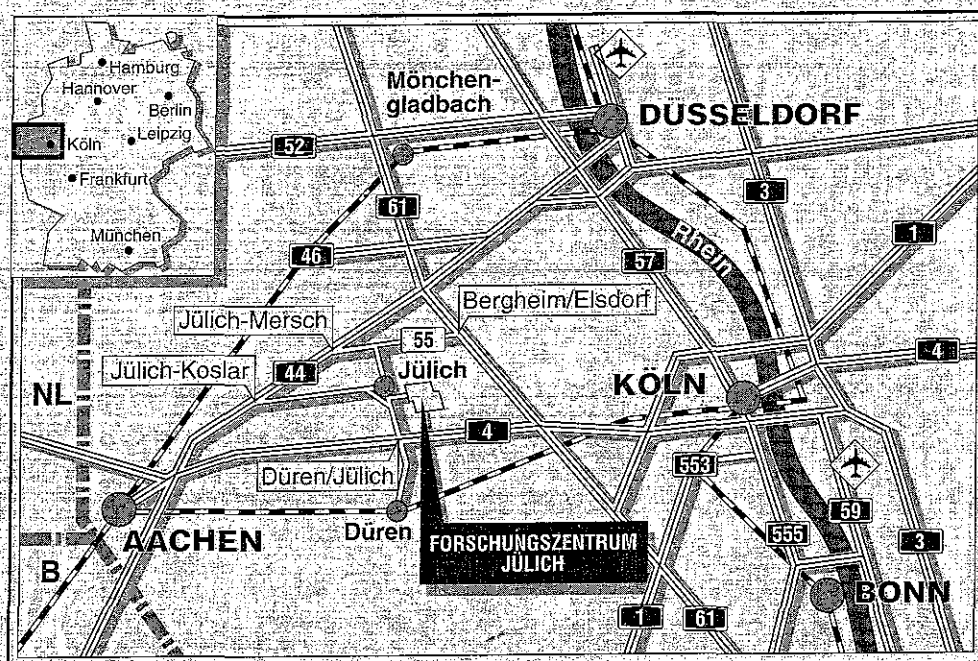


Institut für Nuklearchemie

**Zur praktisch trägerfreien (n.c.a.) Markierung
von Nitroimidazol-Aminosäure-Konjugaten mit
Radioiod zur tomographischen Untersuchung
hypoxischer Zellen**

Harald Henneken



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3162

ISSN 0944-2952

Institut für Nuklearchemie - Jül-3162

D 38 (Diss. Universität Köln)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

**Zur praktisch trägerfreien (n.c.a.) Markierung
von Nitroimidazol-Aminosäure-Konjugaten mit
Radioiod zur tomographischen Untersuchung
hypoxischer Zellen**

Harald Henneken

Abstract

2-Nitroimidazole-derivatives are widely used for the detection of hypoxic cells in tumors, heart and brain. With regard to the non-invasive detection of hypoxic tissue with Single Photon Emission Tomography (SPET) four potential tracers have been synthesized. The following 2-nitroimidazole / amino acid conjugates were synthesized, labelled with radioiodine on the no carrier added (n.c.a.) level and biochemically evaluated:

N-[2-(2-nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-iod-D,L-phenylalanine methylester (**I-P2NI-Me**),

N-[2-(2-nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-iod-D,L-phenylalanine butylamide (**I-P2NI-Ba**),

N-[2-(2-nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-iod- α -methyl-D,L-tyrosine methylester (**I-MT2NI**)

N-[2-(2-nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-iod-O-methyl- α -methyl-D,L-tyrosine methylester (**I-MMT2NI**).

Moreover, the *in vivo* metabolite of **I-P2NI-Me**, N-[2-(2-nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-iod-D,L-phenylalanine (**I-P2NI-S**), was synthesized as a standard and radioiodinated

N.c.a. radioiodination of the phenylalanine derivatives **I-P2NI-Me** and **I-P2NI-Ba** was achieved in >90% radiochemical yield (RCY) via copper(I) assisted radio-iododebromination. The classical method using copper(II) in combination with reducing agents such as stannous sulfate in aqueous acidic medium for the *in situ* formation of copper(I) did not work, because the phenylalanine derivatives are prone to reduction and hydrolysis. The application of Moerlein's reductant- and acid free method (Cu(I)Cl in DMSO) resulted in low RCY.

In order to obtain satisfactory RCY a new, milder copper(I)-system was developed. It consisted of Cu₂SO₄ as the metal salt and DMSO as the preferred reaction solvent. For the optimisation of this system the most important parameters like solvents, reaction temperature, precursor and cuprous sulfate concentrations were examined. The best results for the radioiodination of the phenylalanine derivatives **I-P2NI-Me** and **I-P2NI-Ba** with the new labelling system were obtained with a copper(I) concentration of 2 mM and the addition of equimolar amounts of citric acid or 2,5-dihydroxyterephthalic acid at 140°C. After 3-4h at this temperature a RCY of >90% was obtained. Thus, compared to known labelling systems using copper(I) the new Cu₂SO₄/DMSO system represents a mild and efficient system for the labelling of reduction and hydrolysis sensitive compounds.

The reaction mechanism involving a complex-like transition state was also shown for this system.

The tyrosine derivative **MT2NI** was radioiodinated by the well known direct electrophilic iodination. First labelling of the poorly water soluble precursor in organic solvents was investigated. Various oxidants like chloramin-T, dichloramin-T and iodogen were used for the formation of the electrophilic radioiodine species. Using organic solvents only modest RCY were obtained and the product was accompanied by considerable amounts of by-products.

Changing the reaction solvent to an aqueous ethanolic buffer system in combination with the water soluble oxidant chloramin-B gave rise to considerably better results. Due to the low precursor concentrations normally required for electrophilic radioiodination in buffer systems, optimal ethanol

concentrations were found to be about 10 %. The main parameters like concentrations of precursor, oxidant and ethanol and the pH-range were investigated. Under optimized conditions RCY of 85-90% after 5min reaction time at room temperature were obtained. This labelling procedure offers a possibility for a kit-preparation of this compound.

Due to the α -methyl group of I-MT2NI both the radiolabel and the methylester function proved to be stable *in vivo*.

N.c.a. [^{131}I]I-MMT2NI, the methyl ether of I-MT2NI, was synthesized by the selective methylation of n.c.a. [^{131}I]I-MT2NI using trimethylsilyldiazomethane in methanol-hexane-acetonitrile mixtures. In this reaction the methanol concentration was the most important parameter. After optimisation a RCY of about 90% was obtained within 20 min at room temperature. This is the first example for the use of trimethylsilyldiazomethane for a methylation under n.c.a. conditions.

This simple two step reaction sequence permits the preparation of the desired n.c.a. radioiodinated product in a 65-75% overall RCY within 60-70 min synthesis time. The RCY is 10-20% higher than that obtained with the direct trifluoroacetic acid mediated radioiodination of the appropriate anisole derivative.

Inhaltsverzeichnis

Seite

<u>1. Einleitung</u>	1
1.1 Radionuklide zur radioaktiven Markierung	1
1.2 Emissions-Tomographie	3
1.2.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	3
1.2.2 Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (SPET)	4
1.3 Bedeutung von Radioiod in den Lebenswissenschaften	5
1.4 Herstellung der Radioiodisotope	6
1.4.1 [^{123}I]Iod	6
1.4.2 [^{125}I]Iod	8
1.4.3 [^{131}I]Iod	8
1.5 Chemische und kinetische Aspekte von Reaktionen trägerfreier (n.c.a.) Radionuklide	10
1.6 Methoden zur Radioiodierung organischer Moleküle	13
1.6.1 Direkte elektrophile Substitution	13
1.6.2 Elektrophile Demetallierungsreaktionen	16
1.6.3 Nukleophile Substitution und Cu(I)-Katalyse	17
1.6.4 Radioiodierung durch Ioddiazonierung	19
1.7 Entwicklung neuer Radiotracer	19
1.7.1 <i>In Vivo</i> Stabilität und Synthese von organischen Iodverbindungen	20
1.7.2 Markierungsteile für organische Moleküle	20
1.7.3 Markierung von D,L-Aminosäuren	21
1.8 Hypoxische Zellen in der Tumorthherapie	23
1.9 Nitroimidazole	24
1.9.1 Reduktion und Anreicherungsmechanismus	26
1.9.2 Neuere Entwicklung von Hypoxietracern	29
1.9.3 Nitroimidazole als Hypoxietracer in der nuklearmedizinischen Diagnostik	32
<u>2. Problemstellung</u>	40

3. Ergebnisse und Diskussion	41
3.1 Theoretischer Ansatz zur Syntheseplanung der Nitroimidazoltracer	41
3.2 Aminosäurekonjugate des 2-Nitroimidazols	42
3.3 N-(2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl)-p-iod-D,L-phenylalaninmethylester (I-P2NI-Me)	44
3.3.1 Synthesestrategien zur Radioiodierung	44
3.3.2 Synthese von Br-P2NI-Me und I-P2NI-Me	45
3.4 Cu(I)-katalysierte Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me	46
3.4.1 Radioiodierung von Br-P2NI-Me mit CuCl	47
3.4.1.1 Temperaturabhängigkeit	48
3.4.1.2 Kinetik der Reaktion	49
3.4.1.3 RCA in Abhängigkeit von der CuCl Konzentration	50
3.4.2 Markierung mit CuBr und CuCN als Katalysator	51
3.4.2.1 Temperaturabhängigkeit	52
3.4.2.2 Kinetik der Reaktion	52
3.4.3 Markierung mit Cu ₂ SO ₄	54
3.4.3.1 Kinetik der Reaktion	55
3.4.3.2 Temperaturabhängigkeit	56
3.4.3.3 RCA in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration	56
3.4.3.4 RCA in Abhängigkeit von der Cu ₂ SO ₄ Konzentration	58
3.4.3.5 Luft- und Wasserempfindlichkeit	59
3.4.3.6 Einfluß des Lösungsmittels	60
3.4.4 Untersuchung des Cu ₂ SO ₄ /DMSO Systems mit weiteren Zusätzen	62
3.4.4.1 Zusatz von Carbonsäuren und Komplexbildnern	63
3.4.4.2 Zusatz von Reduktionsmitteln	66
3.4.4.3 Weitere Cu(I)-Komplexe zur Radioioddebromierung	68
3.4.5 Zusammenfassender Vergleich der Cu(I)-Markierungssysteme	68
3.5 Optimierte Darstellung und Reinigung von ¹³¹I-P2NI-Me	69
3.5.1 Synthese der Radioiodverbindung: ¹³¹ I-P2NI-Me	69
3.5.2 Aufarbeitung und Formulierung von ¹³¹ I-P2NI-Me	70
3.6 N-(2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl)-p-[¹³¹I]iod-D,L-phenylalanin (¹³¹I-P2NI-S)	71
3.6.1 Synthese der Radioiodverbindung: ¹³¹ I-P2NI-S	71
3.6.2 Aufarbeitung und Formulierung von ¹³¹ I-P2NI-S	73

3.7 N-(2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl)-p-iod-D,L-phenylalaninbutylamid (I-P2NI-Ba)	74
3.7.1 Radioiodierung von Br-P2NI-Ba	74
3.7.1.1 Kinetik und Vorläuferkonzentration	75
3.7.1.2 Gegenüberstellung der Markierung von Br-P2NI-Me und Br-P2NI-Ba	75
3.7.2 Aufarbeitung und Formulierung von ¹³¹ I-P2NI-Ba	77
3.8 N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-iod-α-methyl-D,L-tyrosinmethylester (I-MT2NI)	78
3.8.1 Synthese des Vorläufers MT2NI und der Standardverbindung I-MT2NI	78
3.8.2 Direkte elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI	80
3.8.2.1 Markierung in organischen Lösungsmitteln	80
3.8.2.2 Reaktionskinetik	81
3.8.2.3 Abhängigkeit vom pH-Wert	82
3.8.2.4 Oxidationsmittelkonzentration	85
3.8.2.5 Vorläuferkonzentration	88
3.8.3 Zusammenfassender Vergleich der Oxidationsmittel	88
3.8.4 Optimierte Radiosynthese und Aufarbeitung von ¹³¹ I-MT2NI	89
3.9 Vergleich der Markierungsmethoden: Elektrophil/Cu(I)-Nukleophil	90
3.10 N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-iod-O-methyl-α-methyl-D,L-tyrosinmethylester (I-MMT2NI)	92
3.10.1 Methylierung von n.c.a.- ¹³¹ I-MT2NI mit Trimethylsilyldiazomethan (TMS-DA)	93
3.10.1.1 Kinetik der Reaktion	93
3.10.1.2 Trimethylsilyldiazomethan-Konzentration	94
3.10.1.3 Methanol Konzentration	95
3.10.1.4 Wasserempfindlichkeit	96
3.10.2 Optimale Radiosynthese und Aufarbeitung von ¹³¹ I-MMT2NI	97
<u>4. Pharmakokinetik und Metabolitenanalyse</u>	98
4.1 Vergleich der pharmakokinetischen Eigenschaften	99
4.2 Blut- und Urinuntersuchungen	103

5. Experimenteller Teil	106
5.1 Chemikalien und Geräte	106
5.2 Synthese von Standardverbindungen und Markierungsvorläufern	109
5.2.1 Nitroimidazolderivate des Phenylalanins	109
5.2.1.1 Darstellung von I/Br-P2NI-Me	109
5.2.1.2 Darstellung von I-P2NI-S	110
5.2.1.3 Darstellung von Br/I-P2NI-Ba	111
5.2.2 Darstellung und Reinigung der Kupferkatalysatoren	111
5.2.3 Darstellung der Tyrosinderivate	112
5.3 Radiosynthesen	114
5.3.1 Radiosynthesen mit Cu(I)-Verbindungen als Katalysator	114
5.3.2 Radiosynthese von ^{131}I -P2NI-Me	114
5.3.3 Radiosynthese von ^{131}I -P2NI-S	115
5.3.4 Radiosynthese von ^{131}I -P2NI-Ba	115
5.3.5 Radiosynthese von ^{131}I -MT2NI	116
5.3.6 Radiosynthese von ^{131}I -MMT2NI	116
5.4 Analytische Verfahren	117
5.4.1 Radio-HPLC und Produktidentifizierung	117
5.4.2 Blut- und Urinuntersuchungen	118
5.4.3 Radiodünnschichtchromatographie	119
5.4.4 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Radioprodukte	120
5.4.5 Bestimmung der radiochemischen Reinheit	122
5.4.6 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	122
5.4.7 Tierexperimente	123
6. Zusammenfassung	124
7. Literaturverzeichnis	127
Anhang	142
Abkürzungsverzeichnis	142
Pharmakokinetiken der Organverteilung der untersuchten Radiotracer in der Maus	143

1. Einleitung

1.1 Radionuklide zur radioaktiven Markierung

Die Kernchemie ist eine relativ junge Wissenschaft, die erst in den Anfängen unseres Jahrhunderts entstand. Kurz nach der Entdeckung und Erforschung der Radioaktivität durch Bequerel, den Curies und Rutherford wurde der Einsatz von radioaktiven Isotopen in den Lebenswissenschaften von dem Chemiker Georg von Hevesy erprobt.

Anfangs waren diese Untersuchungen durch die Verfügbarkeit von ausschließlich natürlichen Isotopen eingeschränkt. Erst mit der Entwicklung des Zyklotrons durch Lawrence und Livingston im Jahre 1930 konnten künstlich erzeugte Zyklotronradionuklide wie [^{24}Na]Natrium, [^{32}P]Phosphor und [^{14}C]Kohlenstoff eingesetzt werden.

Ein weiterer Entwicklungsschub setzte dann mit dem Betrieb von Kernreaktoren ein, die durch den hohen Neutronenfluß eine Vielzahl von künstlichen Reaktornukliden in großen Radioaktivitätsmengen erzeugen konnten. Zu diesen relativ langlebigen β -Strahlern gehören die für die Lebenswissenschaften besonders wichtigen Nuklide [^{14}C]Kohlenstoff, Tritium, [^{32}P]Phosphor und [$^{125}, ^{131}\text{I}$]Iod. Zudem stand mit [^{60}Co]Kobalt eine intensive, transportable γ -Quelle zur Verfügung.

Ab 1960 erfolgte dann eine Rückkehr zu den Zyklotronradionukliden, die den hohen Ansprüchen in den Lebenswissenschaften besser genügten. Hier sind besonders der Aspekt der Nuklidreinheit und die Forderung nach hohen spezifischen Aktivitäten zu nennen.

Obwohl dem Kernchemiker heute grundsätzlich mehr als 1000 künstliche Radionuklide zur Verfügung stehen, sind nur wenige Isotope für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik oder Therapie geeignet. β -Strahler mit nur einem geringen oder niederenergetischen γ -Anteil lassen nur *in vitro* Untersuchungen zu, da sie aufgrund der starken Absorption innerhalb des Körpergewebes außerhalb nicht detektiert werden können. Bei *in vivo* Untersuchungen wird für eine gute Auflösung ein γ -Strahler mit einer dominanten γ -Linie im Energiebereich von 100 bis 300 keV benötigt, da hier die Ansprechwahrscheinlichkeit der verwendeten Detektoren am größten ist. Weitere Einschränkungen sind durch die physikalische Halbwertszeit, die übertragene Strahlendosis, die chemischen Einsatzmöglichkeiten und nicht zuletzt durch die Verfügbarkeit des Radionuklides in genügender chemischer und radiochemischer Reinheit gegeben.

Heute spielen kurzlebige Zyklotronradionuklide eine immer größere Rolle in der diagnostischen Nuklearmedizin. Zum einen ermöglichen kurze Halbwertszeiten eine wiederholte Anwendung in relativ kurzen Intervallen bei geringer Strahlenbelastung des Patienten und eine unproblematische Abfallbeseitigung. Zum anderen erlaubt die allgemein hohe radiochemische Reinheit der Zyklotronnuklide und die damit verbundenen hohen spezifischen Aktivitäten ein Arbeiten mit praktisch gewichtslosen Mengen (n.c.a. = no carrier added), so daß sogar bei der Applikation von toxischen bzw. zentralwirksamen Radiopharmaka nicht mit (negativen) pharmakologischen Effekten wie allergischen, toxikologischen oder immunologischen Reaktionen zu rechnen ist. Auch Störungen des Fließgleichgewichts des untersuchten physiologischen Systems können dadurch ausgeschlossen werden [1-3].

Allerdings ist das Arbeiten mit kurzlebigen Radionukliden in Verbindung mit hohen spezifischen Aktivitäten nicht unproblematisch. Die Darstellung des applizierbaren Radiotracers einschließlich Synthese, Abtrennung, Reinigung und Qualitätskontrolle darf maximal drei Halbwertszeiten in Anspruch nehmen. Je größer der Zeitbedarf der Synthese ist, desto höher sind die erforderlichen Anfangsradioaktivitätsmengen, die das Arbeiten durch die zusätzlich notwendigen Abschirmungen erschweren. Hier wird im allgemeinen ein

automatisiertes Verfahren angestrebt, das in geschlossenen Bleiboxen durchgeführt werden kann. Weiterhin kann die Verfügbarkeit der kurzlebigen Nuklide nur durch deren Produktion in unmittelbarer Nähe zum Anwendungsort oder über geeignete Generatorsysteme garantiert werden. Gleichzeitig ist beim n.c.a.-Arbeiten mit weiteren Problemen, die durch Adsorptionseffekte und Verunreinigungen verursacht werden, zu rechnen (s. u.).

Radionuklide können entweder direkt in ihrer anorganischen Form eingesetzt werden oder aber zur Markierung geeigneter Substanzen dienen. Die Bioverteilung dieser Radiopharmaka wird entweder durch Perfusion und Diffusion und/oder durch spezifische Bindung an Rezeptoren bzw. durch spezifische biochemische Wechselwirkungen bestimmt. Bei der Entwicklung von Tracern für die medizinische Diagnostik und Therapie sind Substanzgruppen gefragt, die mit bestimmten Geweben und Organen diese spezifische Wechselwirkung eingehen. Hier sind im wesentlichen folgende Substanzgruppen von Bedeutung:

- Enzym-Inhibitoren
- Rezeptorbindende Liganden
- Antikörper-Antigen-Systeme
- Stoffwechselsubstrate und deren Analoga

Sie erlauben in Verbindung mit den nicht-invasiven tomographischen Techniken SPET (Single Photon Emission Tomography) und PET (Positron Emission Tomography) eine qualitative und/oder quantitative *in vivo* Bestimmung wichtiger physiologischer Funktionen und Parameter der untersuchten biochemischen Systeme. So können beispielsweise der Metabolismus in Organen und Geweben, die Aktivität von Enzymen und deren regionale Konzentration und das Bindungsverhalten von Rezeptoren untersucht werden. Darüber hinaus sind einige Verbindungen mit speziellen *in vivo* Wechselwirkungen von Bedeutung. Hierzu gehören beispielsweise die Nitroimidazole, die sich über einen Redoxmechanismus gezielt in hypoxischem Gewebe anreichern.

