergibt sich:

$$K_{d(0,5B_{\max})} = [A]_{50} \quad (5)$$

Liganden mit einem K_d -Wert von weniger als 1 nM werden in der Regel als hoch affin bezeichnet.

1.7.1 IC_{50}

Die mittlere inhibitorische Konzentration IC_{50} gibt die Konzentration des konkurrierenden Inhibitors an, die zu einer 50 %igen Verdrängung des Bezugsliganden führt. Dieser Wert dient als Affinitätsvergleich zwischen zwei konkurrierenden Liganden und wird von drei Faktoren bestimmt:

- 1.) Durch die Affinität des Konkurrenzliganden zum Rezeptor. Somit gilt: Je höher die Affinität des Konkurrenzliganden, desto geringer ist der IC_{50} -Wert.
- 2.) Durch die Affinität des Bezugsliganden zum Rezeptor. Somit gilt: Je höher die Affinität des Bezugsliganden, desto höher ist die erforderliche Konzentration des Konkurrenzliganden um eine 50 %ige Verdrängung zu erreichen.

3.) Durch das Verhältnis der Konzentration des Bezugsliganden zu der Konzentration des Rezeptors. Somit gilt: Je höher dieses Verhältnis, desto höher müssen die Konzentrationen des Konkurrenzliganden gewählt werden um eine vollständige Verdrängung zu erreichen.

Ist der K_d -Wert des Bezugsliganden bekannt, kann der K_d -Wert des Konkurrenzliganden berechnet werden. Für Rezeptoren mit einer Bindungsstelle wird häufig folgender Zusammenhang gemäß der Cheng-Prusoff-Gleichung gewählt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[L]}{K_d}\right)} \quad (6)$$

Wobei K_i die Inhibitionskonstante eines Inhibitors zum jeweiligen Rezeptor darstellt und in diesem Fall ebenfalls die Dissociationskonstante, die bei der jeweiligen Konzentration zu einer 50 %igen Rezeptorbesetzung in Abwesenheit des Konkurrenzliganden und anderer Störkomponenten führen würde.

Bei der näheren Betrachtung der Cheng-Prusoff-Gleichung fällt auf, dass bei einigen Bestimmungsmethoden des IC_{50} -Wertes, wie bspw. dem Verdrängungsassay, nicht alle Versuchsparameter berücksichtigt werden. Der IC_{50} -Wert, bei dem die Hälfte des Bezugsliganden durch den Inhibitor ausgetauscht wurde, kann nicht direkt in einem Verdrängungsassay dargestellt werden. Der IC_{50} -Wert kann nur aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf der gemessenen Konzentration des Bezugsliganden über einen Bereich zwischen einer nicht stattfindenden und einer vollständigen Verdrängung bestimmt werden. Der IC_{50} -Wert stellt den Wendepunkt der sigmoidalen Messkurve dar.⁷⁹ Unter diesen Bedingungen bezieht sich die Cheng-Prusoff-Gleichung auf die Konzentration des ungebundenen Liganden $[L_{frei}]$. Da diese Konzentration unter gängigen experimentellen Bedingungen nicht messbar ist, wird in der Praxis statt der Konzentration des ungebundenen Liganden $[L_{frei}]$ häufig die Gesamtkonzentration des Liganden $[L]$ als Näherung genommen. So auch in der Cheng-Prusoff-Gleichung. Da die Konzentration des Liganden in den traditionellen Verdrängungsassays in der Regel viel höher liegt als die Konzentration des Rezeptors $[R] \ll [L]$, kann unter diesen Umständen der vergleichsweise geringe Anteil des gebundenen Liganden vernachlässigt und der Grenzwert $[L] = [L_{frei}]$ angenommen werden. Sollte die Konzentration des Rezeptors hingegen viel höher sein, als die des Liganden, $[R] \gg [L]$, gilt $[L] \neq [L_{frei}]$ kann die Cheng-Prusoff-Gleichung nicht mehr verwendet werden.⁸⁰

Ein weiteres Kriterium, welches von der Cheng-Prusoff-Gleichung nicht erfüllt wird, ist die Konzentration des Rezeptors [R]. Damit bleibt die Tatsache unberücksichtigt, dass mit einer steigenden Konzentration [R] eine höhere Ligandenkonzentration [L] benötigt wird um eine vollständige Verdrängung zu bewirken. Somit liefert in einem solchen Fall die IC₅₀-Wertberechnung mittels Cheng-Prusoff-Gleichung für höhere Konzentrationen des Rezeptors [R] scheinbar auch höhere IC₅₀-Werte des ein und desselben Liganden.⁸⁰

In der Arbeit von Z. Nikolovska-Coleska et al. 2004 wurde eine erweiterte Gleichung vorgestellt, die alle nötigen Parameter berücksichtigen sollte:

$$K_i = \frac{[I]_{50}}{\frac{[L]_{50}}{K_d} + \frac{[R]_0}{K_d} + 1} \quad (7)$$

Dabei stellen [I]₅₀ und [L]₅₀ die Konzentrationen des freien Inhibitors und des freien Ligands bei einer 50 %igen Inhibition, [R]₀ die Konzentration des freien Rezeptors bei einer 0 %igen Inhibition und K_d die Dissoziationskonstante des Rezeptor-Ligandkomplexes dar. Somit werden von dieser Gleichung die Konzentrationen aller beteiligter Stoffe berücksichtigt, was wiederum mehr Freiheiten beim experimentellen Aufbau erlaubt.⁸⁰

1.8 Sättigungsexperiment

Bei dem Sättigungsassay werden Rezeptoren einer bestimmten Art mit verschiedenen Konzentrationen von zu untersuchenden Radioliganden [L] titriert. Die gebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexe werden von freien Radioliganden abgetrennt und deren Gehalt über die spezifische Aktivität der Radioliganden A_s [Bq/mol] bestimmt. Parallel wird die Bindung der Liganden an unspezifische Bindungsstellen bestimmt. Dabei werden alle spezifischen Bindungsstellen der Rezeptoren durch Zugabe eines kalten Liganden mit einem hohen K_d-Wert blockiert. Die unspezifische Bindung erreicht im Bereich der verwendeten Konzentrationen keinen gesättigten Zustand und steigt somit linear mit der Konzentrationserhöhung an. Durch eine Titration mit Radioliganden in Abwesenheit von Konkurrenzliganden kann die Gesamtbindung ermittelt werden. Die Gesamtbindung stellt die Summe aus der spezifischen und der unspezifischen Bindung dar. Durch die Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung kann der spezifische Bindungsverlauf

erhalten werden. Der spezifische konzentrationsabhängige Bindungsverlauf wird durch eine Sättigungskurve beschrieben, die bei theoretisch infinitesimal hoher Konzentration einen stationären Zustand mit einer Steigung 0 erhält (**Abb. 9**). Die Sättigungskurve wird für Rezeptoren mit einer Bindungsstelle durch folgende mathematische Funktion mit den Unbekannten **a** und **b** beschrieben:

$$f(x) = \frac{ax}{b + x} \quad (8)$$

Dieser Zusammenhang entspricht der **Gleichung 3**.

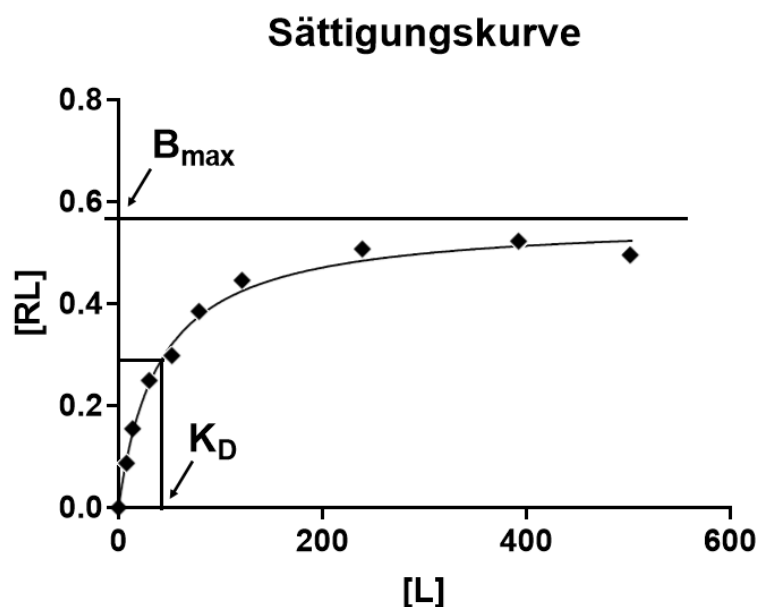


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Affinitätsbestimmung mittels Sättigungskurve.

Für die Bestimmung des K_d -Wertes, wurde in der Vergangenheit eine Linearisierung der Werte nach Scatchard Verfahren durchgeführt:

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{[R]}{[L]} - \frac{[RL]}{K_d} \quad (9)$$

Im Scatchard-Plot ist der K_d - und B_{max} -Werte klar ersichtlich (**Abb. 10**). Der K_d -Wert ist der negativreziproke Wert der Steigung **m**. Der B_{max} -Wert ergibt sich aus dem Abszissenabschnitt.

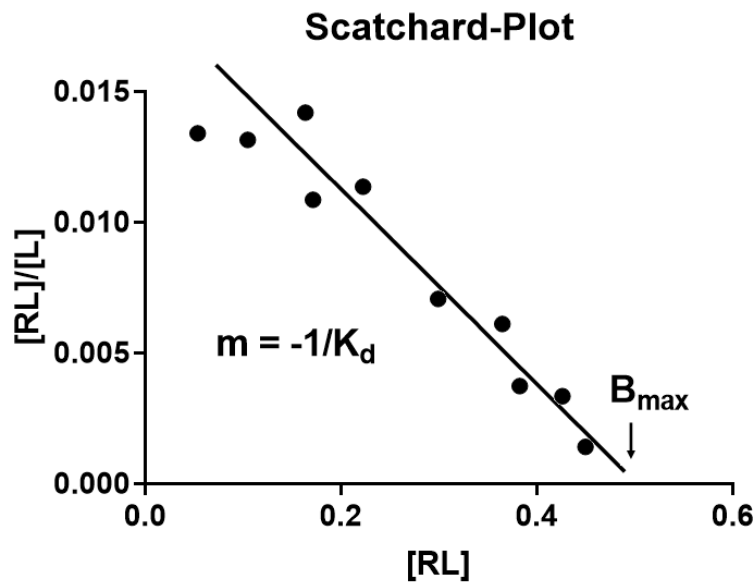


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Affinitätsbestimmung mittels Scatchard-Plot.

Im Vergleich zu der Sättigungskurve ist der Scatchard-Plot mit größeren Fehlern behaftet. Da die Messwerte $[RL]$ und $[L]$ mit abhängigen Messfehlern mit reziprokem Zusammenhang behaftet sind, wirken sie sich auf die Ordinatengröße im Quotienten $\frac{[RL]}{[L]}$ multiplikativ aus. Daher ist es von Vorteil mittels moderner Rechenmethoden den K_d -Wert aus der Sättigungskurve zu bestimmen.

1.9 Chorion-Allantois Membran (CAM) von Hühnereiern (HE-CAM-Experiment)

Das Tierexperiment gehört zu den wichtigsten Untersuchungsmethoden der vorklinischen Tests. Eine besondere Alternative bzw. eine Vorstufe stellt das **CAM**-Experiment dar.⁸¹

Das CAM (Chorion-Allantois Membran)-Experiment ist eine Untersuchungsmethode an embryonierten Eiern, meistens Hühnereiern. Dabei wird die CAM entweder vollständig oder teilweise für die praktische Durchführung und Beobachtungen freigelegt.

Die CAM-Xenotransplantation ist im Vergleich zu Tierexperimenten einfach in der Reproduzierbarkeit und sehr wirtschaftlich. Bis zum 15ten Bebrütungstag fällt das

befruchtete Hühnerei nicht unter das Tierschutzgesetz und bedarf daher keines expliziten Antrags.^{82,82}

Das Immunsystem des Hühnerembryos liegt bis zum 15ten Bebrütungstag unausgereift und inaktiviert vor. Daher können während dieser Zeit Experimente unter immunodefizitären Bedingungen durchgeführt werden. Dazu wird am dritten Bebrütungstag die schon stark vaskularisierte Chorion-Allantois Membran freigelegt⁸³. Die Xenotransplantation in Form einer Zellsuspension oder kleinerer Gewebefragmente erfolgt direkt auf die Membran. Diese Methode ermöglicht es während der Entwicklungsdauer des Hühnerembryos bis zur Aktivierung des Immunsystems Aussagen über das xenokultivierte Gewebe zu treffen.⁸⁴

Die CAM-Assays wurden bereits vielfach zu Untersuchungen von Angiogenese^{83,85}, Tumorgenese und Metastasierung von verschiedenen Tumortypen, wie Darmkrebs⁸⁶, Gliom⁸⁷, Prostatakrebs⁸⁸⁻⁹⁰, Leukämie⁹¹ und Osteosarkom⁹² verwendet.⁹³⁻⁹⁶

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung neuer radioaktiv markierbarer Verbindungen für die therapeutische und diagnostische Anwendung in der Prostata- bzw. Brustkrebsbehandlung.

Diese Verbindungen sollen als Tracer für die häufig in den jeweiligen Krebsarten überexprimierten Targets, wie Androgenrezeptoren AR bzw. Estrogenrezeptoren ER dienen und den Wirkstoff als Diagnostikum, Therapeutikum oder sogar als „Theragnostikum“ in Form von Radioaktivität, zielgerichtet in das Tumorgewebe transportieren. Außerdem sollte nicht nur der Transport, sondern auch eine für die Behandlungsdauer relevante Akkumulation der Radioaktivität im Tumorgewebe gewährleistet werden.

Als Ausgangsverbindungen wurden somit natürliche bzw. synthetische Androgene bzw. Estrogene mit einer hohen und selektiven Affinität zum jeweiligen Target verwendet. Die spätere radioaktive Markierung mit einem metallischen Radioisotop sollte durch eine chemische Modifikation des Liganden mit einem entsprechenden Chelator ermöglicht werden.

Somit beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Synthese und einer chemischen Charakterisierung der AR bzw. ER- Tracer. Desweiteren sollte in einer Reihe von vorklinischen Testversuchen die Effektivität der Verbindungen als Radiopharmaka in der Endo-Radionuklid-Behandlung untersucht werden. Dazu sollten die Markierungsausbeuten, *in vitro* Stabilitäten und Affinitäten der jeweiligen Verbindung überprüft werden. Als letzter Schritt sollte die Pharmakokinetik der synthetisierten Verbindungen *in vivo* getestet werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Aufbau des Tracers

Die pharmakologischen Anforderungen an die jeweiligen Tracer konnten in einem speziellen chemischen Aufbau der jeweiligen Verbindungen realisiert werden (**Abb. 11**). Der Aufbau sieht eine biologisch aktive Substanz vor, einen Liganden mit einer spezifischen Affinität zum gewünschten Target, der den Wirkstoff gezielt in das Tumorgewebe transportieren soll. Der Ligand wird mit einem Chelator verbunden. Der Chelator soll eine *in vivo*-stabile Komplexierung des verwendeten Radionuklids gewährleisten.

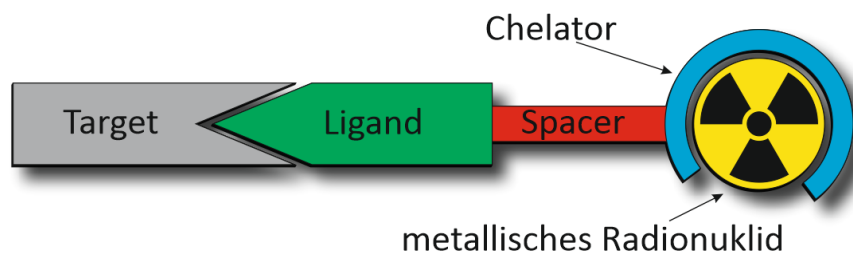


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Radiotracers, bestehend aus einem Liganden (grün), einem Spacer (rot), einem Chelator (blau) und einem komplexierten metallischen Radionuklid (gelb) während der Assoziation mit einem Target (grau).

Aufgrund der sterisch anspruchsvollen Beschaffenheit von Liganden und Chelatoren, kann eine unmittelbare Verknüpfung dieser Verbindungen zu hohen Affinitätsverlusten des Liganden zum Target und des Chelators zum Radionuklid führen. Für die Kompensierung dieser Affinitätsverluste wurden Spacer verwendet.

Der Spacer hat die Aufgabe, einen gewissen Abstand zwischen dem Chelator und dem Liganden zu ermöglichen, um mögliche sterische Hinderungen zwischen Ligand und seiner Bindungsstelle zu verringern. Außerdem können durch die Wahl des Spacers einige pharmakologische Eigenschaften des Radiopharmakons beeinflusst werden. Lipophile Spacer erhöhen bspw. die Akkumulationsrate in fettreichen Gewebesorten, wohingegen lipophile Spacer eher die Akkumulationsrate in fettarmen Gewebesorten begünstigen.

Nachfolgend werden die verwendeten Bestandteile der synthetisierten Tracer aufgelistet und diskutiert.

3.1.1 Liganden

Die in vielen Prostata- bzw. Brustkrebslinien überexprimierten Estrogen-⁹⁷⁻¹⁰⁰ bzw. Androgenrezeptoren^{101,102} stellen ein attraktives Target für zielgerichtete Endo-Radionuklid Behandlungen dar. Als Targetingagents eignen sich somit hierfür Androgene bzw. Estrogene besonders gut. Da die Effektivität des jeweiligen Therapeutikums überwiegend von der hohen Affinität des Liganden abhängt,^{24,103} wurden chemisch modifizierte Liganden verwendet, die entweder eine besonders hohe Affinität zum jeweiligen Target aufweisen oder sich sogar irreversibel an den jeweiligen Rezeptor binden können.^{104,105} Ein weiteres Kriterium der Liganden ist eine gezielt eingeführte kupplungsfähige Domäne, z.B. in Form eines terminalen Alkyls, in einem für die Affinität „unkritischen“ Bereich. Dadurch soll sowohl eine hohe Chemo- als auch eine hohe Regioselektivität ermöglicht und gleichzeitig die Affinität des Zielliganden so gering wie möglich beeinträchtigt werden. Zusätzlich wird eine gewisse Flexibilität bei der chemischen Modifikation der Zielverbindung erreicht, die bspw. mittels Sonogashira-¹⁰⁶ bzw. Glaser-Kupplung^{107,108} oder der fest etablierten Kupfer(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Huisgen-Cycloaddition (Klickreaktion)^{109,110}, durchgeführt werden kann.

3.1.1.1 Androgenliganden

Neben zahlreichen hoch affinen AR-Liganden stellen die von Myung et al. (2013) beschriebenen Bisphenol A (**BPA**) basierten, bioaktiven Verbindungen „EPI“ hoch potente Vertreter von kovalent, also irreversibel bindenden AR-Liganden dar.¹¹¹ Im Gegensatz zu den meisten AR Liganden, die über die Bindung mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des AR eine entsprechende Wirkung erzielen, bindet das EPI an die intrinsisch ungeordnete N-terminale Domäne (NTD) desselben. Diese Liganden zeichnen sich durch eine Chlorhydrinmodifikation am aromatischen Hydroxid des BPA aus (**Abb. 12**). Das **EPI-001** ist das bekannteste EPI-Derivat. Es weist 2 chirale Zentren auf und stellt ein Gemisch aus 4 verschiedenen Stereoisomeren dar. Dabei weisen die Unterschiede in der Stereoisomerie keine Auswirkung auf die irreversible Bindungsfähigkeit des EPI-Liganden auf.¹¹¹

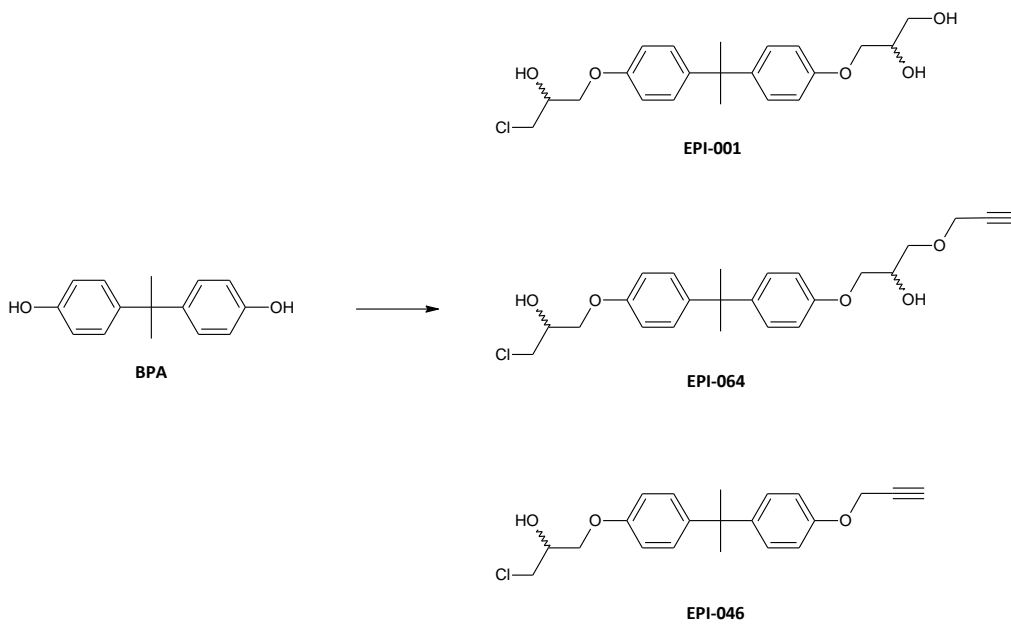


Abbildung 12: Von Myung et al. (2013) beschriebene Chlorhydrin-modifizierte **BPA**-Derivate **EPI-001**, **EPI-064** und **EPI-046**.¹¹¹

Die irreversible Bindungsfähigkeit der EPI-Verbindungen wird durch den Ausbau einer kovalenten Bindung während der Assoziation mit dem AR bedingt. Dabei wird die Chlorhydringruppe erst nach der erfolgten Komplexierung mit dem AR von dessen basischen Aminosäuren zu einem Epoxid katalysiert. Das hoch reaktive Epoxid reagiert anschließend über eine S_N2 -Reaktion mit einem nucleophilen Rest einer benachbarten Aminosäure (**Abb. 13**)¹¹¹.

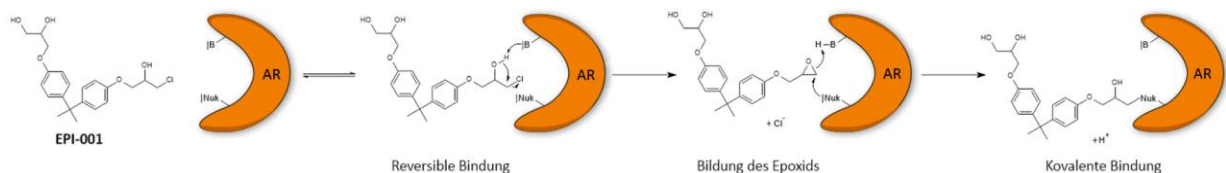


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer EPI-Verbindung und des Androgenrezeptors während der Assoziation.¹¹¹

Des Weiteren kann die gegenüberliegende Hydroxigruppe des **BPA** für weitere Modifikationen, wie bspw. für Fluoreszenz- oder Radioaktivitätsmarkierungen, verwendet werden. Aufgrund der terminalen Alkinfunktion eignet sich für diese Zwecke das **EPI-064** bzw. **EPI-046**. Da das **EPI-046** im Vergleich zum **EPI-064** einen geringeren Synthesaufwand erfordert und aus einem Gemisch von nur 2 statt 4 Stereoisomeren besteht, wurde diese Verbindung für weitere Modifikationen ausgewählt.

3.1.1.2 Estrogenliganden

Ein Estrogen mit einer der höchsten beschriebenen Affinitäten zum Estrogenrezeptor ist das 11 β -Ethylestradiol (**Abb. 14**).^{65,66} Es weist eine zwischen 1000 % und 1500 % höhere Affinität als das 17 β -Estradiol auf.

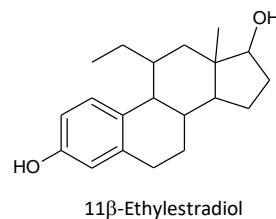


Abbildung 14: Strukturformel des hochaffinen Estrogenliganden 11 β -Ethyl-Estradiol.^{65,66}

Für eine gezielte Modifikation des 11 β -Ethyl-Estradiols wurde ein terminaler Alkinlinker in 17 α -Position eingeführt (**Abb. 14**). Das Alkin-modifizierte 11 β -Ethyl-17 α -ethinyl-estradiol (**Ees**) wurde vom Arbeitskreis Mohr (Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, anorganische Chemie an der Universität Wuppertal) zu Verfügung gestellt.

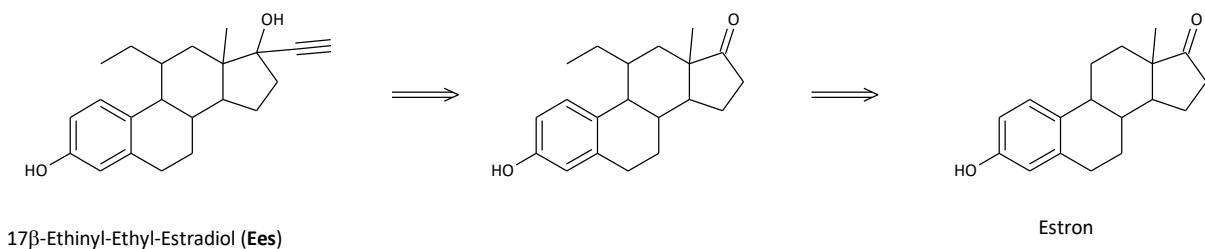


Abbildung 15: Retrosynthese des kopplungsfähigen 11 β -Ethyl-17 α -ethinylestradiols.

3.1.2 Chelator und Spacer

Für die Markierung mit den Radioisotopen ^{68}Ga ^{112,113} bzw. ^{177}Lu ^{114,115} wurde der Chelator DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-tetraessigsäure) (**Abb. 16**) ausgewählt. Ein prominentes, kupplungsfähiges Derivat stellt das p-NCS-Bn-DOTA¹¹⁵ dar. Es kann über eine Thioharnstoffkopplung mit einem primären Amin verknüpft werden¹¹⁵.

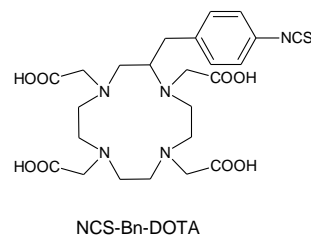


Abbildung 16: Kupplungsfähiges ^{68}Ga - bzw. ^{177}Lu -Chelator p-NCS-Bn-DOTA.

Um den negativen Einfluss des sterisch anspruchsvollen DOTA-Chelators auf die Affinität des Liganden zu minimieren, wurden langkettige Spacer mit einer terminalen Azido- und einer primären Aminogruppe verwendet (**Abb. 17**). Es wurde ein bifunktionaler, PEG-basierter Linker $\text{NH}_2\text{-PEG}_3\text{-N}_3$ und ein trifunktionaler Linker Fmoc-Lys- N_3 verwendet. Diese Spacer lassen sich sowohl über eine kupferkatalysierte Azid-Alkin-Klickreaktion mit der Alkynylgruppe der Liganden verbinden, als auch über eine Thioharnstoffkopplung mit dem NCS-Linker des DOTA. Außerdem bietet der trifunktionale Linker Fmoc-Lys- N_3 die Möglichkeit einer weiteren Modifikation, wodurch das Ligand-Lys-DOTA-Konstrukt bspw. in ein Peptid eingebaut werden könnte.

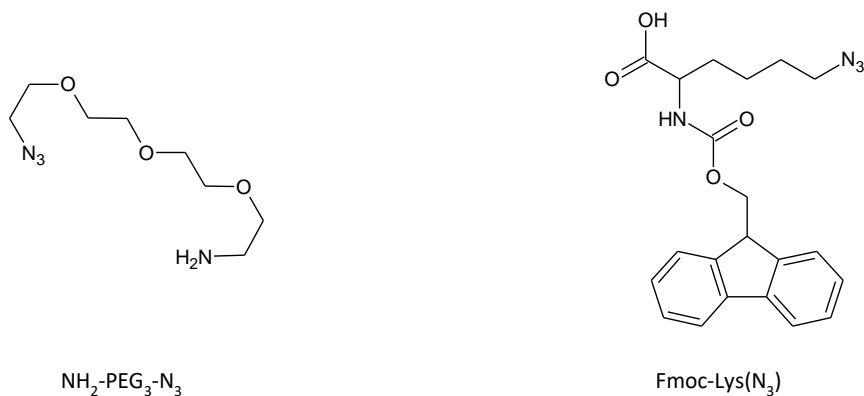


Abbildung 17: Bifunktionaler Spacer $\text{NH}_2\text{-PEG}_3\text{-N}_3$ (links) und trifunktionaler Spacer Fmoc-Lys(N_3) (rechts).

3.2 Synthese

Im folgenden Abschnitt werden die organochemischen Synthesen der hergestellten Verbindungen beschrieben.

3.2.1 Synthese des EPI-046

Die Synthesestrategie des **EPI-046** sah das synthetische Hormon Bisphenol-A als Ausgangsstoff vor, welches mit einer Propargyl- und einer Chlorhydringruppe modifiziert werden sollte (**Abb. 18**).

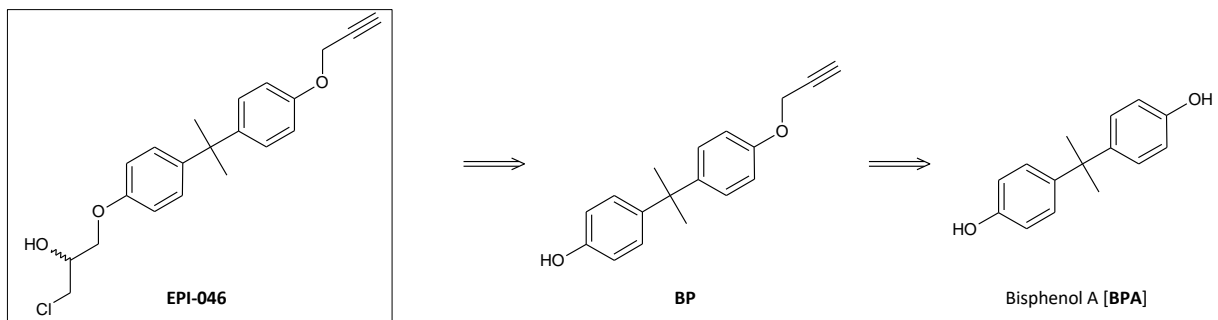


Abbildung 18: Retrosynthese von **EPI-046**.

Da die Modifizierung mit der Propargylgruppe hohe pH-Werte erfordert¹¹⁶ und die Chlorhydrinfunktion unter solchen Bedingungen zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnte, erfolgte die Einführung der Propargylgruppe vor der Chlorhydringruppe.

Die Umsetzung des Bisphenol-A (**B**) zu **BP** wurde über die Williamson-Ethersynthese¹¹⁶ in Aceton durchgeführt (**Abb. 19**). Als Base wurde Kaliumcarbonat verwendet. Die statistische Umsetzung ergab ein Gemisch aus **BP** von 49 % und **BP₂** von 51 %.

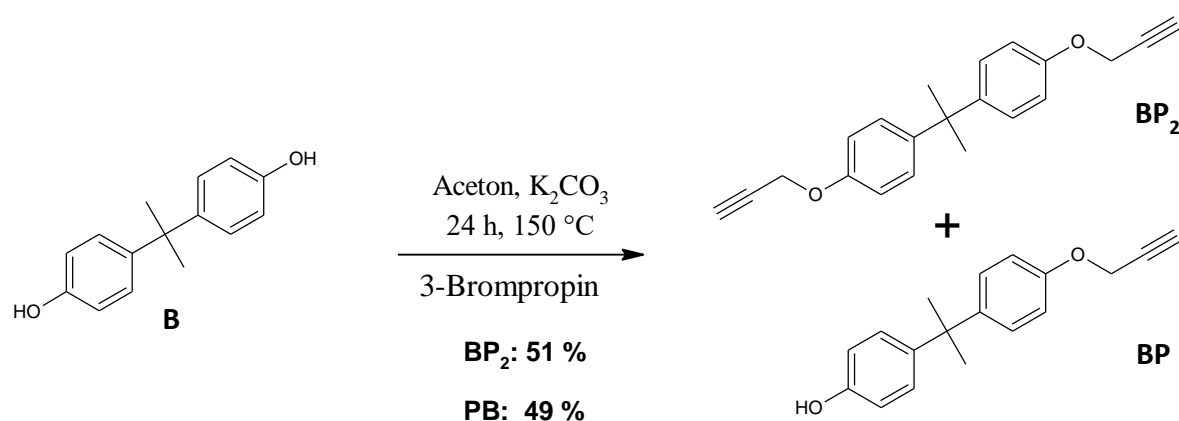


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Umsetzung von Bisphenol-A (**B**) zu **BP** und **BP₂**.

Die Produkte **BP** und **BP₂** konnten säulenchromatographisch von einander getrennt werden. Die Bestimmung des gewünschten Produktes **BP** erfolgte mittels NMR-Spektroskopie. Die Umsetzung des **BP** zu **BPE** erfolgte mittels Epichlorhydrin im Basischen¹¹⁷. Als Base wurde Kaliumhydroxid verwendet. Da sich das **BP** sehr gut im Epichlorhydrin lösen lässt und das Epichlorhydrin im Überschuss eingesetzt werden konnte, wurde es direkt als Lösungsmittel verwendet. Tatsächlich liefert die Reaktion schon das gewünschte Produkt **BPE-Cl**. Allerdings konnte dieses Produkt nicht isoliert werden, da die basenlabile Chlorhydringruppe unter hohen pH-Werten der Reaktionslösung zum Epoxid umgewandelt wurde (**Abb. 20**).

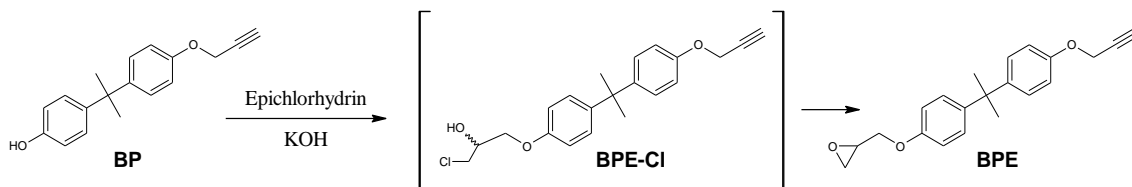


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Umsetzung von **BP** zu **BPE**

Im letzten Syntheseschritt wurde der Epoxidring des **BPE** unter Einsatz von Cer(III)-Chlorid zum Chlorhydrin bei 200 °C geöffnet¹¹⁸. Bei der Ringöffnung des Epoxids bildete sich ein Stereozentrum. Daher besteht die Verbindung **BPE-Cl** und alle nachfolgenden Modifikationen derselben aus einem R/S-Gemisch. Die Ausbeute betrug 95% (**Abb. 21**).

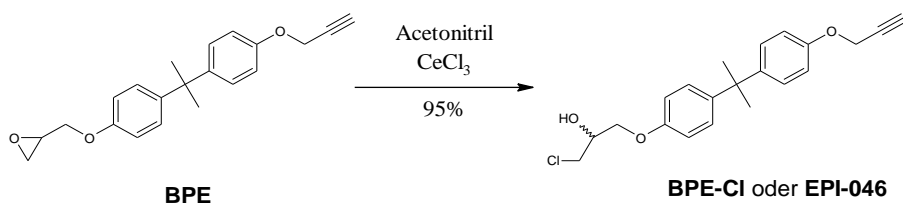


Abbildung 21: Schematische Darstellung der **BPE-Cl** bzw. **EPI-046** Synthese.

Die Strukturbestimmung der Verbindung **BPE-Cl** bzw. **EPI-046** wurde mittels NMR-Spektrometrie durchgeführt.

3.2.2 EsECI

Die Chlorhydrin-modifizierten Bisphenol A-Derivate stellen zurzeit hochpotente, irreversibel bindende AR-Liganden dar.¹¹¹ Die irreversible Bindung wird dabei durch die Chlorhydringruppe bewirkt. Diese wird während des Assoziationsvorgangs mit dem Androgenrezeptor von umliegenden basischen Aminosäuren zum Epoxid katalysiert, was anschließend zum Aufbau einer kovalenten Bindung zu diesen Aminosäuren führt.¹¹¹ Da die Estrogene und insbesondere das Estradiol im Estrogenrezeptor eine ähnliche Lage zu basischen Aminosäuren aufweisen^{119,120}, wie die EPI-Derivate im AR, sollte das Prinzip des

Ausbaus einer kovalenten Bindung durch die Chlorhydringruppe auf das 17 β -Estradiol übertragen werden. Dazu wurde das 17 α -Ethinylestradiol in einer Zweistufensynthese an die aromatische OH-Gruppe mit Chlorhydrin modifiziert (**Abb. 22**).

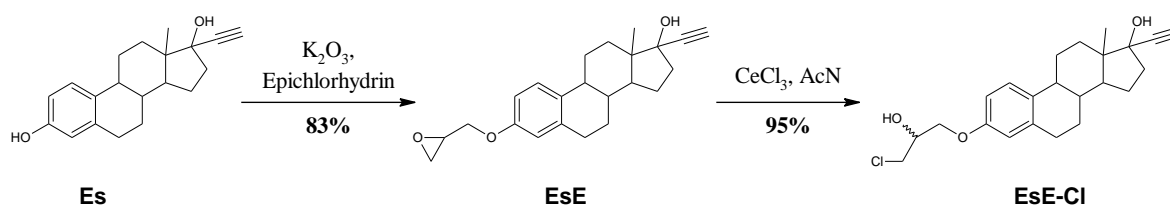


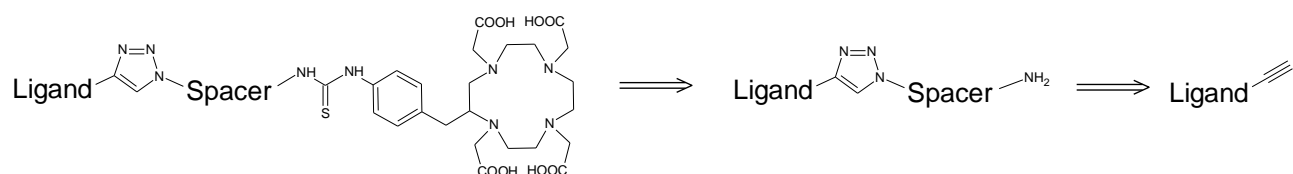
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Synthese von **EsECl**.

