

# Markierung und Glycosylierung von Peptiden mithilfe der Klick-Chemie: ein allgemeiner Ansatz zur Synthese von $^{18}\text{F}$ -Glycopeptiden, leistungsstarken Tracern für die Positronenemissionstomographie\*\*

Simone Maschauer, Jürgen Einsiedel, Roland Haubner, Carsten Hocke, Matthias Ocker, Harald Hübner, Torsten Kuwert, Peter Gmeiner und Olaf Prante\*

Auf dem Gebiet der molekularen Bildgebung hat sich die Positronenemissionstomographie (PET) zu einer Methode mit exzellenter Empfindlichkeit für In-vivo-Studien entwickelt.<sup>[1]</sup> Die PET-Chemie ist jedoch anspruchsvoll, da sie die Verwendung kurzlebiger Positronenstrahler wie  $^{18}\text{F}$  oder  $^{11}\text{C}$  als Markierungsagentien erfordert.<sup>[2]</sup> Die Optimierung und effiziente Anwendung von schnellen und zuverlässigen Markierungsstrategien sind die Grundvoraussetzungen zur Entwicklung neuer Radiopharmazeutika für die Forschung und für klinische Studien.

Bioaktive Peptide, die molekulare Zielstrukturen in vivo spezifisch erkennen, sind eine wichtige Klasse von PET-Tracern, die die prädiktive Bildgebung und PET-gestützte Therapie verbessern. Unter Verwendung von  $^{18}\text{F}$ -markierten prosthetischen Gruppen wurden verschiedene Strategien für die Synthese von Peptid-Radiopharmazeutika ausgearbeitet, darunter die chemoselektive Oxim-Konjugation<sup>[3]</sup> sowie der Einsatz  $^{18}\text{F}$ -markierter Maleimid-Derivate als Cystein-reaktive Reagentien.<sup>[4,5]</sup> In Anlehnung an das von Sharpless et al.<sup>[6]</sup> eingeführte Konzept der Klick-Chemie wurde die [3+2]-Cycloaddition von Aziden mit Alkinen nach Huisgen auf  $^{18}\text{F}$ -Radiosynthesemethoden übertragen, um die Vorteile ihrer Selektivität, Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit unter wässrig-milden  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -katalysierten Reaktionsbedingungen zu nutzen.<sup>[7]</sup>

Die vielseitige Verwendbarkeit von Peptiden für die Bildgebung ist häufig durch ihre In-vivo-Instabilität limitiert, vor allem wegen des schnellen Abbaus durch endogene Peptidasen. Beispielsweise erfordert die Synthese von radio-

markierten Peptid-Tracern für die Bildgebung des Neurotensin-Rezeptors (NTR-1), der bei einer Vielzahl von humanen Tumoren überexprimiert ist, Modifikationen zur Verbesserung der metabolischen Stabilität des Tracers.<sup>[8]</sup>

Ansätze zur Synthese von RGD-Tracern für das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese spielt, beruhen auf den wegweisenden Arbeiten von Kessler et al., die cyclische pentamere RGD-Peptide entwickelten, die selektiv das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin erkennen.<sup>[9]</sup> Eine Vielzahl radiomarkierter cyclischer RGD-Peptide wurde bereits beschrieben.<sup>[10]</sup> Aus dieser Gruppe wurde [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD<sup>[11]</sup> ausführlich in klinischen Studien untersucht.

Da die Glycosylierung von Peptiden oftmals die Biokinetik und die Clearance-Eigenschaften in vivo verbessert, wurden [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD und weitere Radiopeptide entwickelt.<sup>[12,13]</sup> Die mehrstufige Radiosynthese von [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD ist jedoch zeitintensiv und aufwändig. Als ein Versuch, diese Nachteile zu umgehen, wurde die Markierung mithilfe der 2-Desoxy-2- $^{18}\text{F}$ -fluoroglucose (FDG) diskutiert.<sup>[5,14,15]</sup>

Die Hauptnachteile der bisher genutzten  $^{18}\text{F}$ -Markierungsstrategien für Peptide sind: a) drastische Reaktionsbedingungen, b) aufwändige mehrstufige Synthesen mit eingeschränkter, nicht zerfallskorrigierter radiochemischer Ausbeute (RCA), sodass eine Automatisierung für die Produktion größerer Mengen erschwert wird, und c) die lipophile Derivatisierung, die die biokinetischen Eigenschaften der Tracer beeinträchtigt.