Bei der radioaktiven Markierung solcher Verbindungen ist die Auswahl an geeigneten "typischen organischen" Radionukliden wie Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff, deren Einsatz zu unveränderten Biomolekülen führt, durch ihre kurzen Halbwertszeiten begrenzt (s. u. Tab. 1.1-2). Bei der Markierung mit allen anderen Radionukliden erhält man durch Fremdmarkierung nur "Analogtracer". Hier wird bei dem Ersatz von Atomen bzw. Atomgruppen nach dem Struktur-Analogie-Prinzip vorgegangen, so daß aufgrund des ähnlichen Raumbedarfs der ausgetauschten Gruppen sterische Unterschiede weitgehend minimal gehalten oder vernachlässigt werden können (Tab. 1.1-1).

Tab. 1.1-1 Strukturanaloga einiger Radionuklide

Radionuklid	Strukturanaloga
F	H, OH
Br, I	CH ₃
Se	S (auch chemisch ähnlich)

Dennoch sind infolge der unterschiedlichen Ladungsverteilung häufig gravierende Veränderungen der chemischen, physikalischen und physiologischen Eigenschaften des Zielmoleküls zu beobachten. Dieser Aspekt muß vor jeder Anwendung von Analogtracern grundsätzlich berücksichtigt werden. Es können sich jedoch unter Ausnutzung der veränderten Eigenschaften des Tracers durchaus experimentelle Vorteile ergeben (z.B. 2-[¹⁸F]Fluordesoxyglucose, FDG).

Die meisten zur diagnostischen Anwendung geeigneten Radioisotope sind Metalle wie beispielsweise [^{99m}Tc]Technetium, [^{111}In]Indium, [$^{67/68}\text{Ga}$]Gallium und [^{86}Y]Yttrium. Der erfolgreiche Einsatz dieser Metalle in der Diagnostik und Therapie erfordert unter anderem eine hohe *in vivo* Stabilität der Verbindungen [4]. Da diese keine stabilen Kohlenstoffbindungen ausbilden, können sie nur dann angewandt werden, wenn innerhalb der Moleküle Koordinationsmöglichkeiten vorhanden sind, die zu hohen Komplexstabilitäten führen und damit eine *in vivo* Freisetzung des metallischen Radionuklides ausschließen [5].

Weiterhin muß beim Einsatz von Radiotracern neben der *in vivo* Charakteristik des Radiopharmakons auch dessen Metabolismus und das *in vivo* Verhalten der Metabolite bestimmt werden, da durch die eingesetzten diagnostischen Verfahren nicht zwischen den individuellen chemischen Formen des Radiotracers unterschieden werden kann.

Durch die Markierung von Biomolekülen mit Radionukliden und den gleichzeitigen Einsatz bildgebender Verfahren werden nicht nur in der medizinischen Diagnostik neue Wege eröffnet. Anders als bei anderen tomographischen Verfahren wie der Computertomographie, dem Ultraschall oder der Kernspintomographie, die die Morphologie darstellen, ermöglichen SPET und PET auch die Untersuchung und damit ein tieferes Verständnis von *in vivo* Vorgängen auf molekularer Ebene.

1.2 Emissions-Tomographie

1.2.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Ein interessantes Gebiet, das zunehmend an Bedeutung gewinnt, stellt der Einsatz von Positronenstrahlern (β^+ -Strahlern) zur Markierung von Radiotracern dar [1,3]. Nachdem das ausgesandte Positron seine hohe kinetische Energie abgegeben hat, rekombiniert es als Antiteilchen mit einem Elektron unter Aussendung der entsprechenden Vernichtungsstrahlung. Diese sogenannte Annihilationsstrahlung besteht zum größten Teil aus zwei γ -Quanten mit einer Energie von je 511 keV (entsprechend der Ruhemasse eines Elektrons), die unter einem Winkel von etwa 180° abgestrahlt werden.

Bei der PET, der wichtigsten Anwendung in den Lebenswissenschaften, wird dieser Effekt durch die gleichzeitige Messung der Vernichtungsquanten zur Erfassung der zeitlichen und räumlichen Konzentration von β^+ -markierten Substanzen *in vivo* ausgenutzt [6]. Hierbei kann durch die ringförmige Anordnung einer großen Anzahl von NaI(Tl)- bzw. BGO-Detektoren, von denen je zwei gegenüberliegende in Koinzidenz geschaltet sind, und durch den Einsatz leistungsfähiger computergestützter Tomographen eine Auflösung von etwa 4×6 mm erreicht werden [2]. Die PET-Technik erlaubt eine nicht-invasive Funktionsdiagnostik durch *in vivo* Erfassung biologischer Prozesse mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Damit können durch den Einsatz geeigneter Tracer Stoffwechselvorgänge auch unter physiologischen Gleichgewichtsbedingungen exakt erfaßt und quantifiziert werden. In Tab. 1.2-1 sind die wichtigsten Positronenstrahler aufgeführt.

Bei der Handhabung von Positronenstrahlern, deren Halbwertszeiten im 10-Minutenbereich liegen, gelten die unter 1.1 genannten Probleme im besonderen Maße. Deren Verfügbarkeit erfordert den kostspieligen Betrieb eines "in house"-Zyklotrons, da die erzeugten Aktivitäten begrenzt sind, und damit ein Transport aus Zeitgründen auszuschließen ist.

Tab. 1.2-1 Wichtige Positronenstrahler zur Markierung von PET-Radiopharmaka [7]

Nuklid	T _{1/2} [min]	Zerfallsart (%)	E _β max [keV] (rel.%)	Haupt - γ-Linie [keV] (% Häufigkeit)
¹¹ C	20,3	β ⁺ (99,8), EC (0,2)	960 (100)	511 (199,6)
¹³ N	9,96	β ⁺ (100)	1190 (100)	511 (200)
¹⁵ O	2,03	β ⁺ (99,9), EC (0,1)	1723 (100)	511 (200)
¹⁸ F	109,7	β ⁺ (96,9), EC (3,1)	635 (100)	511 (193,8)
⁷⁵ Br	96,0	β ⁺ (75,5), EC (24,5)	1750 (82)	511 (151), 286 (91,6)
⁷⁶ Br	16,7 h	β ⁺ (66,5), EC (33,5)	3600 (62)	511 (133), 559, 657
⁷³ Se	7,1 h	β ⁺ (65), EC (35)	1320 (91,3)	511 (130), 361 (97,1), 67 (71)
⁸⁶ Y	14,7 h	β ⁺ (34), EC (66)	1200	511 (68), 1077 (82,5), 628
⁶⁸ Ga	68,3	β ⁺ (88), EC (12)	1900	511 (176), 1077 (3)

1.2.2 Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (SPET)

Bei dieser Technik werden üblicherweise Radionuklide mit einer dominanten γ-Linie im Bereich von 100-300 keV eingesetzt. Mit der Hilfe von um die Körperachse des Patienten rotierenden γ-Kameras werden Schichtaufnahmen erhalten. Aufgrund der räumlich statistisch emittierten γ-Strahlung müssen die Kameras mit einem Kollimator ausgestattet sein. Die so ermittelten Meßpunkte (Aktivität in Abhängigkeit von der Kameraposition) können mittels bildgebender Programme und geeigneter Computer zu Bildern verarbeitet werden, bei denen eine Auflösung von 0,8-2 cm erreicht wird. Die erhaltene Bildqualität bei SPET ist, wie auch bei PET, in entscheidendem Maße von der Leistungsfähigkeit der eingesetzten Computer und Programme abhängig. Auch SPET liefert Bilder in räumlicher und zeitlicher Auflösung, wobei man im Vergleich zu PET Bilder mit geringerer Qualität erhält. Hier können durch die nur schwer korrigierbare Schwächung der Strahlung im Körper nur bedingt quantitative Aussagen gemacht werden. Trotz dieser Nachteile von SPET gegenüber PET hat sich dieses Verfahren seinen festen Platz in der Diagnostik erobert. Dies ist hauptsächlich auf die bessere Verfügbarkeit geeigneter γ-Strahler wie ^{99m}Tc, ¹²³I, ²⁰¹Tl und ¹³³Xe und auf die geringeren Kosten einer SPET-Meßstelle zurückzuführen.

In Tab. 1.2-2 sind einige für den diagnostischen Einsatz von SPET relevante Radionuklide aufgeführt. Routinemäßig werden hiervon zur Markierung von Biomolekülen hauptsächlich Technetium und die Halogene eingesetzt. Xenon kann als Edelgas keine Bindungen eingehen und wird daher wie das Thallium als Flow-Tracer verwendet. Alle anderen Metalle spielen, von einigen speziellen Anwendungen abgesehen, bis heute aufgrund ihrer Verfügbarkeit in der Diagnostik nur eine geringe Rolle. Allerdings kann hier in nächster Zeit infolge der starken Entwicklung in den letzten Jahren mit einigen interessanten Anwendungen gerechnet werden [8].

Eine herausragende Position nimmt in diesem Zusammenhang das [^{99m}Tc]Technetium ein, das als "Arbeitspferd" der nuklearmedizinischen Diagnostik angesehen werden kann. Trotz der für Metalle auftretenden Probleme bei der Markierung von Biomolekülen wird bei über 90 % der diagnostischen Untersuchungen Technetium eingesetzt. Diese Entwicklung ist hauptsächlich auf die einfache Verfügbarkeit des ^{99m}Tc durch die ⁹⁹Mo/^{99m}Tc-Generatoren zurückzuführen. Neben der räumlichen Unabhängigkeit von einem Zyklotron garantiert der Generator auch eine einfache und kostengünstige Verfügbarkeit des ^{99m}Tc,

wodurch die Entwicklung von leicht darstellbaren Technetiumtracern, die eine spezifische Anreicherung in verschiedensten Organen zeigen, stark vorangetrieben wurde.

Im chemischen Verhalten ist Technetium ein typisches Metall, das keine Tendenzen zur Ausbildung stabiler Kohlenstoffbindungen aufweist. Daher muß es über Komplexbildung an Biomoleküle gebunden werden [11].

Tab. 1.2-2 Diagnostisch relevante SPET-Nuklide [7,9,10]

Nuklid	T _{1/2}	Zerfallsart (% Häufigkeit)	Haupt - γ -Linie [keV] (% Häufigkeit)
^{99m} Tc	6,02 h	IT (>95)	140 (95)
¹²³ I	13,02 h	EC	159 (83), 529 (1,05)
²⁰¹ Tl	73,1 h	EC	167, 135
⁶⁷ Ga	78,3 h	EC	93 (40), 184 (24), 296 (22)
⁹⁷ Ru	69,2 h	EC	216 (86), 325 (10)
¹¹¹ In	67,9 h	EC	245 (94), 171 (91)

1.3 Bedeutung von Radioiod in den Lebenswissenschaften

Von den mehr als dreißig radioaktiven Isotopen des Iods eignen sich aufgrund ihrer Zerfallseigenschaften nur wenige Nuklide zur Markierung von Tracern. Am häufigsten werden in den Lebenswissenschaften die Isotope ¹²³I, ¹²⁵I und ¹³¹I eingesetzt.

Hierbei ist ¹²³I am besten für *in vivo* Untersuchungen geeignet. Mit einer Halbwertszeit von 13,2 h und einer Haupt- γ -Linie von 159 keV stellt es ein fast ideales SPET-Nuklid dar. Die Halbwertszeit ermöglicht die Durchführung auch komplexer, zeitaufwendiger Synthesen, ohne die Vorteile von kurzlebigen Nukliden wie geringe Strahlenbelastung des Patienten, kurze Intervalle der Untersuchung und unproblematische Abfallentsorgung einzubüßen. Die γ -Energie liegt im Bereich der maximalen Ansprechwahrscheinlichkeit der verwendeten Detektoren und garantiert so eine gute Bildauflösung auch bei relativ geringen Aktivitätsmengen. Der EC-Zerfall zu 100 % garantiert, daß, abgesehen von den Konversions- und Augerelektronen, keine weitere gewebsschädigende Partikelstrahlung emittiert wird [12,13].

¹²⁵I wird aufgrund der schwachen γ -Strahlung (K α) von 35 keV und der langen Halbwertszeit (60 d) hauptsächlich für *in vitro* Untersuchungen eingesetzt. Hier dient es häufig als Ersatz der schwerer detektierbaren, langlebigen Radioisotope ¹⁴C und Tritium, wodurch eine größere Nachweisempfindlichkeit bei geringeren Aktivitätsmengen erreicht wird.

Eine weit verbreitete medizinische Anwendung ist der Radioimmunoassay (RIA). Diese immunologische *in vitro* Methode dient zur quantitativen Bestimmung von Erreger-Antigenen, Enzymen, Hormonen und anderen Biomolekülen im Konzentrationsbereich von pg/ml und beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, kombiniert mit dem Prinzip der Isotopenverdünnungsanalyse. Ein markiertes, in definierter Menge eingesetztes Tracerantigen konkurriert mit dem zu bestimmenden Antigen um einen Unterschub an eingesetzten Antikörpern. Die nach dem Massenwirkungsgesetz gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden vom Antikörper abgetrennt und aus der erhaltenen Aktivitätsverteilung der beiden Fraktionen die zu ermittelnde Antigenmenge bestimmt.

Weiterhin ist die Anwendung des ¹²⁵I im therapeutischen Bereich von Bedeutung. Durch den EC-Zerfall

entstehen eine Vielzahl von niederenergetischen Konversions- und Augerelektronen, die nur eine Reichweite von wenigen Zelldurchmessern aufweisen. Da der lineare Energietransfer (LET) von Elektronen umgekehrt proportional zu ihrer Energie ist, wird die gesamte Zerfallsenergie über die hohe spezifische Ionisation auf wenige Zellen verteilt, was zur punktuellen Zerstörung des Gewebes führt.

Durch den Einsatz geeigneter Tracer [13-15], die sich im Zielgewebe (z.B. Tumor) stark anreichern, ist eine Strahlentherapie möglich, deren Erfolg durch die Akkumulation des Tracers und damit durch die Verfügbarkeit von geeigneten Verbindungen bestimmt wird. Die schon seit langen durchgeführte Schilddrüsenthherapie durch den direkten Einsatz von [^{131}I]Iodid, die auf der Anreicherung von Iodid in der Schilddrüse beruht, ist dafür das beste Beispiel.

^{131}I ist als Reaktornuklid eines der ersten in der Medizin angewandten Radionuklide. In der Medizin spielt es heute, abgesehen von der Radioiodtherapie der Schilddrüse, nur noch eine untergeordnete Rolle und wird in der Diagnostik weitgehend durch andere Radionuklide wie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{123}I , die mit einer geringeren Strahlenbelastung verbunden sind, ersetzt.

Trotzdem ist ^{131}I aus den Lebenswissenschaften im Forschungsbereich nicht wegzudenken. Gerade seine nicht zu kurze Halbwertszeit und seine günstige γ -Energie machen es neben seiner einfachen Verfügbarkeit zum "Arbeitspferd" bei nuklearchemischen Iodierungsexperimenten. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Radioiodierung ausschließlich [^{131}I]Iodid verwendet, das in wäßrig-alkalischer Lösung ohne weitere Zusätze erhältlich ist.

1.4 Herstellung der Radioiodisotope

Hier soll ein Abriss über die kernchemische Darstellung der für die Lebenswissenschaften wichtigsten radioaktiven Iodisotope (^{123}I , ^{125}I , ^{131}I) gegeben werden. Der Schwerpunkt liegt bei dem für diese Arbeit relevanten [^{131}I]Iodid.

Aus den obigen Ausführungen wird deutlich, daß zur Darstellung nur gezielte Kernreaktionen in Frage kommen, die zu relativ leicht abtrennbaren Produkten mit hohen spezifischen Aktivitäten führen. Daher wird beispielsweise die bei ^{131}I grundsätzlich mögliche, aber aufwendige Gewinnung aus dem Spaltmaterial von Kernreaktoren nicht besprochen.

1.4.1 [^{123}I]Iod

^{123}I liegt als Kern mit Neutronenunterschuß in der Nuklidkarte links vom "Tal der Stabilität", weshalb es aus stabilen Nukliden nur durch Kernreaktionen mit beschleunigten, geladenen Teilchen erzeugt werden kann. Bei der Produktion ist man damit auf geeignete Teilchenbeschleuniger angewiesen. Grundsätzlich können bei der Nuklidsynthese zwei Methoden unterschieden werden:

1. direkte Methode: Das Nuklid entsteht als unmittelbares Produkt der Kernreaktion
2. indirekte Methode: Das ^{123}I wird als Tochternuklid aus dem durch die Reaktion erzeugten instabilen Mutternuklid gebildet

In Tab. 1.4-1 sind die wichtigsten Kernreaktionen aufgeführt.

Tab. 1.4-1 Kernreaktionen zur Erzeugung von ^{123}I [16,17]

1. Direkte Methode		2. Indirekte Methode		
Kernreaktion	Teilchenenergie [MeV]	Kernreaktion	$T_{1/2}$ Mutternuklid	Teilchenenergie [MeV]
$^{124}\text{Te} (p, 2n) ^{123}\text{I}$	25 → 20	$^{122}\text{Te} (^4\text{He}, 3n) ^{123}\text{Xe}$	2,08 h	43 → 34
$^{123}\text{Te} (p, n) ^{123}\text{I}$	15 → 9	$^{123}\text{Te} (^3\text{He}, 3n) ^{123}\text{Xe}$	2,08 h	38 → 20
$^{122}\text{Te} (d, n) ^{123}\text{I}$	14 → 6	$^{127}\text{I} (p, 5n) ^{123}\text{Xe}$	2,08 h	160 → 20
$^{121}\text{Sb} (^4\text{He}, 2n) ^{123}\text{I}$	28 → 9	$^{127}\text{I} (d, 6n) ^{123}\text{Xe}$	2,08 h	90 → 45
$^{nat}\text{Sb} (^3\text{He}, xn) ^{123}\text{I}$	26 → 12	$^{124}\text{Xe} (p, 2n) ^{123}\text{Cs}$	5,9 min → ^{123}Xe	40 → 17
		$^{124}\text{Xe} (p, pn) ^{123}\text{Xe}$	2,08 h	44 → 20

1. Direkte Methode

Bei der direkten Methode geht man von verschiedenen Antimon- oder Tellurisotopen aus. Hier ist die vom ^{124}Te ausgehende Kernreaktion am weitesten verbreitet, da Protonen bis 24 MeV schon an einem kleinen Zyklotron erzeugt werden können. Für diese Reaktion liegen umfangreiche Ergebnisse zu Kernreaktionsdaten, Targetpräparation und chemischer Aufarbeitung des Targets vor [18]. Hier sind zwei Verfahren zu nennen, die praktische Bedeutung erlangt haben. Bei dem ersten wird von einem metallischen Tellurtarget ausgegangen, wobei das ^{123}I naßchemisch abgetrennt werden muß. Bei dem zweiten Verfahren dient TeO_2 als Targetmaterial, das eine Abtrennung des ^{123}I über direkte trockene Destillation erlaubt [12]. Alle direkten Methoden führen zu mehr oder weniger großen radionuklidischen Verunreinigungen, vor allem an relativ langlebigem ^{124}I ($t_{1/2}=4,15$ d).

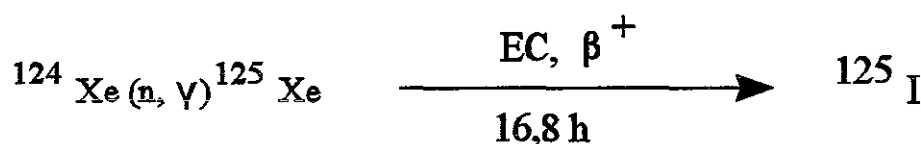
2. Indirekte Methode

Die indirekte Methode bietet die Möglichkeit, entweder von Tellur, Iod oder Xenon auszugehen. In allen Fällen entsteht dabei ^{123}Xe , das durch EC- bzw. β^+ - Zerfall in das gewünschte ^{123}I übergeht. Am weitesten verbreitet sind hier die vom Iod ausgehenden Reaktionen, wobei der $^{127}\text{I}(p, 5n)^{123}\text{Xe}$ Reaktion die größte Bedeutung zukommt. Bei der Produktion wird das gebildete Xenon mittels eines Heliumstroms aus dem Target entfernt und zum Abklingen ausgefroren. Das Tochternuklid ^{123}I kann nach etwa 3 Halbwertszeiten (6 h) des Mutternuklides (87,5 % sind zerfallen) durch Entfernen des Xenons erhalten werden. Bei dieser Vorgehensweise ist das aus dem Nebenreaktionsprodukt ^{125}Xe ($t_{1/2}=16,8$ h) gebildete ^{125}I als Verunreinigung noch zu vernachlässigen. Die indirekten Methoden ermöglichen durch die Nutzung des Generatorprinzips die Darstellung des ^{123}I in hoher radiochemischer und chemischer Reinheit. Allerdings werden im allgemeinen hochenergetische Projektile ($E > 60$ MeV) und damit große Beschleuniger benötigt.