Im ersten Syntheseschritt wurde das **Es** mittels Chlorhydrin im basischen Milieu an der aromatischen OH-Funktion zu **EsE** modifiziert¹¹⁷. Dabei war es nicht erforderlich die aliphatische OH-Funktion an der 17 β -Position zu maskieren. Es konnte keine Substitution am 17 β -OH beobachtet werden. Im anschließenden Schritt wurde der Epoxidring des **EsE** unter Einsatz von Ce(III)-Chlorid geöffnet¹¹⁸.

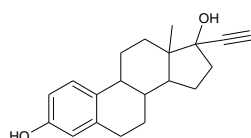
Eine spätere Affinitätsuntersuchung der erhaltenen Verbindung **EsECl** ergab keinerlei Vorhandensein einer Affinität. Daher wurde diese Verbindung nicht weiterverfolgt.

3.2.3 Synthese der Ligand-PEG-DOTA Konstrukte

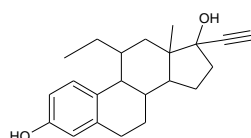
Die Verknüpfung der Liganden mit dem DOTA-Chelator erfolgte über Spacer, die sowohl eine Azid- als auch eine terminale Aminogruppe enthielten (**Abb. 23**). Dafür wurde sowohl die Verbindung $NH_2-PEG_3-N_3$ als auch Fmoc-Lys(N_3) verwendet (**Abb. 17**).



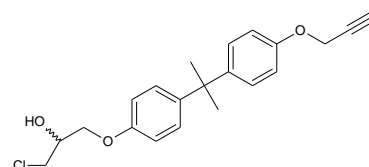
Ligand:



Ethinylestradiol [Es]



11β-Ethyl-Ethinylestradiol [Ees]



EPI-046

Abbildung 23: Retrosynthese der Ligand-Spacer-DOTA Konstrukte.

Die Pegylierung der Liganden 11β-Ethyl-17α-ethinylestradiol (**Ees**), 17α-Ethinylestradiol (**Es**) und **EPI-046** wurde mittels Kupfer(I)-katalysierter 1,3-dipolarer Huisgen-Cycloaddition unter Bildung eines Triazolrings durchgeführt¹²¹. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur in **DMF** unter Schutzgas. Als Katalysator wurde CuI verwendet (**Abb. 24**). Die Umsetzung des 17α-Ethinylestradiols zu **EsP** und des 11β-Ethyl-17α-ethinylestradiols zu **EesP** gelang zu 51 %. Das **EPI-046** konnte zu **BP** umgesetzt werden.

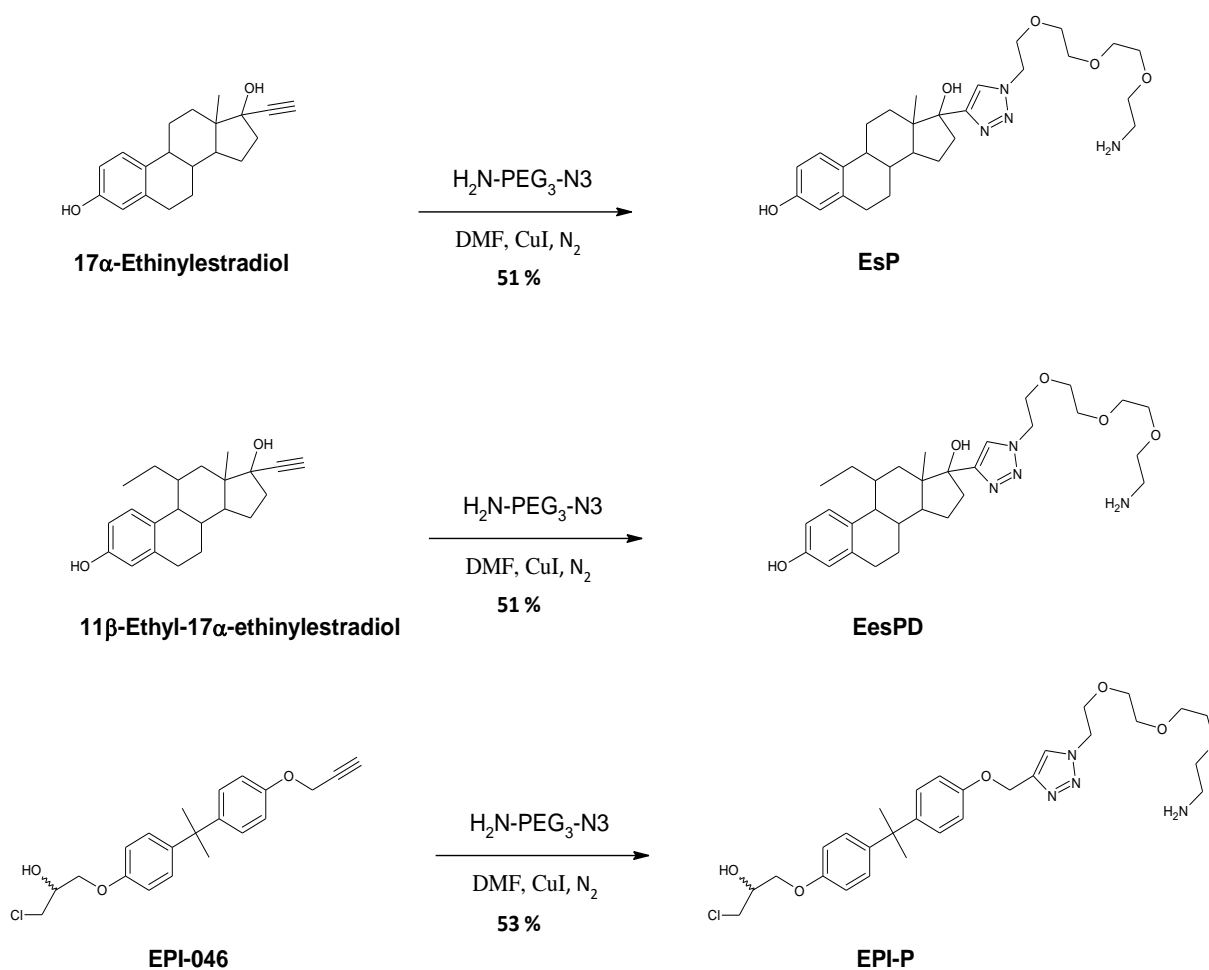


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Synthese der Ligand-PEG-Konstrukte.

Einführung des Lysinlinkers

Die Umsetzung der Liganden **Es** und **Ees** mit Fmoc-L-Lys(N3)-OH erfolgte ebenfalls mittels Kupfer(I)-katalysierter 1,3-dipolarer Huisgen-Cycloadditionen unter Bildung eines Triazolrings¹²¹. Dabei wurde Cu(I) als Katalysator verwendet. Die Cu(I) Ionen wurden *in situ* aus Kupfersulfat und Natriumascorbat, als Reduktionsmittel, generiert (**Abb. 25**). Die Aufreinigung wurde mittels HPLC unter Acetonitril/Wasser Gradientenelution an einer C18 Säule durchgeführt. Die Umsetzung des **EsFL** bzw. **EesFL** erfolgte mit einer Ausbeute von 78 % bzw. 81 %.

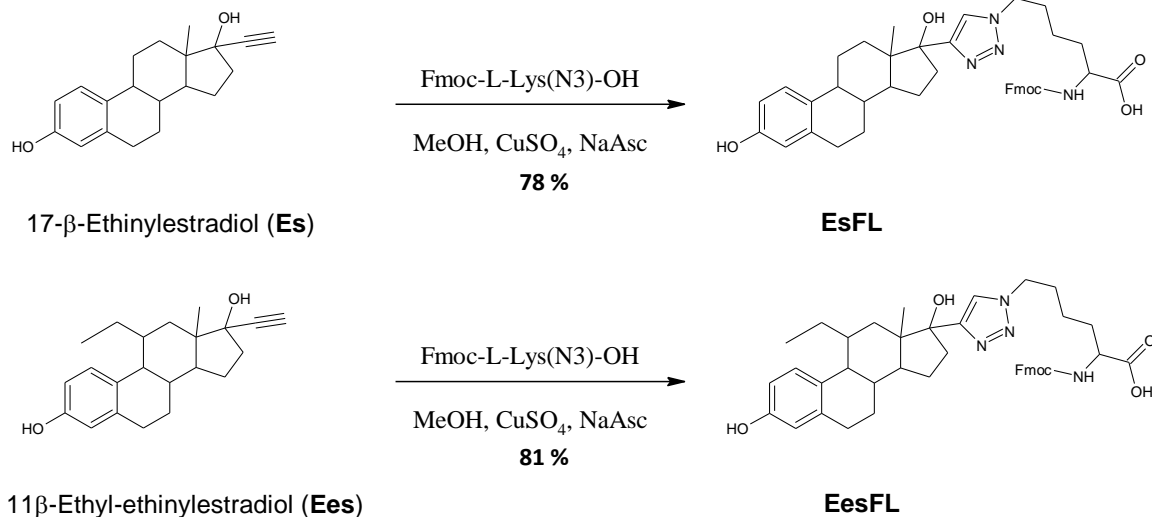


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Synthese der Estrogen-Fmoc-L-Lys-Konstrukte.

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte in einem 30 %igen Piperidin/DMF Gemisch bei Raumtemperatur (**Abb. 26**). Die Aufreinigung des **EsL** bzw. **EesL** wurde ebenfalls mittels HPLC unter Acetonitril/Wasser Gradientenelution an einer C18 Säule durchgeführt.

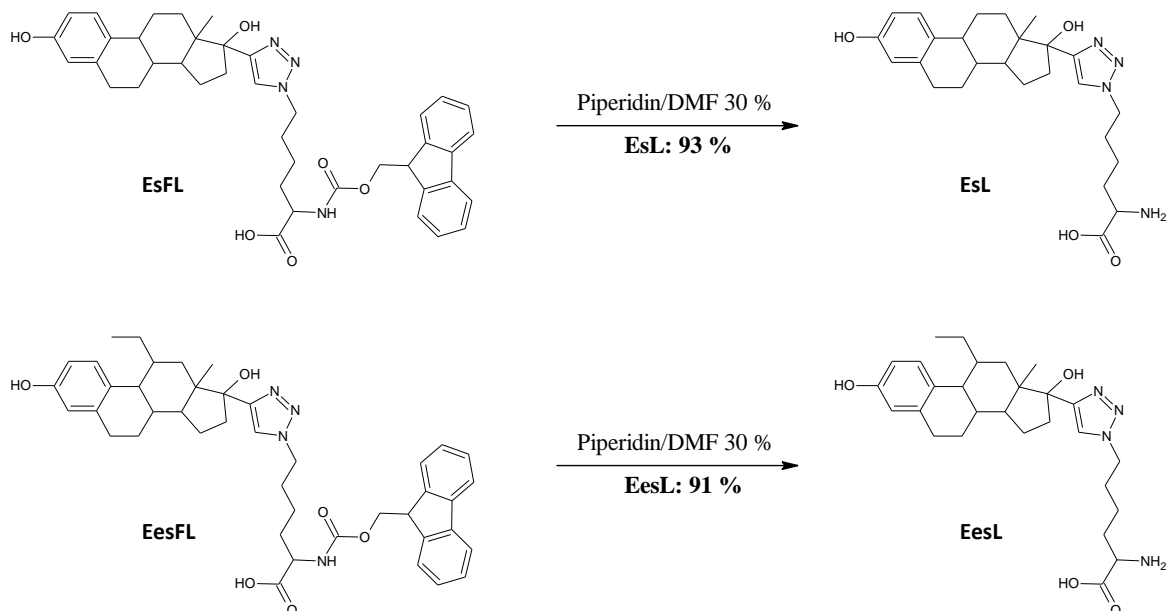


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Abspaltung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Gruppe mittels 30 %iger Piperidin/DMF Lösung.

Die Verbindungen **EsFL** und **EesFL** wurden zum Einbau in Peptide und die entschützten Verbindungen **EsL** und **EesL** für weitere Modifikationen mit Chelatoren vorgesehen. Diese Ziele sollen in nachfolgenden Projekten realisiert werden.

Die Umsetzung der Verbindungen **EPI-P**, **EsP** und **EesP** mit DOTA erfolgte über eine Thioharnstoffkupplung. Dafür wurde das käuflich erhältliche Isothiocyanato-Benzyl-DOTA verwendet. Da die Bildung des Thyoharnstoffs nur unter neutralen bzw. basischen Bedingungen erfolgen kann, wurde der durch die Carboxylgruppen des p-NCS-Bn-DOTA erniedrigte pH-Wert mittels 3 Äquivalenten DIPEA neutralisiert. Als sterisch gehindertes sekundäres Amin, ist DIPEA bei Raumtemperatur inert und geht keine Reaktion mit p-NCS-Bn-DOTA ein (**Abb. 27**).

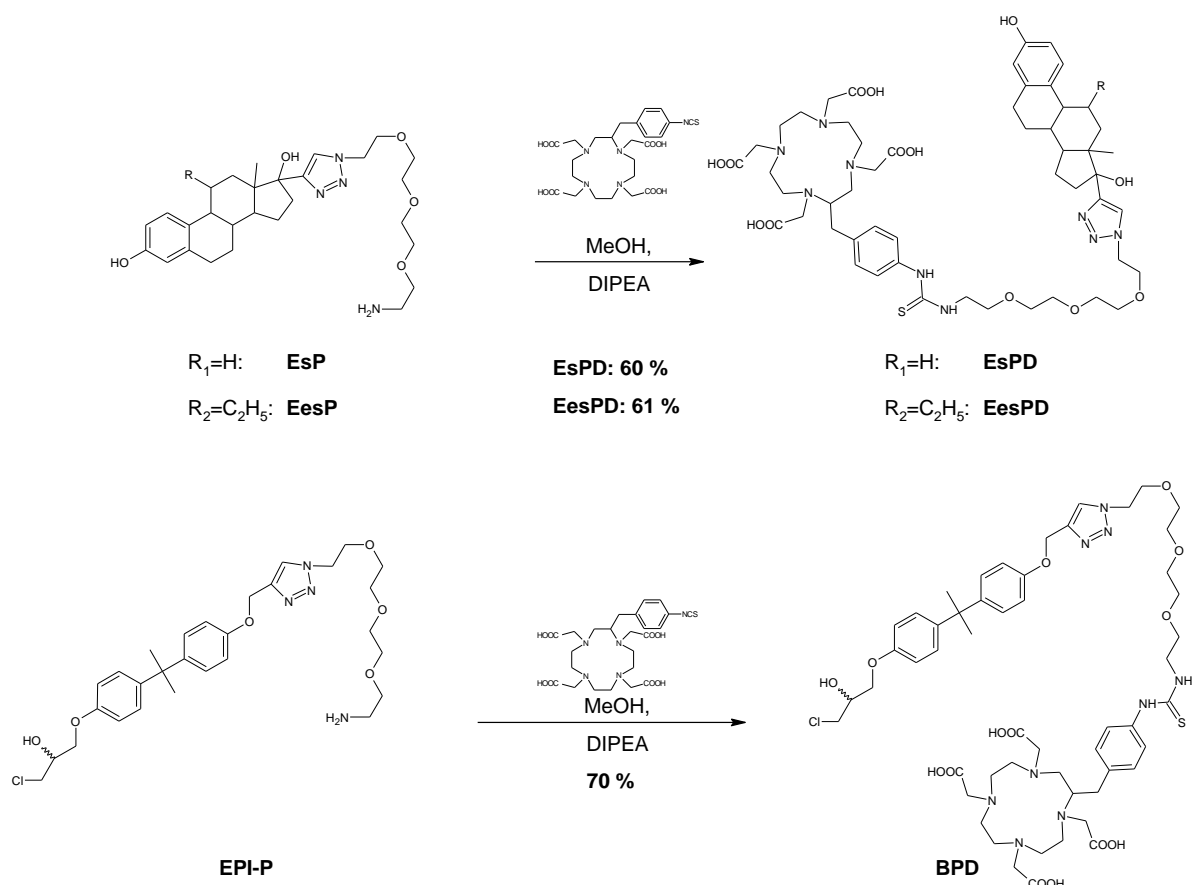


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Umsetzung der pegylierten Verbindungen **EsP**, **EesP** und **EPI-P** mit p-NCS-Bn-DOTA zu **EsPD**, **EesPD** und **BPD**.

Die DOTA-Kupplung wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Umsetzung der pegylierten Steroide **EsP** bzw. **EesP** zu **EsPD** bzw. **EesPD** erfolgte mit einer Ausbeute von 60 % bzw. 61 %. Die Ausbeute der Umsetzung des **EPI-P** zu **BPD** betrug 70 %.

Die synthetisierten Verbindungen **EsPD**, **EesPD** und **BPD** wurden in folgenden Untersuchungen auf ihre Markierbarkeit mit den Radionukliden ^{68}Ga und ^{177}Lu , die Stabilitäten und die Affinitäten zu den jeweiligen Rezeptoren überprüft.

3.3 Markierungs- und Stabilitätsstudien

Im folgenden Abschnitt wird die Markierung der Substanzen **EsPD**, **EesPD** und **BPD** mit ^{177}Lu und ^{68}Ga und deren *in vitro* Stabilitäten beschrieben.

3.3.1 ^{177}Lu - und ^{68}Ga -Markierung

Bei der Markierung der Verbindungen **EsPD**, **EesPD** und **BPD** mit ^{177}Lu bzw. ^{68}Ga handelt es sich um eine Komplexierungsreaktion eines dreiwertigen Metallions mit dem Chelator (Komplexbildner) DOTA. Diese Reaktion hängt von kinetischen und thermodynamischen Faktoren ab, die eine große Rolle sowohl bei der eigentlichen Markierung, als auch bei der Stabilität der Verbindung spielen. Somit trägt die thermodynamische Stabilität wesentlich zu der Gleichgewichtseinstellung des Komplexprodukts zu den jeweiligen Edukten bei und bedingt somit größtenteils die höchstmögliche radiochemische Ausbeute und damit die spezifische Aktivität des Markierungsprodukts. Die Kinetik einer Komplexierungsreaktion bedingt die Reaktionsgeschwindigkeit. Ist eine Reaktion kinetisch gehemmt, wie bspw. im Fall einer Lu bzw. Ga/DOTA-Komplexierung, bedarf diese einer höheren Reaktionstemperatur, die als Aktivierungsenergie eine bestimmte Energiebarriere der Reaktion überwindet und dadurch die Reaktionszeit verkürzt. Dadurch ist die DOTA-Komplexierung zwar einerseits mit hohen Reaktionstemperaturen verbunden, andererseits ist aber bei Zimmer- bzw. Körpertemperatur gegen Transmetallierungen gegenüber stabileren Chelatoren kinetisch „geschützt“.

Ein weiterer Reaktionsparameter neben der Reaktionszeit und Temperatur ist der pH-Wert der Reaktionslösung. Dieser hat eine direkte Auswirkung auf die Markierungsausbeute, die

radiochemische Reinheit und die Stabilität der radioaktiv markierten Vektoren. Da die Metallionenkomplexierung über die freien Elektronenpaare der Carboxylgruppen bzw. der Stickstoffatome des DOTA abläuft, führen niedrige pH-Werte zu einer Protonierung der, für die Komplexierung erforderlichen, Elektronenpaare. Zu hohe pH-Werte erhöhen hingegen die Hydroxidionenkonzentration in der Reaktionslösung, die ihrerseits mit dem jeweiligen Metallionen in Wechselwirkung treten und ebenfalls die DOTA-Komplexierung hemmen. Somit muss der pH-Wert als ein Kompromiss zwischen den beiden Extremzuständen gewählt werden.

Die ^{177}Lu /DOTA-Markierung von **EsPD**, **EesPD** und **BPD** wurde bei 85 °C und einem pH-Wert von 4,3 über einen Zeitraum von 15 min durchgeführt (**Abb. 28**).

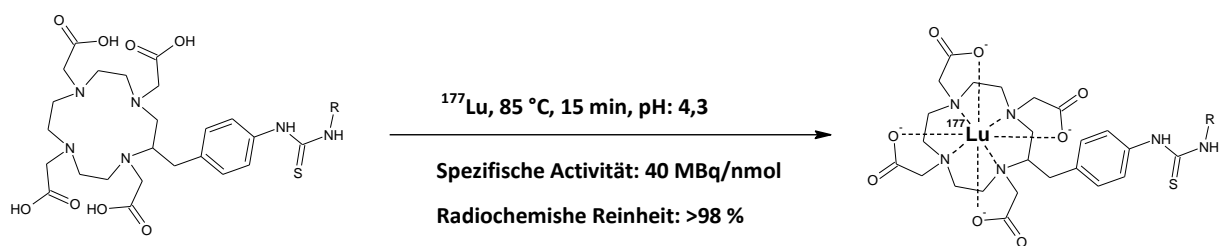


Abbildung 28: Schematische Darstellung der ^{177}Lu -Markierung von **EsPD**, **EesPD** und **BPD**.

Es konnte eine spezifische Aktivität von 40 MBq/nmol und eine radiochemische Ausbeute von mehr als 98 % erreicht werden. Die Reinheit der Substanzen wurde mittels eines Radiogramms im Rahmen einer Qualitätskontrolle überprüft (**Abb. 29**). Die Radiogramme der Markierungsprodukte $[^{177}\text{Lu}]\text{EsPD}$, $[^{177}\text{Lu}]\text{EesPD}$ und $[^{177}\text{Lu}]\text{BPD}$ wiesen keine nennenswerten radioaktiven Verunreinigungen durch freies ^{177}Lu auf.

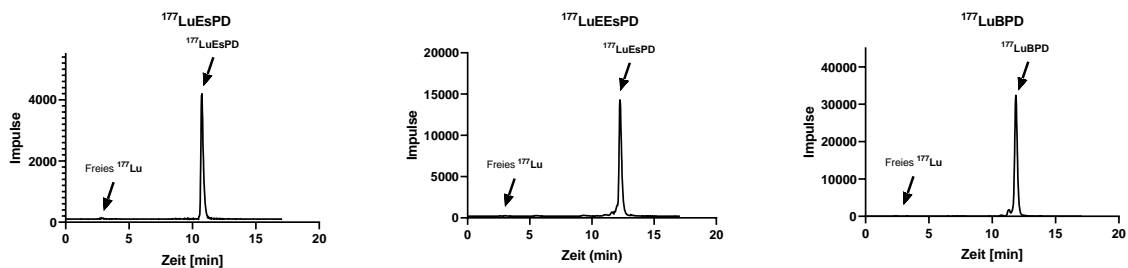


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Radiochromatogramme der Qualitätskontrolle von [^{177}Lu]EsPD, [^{177}Lu]EesPD und [^{177}Lu]BPD.

Die ^{68}Ga /DOTA-Markierung von EsPD, EesPD und BPD wurde bei 90 °C und einem pH-Wert von 4,5 über einen Zeitraum von 15 min durchgeführt (**Abb. 30**).

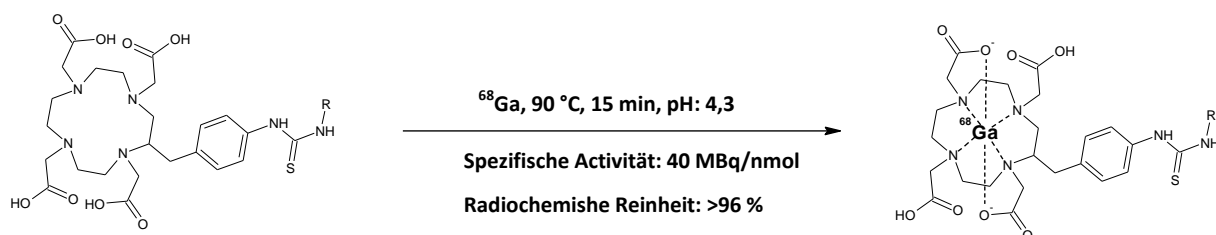


Abbildung 30: Schematische Darstellung der ^{68}Ga -Markierung von EsPD, EesPD und BPD.

Es konnte eine spezifische Aktivität von 40 MBq/nmol und eine radiochemische Reinheit von mehr als 96 % erreicht werden (**Abb. 31**). Es wurde festgestellt, dass im Fall der steroidal Vektoren EsPD und EesPD die Markierungsprodukte mit Spuren von freiem ^{68}Ga verunreinigt sind. Im Fall von BPD wurden allerdings keine nennenswerten radioaktiven Verunreinigungen gefunden. Somit könnten die Steroidstrukturen von EsPD und EesPD eine geringe Störung der Galliumkomplexierung bewirken. Die radiochemische Reinheit kann durch verminderte Mengen des ^{68}Ga erhöht werden. Dies hätte allerdings eine geringere spezifische Aktivität zur Folge.

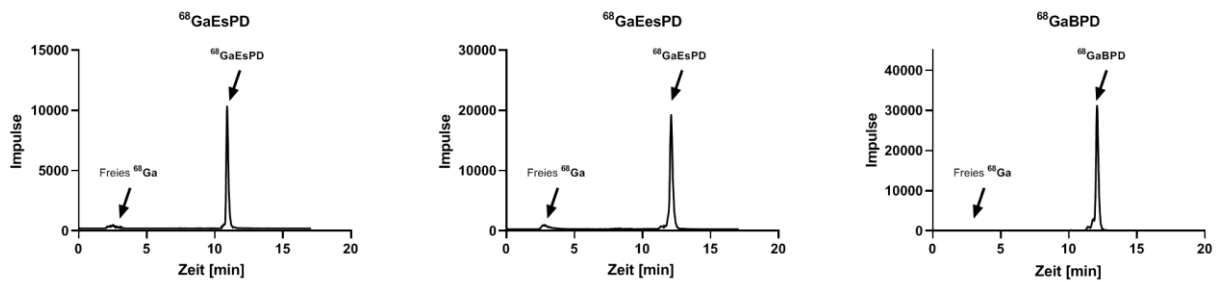


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Radiochromatogramme der Qualitätskontrolle von [^{68}Ga]EsPD, [^{68}Ga]EesPD und [^{68}Ga]BPD.

Die Stabilität der Markierungsprodukte [^{177}Lu]EsPD, [^{177}Lu]EesPD und [^{177}Lu]BPD wurde bei 37 °C in PBS und in Humanserum (HS) über einen Zeitraum von 0 h, 24 h und 48 h ermittelt. Die Analyse der jeweiligen Proben erfolgte dünnschichtchromatographisch an Silica Gel-impregnierten Cellulosestreifen mit 0,5 M Citronensäure als mobile Phase (**Abb. 32 und 33**). Das demetallierte ^{177}Lu wanderte dabei an der Front der mobilen Phase. Das als Markierungsprodukt komplexierte ^{177}Lu blieb hingegen an der Basislinie. Die Stabilität wurde aus dem Verhältnis des komplexierten ^{177}Lu und des freien ^{177}Lu gebildet. In PBS wies die Verbindung [^{177}Lu]EsPD eine >99 %ige Stabilität nach 0, 24 und 48 h auf. Die Verbindungen [^{177}Lu]EesPD und [^{177}Lu]BPD zeigten eine etwas geringere Stabilität von 96 % nach 24 h und 92 % nach 48 h.

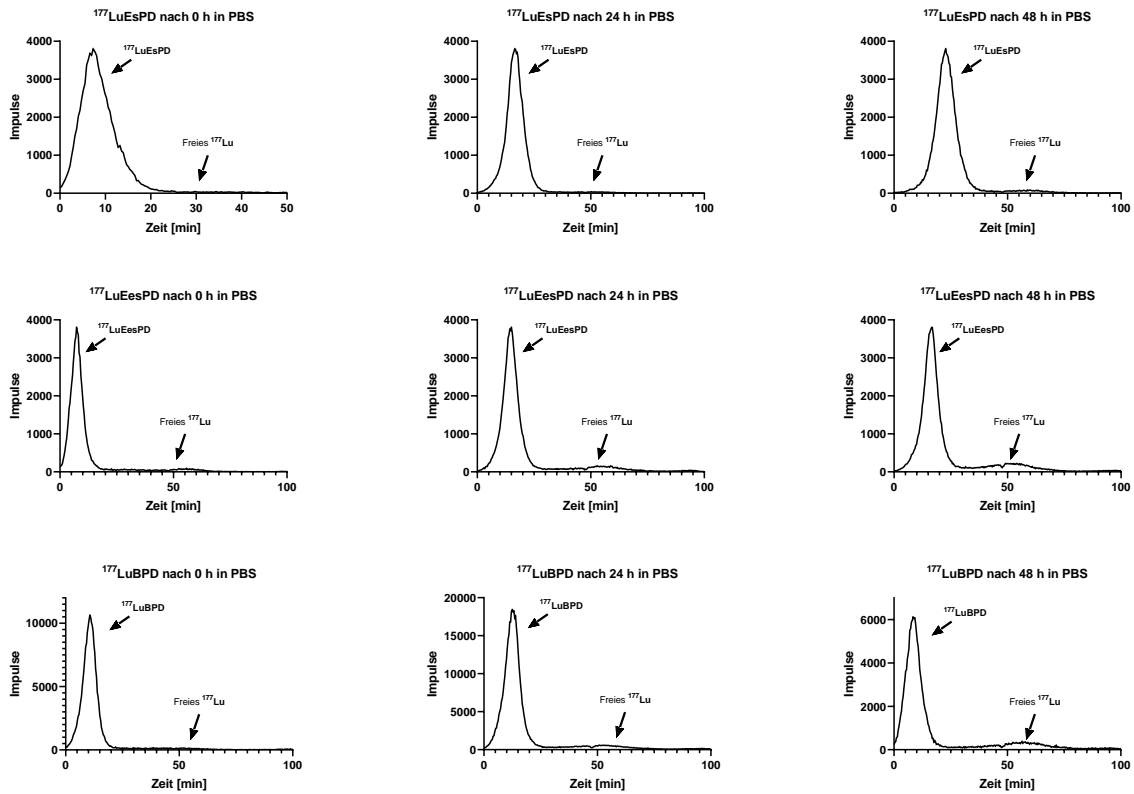


Abbildung 28: Dünnschichtchromatographische Analyse der Markierungsprodukte ^{177}Lu EsPD, ^{177}Lu EesPD und ^{177}Lu BPD in PBS nach 0, 24 und 48 h.

In HS wies die Verbindung ^{177}Lu EsPD eine etwas geringere Stabilität von 98 % nach 24 h und 97 % nach 48 h auf. Die Stabilität der Verbindung ^{177}Lu EesPD betrug nach 24 h 94 % und nach 48 h 89 %. Die Stabilität der Verbindung ^{177}Lu BPD in HS ähnelte der Stabilität in PBS von 96 % nach 24 h und 92 % nach 48 h.

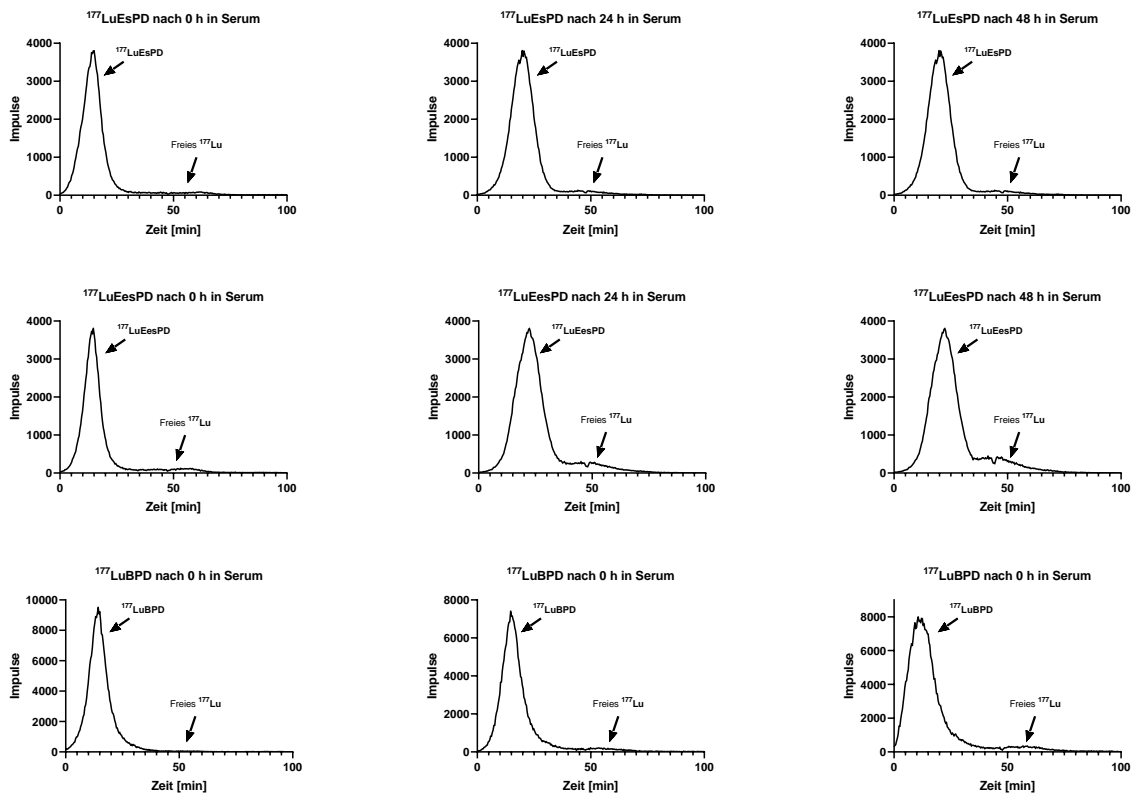


Abbildung 29: Dünnschichtchromatographische Analyse der Markierungsprodukte ^{177}Lu EsPD, ^{177}Lu EesPD und ^{177}Lu BPD in HS nach 0, 24 und 48 h.

Somit bleibt festzuhalten, dass die Stabilität des ^{177}Lu EsPD etwas höher ist, als die des ^{177}Lu EesPD. Da bei der Stabilitätskontrolle Radiolyseprodukte nicht berücksichtigt wurden, sondern nur das freie ^{177}Lu gegen das komplexierte ^{177}Lu verglichen wurden, scheint die Ethylgruppe in 11 β -Position des ^{177}Lu EesPD die Komplexierungsstärke des DOTA geringfügig zu beeinträchtigen. Um diesen Einfluss zu minimieren, könnten entweder längere Spacer als PEG₃ oder aber auch aliphatische Strukturen verwendet werden. Alternativ zum Spacer könnte auch die Kupplungsart am Steroiden einen Einfluss auf die Komplexierungsstärke des DOTA haben. Eine Alternative zu der Klickreaktion, die die Bildung eines Triazolrings zur Folge hat, könnte die Modifikation am Alkin über eine Sonogashirakupplung erfolgen. Ein solches Kupplungsprodukt würde ein „starres“ Alkin

beinhalten, welches einen gewissen Abstand zwischen dem Steroid und dem Chelator besser gewährleisten würde.

3.3 Affinitätsstudien

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden die synthetisierten Tracer auf die Affinität zu den jeweiligen Rezeptoren überprüft.

3.3.1 Bindungsassay

Für die Beurteilung der Affinität der Verbindungen [¹⁷⁷Lu]EesPD und [¹⁷⁷Lu]EsPD wurden K_d-Wertbestimmungen mittels eines Bindungsassays durchgeführt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Typen von Bindungsassays verwendet. Zum einen wurde ein neuer Bindungsassay etabliert, der eine direkte K_d-Wertbestimmung eines radioaktiv markierten Liganden mittels eines Sättigungsexperiments ermöglichen soll. Außerdem soll das Assay die Möglichkeit bieten, indirekt eine K_d-Wertbestimmung von nicht radioaktiven Liganden durchzuführen. Eine solche Bestimmung kann bspw. in einem Verdrängungsexperiment in Bezug auf einen bekannten Konkurrenzliganden erfolgen.

Zum anderen wurde ein bereits etabliertes Bindungsassay *PolarScreen™ Estrogen Receptor Alpha (ER Alpha) Competitor Assay, Red*, der Firma life technologies™ zu Vergleichszwecken verwendet. Dieser Assay ermöglicht eine indirekte K_d-Wertbestimmung über ein Verdrängungsexperiment in Bezug auf einen bekannten Konkurrenzliganden Fluormon™.

Die Affinitätsbeurteilung der Verbindung **BPD** wurde nicht über eine K_d-Wertbestimmung durchgeführt, da die zugrunde liegende Targetingeigenschaft von **BPD** nicht aus einem Assoziations/Dissoziations-Gleichgewicht mit dem AR resultiert, sondern auf dem Ausbau einer irreversiblen Bindung beruht. Aus diesem Grund wurden die Targetingeigenschaften des **BPD** mittels einer Tumoranreicherung in einem *in ovo*-Modell untersucht (Siehe: **3.3.4 PET Aufnahmen der Tumore auf der CAM des Hühnereis, S. 51.**).

3.3.1.1 Aufbau des neuen Bindungsassays

Das zugrunde liegende Prinzip des neuen Bindungsassays ist die Titration der Estrogenrezeptoren mit radioaktiv markierten Liganden. Dabei hängt die praktische Durchführbarkeit eines solchen Assays von der Separation der ER-Radioligand-Komplexe von freien Radioliganden und deren anschließender Detektion ab. Dies sollte durch eine dauerhafte Immobilisierung der ER an einer Adsorptionsmatrix ermöglicht werden. Dadurch könnten nach erfolgter Titration die freien Radioliganden von den gebundenen durch einen Waschvorgang separiert werden.