Auf Grundlage unserer vorherigen Arbeiten zur Anwendung von Klick-Reaktionen in der Wirkstoff-Entwicklung<sup>[16]</sup> und der Synthese von  $\beta$ -Mannosylaziden<sup>[15]</sup> präsentieren wir hier eine effiziente Strategie zur  $^{18}\text{F}$ -Markierung unter gleichzeitiger Glycosylierung für die Synthese von  $^{18}\text{F}$ -Glycopeptiden als Radiopharmazeutika für die PET. Wir kombinierten diese Strategie mit der Entwicklung eines metabolisch stabilen Glycopeptoid-Analogons von NT(8–13), dem hochpotenten C-terminalen Hexapeptid des natürlichen Agonisten Neurotensin (NT). Als Nachweis der Anwendbarkeit der Methode wurden zwei  $^{18}\text{F}$ -Glycopeptide, die sich von NT(8–13) oder c(RGDfPra) ableiten, in Studien zur Bioverteilung und Kleintier-PET ( $\mu\text{PET}$ ) für die Bildgebung der NTR- bzw.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in vivo unter Verwendung von Xenotransplantat-Nacktmäusemodellen eingesetzt.

Im Einzelnen konnte 2-Desoxy-2-fluoroglucosylazid (**3**) ausgehend von tetraacetylierter 2-Desoxy-2-fluoroglucose hergestellt werden.<sup>[15]</sup> **3** wurde in einer  $\text{Cu}^{\text{I}}$ -katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition mit einer Serie Alkin-funktionali-

[\*] Dr. S. Maschauer, Dr. C. Hocke, Prof. T. Kuwert, Dr. O. Prante  
Nuklearmedizinische Klinik, Labor für Molekulare Bildgebung  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Schwabachanlage 6, 91054 Erlangen (Deutschland)  
Fax: (+49) 9131-853-4325  
E-Mail: olaf.prante@uk-erlangen.de

Dr. M. Ocker  
Universitätsklinikum Erlangen (Deutschland)

Dr. J. Einsiedel, Dr. H. Hübner, Prof. P. Gmeiner  
Emil Fischer Center, Universität Erlangen-Nürnberg (Deutschland)

Dr. R. Haubner  
Medizinische Universität Innsbruck (Österreich)

[\*\*] Für die finanzielle Unterstützung danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MA 4295/1-1) und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (01EZ0808). Wir danken B. Weigel und der PET Net GmbH für technische Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200904137> zu finden.


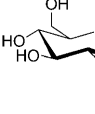

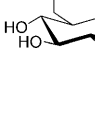

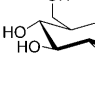
sierter Peptide eingesetzt, um den Einfluss des eingefügten Glycosyl-Restes auf die Rezeptor-Erkennung zu untersuchen. Kommerziell erhältliches Propargylglycin (Pra) wurde durch Festphasensynthese an Position X in die Sequenz des bioaktiven Peptids c(RGDfX) sowie am N-Terminus von NT(8–13) und dessen metabolisch stabilisierten Derivaten eingeführt. Unter Berücksichtigung unserer Studien zum Einfluss von Peptidrückgrat-Modifikationen und der Ligandenkonformation auf Affinitätsänderungen einer Serie von NT(8–13)-Analoge<sup>[17]</sup> wurde die metabolische Stabilisierung durch Modifikation von drei Aminosäuren in der Sequenz von NT(8–13) angestrebt (Tabelle 1). Die Rezeptor-Bindungsstudien an CHO-Zellen, die den humanen NTR-1 stabil exprimieren,<sup>[18]</sup> zeigten, dass die Einführung von Pra am N-Terminus (NT1) keinen signifikanten Einfluss auf die NTR-1-Affinität hat, wogegen  $\beta$ -homotyr in Position 11 (NT2 und NT3) des Peptoid-ähnlichen *N*-(4-Aminobutyl)Gly-Lys(=NLys-Lys)-Derivats die Affinität stark verringert. Der Austausch von Ile gegen Tle an Position 12 und Arg-Arg gegen NLys-Lys (NT4) versprach Erfolg für die Stabilisierung gegenüber Peptidase-katalysiertem Abbau.