Daher wurde in den letzten Jahren eine weitere Methode entwickelt, bei der von hochangereichertem ^{124}Xe als Targetgas ausgegangen wird. Bei einer Protonenenergie von 30 MeV erhält man neben wenig ^{123}Xe hauptsächlich ^{123}Cs , das mit einer Halbwertszeit von 5,9 Minuten in das gewünschte ^{123}Xe übergeht. Dieses Verfahren vereinigt somit günstige Produktionsbedingungen mit höchster Produktqualität und wurde daher bis zur kommerziellen Anwendung weiterentwickelt [17].

1.4.2 [^{125}I]Iod

Zur Darstellung von ^{125}I wird von natürlichem Xenon ausgegangen, das mit Reaktorneutronen bestrahlt wird. Man erhält unter anderem aus dem ^{124}Xe über eine (n, γ) -Reaktion instabiles ^{125}Xe , das mit einer Halbwertszeit von 16,8 h zu ^{125}I zerfällt.



^{124}Xe ist im natürlichen Xenon nur zu 0,1 % vorhanden, hat aber mit 128 barn einen um den Faktor 50 - 1000 höheren Einfangquerschnitt gegenüber Neutronen als die meisten der anderen natürlichen Isotope. Zur Produktion wird das Xenon unter hohem Druck und mit den hohen Neutronenflußdichten eines Kernreaktors bestrahlt. Dabei sollte die Bestrahlungsdauer nicht länger als 60 Tage sein, da das gebildete ^{125}I aufgrund seines extrem hohen Einfangquerschnitts von 894 barn zum unerwünschten Nebenprodukt ^{126}I ($t_{1/2} = 13 \text{ d}$) weiterreagiert. Entstandene Spuren dieser Verunreinigung können durch Abklingzeiten von einigen Wochen durch Zerfall verringert werden.

Das entstandene Iod wird durch Vakuumdestillation bei niedrigen Temperaturen vom Xenon befreit und nach Reduktion über einer Ionenaustauschersäule aufgereinigt [11].

1.4.3 [^{131}I]Iod

^{131}I befindet sich in der Nuklidkarte rechts vom "Tal der Stabilität" und ist damit ein typisches neutronenreiches Reaktornuklid. Es wird dort sowohl durch Neutroneneinfangreaktionen als auch zu 2,9 % aus den Spaltprodukten der Kernspaltung gebildet.

Aufgrund des hohen Aufwandes ist die Gewinnung von ^{131}I aus Kernbrennstäben auszuschließen. Heute wird dieses Radionuklid hauptsächlich über eine Neutroneneinfangreaktion an ^{130}Te gewonnen. Da bereits das natürliche Tellur zu 33,8 % aus ^{130}Te besteht und gleichzeitig andere, durch Neutroneneinfang entstehende Tellurisotope nur zu stabilen oder sehr langlebigen Iodisotopen führen, ist eine Isotopenanreicherung nicht erforderlich. Je nach Neutronenflußdichte wird das Tellur in Kernreaktoren einige Tage bis Wochen bestrahlt. Bei der Bestrahlung erhält man sowohl ^{131}Te als auch zu etwa 7 % das entsprechende metastabile $^{131\text{m}}\text{Te}$. ^{131}Te bildet mit einer Halbwertszeit von 25 min das gewünschte ^{131}I . Das metastabile $^{131\text{m}}\text{Te}$ zerfällt mit einer Halbwertszeit von 30 h, wobei zum einen zu 82 % direkt das ^{131}I entsteht, zum anderen zu 18 % der Grundzustand (^{131}Te) erhalten wird (s. Zerfallsschema).

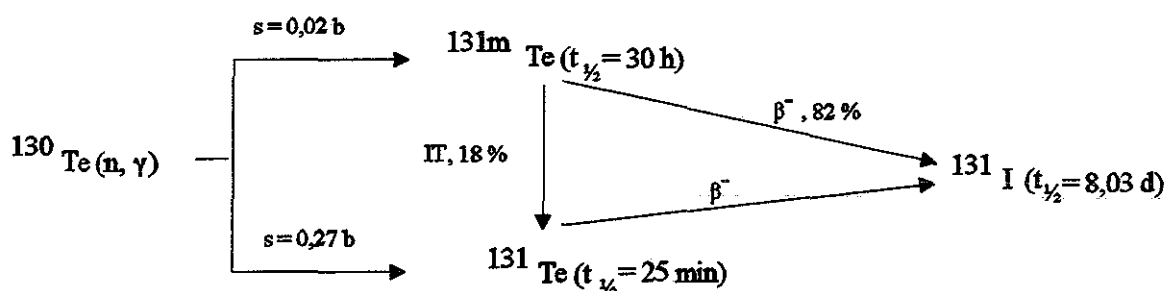


Abb. 1.4-1 Schema zur Produktion von ^{131}I über ^{130}Te

Bei der Abtrennung des ^{131}I aus dem Targetmaterial kann grundsätzlich zwischen 2 Verfahren unterschieden werden, deren Anwendung vom eingesetzten Targetmaterial und vom Hersteller abhängt.

1. Das Targetmaterial wird naßchemisch gelöst und das Iod aus dieser Lösung gewonnen. Hierbei kann das Iod entweder in seiner elementaren Form abdestilliert werden oder als Iodid durch Adsorption an einer Platinelektrode, durch Säulenchromatographie oder durch Solventextraktion abgetrennt werden, wobei Tributylphosphat als Komplexbildner eingesetzt wird.
2. Bei einigen Targetmaterialien wie z.B. Tellurdioxid ist auch eine direkte trockene Destillation des elementaren Iods möglich.

1.5 Chemische und kinetische Aspekte von Reaktionen trägerfreier (n.c.a.) Radionuklide

Ein wichtiger Aspekt bei der Umsetzung mit Radionukliden ist die spezifische Aktivität. Hierbei unterscheidet man grundsätzlich zwischen drei Begriffen:

- geträgert (carrier-added)
- trägerfrei (carrier-free)
- n.c.a. (no carrier added)

Unter "geträgerten" Substanzen versteht man Radionuklide, denen inaktive Isotope (isotoper Träger) zugesetzt werden und die damit nur geringe spezifische Aktivitäten (s. u.) aufweisen. Beim Zusatz von chemisch ähnlichen Verbindungen wie beispielsweise die Verdünnung von ^{131}I Iod mit Brom spricht man von nicht-isotopen Träger. Mit "trägerfrei" ist die völlige Nuklidreinheit des entsprechenden Radionuklides bzw. die Abwesenheit von anderen Isotopen gemeint. Der trägerfreie Zustand ist aufgrund der Allgegenwärtigkeit aller natürlichen Elemente ein Idealzustand, der nur bei rein künstlichen Nukliden wie Technetium oder Astat realisierbar ist. Unter den üblichen n.c.a.-Laborbedingungen arbeitet man ohne Zusatz von isotopen Trägern, wobei sich auch bei sauberster Vorgehensweise das Einschleppen entsprechender Isotope nicht vermeiden läßt. Als Konsequenz hieraus ergibt sich die Tatsache, daß die theoretischen, maximalen spezifischen Aktivitäten in der Praxis nicht erreicht werden [3].

Die spezifische Aktivität A_s ist die auf die Masse m bezogene Aktivität A einer Verbindung:

$$A_s = \frac{A}{m} \quad \left[\frac{\text{Bq}}{\text{g}} \right]$$

A_s = spezifische Aktivität
 A = Radioaktivität
 m = Masse

Gl. 1.5-1

A hängt mit der Zerfallsrate des radioaktiven Nuklides zusammen und ist somit nur von dessen Anzahl und Halbwertszeit abhängig, was aus dem Zeitgesetz hervorgeht, wenn man $t_{1/2} = \ln 2 / \lambda$ berücksichtigt:

$$A = - \frac{dN}{dt} = N\lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} N \quad [\text{Bq}]$$

$t_{1/2}$ = Halbwertszeit [s]
 λ = Zerfallskonstante [s^{-1}]
 N = Anzahl der Atome

Gl. 1.5-2

Die maximale spezifische Aktivität $A_{s,\text{max}}$ erhält man, wenn alle Moleküle radioaktiv markiert sind bzw. ausschließlich Radioisotope vorliegen. Mit der Einführung von molaren Größen ergibt sich dann aus den Gleichungen Gl. 1.5-1 und Gl. 1.5-2:

$$A_{s,\text{max}} = N_A \lambda \quad \left[\frac{\text{Bq}}{\text{mol}} \right]$$

$A_{s,\text{max}}$ = maximale A_s
 N_A = Avogadrosche Konstante
 m = Masse

Gl. 1.5-3

$A_{s,\text{max}}$ ist somit nur von der Halbwertszeit der Verbindung bzw. des Radionuklides abhängig. Sie liegt, je nach Halbwertszeit, in der Größenordnung von $10^8 - 10^{12}$ [GBq/mol] (0,0027-27 [Ci/mol]).

Im allgemeinen können die Produktionsbedingungen am Zyklotron so gewählt werden, daß man n.c.a.-Radionuklide hoher radiochemischer Reinheit erhält. Die dadurch bedingten hohen spezifischen Aktivitäten ermöglichen ein Arbeiten im Subnanomolbereich, so daß grundsätzlich *in vivo* Untersuchungen an einem

ungestörten System möglich sind. Gerade bei Rezeptorstudien sind hohe spezifische Aktivitäten eine wichtige Voraussetzung.

Mit den extrem geringen Stoffmengen der n.c.a.-Radionuklide, in denen diese bei den erhältlichen Verdünnungen von 10^1 - 10^4 und Aktivitäten im mCi-Bereich bei nicht zu langen Halbwertszeiten vorliegen, sind einige wichtige Nebeneffekte verbunden. In der Regel ist ein direktes Übertragen der normalen präparativen, makroskopischen Chemie auf das Arbeiten im n.c.a.-Bereich nur bedingt oder gar nicht möglich. Zum einen ist hier mit Adsorptions- und katalytischen Oberflächeneffekten zu rechnen. Beispielsweise verfügen übliche Glasoberflächen über eine Austauschkapazität von etwa 10^{-10} mol/cm², was die Konzentration des Radiotracers bei weitem übersteigt. Oft können diese Wandverluste durch den Einsatz anderer Gefäßmaterialien wie Quarzglas, Glaskohlenstoff, Platin oder Spezialkunststoffen erheblich verringert werden. Zum anderen können selbst suprareine Chemikalien (99,9 %) Konzentrationen an Verunreinigungen enthalten, die bedeutend größer sind als die des Radionuklides. Durch Wechselwirkungen mit diesen Verunreinigungen der Edukte können sonst unbemerkte Nebenreaktionen zum Hauptreaktionsweg werden. Dies gilt besonders für sehr reaktive Radiotracer oder für stark aktivierte Reaktanden, die häufig reaktive Nebenprodukte in geringen Konzentrationen bilden. Weiterhin ist auch mit der Beeinträchtigung der spezifischen Aktivität durch Einschleppen isotoper Träger gerade bei den allgegenwärtigen Elementen O, N und C zu rechnen. Neben diesen Verunreinigungen mit isotopen Verbindungen kann es auch zur Bildung analoger oder chemisch sehr ähnlicher Verbindungen kommen, die chromatographisch nur schwer abtrennbar sind. Ferner verlaufen die unter n.c.a.-Bedingungen durchgeführten Reaktionen weit entfernt vom chemischen Gleichgewicht und von stöchiometrischen Bedingungen, was erhebliche Konsequenzen für den Reaktionsverlauf haben kann.

Bei Markierungen oder Reaktionen im n.c.a.-Bereich liegen alle Reaktionspartner immer im großen Überschuß vor, so daß deren Konzentration während der Reaktion praktisch als konstant angesehen werden kann. Daher liegt hier vom reaktionskinetischen Standpunkt aus gesehen immer eine einfache Kinetik "pseudo-erster-Ordnung" vor. Für eine einfache bimolekulare Reaktion der Form $E + R \rightarrow P$ gilt bei konstanter Konzentration des Vorläufers [E] für die Zunahme des Produktes [P] folgende Gleichung:

$$[P] = [R_0] (1 - e^{-k't})$$

[P] = Konzentration Produkt
[R₀] = Anfangskonzentration des Radionuklids
k' = apparente Geschwindigkeitskonstante
t = Reaktionszeit

Gl. 1.5-4

Die apparente Geschwindigkeitskonstante k' ist das Produkt aus der wahren Geschwindigkeitskonstante k und der Konzentration von E: $k' = k [E]$.

Wird bei der Untersuchung der Markierung die Reaktionszeit t konstant gehalten und die Vorläuferkonzentration variiert, so kann t in die Geschwindigkeitskonstante einbezogen werden und man erhält einen mit Gl. 1.5-4 identischen Ausdruck, wobei der Exponent durch $-k''[E]$ mit $k'' = k t$ zu ersetzen ist. Die Produktkonzentration [P] verändert sich in beiden Fällen mit einem exponentiellen Verlauf und strebt mit zunehmender Reaktionszeit bzw. zunehmender Eduktkonzentration einem Sättigungswert entgegen.

Aufgrund der während der Reaktion auftretenden geringen Produktkonzentrationen ist im allgemeinen nicht mit einer Weiterreaktion des Produktes mit dem Radionuklid zu rechnen. So ist beispielsweise sowohl die Markierung von Tyrosin ohne das Auftreten des Diiodproduktes als auch die Darstellung von

[¹⁸F]Fluorbromethan aus 1,2 Dibromethan ohne die Bildung des Difluorproduktes problemlos möglich.

Hinsichtlich der Einstellung von Verteilungs- und Austauschgleichgewichten unterscheiden sich Verbindungen unter n.c.a.-Bedingungen nicht von Substanzen in höheren Konzentrationen. Vielmehr sind die Bedingungen des Nernst'sche Verteilungsgesetzes aufgrund des Vorliegens ideal verdünnter Lösungen gut erfüllt.

Allerdings können zusätzlich kinetische Gleichgewichts- und spektroskopische Isotopieeffekte auftreten, die man sich zur Trennung und Anreicherung von Isotopen zunutze macht. Sie spielen jedoch bei den hier behandelten Nukliden und Reaktionen nur eine untergeordnete Rolle.

Aus den obigen Überlegungen wird deutlich, daß die speziellen Gegebenheiten im Bereich der Synthese mit kurzlebigen Radionukliden die Aufgabenstellung der Markierung von Produkten mit hohen spezifischen Aktivitäten sehr erschweren können. Dies kann weitgehend vermieden werden, wenn bei der Syntheseplanung die folgenden Punkte beachtet werden:

- a) Die Gesamtsynthesezeit sollte drei Halbwertszeiten nicht überschreiten. Nur schnelle chemische Reaktionen und Methoden sollten eingesetzt werden. Damit sind auch die Möglichkeiten der Identifizierung, Isolierung und Qualitätskontrolle auf schnelle, einfache und empfindliche Analysetechniken beschränkt. Hier werden hauptsächlich chromatographische Methoden wie die HPLC und die GC verwendet. Aber auch die Festphasenfixierung auf Reversed-Phase- oder Ionenaustauscher-Kartuschen hat hier Bedeutung erlangt.
- b) Verluste durch Adsorption an Oberflächen, Bildung von Niederschlägen und Nebenreaktionen mit Verunreinigungen müssen möglichst gering gehalten werden. Daher werden die, bezogen auf das Radionuklid, unstöchiometrischen Synthesen im mikromolaren Bereich und mit möglichst kleiner und wenig aktiver Oberfläche durchgeführt. Nur reinste Lösungsmittel und Edukte finden Verwendung.
- c) Unkomplizierte und automatisierbare Verfahren erleichtern die Arbeit und verkürzen damit Synthesezeiten. Zudem werden sie auch aus Strahlenschutzgründen angestrebt. Hier sind "Eintopfreaktionen" klar zu bevorzugen, da das langwierige und häufig lösungsmittelintensive Aufarbeiten nach jedem Reaktionsschritt entfällt. Das bei Volumensmengen von 0,1 – 1 ml verlustreiche Umfüllen wird umgangen.
- d) Hochreaktive Zwischenprodukte mit unübersichtlichen Reaktionsmechanismen (z.B. radikalisch) führen oft zu störenden, reaktiven Nebenprodukten und sollten bei der Markierung vermieden werden.
- e) Die Einführung des Radioisotops sollte der letzte Schritt der Synthese sein oder zumindest so spät wie möglich erfolgen. Dadurch wird das kritische n.c.a.-Niveau auf möglichst wenig Reaktionsschritte begrenzt.

1.6 Methoden zur Radioiodierung organischer Moleküle

Bei der Darstellung von Radioiodtracern spielt die *in vivo* Stabilität der Iod-Kohlenstoffbindung eine wichtige Rolle. Daher wurden in der Vergangenheit hauptsächlich Radioiodarylverbindungen untersucht, so daß hier grundsätzlich eine Vielzahl von Markierungsmethoden zur Verfügung stehen. Bis heute haben sich hier 3 Methoden durchgesetzt, die alle für den n.c.a.-Einsatz geeignet sind:

A: Direkte elektrophile Radioiodierung

Diese am weitesten verbreitete Methode erfordert aktivierte (elektronenreiche) Aromaten und ist somit nur auf wenige Moleküle anwendbar. Gleichzeitig können durch die oxidativen Markierungsbedingungen Probleme auftreten.

B: Elektrophile Demetallierung

Diese Markierungsmethode erfordert Organometallverbindungen als Vorläufer, die häufig eine komplexe Synthese erfordern. Man geht hier im allgemeinen von Tributylstannyl- Trimethylsilyl- oder Borsäurederivaten aus.

C: Nukleophile Substitution mit Cu(I) als Katalysator

Der nukleophile "Brom gegen Radioiod"-Austausch ist wie die Demetallierung auf alle Aromaten anwendbar. Hier werden die einfach zugänglichen Br-Vorläufer eingesetzt. Die häufig erforderlichen drastischen, reduktiven Markierungsbedingungen beschränken diese Methode jedoch auf relativ stabile Moleküle [19]. Im folgenden soll neben einem kurzen Überblick über die Radioiodierungsmethoden genauer auf die oben angedeuteten Punkte eingegangen werden.

1.6.1 Direkte elektrophile Substitution

Die elektrophile Substitution von aromatisch gebundenem Wasserstoff gegen Radioiod ist aufgrund der einfachen Reaktionsführung in Verbindung mit Ausbeuten von 80-90 % von großer Bedeutung. Allerdings ist sie nur bei aktivierten (elektronenreichen) Aromaten durchführbar und führt häufig zu Isomerengemischen, die oft schwierige Trennungen erfordern. Es wurde eine Vielzahl von speziellen Markierungstechniken entwickelt, die vom gut handhabbaren Radioiodid ausgehen, und dieses *in situ* zu einer reaktiven, elektrophilen "I⁺"-Spezies oxidieren. Die Erzeugung von molekularem Iod (I₂), wie es etwa in der "makroskopischen" organischen Chemie üblich ist, ist für das Arbeiten im n.c.a.-Bereich sowohl aufgrund des notwendigen Trägerzusatzes als auch wegen der hohen Flüchtigkeit des elementaren Iods ungeeignet. Zur einfachen Handhabbarkeit und zur *in situ* Oxidation des Iodids wurden verschiedene Reagenzien eingesetzt.

a) Iodmonochlorid [20-22]

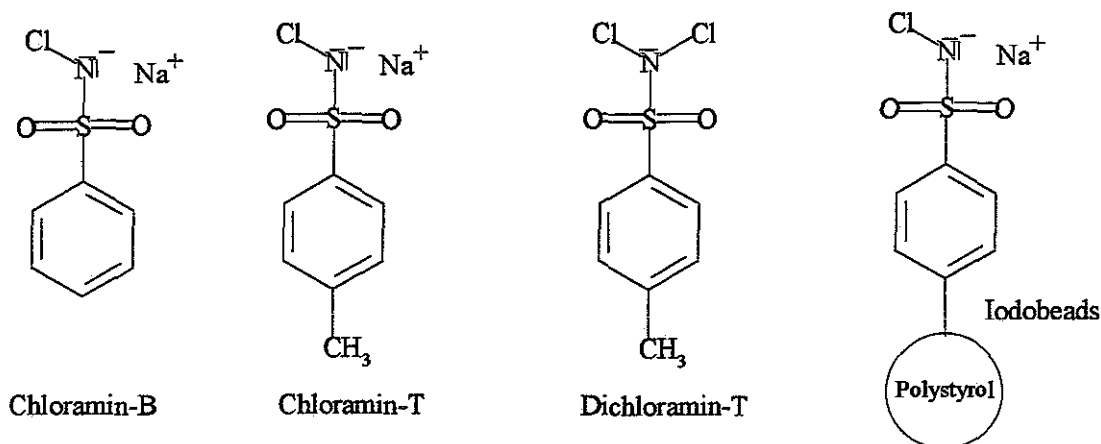
Durch Zugabe einer aktiven Natriumiodidlösung zu inaktivem, kommerziell erhältlichem Iodmonochlorid (ICl, Kp. 97,4°C) wird die reaktive Spezies durch Iod-Radioiod-Austausch gebildet. Im Vergleich zum I₂ verfügt das Iod im ICl aufgrund der höheren Elektronegativität des Bindungspartners über eine ausgeprägtere Elektrophilie, was sich in ausgezeichneten radiochemischen Ausbeuten niederschlägt. Nachteilig sind das hohe Oxidationspotential des Iodmonochlorids und der mit dem Reagens verbundene Trägerzusatz. Eine trägerfreie Markierung ist hier nur durch den aufwendigeren Einsatz von [¹²³Xe]Xenon (t_{1/2}=2,08 h) in Verbindung mit elementarem Chlor möglich, wobei sich das ¹²³I-Cl durch eine zerfallsinduzierte Reaktion *in situ* bildet.

b) Iodat (IO_3^-)

Wie unter a) erhält man auch bei dieser Methode keine hohen spezifischen Aktivitäten, da über das Iodat inaktiver Träger zugesetzt wird. Allerdings handelt es sich beim Iodat um ein relativ sanftes Oxidationsmittel, das besonders für die Markierung empfindlicher Substanzen (z.B. Proteine) geeignet ist. Iodat wurde bei der Darstellung von 3- $^{131,123}\text{I}$ - α -Methyltyrosin (IMT) eingesetzt. Bei diesem für die Diagnostik von Gehirntumoren verwendeten Radiopharmakon lassen sich so radiochemische Ausbeuten bis zu 85 % erreichen [23-26]. Allerdings ist es in letzter Zeit gelungen, das IMT auch mittels IodogenTM (s. u.) als Oxidationsmittel auf dem n.c.a.-Niveau zu erhalten [27].