Für die Immobilisierung der ER wurden Mikrotiterstreifenplattenwells aus einem hochbindenden Material, ImmunoGrade™ der Firma Brand verwendet. Die Wells dienen sowohl als Reaktions- als auch als Messgefäße. Für das Assay wurden rekombinant hergestellte, humane ER als ER-Lösung von der Firma Thermo Fischer verwendet. Die Adsorption der Estrogenrezeptoren ER an die Oberfläche der Wells erfolgte aus einer 10 µM ER-Lösung. Als Inkubationsmedium wurde ein BPS Puffer verwendet^{122,123}. Die ER-Lösung wurde 24 h bei 4 °C inkubiert^{122,123} und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen der ¹⁷⁷Lu -markierten EesPD/PBS Lösungen titriert. Die Wells wurden zwischen den einzelnen Schritten 3 X mit einer 0,05 % Tween 20/PBS Lösung gewaschen. Für die Minimierung der unspezifischen Bindung und der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, wurde die Welloberfläche vor der Titration mit humanem Serumalbumin HSA vorbehandelt¹²⁴. Dadurch sollten die Leerstellen der Welloberfläche vom HSA besetzt und somit eine Adsorption des markierten Estrogens an die Welloberfläche vermindert werden. Es wurde festgestellt, dass sich für das Blocken der Leerstellen eine HSA/PBS Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL besonders gut eignet. Höhere HSA Konzentrationen erhöhen die Viskosität der Lösung und erschweren somit den Waschvorgang. Geringere HSA Konzentrationen schirmen die Welloberfläche zunehmend schlechter ab.

3.3.1.2 Sättigungsexperimente

Für die Feststellung der K_d -Werte der ¹⁷⁷Lu markierten Liganden [¹⁷⁷Lu]EesPD und [¹⁷⁷Lu]EsPD wurden Sättigungsexperimente durchgeführt. Dabei wurden die ER-beladenen und HSA-geblockten Wells mit den zu untersuchenden, ¹⁷⁷Lu markierten Liganden titriert. Die Konzentrationsreihen wurden individuell für die entsprechenden Liganden so angepasst,

dass die K_d -Werte der entsprechenden Liganden sich zum einen innerhalb des getesteten Konzentrationsbereichs befanden und zum anderen ein gesättigter Zustand beobachtet werden konnte. Die gemessene Aktivität wurde nachträglich über die spezifische Aktivität des Radioliganden auf den Gehalt der besetzten ER in pmol umgerechnet. Die spezifische Bindung der Radioliganden konnte durch die Subtraktion der gemessenen Werte der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung erhalten werden. Die unspezifische Bindung wurde durch eine Titration mit den gleichen Radioliganden in Anwesenheit eines nicht aktiven hochaffinen Konkurrenzliganden DES im Überschuss ermittelt. Die Versuche wurden als Triplikate durchgeführt. Die Messergebnisse der Versuche wurden mit dem Programm Prism 7.05 von *GraphPad* ausgewertet. Die Berechnung der K_d -Werte erfolgte über eine numerische Anpassung einer Sättigungsfunktion an die gewonnenen Messergebnisse für die Gesamtbindung, woraus sich die K_d - und B_{max} -Werte berechnen lassen.

Die Sättigungsexperimente mit $[^{177}\text{Lu}]\text{EesPD}$ und $[^{177}\text{Lu}]\text{EsPD}$ wurden in einem Sättigungsdiagramm zusammengefasst (**Abb. 34**).

Die Auswertung über die Sättigungskurve ergab einen K_d -Wert für $[^{177}\text{Lu}]\text{EesPD}$ von 29 nM und einen B_{max} -Wert von 0,46 pmol. Für $[^{177}\text{Lu}]\text{EsPD}$ betrug der K_d -Wert 610 nM, der B_{max} -Wert lag bei 0,14 pmol.

Die B_{max} -Werte geben den adsorbierten Gehalt der aktiven ER an der Oberfläche der Wells wieder. Dieser liegt im Fall der Analyse von $[^{177}\text{Lu}]\text{EesPD}$ bei 0,46 pmol und im Fall von $[^{177}\text{Lu}]\text{EsPD}$ bei 0,14 pmol. Der Unterschied der B_{max} -Werte ist auf verschiedene Ursachen zurückzuführen. Da die Adsorption der ER an die Oberfläche der Wells einem reversiblen Vorgang entspricht, wirken sich jegliche Unterschiede im Ausführen der Waschvorgänge, wie Einhaltung der Inkubationsdauer oder die Zusammensetzung des Waschpuffers, auf die gemessenen B_{max} -Werte. Desweiteren können unterschiedliche B_{max} -Werte auf einen herstellungs- oder lagerungsbedingten Verlust der Rezeptoraktivität der ER hindeuten. Nichtsdestotrotz ist ein konstanter B_{max} -Wert nicht entscheidend für die K_d -Wertbestimmung.

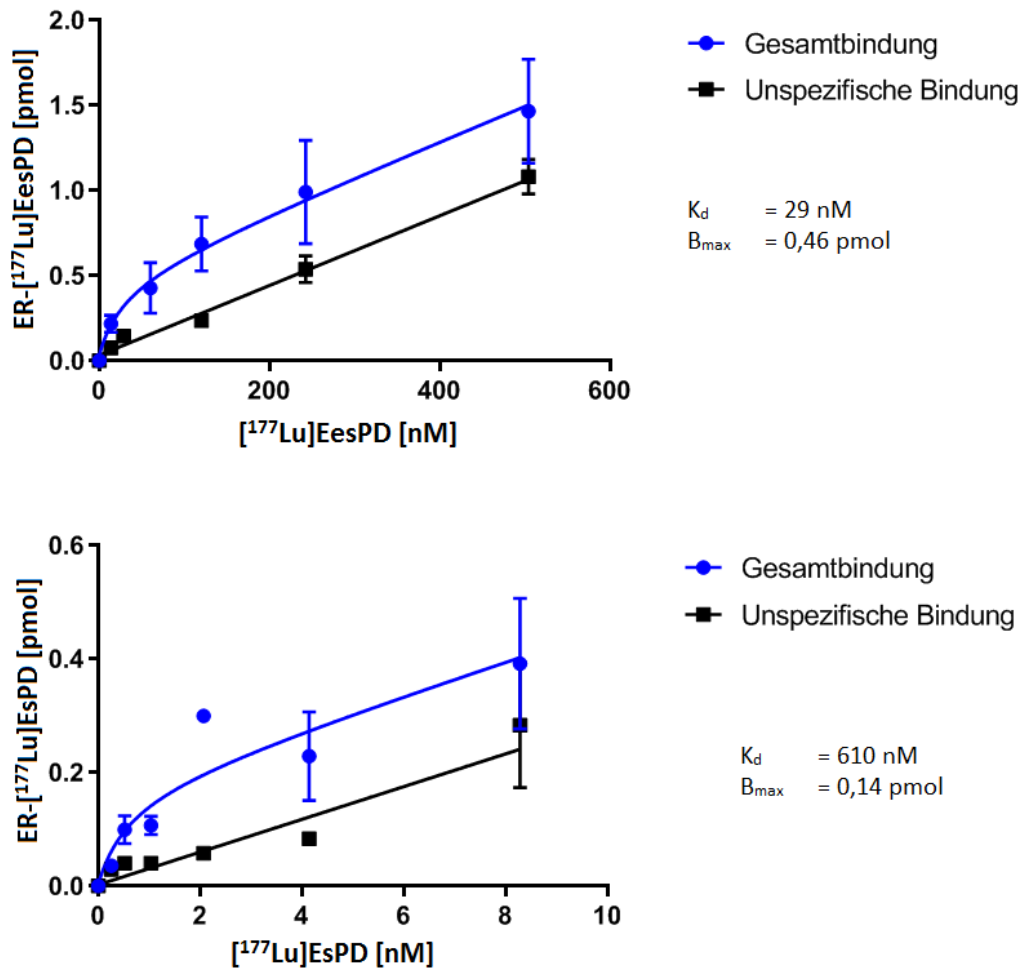


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Sättigungsexperimente mit dem ^{177}Lu -markierten EsPD und EesPD: Gemessene Gesamtbindung (blau), gemessene unspezifische Bindung (schwarz).

Grundsätzlich ist das Assay für die Durchführung von Affinitätsuntersuchungen im Sinne einer K_d -Wertbestimmung geeignet. Die ER lassen sich an der Oberfläche des Trägermaterials mit einer Menge von 0,14 pmol oder höher adsorbieren und es kann mittels einer Titration mit Radiotracern die Gesamt- und die unspezifische Bindung deutlich voneinander unterschieden und bestimmt werden. Allerdings bedarf diese Methode sehr hoher Rezeptormengen, was mit einem hohen Kostenaufwand verbunden ist.

3.3.2 IC_{50} -Wertbestimmung mittels PolarScreen™ Estrogen Receptor Alpha (ER Alpha) Competitor Assay, Red

Die IC_{50} -Wertbestimmung wurde mittels PolarScreen™ Estrogen Receptor Alpha (ER Alpha) Competitor Assay, Red nach dem Fluoreszenzpolarisation/Fluoreszenzanisotropie-Verfahren durchgeführt. Dieses Verfahren nutzt den Einfluss der Molekülgröße auf die Polarisation der Fluoreszenzemission aus. Bei einer Bindung der Fluoreszenzsonde an größere bzw. trägere Strukturen ist die Polarisation der Fluoreszenz höher, als im ungebundenen Zustand (Abb. 35).¹²⁵

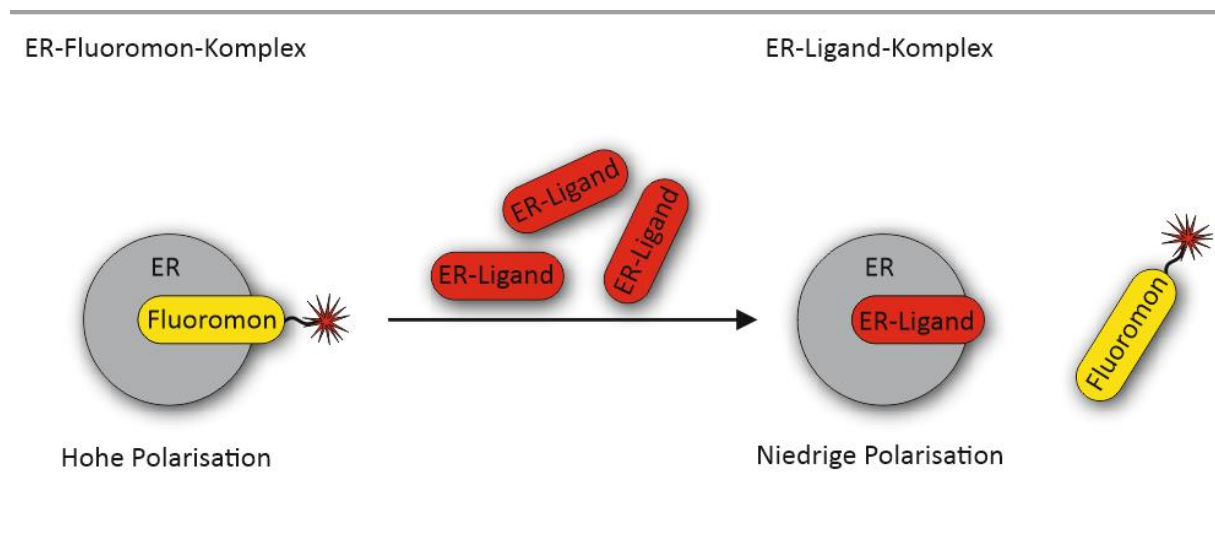


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Fluoreszenzdepolarisations-Estrogenrezeptor-Verdrängungsassays.

Somit kann die Verdrängung eines kleineren Fluoreszenzmarkierten Estrogens aus einem vergleichsweise viel größeren ER über die abfallende Polarisation bzw. Anisotropie der Fluoreszenz nachvollzogen werden.

Bei der Messung wurde ein Komplex aus ER und einem fluoreszierenden Estrogen, dem *Fluoromon*TM mit einem bekannten K_d -Wert von 7 - 14 nM, mit zu untersuchenden Liganden titriert. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellervorgaben. Für eine deutlich detektierbare Veränderung der Polarisation musste der ER im Überschuss vorliegen, damit das *Fluoromon*TM nahezu vollständig komplexiert und der Anfangswert der Fluoreszenzpolarisation so hoch wie möglich vorliegt.

Die Verdrängungsdiagramme der Verbindungen **EsPD** und **EesPD** sind zusammen mit dem Verdrängungsdiagramm der Referenzsubstanz 17 β -Estradiol (**Es**) in **Abbildung 36** zusammengefasst.

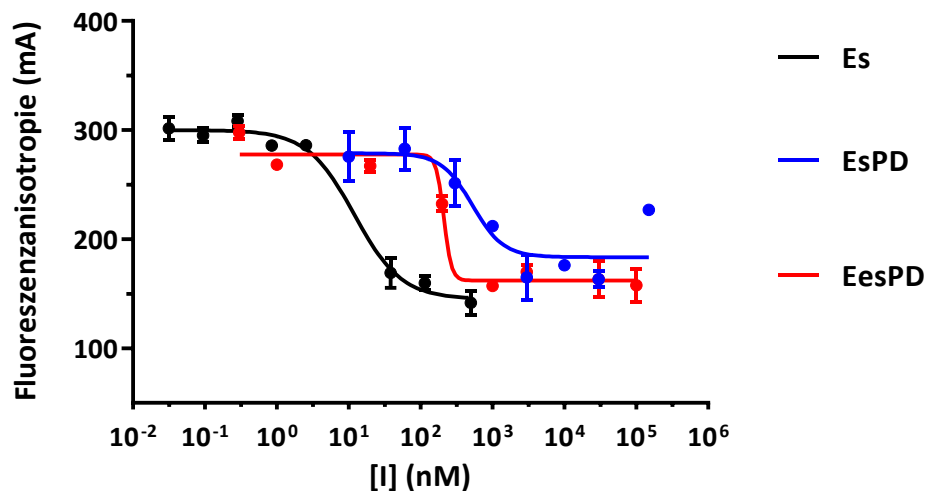


Abbildung 32: Verdrängungsdiagramme von Fluoromon durch 17 β -Estradiol (**Es**) (schwarz), Estradiol-PEG-DOTA (**EsPD**) (blau) und Ethylestradiol-PEG-DOTA (**EesPD**) (rot).

Anhand der Verdrängungsdiagramme wurden anschließend mit Prism 7.05 von *GraphPad* die IC₅₀-Werte der jeweiligen Substanzen bestimmt.

Die K_d-Werte der Testsubstanzen konnten aus den erhaltenen IC₅₀-Werten berechnet werden (**Tabelle 2**). Die Berechnung erfolgte über die mathematische Beziehung aus der, von Nikolovska-Coleska et al. beschriebenen **Gleichung 7** und nicht nach der Cheng-Prusoff-Gleichung, da diese nicht alle Versuchsparameter, wie eine hohe Fluoromon-Konzentration, abdeckt (siehe Begründung **1.7.1 IC₅₀**; **S. 18**).⁸⁰ Dazu wurde ein Excel sheet verwendet, der von der selbigen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde.¹²⁶

$$K_{d(\text{Testsubstanz})} = \frac{[I]_{50}}{\frac{[L]_{50}}{K_{d(\text{Fluoromon})}} + \frac{[R]_0}{K_{d(\text{Fluoromon})}} + 1} \quad (7)$$

Tabelle 2: Aus den Verdrängungsdiagrammen (**Abb. 36**) mittels Prism 7.05 berechneten IC₅₀-Werte und mittels mathematischer Beziehung gemäß **Gleichung 7** berechnete K_d-Werte.

Ligand	IC ₅₀ [nM]	K _d (Ligand) [nM]
Es	14±4	4
EsPD	531±130	70
EesPD	212±8	24

Für **EsPD** bzw. **EesPD** konnten IC₅₀-Werte von 531±130 nM bzw. 212±8 nM bestimmt werden. Der IC₅₀-Wert der Referenzsubstanz **Es** betrug 14±4 nM. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten hat einen K_d-Wert von 70 nM für **EsPD** und 24 nM für **EesPD** ergeben.

Damit hat sich die chemische Modifikation der Estrogene mit DOTA erwartungsgemäß negativ auf die Affinität der Gesamtverbindung ausgewirkt. Der Vergleich der K_d-Werte von **Es** und der DOTA-modifizierten Form **EsPD** ergibt eine K_d-Wertsteigerung bzw. einen Affinitätsverlust von mehr als 1750%. Allerdings fällt auf, dass die Ethyl-Modifikation in 11β-Position des Steroids, ihrerseits eine Affinitätssteigerung hervorruft. Dadurch wird der Affinitätsverlust durch DOTA-Modifikation zu einem sehr großen Teil ausgeglichen. Somit wäre der nächste Schritt, eine alternative DOTA-Modifikation vorzustellen, die mit geringeren Affinitätsverlusten verbunden ist.

Bei einem Vergleich der über den Sättigungsassay bestimmten K_d-Werte, von 610 nM für **[¹⁷⁷Lu]EsPD** und 29 für **[¹⁷⁷Lu]EesPD**, fällt grundsätzlich auf, dass diese K_d-Werte höher ausfallen. Dem könnte ein systematischer, assaybedingter Fehler zugrunde liegen. Allerdings könnten die höheren K_d-Werte auch auf, durch die ¹⁷⁷Lu-Markierung hervorgerufenen Affinitätsverluste zurückzuführen sein, die umso höher an Einfluss gewinnen, je niedriger die Affinität des Vektors ausfällt. Um diese Frage zu klären, müssten weitere K_d-Werte von ähnlichen Substanzen über beide Methoden bestimmt und miteinander verglichen werden.

Die Verbindung **EsECI** wurde in einem Schnelltestverfahren auf eine ausreichende Affinität untersucht. Dabei sollte mit einer 1 mM Lösung der jeweiligen Substanz eine Verdrängung des Fluoromons hervorgerufen werden. Durch das Schnelltestverfahren konnte keine nennenswerte Verdrängung festgestellt werden, was auf einen IC₅₀-Wert von weit über 1 mM hindeutet. Daher wurde diese Verbindung nicht weiter untersucht.

3.3.3 Xenotransplantation an der Chorioallantoismembran (CAM)

Aufgrund der viel geringeren Kultivierungszeiten, kostengünstigeren Anschaffung und einfacheren Handhabung wurde das CAM-Experiment als Vorstufe für Tierversuche in Betracht gezogen und auf seine diesbezügliche Eignung geprüft.^{127,128}

Für das CAM-Kultursystem wurden die MCF7 (ER α^+) und LNCaP (AR $^+$, PSMA $^+$) Zelllinien verwendet. Die Vorkultivierung der jeweiligen Zelllinien erfolgte in Kulturflaschen bei Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂-Sättigung, Wasserdampf-gesättigte Atmosphäre). Für MCF7-Zellen wurde DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) und LNCaP-Zellen RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) Medium mit 10 % FBS und 5 % Antibiotika (Penicillin-Streptomycin) eingesetzt. Es wurde bei 80 - 90 %iger Konfluenz 1:8 passagiert. Die CAM-Kultur wurde mit Zellen der 3. Passage durchgeführt.

Der Zeitpunkt der CAM-Applikation eines befruchteten Hühnereis ist entscheidend für die Einnistung des Tumorgewebes und hängt von dem Fortschritt der CAM-Vaskularisierung und der Entwicklung des Immunsystems ab. Für Anwendungen im Zusammenhang mit Transplantationen ist zu beachten, dass das Immunsystem des Hühnerembryos ab dem 15. Tag nach der Befruchtung seine physiologische Aktivität erreicht.⁸² Somit würde eine zu frühe Applikation, während einer niedrig ausgeprägten Vaskularisierung, zu einer Unterversorgung und somit zum Tod der Tumorzellen führen. Bei einer späten Applikation hingegen, geht wertvolle Inkubationszeit verloren, da das xenotransplantierte Tumorgewebe ab dem 15. Tag als solches vom Immunsystem des Embryos erkannt und angegriffen wird.⁸⁴ Es wurde festgestellt, dass sich der 8. Tag nach der Befruchtung als ein optimaler Applikationszeitpunkt eignet.¹²⁹

Die freigelegte CAM der Hühnereier wurde mit einer Zellsuspension inokuliert. Dabei wurden 1 Mio. Zellen der jeweiligen Zelllinie in 8 μ L Kulturlösung mit weiteren 8 μ L einer

Implantationsmatrix MatriGel® (Corning) versehen und auf die CAM des Hühnereis aufgetragen (**Abb. 37**).

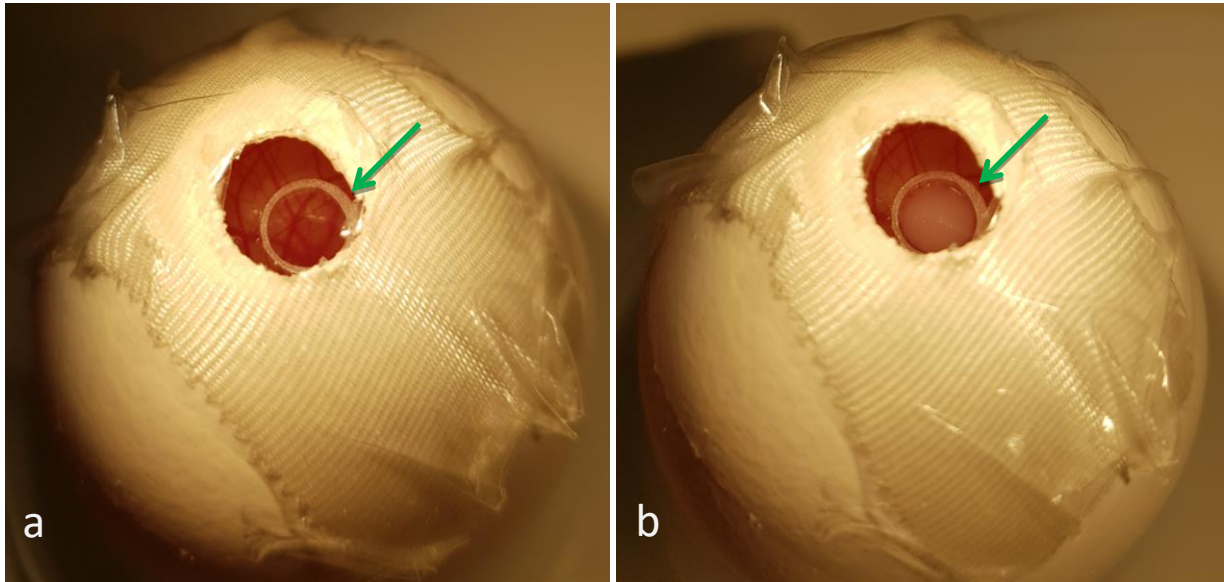


Abbildung 37: Fotografie eines Hühnereis vor (a) und nach (b) der Beimpfung mit Tumorzellen.

Die Zellsuspension wurde durch einen vorher angebrachten Silikonring in der Nähe eines großen Blutgefäßes lokalisiert. Die Öffnung in der Kalkschale wurde über die Dauer der Kultivierung mit einer diffusionsfähigen Membran verschlossen. Auf diese Weise sollte eine Austrocknung oder Kontamination der CAM vermieden werden. Die Kultivierungsdauer betrug 6 Tage und wurde am 14. Tag nach der Befruchtung des Eis für Untersuchungen unterbrochen.

Von den jeweils 12 mit LNCaP- bzw. MCF7-Zellen behandelten Hühnereiern, konnte in allen Fällen eine deutliche Tumorbildung beobachtet werden. Die Tumorgößen variierten von 0,5 bis 26 mm³. Die Tumore der Zelllinie LNCaP bildeten einerseits klar abgegrenzte, spheroidale und andererseits diffuse, invasive Strukturen (**Abb. 38**).

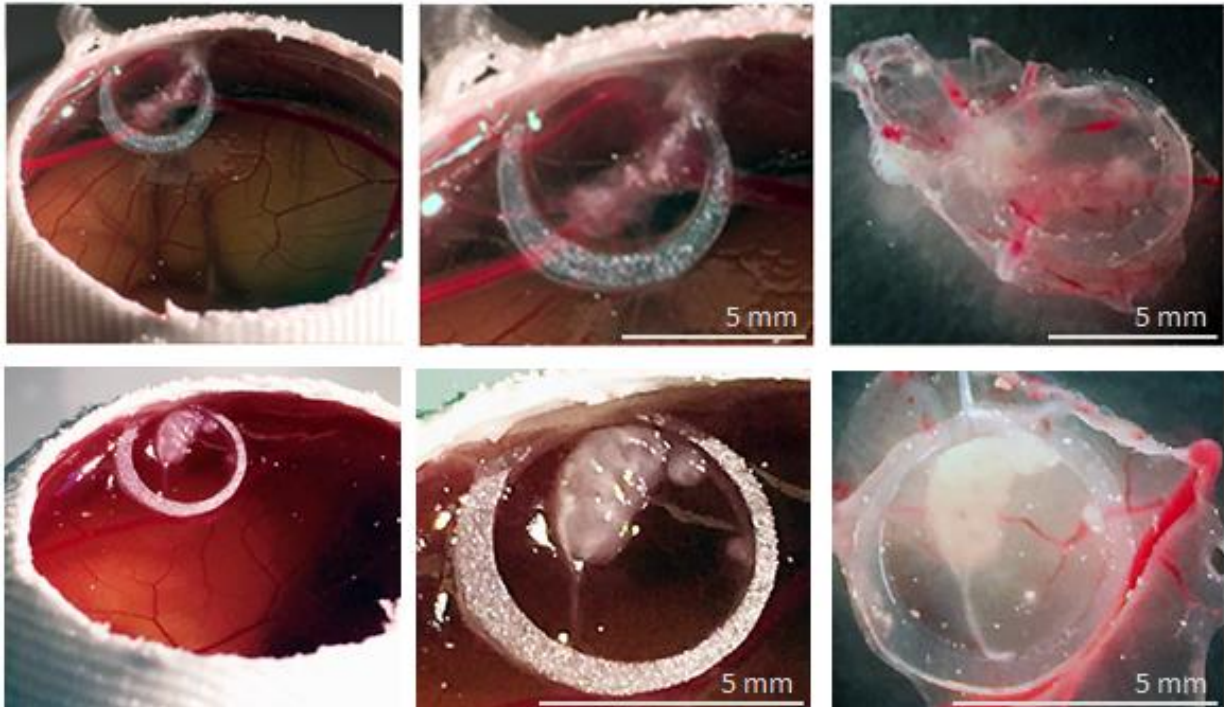


Abbildung 38: Repräsentative Darstellung der CAM-kultivierten Tumore der Zelllinie LNCaP. Oben invasiv verlaufender Tumorwachstum; unten spheroidal, abgegrenzt.

Die Tumore der Zelllinie MCF7 bildeten hingegen nur Strukturen mit klar abgegrenzten Rändern (**Abb. 39**). Somit konnten während einer Kultivierungsdauer von 6 Tagen ausreichend große Tumore gezüchtet werden, um in weiteren Versuchen pharmakokinetische Eigenschaften bestimmter Substanzen unter in ovo-Bedingungen zu testen.

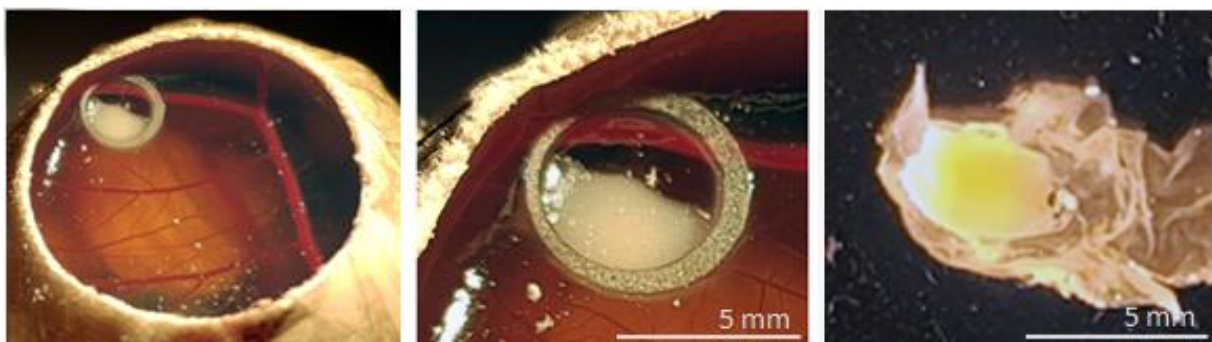


Abbildung 39: Repräsentative Darstellung der CAM-kultivierten Tumore der Zelllinie MCF7.

3.3.4 PET Aufnahmen der Tumore auf der CAM des Hühnereis

Für die Untersuchung pharmakokinetischer Eigenschaften von Radiotraceren wurden deren Verteilung im Organismus des Hühnerembryos und eine mögliche Akkumulation im jeweiligen Tumorgewebe mittels PET untersucht. Es wurden die radioaktiv-markierten Tracer $[^{68}\text{Ga}]\text{BPD}$, $[^{18}\text{F}]\text{PSMA7}$, und $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (Abb. 40) an LNCaP-Tumor-beimpften Hühnereiern und $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ an MCF7-Tumor-beimpften Hühnereiern getestet.

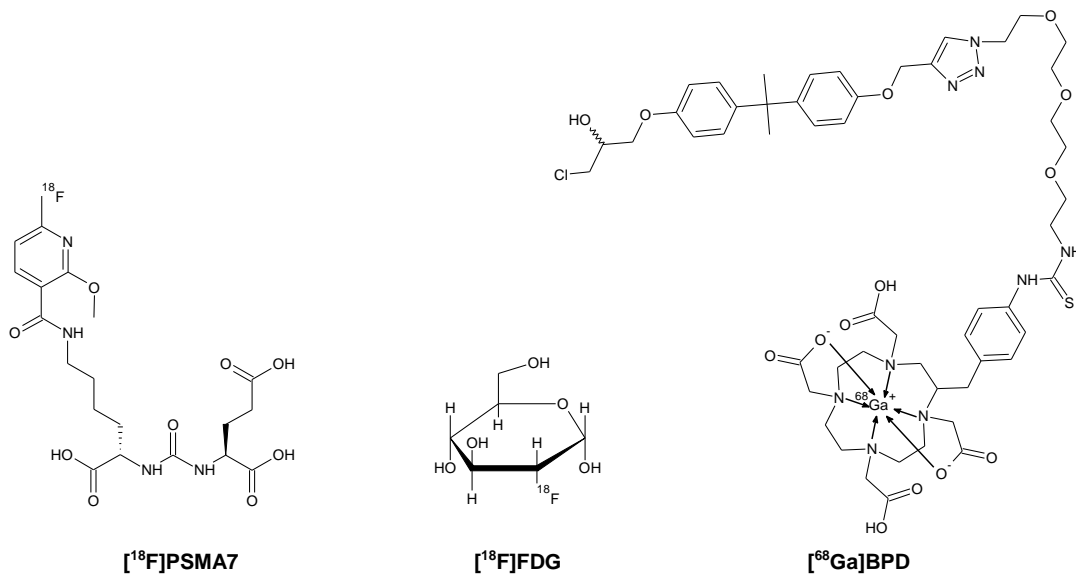


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Strukturformeln der Radiotracer $[^{18}\text{F}]\text{PSMA7}$, $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{BPD}$.

Für die Untersuchung der Tracer wurden 20 μL einer Radiotracerlösung in den Blutstrom des Embryos über eine Vene injiziert und zwischen 0 und 30 min mit einem PET-Scanner gemessen. Für die physiologische Quantifizierung und die Möglichkeit des Vergleichs der Radioaktivitätskonzentrationen, wurde das „standardized uptake value“ bezogen auf das Gewicht des Eis bestimmt (SUV_{BW}). Die Bestimmung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{SUV}_{\text{BW}} = \frac{\text{detektiertes Signal} * \text{Gewicht des Eis}}{\text{apliizierte Aktivität}} \quad (9)$$

Die auf diese Weise gewonnenen und normierten PET-Aufnahmen lassen eine deutliche Tumorvisualisierung erkennen (**Abb. 41**). Die daraus abgeschätzte Tumorgroße beläuft sich beim $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ visualisierten LNCaP-Tumor auf ca. 24 mm^3 , beim $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ visualisierten MCF7-Tumor auf ca. 10 mm^3 , beim $[^{68}\text{Ga}]\text{BPD}$ visualisierten LNCaP-Tumor auf 26 mm^3 und beim $[^{18}\text{F}]\text{PSMA7}$ visualisiertem LNCaP-Tumor auf 10 mm^3 .

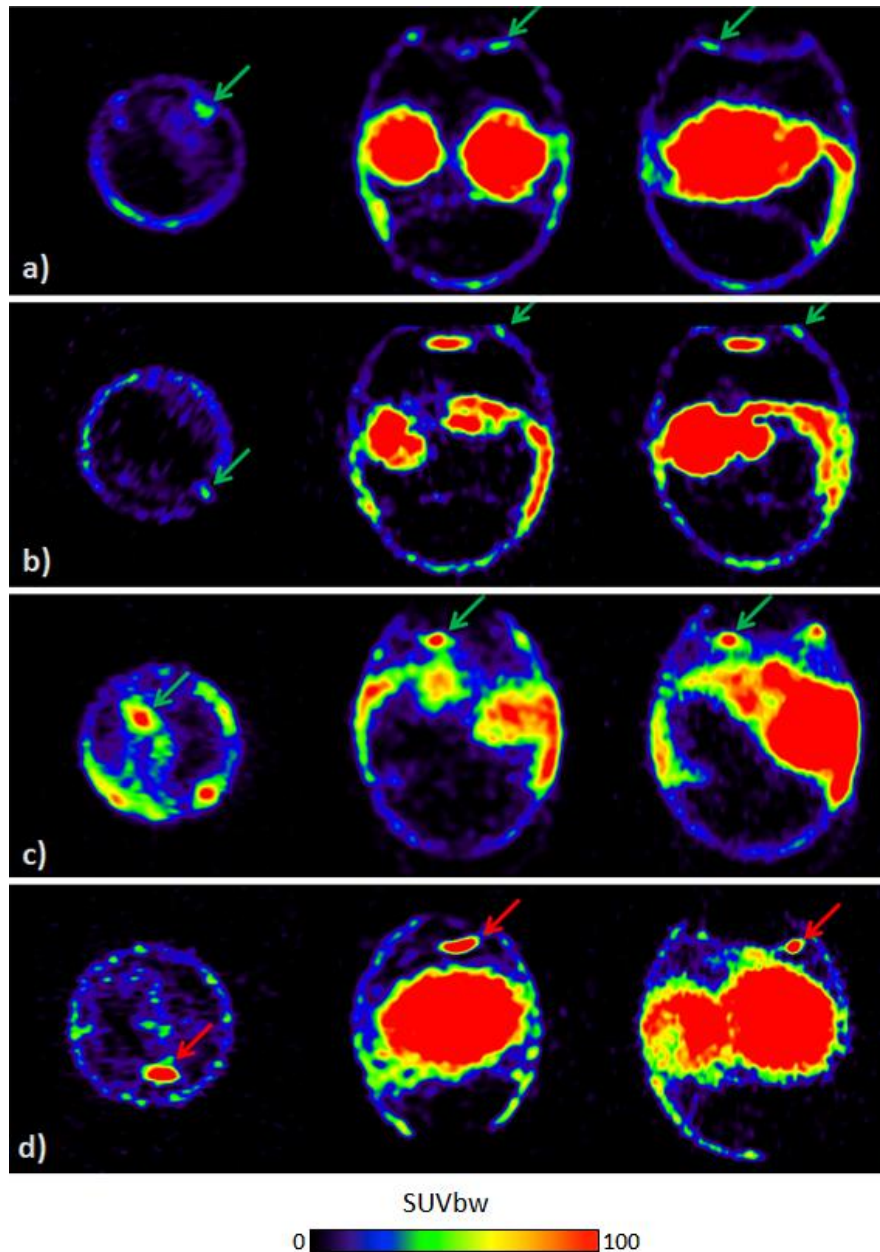


Abbildung 41: SUF_{BW} -normierte PET-Aufnahmen von, auf der CAM von Hühnereiern gezüchteten, Tumoren. Aufgenommen über einen Zeitraum von 30 Minuten: a) Mittels $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ visualisiertem Tumor der LNCaP Zelllinie; b) Mittels $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ visualisiertem Tumor der MCF7 Zelllinie; c) Mittels $[^{68}\text{Ga}]\text{BPD}$ visualisiertem Tumor der LNCaP Zelllinie; d) Mittels $[^{18}\text{F}]\text{PSMA7}$ visualisiertem Tumor der LNCaP Zelllinie.

Für die Überprüfung der Akkumulationsrate der Radiotracer in den jeweiligen Tumoren, wurde die Veränderung der Aktivitätskonzentration [Bq/mm³] über einen Zeitraum von 30 min im Tumorgewebe und im Blut bestimmt. Dazu wurden „Time Activity Curves“ (TAC) des Blutes und des Tumorgewebes bestimmt und miteinander verglichen (**Abb. 42**). Bei einer Akkumulation der Radiotracer im Tumorgewebe ist von einer stärkeren Aktivitätsabnahme im Blut, als im Tumor auszugehen. Wenn hingegen keine Akkumulation im Tumor vorliegt, ist von einer stärkeren Aktivitätsabnahme im Tumorgewebe auszugehen.