Die Ligation von NT1, NT3, NT4 und c(RGDfPra) mit 2-Desoxy-2-fluor- $\beta$ -glucopyranosylazid (**3**) in Gegenwart von CuSO<sub>4</sub> und Natriumascorbat ergab die gewünschten Peptid-Konjugate FGlc-NT1, FGlc-NT3, FGlc-NT4 und FGlc-RGD in Ausbeuten von 80–90 % und Reinheiten von > 98 %. Die Erhaltung der  $\beta$ -anomeren Konfiguration des Glycosylrestes von FGlc-NT1 wurde <sup>19</sup>F-NMR-spektroskopisch nachgewiesen.<sup>[15]</sup>

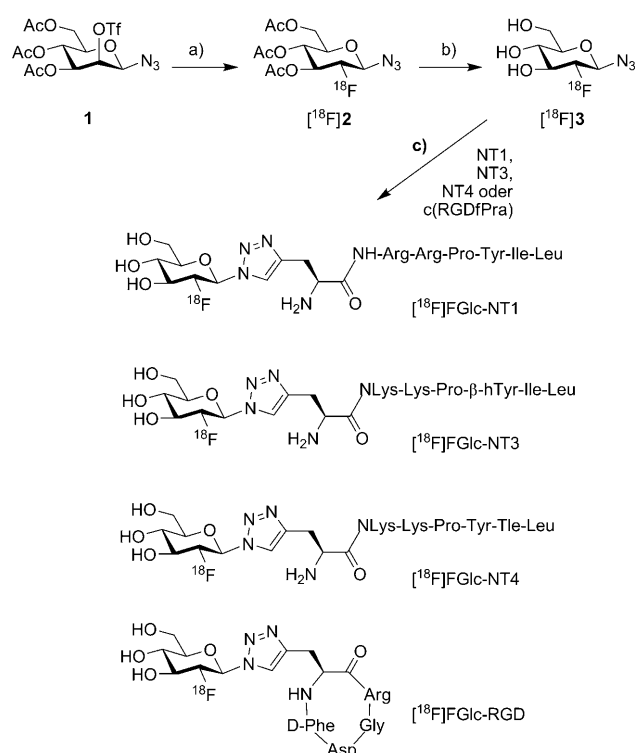
Unseren Liganden-Bindungsexperimenten zufolge waren die glycosylierten NTR-1-Liganden nahezu äquipotent wie die entsprechenden nichtglycosylierten Derivate (Tabelle 1). Insbesondere FGlc-NT4 zeigte eine exzellente Inhibierungskonstante im niedrigen zweistelligen nanomolaren Bereich, sodass für diese Verbindung eine <sup>18</sup>F-Markierung vielversprechend erschien.

Für die Radiosynthese der gewünschten <sup>18</sup>F-markierten Glycopeptide wurde zunächst in einer Kryptat-vermittelten <sup>18</sup>F-gegen-Triflat-Substitution des Mannosyltriflats **1** die prosthetische Gruppe 2-Desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluorglucosylazid ([<sup>18</sup>F]**3**)<sup>[15]</sup> hergestellt, der sich die basische Hydrolyse mit NaOH anschloss (Schema 1). Danach erfolgte im selben Reaktionsgefäß in einer Mischung aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und Ethanol (10:1) bei 60 °C die Glycosylierung, die nur 100  $\mu$ L des Alkin-haltigen Peptids in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L benötigt. Ausgehend von

**Tabelle 1:** Rezeptorbindungsdaten der NT-Analoga im Vergleich zu NT(8–13) als Referenz; ermittelt durch Verdrängung von [<sup>3</sup>H]NT an hNTR-1 exprimierenden CHO-Zellen.<sup>[a]</sup>