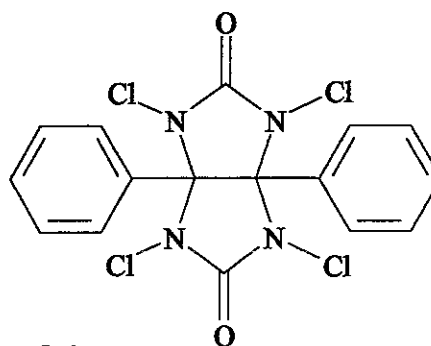
c) Chloramin-T (CAT), Chloramin-B (CAB), Dichloramin-T

Bei diesen Verbindungen handelt es sich um N-chlorierte Sulfonsäureamide (CAT: Toluolsulfonsäure, CAB: Benzolsulfonsäure) die schon 1962 von Hunter und Greenwood [28] als Oxidationsmittel zur Radioiodierung eingesetzt wurden. Als oxidierende Spezies wird das in wässriger Lösung gebildete Hypochlorit angenommen, das neben der erwünschten, relativ starken Oxidationswirkung auch die Eigenschaft zur Bildung von Cl_2 und damit von chlorierten Nebenprodukten besitzt. Um die daraus resultierenden Nebenreaktionen besonders bei empfindlichen Molekülen gering zu halten, sind niedrige Konzentration des Reagens, kurze Reaktionszeiten und niedrige Reaktionstemperaturen wünschenswert [3,20,29].



d) Iodogen

IodogenTM ist der Handelsname für 1,3,4,6-Tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycouril, das auch als N-chloriertes Harnstoffderivat bzw. Kohlensäureamid aufgefaßt werden kann. Iodogen ist in erster Linie zur direkten, schonenden Markierung von Proteinen entwickelt worden. In seiner oxidierenden Wirkung und den erzielten Markierungsausbeuten ist es mit CAT vergleichbar, wobei auch hier ohne Trägerzusatz gearbeitet werden kann. Allerdings ist es als nicht ionisches Molekül in Wasser unlöslich, was zur einfachen Abtrennung des Oxidationsmittels



ausgenutzt wird. Bei der Reaktionsführung wird das Iodogen zunächst über eine Chloroformlösung als dünner Film auf der Gefäßwand abgeschieden. Nach der darauffolgenden Zugabe der wäßrigen Eduktlösung wird die 2-Phasenreaktion ohne Rühren stengelassen. Nach der Reaktion kann das Reagens durch einfache Entnahme der Reaktionslösung abgetrennt werden (Iodogen-Methode) [20,35].

e) N-Halogensuccinimide

Neben CTA und seinen Derivaten und Iodogen eignen sich noch weitere N-halogenierte organische Verbindungen für die *in situ* Oxidation von Radioiodid. Dazu gehören die N-Halogensuccinimide N-Chlor-tetrafluorsuccinimid (NCTFS), N-Chlorsuccinimid (NCS) und N-Bromsuccinimid (NBS), deren Struktur einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie bei Iodogen vermuten läßt. Diese Verbindungen sind wie Iodogen in organischen Medien löslich und zur n.c.a.-Markierung geeignet. NCTFS und NCS sind im Gegensatz zu NBS, mit dem nur geringere radiochemische Ausbeuten erzielt werden, in ihrer Handhabung und den erhaltenen Markierungsausbeuten mit CTA vergleichbar, wobei längere Reaktionszeiten erforderlich sind.

f) Persäuren als Oxidationsmittel

Bei entsprechender Vorgehensweise ist der Einsatz von Persäuren eine schonende Methode, die auch zum Arbeiten unter n.c.a.-Bedingungen geeignet ist. Wichtig ist die *in situ* Bildung der Persäure aus Wasserstoffperoxid und der Säure (z. B. Essigsäure), so daß deren Konzentration gering gehalten wird. Der direkte Zusatz von Persäuren führt im allgemeinen zur Zerstörung des Eduktes.

Verglichen mit dem allgemein üblichen Einsatz von Chloramin-T (s. o.) und seinen Analoga ist sowohl das Auftreten chlorierter Nebenprodukte ausgeschlossen als auch die Entstehung oxidativer Nebenprodukte stark eingeschränkt. Diese Eigenschaften sind gerade bei empfindlichen Edukten von Bedeutung. Die radiochemischen Ausbeuten liegen bei der Persäureiodierung im Vergleich zu CAT etwas niedriger. Auch wenig aktivierte Aromaten wie Anisole können in moderaten Ausbeuten radioiodiert werden (z.B. Anisol: 25 % RCA). Zudem erlaubt diese Methode auch die Radiobromierung, bei der allerdings im Vergleich zur Radioiodierung etwas geringere RCA erhalten werden [29,36].

g) Enzymatische Methoden

Weiterhin besteht die Möglichkeit, Enzyme bei der Radioiodierung als Oxidationsmittel zu verwenden. Dabei handelt es sich um eine sehr milde Methode, die nur bei sehr oxidationsempfindlichen Biomolekülen eingesetzt wird. Im allgemeinen werden zur Oxidation Peroxidasen wie z.B. Lactoperoxidase verwendet, deren Abtrennung bei der Aufarbeitung relativ problematisch sein kann [20,37-39].

h) Elektrolytische Oxidation

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit I^+ durch anodische Oxidation zu erzeugen. Neben milden Reaktionsbedingungen bringt diese Methode auch eine extrem einfache Aufarbeitung mit sich, da weder Nebenprodukte noch zusätzliche Oxidationsmittel abgetrennt werden müssen. Jedoch ist zur erfolgreichen Durchführung ein relativ großer apparativer Aufwand in Verbindung mit einem erfahrenen Experimentator erforderlich [20,40-42].

1.6.2 Elektrophile Demetallierungsreaktionen

Die oben beschriebene elektrophile Substitution ist eine einfach handhabbare Methode, die aufgrund der kurzen Reaktionszeit und der einfachen Reaktionsführung hervorragend zur Bestock-Präparation (Kit) geeignet ist. Um diese Methode auch auf nicht-aktivierte (elektronenarme) Aromaten übertragen zu können, werden Organometallderivate eingesetzt, die neben den Vorteilen der direkten elektrophilen Substitution auch eine regioselektive Radioiodierung erlauben. Neben Bor und Quecksilber finden die Metalle der IV. Hauptgruppe des Periodensystems Verwendung, wobei sich Zinn als besonders günstig erwiesen hat. Weiterhin sind über die Organometallverbindungen auch Radiopharmaka mit vinylisch gebundenem Radioiod, die gleichfalls eine hohe *in vivo* Stabilität aufweisen und über die direkte elektrophile Substitution nicht erhalten werden können, zugänglich. Bei der Darstellung der Vinylradioiodide wird hauptsächlich mit den entsprechenden Zinn- und Borverbindungen gearbeitet [43-46]. Auch wenn die Markierung durch Demetallierung der direkten elektrophilen Substitution in vielen Punkten überlegen ist, bringt sie doch aufwendige, oft sehr komplizierte und mehrstufige Vorläufersynthesen mit sich [47-49].

Die Radioiodierung der Organometallvorläufer findet im allgemeinen unter den oben beschriebenen Bedingungen der direkten elektrophilen Substitution statt, wobei aufgrund der hohen Lipophilie der Vorläufer eher in organischen Solvenzien gearbeitet wird. Auch hier werden zur Oxidation des Iodids bevorzugt die N-Halogenverbindungen Chloramin-T und Dichloramin-T eingesetzt [50-52].

Entscheidend für die Reaktivität der Organometallverbindungen ist die Polarisierung der Kohlenstoff-Metallbindung und die damit verbundene Negativierung des Kohlenstoffs, die, verglichen mit der C-H-Bindung sowohl zur Aktivierung gegenüber elektrophilen Angriffen als auch zur Verringerung der Bindungsenergie führt [29,36,53].

Bei der Betrachtung der Radiohalogenierung durch elektrophile Demetallierung nimmt das auch häufig verwendete Bor eine Sonderstellung ein. Die Bor-Kohlenstoffbindung verfügt einerseits über eine hohe Bindungsenergie (vergleichbar mit der C-C-Bindung) und ist andererseits mit einem ionischen Anteil von 6 % kaum polarisiert. Daher sind Organoborane im allgemeinen luft- und wasserstabile, kristalline und leicht handhabbare Verbindungen. Die zudem einfache Radioiodierung ist auf das leere 2p-Orbital des Borkomplexes zurückzuführen, das einen kinetischen Weg zum elektrophilen Angriff eröffnet. Die Radioiodierung verläuft über eine elektrophile Demetallierung und ist daher eine schnelle Reaktion, die hohe radiochemische Ausbeuten mit regio- und stereospezifischen Produkten liefert [54,55].

Die Dethallierung und die Demercurierung [56] spielen heute zur Radiohalogenierung nur noch eine untergeordnete Rolle. Den relativ einfach zugänglichen Vorläufern stehen Produkte mit nur geringen spezifischen Radioaktivitäten und geringer Regioselektivität gegenüber. Darüber hinaus kann Thallium nur bei oxidationsunempfindlichen Aromaten eingesetzt werden, wobei zur Radioiodierung kein zusätzliches Oxidationsmittel erforderlich ist [29].

1.6.3 Nukleophile Substitution und Cu(I)-Katalyse

Nukleophile Substitution ohne Katalyse

Diese in der präparativen organischen Chemie weit verbreitete und einfach durchführbare Reaktion wird ebenfalls zu Markierungen mit Radiotracer angewandt. Hauptsächlich wird hier von einfach zugänglichen oder käuflichen Halogenaliphaten ausgegangen, die analog der Finkelstein-Reaktion umgesetzt werden. Neben dem einfachen isotonen Austausch (Iod gegen Radioiod) können auch durch nicht-isotonen Austausch n.c.a.-Produkte erhalten werden. Die Reaktion wird üblicherweise durch Erhitzen des Halogenvorläufers mit Radioiodid in Lösungsmitteln wie Wasser, Aceton oder Eisessig durchgeführt. Zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit wurden auch andere Systeme eingesetzt, die von besseren organischen Abgangsgruppen ausgehen und in unpolaren Lösungsmitteln unter Zusatz von Phasentransferkatalysatoren ausgeführt werden. Die Bedeutung der aliphatischen Radioiodierung ist allerdings gering, da sie im allgemeinen zu *in vivo* instabilen Produkten führt, die Radioiod freisetzen, das sich dann in der Schilddrüse anreichert [29].

Cu(I)-katalysierte aromatische nukleophile Substitution

Die Synthese von aromatischen Radiotracer ist aufgrund ihrer *in vivo* Stabilität von größerer Bedeutung. Die direkte aromatische nukleophile Substitution ist nur in Ausnahmefällen und bei aktivierten (elektronenarmen) Aromaten unter relativ drastischen Bedingungen möglich [57,58]. Sie wird hauptsächlich bei der isotonen Radioioddeiodierung von ortho-substituierten Iodaromaten angewandt und führt häufig zu geringen radiochemischen Ausbeuten und vielen schwer abtrennbaren Nebenprodukten [59]. Unter dem Zusatz geeigneter Katalysatoren kann die nukleophile Substitution auch bei anderen Aromaten unter relativ milden Bedingungen durchgeführt werden. Hierbei hat der Kupfer(I)-katalysierte Halogenaustausch, der in der präparativen organischen Chemie eine breite Anwendung gefunden hat, die größte Bedeutung erlangt [60-62].

Bei dieser Reaktion erniedrigt das Cu(I) durch Komplexbildung die Aktivierungsenergie der Austauschreaktion und ermöglicht so die nukleophile Substitution. Die Substitution wird mit der Reihenfolge $I > Br > Cl$ der Abgangsgruppe und mit der umgekehrten Reihenfolge $Cl > Br > I$ des Nukleophils erschwert, so daß sich der Austausch vom Iod in Iodaromaten gegen Chlor am leichtesten bewerkstelligen läßt. Für den präparativ sinnvolleren Weg des Austausches von Iod gegen Chlor in Chloraromaten zur Gewinnung von Iodaromaten konnten erst nach längeren Bemühungen geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden [60,62-65].

Im Rahmen der Radiomarkierung wurde diese Reaktion zunächst nur für den isotonen Austausch Iod gegen Radioiod eingesetzt, wobei natürlich keine n.c.a.-Produkte erhalten wurden [59,66]. Bei der Übertragung auf den nicht-isotonen Austausch nimmt die Austauschgeschwindigkeit in der Reihenfolge $I > Br \gg Cl \gg F$ der Abgangsgruppe so stark ab, daß in der Praxis die Markierung von Chlor- oder gar Fluoraromaten durch diese Methode ausgeschlossen werden kann. Wo unter sonst identischen Bedingungen bei der Radioioddeiodierung um die 90 % radiochemische Ausbeute erhalten werden, werden bei der analogen Radioioddebromierung nur etwa 50 % erreicht. Die radiochemischen Ausbeuten für Radiobromdeiodierung liegen erwartungsgemäß um 10-40 % höher als die der Radioioddebromierung [67,68].

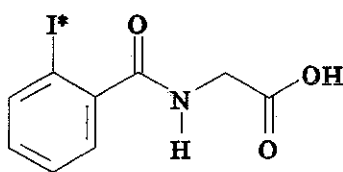
Cu(I) ist in seiner Elektronenkonfiguration mit Ag(I) vergleichbar. Wie dieses bildet es schwerlösliche

Halogen- und Pseudohalogenverbindungen und hat eine entsprechende Tendenz in den metallischen Zustand überzugehen. Cu(I)-Verbindungen sind demnach lichtempfindlich und neigen zur Disproportionierung in Cu(0) und Cu(II). Diese Tendenz ist gerade in wäßrigen Lösungen besonders ausgeprägt, da die hohe Hydratationsenthalpie des Cu(II)-Ions das Gleichgewicht entsprechend verschiebt. Zudem wird hier der relativ geringe Energieunterschied der ersten Oxidationszahlen Cu(0), Cu(I) und Cu(II) deutlich, der für viele katalytische Eigenschaften des Kupfers von entscheidender Bedeutung ist. Nach dem HSAB-Konzept [69] gehört Cu(I) zu den weichen Kationen und bildet somit thermodynamisch stabile Komplexe mit polarisierbaren und π -Akzeptor-Liganden. Daher sind Komplexe mit Kohlenmonoxid, den schweren Halogenen, Alkenen, Alkinen und in speziellen Fällen auch mit aromatischen Kernen im allgemeinen stabil. Mit diesen Liganden werden üblicherweise tetraederisch koordinierte Komplexe aufgebaut, die normalerweise keine große kinetische Stabilität aufweisen [60]. Gegenüber "härteren" Liganden, die O- und N-Koordinationen ausbilden, wird allerdings die charakteristische Koordinationszahl 2 angenommen [70].

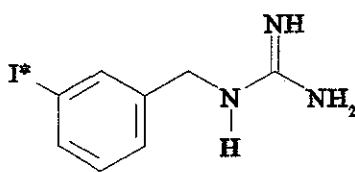
Mechanistisch verläuft die Reaktion über einen tetraedrischen Komplex des Cu(I)-Ions in einem zweistufigen Reaktionsablauf. Zunächst wird das Radioiod durch Ligandenaustausch an dem Komplex koordiniert. Bei einem weiteren Ligandenaustausch wird dann der Halogenaromat über das Halogen angelagert, wobei sich in einem konzertierten Prozeß die Radioiodaromatenbindung und die Cu(I)-Halogenbindung ausbilden. Beide Prozesse setzen thermodynamisch stabile, aber kinetisch labile Komplexe voraus [67].

Für die Radiohalogenierung wird das Cu(I) entweder *in situ* aus Cu(II) und Reduktionsmitteln wie Zinn(II), Bisulfit, Ascorbinsäure oder Gentisinsäure erzeugt [71] oder direkt als käufliches Cu(I)-Halogenid zugesetzt. Als Solvenzien werden Wasser, Wasser/Ethanol, Wasser/Essigsäure oder DMF bzw. DMSO und deren wäßrige Mischungen eingesetzt. Da saure Reaktionsbedingungen sowohl den Austausch als auch die Bildung von Cu(I) unterstützen, werden häufig organische Säuren wie Zitronensäure zugesetzt. Organische Verbindungen, die Schwefel enthalten, sind nur bedingt einsetzbar, da sie als Kupferkomplexe ausfallen können [72].

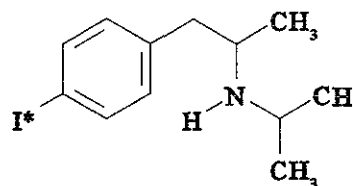
Typische mit dieser Methode radiomarkierte Verbindungen sind ortho-Iodhippursäure, meta-Iodbenzylguanidin (MIBG), para-N-Isopropylodamphetamin und 15(p-Iodphenyl)-9-methylpentadecansäure, die in der SPET-Diagnostik routinemäßig eingesetzt werden [19,73-76].



ortho-Iodhippursäure



meta-Iodbenzylguanidin



para-N-Isopropylodamphetamin

Durch den direkten Zusatz von käuflichem CuCl können die üblichen sauren, reduktiven Reaktionsbedingungen vermieden werden. In DMSO als Solvens wurden bei 140°C nach 30 min bei einer Vielzahl von einfachen Modellaromaten radiochemische Ausbeuten von 50 -70 % erreicht. Hierbei hat sich gezeigt, daß der Einfluß von weiteren aromatischen Funktionen auf die radiochemische Ausbeute nicht sehr ausgeprägt ist. Sowohl elektronegatив als auch elektropositiv aktivierte Bromaromaten liefern höhere Ausbeuten als die nicht aktivierten Verbindungen [67].

Die Markierung von Halogenaromaten über den Cu(I)-katalysierten Austausch ist eine relativ neue und

einfache Methode, die es erlaubt, eine regiospezifische n.c.a.-Radioiodierung auch von nicht aktivierten Aromaten durchzuführen. Anders als bei der elektrophilen Demetallierung geht man hier von einfach zugänglichen bzw. käuflichen Iod- oder Bromaromaten aus und umgeht damit eine oft aufwendige und schwierige Vorläufersynthese.

1.6.4 Radioiodierung durch Iodediazonierung

Die gängigste Methode zur regioselektiven Synthese aromatischer Iodverbindungen in der präparativen organischen Chemie ist die Dediazonierungsreaktion nach Schiemann, bei der ausgehend von Aminen die Iodverbindungen über Diazoniumsalzzersetzung gewonnen werden. Bei der n.c.a.-Radioiodierung sollte das Diazoniumion zur Vermeidung von Verlusten durch Nebenreaktionen mit dem Lösungsmittel in hohen Konzentrationen vorliegen. Eine Variante stellt die der Wallachreaktion analoge säurekatalysierte Zersetzung von Triazenen dar, die selbst durch die Zugabe von sekundären Aminen zu entsprechenden Diazoniumverbindungen erhalten werden. Triazene sind stabile, isolierbare Feststoffe, durch deren Einsatz als Vorläufer die sonst notwendigen, stark oxidierenden Bedingungen bei der eigentlichen Markierung umgangen werden können. Weiterhin können durch die Trennung von Diazotierungs- und Markierungsreaktion Nebenprodukte aus dem ersten Reaktionsschritt unter inaktiven Bedingungen und durch klassisch organische Methoden abgetrennt werden.