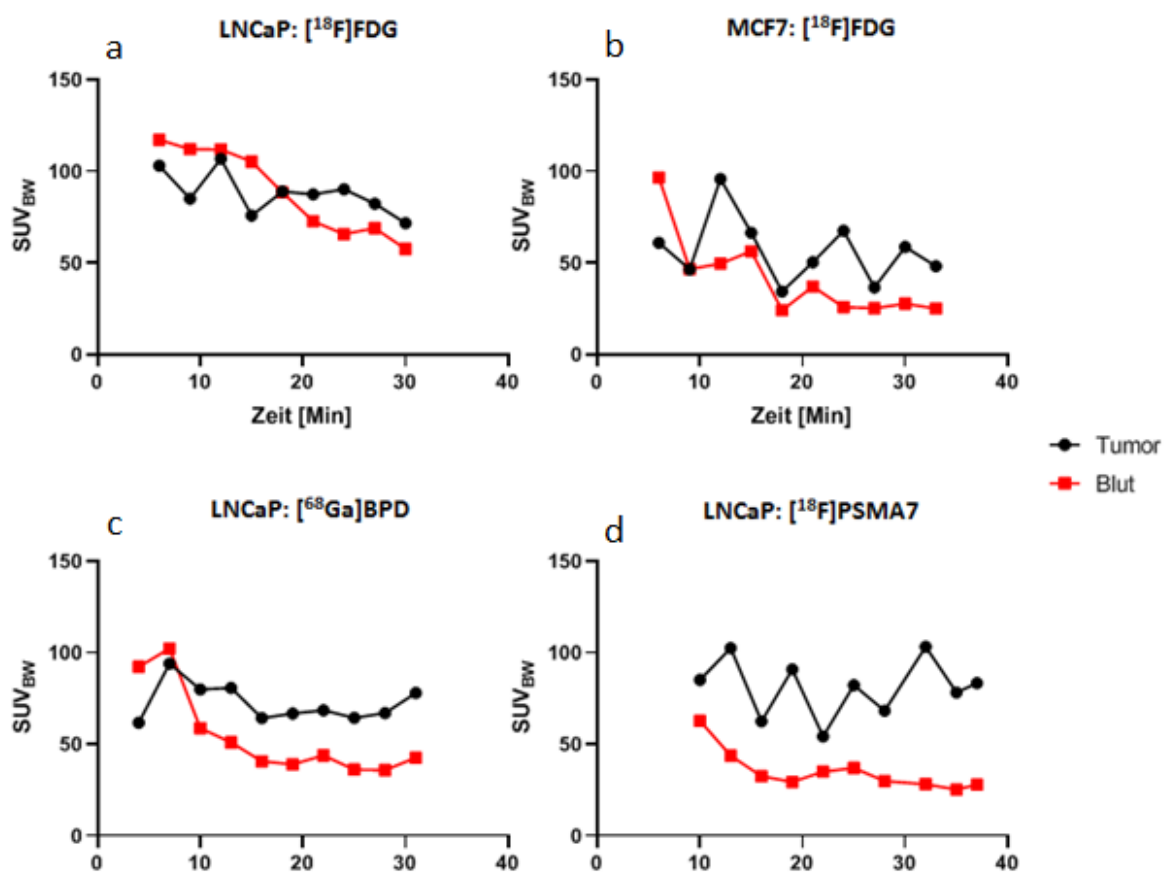


Abbildung 42: TAC im Tumorgewebe (schwarz) und Blut (rot) von: a) [¹⁸F]FDG im Fall eines LNCaP-Tumors; b) [¹⁸F]FDG im Fall eines MCF7-Tumors; c) [⁶⁸Ga]BPD im Fall eines LNCaP-Tumors und d) [¹⁸F]PSMA7 im Fall eines LNCaP-Tumors.

Die TAC von a) und b) (**Abb. 42**) zeigen in der Anfangszeit eine höhere Aktivitätskonzentration im Blut als im Tumorgewebe. Nach ca. 20 min im Fall von a) und

nach ca. 10 min im Fall von **b**) kehrt sich das Verhältnis und das Tumorgewebe weist eine höhere Aktivitätskonzentration auf. Dies deutet auf eine leichte Anreicherung von **[¹⁸F]FDG** im Tumorgewebe hin. Allerdings wird ebenfalls deutlich, dass es zu einer stetigen Abnahme der Aktivitätskonzentration sowohl im Blut als auch im Tumorgewebe kommt, was im Fall eines unspezifischen Tracers, wie **[¹⁸F]FDG**, typisch ist.

Bei einer näheren Betrachtung der spezifischen Tracer **[⁶⁸Ga]BPD** bzw. **[¹⁸F]PSMA7** (**c** bzw. **d**), stellt sich mit der Zeit ein deutlich höherer Unterschied zwischen der Aktivitätskonzentration im Blut und im Tumorgewebe ein. Diese Tatsache deutet auf eine spezifische Anreicherung eines Tracers im Tumorgewebe und damit auf eine entsprechende Tumoraффinität hin. Im Fall von **[⁶⁸Ga]BPD** beträgt das Verhältnis zwischen der im Blut und im Tumor befindlichen Aktivität nach 30 min 1,82; im Fall von **[¹⁸F]PSMA7** 2,99. Somit scheint die Akkumulation von **[¹⁸F]PSMA7** im LNCaP-Tumorgewebe höher zu liegen als im Fall von **[⁶⁸Ga]BPD**. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Da die PSMA-Überexpression in LNCaP-Tumoren mit 1,7 Mio. Bindungsstellen pro Zelle¹³⁰ weit über der des AR mit 30.000 Bindungsstellen pro Zelle¹³¹ liegt, kann es daher im LNCaP-Tumorgewebe zu einer höheren oder zumindest schnelleren Anreicherung des PSMA-spezifischen **[¹⁸F]PSMA7** kommen. Außerdem spielt ebenfalls die Tatsache eine Rolle, dass man *de facto* nicht über eine Clearance *in ovo* sprechen kann. Daher kann es zu einer verzögerten Aktivitätsabnahme im Blut kommen. Dies könnte bspw. durch geringere Applikationsdosen oder längere Messzeiten überprüft werden.

3.3.5 Fazit

Für die Behandlung von Prostata- bzw. Brustkrebs sollten radioaktiv-markierbare, organische Verbindungen hergestellt werden, die aufgrund ihrer hohen AR- bzw. ER-Affinität zu einer Akkumulation der Radioaktivität im entsprechenden Tumorgewebe führen sollten. Hierzu wurden ein irreversibel bindender AR-Ligand **EPI-046** und ein hoch affiner ER-Ligand **Ees** über einen PEG₃-Spacer mit einem DOTA-Chelator konjugiert, um den AR-Präkursor **BPD** und ER-Präkursor **EesPD** zu erhalten. Die Aufbaustrategie der Präkursor wurde so gewählt, dass der finanzielle, technische und synthetische Aufwand möglichst gering gehalten werden konnte.

Die radiochemische Markierung der Verbindungen **BPD** und **EesPD** mit ¹⁷⁷Lu bzw. ⁶⁸Ga ergab eine radiochemische Reinheit von 98 % im Fall der ¹⁷⁷Lu-Markierung und 96 % im Fall der ⁶⁸Ga-Markierung. Die Stabilität des ¹⁷⁷Lu-Markierungsprodukts [¹⁷⁷Lu]**BPD** in Serum betrug nach 24 h 94 % und nach 48 h 89 %. Im Fall des [¹⁷⁷Lu]**EesPD** betrug die Stabilität nach 24 h 96 % und nach 48 h 92 %.

Es wurde ein Assay zur Bestimmung der K_d-Werte von radioaktiv-markierten Liganden etabliert und getestet. Die K_d-Wertbestimmung für [¹⁷⁷Lu]**EesPD** ergab einen K_d-Wert von 29 nM. Eine alternative Affinitätsuntersuchung mittels eines Fluoreszenz-Depolarisations-Assays ergab für die nichtmarkierte Verbindung **EesPD** einen K_d-Wert von 24 nM.

Es konnte ein HE-CAM-Kultursystem für LNCaP- bzw. MCF7-Tumorkultivierung *in ovo* etabliert werden. Dieses System konnte für Affinitätsstudien von radioaktiv-markierten Substanzen verwendet werden.

Der *in ovo* PET-Versuch von ¹⁸F-markiertem FDG an LNCaP- bzw. MCF7-tumorapplizierten HE-CAM-Systemen ergab zwar eine Visualisierung der Tumore, allerdings keine nennenswerte Anreicherung des FDG im jeweiligen Tumorgewebe. Im Vergleich dazu konnte sowohl eine Visualisierung als auch eine deutliche Tumorakkumulation von [⁶⁸Ga]**BPD** bzw. [¹⁸F]**PSMA7** mit einem Tumor/Blutverhältnis von 1,82 bzw. 2,98 festgestellt werden.

4 Materialien und Methoden

4.1 Organochemische Synthesen

Im folgenden Abschnitt werden die Methoden der organochemischen Synthesen der hergestellten Verbindungen beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Durchführung der Synthesen im Rahmen einer Kooperation mit dem Zentrum für Molekulare Medizin Köln (**ZMMK**) der Universität zu Köln in einem vom **ZMMK** zur Verfügung gestellten Labor. Die Aufreinigung der Rohprodukte wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Ines Neundorf durchgeführt.

Die Synthese der Verbindungen **BP**, **BPE**, **BPE-Cl** sowie **EsFL** und **EesFL** wurde am Institut für anorganische Chemie der Bergischen Universität Wuppertal im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Fabian Mohr durchgeführt.

4.1.1 Geräte und Chemikalien

Alle Chemikalien und Reagenzien, soweit nicht anders angegeben, wurden von Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) erworben.

Folgende Chemikalien wurden von anderen Herstellern käuflich erworben:

1-Amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecan (Iris Biotech), Fmoc-L-Lys(N₃)-OH (Iris Biotech), p-SCN-Bn-DOTA (Macrocyclics), Methanol *d*⁶ (Merk), Methanol (Merk), Ethanol (Merk).

4.1.2 Massenspektrometrische Analyse

Die analytische Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen wurde mittels Umkehrphasen-HPLC/MS (RP-HPLC-MS) durchgeführt. Die aufgereinigte Substanz wurde im Lösungsmittel B (10% ACN, 0,1% TFA) zu etwa 10 – 30 µM gelöst und auf eine Umkehrphasen-HPLC-Säule (Nucleodur 100-5; C18ec; 4.6 x 125 mm, Macherey-Nagel) aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine lineare Gradientenelution unter Erhöhung der Konzentration des Lösungsmittelgemisches B in A (A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,1% TFA in MeCN) über einen Zeitraum von 15 min und einer Flussrate von 0,6 ml/min. Nach der Elution erfolgte, unter einer simultanen Detektion der

AU-Absorption, die Massenspektrometrie. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels der Software Xcalibur (Thermo Scientific).

4.1.3 Präparative Säulenchromatographie

Für die säulenchromatographische Reinigung wurde Kieselgel Geduran Si 60 (Korngröße 63 – 200 μm) der Firma Merck verwendet.

4.1.4 Preparative Aufreinigung mittels HPLC

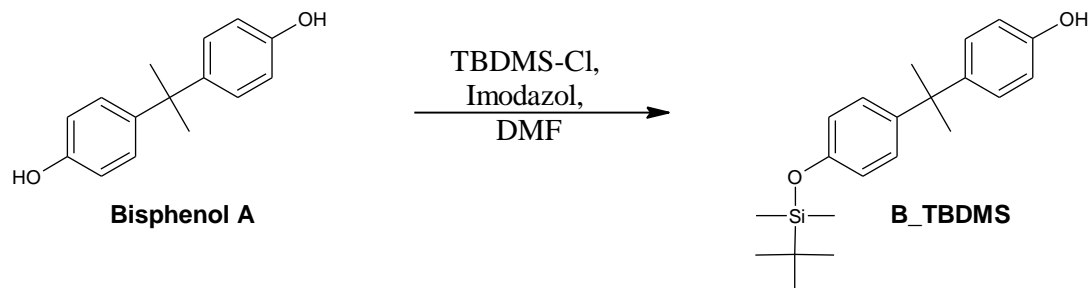
Die Aufreinigung von Polyethylenglykol haltigen Verbindungen wurde mittels präparativer Umkehrphasen-HPLC durchgeführt. Es wurde weniger als 30 mg des Rohproduktes in Lösungsmittelgemisch B (10% MeCN, 0,1% TFA) gelöst und auf eine Nucleodur Säule (1005; C18ec; 16 x 250 mm) von Macherey-Nagel aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung erfolgte über eine lineare Gradientenelution unter Erhöhung der Konzentration des Lösungsmittelgemisches B in A (A: 0,1% TFA in Wasser, B: 0,08% TFA in MeCN). Die Fraktionierten Verbindungen wurden anschließend vom Acetonitril befreit und unter Vakuum lyophilisiert.

4.1.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die NMR Spektren der Verbindungen wurden auf einem Avance-400 (^1H 400.13 MHz, ^{13}C 100.61 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung wird in δ Werten in ppm angegeben. Als Bezug dienen die ^1H - bzw. ^{13}C -Signale des verwendeten deuterierten Lösungsmittels. Die Kopplungskonstanten J werden in Hertz (Hz) angegeben. Die Angabe der Spinmultiplizitäten wird folgendermaßen abgekürzt: s: (Singulett), d: (Dublett), t: (Triplett), q: (Quartett), und m: (Multipllett). Die Nummerierung in den Abbildungen der Moleküle verfolgt den Zweck der anschaulichen Zuordnung der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome. Sie entspricht nicht in allen Fällen der IUPAC-Nomenklatur.

4.2 Synthesen

4.2.1 Synthese des B_TBDMS



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
Bisphenol A	1 g	228,29	1
TBDMS-Cl	77 mg	159,72	1,1
Imidazol	60 mg	68,08	2
DMF	1 mL		

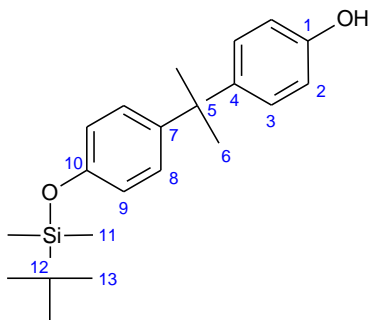
Durchführung

Bisphenol A (1 g, 4,3 mmol, 1 Eq.), Imidazol (600 mg, 0,88 mmol, 2 Eq.) und TBDMS-Cl (770 mg, 4,7 mmol, 1,1 Eq.) wurden im trockenen DMF (1 mL,) gelöst. Die Reaktionslösung wurde 4 h. bei Zimmertemperatur gerührt, wobei der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie nachverfolgt wurde. Nach dem Ablauf der Reaktion wurde das DMF mittels Rotationsverdampfer entfernt und der Überstand mit Ethylacetat (2 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 2 mL H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Rohprodukt eingengt und mittels Silikagelchromatographie aufgereinigt.

Als Produkt wurde ein weißer kristalliner Stoff erhalten. Ausbeute: 68%.

Analysen:

$R_f(\text{PE/EA: 5/1})=0,6$



NMR

$^1\text{H-NMR}$ (Methanol d_4 , 400 MHz) d:

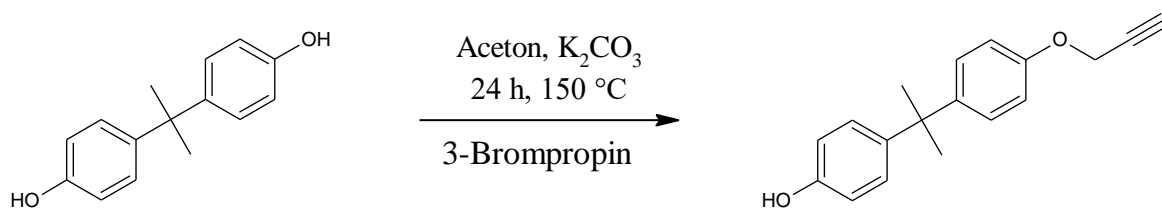
7,10 (4H, m, H8, 3), **6,75** (4H, m, H9, 2), **1,65** (6H, s, H6), **1,00** (9H, s, H13), **0,22** (6H, s, H11).

$^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol d_4 , 400 MHz) d:

153,28 (C10, 1), **143,55** (C7, 4), **127,94** (C8, 18), **127,65** (C3, 21), **119,25** (C9, 19), **114,65** (C2, 20), **41,71** (C5), **31,08** (C6), **25,70** (C13), **18,18** (C12), **4,38** (C11).

Masse $[\text{M}+\text{H}]^+$: 343,2; (Nominalmasse: 342,20)

4.2.2 Synthese des BP



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
Bisphenol A	5 mg	228,28	1
Kaliumcarbonat	9 mg	138,20	3
Propargylbromid	3,9 mg	118,96	1,5
Aceton	10 mL		

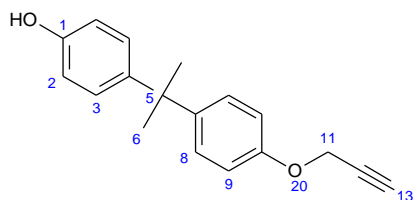
Durchführung

Bisphenol A (5 mg, 21,9 mmol, 1 Eq.) wurde in Aceton (10 mL) gelöst. Es wurde Kaliumcarbonat (9 mg, 65,7 mmol, 3 Eq.) und Propargylbromid (3,9 mg, 32,9 mmol, 1,5 Eq.) zugegeben und bei 150 °C über Nacht refluxiert. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O aufgenommen, mit Ethylacetat zweimal extrahiert und auf 4 g Silikagel im Rotationsverdampfer aufgetragen. Anschließend wurde das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Eluent wurde ein Lösungsmittelgemisch von Petrolether/Ethylacetat in einem Verhältnis von 5 zu 1 verwendet.

Als Produkt wurde ein gelbes Öl erhalten. Ausbeute 49%.

Analysen:

$R_f(\text{PE/EA: 5/1})=0,5$



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

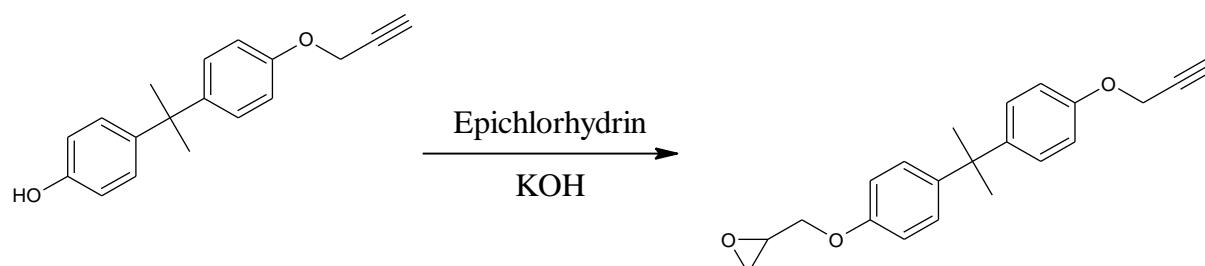
7,14 (2H, tt, H8, $^3J_{(H8-H9)}=8,97$, $^4J_{(H8-H8')}=3,17$, $^5J_{(H8-H9')}=2,24$), **7,05** (2H, tt, H3, $^3J_{(H3-H2)}=8,85$, $^4J_{(H3-H3')}=3,10$, $^5J_{(H3-H2')}=2,19$), **6,86** (2H, tt, H9, $^3J_{(H9-H8)}=8,97$, $^4J_{(H9-H9')}=3,17$, $^5J_{(H9-H8')}=2,24$), **6,69** (2H, tt, H3, $^3J_{(H2-H3)}=8,85$, $^4J_{(H2-H2')}=3,10$, $^5J_{(H2-H3')}=2,19$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (Methanol d_4 , 400 MHz) d:

156,99 (C10), **156,11** (C1), **145,58** (C7), **143,26** (C4), **128,85** (C3, 8), **115,74** (C9), **115,43** (C2), **80,16** (C12), **76,60** (C13), **56,77** (C11), **42,72** (C5), **31,73** (C6).

Masse $[M+H]^+$: 267,1; (Nominalmasse: 366,13)

4.2.3 Synthese des BPE



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
BP	50 mg	266,33	1
Epichlorhydrine	1 mL	92,53	50
KOH	52 mg	56,11	5

Durchführung

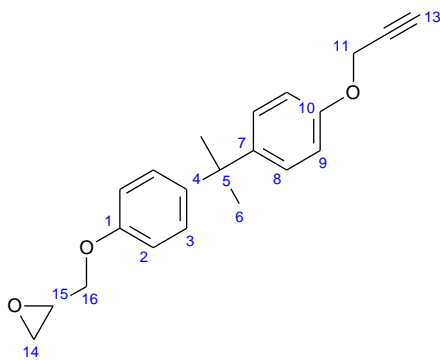
BP (50 mg, 0,2 mmol, 1 Eq.) wurde in Epichlorhydrin (1 mL, 9,1 mmol, 50 Eq.) gelöst. Es wurden **KOH** (52 mg, 0,9 mmol, 5 Eq.) hinzugegeben und bei 150 °C 20 min refluxiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingengt, mit

Ethylacetat (4 mL) aufgenommen und zweimal mit H₂O (4 mL) gewaschen. Das Produkt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Eluent wurde ein Lösungsmittelgemisch von Petrolether/Ethylacetat in einem Verhältnis von 10 zu 1 verwendet.

Als Produkt wurde ein transparentes Öl erhalten. Ausbeute 96%.

Analysen:

$R_f(\text{PE/EA: 10/1})=0,4$



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

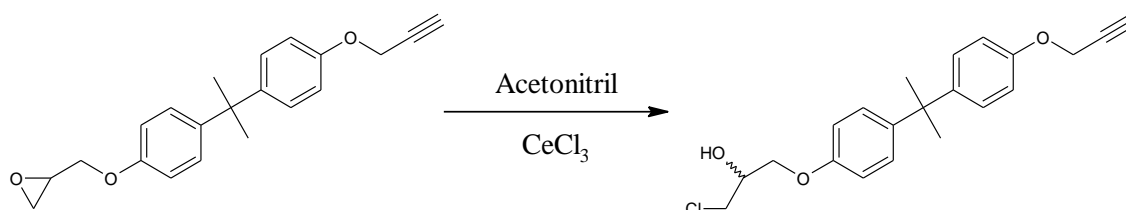
7,14 (4H, m, H8, H3), **6,88** (4H, m, H9, H2), **4,75** (2H, d, H11, ³*J*_(H11-H13)=2,41), **4,28** (1H, dd, H16', ²*J*_(H16'-H16'')=11,4Hz, ³*J*_(H16'-H15)=2,9), **3,82** (1H, dd, H16'', ²*J*_(H16''-H16')=11,4Hz, ³*J*_(H16''-H15)=6,45), **3,51** (1H, m, H13), **3,31** (1H, m, H15), **2,83** (1H, m, H14'), **2,70** (1H, dd, H14'', ²*J*_(H14''-H14')=5,8Hz, ²*J*_(H14''-H15')=2,6Hz), **1,60** (6H, s, H6).

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

156,96 (C10), 154,94 (C1), 143,22 (C7), 142,77 (C4), 127,29 (C3, 8), 114,12 (C9), 113,87 (C2), 79,35 (C12), 77,88 (C13), 68,78 (C16), 55,28 (C11), 49,65 (15), 43,68 (C14), 41,13 (C5), 30,59 (C6).

Masse $[M+H]^+$: 321,1; (Nominalmasse: 322,16)

4.2.4 Synthese des BPECl



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
BPE	40 mg	322,40	1
$CeCl_3$	61 m	246,48	2
Acetonitril	500 μ L		

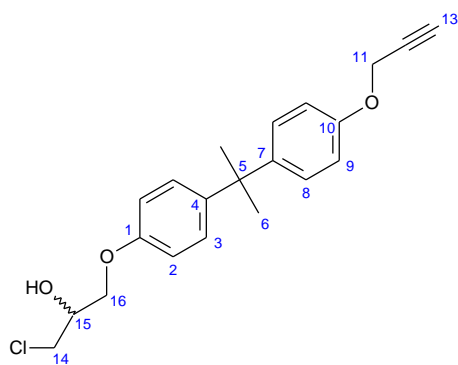
Durchführung

BPE (40 mg, 0,12 mmol, 1 Eq.) wurde in Acetonitril (500 μ L) gelöst. Es wurde $CeCl_3$ (61 mg, 0,24 mmol, 2 Eq.) hinzugegeben und 8 h bei 150 °C gerührt. Der Reaktionsablauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie nachvollzogen. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingengt, mit Ethylacetat (2 mL) aufgenommen und zweimal mit H_2O (2 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Eluent wurde ein Lösungsmittelgemisch von Petrolether/Ethylacetat in einem Verhältnis von 20 zu 1 verwendet.

Als Produkt wurde ein transparentes Öl erhalten. Ausbeute 95 %.

Analysen:

R_f(PE/EA: 20/1)=0,4



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

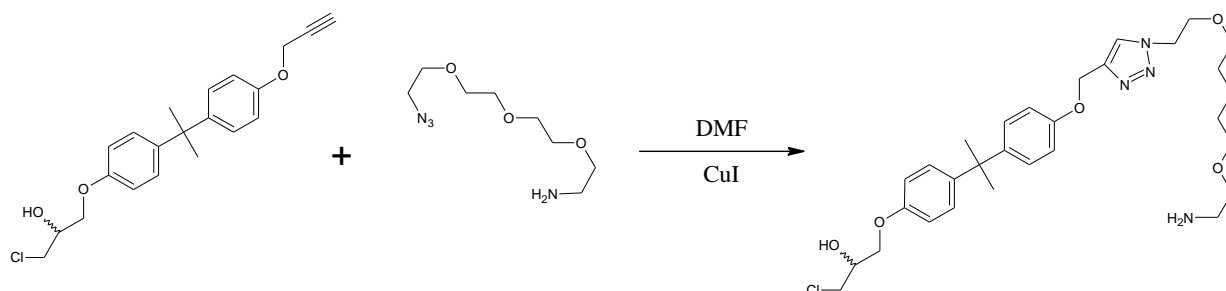
7,13 (4H, m, H8, H3), **6,86** (4H, m, H9, H2), **5,55** (1H, d, OH, $^3J_{(\text{OH}-\text{H}15)}=5,1$ Hz), **4,75** (2H, d, H11, $^3J_{(\text{H}11-\text{H}13)}=2,33$), **4,03** (1H, d, H15, $^3J_{(\text{H}15-\text{H}16)}=2,41$, $^3J_{(\text{H}15-\text{H}14)}=4,72$, $^3J_{(\text{H}15-\text{OH})}=5,1$), **5,24** (2H, d, H16, $^3J_{(\text{H}16-\text{H}15)}=5,24\text{Hz}$), **3,75** (1H, dd, H14, $^2J_{(\text{H}14'-\text{H}14'')}=11,24\text{Hz}$, $^3J_{(\text{H}14-\text{H}15)}=4,72\text{Hz}$), **3,67** (1H, dd, H14'', $^2J_{(\text{H}14''-\text{H}14')}=11,24\text{Hz}$, $^3J_{(\text{H}14''-\text{H}15)}=4,72\text{Hz}$) **3,55** (1H, t; H13, $^3J_{(\text{H}13-\text{H}11)}=2,33\text{Hz}$), **1,59** (6H, s, H6).

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

156,59 (C10), **155,44** (C1), **143,76** (C7), **143,21** (C4), **127,91** (C8, 3), **114,62** (C9), **113,36** (C2), **79,91** (C12), **78,56** (C13), **69,31** (C16), **69,09** (15), **55,75** (C11), **47,25** (C14), **41,67** (C5), **31,16** (C6).

Masse [M+H]⁺: 359,1; (Nominalmasse: 358,13)

4.2.5 Synthese des EPI-P



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
BPECl	100 mg	358,86	1
11-Azido-3,6,9-Trioxaundecan-1-amin	60,85 mg	218,25	1
CuI	5 mg	190,45	0,7
DMF	2 mL		

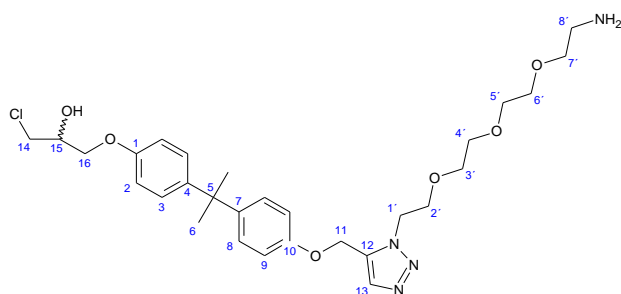
Durchführung

BPECl (100 mg, 0,3 mmol, 1 Eq.) und **11-Azido-3,6,9-Trioxaundecan-1-amin** (60,85 mg, 0,3 mmol, 1 Eq.) wurde in DMF (2 mL) gelöst und anschließend unter Stickstoffatmosphäre CuI (5 mg, 26 μ mol, 0,7 Eq) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingengt, mit Ethylacetat (5 mL) aufgenommen, zweimal mit H₂O (4 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 30->60%, 6 mL/min, 30 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 7,2 min. Anschließend wurde das Produkt am Rotationsverdampfer getrocknet.

Als Produkt wurde ein blass gelbes Öl erhalten. Ausbeute 53 %.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 30->60 %, 6 mL/min, 30 min, C18) = 7,2 min



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

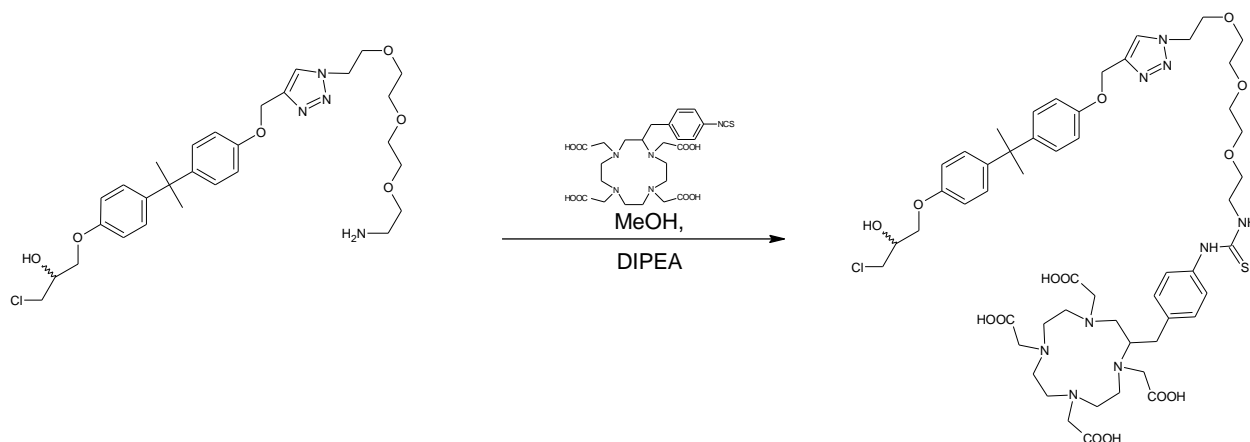
7,77 (1H, s, H13), **7,12** (4H, m, H8, H3), **6,83** (4H, m, H9, H2), **5,12** (1H, s, H11), **4,53** (2H, t, H1', ³J_{(H1'-H2')}}=4,87 Hz), **4,18** (1H, m, H15), **4,03** (2H, m, H16), **3,83** (2H, t, H2', ³J_(H2'-H1')=4,87 Hz), **3,75** (1H, m, H14), **3,69** (3H, m, H14, H7') **3,52** (8H, m, H3', H4', H5', H6'), **3,17** (1H, m, H8'), **1,61** (6H, s, H6).

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

161,19 (C12), **156,07** (C10), **155,92** (C1), **143,88** (C7), **143,79** (C4), **127,82** (C8, 3), **124,19** (C13), **114,12** (C9), **113,96** (C2), **69,84** (C3', C4', C5', C6'), **69,81** (C15), 69,24 (C2'), **68,51** (C16), **66,57** (C7'), **61,49** (C11), **50,47** (C1'), **45,92** (C14), **41,71** (C5), **39,76** (C8'), **30,92** (C6).

Masse [M+H]⁺: 577,3; (Nominalmasse: 376,27)

4.2.6 Synthese des BPD



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
NCS-BnDOTA 2 x HCL	60 mg; 87 µmol	688,2	1
BP	50 mg; 87 µmol	577,11	1
DIPEA	60 µL	129,24	
MeOH	500 µL		

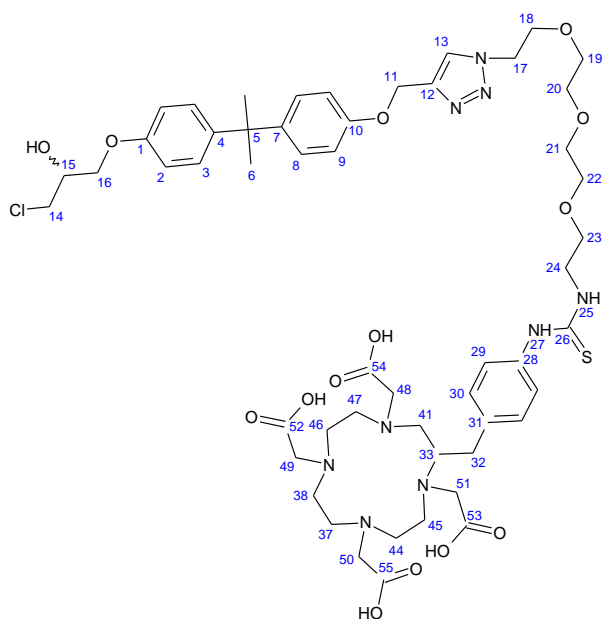
Durchführung

BP wurde (50 mg; 87 µmol; 1 Eq.) in MeOH (500 µL) gelöst. Dazu wurde p-NCS-Bn-DOTA (60 mg; 87 µmol; 1 Eq.) und DIPEA (60 µL) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Die Umsetzung des **BP** wurde mittels LCMS-Analyse nachvollzogen. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingengt, mit Ethylacetat (2 mL) aufgenommen, zweimal mit H₂O (2 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 30->60%, 6 mL/min, 30 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 18,2 min. Anschließend wurde das Produkt lyophilisiert.

Als Produkt wurde ein weißes Pulver erhalten. Ausbeute 70 %.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 30->60%, 6mL/min, 30 min, C18) = 18,2 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) *d*:

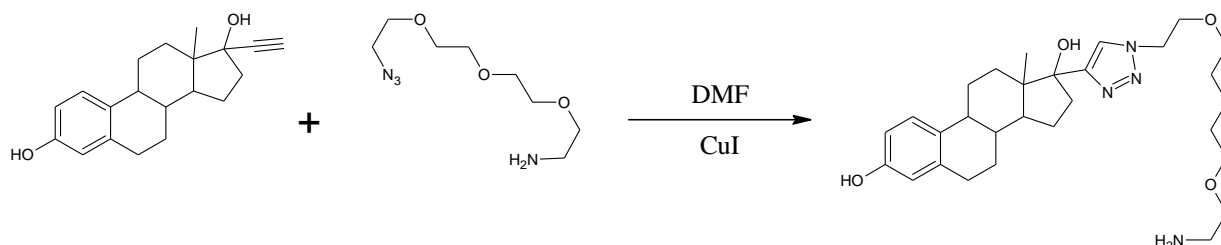
9,72 (1H, s, H27), **8,16** (1H, s, H13), **7,84** (1H, s, H25), **7,45** (2H, d, H29, ³J_(H29-H30)=8,35 Hz), **7,20** (2H, d, H30, ³J_(H30-H29)=8,35 Hz), **7,11** (4H, m, H8, H3), **6,88** (4H, m, H9, H2), **5,09** (1H, s, H11), **4,51** (2H, t, H17, ³J_(H17-H18)=5,22 Hz), **4,00** (1H, m, H15), **3,95** (2H, m, H16), **3,82** (2H, t, H18, ³J_(H18-H17)=5,22 Hz), **3,74** (1H, m, H14'), **1,58** (6H, s, H6).

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) *d*:

180,58 (C26), **156,11** (C10), **155,83** (C1), **143,86** (C7), **143,70** (C4), **137,92** (C28), **133,28** (31), **129,02** (29), **127,44** (C8, 3), **124,69** (C13), **122,74** (C30), **114,04** (C9), **113,90** (C2), **69,69** (C19, C20, C21, C22), **68,89** (C18), **68,631** (C15), **68,53** (C16), **61,08** (C11), **49,40** (C17), **47,70** (C14), **43,48** (C5), **41,15** (C24), **30,92** (C6).

Masse [M+H]⁺: 1128,5; (Nominalmasse: 1127,48)

4.2.7 Synthese des EsP



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
17 α -Ethinylestradiol	50 mg	296,4	1
11-Azido-3,6,9-Trioxaundecan-1-amin	37 mg	218,2	1
CuI	1 mg	190,4	0,03
DMF	1 mL		

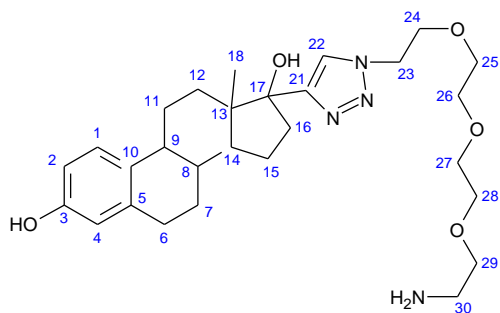
Durchführung

17 α -Ethinylestradiol (50 mg, 169 μ mol) und 11-Azido-3,6,9-Trioxaundecan-1-amin (37 mg, 169 μ mol) wurden in DMF (1 mL) gelöst. Es wurden CuI (1 mg, 5 μ mol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit Ethylacetat (2 mL) aufgenommen, zweimal mit H₂O (2 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 30->60%, 6mL/min, 30 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 3,4 min. Anschließend wurde das Produkt am Rotationsverdampfer getrocknet.

Als Produkt wurde ein braun-gelbes Öl erhalten. Ausbeute 51 %.