Peptid	Sequenz	K <sub>i</sub> [nM]
NT(8–13)	Arg <sup>8</sup> -Arg <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Tyr <sup>11</sup> -Ile <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	0.23 $\pm$ 0.042 <sup>[b]</sup>
NT1	 H <sub>2</sub> N-Arg <sup>8</sup> -Arg <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Tyr <sup>11</sup> -Ile <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	0.29 $\pm$ 0.046 <sup>[b]</sup>
FGlc-NT1	 H <sub>2</sub> N-Arg <sup>8</sup> -Arg <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Tyr <sup>11</sup> -Ile <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	0.32 $\pm$ 0.11 <sup>[c]</sup>
NT2	NLys <sup>8</sup> -Lys <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> - $\beta$ -hTyr <sup>11</sup> -Ile <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	130 $\pm$ 140 <sup>[c]</sup>
NT3	 NLys <sup>8</sup> -Lys <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> - $\beta$ -hTyr <sup>11</sup> -Ile <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	350 $\pm$ 78 <sup>[c]</sup>
FGlc-NT3	 NLys <sup>8</sup> -Lys <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> - $\beta$ -hTyr <sup>11</sup> -Ile <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	400 $\pm$ 21 <sup>[c]</sup>
NT4	 NLys <sup>8</sup> -Lys <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Tyr <sup>11</sup> -Tle <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	5.2 $\pm$ 0.92 <sup>[b]</sup>
FGlc-NT4	 NLys <sup>8</sup> -Lys <sup>9</sup> -Pro <sup>10</sup> -Tyr <sup>11</sup> -Tle <sup>12</sup> -Leu <sup>13</sup>	16 $\pm$ 2.8 <sup>[c]</sup>

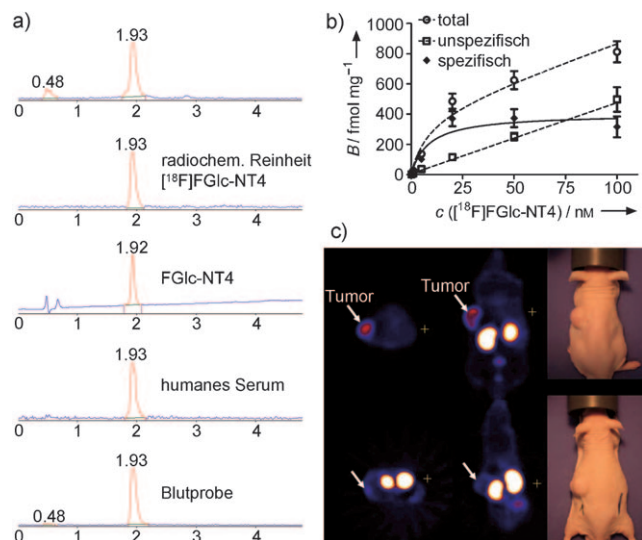
[a] Die K<sub>i</sub>-Werte entsprechen den Mittelwerten aus 2–7 Einzelexperimenten, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. [b] K<sub>i</sub>  $\pm$  Standardfehler (SEM) [nM]. [c] K<sub>i</sub>  $\pm$  SD [nM].



**Schema 1.** a) K<sup>18</sup>F, Kryptofix 2.2.2, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Acetonitril, 2.5 min, 85 °C, 71 % RCA; b) NaOH, 5 min, 60 °C; c) 1. HCl (0.1 M); 2. Alkynylpeptid, PBS (10 % Ethanol), CuSO<sub>4</sub>, Natriumascorbat, 20 min, 60 °C, 70–80 % RCA.

[ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid wurde für diese dreistufige Zweitopfreaktion eine hohe RCA erreicht, sodass die isolierten [ $^{18}\text{F}$ ]Glycopeptide [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT1, [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT3, [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 und [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD in ausgezeichneten Reinheiten, in 17–20% nicht zerfallskorrigierter RCA (bei  $n = 71$  Einzelexperimenten) und mit brauchbaren spezifischen Aktivitäten ( $55\text{--}210\text{ GBq}\mu\text{mol}^{-1}$ ) in einer Gesamtsyntheszeit von 75 min erhalten wurden. Diese neue Methode zur Einführung eines [ $^{18}\text{F}$ ]Glucopyranosid-Markers in Peptide ist zur [ $^{18}\text{F}$ ]Markierung von Peptiden gut geeignet, da sie a) im wässrigen Medium stattfindet, b) hoch chemoselektiv ist, c) zuverlässig hohe RCAs liefert und d) nur niedrige Konzentrationen des Reaktanten benötigt. Die große Zahl von 71 gelungenen Radiosynthesen – ohne einen einzigen Fehlversuch – demonstriert die hohe Zuverlässigkeit der „ $^{18}\text{F}$ -Klick“-Glycosylierung.