Die Markierungsreaktion selbst verläuft aufgrund des radikalischen bzw. ionischen Reaktionsmechanismus über sehr reaktive Zwischenstufen, die eine Vielzahl von aktiven und inaktiven Nebenprodukten bilden. Die damit verbundene oft aufwendige Abtrennung des Radioproduktes hat neben den relativ drastischen Reaktionsbedingungen zur weitgehenden Verdrängung dieser Methode durch die einfacheren Demetallierungs- oder Cu(I)-katalysierten Austauschreaktionen geführt.

1.7 Entwicklung neuer Radiotracer

Bei der Entwicklung von neuen Radiotracern für die medizinische Diagnostik geht man üblicherweise von bekannten Pharmaka oder Biomolekülen aus, für die dann ein geeignetes Verfahren zur Markierung entwickelt werden muß. Dies geschieht im allgemeinen dadurch, daß nach dem Analogprinzip (s. o.) Atome bzw. Atomgruppen des Biomoleküls durch ein geeignetes Radioisotop ersetzt werden. Speziell bei der Markierung mit Radiometallen, insbesondere dem ^{99m}Tc , aber auch bei Radioiod als Markierungstracer ist diese Vorgehensweise häufig nur sehr schwierig durchzuführen.

Metalle können ausschließlich über geeignete Koordinationsstellen stabil an organische Moleküle gebunden werden. Diese sind oft nur bei größeren Biomolekülen wie Peptiden und Proteinen in der Form vorhanden, daß ausreichende Komplexbildungskonstanten erreicht werden. Auf die synthetischen und biochemischen Probleme, die bei der Konjugation von geeigneten Komplexbildnern mit entsprechenden Biomolekülen oder bei der Direktmarkierung von Proteinen auftreten, soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Bei der Planung der Radioiodmarkierung spielt nicht nur das veränderte *in vivo* Verhalten des Zielmoleküls eine große Rolle, sondern auch die *in vivo* Stabilität der Iodbindung ("fate of the label") und die Stabilität sowohl des Vorläufers als auch des Zielmoleküls gegenüber den Markierungsbedingungen bei der entsprechenden Synthesemethode (s. o.).

1.7.1 *In Vivo* Stabilität und Synthese von organischen Iodverbindungen

Auf der Suche nach zur Markierung geeigneten Molekülen spielt die *in vivo* Stabilität des Tracers, insbesondere die der Iod-Kohlenstoffbindung, eine zentrale Rolle. Es hat sich gezeigt, daß nur wenige Moleküle bzw. Molekülteile sowohl einfach markierbar sind als auch eine genügend hohe Stabilität gegenüber der *in vivo* Deiodierung aufweisen. Generell gilt [29]:

- fast alle aliphatischen Iodverbindungen haben sich als instabil erwiesen
- nur bei vinyllisch und aromatisch gebundenem Iod kann mit ausreichender Stabilität gerechnet werden
- die β -Iodethoxy-Gruppe ($\text{I-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$) hat sich zumindest in einigen Fällen als stabil erwiesen [77,78].

Die *in vivo* Stabilität der Verbindungen steht in gewisser Beziehung zur Bindungsenergie der Kohlenstoff-Iod-Bindung. Diese fällt von 297 [kJ/mol] für Vinyljodide über 268 [kJ/mol] für aromatische Iodverbindungen auf 222 [kJ/mol] für aliphatische Iodverbindungen ab [29]. Zum vollständigen Verständnis der Stabilität müssen allerdings auch enzymatische Effekte berücksichtigt werden. So haben sich 3-Iod- α -methyltyrosin und 6-Iod-meta-tyrosin als stabil erwiesen, während 3-Iodtyrosin und 4-Iod-meta-tyrosin *in vivo* einer starken Deiodierung unterliegen [27,30]. Auch bei aliphatischen Iodverbindungen sind mit den langkettigen Iodfettsäuren und der β -Iodethoxy-Gruppe stabile Vertreter bekannt geworden.

Iodvinylverbindungen werden im allgemeinen durch Demetallierungsreaktionen erhalten. Hierbei geht man entweder von Tributylstannyl- oder von Borsäurederivaten aus, die unter elektrophilen Bedingungen das Vinylradioiodid n.c.a. und in hohen Ausbeuten liefern [52,55]. Die erforderlichen Metall-Ethenylvorläufer wurden für viele Verbindungsklassen wie Kohlenhydrate [79], Steroide [80] und Nitroimidazole [81] synthetisiert. Für sehr oxidationsempfindliche Moleküle können Vinylradioiodide auch n.c.a. über einen Cu(I)-katalysierten "Brom gegen Radioiod"-Austausch erhalten werden. Hierbei wurden nach 60 min bei 90°C radiochemische Ausbeuten von 90 % erreicht [82].

Für die Darstellung von Radioiodaromaten sei auf Abschnitt 1.6 verwiesen.

Die Markierung der β -Iodethoxy-Gruppe wurde bisher nur durch nukleophilen, isotopen Austausch durchgeführt. Eine Übertragung dieser einfachen aliphatischen Markierung auf eine n.c.a.-Synthese sollte aber durch den Einsatz geeigneter Abgangsgruppen unproblematisch sein [77].

1.7.2 Markierungsteile für organische Moleküle

Da nur wenige Moleküle für die Radioiodmarkierung in Frage kommen, ist man bei der Radiopharmakaentwicklung bestrebt, entweder entsprechende Fragmente in dem Originalmolekül zu markieren oder aber eine der Strukturen einzubauen bzw. anzuhängen, die für die Radioiodierung in Frage kommen. Man erhält damit ein Baukastensystem, das die einfache und effektive Markierung vieler Biomoleküle erlaubt. Die bekannten Eigenschaften der eingebauten Strukturen wie Markierungsbedingungen, *in vivo* Stabilitäten und pharmakologische Einflüsse können oft problemlos auf das neue Konjugat übertragen werden.

Als Markierungsteil werden im allgemeinen die unter 1.7.1 aufgeführten Struktureinheiten eingesetzt, wobei die Eignung der β -Iodethoxy-Gruppe noch an anderen Systemen zu prüfen ist. In neuerer Zeit sind auch nido-Carborane erfolgreich angewandt worden, bei denen das elektrophil eingeführte Iod an Bor gebunden ist. Allerdings ist bisher nichts über die *in vivo* Stabilität dieser ionischen und damit sehr hydrophilen Verbindung bekannt [83].

Die Weiterentwicklung dieses Gedankens führt zur Einführung von kleinen, einfachen und gut zu markierenden Molekülen, die nach der Radioiodierung über weitere, reaktive funktionelle Gruppen an Biomoleküle gekoppelt werden können. Gerade die zunehmende Anzahl an interessanten, verfügbaren Peptiden und Proteinen hat hier in neuester Zeit zu einem starken Entwicklungsschub geführt. Als Beispiele solcher gut markierbarer Kupplungsreagenzien seien das schon lange bekannte Bolton-Hunter Reagens, das Tributylstannylbenzoat und das Tributylstannylhippurat genannt [84-86]. Einerseits wird durch den Einsatz dieser Reagenzien eine Trennung zwischen der Radioiodierung und der eigentlichen Markierung des Biomoleküls erreicht, wobei durch die Auswahl der funktionellen Kupplungsgruppe milde Markierungsbedingungen gewählt werden können. Andererseits sind die Kupplungsreaktionen auf gängige funktionelle Gruppen von Biomolekülen ausgerichtet und damit universell einsetzbar.

1.7.3 Markierung von D,L-Aminosäuren

Das Interesse an markierten Aminosäuren liegt in der großen Bedeutung der Aminosäuren als essentielle Bausteine des Lebens. Nicht nur die direkten Stoffwechselwege der Aminosäuren können mit Hilfe von markierten Aminosäuren untersucht werden, sondern sie ermöglichen auch Aufschlüsse über die Funktion und Konzentration von wichtigen Peptiden wie z.B. Enzymen und Antikörpern. Darüber hinaus werden Aminosäuren häufig verstärkt in schnell wachsende Tumoren aufgenommen und angereichert, was zur Diagnostik dieser Tumoren ausgenutzt werden kann. Aminosäuren können grundsätzlich sowohl enantiomerenrein als auch als D,L-Enantiomerengemische eingesetzt werden. Bei den Enantiomerengemischen muß mit einem unterschiedlichen *in vivo* Verhalten der enantiomeren Formen gerechnet werden. Für die Markierung mit Radioiod kommen aufgrund ihrer *in vivo* Stabilität nur aromatische Aminosäuren in Frage. Daher spielen das einfach zu iodierende Tyrosin und dessen Derivate sowie das nur "indirekt" zu iodierende Phenylalanin eine große Rolle.

Tyrosin

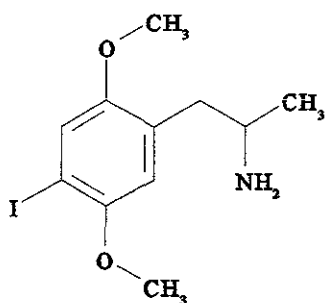
Tyrosin kann als p-Phenolderivat durch einfache elektrophile Substitution mit radiochemischen Ausbeuten von über 80 % regioselektiv iodiert werden. Man erhält das n.c.a.-3-Radioiodtyrosin direkt bei Raumtemperatur in wäßrigen Pufferlösungen und unter Zusatz entsprechender Oxidationsmittel (s. o.). Praktische Anwendung findet heute das 3-Radioiod- α -methyl-L-tyrosin, das in der Nuklearmedizin zur Diagnose von Hirntumoren eingesetzt wird. Im Gegensatz zum 3-Iodtyrosin erweist sich die α -Methylverbindung als bedeutend stabiler gegenüber der *in vivo* Deiodierung [24,26,27].

Unter ähnlichen Bedingungen ist eine Vielzahl von Tyrosinderivaten markiert worden. Hierzu gehören der iodierte Dopaminmetabolit 6-Iod-L-m-tyrosin und eine große Anzahl von direkt markierbaren Peptiden und Proteinen, die Tyrosin als Aminosäurebaustein enthalten [8,33,87,88].

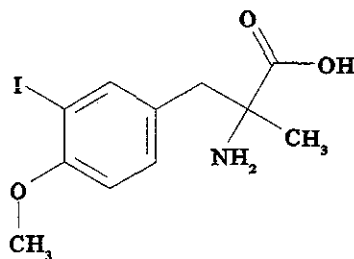
Ebenso konnte das 3-Hydroxytyrosin (Dopa) in der 6-Position radioiodiert werden. Als oxidationsempfindliches Catecholderivat ist das Dopa unter den üblichen oxidativen Markierungsbedingungen instabil, so daß hier das Radioiod über einen direkten, ohne Zusatz von Katalysatoren ablaufenden "Brom gegen Radioiod"-Austausch aus dem 6-Br-Dopavorläufer erhalten wurde. Für L-6-Radioioddopa wurde eine nicht signifikante *in vivo* Deiodierung gefunden [57].

Auch O-methylierte Tyrosinderivate lassen sich, trotz der geringen Aktivität gegenüber Elektrophilen, nach der obigen Methode radioiodieren. Hier sind aber ohne weitere aktivierend wirkende Gruppen drastischere

Reaktionsbedingungen notwendig. Wo das Dimethoxybenzedrin noch in wäßriger Pufferlösung markiert werden kann [89], ist zur Radioiodierung von O-Methyl- α -methyl-L-tyrosin schon der Einsatz von Trifluoressigsäure bei erhöhten Temperaturen notwendig, um radiochemische Ausbeuten um 50 % zu erhalten.



Dimethoxyiodbenzedrin



3-Iod-O-methyl- α -methyltyrosin

O-methylierte Iodtyrosine zeichnen sich durch eine exzellente *in vivo* Stabilität gegenüber der Deiodierung aus [27]

Phenylalanin

Auch wenn es sich beim p-Iodphenylalanin um eine *in vivo* stabile Verbindung handelt, sind erst in neuerer Zeit Versuche zur n.c.a.-Markierung unternommen worden. Phenylalanin als nicht aktivierter Aromat läßt sich nicht unter den Reaktionsbedingungen der elektrophilen Radioiodierung markieren. Daher wurden erste Versuche zur Synthese des p-Iodphenylalanins mittels der Ioddediazonierung unternommen, die allerdings nur geträgertes Produkt in RCA von 20 % liefern [90]. Eine neuere Arbeit geht vom synthetisch schwer zugänglichen p-Tributylstannylphenylalanin als Vorläufer aus und erhält unter den üblichen Reaktionsbedingungen der Demetallierung Ausbeuten von mehr als 80 % [49]. Darüber hinaus ist Iodphenylalanin auch über den Cu(I)-katalysierten "Brom gegen Radioiod"-Austausch zugänglich. Hier wird sowohl mit dem Cu(II)SO₄/Sn(II)SO₄ System [91] als auch mit der CuCl/DMSO-Methode [92] gearbeitet, wobei letztere den Schutz der Aminfunktion erfordert.

1.8 Hypoxische Zellen in der Tumorthherapie

Die Sauerstoffunterversorgung einer Zelle hat weitreichende Konsequenzen auf ihren chemischen und biochemischen Status [93,94]:

- stimulierte Glykolyse mit zunehmender Milchsäurekonzentration und instabilen pH-Bedingungen
- veränderte Enzymkonzentrationen mit der Öffnung anderer Metabolisierungs- und Stoffwechselfade
- beeinträchtigte Ca-Homöostase
- beeinträchtigte Na^+/K^+ -ATPase
- vermindertes ATP-Niveau
- verminderte GSH-Synthese (GSH = Glutathion)
- Beeinflussung des Proliferationsstatus

Mit zunehmender Hypoxie wird ein zunehmendes reduktives Milieu mit einem vergrößerten Potential für Redoxzyklen und, speziell bei Tumorzellen, ein aggressives Verhalten mit wesentlich gesteigertem Invasions- und Metastatisierungspotential beobachtet [93]. Tumorzellen weisen im allgemeinen auch aufgrund einer charakteristisch erhöhten Glykolysekapazität [95] eine bedeutend größere Toleranz gegenüber periodischen Schwankungen in der Sauerstoffversorgung (Hypoxie, Reoxygenierung) auf als normales Gewebe, so daß periodische hypoxische Phasen relativ gut überstanden werden können [96]. Überdies zeigen hypoxische Gewebe eine bis zum Faktor 3 erhöhte Strahlenresistenz, die umgekehrt proportional zur Sauerstoffkonzentration ist (Sauerstoffeffekt). Schon bei einem Anteil von 2-3 % dieser strahlenresistenten Zellen muß die Strahlendosis zur effektiven Radiotherapie eines Tumors verdoppelt werden [97]. Gleichfalls weisen hypoxische Gewebe auch eine ausgeprägte Unempfindlichkeit gegenüber den gängigen Antitumor-Chemotherapeutika auf. Diese Unempfindlichkeit kann sowohl auf die eingeschränkte Versorgungssituation, die neben Sauerstoff auch für alle anderen Nährstoffe gilt als auch auf die geänderten hypoxischen Stoffwechselbedingungen zurückgeführt werden. Zudem wird durch die heterogene Mangelversorgung auch das charakteristische, schnelle Wachstum der Tumoren lokal unterbrochen, so daß viele Therapiemethoden, die stark proliferierende Zellen voraussetzen, keinen Erfolg mehr zeigen.

Genauere Messungen der Sauerstoffverteilung in menschlichen Tumoren zeigten eine im Durchschnitt grundsätzlich geringere Sauerstoffkonzentration als in normalem Gewebe mit großen inter- und intratumoralen Schwankungen. Hierbei war kein Zusammenhang zwischen den üblichen morphologischen Parametern der Tumordiagnostik und der Konzentration und Verteilung von Sauerstoff zu erkennen. Starke Unterschiede wurden auch bei Tumoren gleicher Größe, gleichen Stadiums (staging) und feingeweblichen Aufbaus (grading) beobachtet. Bei der Untersuchung von Mamma- und Zervixkarzinomen zeigten beispielsweise etwa 30 % aller Tumoren hypoxische Bereiche, wobei der stark hypoxische Anteil ($\text{pO}_2 < 2,5$ mm Hg) zwischen 1 % und 82 % schwankte. Entsprechend konnte bei etwa 70 % der Tumoren bezüglich der Sauerstoffkonzentration nur ein geringer Unterschied zum Normalgewebe festgestellt werden [95,98].

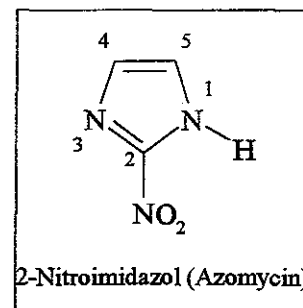
In diesem Zusammenhang konnte trotz der starken Komplexität der untersuchten Tumoren sowohl auf anatomischer, makroskopischer und mikroskopischer als auch auf physiologisch-biochemischer Ebene die immense Bedeutung des pO_2 für die klassische Tumorradiationstherapie aufgezeigt werden. Für Mamma- und Zervixkarzinome wurde ein eindeutig negativer Zusammenhang zwischen dem Anteil von hypoxischem Gewebe ($\text{pO}_2 < 10$ mm Hg) und der rezidivfreien Überlebenswahrscheinlichkeit nach einer Strahlentherapie nachgewiesen [93,99]. Auch bei Metastasen von squamösen Karzinomen im Kopf-Hals Bereich korrelierte der Therapieerfolg mit dem mittleren Tumor- pO_2 . Lag dieser über 10 mm Hg, konnten fast 90 % der Patienten geheilt werden [100]. Ebenso wurden bei Hirntumoren, die allgemein als relativ resistent gegenüber der

Radio- und Chemotherapie gelten, hohe Anteile mit einer stark individuellen Verteilung von hypoxischen Bereichen gefunden [101].

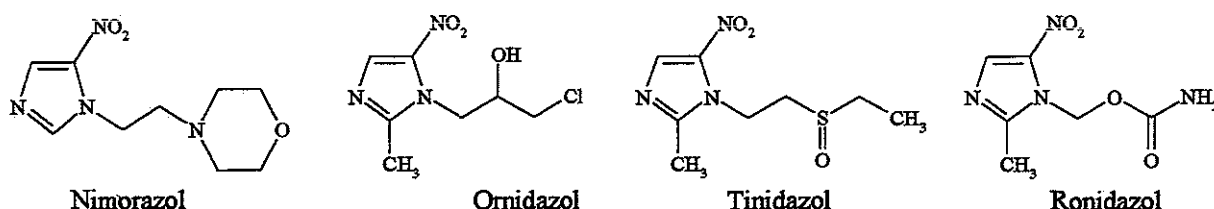
Die Tumorphypoxie gilt heute als der wichtigste Parameter in der Tumorthherapie [99,102-106]. Daher wurden mehrere Alternativmethoden zur speziellen Behandlung von Tumoren mit hypoxischen Zellen entwickelt. Für die erfolgreiche Anwendung dieser Methoden ist die Diagnose der Verteilung und des Ausmaßes der hypoxischen Bereiche und die damit verbundene Verfügbarkeit von Hypoxie-Tracern von entscheidender Bedeutung [107]. Nur durch ein leistungsfähiges diagnostisches Verfahren kann der individuelle hypoxische Zustand eines Tumors erkannt und eine entsprechende Therapieform ausgewählt werden. [93,108] Vorläufige Ergebnisse zeigen, daß Nitroimidazolderivate in diesem Zusammenhang als Hypoxietracer nicht nur eine Therapieprognose ermöglichen, sondern auch das Ansprechen einer Therapie durch Messung der Tumorreoxygenierung (Therapiekontrolle) aufzeigen und damit zur Entwicklung effektiver Therapien für hypoxische Tumoren beitragen können [106].

1.9 Nitroimidazole

Das Interesse für Nitroimidazole begann in den 50er Jahren, als deren antibiotische Wirkung erkannt wurde. Die antitrichomonale Wirkung von 2-Nitroimidazol (Azomycin) wurde 1956 entdeckt. Erste Synthesversuche von Derivaten gingen von natürlichem, aus *Nocardia mesenterica* gewonnenem 2-Nitroimidazol aus, da die Nitrierung von Imidazol nur zu 4 (5)-Derivaten führt. Erst 1965 konnte das 2-Nitroimidazol synthetisch erhalten werden [109,110].



Auch die ersten 5-Nitroimidazolderivate wurden als Antibiotika gegen anaerobe Mikroorganismen eingesetzt. Metronidazol war das erste 5-Nitroimidazolderivat, das ab 1960 erfolgreich als Antibiotikum gegen *Trichomonas vaginalis* klinisch angewandt wurde und hier noch heute als das Mittel der Wahl gilt [111,112]. Es setzte eine starke Entwicklung auf diesem Gebiet ein, die zu einer Vielzahl von antibiotisch wirkenden Verbindungen führte. Zum Überblick seien hier Nimorazol, Ornidazol, Tinidazol und Ronidazol genannt. Die meisten Verbindungen orientierten sich dabei an dem Metronidazol-Grundkörper 5-Nitro-2-methylimidazol. Nitroimidazole zeichnen sich durch ein breites Wirkungsspektrum und eine geringe Resistenzentwicklung aus [111].



Die Bevorzugung der 5-Nitroimidazole bei dieser Entwicklung ist durch ihre einfache Zugänglichkeit und den hohen Preis der 2-Nitroimidazole zu erklären. Zudem weisen 2-Nitroimidazole im allgemeinen eine höhere systemische Toxizität auf als die 5-Derivate.