Analysen

R_f(HPLC: ACN/H₂O 30->60%, 6mL/min, 30 min, C18) = 3,4 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

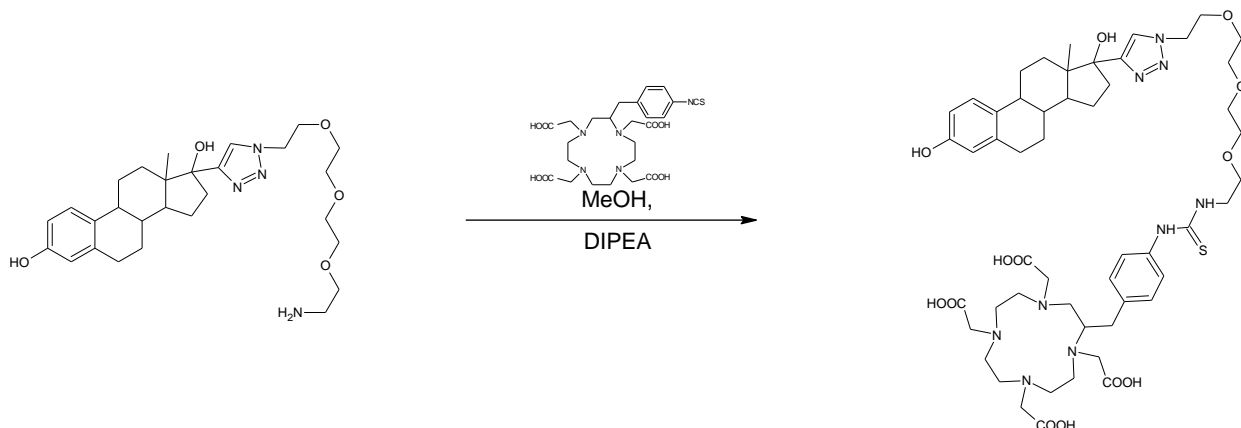
7,89 (1H, s, H22), **6,97** (1H, d, H1, ³*J*_(H1-H2)=8,25 Hz), **6,50** (1H, dd, H2, ³*J*_(H2-H1)=8,25 Hz, ⁴*J*_(H2-H4)=2,47 Hz), **6,46** (1H, d, H4, ⁴*J*_(H4-H2)=2,47 Hz), **4,58** (2H, t, H23, ³*J*_(H23-H24)=4,85 Hz), **3,91** (2H, t, H24, ³*J*_(H24-H23)=4,85 Hz), **3,66** (2H, t, H29, ³*J*_(H29-H30)=4,90 Hz), **3,60** (8H, m, H25, 26, 27, 28), **3,11** (2H, t, H30, ³*J*_(H30-H29)=4,90 Hz), **2,75** (2H, m, H6), **2,46** (1H, m, H16'), **2,12** (2H, m, H11', 16'), **1,95** (2H, m, H7', 15'), **1,84** (1H, m, H9), **1,61** (3H, m, H12', 14, 15''), **1,42** (2H, m, H8, 11'), **1,29** (1H, m, H7''), **1,05** (3H, s, H18), **0,70** (1H, m, H12'').

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

162,5 (C22), **155,9** (C3), 138,8 (C5), **132,4** (C10), **127,1** (C1), **124,9** (C22), **116,1** (C4), **113,7** (C2), **83,1** (C17), **71,52** (C25, 26, 27, 28), **70,5** (C24), **67,8** (C29), **51,4** (C23), **49,4** (C14), **48,4** (C13), **44,9** (C9), **41,1** (C8), **40,6** (C30), **38,5** (C16), **34,3** (C12), **30,7** (C6), **28,7** (C7), **27,5** (C11), **24,6** (C15), **14,9** (C18).

Masse [M+H]⁺: 515,2; (Nominalmasse: 514,31)

4.2.8 Synthèse des EsPD



Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
NCS-BnDOTA 2 x HCL	50 mg; 72 µmol	688,2	1
EsP	39 mg; 72 µmol	541,65	1
DIPEA	60 µL	129,24	
MeOH	500 µL		

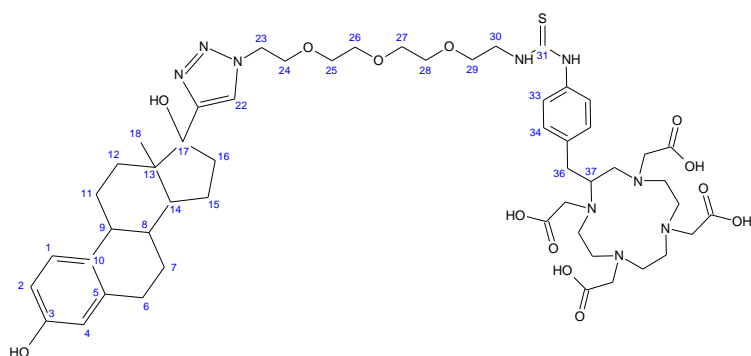
Durchführung

Es wurde **EsP** (39 mg; 72 µmol; 1 Eq.) in MeOH (500 µL) gelöst. Dazu wurde p-NCS-Bn-DOTA (50 mg; 72 µmol; 1 Eq.) und DIPEA (60 µL) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht gerührt. Die Umsetzung des **EsP** wurde mittels LCMS-Analyse nachvollzogen. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingengt, mit Ethylacetat (3 mL) aufgenommen, dreimal mit H₂O (2 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 30->60%, 6 mL/min, 30 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 24,3 min. Anschließend wurde das Produkt lyophilisiert.

Als Produkt wurde ein weißes Pulver erhalten. Ausbeute 60 %.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 30%->60%, 6mL/min, 30 min, C18) = 24,3 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

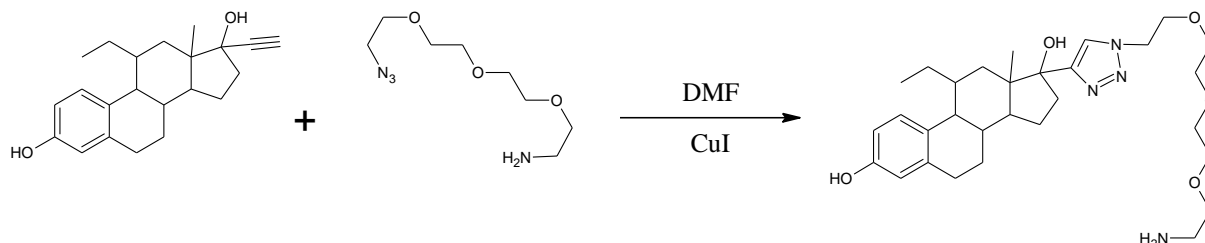
7,80 (1H, s, H22), **7,40** (2H, m, H33), **7,23** (2H, m, H34), **6,92** (1H, dd, H1, ³*J*_(H1-H2)=8,53 Hz, ³*J*_(H1-H4)=2,43 Hz), **6,46** (1H, d, H2, ³*J*_(H2-H1)=8,53 Hz), **6,41** (1H, d, H4, ³*J*_(H4-H1)=2,43 Hz), **4,47** (2H, t, H23, ³*J*_(H23-H24)=4,9 Hz), **3,79** (2H, t, H24, ³*J*_(H24-H23)=4,9 Hz), **3,59** (2H, m, H29), **3,47** (8H, m, H25, 26, 27, 28), **2,66** (2H, m, H6), **2,32** (1H, m, H16'), **2,01** (1H, m, H11'), **1,93** (1H, m, H16''), **1,81** (1H, m, H7', 15'), **1,71** (1H, m, H9), **1,52** (1H, m, H12'), **1,47** (1H, m, H14), **1,38** (1H, m, H15), **1,23** (3H, m, H8, 7'', 11''), **0,89** (3H, s, H18), **0,55** (1H, m, H12'').

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

180,93 (C31), **155,02** (C3), **137,81** (C5), **131,09** (C10), **129,87** (C34), **126,45** (C1), **123,62** (C22), **123,50** (C33), **115,37** (C4), **113,13** (C29), **81,63** (C17), **70,13** (C25, 26, 27, 28), **69,26** (C24), **68,96** (C29), **49,92** (C23), **48,14** (C13), **47,19** (C14), **43,92** (C9), **37,47** (C16), **33,05** (C12), **29,63** (C6), **27,61** (C7), **26,51** (C11), **23,86** (C15), **14,76** (C18).

Masse [M+H]⁺: 1066,5; (Nominalmasse: 1065,52)

4.2.9 Synthese des EesP



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
11β-Ethyl-17α-Ethinylestradiol	50 mg	324,5	1
11-Azido-3,6,9-Trioxaundecan-1-amin	33 mg	218,3	1
CuI	1 mg	190,45	0,03
DMF	1 mL		

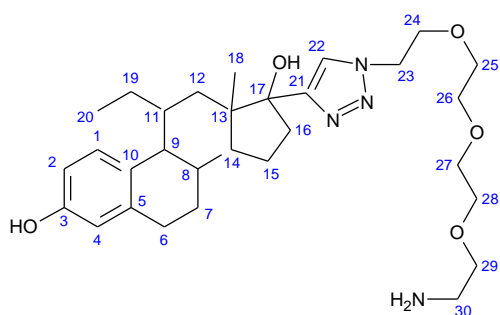
Durchführung

11β-Ethyl-17α-Ethinylestradiol (50 mg, 154 μmol) und 11-Azido-3,6,9-Trioxaundecan-1-amin (33 mg, 154 μmol) wurden in DMF (1 mL) gelöst. Es wurden CuI (1 mg, 5 μmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingengt, mit Ethylacetat (2 mL) aufgenommen, zweimal mit H₂O (2 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 30->60%, 6 mL/min, 30 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 5,7 min. Anschließend wurde das Produkt am Rotationsverdampfer getrocknet.

Als Produkt wurde ein braun-gelbes Öl erhalten. Ausbeute 51 %.

Analysen

R_f(HPLC: ACN/H₂O 30->60%, 6mL/min, 30 min, C18) = 5,7 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

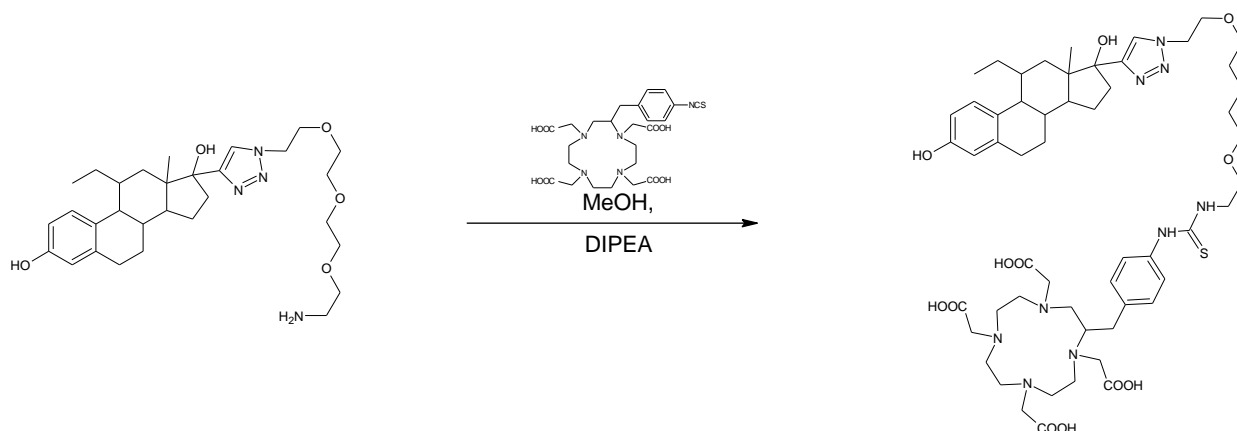
7,93 (1H, s, H22), **6,83** (1H, d, H1, ³J_(H1-H2)=8,10 Hz), **6,52** (1H, dd, H2, ³J_(H2-H1)=8,10 Hz, ⁴J_(H2-H4)=2,46 Hz), **6,45** (1H, d, H4, ⁴J_(H4-H2)=2,46 Hz), **4,59** (2H, t, H23, ³J_(H23-H24)=4,87 Hz), **3,91** (2H, t, H24, ³J_(H24-H23)=4,87 Hz), **3,66** (2H, t, H29, ³J_(H29-H30)=4,91 Hz), **3,58** (8H, m, H25, 26, 27, 28), **3,12** (2H, t, H30, ³J_(H30-H29)=4,86 Hz), **2,64** (2H, m, H6), **2,43** (1H, m, H16'), **2,14** (3H, m, H14, 11, 16'), **1,92** (3H, m, H7', 12', 15'), **1,62** (3H, m, H8, 9, 15''), **1,29** (6H, m, H7'', 19, 18), **0,88** (3H, m, H20, ³J_(H20-H19)=7,19 Hz), **0,72** (1H, m, H12).

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

155,40 (C3), **140,00** (C5), **130,01** (C10), **128,55** (C1), **125,01** (C22), **116,16** (C4), **114,16** (C2), **83,99** (C17), **71,31** (C25, 26, 27, 28), **70,38** (C24), **67,79** (C29), **51,53** (C23), **50,54** (C9), **40,62** (C30), **39,68** (C11), **38,77** (C16), **36, 56** (C8), **34,56** (C12), **31,32** (C6), **28,43** (C7), **24,35** (C15), **21,92** (C19), **18,28** (C18), **13,30** (C20).

Masse [M+H]⁺: 543,4; (Nominalmasse: 542,35)

4.2.10 Synthese des EesPD



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare [g/mol]	Masse	Eq.
NCS-BnDOTA 2 x HCL	50 mg; 72 μ mol	688,2		1
EesP	39 mg; 72 μ mol	541,65		1
DIPEA	60 μ L	129,24		
MeOH	500 μ L			

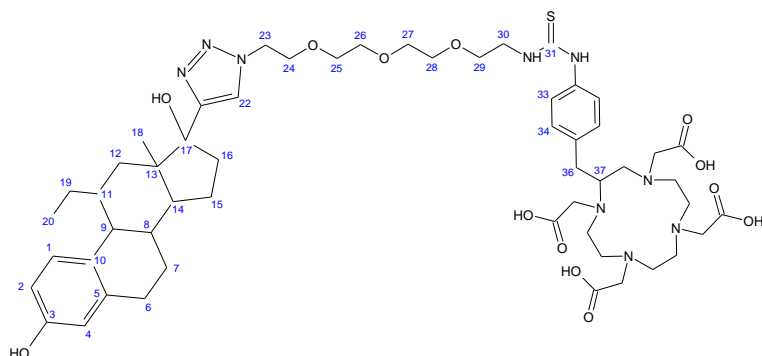
Durchföhrung

Es wurde **EesP** (39 mg; 72 μ mol; 1 Eq.) in MeOH (500 μ L) gelöst. Dazu wurde p-NCS-Bn-DOTA (50 mg; 72 μ mol; 1 Eq.) und DIPEA (60 μ L) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht geröhrt. Die Umsetzung des **EesP** wurde mittels LCMS-Analyse nachvollzogen. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit Ethylacetat (3 mL) aufgenommen, dreimal mit H₂O (2 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 30->60%, 6 mL/min, 30 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 14,3 min. Anschließend wurde das Produkt lyophilisiert.

Als Produkt wurde ein weißes Pulver erhalten. Ausbeute 60 %.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 30%→60%, 6mL/min, 30 min, C18) = 14,3 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

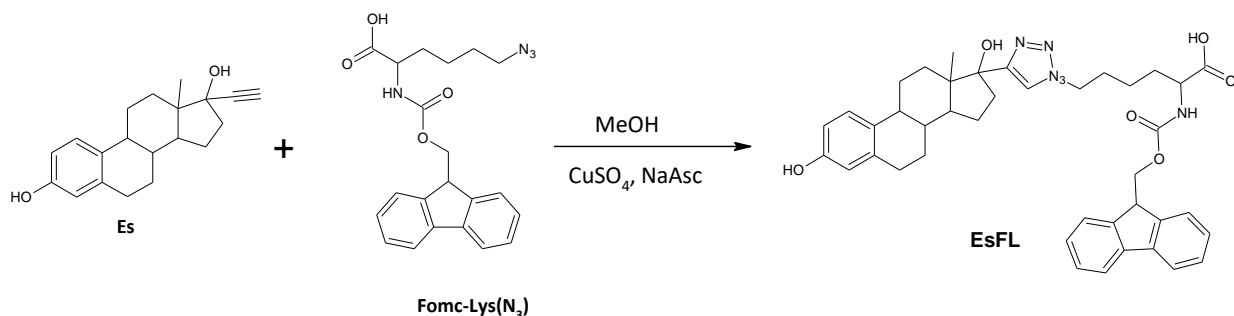
7,83 (1H, s, H22), **7,43** (2H, m, H33), **7,23** (2H, m, H34), **6,92** (1H, d, H1, ³J_(H1-H2)=8,36 Hz), **6,47** (1H, dd, H2, ³J_(H2-H1)=8,36 Hz, ³J_(H1-H4)=2,20 Hz), **6,40** (1H, d, H4, ³J_(H4-H1)=2,20 Hz), **4,47** (2H, t, H23, ³J_(H23-H24)=4,9 Hz), **3,80** (2H, t, H24, ³J_(H24-H23)=4,9 Hz), **3,52** (2H, m, H29), **3,48** (8H, m, H25, 26, 27, 28), **2,66** (2H, m, H6), **2,31** (1H, m, H16'), **2,06** (1H, m, H11'), **1,93** (1H, m, H16''), **1,71** (1H, m, H12, 15'), **1,71** (1H, m, H9), **1,51** (1H, m, H8), **1,46** (1H, m, H15), **1,14** (3H, m, H19), **1,04** (2H, s, H18), **0,80** (3H, m, H20), **0,60** (1H, m, H12'').

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

180,74 (C31), **154,51** (C3), **138,62** (C5), **138,27** (C32), **132,85** (C35), **129,67** (C34), **128,32** (C10), **127,36** (C1), **123,55** (C22), **123,07** (C33), **115,28** (C4), **113,43** (C3), **81,63** (C17), **70,06** (C25, 26, 27, 28), **69,13** (C24), **68,85** (C29), **49,67** (C14), **49,04** (C9), **47,66** (C13), **37,59** (C16), **35,11** (C8), **33,21** (C12), **31,13** (C36), **30,14** (C6), **27,35** (C7), **23,57** (C15), **20,91** (C19), **17,91** (C18), **13,03** (C20).

Masse [M+H]⁺: 1094,6; (Nominalmasse: 1093,55)

4.2.11 Synthese des EesFL



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
17α-Ethinylestradiol	45,7 mg	296,4	1
Fmoc-Lys(N ₃)-OH	60,8 mg	394,4	1
CuSO ₄	2 mg	159,6	0,08
Natriumascorbat	20 mg	198,1	0,66
MeOH	1 mL		

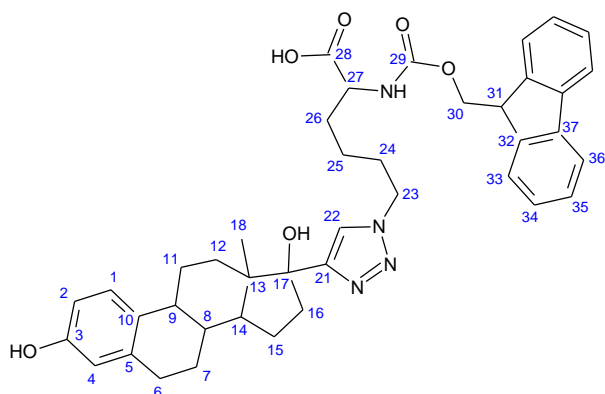
Durchführung

17α-Ethinylestradiol (45,7 mg, 154 μmol) und Fmoc-Lys(N₃)-OH (60,8 mg, 154 μmol) wurden in MeOH (1 mL) gelöst. Es wurden CuSO₄ (2 mg, 12 μmol) und Natriumascorbat (20 mg, 101 μmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingengt, mit Ethylacetat (2 mL) aufgenommen, zweimal mit H₂O (2 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 35->90%, 6mL/min, 45 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 20,1 min. Anschließend wurde das Produkt am Rotationsverdampfer getrocknet.

Als Produkt wurde ein weißer, kristalliner Feststoff erhalten. Ausbeute 78 %.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 35->90%, 6mL/min, 30 min, C18) = 20,1 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

7,89 (3H, m, H36, 22), **7,72** (2H, d, H33, ³J_(H33-H34)=7,39 Hz), **7,42** (2H, t, H35, ³J_(H35-H36)=7,59 Hz, ³J_(H35-H34)=7,39 Hz), **7,34** (2H, t, H34, ³J_(H34-H35)=7,39 Hz, ³J_(H34-H33)=7,39 Hz), **6,96** (1H, d, H1, ³J_(H1-H2)=8,69 Hz), **6,47** (1H, dd, H2, ³J_(H2-H1)=8,69 Hz, ⁴J_(H2-H4)=2,12 Hz), **6,43** (1H, d, H4, ⁴J_(H4-H2)=2,12 Hz), **4,21-4,36** (5H, m, H23, 30, 31), **3,95** (1H, m, H27), **2,67-2,74** (2H, m, H6), **2,34-2,39** (1H, m, H16'), **2,05-2,13** (1H, m, H11), **1,93-1,99** (1H, m, H16'), **1,75-1,88** (6H, m, 7', 9, 15', 24, 26'), **1,62-1,70** (2H, m, H14, 26''), **1,16-1,51** (7H, m, 7'', 8, 11'', 12', 15'', 25), **0,93** (3H, s, H18), **0,57-0,63** (1H, m, H12'').

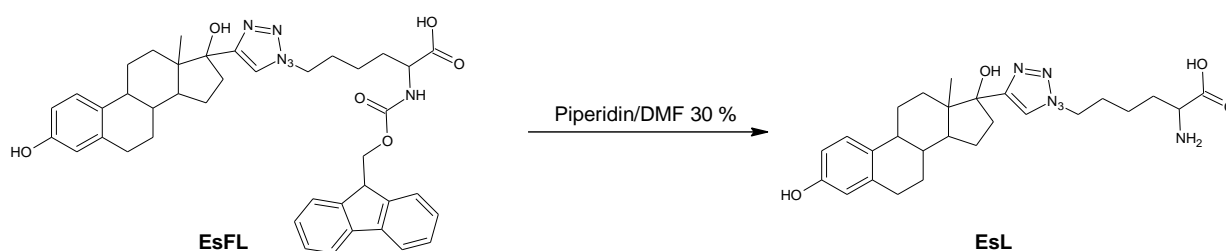
¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

174,3 (C28), **156,7** (C21), **155,3** (C3), **154,4** (C29) **144,3** (C32), **141,2** (C37), **137,6** (C5), **130,9** (C10), **128,1** (C35), **127,5** (C34), **125,5**(C1), **125,7** (C33), **121,2** (C22), **120,5** (C36), **115,3** (C4), **113,1** (C2), **81,6** (C17), **66,1** (C30), **54,2** (C27), **49,5** (C23), **48,0** (C14), **47,1** (C13), **47,1** (C31),

43,6 (C9), 40,01 (C8), 37,7 (C16), 33,1 (C12), 30,6 (C8), 30,6 (C26), 29,9 (24), 29,7 (C6), 27,7 (C7), 26,54 (C11), 24,0 (C15), 23,2 (C25), 14,8 (C18).

Masse [M+H]⁺: 691,3; (Nominalmasse: 690,34)

4.2.12 Synthese des EsL



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
EsFL	80 mg	718,8	
Piperidin/DMF 30%	1 mL		

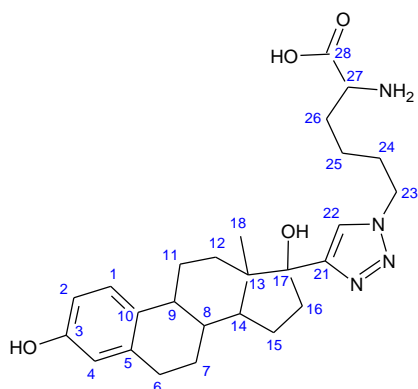
Durchführung

Die Verbindung **EsFL** (80 mg, 111 µmol) wurde in einer 30 %igen Piperidin/DMF Lösung gelöst und 2 h bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurden 2 mL H₂O zugegeben und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und 2 x mit 2 mL H₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 50->90%, 6mL/min, 45,4 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 5 min. Anschließend wurde das Produkt am Rotationsverdampfer getrocknet.

Als Produkt wurde ein weißes Pulver erhalten. Ausbeute 93 %.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 50->60%, 6mL/min, 60 min, C18) = 45,4 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

7,85 (1H, s, H22), **6,96** (1H, d, H1, ³J_{(H1-H2)}}=8,57 Hz), **6,47** (1H, dd, H2, ³J_{(H2-H1)}}=8,57 Hz, ⁴J_{(H2-H4)}}=2,53 Hz), **6,42** (1H, d, H4, ⁴J_{(H4-H2)}}=2,53 Hz), **4,33** (2H, t, H23, ³J_{(H2-H1)}}=6,95 Hz), **3,87-3,81** (1H, m, H27), **2,67-2,75** (2H, m, H6', 7'), **2,32-2,39** (1H, m, H16'), **1,71-2,00** (5H, m, H6'', 7'', 8, 9), **1,59-1,69** (1H, m, H14), **1,16-1,53** (3H, m, H12', 15), **0,93** (3H, s, H18), **0,59-0,65** (1H, m, H12'').

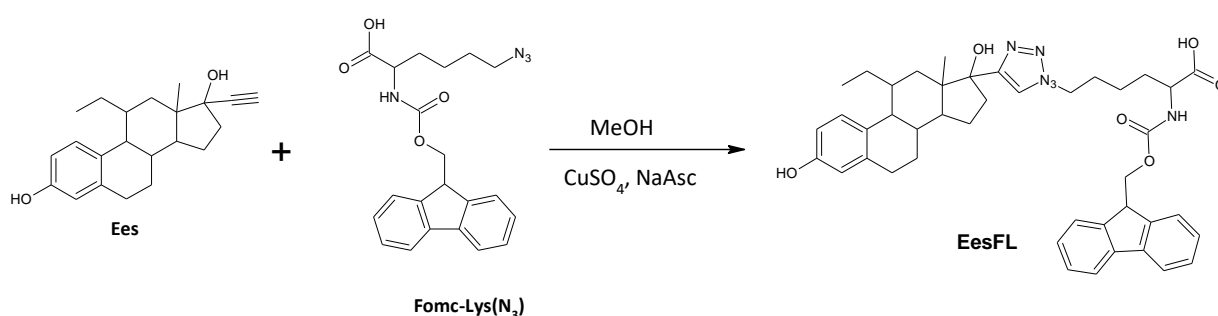
¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

171,5 (C28), **155,3** (C3), **154,5** (C21), **137,6** (C5), **130,9** (C10), **126,4** (C1), **122,9** (C22), **115,3** (C4), **113,1** (C2), **81,6** (C17), **52,3** (C27), **49,3** (C23), **48,0** (C14), **47,2** (C13), **43,6** (C9), **40,01**

(C8), **37,7** (C16), **33,1** (C12), **29,9** (C6), **29,8** (C7), **27,7** (C26), **26,5** (24), **24,0** (C15), **22,0** (C25), **14,9** (C18).

Masse [M+H]⁺: 469,3; (Nominalmasse: 468,27)

4.2.13 Synthese des EesFL



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
11β-Ethyl-17α-Ethinylestradiol	50 mg	324,5	1
Fmoc-Lys(N ₃)-OH	60,8 mg	394,4	1
CuSO ₄	2 mg	159,6	0,08
Natriumascorbat	20 mg	198,1	0,66
MeOH	1 mL		

Durchführung

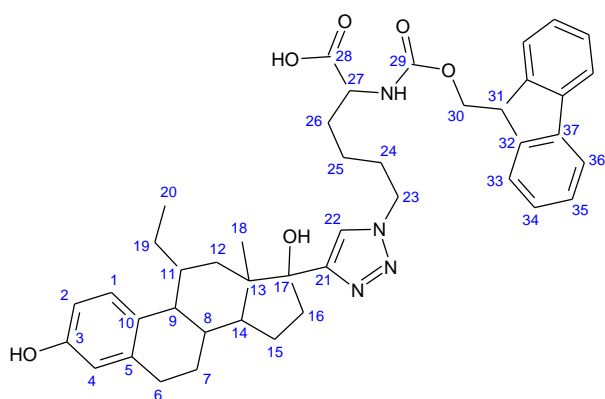
11β-Ethyl-17α-Ethinylestradiol (50 mg, 154 μmol) und Fmoc-Lys(N₃)-OH (60,8 mg, 154 μmol) wurden in MeOH (1 mL) gelöst. Es wurden CuSO₄ (2 mg, 12 μmol) und Natriumascorbat (20 mg, 101 μmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Nach erfolgter Umsetzung der Reaktanden wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit Ethylacetat (2 mL) aufgenommen,

zweimal mit H₂O (2 mL) gewaschen und mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 35->90%, 6 mL/min, 45 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 25 min. Anschließend wurde das Produkt am Rotationsverdampfer getrocknet.

Als Produkt wurde ein weißer, kristalliner Feststoff erhalten. Ausbeute 89 %.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 35->90%, 6mL/min, 60 min, C18) = 45 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

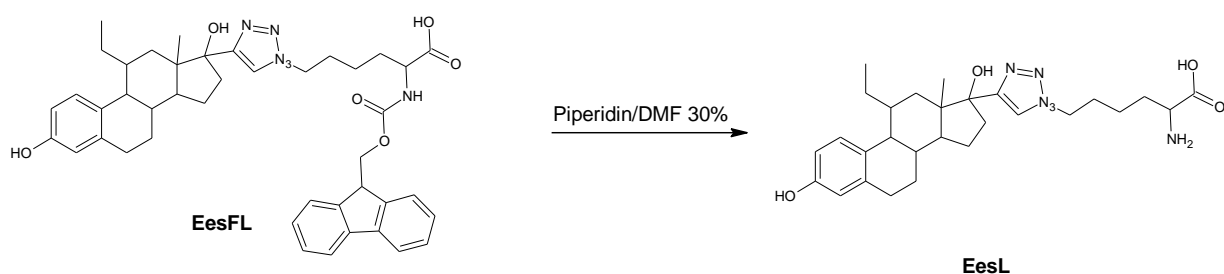
7,89 (2H, d, H36, ³J_(H36-H35)=7,51 Hz), **7,73** (2H, d, H33, ³J_(H33-H34)=7,50 Hz), **7,42** (2H, t, H35, ³J_(H35-H36)=7,51 Hz, ³J_(H35-H34)=7,19 Hz), **7,34** (2H, t, H34, ³J_(H34-H35)=7,19 Hz, ³J_(H34-H33)=7,50 Hz), **6,84** (1H, d, H1, ³J_(H1-H2)=8,30 Hz), **6,47** (1H, dd, H2, ³J_(H2-H1)=8,30 Hz, ⁴J_(H2-H4)=1,96 Hz), **6,40** (1H, d, H4, ⁴J_(H4-H2)=1,96 Hz), **4,23-4,35** (5H, m, H23, 30, 31), **3,93** (1H, m, H27), **2,59-2,68** (2H, m, H6), **2,35-2,37** (1H, m, H16'), **2,09-2,13** (5H, m, H9, H11, H26), **1,93-1,98** (1H, m, H16''), **1,74-1,88** (7H, m, 7', 8, 12', 15', 24), **1,07-1,48** (9H, m, H7'', 19, 15'', 25, 18), **0,82** (3H t, H20, ³J_(H20-H19)=7,29 Hz), **0,63** (1H, m, H12).

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

174,3 (C28), 156,6 (C29), 154,8 (C3), 144,3 (C32), 141,2 (C37), 138,6 (C5), 128,4 (C10), 128,1 (C35), 127,8 (C1), 127,5 (C34), 125,7 (C33), 120,5 (C36), 115,4 (C4), 113,6 (C2), 82,4 (C17), 66,1 (C30), 54,2 (C27), 49,9 (C14), 49,5 (C23), 49,1 (C9), 47,8 (C13), 47,1 (C31), 38,0 (C11), 37,9 (C16), 33,4 (C12), 31,1 (C8), 30,6 (C26), 30,3 (C6), 29,9 (C24), 27,5 (C7), 23,8 (C15), 23,3 (C25), 21,1 (C19), 18,1 (C18), 13,2 (C20).

Masse [M+H]⁺: 719,4; (Nominalmasse: 718,37)

4.2.14 Synthese des EesL



Chemikalien

Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
EesFL	85 mg	746,9	
Piperidin/DMF 30%	1 mL		

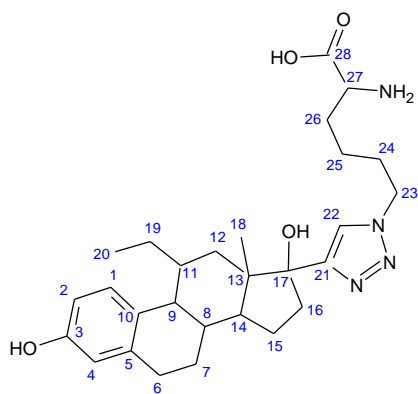
Durchführung

Die Verbindung **EesFL** (80 mg, 111µmol) wurde in einer 30 %igen Piperidin/DMF Lösung gelöst und 2 h bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurden 2 mL H₂O zugegeben und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und 2 X mit 2 mL H₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt. Methode: ACN/H₂O 50->90%, 6 mL/min, 3,2 min, C18 Säulenmaterial. Die Retentionszeit betrug 3,2 min. Anschließend wurde das Produkt am Rotationsverdampfer getrocknet.

Als Produkt wurde ein weißes Pulver erhalten. Ausbeute 91%.

Analysen:

R_f(HPLC: ACN/H₂O 50->90%, 6 mL/min, 30 min, C18) = 3,2 Minuten



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

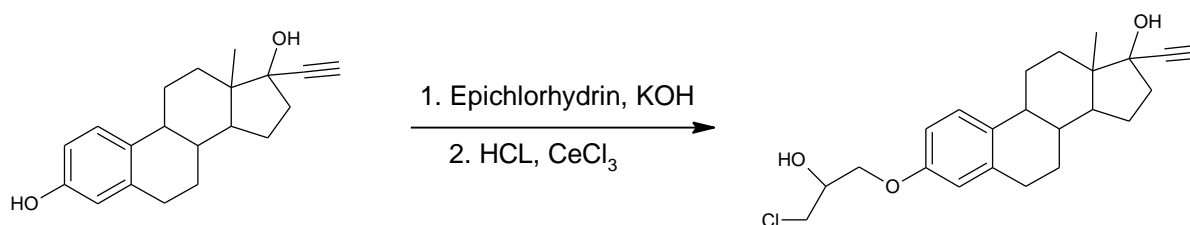
7,86 (1H, s, H22), **6,82** (1H, d, H1, ³J_{(H1-H2)}}=8,50 Hz), **6,49** (1H, dd, H2, ³J_{(H2-H1)}}=8,50 Hz, ⁴J_{(H2-H4)}}=2,34 Hz), **6,40** (1H, d, H4, ⁴J_{(H4-H2)}}=2,34 Hz), **4,33** (2H, t, H23, ³J_{(H2-H1)}}=6,95 Hz), **3,87-3,91** (1H, m, H27), **2,57-2,72** (2H, m, H6), **2,31-2,38** (1H, m, H16'), **2,08-2,14** (2H, m, H9, 11), **1,71-1,99** (8H, m, H7', 8, 12', 14, 15', 16'', 24, 26), **1,32-1,55** (2H, m, H15'', 25), **1,09-1,27** (3H, m, H7'', 19), **1,07** (3H, s, H18), **0,82** (3H, t, H20, ³J_{(H1-H2)}}=7,38 Hz) **0,61-0,66** (1H, m, H12').

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

171,5 (C28), 154,9 (C3), 154,8 (C21), 138,6 (C5), 128,4 (C10), 127,8 (C1), 123,1 (C22), 115,4 (C4), 113,6 (C2), 82,5 (C17), 52,3 (C27), 49,8 (C14), 49,3 (C23), 49,1 (C9), 47,8 (C13), 37,8 (C11), 37,9 (C16), 35,28 (C8), 33,4 (C12), 30,3 (C6), 29,9 (C26), 29,8 (C24), 27,5 (C7), 23,8 (C15), 22,0 (C25), 21,0 (C19), 18,1 (C18), 13,2 (C20).

Masse [M+H]⁺: 497,3; (Nominalmasse: 496,31)

4.2.15 Synthese des EsECI



Bezeichnung	Menge	Molare Masse [g/mol]	Eq.
17α-Ethinylestradiol	50 mg	296,4	1
Epichlorhydrin	1 mL	92,53	53
CeCl ₃	83 mg	246,48	2
KOH			
HCl			

Durchführung

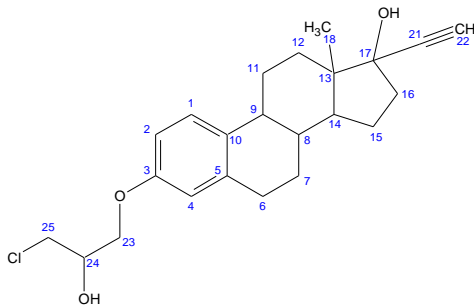
17α-Ethinylestradiol (50 mg, 0,2 mmol, 1 Eq.) wurde in Epichlorhydrin (1 mL, 9,1 mmol, 53 Eq.) gelöst. Es wurde KOH (30 mg) hinzugegeben und bei 150°C 20 min refluxiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer getrocknet, mit HCl neutralisiert und in Acetonitril (1 mL) gelöst. Es wurde Cerchlorid (83 mg, 0,4 mmol, 2 Eq) hinzugegeben und 2 h bei 200 °C refluxiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend am Rotationsverdampfer getrocknet, mit Ethylacetat aufgenommen, mit konzentrierter

Kochsalzlösung 2 x gewaschen und erneut am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Eluent wurde ein Lösungsmittelgemisch von Petrolether/Ethylacetat in einem Verhältnis von 20 zu 1 verwendet.

Als Produkt wurde ein transparenter kristalliner Feststoff erhalten. Ausbeute 73 %.

Analysen:

$R_f(\text{PE/EA: 6/1})=0,78$



NMR

¹H-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

7,21 (1H, d, H1, $^3J_{(H1-H2)}=8,61$ Hz), **6,73** (1H, dd, H2, $^3J_{(H2-H1)}=8,61$ Hz, $^4J_{(H2-H4)}=2,63$ Hz), **6,66** (1H, d, H4, $^4J_{(H4-H2)}=2,63$ Hz), **4,23** (1H, m, H24), **4,07** (1H, m, H25), **3,75** (2H, m, H23), **2,92** (1H, m, H6), **2,54-1,94** (8H, m, H7', 9, 11', 12', 15', 16) **1,68-1,39** (7'', 8, 11'', 12'', 14, 15''), **0,91** (3H, s, H18).