Die Stabilität der [ $^{18}\text{F}$ ]markierten NT-Analoga wurde in humanem Serum bei  $37^\circ\text{C}$  überprüft. Im Vergleich zu [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT1, das nach 30 min vollständig abgebaut war (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S2), zeigten die Peptide [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT3 und [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 eine stark erhöhte metabolische Stabilität von  $>90\%$  (Abbildung 1a). Sättigungsexperimente und Internalisierungsstudien mit [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT3 und [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 wurden an NTR exprimierenden HT29-Zellen durchgeführt. Die spezifische Bindung wurde für [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 mit einem  $B_{\text{max}}$ -Wert von  $403\text{ fmol mg}^{-1}$  ( $B$  = Bindung) und einer Dissoziationskonstanten  $K_d$  von  $(8.5 \pm 2.9)\text{ nm}$  nachgewiesen (Abbildung 1b), und die Internalisierungsrate betrug 60–80% nach 30 min. Die In-vitro-Autoradiographie an Hirnschnitten der Ratte

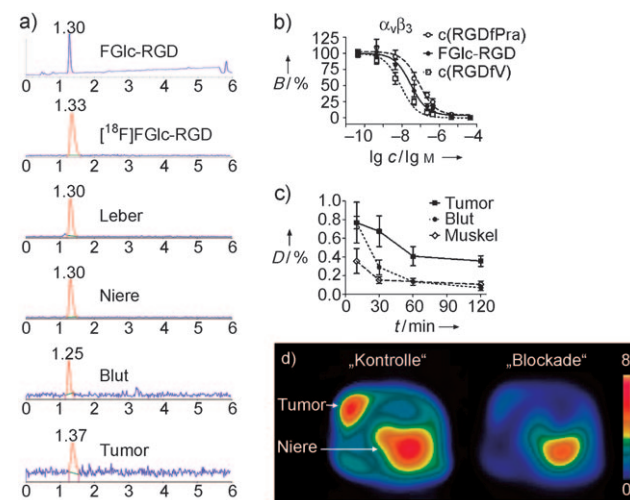


**Abbildung 1.** Reinheit, Stabilität und spezifische Bindung in vitro und  $\mu\text{PET}$ -Bildgebung mit [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4. a) Radio-HPLC für: RCA von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 nach 20 min; radiochemische Reinheit nach HPLC-Isolierung; die Reinheit der Referenzverbindung FGlc-NT4 (UV); die Stabilität von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 in humanem Serum (3 h) und im Blut der Maus (30 min p.i.). b) Sättigungskurve von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 für HT29-Zellen in vitro. c) Statische  $\mu\text{PET}$ -Aufnahmen (links: transaxial, Mitte: coronal) von HT29-Tumor tragenden Nacktmäusen 45–65 min nach Injektion von  $5.7\text{ MBq}$  [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 mit (unten) und ohne Koinjektion von NT4 (oben;  $100\text{ }\mu\text{g/Maus}$ ).

bestätigte die spezifische Bindung von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 in NTR-reichen Arealen, die in Gegenwart von  $1\text{ }\mu\text{M}$  NT vollständig inhibiert wurde (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S6).