Mit der Intensivierung der Tumorforschung in den sechziger und siebziger Jahren wurden auch Antibiotika

und damit Nitroimidazole zur Therapie in verschiedensten Kombinationen mit anderen Methoden getestet. Hierbei wurden die radiosensibilisierenden Eigenschaften dieser Verbindungen entdeckt. Bei der darauffolgenden ab 1970 einsetzenden Entwicklung wurde auf diesem Gebiet mehr oder weniger erfolgreich versucht, die radiosensibilisierenden Eigenschaften mit physikalischen und chemischen Parametern wie Reduktionspotential, P_{K_a} , Verteilungskoeffizient und Hammett-Substitutionskonstante zu korrelieren [113-116]. Nitroimidazole erschienen hier als besonders geeignet, da sie einerseits nicht von sauerstoffreichem Normalgewebe metabolisiert werden und andererseits gut in Tumoren und hypoxische Bereiche eindringen, wobei hier relativ hohe Konzentrationen erreicht werden. Allerdings hat sich die Anwendung der radiosensibilisierenden Wirkung in der klinischen Tumorthherapie durch die systemische Toxizität der Nitroimidazole und den dadurch begrenzten Dosen bisher nicht durchsetzen können [117].

Neben der Entdeckung der ausgeprägten Zytotoxizität gegenüber hypoxischen Säugetierzellen und der mutagenen Wirkung der Nitroimidazole wurde bei der Untersuchung des Mechanismus der Radiosensibilisation auch die Anreicherung in hypoxischen Tumoren erkannt, was 1979 erstmals zu dem Vorschlag führte, Nitroimidazole als Marker für hypoxische Tumorzellen zu verwenden [118-120]. Zu diesem Zeitpunkt wurde aufgrund der Problematik der hypoxischen Strahlenresistenz vieler Tumoren [104] die therapeutische Notwendigkeit immer deutlicher, den Anteil der hypoxischen Bereiche eines Tumors zu quantifizieren. Zunächst wurden hier Tritium und [^{14}C]Kohlenstoff als Radiotracer für *in vitro* und *in vivo* Experimente eingesetzt, die eine autoradiographische Auswertung erfordern [121-123]. Mit zunehmender Verfügbarkeit von SPET und PET konnten dann auch ab Mitte der 80er Jahre entsprechend markierte Radiotracer zur Verfügung gestellt werden, wodurch grundsätzlich eine nicht-invasive Diagnostik von hypoxischen und deren Abgrenzung zu nekrotischen Arealen ermöglicht wurde. Lag der Schwerpunkt der hypoxischen Diagnostik anfangs bei den Tumoren, so wurden später auch hypoxische Bereiche in anderen Organen wie Herz und Hirn zur Untersuchung und Früherkennung von Herz- bzw. Hirninfarkten mit einbezogen [124,125]. Heute wird hierbei ganz allgemein ein diagnostisches Verfahren zur *in vivo* Messung von Sauerstoffpartialdrücken ($p\text{O}_2$) angestrebt, da in diesem Bereich bisher nur schwierig anwendbare und unzureichend einsetzbare Verfahren zur Verfügung stehen [126]. Allerdings konnten diese Ansätze bis heute nicht erfolgreich vom experimentellen Stadium bis zur klinischen Routineanwendung gebracht werden. Gerade in den "luxusperfundierten" Organen Herz und Hirn ist der Sauerstoffpartialdruck auch bei kleinen Defekten offensichtlich noch so hoch, daß ein für die Anreicherung der heutigen Hypoxietracer notwendiger Sauerstoffüberschuß nicht entsteht, so daß geringe Schädigungen nicht erkannt werden können [127]. Neben dem zur Anreicherung notwendigen relativ niedrigen $p\text{O}_2$ wird der Einsatz der Nitroimidazoltracer auch durch deren ausgeprägte Akkumulation im Magen-Darm-Trakt und der Leber und den dadurch erhaltenen, für die Messung störenden Untergrund, eingeschränkt.

Neuere Entwicklungen bezüglich der Nitroimidazole im Bereich der Tumorthherapie stellen die bioreduktiven Drogen dar. Die ausgeprägte Toxizität vieler Nitroimidazole gegenüber hypoxischen Zellen, die anfangs bei der Untersuchung der Radiosensibilisatoren als Sekundäreffekt angesehen wurde, ist hier zu einer der wichtigsten Eigenschaften im Hinblick auf die Entwicklung neuer Antitumormittel geworden. Durch die Konjugation von Nitroimidazolen mit alkylierenden Funktionen wie beispielsweise Aziridin zu "bifunktionalen" Verbindungen kann die selektive hypoxische Toxizität stark erhöht werden [128-130].

1.9.1 Reduktion und Anreicherungsmechanismus

Alle pharmakologischen Eigenschaften der Nitroimidazole wie selektive hypoxische Zytotoxizität, hypoxische Radiosensibilisation, Anreicherung in hypoxischen Zellen und die antibiotische Wirkung gegenüber anaeroben Bakterien werden mechanistisch grundsätzlich mit der Bildung von reaktiven Intermediaten über die Reduktion der Nitrofunktion erklärt [zum Überblick s. 131]. Damit gehören die Nitroimidazole zur Gruppe der bioreduktiv aktivierbaren Medikamente, die auch Verbindungen wie Anthracycline, Quinone und Belomycin beinhalten [132]. Die vollständige Reduktion der Nitroverbindungen erfordert 6 Elektronen und führt bei 2-Elektronen-Reduktionsschritten über die Nitroso- und Hydroxylaminverbindung zu den entsprechenden Aminen (s. Abb. 1 9-1)[111].

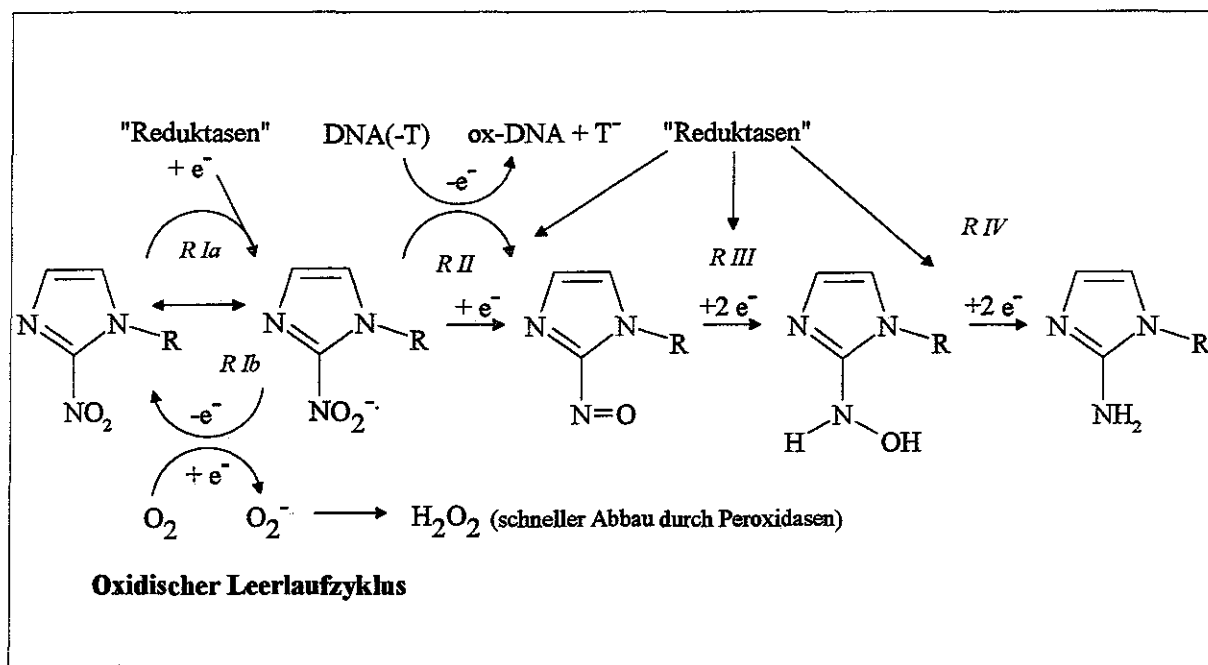


Abb. 1.9-1 Reduktion der Nitroimidazole

Der wichtigste Schritt für die selektive Toxizität in der stufenweise auftretenden Reduktion der Nitroverbindungen ist die Übertragung eines Elektrons (R Ia) auf die reduktionsempfindliche Nitrofunktion, die damit in ein reaktionsfähiges Radikalanion übergeht. Für dieses Zwischenprodukt eröffnen sich nun mehrere Reaktionswege, die vom jeweiligem Medium abhängig sind. In der Gegenwart von Sauerstoff als bestem biologischen Elektronenakzeptor erfolgt eine sofortige Rückoxidation (R Ib) zum Ausgangsprodukt, so daß eine Art "Leerlaufzyklus" (futile cycle) entsteht. Diese Reaktionssequenz führt im Endeffekt zur vermehrten Bildung von Wasserstoffperoxid, das durch allgegenwärtige Peroxidasen schnell abgebaut wird. Bei geringen Konzentrationen von Gewebesauerstoff tritt eine Konkurrenzsituation zwischen der Rückoxidation durch Sauerstoff, der nochmaligen Reduktion des Zwischenproduktes zum 2-Elektronen-Reduktionsprodukt und der Wechselwirkung mit zellulären Makromolekülen auf. Durch die Reaktion mit Biomolekülen, die auch für einige weitere Zwischen- und Folgeprodukte der Nitroimidazole angenommen wird, kann sich deren Wirkung in der Zelle entfalten. Grundsätzlich können sich auch alle Intermediate durch Fragmentierung oder Umlagerung stabilisieren, was besonders bei 5-Nitroimidazolderivaten beobachtet wird [133]. So hat beispielsweise das 4-Elektronen-Reduktionsprodukt Hydroxylaminimidazol (R III) unter physiologischen Bedingungen nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten [134]. Die daraus erhaltenen

Folgeprodukte scheinen allerdings für die biologische Wirkung der Nitroimidazole, insbesondere der Anreicherung in hypoxischen Zellen, nur eine geringe Rolle zu spielen [131].

An dieser Stelle erscheint eine grobe Einteilung des Wirkmechanismus in zwei Phasen sinnvoll:

1. Phase-R (**Ph-R**): Reduktionsphase: soll die Reduktion, insbesondere die 1-Elektronen-Aktivierung, beinhalten
2. Phase-W (**Ph-W**): Wechselwirkungsphase: soll die Wechselwirkung des aktiven Intermediates beinhalten

Weder die Frage nach dem wichtigsten, reaktiven Intermediat (Ph-R), noch die Frage nach dessen Reaktion mit "sensiblen" Biomolekülen (Ph-W) konnte bis heute eindeutig geklärt werden [133].

Das in Ph-R gebildete Intermediat wurde zwischen dem 1-Elektronen- (Nitroradikalanion, *RIa*) und dem 4-Elektronen-Reduktionsprodukt (Hydroxylamin *RIII*) angeordnet, da der Zusatz des Hydroxylamins im Gegensatz zur Nitrosoverbindung (2-Elektronen Reduktionsprodukt *RII*) keine toxische Wirkung zeigte [135]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, daß Hydroxylamine in neutralem, wäßrigem Medium instabil sind und durchaus Addukte mit Nukleophilen bilden können [136]. Demnach ist hier auch die Beteiligung mehrerer Intermediate denkbar, die je nach Nitroimidazolverbindung während der Ph-W in unterschiedlichen Konzentrationen gebildet werden und für die unterschiedlichen Wirkungen von verschiedener Bedeutung sind.

Mechanismus der Toxizität

Bei der toxischen Wirkung der Nitroimidazole kann zumindest bezüglich deren antibiotischer Wirkung gegenüber Mikroorganismen die Wechselwirkung eines Intermediates mit der DNA als der entscheidende Mechanismus in der Ph-W angesehen werden [137]; auch eine Inhibition der DNA-Synthese wird hier beobachtet [138]. Bei Nitroimidazolen wird ganz allgemein eine Degradierung der DNA gefunden, die auf ausgelöste Einzel- und Doppelstrangbrüche zurückgeführt werden kann und zu einer Destabilisierung der Helixstruktur führt. Daher wird auch bezüglich der anderen Wirkungen die DNA als wichtigstes Zielmolekül der Nitroimidazole angesehen. In diesem Zusammenhang spielen Kreuzverbindungen und Einlagerungen bzw. Anlagerungen als Schädigungsmechanismus während der Ph-W keine Rolle. Der Grad der Schädigung der DNA kann in erster Linie mit ihrem Anteil an Thymidinnukleotiden und mit der gleichzeitigen Freisetzung von Thymin bzw. Thymidin korreliert werden [111,133,139,140]. Ein Zusammenhang zwischen der Bindung bzw. Anlagerung von Nitroimidazol-Intermediaten an die DNA und deren Schädigung bzw. der Zytotoxizität konnte nicht aufgezeigt werden. Daher wird als Mechanismus der Schädigung von einer einfachen radikalischen Oxidation der DNA durch ein Intermediat wie z.B. das protonierte Nitroradikalanion ausgegangen, das dabei selbst in das Nitrosoderivat (*RII*) übergeht [141].

Darüber hinaus werden noch weitere Mechanismen zur hypoxischen Toxizität diskutiert. So ist die Kapazität des DNA-Reparatursystems und die intrazelluläre Konzentration von SH-Funktionen (z. B. Glutathion) für die Zellschädigung von Bedeutung. Nitroimidazole können unter hypoxischen Bedingungen während der Ph-W über zellulären SH-Funktionen inaktiviert und damit entgiftet werden, was wiederum zu einer Abnahme der Glutathionkonzentration und damit zur Sensibilisierung der Zelle gegenüber anderen Einflüssen führt. In diesem Zusammenhang kann eine Korrelation der hypoxischen Toxizität der Nitroimidazole mit der Glutathionkonzentration beobachtet werden (Glutathion ist ein Tripeptid, das neben der Beeinflussung vieler physiologischer Prozesse auch eine wichtige Rolle sowohl zur Entgiftung als auch im Redoxgleichgewicht der Zelle spielt) [111,137].

In Verbindung mit Bindungsstudien an Säugetierzellen werden nur etwa 20 % des Nitroimidazoles im Zellkern gefunden, so daß hier neben der Wechselwirkung mit DNA auch die Reaktion mit wichtigen Enzymen bzw. Proteinen und deren toxischen Inaktivierung denkbar ist [142].

Zudem wird bei höheren Nitroimidazolkonzentrationen eine Zunahme der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration bis in einen letalen Bereich beobachtet. Auch die Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptosis) wird heute in zunehmendem Maße diskutiert [135].

Oxidische Toxizität

Die selektive Wirkung der Nitroimidazole gegenüber hypoxischen Zellen wird durch die Reduktionsphase (Ph-R) und hier ausschließlich durch die Reversibilität des 1-Elektronen-Reduktionsschrittes bestimmt. Die Bildung des 2-Elektronen-Reduktionsproduktes ist sowohl vom Edukt als auch vom 1-Elektronen-Reduktionsprodukt aus irreversibel. Folglich würde eine direkte Übertragung von 2 Elektronen im ersten Reduktionsschritt, die für einige Reduktasen wie der NAD(P)H-Dehydrogenase beobachtet wird [143], zu einer entsprechenden oxidischen Wirkung führen und damit zur Verringerung der hypoxischen Selektivität beitragen. Zudem ist auch in Konkurrenz zur Sauerstoffregenerierung bzw. Inaktivierung eine weitere Aktivierung des Nitroradikalanions durch Redoxenzyme zum irreversibel gebildetem 2-Elektronen-Reduktionsprodukt denkbar [144]. Diese Mechanismen sollten gerade für Gewebe mit hohen Reduktasekonzentrationen von Bedeutung sein. Die starke Anreicherung von Hypoxietracern in der enzymreichen Leber, die sich nur unzureichend durch die Sauerstoffinaktivierung erklären läßt, deutet auf einen solchen enzymatischen Zusammenhang hin [145]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß die Nitroimidazolanreicherung auch in normoxischen Geweben wie der Luftröhre und der Ohrspeicheldrüse stattfindet, wobei sie hier mit der Reduktaseaktivität des Gewebes korreliert werden kann [144]. Ebenfalls wird auch für das Nierengewebe der Maus eine erhöhte oxidische Bindungsrate beobachtet [146]. Grundsätzlich weisen alle Gewebe, die Nitroimidazolanreicherung zeigen, auch hohe Konzentrationen an Reduktasen auf [143,144,147]. Dieser Zusammenhang macht die prinzipielle Bedeutung der Enzymreaktionen für die oxidische Aktivierung deutlich. Auch die Zunahme der systemischen Toxizität der Nitroimidazole mit zunehmendem Reduktionspotential [116,131], die für die Entwicklung der Radiosensibilisatoren von entscheidender Bedeutung ist, läßt sich entsprechend erklären.

Im Rahmen dieser Überlegungen soll die Sonderstellung der hypoxischen Anreicherung bezüglich des mechanistischen Vergleichs, insbesondere während der Ph-W, zu den anderen Eigenschaften der Nitroimidazole hervorgehoben werden. Schon aus den obigen Überlegungen wird deutlich, daß eine "mechanistische Optimierung" der auf Toxizität beruhenden Eigenschaften nur mit Vorsicht und bedingt auf die hypoxische Anreicherung übertragen werden kann. So ist im Hinblick auf die DNA als Zielstruktur deren Guanin/Cytosin-Anteil für die hypoxische Anreicherung von Bedeutung. Hierbei kommt es während der Wechselwirkung, im Gegensatz zu den toxischen Untersuchungen, nicht zur Degradierung der DNA. Auch wird die Bindung in deutlich geringerer Quantität beobachtet als die toxische Thymidinfreisetzung [137,142]. Für die irreversible Bindung von Nitroimidazolen im Rahmen der Markierung hypoxischer Zellen spielt somit die Bindung an die DNA nur eine untergeordnete Rolle [123]. Auch dies deutet auf unterschiedliche Reaktionspfade innerhalb der Ph-W bei der hypoxischen Anreicherung im Vergleich zu den toxischen Wirkungen hin; eine Korrelation dieser Eigenschaften sollte daher höchstens bezüglich der Ph-R zu beobachten sein (s. u.) [148].

1.9.2 Neuere Entwicklung von Hypoxietracern

Bei der Diskussion der unterschiedlichen biologischen Eigenschaften der Nitroimidazole liegt der Schwerpunkt zum einen auf der Ph-R und damit beim ersten Reduktionsschritt und dem Redoxpartner, zum anderen auf der Ph-W und damit bei den Mechanismen und Produkten der Wechselwirkung. Dies soll im folgenden für die einzelnen Bereiche unter Berücksichtigung der Sonderstellung der selektiven Anreicherung in hypoxischen Zellen kurz aufgezeigt werden.

Bei der Radiosensibilisierung erfolgt die Aktivierung der Nitrofunktion durch freie, mittels Strahlung (Radiolyse) erzeugter Elektronen, die als solvatisierte Elektronen im wässrigen Zellmilieu vorliegen. Die Ph-W wird durch die effektive Zerstörung von wichtigen Zellstrukturen wie z.B. DNA bestimmt. Der Verbleib der Verbindung in den Zellen nach der Ph-W und damit eine Bindung an Zellstrukturen ist hier von untergeordneter Bedeutung.

Sowohl die bioreduktive als auch die antibiotische als auch die chemosensibilisatorische Wirkung der Nitroimidazole sind bezüglich der Ph-R und der PH-W vergleichbar. Im Unterschied zur Radiosensibilisation werden die zur Reduktion und Aktivierung notwendigen Elektronen von Enzymen bzw. biologischen Redoxsystemen der Zelle zur Verfügung gestellt und auf die Nitrofunktion übertragen. Aufgrund der damit verbundenen Wechselwirkung mit Enzymen während der Ph-R ist bei diesen biologischen Eigenschaften mit einer ausgeprägten Abhängigkeit der Wirkung von der Struktur und weniger vom Reduktionspotential zu rechnen [149]. Die Ph-W innerhalb der Betrachtung dieser Eigenschaften ist analog zur Radiosensibilisation.