¹³C-NMR (Methanol *d*₄, 400 MHz) d:

155,9 (C3), **138,1** (C5), **133,1** (C10), **126,6** (C1), **114,8** (C4), **112,3** (C2), **70,0** (C24), **68,6** (C23), **50,55** (C14), **48,15** (C13), **46,1** (C25), **44,1** (C9), **38,5** (C8), **36,0** (C16), **31,7** (C16), **29,8** (C12), **26,6** (C7), **26,1** (C11), **21,7** (C15), **14,0** (C18).

Masse [M+H]⁺: 389,2; (Nominalmasse: 388,18)

4.3 Radionuklidmarkierungen und Stabilitätsuntersuchungen

Die Markierungs- und Stabilitätsuntersuchungen wurden in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Schomäcker von Sergio Muñoz durchgeführt.

Wasser-Ultrapur[®] und Salzsäure-Ultrapur[®] wurden von Merck Millipore (Steinheim, Deutschland) erhalten. ⁶⁸Ga wurde in einer 0,1 M HCl Lösung aus einem ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga-Generator von Eckert & Ziegler Radiopharma (Berlin, Deutschland) eluiert. ¹⁷⁷Lu wurde in einer 0,05 M HCl Lösung von ITG Garching (München, Deutschland) bezogen.

4.3.1 ¹⁷⁷Lu-Markierung

Die ¹⁷⁷Lu/HCl-Lösung wurde in ein 4 mL Glasgefäß mit Schraubverschluss überführt und auf 200 µL mit HCl (0,05 M) aufgefüllt. Es wurden 13 µL einer Natriumacetatlösung (2 M) hinzugegeben und anschließend 10 µL einer DMSO/Precursor-Lösung (1 nmol/µL). Das Reaktionsgemisch wurde bei 80 °C 15 min inkubiert und anschließend über 5 min auf Raumtemperatur gebracht. Abschließend wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt.

4.3.2 ⁶⁸Ga-Markierung

⁶⁸Ga wurde von einem ⁶⁸Ga-Generator mit 5 mL einer 0,1 M HCl Lösung eluiert. Es wurden 200 µL der ⁶⁸Ga/HCl Lösung in ein 4 mL Glasgefäß mit Schraubverschluss überführt, 15 µL einer Natriumacetatlösung (2 M) und 10 mL einer DMSO/Precursor-Lösung (1 nmol/µL) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 90 °C 15 min inkubiert und anschließend über 5 min auf Raumtemperatur gebracht. Abschließend wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt.

4.3.3 Qualitätskontrolle der Markierungsprodukte

Die Qualitätskontrolle der Markierungsprodukte wurde chromatographisch mittels HPLC (Knauer Smartline pump 1000) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine C-18 Säule (Macherey, Nagel, NUCLEODOR 5 µm, C18, 110 Å, 250×4 mm) verwendet. Als Eluent diente ein Acetonitril/Wassergemisch. Für die Analyse der radiochemischen Reinheit wurde folgende Methode verwendet: Durchflussrate 1,2 mL/min; 0 - 2 min 5 % B; 2 - 17 min 5 -

95 % B; 17 - 22 min 95 % B. Als Lösungsmittel A wurde Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure und als Lösungsmittel B wurde Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure verwendet. Das Radiogramm wurde mittels eines Detektors LB 506 C-1 der Firma Berthold aufgenommen.

4.3.4 Stabilitätsstudien

100 µL der Markierungsprodukte [¹⁷⁷Lu]EsPD und [¹⁷⁷Lu]EesPD wurden mit 1 mL HS oder PBS versetzt und über einen Zeitraum von 0 h, 24 h und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen mittels Dünnschichtchromatographie beurteilt. Als stationäre Phase wurde Silicagel impregnierte Cellulosestreifen (Sheet Cell 200 von Polygam) verwendet. Als mobile Phase diente 0,5 M Citronensäure. Die Detektion der Aktivität wurde mittels eines β-Radiocounters gemessen. (Elysia Raytest, Rita Star)

4.4 Affinitätsstudien

Die Etablierung des Bindungsassays wurde in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Schomäckerin Zusammenarbeit mit Frau Verena Maarman durchgeführt.

Die Ermittlung der IC₅₀-Werte erfolgte im Rahmen einer Kooperation im Zentrum für Pharmakologie der Uniklinik Köln in der Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Markus Pietsch.

4.4.1 Durchführung des Bindungsassays

Der Bindungsassay wurde in separaten 350 µL Wells (BRANDplates® mit immunoGrade™) durchgeführt. Dazu wurden 100 µL einer 10 µM ER-Lösung (Thermo Fischer) auf die Wells gegeben, abgedeckt und bei 4 °C, 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abpipettiert und 3 x mit 350 µL PBS-Puffer (Pan Biotech) gewaschen. Die Wells wurden mit 340 µL einer 5 mg/mL Albuminlösung befüllt, 1 h bei RT inkubiert und anschließend 3 x mit 350 µL PBS-Puffer (Pan Biotech) mit 0,05 % Tween® 20 (VWR) gewaschen.

Für die Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden die entsprechenden Wells zusätzlich mit 200 µL einer 1 mM 17β-Estradiol-Lösung 1 h vorbehandelt und anschließend 3 X mit 350 µL PBS-Puffer mit 0,05 % Tween® 20 gewaschen.

Die vorbehandelten Wells wurden in Triplikaten mit 150 μL der ^{177}Lu markierten Substanzen titriert. Dazu wurden 150 μL einer Konzentrationsreihe der jeweiligen Substanz auf die Wells gegeben und 3 h inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abpipettiert und 3 X mit 350 mL PBS-Puffer (Pan Biotech) mit 0,05 % Tween[®] 20 (VWR) gewaschen.

Die Messung der Aktivität erfolgte an einem Bohrloch-Messplatz ISOMED 100.

Die Auswertung der Messergebnisse wurde mittels GraphPad 7 von Prism durchgeführt.

4.4.2 Ermittlung der IC₅₀-Werte mittels Fluoreszenz-depolarisations-Spektroskopie

Bei der Ermittlung der IC₅₀-Werte mittels Fluoreszenz-depolarisations-Spektroskopie wurde der PolarScreen™ ER Alpha Competitor Assay der Firma *Thermo Fischer* verwendet. Das Kit enthält 2,1 nmol (140 μg) eines rekombinant erzeugten, ungetaggtten ER- α in voller Länge in einer Pufferlösung (50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 500 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM Na₃VO₄, 2 mM DTT und 10 % Glycerol), 100 μL Fluormone™ EL Red (285 nM in 20 mM; 90 % Methanol) und 50 mL des ER Red screening buffer (**SB**) (Proprietary Buffer (pH 8.0); 10 % Glycerol). Jede der Substanzen wurde nach den Herstellerangaben gelagert. Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers.¹³²

Aus den Testverbindungen **EE**, **EsPD** und **EesPD** wurden 1 mM DMSO-Stammlösungen hergestellt und auf einer DMSO-resistenten Polypropylen 98-Well-Platte (Corning) auf verschiedene nano- bzw. mikromolare Konzentrationen verdünnt und anschließend erneut mit Estrogen-Screening-Puffer™ (Life Technologies) in im Verhältnis 1 zu 49 verdünnt. Das Endvolumen der Lösungen betrug 100 μL . Danach wurde die Verdünnungsreihe mit jeweils 2 μL auf einer schwarzen 98-Well-Platte (Corning) unter Ausschluss von Licht in Triplikaten auf die ER α - /Fluormone™-Komplexlösung (60 nM/1,4 nM in Estrogen-Screening-Puffer, 38 μL) titriert. Nach 3 h Inkubation bei 30 °C unter Ausschluss von Licht wurde die Platte auf einem Fluoreszenzpolarisationsmessgerät (Synergy™ 2 Plate Reader der Firma BioTek) ausgelesen. Zur Bestimmung der Referenzwerte für die Polarisationsmessungen wurden eine Negativkontrolle (ER α -Fluormone™) und eine Positivkontrolle (ER α -Fluormone™ + Kontrollverbindung) durchgeführt. Die Positivkontrolle des Assays gab die Verdrängung des fluoreszierenden Liganden (Fluormone™) aus dem ER α -Fluormone™-Komplex durch

einen Kontrollliganden. Als Kontrollligand wurde natives 17 β -Estradiol (10 μ M) verwendet. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels Prism 7 der Firma GraphPad.

4.5 Kultivierung der Tumorzellen

Die Zelllinien des Prostatakarzinoms LNCaP und die des Brustkarzinoms MCF7 wurden von dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Schomäcker (Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt und in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Dr. (SU) V. Isachenko durchgeführt.

Das eingefrorene 1 mL Aliquot mit der jeweiligen Zelllinie wurde in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 10 mL Kulturlösung gewaschen¹³³ und zum Kultivieren in Zellkulturflaschen überführt.

Die Kultivierung sämtlicher Zelllinien erfolgte unter Standardbedingungen, bei 37 °C, 5 % CO₂-Sättigung und in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre, steril nach S1-Sicherheitsstufenbedingungen. MCF7 Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) und LNCaP Zellen in RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640, von Gibco) Medium unter Zusatz von 10 % FBS (Pan Biotech) und 5 % Antibiotika (Penicillin-Streptomycin von Thermo Fischer) kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 48 h gewechselt. Für die Kultivierung wurden 25 bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Beim Erreichen einer 80 – 90 %igen Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert (passagiert). Dabei betrug das Subkultivierungsratio 1 zu 8.

Für die Subkultivierung wurden die Zellen mit 0,5 mL/25 cm²- und 1 mL/75 cm²-Kulturflasche mit einer 0,05%igen Trypsin/EDTA-Lösung (von Gibco) 3-7 min bei 37 °C bis zum Ablösen des Monolayers inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch die Zugabe von 10 mL des Kulturmediums inaktiviert und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Subkultivierung wurde bis zum Erreichen der gewünschten Zellmenge wiederholt.

4.6 CAM-Kultur

Die CAM-Kultur wurde in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Dr. (SU) V. Isachenko durchgeführt.

Die Bebrütung der Hühnereier für die Cam-Kultur erfolgte im Brutschrank bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 37,4 °C.

Die befruchteten Hühnereier der Firma LSL Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetriebe GmbH & Co.KG wurden am ersten Bebrütungstag mit der Spitze nach oben im Brutschrank platziert. Am zweiten Bebrütungstag wurden die Eier gedreht, sodass die Spitze nach unten zeigte. An der stumpfen Seite des Eis wurde eine 3 mm breite Öffnung gebohrt und mit einem Pflaster verschlossen. Am 5. Bebrütungstag wurde die Öffnung auf 1 cm Durchmesser erweitert und mit einer diffusionsfähigen Membran (Tegaderm Film von M3) verschlossen. Am 8. Bebrütungstag wurde ein Silikonring an einem großen Blutgefäß platziert. Es wurden 8 µL einer Zellsuspension von 1 Mio. Zellen im Kulturmedium bei 0 °C mit 8 µL Matrigel (Corning) vermischt und auf die CAM inokuliert, wobei der Silikonring als Begrenzung diente. Die Öffnung wurde bis zum 14. Bebrütungstag wieder mit einer diffusionsfähigen Membran (Tegaderm Film von M3) verschlossen.

Am 14. Bebrütungstag wurde die diffusionsfähige Membran entfernt und die Öffnung auf 2,5 bis 3 cm für weitere Untersuchungen erweitert.

4.7 PET Untersuchungen

Die PET-Untersuchungen wurden in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität zu Köln unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Heike Endepols durchgeführt.

Die LNCaP bzw. MCF7 applizierten Hühnereier wurden vor der Dosisinjektion an einem Stativ befestigt. Die Injektion der radioaktiv-markierten Verbindungen [¹⁸F]FDG, [⁶⁸Ga]BPD und [¹⁸F]PSMA7 erfolgte über eine Insulinspritze (Omnican® 100, 1 mL, Kanüle: Ø 0.30 x 8 mm Länge) in die Chorionvene des Hühnerembryos. Vor der Injektion wurde die Einstichstelle mit isotonomischer Kochsalzlösung (Pan Biotech) angefeuchtet. Die injizierte Aktivität betrug zwischen 1 und 2 MBq in 10 - 30 µL Lösungsvolumen. Die Injektionsstelle wurde mit einem chirurgischen Flüssigpflaster (Opsite Spray, Smith & Nephew) verklebt. Dazu wurde ein 1,5 mL Eppendorf Tube mit ca.0,5 mL des Flüssigpflasters gefüllt und mit einer Präzisionspipette, mit einer gekühlten 200 µL Pipettenspitze 50 µL des Flüssigpflasters aufgezogen. Während

des Rausziehens der Kanüle wurden 50 mL des Flüssigpflasters auf die Injektionsstelle gegeben.

Die applizierte Aktivitätsmenge wurde durch die vorher/nachher-Messung der Spritze unter der Berücksichtigung der Zerfallsrate des jeweiligen Radionuklids bestimmt.

Die PET-Messung wurde an einem Kleintier-PET-Scanner (CTI/Siemens Knoxville, TN; Öffnungsfenster: 1.4 mm; 30 min Messzeit) durchgeführt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels Vinci 4.95.

5 Literaturverzeichnis

- (1) GLOBOCAN Cancer Fact Sheets:
<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp#MORTALITY> .
- (2) Krebs - Prostatakrebs:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html.
- (3) Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. Cancer Statistics, 2010. CA Cancer J Clin. **2010**, 60, 277-300.
- (4) Dorr, V. J.; Williamson, S. K.; Stephens, R. L. An Evaluation of Prostate-Specific Antigen as a Screening Test for Prostate Cancer. Arch Intern Med. **1993**, 153, 2529–2537.
- (5) Bostwick, D. G.; Burke, H. B.; Djakiew, D.; Euling, S.; Ho, S.; Landolph, J.; Morrison, H.; Sonawane, B.; Shifflett, T.; Waters, D. J.; et al. Human Prostate Cancer Risk Factors. Cancer. **2004**, 101, 2371-490.
- (6) Wertz, R. P.; Eggener, S. E. Use of Active Surveillance or Watchful Waiting for Low-Risk Prostate Cancer and Management Trends Across Risk Groups in the United States 2010-2015. Eur Urol. **2019** (in press).
- (7) Balakrishnan, A. S.; Cowan, J. E.; Cooperberg, M. R.; Shinohara, K.; Nguyen, H. G.; Carroll, P. R. Evaluating the Safety of Active Surveillance: Outcomes of Deferred Radical Prostatectomy after an Initial Period of Surveillance. The Journal of Urology **2019** (in press).

- (8) Mahal, B. A.; Butler, S.; Franco, I.; Spratt, D. E.; Rebbeck, T. R.; D'Amico, A. V.; Nguyen, P. L. Use of Active Surveillance or Watchful Waiting for Low-Risk Prostate Cancer and Management Trends Across Risk Groups in the United States, 2010-2015. *JAMA* **2019**, 32, 704-706.
- (9) D'Amico, A. V.; Whittington, R.; Malkowicz, S. B.; Cote, K.; Loffredo, M.; Schultz, D.; Chen, M.-H.; Tomaszewski, J. E.; Renshaw, A. A.; Wein, A.; et al. Biochemical Outcome after Radical Prostatectomy or External Beam Radiation Therapy for Patients with Clinically Localized Prostate Carcinoma in the Prostate Specific Antigen Era. *Cancer*. **2002**, 95, 281-286.
- (10) Cornford, P.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Briers, E.; De Santis, M.; Gross, T.; Henry, A. M.; Joniau, S.; Lam, T. B.; Mason, M. D.; et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2017**, 71, 630–642.
- (11) Prostatakrebs, Hormonelle Therapie und Hormonentzug:
<https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/prostatakrebs/behandlung-antihormontherapie.php>
- (12) Lütter, C. Strahlentherapie für MTRA/RT; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, **2012**.
- (13) Urologie, 4th ed.; Hautmann, R., Ed.; Springer-Lehrbuch; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2010**.
- (14) Coughlin, G. D.; Yaxley, J. W.; Chambers, S. K.; Occhipinti, S.; Samaratunga, H.; Zajdlewicz, L.; Teloken, P.; Dunlison, N.; Williams, S.; Lavin, M. F.; et al. Robot-Assisted Laparoscopic Prostatectomy versus Open Radical Retropubic Prostatectomy: 24-Month Outcomes from a Randomised Controlled Study. *Lancet Oncol.* **2018**, 19, 1051–1060.
- (15) Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* **2015**, 136, 359-386.
- (16) GLOBOCAN Cancer Fact Sheets:
<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>.
- (17) Krebs - Brustkrebs:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html.

- (18) Noguchi, M.; Kinne, D. W.; Miyazaki, I. Breast-Conserving Treatment: Controversies and Consensus. *J Surg Oncol.* **1996**, 62, 228–234.
- (19) Gennari, A.; Conte, P.; Rosso, R.; Orlandini, C.; Bruzzi, P. Survival of Metastatic Breast Carcinoma Patients over a 20-Year Period: A Retrospective Analysis Based on Individual Patient Data from Six Consecutive Studies. *Cancer.* **2005**, 104, 1742–1750.
- (20) Fisher, B.; Brown, A.; Mamounas, E.; Wieand, S.; Robidoux, A.; Margolese, R. G.; Cruz, A. B.; Fisher, E. R.; Wickerham, D. L.; Wolmark, N.; et al. Effect of Preoperative Chemotherapy on Local-Regional Disease in Women with Operable Breast Cancer: Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol.* **1997**, 15, 2483-2493..
- (21) Sakamoto, T.; Eguchi, H.; Omoto, Y.; Ayabe, T.; Mori, H.; Hayashi, S. Estrogen Receptor-Mediated Effects of Tamoxifen on Human Endometrial Cancer Cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, 192, 93–104.
- (22) Choi, Y. M.; Kim, K. B.; Lee, J. H.; Chun, Y. K.; An, I. S.; An, S.; Bae, S. DBC2/RhoBTB2 Functions as a Tumor Suppressor Protein via Musashi-2 Ubiquitination in Breast Cancer. *Oncogene.* **2017**, 36, 2802–2812.
- (23) Miller, K.; Wang, M.; Gralow, J.; Dickler, M.; Cobleigh, M.; Perez, E. A.; Shenkier, T.; Cella, D.; Davidson, N. E. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 357, 2666–2676.
- (24) Gudkov, S. V.; Shilyagina, N. Y.; Vodeneev, V. A.; Zvyagin, A. V. Targeted Radionuclide Therapy of Human Tumors. *Int J Mol Sci* **2015**, 17.
- (25) Alt-Epping, B.; Fuxius, S.; Wedding, U. *Onkologie für die Palliativmedizin.* Universitätsverlag Göttingen, **2015**.
- (26) Lewington, V. J. Targeted Radionuclide Therapy for Bone Metastases. *Eur J Nucl Med.* **1993**, 20, 66-74.
- (27) Bouchelouche, K.; Choyke, P. L.; Capala, J. Prostate Specific Membrane Antigen—A Target for Imaging and Therapy with Radionuclides. *Discov Med.* **2010**, 9, 55–61.
- (28) Schmaljohann, J.; Biersack, H.-J.; Gohlke, S. Radiotherapeutika: Herstellung und therapeutische Anwendung von Radiopharmaka. *Pharmazie in unserer Zeit.* **2005**, 34, 498–504.

- (29) Fani, M.; André, J. P.; Maecke, H. R. ^{68}Ga -PET: A Powerful Generator-Based Alternative to Cyclotron-Based PET Radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging*. **2008**,*3*, 67-77.
- (30) Palumbo, B.; Sivoletta, S.; Palumbo, I.; Liberati, A. M.; Palumbo, R. ^{67}Ga -SPECT/CT with a Hybrid System in the Clinical Management of Lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2005**, *32*, 1011–1017.
- (31) Welch, M. J. *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*; John Wiley & Sons: Hoboken, New Jersey, **2003**.
- (32) Standke, R. Technische Grundlagen der ^{18}F -Fluorodeoxyglukose-Positronen-emissionstomographie-Diagnostik. *Act Med Austr*. **2002**, *29*, 149–155.
- (33) Green, M. A.; Welch, M. J. Gallium Radiopharmaceutical Chemistry. *Int J Rad Appl Instrum B*. **1989**, *16*, 435-448.
- (34) Dymov, A. M. *Analytical Chemistry of Gallium*; Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor: Freiburg, **1970**.
- (35) Knapp, A. M. R. P. and F. F. (Russ). Evolving Important Role of Lutetium-177 for Therapeutic Nuclear Medicine. *Curr Radiopharm*. **2015**, *8*, 78-85.
- (36) Milenic, D. E.; Brady, E. D.; Brechbiel, M. W. Antibody-Targeted Radiation Cancer Therapy. *Nat Rev Drug Discov*. **2004**, *3*, 488-499.
- (37) Kam, B. L. R.; Teunissen, J. J. M.; Krenning, E. P.; de Herder, W. W.; Khan, S.; van Vliet, E. I.; Kwekkeboom, D. J. Lutetium-Labelled Peptides for Therapy of Neuroendocrine Tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **2012**, *39*, 103–112.
- (38) Banerjee, S.; Pillai, M. R. A.; Knapp, F. F. (Russ). Lutetium-177 Therapeutic Radiopharmaceuticals: Linking Chemistry, Radiochemistry, and Practical Applications. *Chem Rev*. **2015**, *115*, 2934-2974.
- (39) Dvorakova, Z.; Henkelmann, R.; Lin, X.; Türler, A.; Gerstenberg, H. Production of ^{177}Lu at the New Research Reactor FRM-II: Irradiation Yield of ^{176}Lu / ^{177}Lu . *Appl Radiat Isot*. **2008**, *66*, 147-151.
- (40) Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; et al. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell*. **1995**, *83*, 835–839.

- (41) Cleator, S. J.; Ahamed, E.; Coombes, R. C.; Palmieri, C. A 2009 Update on the Treatment of Patients with Hormone Receptor—Positive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. **2009**, *9*, 16–17.
- (42) Anderson, W. F.; Chatterjee, N.; Ershler, W. B.; Brawley, O. W. Estrogen Receptor Breast Cancer Phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Breast Cancer Res Treat*. **2002**, *76*, 27–36.
- (43) Davies, E.; Hiscox, S. New Therapeutic Approaches in Breast Cancer. *Maturitas*. **2011**, *68*, 121–128.
- (44) Walter, P.; Green, S.; Greene, G.; Krust, A.; Bornert, J. M.; Jeltsch, J. M.; Staub, A.; Jensen, E.; Scrace, G.; Waterfield, M. Cloning of the Human Estrogen Receptor CDNA. *Proc Natl Acad Sci*. **1985**, *82*, 7889–7893.
- (45) Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. Cloning of a Novel Receptor Expressed in Rat Prostate and Ovary. *Proc Natl Acad Sci*. **1996**, *93*, 5925–5930.
- (46) Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R. ER Beta: Identification and Characterization of a Novel Human Estrogen Receptor. *FEBS Lett*. **1996**, *392*, 49–53.
- (47) HIROKI, E.; Jun-ichi, A.; SUZUKI, F.; NAGASE, S.; ITO, K.; SUZUKI, T.; SASANO, H.; YAEHASHI, N. Changes in MicroRNA Expression Levels Correlate with Clinicopathological Features and Prognoses in Endometrial Serous Adenocarcinomas. *Cancer sci*. **2010**, *101*, 241–249.
- (48) Ström, A.; Hartman, J.; Foster, J. S.; Kietz, S.; Wimalasena, J.; Gustafsson, J.-A. Estrogen Receptor β Inhibits 17β -Estradiol-Stimulated Proliferation of the Breast Cancer Cell Line T47D. *Proc Natl Acad Sci*, **2004**, *101*, 1566–1571.
- (49) Sotoca Covalada, A. M.; van den Berg, H.; Vervoort, J.; van der Saag, P.; Ström, A.; Gustafsson, J.-A.; Rietjens, I.; Murk, A. J. Influence of Cellular ER α /ER β Ratio on the ER α -Agonist Induced Proliferation of Human T47D Breast Cancer Cells. *Toxicol Sci*. **2008**, *105*, 303–311.
- (50) Roger, P.; Sahla, M. E.; Mäkelä, S.; Gustafsson, J. A.; Baldet, P.; Rochefort, H. Decreased Expression of Estrogen Receptor β Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors. *Cancer Res*. **2001**, *61*, 2537–2541.
- (51) Haldosén, L.-A.; Zhao, C.; Dahlman-Wright, K. Estrogen Receptor Beta in Breast Cancer. *Mol Cell Endocrinol*. **2014**, *382*, 665–672.

- (52) Holst, F.; Stahl, P. R.; Ruiz, C.; Hellwinkel, O.; Jehan, Z.; Wendland, M.; Lebeau, A.; Terracciano, L.; Al-Kuraya, K.; Jänicke, F.; et al. Estrogen Receptor Alpha (ESR1) Gene Amplification Is Frequent in Breast Cancer. *Nat Genet.* **2007**, *39*, 655–660.
- (53) Tomita, S.; Zhang, Z.; Nakano, M.; Ibusuki, M.; Kawazoe, T.; Yamamoto, Y.; Iwase, H. Estrogen Receptor Alpha Gene ESR1 Amplification May Predict Endocrine Therapy Responsiveness in Breast Cancer Patients. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1012–1017.
- (54) Tsiambas, E.; Georgiannos, S. N.; Salemis, N.; Alexopoulou, D.; Lambropoulou, S.; Dimo, B.; Ioannidis, I.; Kravvaritis, C.; Karameris, A.; Patsouris, E.; et al. Significance of Estrogen Receptor 1 (ESR-1) Gene Imbalances in Colon and Hepatocellular Carcinomas Based on Tissue Microarrays Analysis. *Med Oncol.* **2011**, *28*, 934–940.
- (55) Moelans, C. B.; Monsuur, H. N.; de Pinth, J. H.; Radersma, R. D.; de Weger, R. A.; van Diest, P. J. ESR1 Amplification Is Rare in Breast Cancer and Is Associated with High Grade and High Proliferation: A Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Study. *Anal Cell Pathol.* **2010**, *33*, 13–18.
- (56) Dunbier, A. K.; Anderson, H.; Ghazoui, Z.; Lopez-Knowles, E.; Pancholi, S.; Ribas, R.; Drury, S.; Sidhu, K.; Leary, A.; Martin, L.-A.; et al. ESR1 Is Co-Expressed with Closely Adjacent Uncharacterised Genes Spanning a Breast Cancer Susceptibility Locus at 6q25.1. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001382.
- (57) Ban, K. A.; Godellas, C. V. Epidemiology of Breast Cancer. *Surg Onc Clin.* **2014**, *23*, 409–422.
- (58) Sommer, S.; Fuqua, S. A. . Estrogen Receptor and Breast Cancer. *Semin Cancer Biol.* **2001**, *11*, 339–352.
- (59) Turner, R. T.; Riggs, B. L.; Spelsberg, T. C. Skeletal Effects of Estrogen. *Endocr Rev* **1994**, *15*, 275–300.
- (60) Farhat, M. Y.; Lavigne, M. C.; Ramwell, P. W. The Vascular Protective Effects of Estrogen. *FASEB J.* **1996**, *10*, 615–624.
- (61) Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G. Steroid Hormone Receptors: Many Actors in Search of a Plot. *Cell* **1995**, *83*, 851–857.
- (62) Vogel, V. G.; Costantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Cronin, W. M.; Cecchini, R. S.; Atkins, J. N.; Bevers, T. B.; Fehrenbacher, L.; Pajon, E. R.; Wade, J. L.; et al. Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and

- Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing Breast Cancer. *Cancer Prev Res.* **2010**, 696-706.
- (63) Jensen, E. V.; Jordan, V. C. The Estrogen Receptor: A Model for Molecular Medicine. *Clin Cancer Res.* **2003**, 9, 1980–1989.
- (64) Lippman, M.; Bolan, G.; Huff, K. The Effects of Estrogens and Antiestrogens on Hormone Responsive Human Breast Cancer in Long-Term Tissue Culture. *Cancer Res.* **1976**, 36, 4595–4601.
- (65) Tedesco, R.; Katzenellenbogen, J. A.; Napolitano, E. $7\alpha,11\beta$ -Disubstituted Estrogens: Probes for the Shape of the Ligand Binding Pocket in the Estrogen Receptor. *Bioorg Med Chem Let.* **1997**, 7, 2919–2924.
- (66) Napolitano, E.; Fiaschi, R.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A. 11.Beta.-Substituted Estradiol Derivatives, Potential High-Affinity Carbon-11-Labeled Probes for the Estrogen Receptor: A Structure-Affinity Relationship Study. *J Med Chem.* **1995**, 38, 429–434.
- (67) *Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors*; Freedman, L., Ed.; Progress in Gene Expression; Birkhäuser: Basel, **1998**.
- (68) Roy, A. K.; Lavrovsky, Y.; Song, C. S.; Chen, S.; Jung, M. H.; Velu, N. K.; Bi, B. Y.; Chatterjee, B. Regulation of Androgen Action. In *Vitamins & Hormones*; Litwack, G., Ed.; Academic Press; Boston, **1998**; Vol. 55, 309–352.
- (69) Gao, W.; Bohl, C. E.; Dalton, J. T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem Rev.* **2005**, 105, 3352–3370.
- (70) Mooradian, A. D.; Morley, J. E.; Korenman, S. G. Biological Actions of Androgens. *Endocr Rev.* **1987**, 8, 1–28.
- (71) Visakorpi, T.; Hyytinen, E.; Koivisto, P.; Tanner, M.; Keinänen, R.; Palmberg, C.; Palotie, A.; Tammela, T.; Isola, J.; Kallioniemi, O.-P. In Vivo Amplification of the Androgen Receptor Gene and Progression of Human Prostate Cancer. *Nature Genetics.* **1995**, 9, 401–406.
- (72) LaTulippe, E.; Satagopan, J.; Smith, A.; Scher, H.; Scardino, P.; Reuter, V.; Gerald, W. L. Comprehensive Gene Expression Analysis of Prostate Cancer Reveals Distinct Transcriptional Programs Associated with Metastatic Disease. *Cancer Res.* **2002**, 62, 4499–4506.
- (73) *Advances in Cancer Research*; Academic Press; Boston, **1996**.

- (74) Kokontis, J.; Takakura, K.; Hay, N.; Liao, S. Increased Androgen Receptor Activity and Altered C-Myc Expression in Prostate Cancer Cells after Long-Term Androgen Deprivation. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1566–1573.
- (75) Mooradian, A. D.; Morley, J. E.; Korenman, S. G. Biological Actions of Androgens. *Endocr Rev.* **1987**, *8*, 1–28.
- (76) Lin, X.; Huebner, V. Non-Steroidal Ligands for Steroid Hormone Receptors. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **2000**, *3*, 383–398.
- (77) Nelson, A. M.; Long, T. E. A Perspective on Emerging Polymer Technologies for Bisphenol-A Replacement. *Polym Internat.* **2012**, *61*, 1485–1491.
- (78) Wang, H.; Ding, Z.; Shi, Q.-M.; Ge, X.; Wang, H.-X.; Li, M.-X.; Chen, G.; Wang, Q.; Ju, Q.; Zhang, J.-P.; et al. Anti-Androgenic Mechanisms of Bisphenol A Involve Androgen Receptor Signaling Pathway. *Toxicology.* **2017**, *387*, 10–16.
- (79) Munson, P. J.; Rodbard, D. An Exact Correction to the “Cheng-Prusoff” Correction. *J Recept Res.* **1988**, *8*, 533–546.
- (80) Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N. G.; Stuckey, J. A.; et al. Development and Optimization of a Binding Assay for the XIAP BIR3 Domain Using Fluorescence Polarization. *Anal Biochem.* **2004**, *332*, 261–273.
- (81) Strome, E. M.; Doudet, D. J. Animal Models of Neurodegenerative Disease: Insights from *In Vivo* Imaging Studies. *Mol Imaging Biol.* **2007**, *9*, 186–195.
- (82) Cimpean, A. M.; Ribatti, D.; Raica, M. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model to Study Tumor Metastasis. *Angiogenesis.* **2008**, *11*, 311–319.
- (83) DeFouw, D. O.; Rizzo, V. J.; Steinfeld, R.; Feinberg, R. N. Mapping of the Microcirculation in the Chick Chorioallantoic Membrane during Normal Angiogenesis. *Microvasc Res.* **1989**, *38*, 136–147.
- (84) Li, M.; Pathak, R. R.; Lopez-Rivera, E.; Friedman, S. L.; Aguirre-Ghiso, J. A.; Sikora, A. G. The In Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as an Efficient Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma. *J Vis Exp.* **2015**, 104.
- (85) Richardson, M.; Singh, G. Observations on the Use of the Avian Chorioallantoic Membrane (CAM) Model in Investigations into Angiogenesis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* **2003**, *3*, 155–185.

- (86) Demir, R.; Dimmler, A.; Naschberger, E.; Demir, I.; Papadopoulos, T.; Melling, N.; Sturzl, M.; Hohenberger, W. Malignant Progression of Invasive Tumour Cells Seen in Hypoxia Present an Accumulation of Beta-Catenin in the Nucleus at the Tumour Front. *Exp Mol Pathol.* **2009**, *87*, 109–116.
- (87) Hagedorn, M.; Javerzat, S.; Gilges, D.; Meyre, A.; de Lafarge, B.; Eichmann, A.; Bikfalvi, A. Accessing Key Steps of Human Tumor Progression in Vivo by Using an Avian Embryo Model. *Proc Natl Acad Sci.* **2005**, *102*, 1643–1648.
- (88) Kobayashi, T.; Koshida, K.; Endo, Y.; Imao, T.; Uchibayashi, T.; Sasaki, T.; Namiki, M. A Chick Embryo Model for Metastatic Human Prostate Cancer. *Eur Urol.* **1998**, *34*, 154–160.
- (89) Wittig-Blaich, S. M.; Kacprzyk, L. A.; Eismann, T.; Bewerunge-Hudler, M.; Kruse, P.; Winkler, E.; Strauss, W. S. L.; Hibst, R.; Steiner, R.; Schrader, M.; et al. Matrix-Dependent Regulation of AKT in Hepsin-Overexpressing PC3 Prostate Cancer Cells. *Neoplasia.* **2011**, *13*, 579–589.
- (90) Conn, E. M.; Botkjaer, K. A.; Kupriyanova, T. A.; Andreasen, P. A.; Deryugina, E. I.; Quigley, J. P. Comparative Analysis of Metastasis Variants Derived from Human Prostate Carcinoma Cells. *Am J Pathol.* **2009**, *175*, 1638–1652.
- (91) Taizi, M.; Deutsch, V. R.; Leitner, A.; Ohana, A.; Goldstein, R. S. A Novel and Rapid in Vivo System for Testing Therapeutics on Human Leukemias. *Exp Hematol.* **2006**, *34*, 1698–1708.
- (92) Balke, M.; Neumann, A.; Kersting, C.; Agelopoulos, K.; Gebert, C.; Gosheger, G.; Buerger, H.; Hagedorn, M. Morphologic Characterization of Osteosarcoma Growth on the Chick Chorioallantoic Membrane. *BMC Res Not.* **2010**, *3*, 58.
- (93) Deryugina, E. I.; Quigley, J. P. Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Model Systems to Study and Visualize Human Tumor Cell Metastasis. *Histochem Cell Biol.* **2008**, *130*, 1119–1130.
- (94) Tufan, A. C.; Satioglu-Tufan, N. L. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model System for the Study of Tumor Angiogenesis, Invasion and Development of Anti-Angiogenic Agents. *Curr Cancer Drug Targets.* **2005**, *5*, 249–266.
- (95) Ossowski, L. In Vivo Invasion of Modified Chorioallantoic Membrane by Tumor Cells: The Role of Cell Surface-Bound Urokinase. *J Cell Biol.* **1988**, *107*, 2437–2445.

- (96) Zhai, Y.; Kuick, R.; Nan, B.; Ota, I.; Weiss, S. J.; Trimble, C. L.; Fearon, E. R.; Cho, K. R. Gene Expression Analysis of Preinvasive and Invasive Cervical Squamous Cell Carcinomas Identifies HOXC10 as a Key Mediator of Invasion. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10163–10172.
- (97) Allred, D. C.; Mohsin, S. K. Biological Features of Premalignant Disease in the Human Breast. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **2000**, *5*, 351–364.
- (98) Sommer, S.; Fuqua, S. A. W. Estrogen Receptor and Breast Cancer. *Sem Cancer Biol.* **2001**, *11*, 339–352.
- (99) Knight, W. A.; Livingston, R. B.; Gregory, E. J.; McGuire, W. L. Estrogen Receptor as an Independent Prognostic Factor for Early Recurrence in Breast Cancer. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 4669–4671.
- (100) Järvinen, T. A. H.; Pelto-Huikko, M.; Holli, K.; Isola, J. Estrogen Receptor β Is Coexpressed with ER α and PR and Associated with Nodal Status, Grade, and Proliferation Rate in Breast Cancer. *Am J Pathol.* **2000**, *156*, 29–35.
- (101) Heinlein, C. A.; Chang, C. Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocr Rev.* **2004**, *25*, 276–308.
- (102) Denis Louis J.; Griffiths Keith. Endocrine Treatment in Prostate Cancer. *Semin Surg Oncol.* **1999**, *18*, 52–74.
- (103) Gallo Curcio, C.; Vasile, C.; Gianciotta, A.; Casali, A.; Gionfra, T.; Rinaldi, M.; Guadagni, A.; Le Pera, V.; Segal, E. Short-Term Results of Combined Radioimmunotherapy in Inoperable Lung Cancer. *Tumori.* **1976**, *62*, 587–598.
- (104) Zablocki, J. A.; Katzenellenbogen, J. A.; Carlson, K. E.; Norman, M. J.; Katzenellenbogen, B. S. Estrogenic Affinity Labels: Synthesis, Irreversible Receptor Binding, and Bioactivity of Aziridine-Substituted Hexestrol Derivatives. *J Med Chem.* **1987**, *30*, 829–838.
- (105) Robertson, D. W.; Wei, L. L.; Hayes, J. R.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. TAMOXIFEN AZIRIDINES: EFFECTIVE INACTIVATORS OF THE ESTROGEN RECEPTOR. *Endocrinology.* **1981**, *109*, 1298–1300.
- (106) Gelman Dmitri; Buchwald Stephen L. Efficient Palladium-Catalyzed Coupling of Aryl Chlorides and Tosylates with Terminal Alkynes: Use of a Copper Cocatalyst Inhibits the Reaction. *Angew Chem Int Ed.* **2003**, *42*, 5993–5996.