Daraufhin wurde die Bioverteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 an HT29-Xenotransplantat-Nacktmäusen bei 10, 30 und 65 min p.i. (= post injectionem) untersucht (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S7). [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 zeigte eine hohe metabolische Stabilität in vivo ( $>98\%$ ; Abbildung 1a), eine schnelle Blut-Clearance, eine hohe Aufnahme in die Nieren und niedrige Aufnahme in andere Organe. Die Aufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 in HT29-Tumoren betrug  $2.0$  bzw.  $1.2\text{ }\text{ID g}^{-1}$  ( $\text{ID}$  = injizierte Dosis) nach 30 bzw. 65 min mit schnell von 1.7 auf 3.5 steigenden Tumor/Blut-Verhältnissen (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S8), sodass ein geeignetes Signal-Hintergrund-Verhältnis für die PET-Bildgebung zu frühen Zeitpunkten nach Injektion nahe liegt. Tatsächlich belegten  $\mu\text{PET}$ -Studien die spezifische Visualisierung der NTR-Expression in vivo mithilfe von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 (Abbildung 1c).

Die Anwendbarkeit unserer sequenziellen Strategie zur [ $^{18}\text{F}$ ]Markierung und Glycosylierung wurde zusätzlich durch die In-vitro- und In-vivo-Daten für [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD unterstrichen. In-vitro-Bindungsexperimente wurden mit dem Disintegrin  $^{125}\text{I}$ -Echistatin in einem Festphasenassay mit immobilisiertem  $\alpha_v\beta_3$  (Abbildung 2b) und an  $\alpha_v\beta_3$  exprimie-



**Abbildung 2.** Reinheit,  $\alpha_v\beta_3$ -Bindung in vitro, metabolische Stabilität in vivo und  $\mu\text{PET}$ -Bildgebung der  $\alpha_v\beta_3$ -Expression mit [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD.

a) Reinheit von FGlc-RGD und [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD sowie HPLC-Analysen der extrahierten Radioaktivität aus Mausorgan-Homogenaten (40 min p.i.). b) Verdrängungskurve von  $^{125}\text{I}$ -Echistatin mit FGlc-RGD, c(RGDfPra) und c(RGDfV). Dargestellt ist der Anteil der an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gebundenen Radioaktivität ( $B$  in %). Abgebildet sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) aus drei Experimenten, jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt. c) Zeit-Aktivitäts-Kurven von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD für Tumor, Blut und Muskelgewebe von U87MG tragenden Nacktmäusen. Die Radioaktivität im Gewebe ist dargestellt als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe ( $D$ , Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3\text{--}6$ ). d)  $\mu\text{PET}$  unter Verwendung von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD (30–40 min p.i.): transaxiale Bilder von U87MG tragenden Mäusen, die mit c(RGDfV) ( $12.5\text{ mg kg}^{-1}$ , „Blockade“) und ohne c(RGDfV) („Kontrolle“) injiziert wurden.



renden humanen U87MG-Glioblastomzellen durchgeführt und bestätigten eine zweistellige nanomolare Affinität von FGlc-RGD für  $\alpha_v\beta_3$  (siehe Hintergrundinformationen, Tabelle S2). Die Experimente zur Bioverteilung von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD in U87MG tragenden Mäusen zeigten eine ähnliche Blut-Clearance wie im Fall von [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD,<sup>[13]</sup> aber eine dreifach erhöhte Aufnahme in Leber und Niere (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S9). Die hohe Leber- und Nierenaufnahme konnte nicht durch Lipophilie-Unterschiede zwischen [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD und [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD erklärt werden, da deren  $\text{lgD}_{7.4}$ -Werte ähnlich waren ( $\text{lgD}_{7.4} = -3.8$  ( $n=3$ ) bzw.  $-3.2$ <sup>[13]</sup>). Die spezifische Tumoraufnahme von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD betrug  $0.49\% \text{ ID g}^{-1}$  (60 min p.i.). Unsere Studien bestätigten die ausgezeichnete metabolische Stabilität von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD in vivo sowie eine schnelle Anreicherung im Tumor in Kombination mit invarianten Tumor/Blut- und Tumor/Muskel-Verhältnissen von 2.3 bzw. 4.4 zu frühen Zeitpunkten von 30 min p.i. (Abbildung 2a,c). Dies ermöglichte die Bildgebung der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in vivo (Abbildung 2d) und verdeutlicht das große Potenzial von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD für die zukünftige Anwendung in PET-Studien.