Anreicherung in hypoxischen Zellen (Hypoxietracer)

Bezüglich des Reaktionsmechanismus wird auch bei den Hypoxietracer von der reduktiven Aktivierung der Nitroimidazole durch Redoxenzyme ausgegangen. In diesem Zusammenhang wurden bisher eine Vielzahl von Redoxenzymen wie Cytochrom P-450, Cytochrom P-450 Reduktase, Xanthin Oxidase, NADH-Dehydrogenase, DT-Diaphorase, Aldehyd Oxidase und verschiedene Nitroreduktasen diskutiert, die mehr oder weniger im gesamten Organismus gefunden werden [132,149,150-152]. In anaeroben Mikroorganismen wird bezüglich der antibiotischen Eigenschaften die Pyruvat-Ferredoxin Oxidoreduktase als wichtigster Elektronenüberträger angesehen [100]. Neben dem Leerlaufzyklus scheint die ausgeprägte hypoxische Toxizität in diesem Bereich auch auf dem veränderten Reduktionsvermögen der sauerstoffarmen Zellen zu beruhen. In diesen wurde eine höhere Konzentration und Aktivität von Redoxenzymen gefunden [147,153]. Demnach ist die Aktivierung zum reaktiven Intermediat auch durch die Beteiligung von verschiedenen Redoxenzymen denkbar, die das zunächst reversibel gebildete Nitroradikalanion (*R Ia*) weiter zum reaktiven Intermediat (z.B. *R II*) reduzieren. Auf die Bedeutung dieser enzymatischen Reaktionen für die oxidische Toxizität wurde hingewiesen (s. o.). Folglich ist hier, anders als bei der Radiosensibilisation, die Konkurrenz der Weiterreaktion durch Enzyme gegenüber der Inaktivierung durch Sauerstoff zur Erklärung der selektiven hypoxischen Toxizität bzw. Anreicherung von Bedeutung.

Bei der Diskussion um die Entwicklung neuer effektiver Hypoxietracer wird im allgemeinen auf die vielfältigen Ergebnisse der Untersuchung von Radiosensibilisatoren, Chemosensibilisatoren, etc. zurückgegriffen. Gerade die Entwicklung auf der Grundlage möglichst hoher Reduktionspotentiale (E_7^1 = Reduktionspotential des ersten Elektrons bei pH 7) ist von vielen Autoren aus dem Bereich der Radiosensibilisatoren übernommen worden [115,116], wobei implizit vorausgesetzt wurde, daß auch die selektive, irreversible Anreicherung der Nitroimidazolverbindungen in hypoxischen Geweben mit dem

Reduktionspotential korreliert. Aus Tab. 1.9-1 wird deutlich, daß schon nach dem einfachen obigen Modell prinzipiell nur ein bedingter Vergleich bezüglich der reduktiven Aktivierung der Verbindungen möglich ist, wobei Radiosensibilisatoren keine und Antibiotika aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen nur bedingte Aussagen zulassen.

Tab. 1.9-1 Übertragbarkeit einiger biologischer Eigenschaften der Nitroimidazole auf deren Anreicherung

Eigenschaft	Ph-R	Ph-W
Radiosensibilisation	-	-
Bioreduktion	++	-
Chemosensibilisation	++	-
Antibiotika	+	-

Ph-R: Reduktionsphase, Ph-W: Wechselwirkungsphase; ++: gut übertragbar; -: nicht übertragbar

Aus keiner der betrachteten Eigenschaften können jedoch Rückschlüsse auf die irreversible Anreicherung gezogen werden. Offensichtlich sind unterschiedliche metabolische Pfade mit andersartigen, reaktiven Intermediaten an den verschiedenen Effekten beteiligt [107]. In der weiteren Diskussion soll diese Differenz in der Ph-W anhand einzelner Untersuchungsergebnisse verdeutlicht werden.

Im Rahmen von mechanistischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die irreversible Bindung von Nitroimidazolen an DNA, die im Bereich von 20 % lag, für die Toxizität nicht ausschlaggebend ist und folglich für die Anreicherung ein anderer Mechanismus vorliegen sollte [111]. Auch für 5-Nitroimidazole wurde bei ^{14}C -markierten Edukten beobachtet, daß sich der größte irreversibel gebundene Anteil in Proteinen und nicht an der DNA befindet [154]. Dagegen ist sowohl die Zytotoxizität als auch die Radiosensibilisation der Nitroimidazole auf DNA- Einzel- und Doppelstrangbrüche zurückzuführen. Diese werden nicht durch Anlagerungen, sondern durch eine einfache Radikalübertragung der Nitroimidazolintermediate ausgelöst (s. o.). Darüber hinaus konnte für Misonidazol eine Abhängigkeit der Zytotoxizität von der intrazellulären Glutathionkonzentration beobachtet werden. Bezüglich der Anreicherung besteht kein solcher Zusammenhang [158]. Zudem wurden für die Zytotoxizität und die Bindung unterschiedliche Abhängigkeiten von der Sauerstoffkonzentration gefunden. Zeigten Nitroimidazole bei *in vitro* Versuchen ab Sauerstoffkonzentrationen von 300 - 400 ppm ($\sim 0,3$ mm Hg) kaum noch zytotoxische und chemosensibilisierende Eigenschaften, wurde eine Beeinflussung der Bindung erst ab 2000 - 4000 ppm (~ 3 mm Hg) beobachtet [107].

Auch aufgrund der mit ihnen verbundenen diagnostischen Anwendung nehmen die Hypoxietracer eine Sonderstellung ein:

1. Der Einsatz von Hypoxietracern erfolgt im allgemeinen auf dem n.c.a.-Niveau. Dadurch fallen alle Wechselwirkungen weg, die auf der Einwirkung größerer Konzentrationen bzw. Stoffmengen beruhen, was speziell bei den Nitroimidazolen von Bedeutung ist. Bezüglich der Zytotoxizität wurde z.B. ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen Wirkung und Konzentration (doppelte Konzentration führt zu mehr als doppelter Wirkung) beobachtet [135], was auf zusätzliche konzentrationsabhängige Mechanismen hindeutet. Toxische Effekte werden bedeutungslos, so daß im Gegensatz zu den Radiosensibilisatoren die Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke erwünscht ist und die Verbindungen eher lipophilen Charakter aufweisen sollen.

Größere Substanzmengen können zur Aktivierung oder Blockade von metabolischen Pfaden führen und damit eine grundlegende Veränderung des Zellmilieus und der Zellbiochemie bewirken. Daher sind viele Effekte, die für die Chemosensibilisation verantwortlich gemacht werden, ohne Bedeutung. Sowohl mit der zusätzlichen Induktion von Hypoxie [131] als auch mit der Induktion oder Hemmung von Enzymen ist nicht zu rechnen.

Weiterhin können solche Zellstrukturen bzw. Biomoleküle zu einem Großteil zur irreversiblen Bindung der Tracer beitragen, die nur in geringen Konzentrationen vorliegen. Bei geringeren Nitroimidazol-konzentrationen wurde eine Zunahme der selektiv hypoxischen gegenüber der aerobischen Anreicherung gefunden [121]. Zudem ist die Absättigung von aktiven Transportmechanismen ohne Bedeutung. Dies kann sowohl für die Aufnahme des Tracers in die Zellen als auch für mit dem Tracer verbundene Biomoleküle, die aus der Zelle transportiert werden, eine Rolle spielen. Überdies sollten intermolekulare Radikalübertragungsreaktionen und die damit zusammenhängenden zusätzlichen Aktivierungen irrelevant sein.

2. Bei der Betrachtung der Hypoxietracer steht, im Unterschied zu allen anderen untersuchten biologischen Eigenschaften, der Verbleib des reaktiven Intermediats nach der Ph-W und damit die irreversible Bindung des Tracers an Biomoleküle im Mittelpunkt. Daher darf weder eine Metabolisierung, die zur Abspaltung des Radionuklides oder zur Inaktivierung des Nitroimidazoles führt, auftreten noch eine Fragmentierung des reaktiven Intermediats stattfinden. Zudem muß eine irreversible Bindung an solche Biostrukturen erfolgen, die in der Zelle fixiert sind bzw. die Zellmembran nicht überwinden können.
3. Die irreversible Bindung an Biomoleküle soll ausschließlich über die Nitrofunktion erfolgen, wodurch sowohl die selektiv hypoxische Anreicherung als auch die Quantifizierung der Messung gewährleistet sind. Darüber hinaus sind aktive Transportmechanismen zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration natürlich erwünscht.

Entwicklung von Hypoxietracern

Stand bei früheren Untersuchungen der Nitroimidazole das Reduktionspotential (E_1^1) der Verbindungen im Mittelpunkt [156,157], so wird heute die Rolle von Redoxenzymen immer deutlicher [153] (s. o.). Auch im Bereich der antibiotischen Wirkung wird die Art und Aktivität der Nitroreduktasen eines Mikroorganismus als entscheidend für die Wirksamkeit angesehen [158]. Über die Erhöhung des Reduktionspotentials konnten zwar bei *in vitro* Experimenten deutliche Verbesserungen, besonders der radiosensibilisierenden Eigenschaften, erzielt werden, die allerdings aufgrund der auch stark zunehmenden oxidischen *in vivo* Toxizität keine klinische Bedeutung erlangen konnten. Mit zunehmendem E_1^1 nimmt die metabolische Reaktivität und damit die Wahrscheinlichkeit der Reaktion mit anderen biochemischen Verbindungen als Sauerstoff (Leerlaufzyklus) zu, so daß gleichzeitig die selektive hypoxische Anreicherung verringert und die oxidische Toxizität erhöht werden. Weiterhin führt die zunehmende Reaktivität der Intermediate zu geringeren *in vivo* Stabilitäten und erhöhten Metabolisierungsraten [159]. Entsprechende Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zeigen mit ansteigendem E_1^1 eine Zunahme der Radiosensibilisation, der aeroben und anaeroben Zytotoxizität und der Mutagenität. Bei anaeroben Mikroorganismen wurde sogar eine Abnahme der antibiotischen Effektivität mit zunehmendem E_1^1 beobachtet [160]. Entweder wird hier durch die zusätzliche Aktivierung ein anderer Reaktionspfad mit weniger toxischen Intermediaten beschritten oder aber die Intermediate sind so reaktiv, daß sie schon von "unwichtigen" Zellstrukturen abgefangen werden können. Der Verbesserung der Ph-R steht offensichtlich eine erhebliche Verschlechterung der Ph-W gegenüber. Daher hat

sich im Bereich der Hypoxietracer in erster Näherung das Reduktionspotential des 2-Nitroimidazolderivates Misonidazol mit -398 mV als praktische Grenze erwiesen [159,161], obwohl erst ab einem E_1^0 von etwa -300 mV eine stark reduzierte *in vivo* Aktivität bezüglich der Radiosensibilisation und der bioreduktiven Eigenschaften gefunden wurde. Trotzdem erscheint einigen Autoren die Variation des Reduktionspotentials durch die 4-Substitution von 2-Nitroimidazolen als geeignet, um zu besseren Hypoxietracern zumindest für bestimmte Anwendungsbereiche zu gelangen [127,162].

Im allgemeinen scheint jedoch bei der weiteren Entwicklung sowohl für die optimale, selektiv reduktive Aktivierung der Verbindungen (Ph-R) als auch für die Reaktion der Intermediate mit Zellstrukturen (Ph-W) die schwierigere sterische und elektronische Abstimmung auf entsprechende Enzyme und Zielmoleküle am erfolgversprechendsten zu sein [150]. In diesem Zusammenhang sollte die Bevorzugung bestimmter, für die Wirkung verantwortlicher Reaktions- und Stoffwechselfade über gezielte strukturelle Veränderungen möglich sein. Für diese Entwicklung ist das Wissen über Art, Vorkommen und Konzentration der entsprechenden Redoxenzyme in hypoxischen Tumoren und anderen Geweben und deren Bedeutung für die Aktivierung der jeweiligen Nitroverbindung einerseits, und das Wissen über die Anteile der verschiedenen reaktiven Intermediate und deren Bindungsmechanismen an Zellstrukturen andererseits von entscheidender Bedeutung [143,149,153,163]. Abgesehen vom Vergleich der 2- und 5-Nitroimidazole liegen hier in der Literatur kaum Daten vor. Weiterhin darf natürlich die Pharmakokinetik, die maßgeblich über Parameter wie den Verteilungskoeffizienten und den pKa bestimmt wird, nicht unberücksichtigt bleiben [161].

1.9.3 Nitroimidazole als Hypoxietracer in der nuklearmedizinischen Diagnostik [164]

Die Sauerstoffversorgung von Zellen ist für die meisten menschlichen Gewebe von entscheidender Bedeutung. Die Verminderung der Sauerstoffkonzentration kann, je nach Ausmaß und Dauer, von der Verminderung der Zellfunktionen, über eine grundlegende Umstellung des Zellstoffwechsels (Hypoxie), bis hin zum Zelltod (Nekrosis) führen. Folglich spielt die Kenntnis des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) der Gewebe in vielen Bereichen der Medizin eine entscheidende Rolle. Neben der oben ausführlich dargestellten Problematik der Tumorthherapie (s. 1.8) sind hier für den diagnostischen Bedarf die Bereiche Herz und Hirn zu nennen. Allgemein ist in diesem Zusammenhang sowohl die akute Diagnose mit der Lokalisation des hypoxischen Zentrums und der Unterscheidung von nekrotischen und lebensfähigen Bereichen als auch die Früherkennung solcher Bereiche mit der Möglichkeit, die Organfunktion durch frühzeitige Intervention zu erhalten, von großer Bedeutung. Für einige Hypoxietracer konnte im vorklinischen Stadium sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* Experimenten ein grundsätzliches diagnostisches Potential unter definierten Bedingungen aufgezeigt werden. Trotzdem muß der Nutzen und die Aussagefähigkeit dieser Methode noch unter weniger genau definierten klinischen Bedingungen demonstriert werden [164,165].

Herz

Gerade beim akuten Herzinfarkt spielt die schnelle Unterscheidung von hypoxischem bzw. ischämischem und nekrotischem Gewebe klinisch eine wichtige Rolle. Die heutigen Hypoxietracer erlauben allerdings erst eine Messung nach frühestens 2 h, so daß nicht ein Bild der momentanen Situation, sondern nur eine integrale Messung möglich ist [164]. Da sowohl die Anreicherung in hypoxischen und normoxischen Zellen als auch die Plasmahalbwertszeit eines Tracers mit zunehmender Lipophilie ansteigt, können bessere Auflösungen nur

mit lipophilen Hypoxietracern in Verbindung mit längeren Inkubationszeiten erreicht werden [200]. Darüber hinaus ist die starke Leberanreicherung gerade bei Herzmessungen als störender Untergrund besonders problematisch.

Hirn

Für die Hirndiagnostik sind zwei Situationen von Bedeutung, die mit Flowtracern nicht zugänglich sind. Zum einen soll, wie beim Herzen, hypoxisches, aber lebensfähiges und nekrotisches Gewebe unterschieden werden; zum anderen soll der Grenzfall der "ischemic penumbra" diagnostiziert werden können. Bei der "ischemic penumbra" handelt es sich um eine Versorgungssituation nach einem Schlaganfall, bei der zwar die Funktionalität des Gewebes aufrecht erhalten werden kann, langfristig aber irreversible Schäden zu erwarten sind [164]. Bei der Konzeption von Hirntracern muß die Blut-Hirn-Schranke berücksichtigt werden.

Die Tragweite eines allgemein anwendbaren, diagnostischen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Gewebe- pO_2 kann nicht überschätzt werden. Trotzdem ist die klinische *in vivo* Bestimmung von pO_2 bis heute problematisch [105,126,164].

Zur klinischen Routineanwendung sind in diesem Bereich Verfahren zu bevorzugen, die eine einfache, schnelle und nicht-invasive Anwendung erlauben und damit zu Reihenuntersuchungen geeignet sind. Daher bietet sich der Einsatz der tomographischen Verfahren SPET und PET an. Speziell bei der Tumorthherapie werden diesbezüglich die folgenden klinischen Anforderungen an die Diagnostik gestellt:

- Detektion von radiobiologisch resistenten Regionen in Tumoren (radiobiologische Hypoxie)
- Quantifizierung dieser Regionen vor und nach einer Therapie (Therapiekontrolle)
- Prognosemöglichkeit über den Erfolg einer Therapieform

Bei der allgemeinen Bestimmung von Gewebe- pO_2 gilt für den Hypoxietracer, daß hohe differentielle Bindungsraten in Verbindung mit moderaten Clearanceraten und einer schnellen Gewebeverteilung eine kurzfristige Messung bei geringem Untergrund und damit guten Auflösungen ermöglichen. Kurzfristige Messungen sind sowohl beim Einsatz kurzlebiger Radionuklide (PET) als auch bei der Diagnose akuter Zustände wichtig [164]. Ein idealer Hypoxietracer sollte zusammenfassend folgende Eigenschaften aufweisen [123,230]:

- schnelle Kinetik der irreversiblen Bindung mit hohen absoluten Bindungsraten
- hohe Differenzierung der Bindungsraten *in vivo* zwischen hypoxischem und oxidischem Gewebe
- irreversible Bindung an Biomoleküle zu Verbindungen, die die Zellmembran nicht passieren können
- ausschließliche und quantifizierbare Abhängigkeit der Bindungsrate von der Sauerstoffkonzentration während der Inkubation (speziell zur Tumordiagnostik: Bindungsrate proportional zur radiobiologischen Resistenz des Gewebes)
- mittlere Verteilungskoeffizienten, die sowohl die schnelle Verteilung innerhalb aller Gewebe als auch eine adäquate Clearancerate zur entsprechenden Verminderung des Untergrundes ermöglichen
- einfache Markierung mit SPET- bzw. PET- Radionukliden mit hohen spezifischen Aktivitäten

Hypoxietracer

1979 wurden die bis dahin als Radiosensibilisatoren eingesetzten Nitroimidazole erstmals von Chapman zur Anwendung als Hypoxie-Marker vorgeschlagen und 1981 mittels [^{14}C]Kohlenstoff markiertem Misonidazol

erfolgreich getestet [107,120]. Misonidazol wurde als Leitsubstanz dieser Verbindungsklasse ausgiebig untersucht und erfüllte dabei im großen und ganzen die oben gestellten Anforderungen. Es wird mit zellulären Makrostrukturen konjugiert, wobei diese Konjugate mit einer Halbwertszeit von etwa 50 h ausgewaschen werden. Da Misonidazol selbst mit einer Halbwertszeit von 0,7 h aus dem Organismus eliminiert wird, kann nach etwa 7 - 12 h eine maximale Auflösung erreicht werden. Die Bindung ist umgekehrt proportional zur lokalen Sauerstoffkonzentration [146,167] und unabhängig von der Konzentration anderer Biometaboliten und Nährstoffe, so daß grundsätzlich quantitative Messungen möglich sind [107]. Die Bindung setzt bei einem pO_2 von < 10 mm Hg ein [98] und erreicht ihren Halbmaximalwert (K_m) je nach Gewebe bei Sauerstoffkonzentrationen von 1 - 5 mm Hg (1000 - 6000 ppm) [164]. Zum Vergleich liegen in gesunden Geweben übliche pO_2 von 15 - 70 mm Hg vor, wobei auch in geringem Maße extreme Werte von 1,5 oder 90 mm Hg erreicht werden können [168]. Dagegen erreicht der radiobiologische Sauerstoff-Effekt, bei dem Sauerstoff als Radiosensibilisator angesehen wird, mit zunehmendem pO_2 bei etwa 4 mm Hg seinen Halbmaximalwert, um nach steilem Anstieg bei etwa 20 - 25 mm Hg in ein Plateau überzugehen [93,105,164]. Daher sollte der pO_2 durch Misonidazolderivate grundsätzlich im strahlenbiologisch relevanten Bereich bestimmbar sein. Mit [3H]- und [^{14}C]Misonidazol konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, daß die quantitative Bestimmung von Gewebe pO_2 grundsätzlich möglich ist, wobei die hypoxische Anreicherung eine starke Abhängigkeit vom jeweils betrachteten Gewebe aufweist [146,167]. Mit Fluormisonidazol als Hypoxietracer konnte eine für die Strahlentherapie relevante Bestimmung der Tumorphypoxie *in vivo* durchgeführt werden [106].

Diese vielversprechenden Ergebnisse haben dazu geführt, daß bisher, abgesehen vom Fluormetronidazol [169], einigen Technetium-4-Nitroimidazolkomplexen [170] und einigen Kohlenhydratderivaten [171], ausschließlich dem Misonidazol analoge 2-Nitroimidazolderivate als Radiohypoxietracer eingesetzt worden sind [126,164]. Alle 4- und 5-Nitroimidazolderivate scheinen als Hypoxietracer ungeeignet zu sein.

SPET-Hypoxietracer

Zur Markierung von Hypoxietracern wurden neben dem [^{99m}Tc]Technetium auch Radioiod und Radiobrom verwendet. Zum Verständnis der biochemischen Eigenschaften sind die Verteilungskoeffizienten P der Tracer von Bedeutung. Daher findet sich in Tab. 1.9-2 eine Zusammenfassung der P der wichtigsten Verbindungen

Tab. 1.9-2 Verteilungskoeffizienten P Octanol/Wasser einiger Nitroimidazolhypoxietracer

Verbindung	P	Literatur
Misonidazol	0,41	81
Iodvinylmisonidazol	2,52	81
Fluormisonidazol	0,4	81
4-Brommisonidazol	2,87	172
IPENI	694	173
5'-IAZR	2,1	174
5'-IAZA	4,98	175
IAZP	0,9	164
FIAZP	6,3	176

IPENI: 1-[2-(2-Iodphenoxy)-ethyl]-2-nitroimidazol, 5'-IAZR: 1-(5-Iod-5-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2-nitroimidazol, 5'-IAZA: 1-(5-Iod-5-deoxy- β -D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazol, IAZP: 1-(4-Iod-4-deoxy- β -L-xylopyranosyl)-2-nitroimidazol, FIAZP: 1-(2-Fluor-4-iod-2,4-deoxy- β -L-xylopyranosyl)-2-nitroimidazol

Alle Hypoxietracer weisen mehr oder weniger die für Misonidazol charakteristische Anreicherung in der Leber, den Nieren, dem Gastrointestinaltrakt und der Lunge auf. Ebenfalls wird im allgemeinen eine zweiphasige *in vivo* Clearance mit einer kurzen Halbwertszeit im Minutenbereich und einer langen Halbwertszeit im Stundenbereich beobachtet.