- (107) Lampkowski Jessica S.; Villa Jordan K.; Young Travis S.; Young Douglas D. Development and Optimization of Glaser–Hay Bioconjugations. *Angew Chem Int Ed.* **2015**, 54, 9343–9346.
- (108) Tripp, V. T.; Lampkowski, J. S.; Tyler, R.; Young, D. D. Development of Solid-Supported Glaser–Hay Couplings. *ACS Comb Sci.* **2014**, 16, 164–167.
- (109) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. The Growing Applications of Click Chemistry. *Chem Soc Rev.* **2007**, 36, 1249–1262.
- (110) Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. The Growing Impact of Click Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discov Today.* **2003**, 8, 1128–1137.
- (111) Myung, J.-K.; Banuelos, C. A.; Fernandez, J. G.; Mawji, N. R.; Wang, J.; Tien, A. H.; Yang, Y. C.; Tavakoli, I.; Haile, S.; Watt, K.; et al. An Androgen Receptor N-Terminal Domain Antagonist for Treating Prostate Cancer. *J Clin Invest* **2013**, 123, 2948–2960.
- (112) Fani Melpomeni; André João P.; Maecke Helmut R. ⁶⁸Ga-PET: A Powerful Generator-based Alternative to Cyclotron-based PET Radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging.* **2008**, 3, 53–63.
- (113) Decristoforo, C.; Pickett, R. D.; Verbruggen, A. Feasibility and Availability of ⁶⁸Ga-Labelled Peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2012**, 39, 31–40.
- (114) Kwekkeboom, D. J.; Bakker, W. H.; Kam, B. L.; Teunissen, J. J. M.; Kooij, P. P. M.; Herder, W. W. de; Feelders, R. A.; Eijck, C. H. J. van; Jong, M. de; Srinivasan, A.; et al. Treatment of Patients with Gastro-Entero-Pancreatic (GEP) Tumours with the Novel Radiolabelled Somatostatin Analogue [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰,Tyr³]Octreotate. *Eur J Nucl Med.* **2003**, 30, 417–422.
- (115) D’Huyvetter, M.; Aerts, A.; Xavier, C.; Vaneycken, I.; Devoogdt, N.; Gijs, M.; Impens, N.; Baatout, S.; Ponsard, B.; Muyldermans, S.; et al. Development of ¹⁷⁷Lu-nanobodies for Radioimmunotherapy of HER2-positive Breast Cancer: Evaluation of Different Bifunctional Chelators. *Contrast Media Mol Imaging.* **2012**, 7, 254–264.
- (116) Carvalho, J. F. S.; Louvel, J.; Doornbos, M. L. J.; Klaasse, E.; Yu, Z.; Brussee, J.; IJzerman, A. P. Strategies To Reduce HERG K⁺ Channel Blockade. Exploring Heteroaromaticity and Rigidity in Novel Pyridine Analogues of Dofetilide. *J Med Chem.* **2013**, 56, 2828–2840.

- (117) Gokel, G. W.; Dishong, D. M.; Diamond, C. J. Lariat Ethers. Synthesis and Cation Binding of Macrocyclic Polyethers Possessing Axially Disposed Secondary Donor Groups. *J Chem Soc., Chem. Commun.* **1980**, 1, 1053–1054.
- (118) Sabitha, G.; Satheesh Babu, R.; Rajkumar, M.; Reddy, C. S.; Yadav, J. S. Highly Regioselective Ring Opening of Epoxides and Aziridines Using Cerium(III) Chloride. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42 (23), 3955–3958.
- (119) Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell*. **1998**, 95, 927–937.
- (120) Manas, E. S.; Xu, Z. B.; Unwalla, R. J.; Somers, W. S. Understanding the Selectivity of Genistein for Human Estrogen Receptor- β Using X-Ray Crystallography and Computational Methods. *Structure*. **2004**, 12, 2197–2207.
- (121) Kolb Hartmuth C.; Finn M. G.; Sharpless K. Barry. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed*. **2001**, 40, 2004–2021.
- (122) Chia, S. L.; Tan, W. S.; Shaari, K.; Abdul Rahman, N.; Yusoff, K.; Satyanarayanajois, S. D. Structural Analysis of Peptides That Interact with Newcastle Disease Virus. *Peptides*. **2006**, 27, 1217–1225.
- (123) Lin, A. H. Y.; Li, R. W. S.; Ho, E. Y. W.; Leung, G. P. H.; Leung, S. W. S.; Vanhoutte, P. M.; Man, R. Y. K. Differential Ligand Binding Affinities of Human Estrogen Receptor- α Isoforms. *PLoS One*. **2013**, 8.
- (124) Ramanujam, P.; Tan, W. S.; Nathan, S.; Yusoff, K. Novel Peptides That Inhibit the Propagation of Newcastle Disease Virus. *Arch Virol*. **2002**, 147, 981–993.
- (125) Owicki, J. C. Fluorescence Polarization and Anisotropy in High Throughput Screening: Perspectives and Primer. *J Biomol Screen*. **2000**, 5, 297–306.
- (126) Ki Calculator:
http://www.umich.edu/~shaomengwanglab/software/calc_ki/index.html (accessed Apr 10, 2019).
- (127) Zuo, Z.; Syrovets, T.; Wu, Y.; Hafner, S.; Vernikouskaya, I.; Liu, W.; Ma, G.; Weil, T.; Simmet, T.; Rasche, V. The CAM Cancer Xenograft as a Model for Initial Evaluation of MR Labelled Compounds. *Sci Rep*. **2017**, 7.

- (128) Plettenberg, A.; Meigel, W. N.; Moll, I. *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend: Aktueller Stand von Klinik und Forschung*; Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, **2013**.
- (129) Adaramoye, O.; Erguen, B.; Nitzsche, B.; Höpfner, M.; Jung, K.; Rabien, A. Punicalagin, a Polyphenol from Pomegranate Fruit, Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Human PC-3 and LNCaP Cells. *Chem Biol Interact.* **2017**, 274, 100–106.
- (130) Taylor, R. M.; Severns, V.; Brown, D. C.; Bisoffi, M.; Sillerud, L. O. Prostate Cancer Targeting Motifs: Expression of Av β 3, Neurotensin Receptor 1, Prostate Specific Membrane Antigen, and Prostate Stem Cell Antigen in Human Prostate Cancer Cell Lines and Xenografts. *Prostate.* **2012**, 72, 523–532.
- (131) Cleutjens, C. B. J. M.; Steketee, K.; van Eekelen, C. C. E. M.; van der Korput, J. a. G. M.; Brinkmann, A. O.; Trapman, J. Both Androgen Receptor and Glucocorticoid Receptor Are Able to Induce Prostate-Specific Antigen Expression, but Differ in Their Growth-Stimulating Properties of LNCaP Cells. *Endocrinology.* **1997**, 138, 5293–5300.
- (132) Scientific, T. F. PolarScreen Nuclear Receptor Competitor Assays. 9: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/nuclear-receptor-biology/nuclear-receptor-biochemical-assays/polarscreen-competition-assays.html>
- (133) Gstraunthaler, G.; Lindl, T. *Zell- Und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen Und Spezielle Anwendungen*, 7th ed.; Springer Spektrum; Berlin Heidelberg, **2013**.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
BC	Brustkrebs (breast cancer)
BET	brusterhaltende Therapie
BPA	Bisphenol A
CAM	Chorion-Allantois-Membran

DEPT	“Distortionless enhancement by polarization transfer”
DES	Diethylstilbestrol
DHT	Dihydrotestosteron
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-tetraessigsäure
DPN	Diarylpropionitril
ER	Estrogenrezeptor (Estrogenrezeptor)
Es	17 α -Ethinylestradiol
FDG	Fluordesoxyglucose
HE-CAM	Hühnereier Chorion-Allantois-Membran
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS	Human Serum
HSA	Human Serum Albumin
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LET	Linearer Energietransfer
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	LH-Releasing Hormone
MRM	modifizierte radikale Mastektomie
NCS	Isothiocyanat-Gruppe
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
PC	Prostatakrebs (prostate cancer)
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PPT	Propylpyrazoletriol
PSA	Positronen-Emissions-Tomographie
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RT	Raumtemperatur
SARM	selektiver Androgenrezeptormodulator
Serm	Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren

SPECT	Single photon Emission Computed Tomography
SUV	Standardized uptake values
T _{1/2}	Halbwertszeit
TAC	time activity curves
TBDMS	tert-Butyldimethylsilyl
TRT	Targeted Radionuclide Therapy

6.2 Anhang der Abbildungen und Schemata

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reichweite einzelner Strahlungsarten. ^{26,28}	7
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Zerfalls von ⁶⁸ Ge über ⁶⁸ Ga zu ⁶⁸ Zn.	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Annihilation eines Positrons e ⁺ mit einem Elektron e ⁻ zu zwei Gammaphotonen.	9
Abbildung 4: Kernreaktion der ⁶⁸ Ge-Herstellung aus dem Tochternuklid ⁶⁹ Ga.	10
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Zerfalls von ¹⁷⁷ Lu zu ¹⁷⁷ Hf.	11
Abbildung 6: Strukturformeln des ER α Agonisten Propylpyrazoletriol (PPT) und des ER β Agonisten, wie Diarylpropionitril (DPN).	13
Abbildung 7: Strukturformeln der gängigen ER-Liganden: Agonisten oben; Antagonisten unten.	14
Abbildung 8: Strukturformeln der gängigen AR-Liganden: Agonisten oben; Antagonisten unten.	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Affinitätsbestimmung mittels Sättigungskurve.	21
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Affinitätsbestimmung mittels Scatchard-Plot.	22
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Radiotracers, bestehend aus einem Liganden (grün), einem Spacer (rot), einem Chelator (blau) und einem komplexierten metallischen Radionuklid (gelb) während der Assoziation mit einem Target (grau).	25
Abbildung 12: Von Myung et al. (2013) beschriebene Chlorhydrin-modifizierte BPA-Derivate EPI-001, EPI-064 und EPI-046. ¹¹¹	27
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen einer EPI-Verbindung und des Androgenrezeptors während der Assoziation. ¹¹¹	27

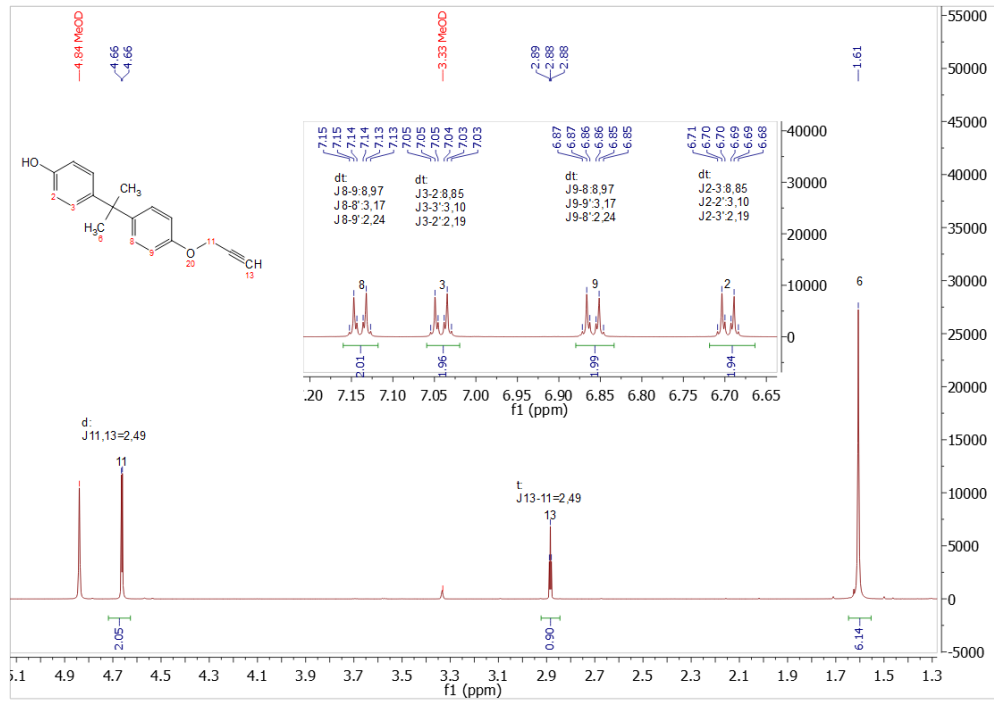
Abbildung 14: Strukturformel des hochaffinen Estrogenliganden 11 β -Ethyl-Estradiol. ^{65,66} ...	28
Abbildung 15: Retrosynthese des kopplungsfähigen 11 β -Ethyl-17 α -ethinylestradiols.	28
Abbildung 16: Kupplungsfähiges ⁶⁸ Ga- bzw. ¹⁷⁷ Lu-Chelator p-NCS-Bn-DOTA.	29
Abbildung 17: Bifunktionaler Spacer NH ₂ -PEG ₃ -N ₃ (links) und trifunktionaler Spacer Fmoc-Lys(N ₃) (rechts).	30
Abbildung 18: Retrosynthese von EPI-046.	30
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Umsetzung von Bisphenol-A (B) zu BP und BP ₂	31
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Umsetzung von BP zu BPE	32
Abbildung 21: Schematische Darstellung der BPE-Cl bzw. EPI-046 Synthese.	32
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Synthese von EsECl.	33
Abbildung 23: Retrosynthese der Ligand-Spacer-DOTA Konstrukte.....	34
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Synthese der Ligand-PEG-Konstrukte.	35
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Synthese der Estrogen-Fmoc-L-Lys-Konstrukte.	36
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Abspaltung der Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Gruppe mittels 30 %iger Piperidin/DMF Lösung.	36
Abbildung 27: Schematische Darstellung der Umsetzung der pegylierten Verbindungen EsP, EesP und EPI-P mit p-NCS-Bn-DOTA zu EsPD, EesPD und BPD.	37
Abbildung 28: Schematische Darstellung der ¹⁷⁷ Lu-Markierung von EsPD , EesPD und BPD . .	39
Abbildung 29: Graphische Darstellung der Radiochromatogramme der Qualitätskontrolle von [¹⁷⁷ Lu]EsPD, [¹⁷⁷ Lu]EesPD und [¹⁷⁷ Lu]BPD.	40
Abbildung 30: Schematische Darstellung der ⁶⁸ Ga-Markierung von EsPD, EesPD und BPD. ..	40
Abbildung 31: Graphische Darstellung der Radiochromatogramme der Qualitätskontrolle von [⁶⁸ Ga]EsPD, [⁶⁸ Ga]EesPD und [⁶⁸ Ga]BPD.	41
Abbildung 32: Dünnschichtchromatographische Analyse der Markierungsprodukte [¹⁷⁷ Lu]EsPD, [¹⁷⁷ Lu]EesPD und [¹⁷⁷ Lu]BPD in PBS nach 0, 24 und 48 h.	42
Abbildung 33: Dünnschichtchromatographische Analyse der Markierungsprodukte [¹⁷⁷ Lu]EsPD, [¹⁷⁷ Lu]EesPD und [¹⁷⁷ Lu]BPD in HS nach 0, 24 und 48 h.....	43
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Sättigungsexperimente mit dem ¹⁷⁷ Lu-markierten EsPD und EesPD: Gemessene Gesamtbindung (blau), gemessene unspezifische Bindung (schwarz).....	47

Abbildung 35: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Fluoreszenzdepolarisations-Estrogenrezeptor-Verdrängungsassays.....	48
Abbildung 36: Verdrängungsdiagramme von Fluoromon durch 17 β -Estradiol (Es) (schwarz), Estradiol-PEG-DOTA (EsPD) (blau) und Ethylestradiol-PEG-DOTA (EesPD) (rot).....	49
Abbildung 37: Fotografie eines Hühnereis vor (a) und nach (b) der Beimpfung mit Tumorzellen.	52
Abbildung 38: Repräsentative Darstellung der CAM-kultivierten Tumore der Zelllinie LNCaP . Oben invasiv verlaufender Tumorwachstum; unten spheroidal, abgegrenzt.	53
Abbildung 39: Repräsentative Darstellung der CAM-kultivierten Tumore der Zelllinie MCF7.	53
Abbildung 40: Schematische Darstellung der Strukturformeln der Radiotracer [^{18}F]PSMA7, [^{18}F]FDG und [^{68}Ga]BPD.	54
Abbildung 41: SUF_{BW} -normierte PET-Aufnahmen von auf der CAM von Hühnereiern gezüchteten Tumoren. Aufgenommen über einen Zeitraum von 30 Minuten: a) Mittels [^{18}F]FDG visualisiertem Tumor der LNCaP Zelllinie; b) Mittels [^{18}F]FDG visualisiertem Tumor der MCF7 Zelllinie; c) Mittels [^{68}Ga]BPD visualisiertem Tumor der LNCaP Zelllinie; d) Mittels [^{18}F]PSMA7 visualisiertem Tumor der LNCaP Zelllinie.	55
Abbildung 42: TAC im Tumorgewebe (schwarz) und Blut (rot) von: a) [^{18}F]FDG im Fall eines LNCaP-Tumors; b) [^{18}F]FDG im Fall eines MCF7-Tumors; c) [^{68}Ga]BPD im Fall eines LNCaP-Tumors und d) [^{18}F]PSMA7 im Fall eines LNCaP-Tumors.....	56

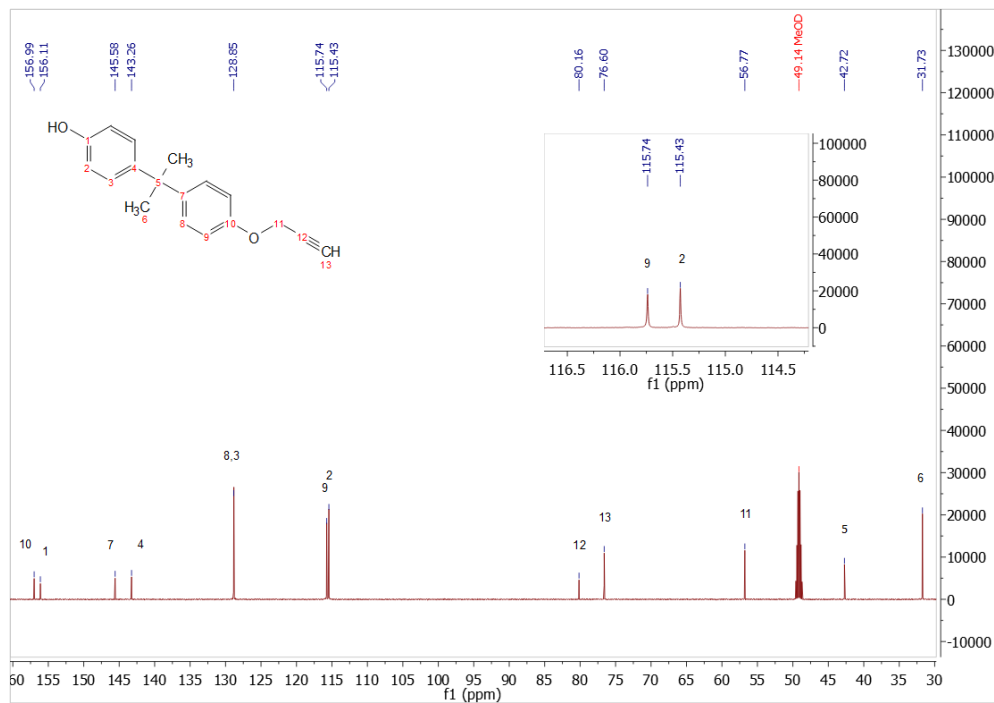
6.3 Anhang der ergänzenden NMR-Spektren

BP:

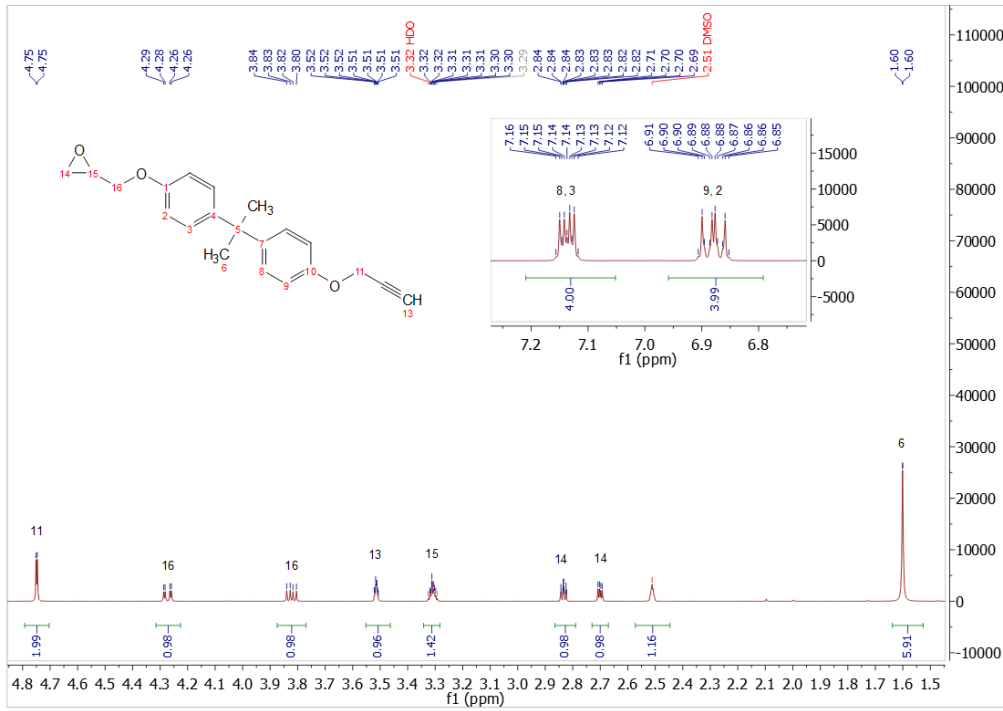
^1H -NMR-Spektrum



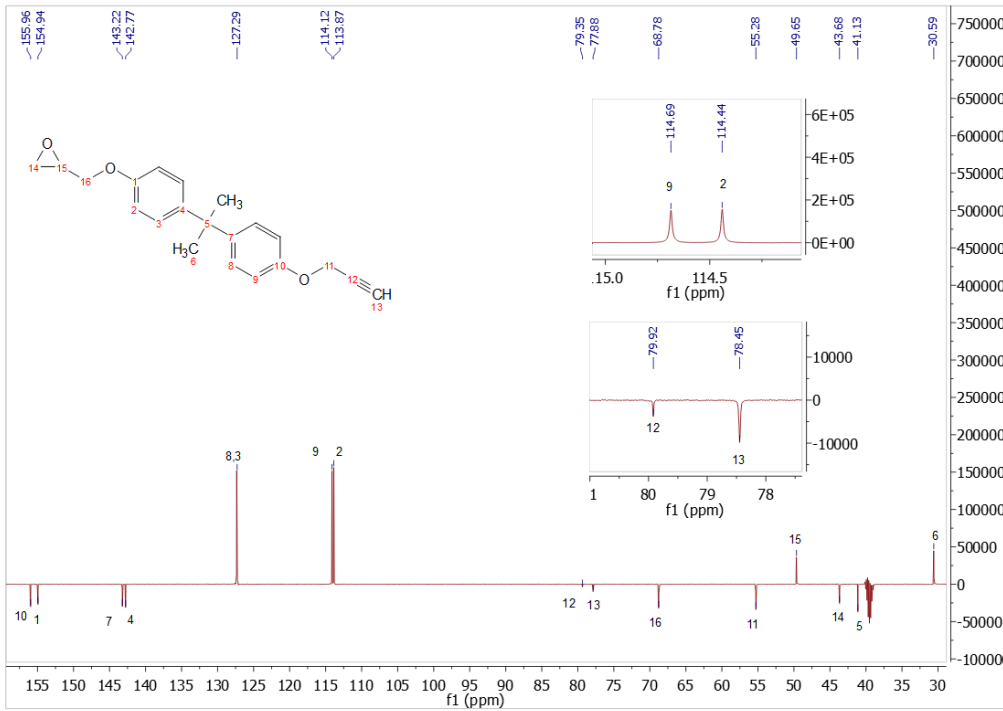
^{13}C -NMR-Spektrum



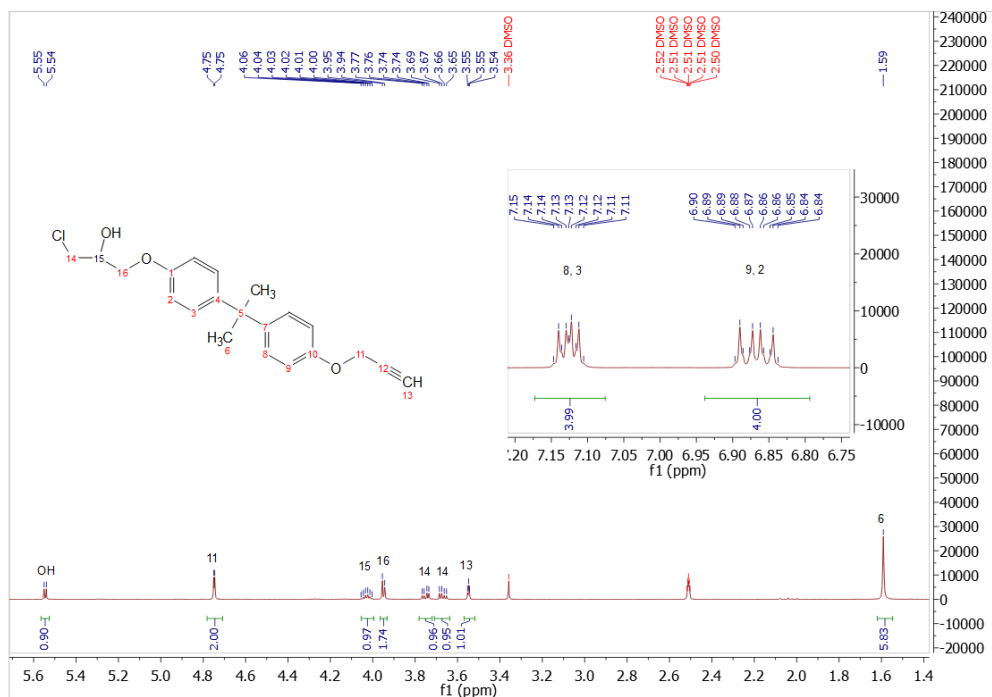
BPE:
¹H-NMR



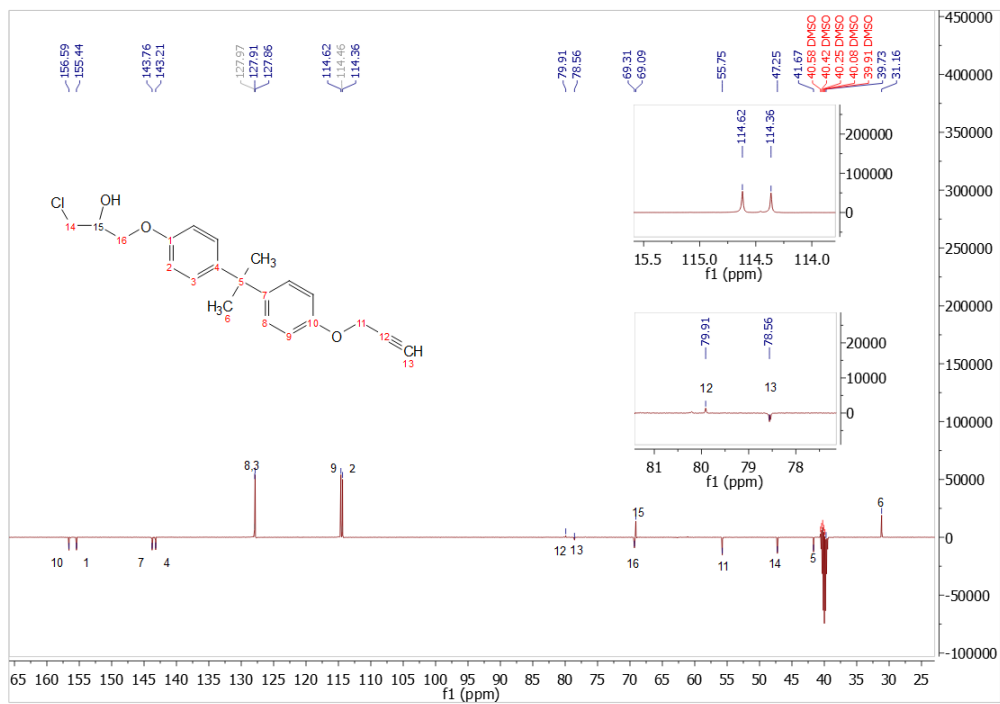
¹³C-NMR



BPECI:
¹H-NMR

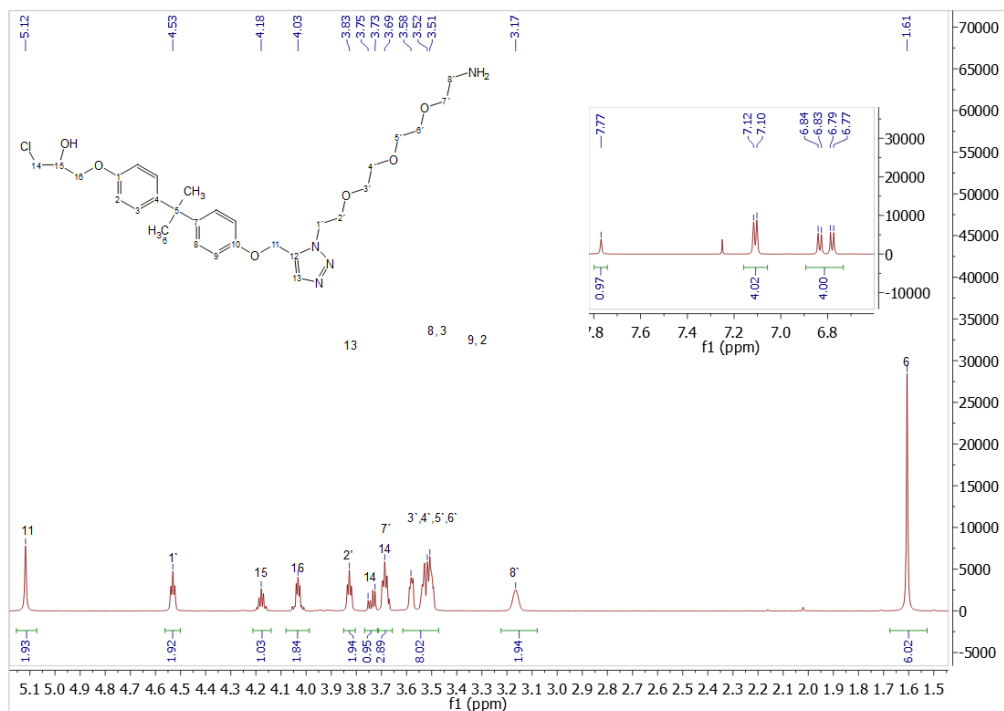


¹³C-NMR

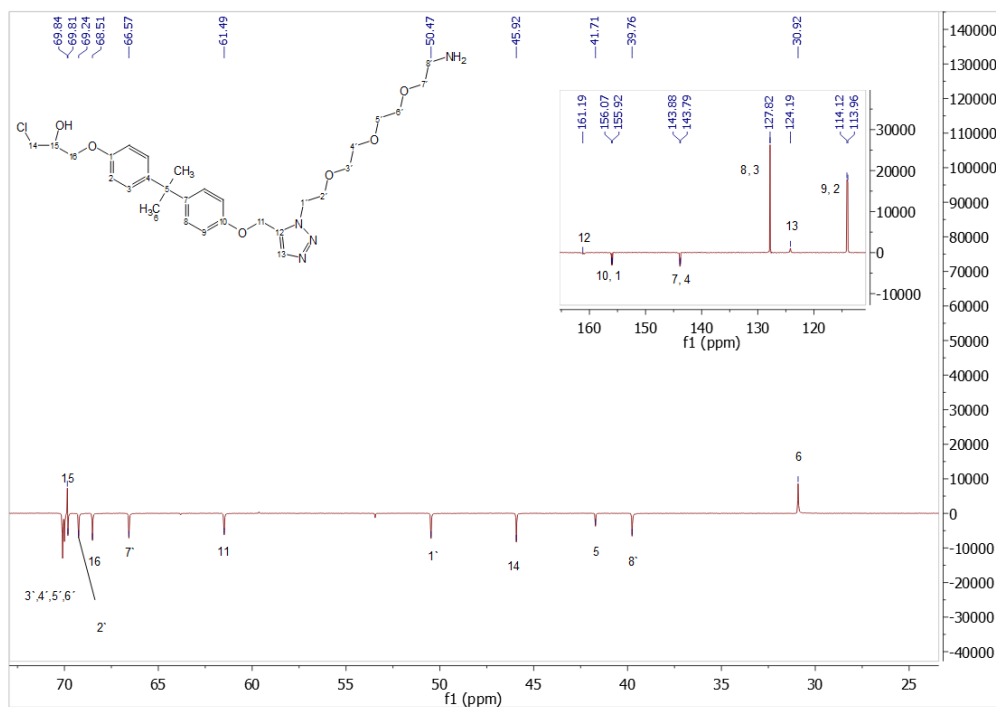


Epi_P

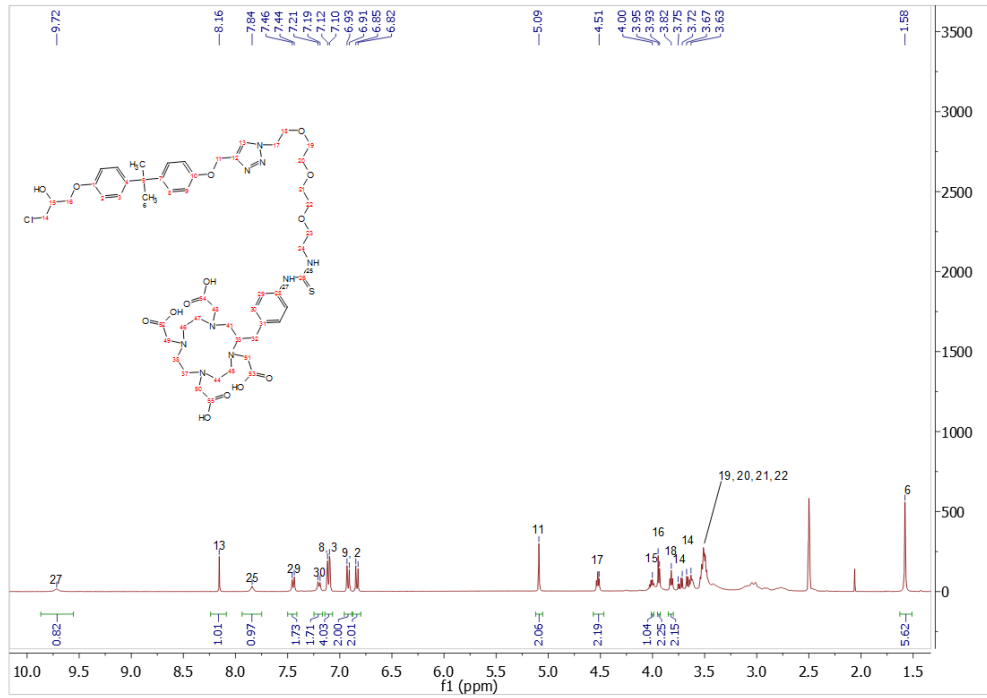
¹H-NMR



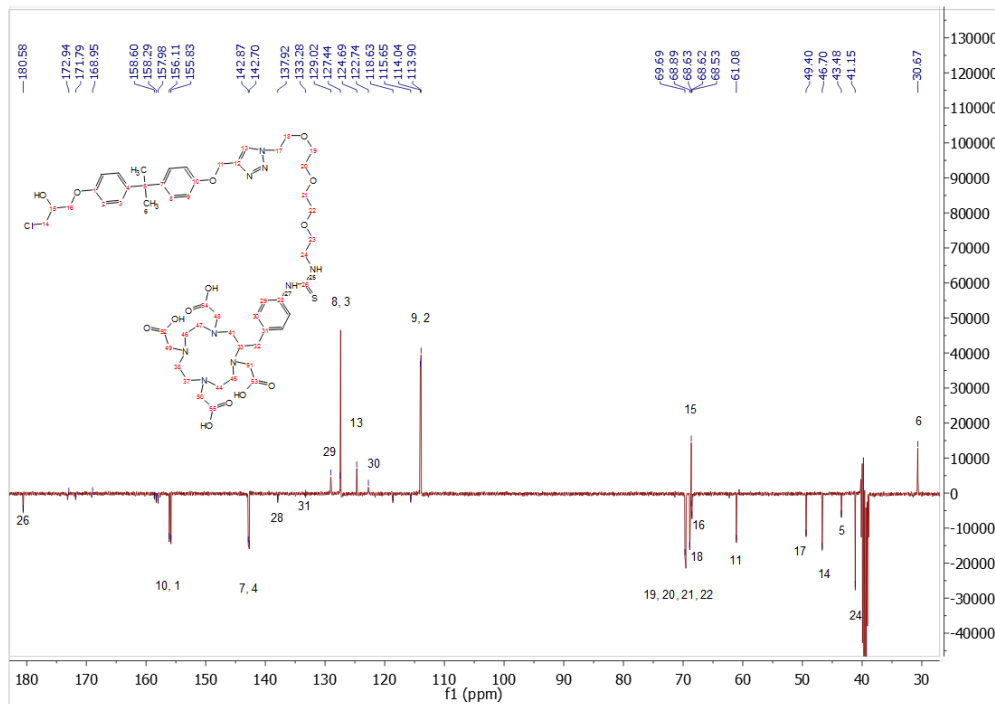
¹³C-NMR



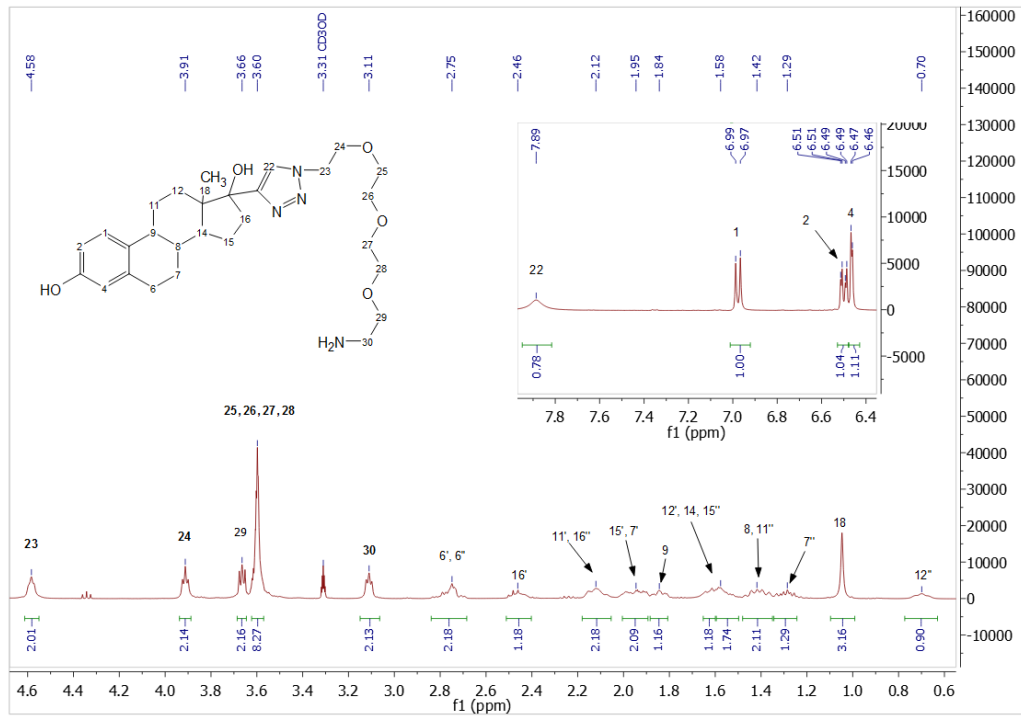
BPD
¹H-NMR



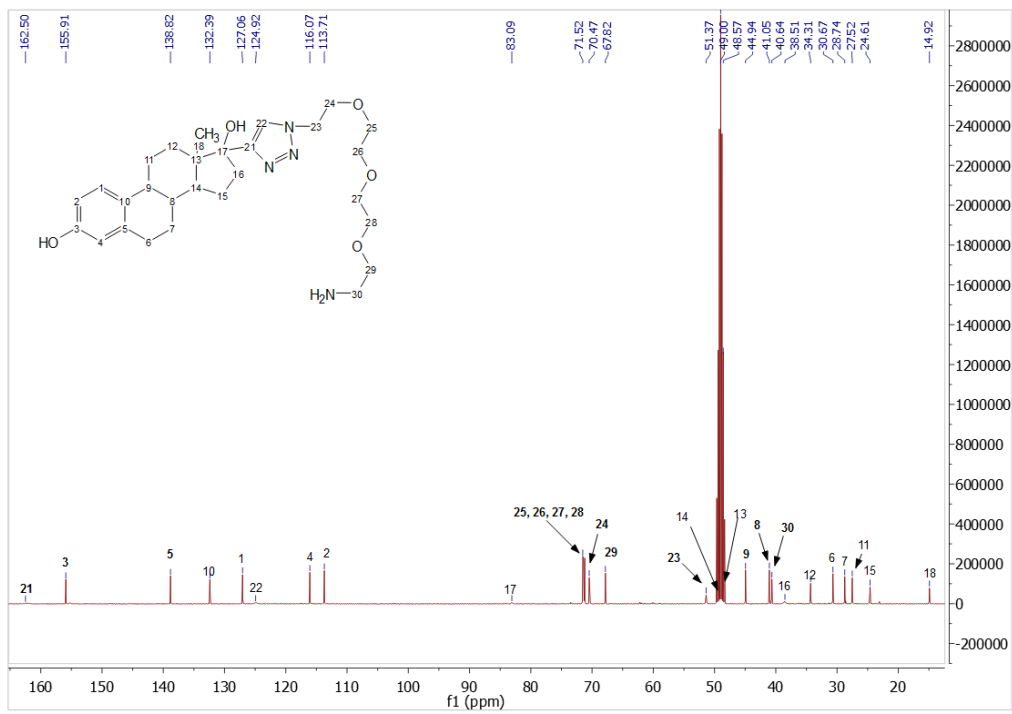
¹³C-NMR



ESP
¹H-NMR

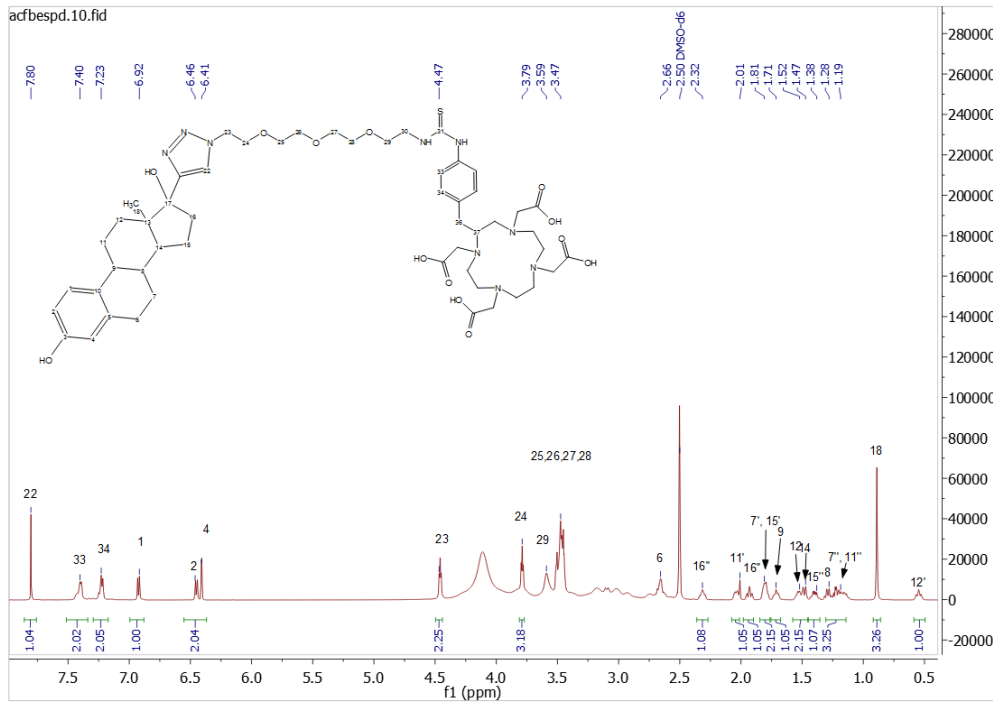


¹³C-NMR

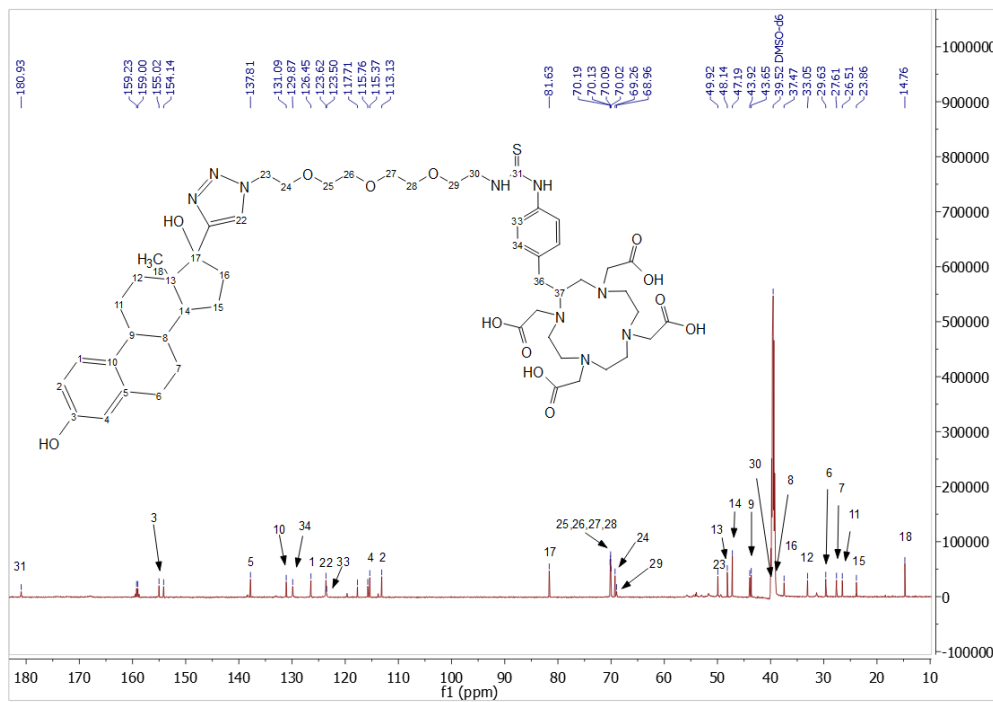


EsPD

¹H-NMR

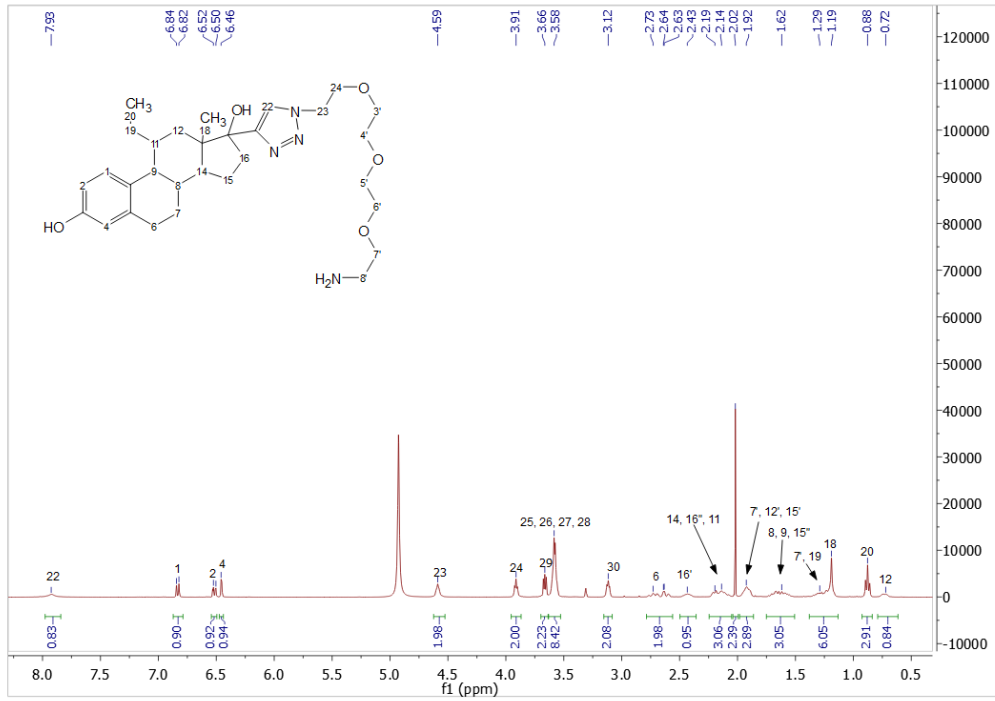


¹³C-NMR

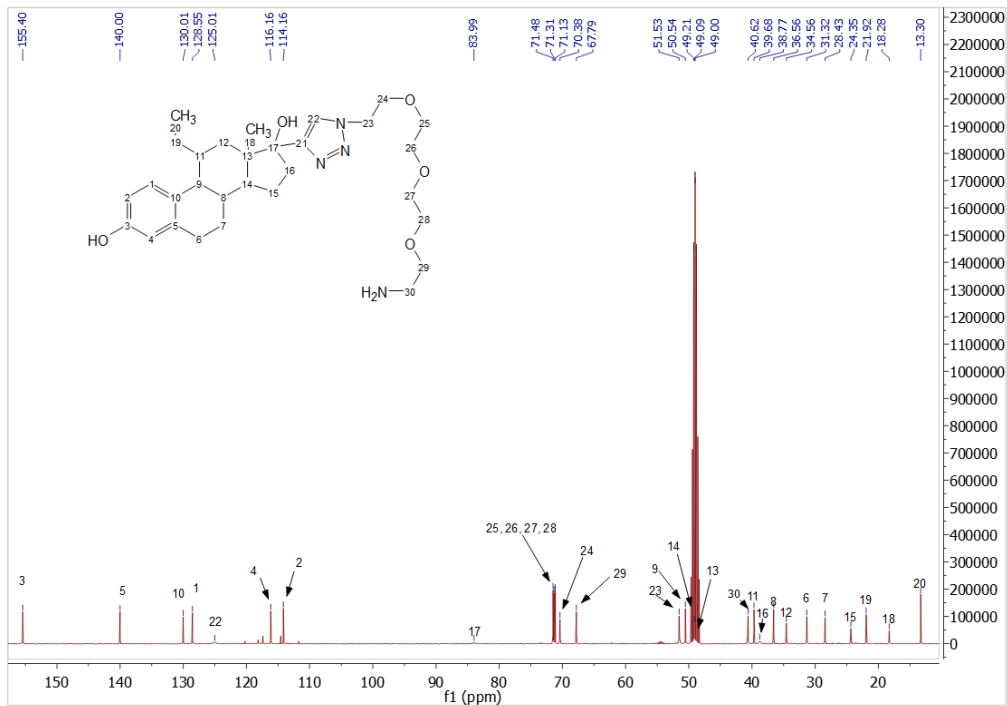


EesP

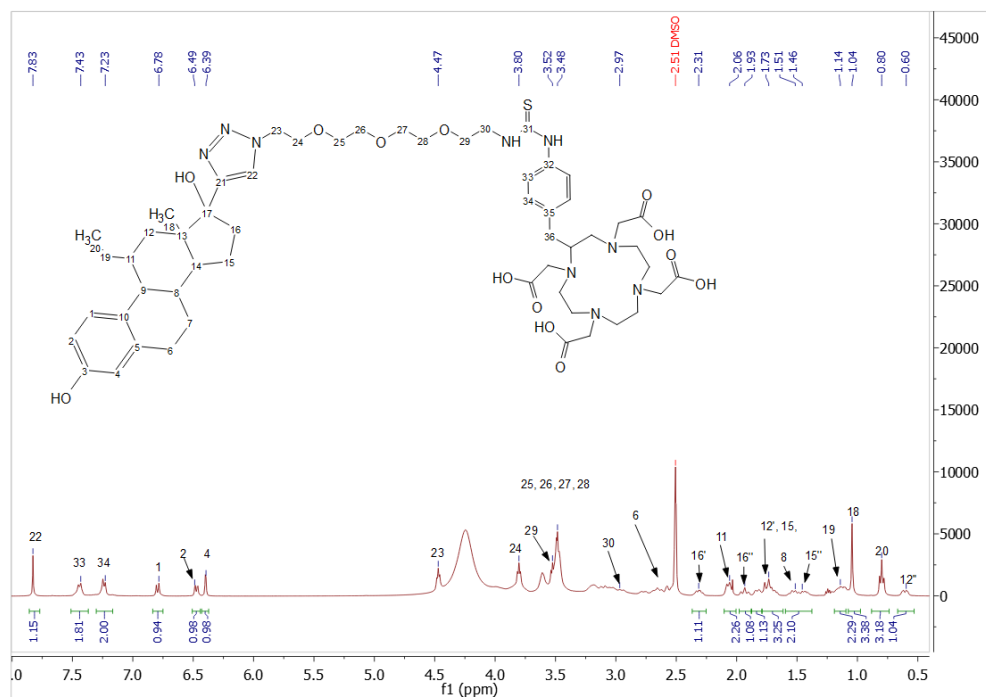
¹H-NMR



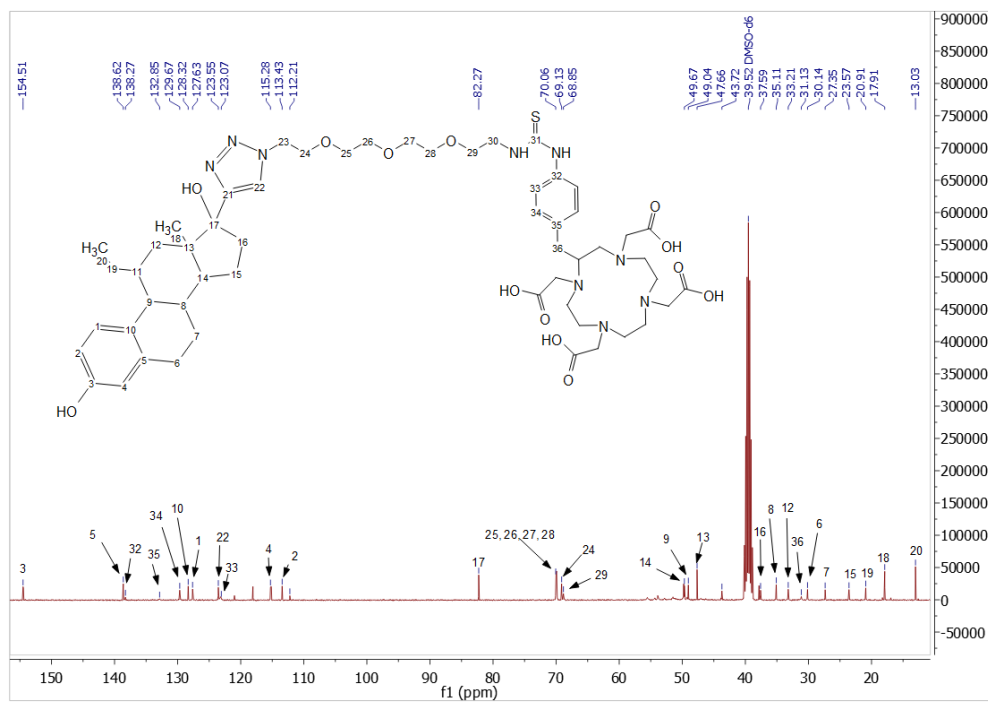
¹³C-NMR



EesPD
¹H-NMR

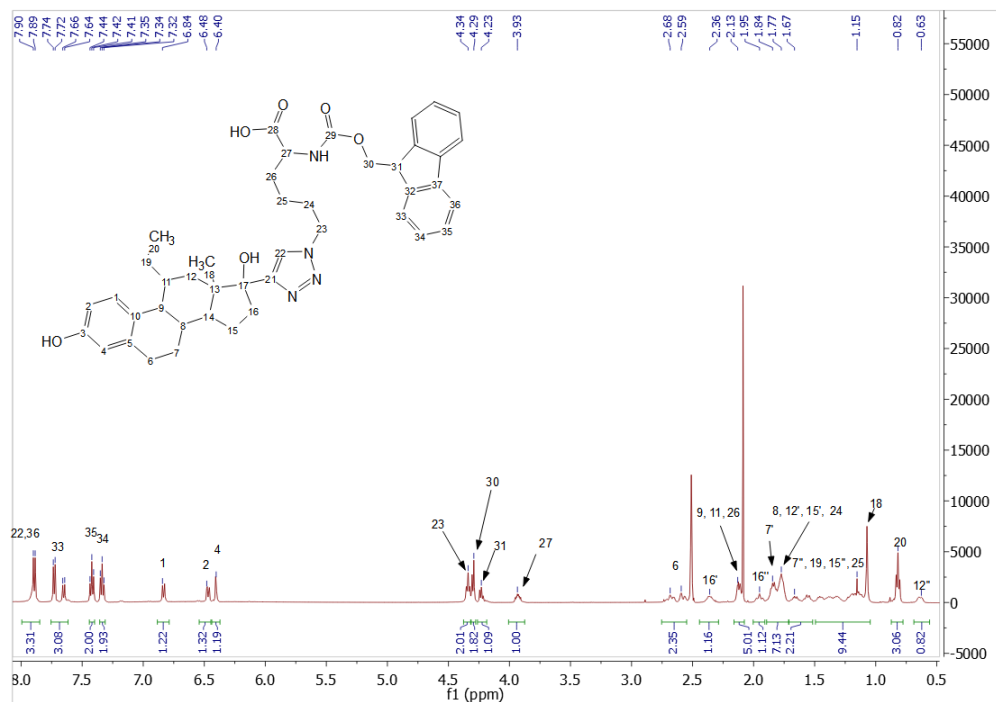


¹³C-NMR

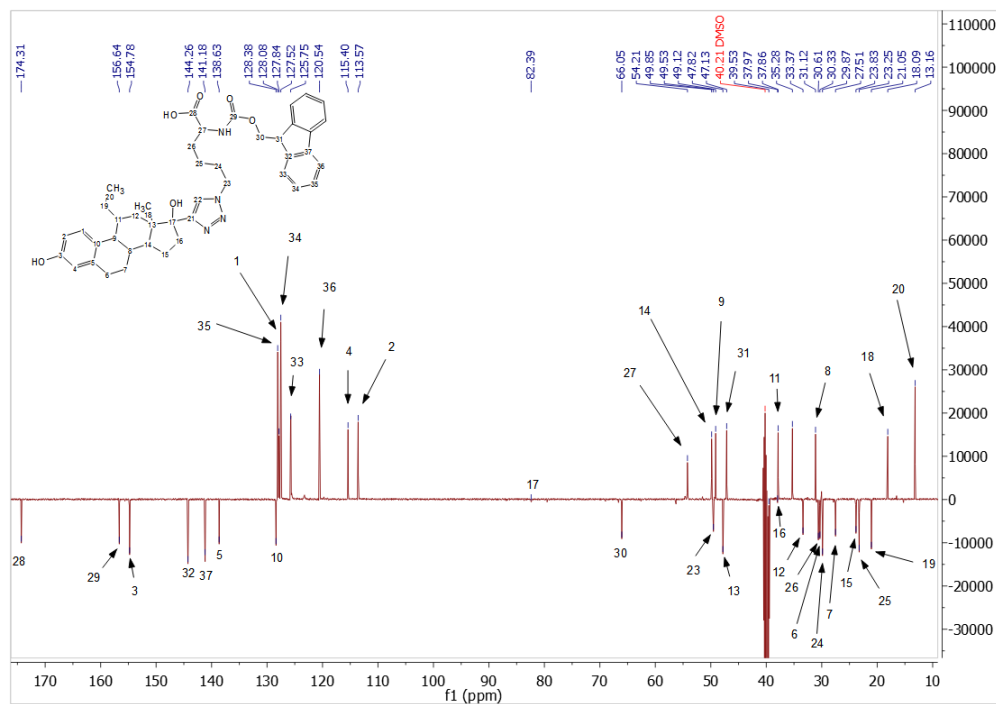


EesFL

¹H-NMR

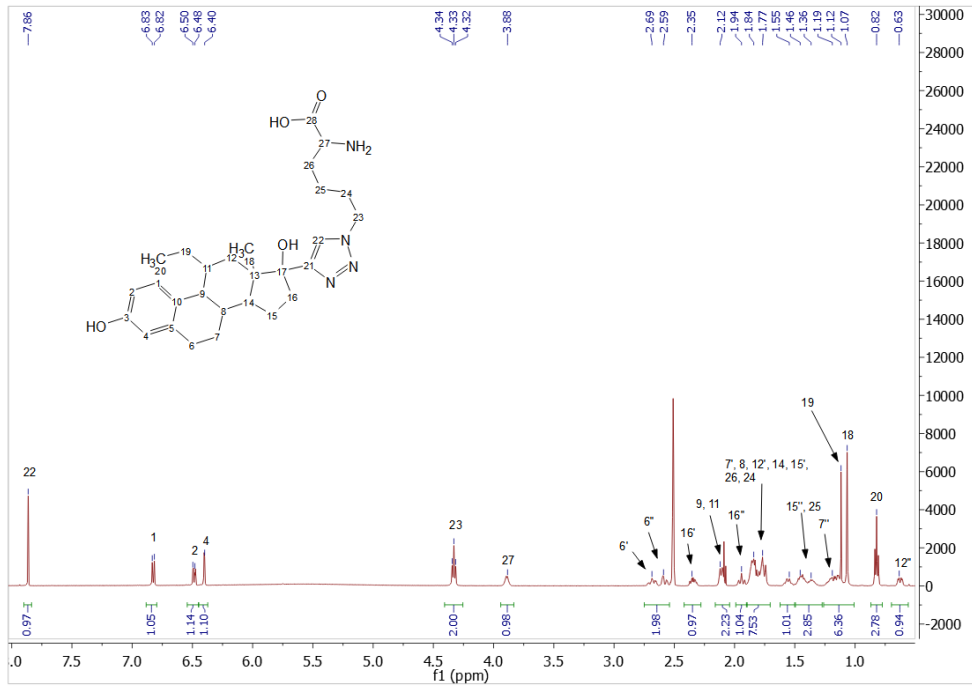


¹³C-NMR

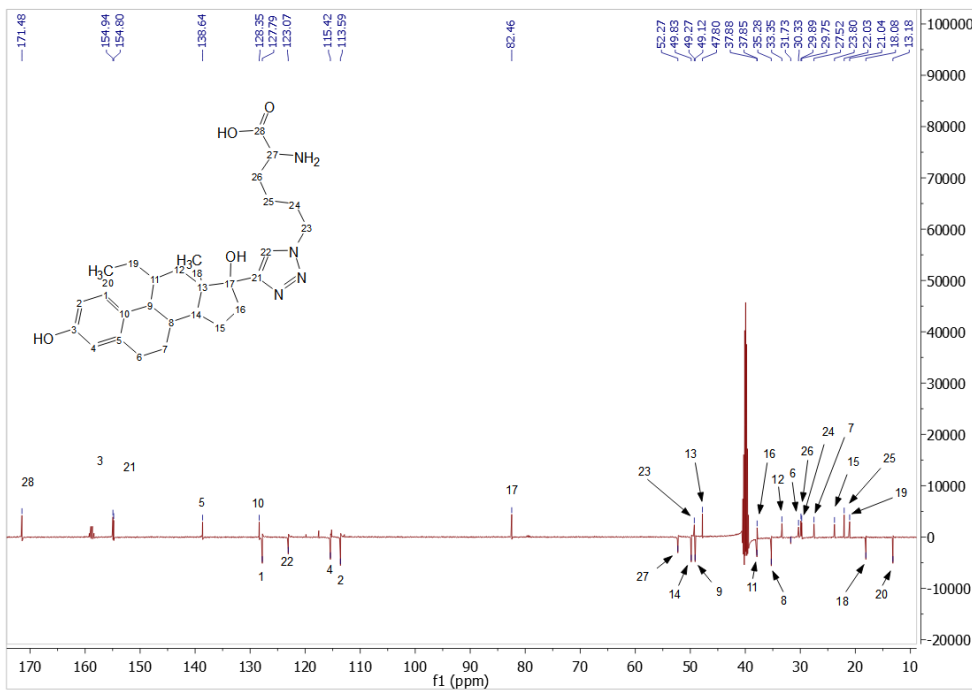


EesL

¹H-NMR

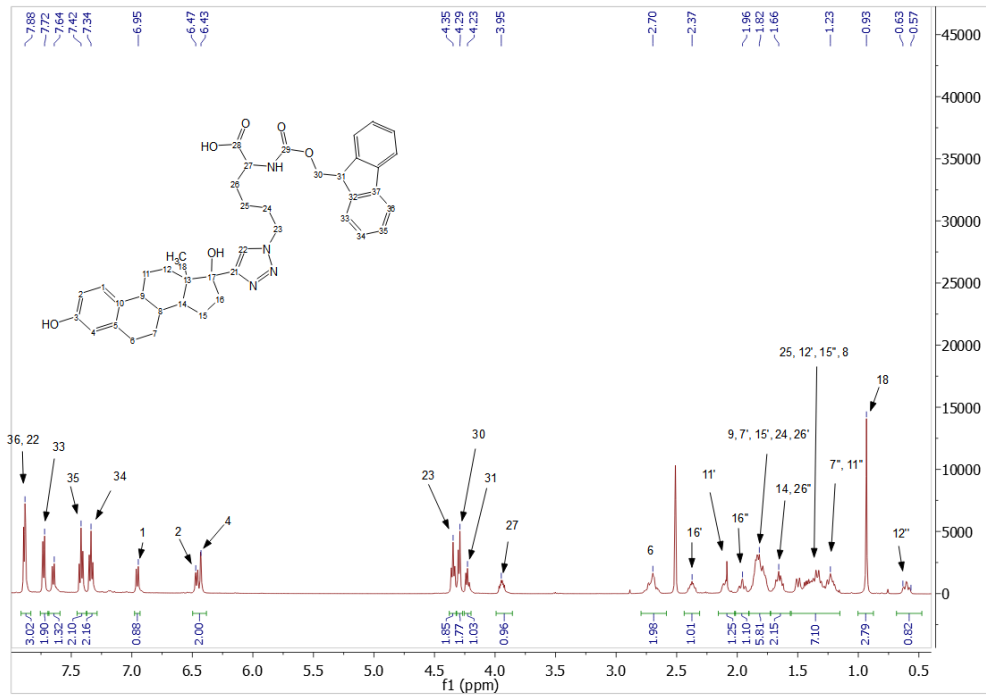


¹³C-NMR

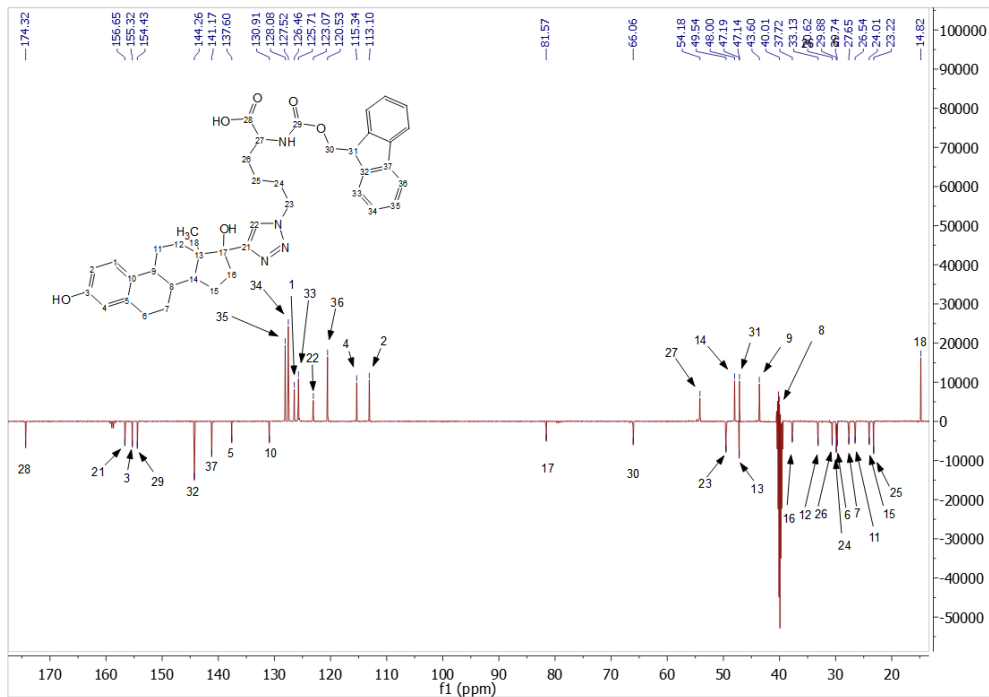


EsFL

¹H-NMR

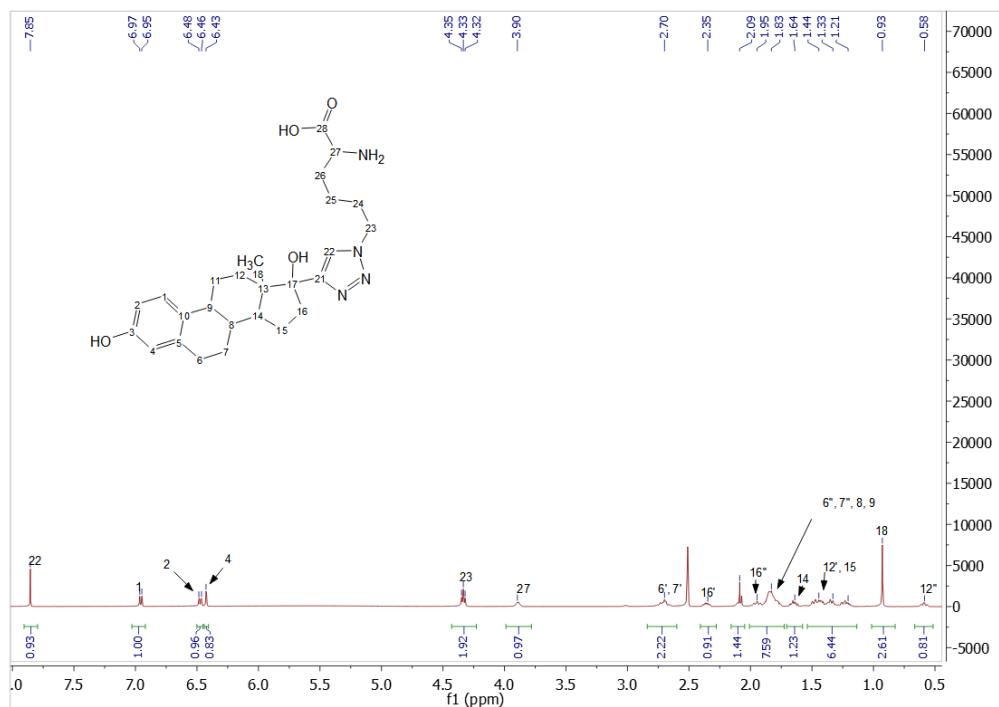


¹³C-NMR

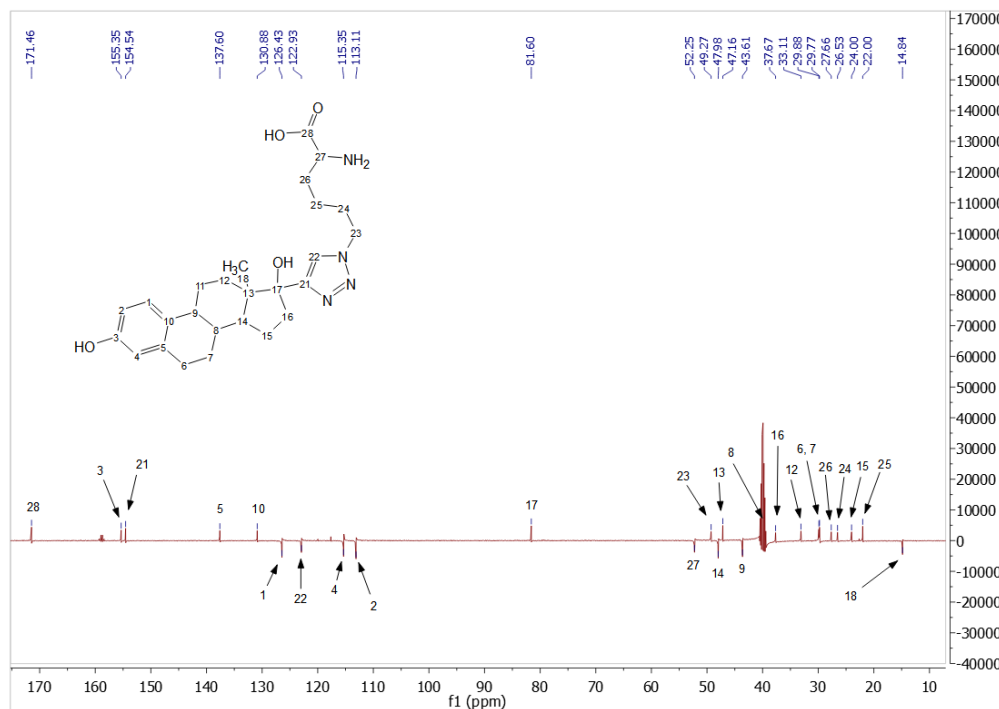


EsL

¹H-NMR



¹³C-NMR



Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Neundorf, Herrn Prof. Dr. Mohr und Herrn Prof. Dr. Schomäcker für die Zeit der Betreuung und für ihre Unterstützung bedanken. Ich bedanke mich besonders für den konstruktiven Austausch und die hilfreichen Ideen, die mir im Zuge der zahlreichen Gespräche stets sehr weitergeholfen haben.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. und Herrn Dr. Isachenko bedanken. Durch sie habe ich viele neue Kontakte knüpfen können, die mir bei der Ausführung meiner Dissertation sehr weitergeholfen haben. Zudem bedanke ich mich dafür, dass sie mir ihre Labore und das Know-how zur Verfügung gestellt haben.

Des Weiteren gilt mein Dank auch Frau Dr. von Brandenstein für die Einarbeitung und der sehr nützlichen Hilfestellung hinsichtlich allem was die Zellkultur betrifft.

Außerdem gebührt mein Dank Dr. Fischer, Frau Zimmermanns und Dr. Pietsch für ihr wertvolles Feedback, die mannigfaltigen Anregungen und die wertvolle Unterstützung in Wort und Tat.

Ich danke auch die Menschen, die mich während dieser Zeit begleitet, aufgemuntert und unterstützt haben, wie Herrn Sahnoun, Herrn Muñoz, Frau Marmann und Frau Feni.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und besonders bei meiner Frau Debora bedanken - für all die Geduld, Verständnis und Beistand über die vielen Stunden, Wochen und Jahre, wo sie mir den Rücken freigehalten haben.

Danke!

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. Ines Neundorf betreut worden.

Ort, Datum

(Feodor Braun)