Unter Anwendung unserer Klick-Chemie-basierten Glycosylierungsmethode für die  $^{18}\text{F}$ -Markierung haben wir die Gesamtausbeute von [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-RGD (20%) und die Gesamtsynthesezeit (70 min) signifikant gegenüber den entsprechenden Werten des klinisch angewendeten [ $^{18}\text{F}$ ]Galacto-RGD (10%, 200 min)<sup>[13]</sup> verbessert. Darüber hinaus haben wir [ $^{18}\text{F}$ ]FGlc-NT4 als ersten Peptoid-Tracer für die Bildgebung der NTR-Expression in vivo mithilfe der PET entwickelt.

Die vorgestellte Prozedur ist gut geeignet für die Automatisierung, da die Entschützung des Zuckers und die Klick-Chemie-basierte Ligation des Peptids in einer Eintopfreaktion stattfinden. Die zuverlässige Zugänglichkeit von  $^{18}\text{F}$ -Glycopeptiden wird die weitere Evaluierung dieser Tracer in longitudinalen  $\mu\text{PET}$ -Studien an Tiermodellen maßgeblich vereinfachen. Zukünftige Forschungsarbeiten werden auf eine Erhöhung der Nieren-Clearance durch Variation des Glycosylrestes der vorgestellten  $^{18}\text{F}$ -Glycopeptide zielen.

Wir erwarten, dass die Ligation von  $^{18}\text{F}$ -markierten Glycosylaziden und Alkin-haltigen Peptiden für eine Vielzahl von Zielpeptiden allgemein anwendbar sein wird und so den Zugang zu einer Serie von  $^{18}\text{F}$ -Glycopeptiden als neuen Radiopharmazeutika mit verbesserter Biokinetik für die experimentelle Forschung und frühe klinische PET-Studien eröffnet wird.

## Experimentelles

Typische Prozedur der  $^{18}\text{F}$ -Markierung von Peptiden unter gleichzeitiger Glycosylierung: Die Mannosylvorstufe **1**<sup>[15]</sup> (9 mg, 15  $\mu\text{mol}$ ) in wasserfreiem Acetonitril (450  $\mu\text{L}$ ) wird zum getrockneten  $\text{K}^+/\text{Kryptofix}2.2.2/^{18}\text{F}^-$ -Komplex gegeben und die Lösung 2.5 min bei  $85^\circ\text{C}$  gerührt. [ $^{18}\text{F}$ ]**2** wird durch semi-präparative HPLC [Kromasil C8, 125  $\times$  8, 4  $\text{mL min}^{-1}$ , Acetonitril (0.1% Trifluoressigsäure (TFA))/Wasser (0.1% TFA) 30:70] isoliert und auf einer C18-Kartusche (Li-chrosorb, Merck, 100 mg) fixiert. Nach Elution mit Ethanol (0.8  $\text{mL}$ ) und Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird eine Lösung von

NaOH (10% Ethanol, 60  $\text{mM}$ , 250  $\mu\text{L}$ ) zugegeben. Nach 5 min bei  $60^\circ\text{C}$  (Entstehung von [ $^{18}\text{F}$ ]**3**) wird mit HCl (0.1  $\text{M}$ , 13.5  $\mu\text{L}$ ) versetzt, gefolgt von einer Lösung des Alkin-funktionalisierten Peptids (100  $\mu\text{g}$ , siehe Hintergrundinformationen) in 250  $\mu\text{L}$  PBS (10% Ethanol), Natriumascorbat (0.6  $\text{mM}$ , 10  $\mu\text{L}$ ) und  $\text{CuSO}_4$  (0.2  $\text{mM}$ , 10  $\mu\text{L}$ ). Nach 20 min bei  $60^\circ\text{C}$  unter Rühren wurden die  $^{18}\text{F}$ -Glycopeptide durch semi-präparative HPLC und anschließende Festphasenextraktion isoliert und für die In-vitro- und In-vivo-Experimente in PBS formuliert.

Eingegangen am 27. Juli 2009

Online veröffentlicht am 22. Dezember 2009

**Stichwörter:** Glycosylierungen · Klick-Chemie · Peptide · Positronenemissionstomographie · Radiopharmazeutika

- [1] S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1501–1516.
- [2] P. W. Miller, N. J. Long, R. Vilar, A. D. Gee, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 9136–9172; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8998–9033.
- [3] T. Poethko, M. Schottelius, G. Thumshirn, U. Hersel, M. Herz, G. Henriksen, H. Kessler, M. Schwaiger, H. J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2004**, 45, 892–902; R. R. Flavell, P. Kothari, M. Bar-Dagan, M. Synan, S. Vallabhajosula, J. M. Friedman, T. W. Muir, G. Cacciarini, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9106–9112.
- [4] T. Toyokuni, J. C. Walsh, A. Dominguez, M. E. Phelps, J. R. Barrio, S. S. Gambhir, N. Satyamurthy, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 1253–1259; B. de Bruin, B. Kuhnast, F. Hinnen, L. Yaouancq, M. Amessou, L. Johannes, A. Samson, R. Boisgard, B. Tavitian, F. Dollé, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 406–420; Z. Cheng, O. P. De Jesus, M. Namavari, A. De, J. Levi, J. M. Webster, R. Zhang, B. Lee, F. A. Syud, S. S. Gambhir, *J. Nucl. Med.* **2008**, 49, 804–813.
- [5] F. Wuest, M. Berndt, R. Bergmann, J. van den Hoff, J. Pietzsch, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1202–1210.
- [6] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.
- [7] J. Marik, J. L. Sutcliffe, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 6681–6684; M. Glaser, E. Arstad, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 989–993; Z.-B. Li, Z. Wu, K. Chen, F. T. Chin, X. Chen, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1987–1994; T. Ramenda, R. Bergmann, F. Wuest, *Lett. Drug Des. Discovery* **2007**, 4, 279–285; T. L. Ross, M. Honer, P. Y. Lam, T. L. Mindt, V. Groehn, R. Schibli, P. A. Schubiger, S. M. Ametamey, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2462–2470; D. Thonon, C. Kech, J. Paris, C. Lemaire, A. Luxen, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 817–823.
- [8] R. M. Myers, J. W. Shearman, M. O. Kitching, A. Ramos-Montoya, D. E. Neal, S. V. Ley, *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4, 503–525.
- [9] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50–54; R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461–7472; T. Weide, A. Modlinger, H. Kessler, *Top. Curr. Chem.* **2007**, 272, 1–50.
- [10] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H. J. Wester, *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 969–980.
- [11] R. Haubner, H. J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, *Cancer Res.* **2001**, 61, 1781–1785.
- [12] E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechante-reiter, R. Haubner, H. J. Wester, M. Schwaiger, G. Holzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2868–2871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2761–2764; M. Schottelius, F. Rau, J. C. Reubi, M. Schwaiger, H. J. Wester, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 429–437.

- [13] R. Haubner, B. Kuhnast, C. Mang, W. A. Weber, H. Kessler, H. J. Wester, M. Schwaiger, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 61–69.
  - [14] S. Maschauer, M. Pischetsrieder, T. Kuwert, O. Prante, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2005**, *48*, 701–719; S. Maschauer, T. Kuwert, O. Prante, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2006**, *49*, 101–108; O. Prante, J. Einsiedel, R. Haubner, P. Gmeiner, H. J. Wester, T. Kuwert, S. Maschauer, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 254–262; O. Prante, K. Hamacher, H. H. Coenen, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2007**, *50*, 55–63; C. Hultsch, M. Schottelius, J. Auernheimer, A. Alke, H. J. Wester, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 1469–1474; M. Namavari, Z. Cheng, R. Zhang, A. De, J. Levi, J. K. Hoerner, S. S. Yaghoubi, F. A. Syud, S. S. Gambhir, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 432–436.
  - [15] S. Maschauer, O. Prante, *Carbohydr. Res.* **2009**, *344*, 753–761.
  - [16] L. Bettinetti, S. Löber, H. Hübner, P. Gmeiner, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 309–316; P. R. Loaiza, S. Löber, H. Hübner, P. Gmeiner, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 252–261; L. Leeb, P. Gmeiner, S. Löber, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1145–1150.
  - [17] J. Einsiedel, H. Hübner, M. Hervet, S. Härterich, S. Koschätzky, P. Gmeiner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2013–2018.
  - [18] S. Härterich, S. Koschätzky, J. Einsiedel, P. Gmeiner, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9359–9368.
-