- Radiobrom

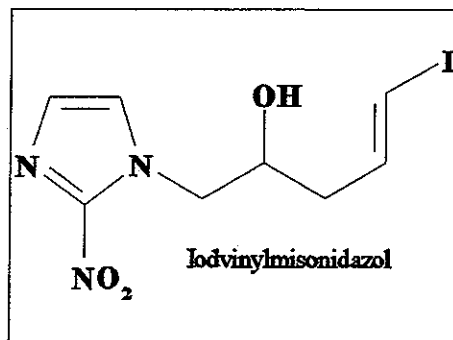
In diesem Zusammenhang wurde Misonidazol direkt am Imidazolkern radiobromiert. Das erhaltene 4-Radiobrom-Misonidazol ist aber aufgrund der *in vivo* instabilen Radiobrombindung, die zu einem hohen Untergrund führt, als Hypoxietracer ungeeignet [172].

- Radioiod

Die Radioiodverbindungen können grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen die relativ große Gruppe der Kohlenhydratanaloga, zum anderen die mit einem "Markierungsteil" versehenen Misonidazolanaloga.

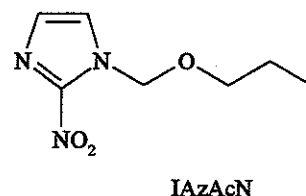
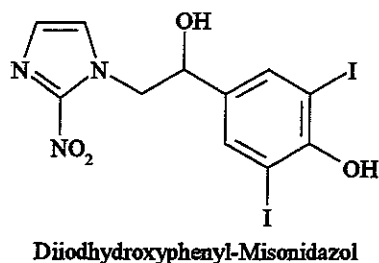
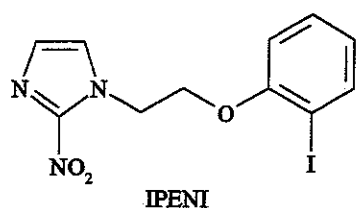
Misonidazolanaloga

Das Iodvinylmisonidazol ist das in diesem Zusammenhang am meisten getestete Misonidazolanalogon. Es weist eine höhere Lipophilie als Misonidazol (s. Tab. 1.9-2) auf und ist erwartungsgemäß gegenüber der *in vivo* Radiodeiodierung stabil. Der Tracer wird über eine elektrophile Demetallierung aus dem Tributylstannylvorläufer in guten RCA und mit hoher radiochemischer Reinheit erhalten. In verschiedenen Zelltypen, insbesondere im Tumor- und Herzgewebe, konnte die hypoxische



in vitro Anreicherung nachgewiesen werden, wobei diese etwas niedriger ausfällt als beim Fluormisonidazol [81]. Bei Tierexperimenten (Hund) zeigte sich die übliche Anreicherung in Leber-, Nieren- und Lungengewebe. Darüber hinaus konnte in diesem *in vivo* Modell gezeigt werden, daß Iodvinylmisonidazol grundsätzlich zur Myocardiagnostik geeignet ist. Allerdings wird nur eine qualitative Beziehung zwischen dem Blutfluß und der Iodvinylmisonidazolanreicherung mit einer starken Abhängigkeit von der Gewebeart gefunden. Ansonsten sind die erhaltenen Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit analogen Fluormisonidazoluntersuchungen [177].

Als weitere Misonidazolanaloga sind das 1-[2-(2-Iodphenoxy)-ethyl]-2-nitroimidazol (IPENI) und das 2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-1-(3,5-diiod-4-hydroxyphenyl)ethanol (Diiodhydroxyphenyl-Misonidazol) zu nennen.



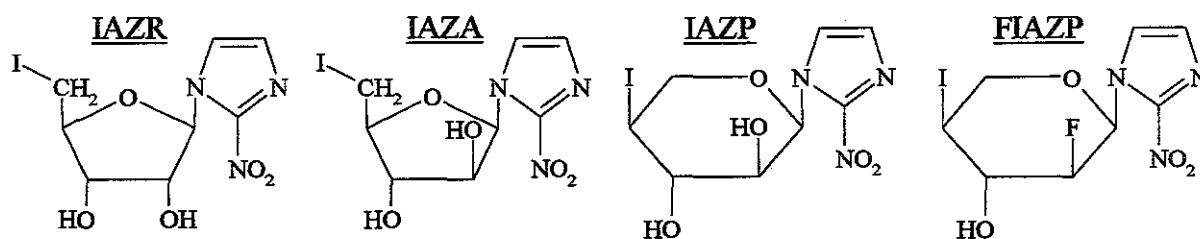
Auch wenn beide Moleküle gut markierbar und gegenüber der *in vivo* Deiodierung stabil sind, wird bei ihnen

bezüglich der *in vivo* Anreicherung nur ein Tumor/Blut Quotient < 1 beobachtet [173,178]. Zudem wird eine hohe Plasmaproteinbindung und eine geringe Abhängigkeit der zellulären Bindung von der Sauerstoffkonzentration gefunden [175].

Darüber hinaus wurde ein 2-Iodethoxyderivat des Azomycins (IAzAcN) als Hypoxietracer vorgestellt. In einer direkten "Radioiod gegen Iod"-Austauschreaktion konnte die Verbindung in RCA von 80 % mit $[^{125}\text{I}]$ Iod markiert werden. Bei *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell werden sowohl eine überraschend geringe Deiodierung (0,6 % ID) als auch eine signifikante Aufnahme im Tumorgewebe gefunden [78].

Kohlenhydratanaloga

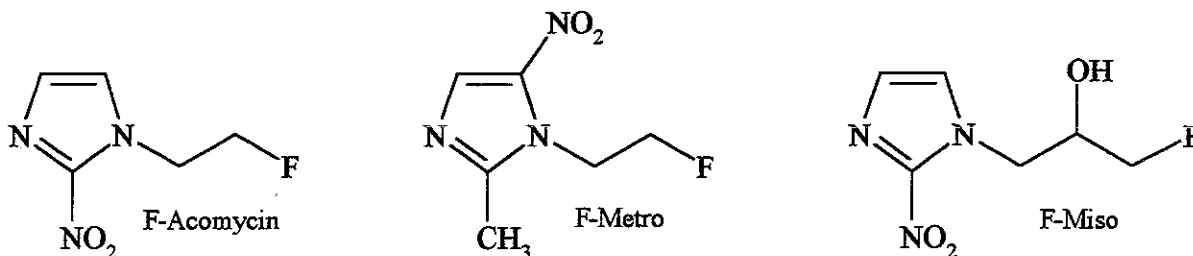
Aufgrund der schlechten Hypoxietracereigenschaften des IPENI wurden Nitroimidazole mit Kohlenhydraten konjugiert. Dadurch sollte dem Hypoxietracer die Anreicherung im Tumor durch aktiven Transport erleichtert und gleichzeitig eine geringere Lipophilie erreicht werden. Ein zentrales Problem dieser Konjugate ist die Markierung zu *in vivo* stabilen Radioiodverbindungen. So weist das schon 1986 vorgestellte Radioiod-azomycinribosid IAZR zwar eine hohe Affinität zu Nukleosid-Membran-Transportern und eine bedeutend höhere Bindungsrate in hypoxischen Geweben auf als Misonidazol, zeigt aber aufgrund der einfachen Radioiod-Kohlenstoffbindung Deiodierung *in vivo* [164,174]. Allerdings wurde angenommen, daß die Deiodierung nicht direkt am IAZR, sondern erst nach einer enzymatischen Spaltung der Glykosidbindung abläuft. Folglich sollten gegenüber der Glykosidspaltung stabilere Kohlenhydratanaloga auch eine höhere Stabilität bezüglich der *in vivo* Deiodierung aufweisen. Das entsprechende β -Anomer IAZA zeigt jedoch bei sonst ähnlichem Tumorbindungsverhalten nur eine etwas geringere Deiodierung [175]. Bei Humanuntersuchungen konnte grundsätzlich die Möglichkeit zur Bestimmung der Tumorphoxie mit IAZA als Hypoxietracer demonstriert werden. Bei einer Eliminationshalbwertszeit von 9,8 h wurden nach etwa 20 h Tumorbilder erhalten [174]. In einer *in vitro* Studie wurden, abgesehen von einem unvorteilhaften Anstieg der Schilddrüsenaktivität, ähnliche Bindungsmuster und Sauerstoffabhängigkeiten gefunden wie beim Misonidazol [179].



Weitere Verbesserungen der *in vivo* Stabilitäten konnten durch die direkte Einführung des Radioiods in einen Pyranosering beim IAZP erreicht werden. Die gleichzeitige Fluorierung der 2-Position der Pyranose beim FIAZP führt im Vergleich zum IAZP zwar nicht zur erhofften verbesserten *in vivo* Stabilität, ermöglicht aber grundsätzlich bei entsprechender Markierung einen Vergleich von PET- und SPET-Studien. Die höhere Lipophilie von FIAZP, verglichen mit IAZP (Tab. 1.9-2), bedingt bei gleicher Anreicherung eine längere Eliminationshalbwertszeit und damit eine schlechtere Auflösung. Auffällig ist die relativ hohe Leberanreicherung des FIAZP im Vergleich zu anderen Tracern. Grundsätzlich wird jedoch für beide Verbindungen eine gute hypoxische Tumoranreicherung *in vivo* und *in vitro* beobachtet [176,180].

PET-Hypoxietracer

Für [^{18}F]Fluormisonidazol ([^{18}F]-Miso) als PET-Hypoxietracer sind bisher die meisten Untersuchungen durchgeführt worden. Trotz vergleichbarer *in vivo* Charakteristiken von F-Azomycin und F-Metro mit F-Miso konnte mit diesen Tracern keine ausreichende Anreicherung in hypoxischem Gewebe erreicht werden [169].

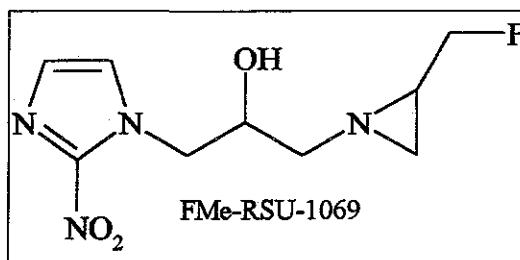


Abgesehen von der um den Faktor 2 - 3 stärkeren Anreicherung in den Nieren und der Leber zeigt F-Miso ein ähnliches *in vivo* Verhalten wie das Misonidazol. Bei gleichen Plasmahalbwertszeiten wird für F-Miso allerdings eine etwas geringere Tumoraufnahme gefunden [172,181]. Das Bindungsverhalten von F-Miso, insbesondere die Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration und der Zelllinie, stimmt mit dem von Misonidazol überein [182].

[^{18}F]-Miso konnte erst nach großen anfänglichen Schwierigkeiten [184] sowohl durch eine 2-Stufenreaktion über das [^{18}F]Epifluorhydrin innerhalb von 45 min mit 40 % RCA [185] als auch durch eine direkte Radiofluorierung des Toluolsulfonsäure- bzw. des Methansulfonsäurederivates in einer Eintopfreaktion innerhalb von 50 min mit 55-80 % RCA [186] dargestellt werden. Die Eignung von [^{18}F]-Miso als Hypoxietracer konnte im Bereich der Herz- und Tumordiagnostik an *in vitro* und *in vivo* Modellen demonstriert werden [106,187,188]. Am Herzen wurde allerdings eine geringe Bindung an nekrotischem Gewebe beobachtet [106,188]. Trotzdem konnte gezeigt werden, daß [^{18}F]-Miso grundsätzlich geeignet ist, nach einem Infarkt solche hypoxischen Herzbereiche aufzuzeigen, die lebensfähig sind und deren Funktion durch Reperfusion wieder hergestellt werden kann [189]. Bei der PET-Tumordiagnostik konnte gezeigt werden, daß mit [^{18}F]-Miso eine Therapiekontrolle bezüglich der konventionellen Radiotherapie beim Menschen möglich ist. Zur Quantifizierung der PET-Messungen wurden Bereiche, die nach einer zweistündigen Inkubationszeit einen Tumor/Plasma Quotienten > 1,4 aufwiesen, als hypoxisch definiert. Eine Korrelation des Anteils dieser Bereiche mit der Strahlenresistenz und damit mit der Hypoxie konnte aufgezeigt werden, so daß das Verschwinden dieser Bereiche während einer fraktionierten Strahlentherapie die Reoxygenierung des Tumors und damit das Ansprechen der Therapie anzeigen könnte [106,190,191].

Neuerdings wird das [^{18}F]FMeRSU-1069 in Anlehnung an die bifunktionellen bioreduktiven Verbindungen als PET-Hypoxietracer vorgeschlagen. Die Verbindung kann mit einer RCA von 16 % erhalten werden. Weiterführende Studien liegen allerdings noch nicht vor [192].

Die physiologischen Eigenschaften der Misonidazol-analoga, insbesondere die Plasmahalbwertszeiten im Stundenbereich, erfordern entsprechende Wartezeiten bis zur Einstellung vernünftiger Tumor/Blut-Quotienten. Die zur Inkubationszeit proportionale Auflösung der Messung ist somit bei PET-Messungen mit [^{18}F]-Miso durch die Halbwertszeit des [^{18}F]Fluors begrenzt. In neueren Ansätzen soll dieses Problem durch



die Veränderung des Reduktionspotentials und der Lipophilie des Tracers angegangen werden [162,193].

Radiometallkomplexe der Nitroimidazole als Hypoxietracer

Im Hinblick auf die Markierung von Nitroimidazolen zu SPET-Tracern ist die Bildung von Metallkomplexen mit Radiometallen von Interesse. Diese sind im allgemeinen unter den sauren, reduktiven Bedingungen der hypoxischen Zellen instabil, so daß die Metalle zu ihrer elementaren Form reduziert werden sollten. Für die hypoxische Anreicherung könnte demnach durch den Einsatz von Nitroimidazol-Metall-Komplexen ein weiterer Anreicherungsmechanismus ausgenutzt werden. Allerdings wurden Metallkomplexe mit direkter Nitroimidazol-Bindung bisher nur als Radiosensibilisatoren eingesetzt [194].

Bei den Metallradionukliden kommt dem [^{99m}Tc]Technetium eine besondere Bedeutung zu. Technetium kann zwar grundsätzlich direkt mit Imidazolen koordiniert werden, wobei aber nur relativ instabile Verbindungen entstehen, die in wäßrigen Lösungen einer schnellen Hydrolyse unterliegen. Nitroimidazolkomplexe mit direkter Tc-Nitroimidazolbindung sind nicht bekannt, so daß dieser Weg für Nitroimidazol-Tc-Komplexe weniger geeignet zu sein scheint [195]. Beim Ru konnten durch die Ergänzung von zusätzlichen komplexierenden Gruppen am Nitroimidazolkern stabile Verbindungen erhalten werden [196].

Einige indirekte Nitroimidazol-Metallkomplexe, bei denen das Nitroimidazol mit komplexbildenden Molekülen konjugiert wird, sind als Hypoxietracer vorgeschlagen und getestet worden. So konnten Komplexe mit ^{67}Ga und ^{111}In erhalten werden, die allerdings kaum eine Anreicherung in hypoxischen Geweben bzw. Tumoren zeigten [197].

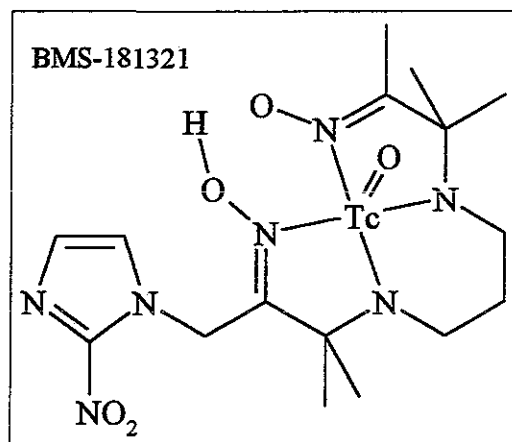
Vom Technetium sind in diesem Zusammenhang bisher 3 mit [^{99m}Tc]Tc markierte Komplextypen bekannt geworden:

- a) Tc-BATO-Nitroimidazolkomplexe
- b) Tc-PnAO bzw. Amido-Tc-PnAO-Nitroimidazolkomplexe
- c) Tc-Schiff'sche Base-Nitroimidazolkomplexe

Anfangs wurde eine Reihe von 7fach koordinierten [^{99m}Tc]Bato Nitroimidazolkomplexen (Boronic Acid adducts of Technetium diOximes) dargestellt. Diese weisen jedoch deutlich geringere enzymatische und elektrochemische Reduktionsraten auf als das Misonidazol und sind somit als Hypoxietracer ungeeignet [111,198].

Auch die Tc-Schiff'sche Base-Nitroimidazolkomplexe sind aufgrund ihrer geringen Permeabilität durch Zellmembranen als Hypoxietracer nur wenig geeignet. Sowohl in normoxischen als auch in hypoxischen Zellen wird dieser Tracer hauptsächlich in der Zellmembran gefunden [164]. Bessere Ergebnisse konnten mit Komplexkernen des Tc (V) oxo propylenamin oxim -Typs ([^{99m}Tc]TcO(PnAO) erhalten werden [199]. Als besonders vielversprechend hat sich hier das BMS-181321 erwiesen, für das die hypoxische Anreicherung im Myocard [200], im Hirn und in Tumoren

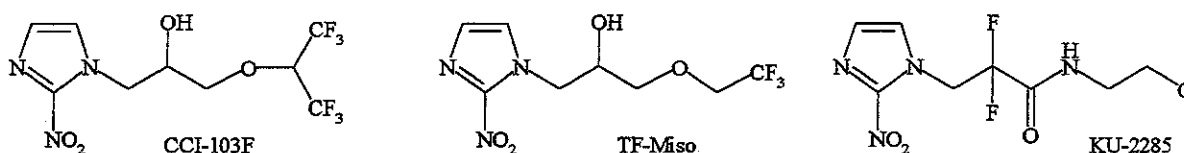
gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu den Misonidazolderivaten scheint die Anreicherung durch die Bildung kleiner hydrophiler Molekülfragmente bedingt zu sein, die die Zellmembran nur noch schwer überschreiten können [164,201]. Darüber hinaus wird von Amersham International ein Amido-



[^{99m}Tc]TcO(PnAO)-Nitroimidazolkomplex angeboten [164].

Marker für hypoxische Zellen in Verbindung mit anderen Verfahren

Außer PET und SPET, denen radioaktiv markierte Verbindungen zugrunde liegen, finden sich in der Literatur hauptsächlich noch drei weitere Verfahren zur Abbildung hypoxischer Zellen, die von entsprechenden nitroaromatischen Verbindungen ausgehen. Die in diesem Zusammenhang wichtigsten Verbindungen sind die unten aufgeführten Nitroimidazolderivate. Dabei sind KU-2285 und seine Derivate nur von theoretischem Interesse, da diese Verbindungen bisher nur als Radiosensibilisatoren getestet worden sind [202,203].



Bei der ¹⁹F-NMR-Spektroskopie wurden die 2-Nitroimidazolderivate Bis-trifluormethylmisonidazol (CCI-103F), Fluormisonidazol und das Trifluormethylmisonidazol (TF-Miso) erfolgreich eingesetzt. Nach 24 h ist die gesamte ungebundene Substanz ausgewaschen, so daß die hypoxischen Bereiche dann detektiert werden können. Die Anreicherung der fluorierten Verbindungen stimmt mit der vom radiomarkierten Misonidazol gut überein. Das Verfahren ist allerdings durch die Toxizität und der damit verbundenen Maximalkonzentration der Nitroimidazoltracer begrenzt. Überdies wird eine Defluorierung des CCI-103F beobachtet [117,204,205].

Bei der zweiten Alternative handelt es sich um die **Fluoreszenzanalyse**. Hier werden unter definierten Bedingungen fluoreszierende Tracer eingesetzt, die man durch Konjugation der Wirkstoffe mit entsprechend fluoreszierenden Molekülen erhält. Als Fluoreszenzmarker für hypoxische Zellen wurden neben vielen aromatischen Nitroverbindungen mit Eigenfluoreszenz [206] auch entsprechende Konjugate des 2-Nitroimidazoles eingesetzt [207,208]. Hierbei ist die Änderung der definierten Fluoreszenz des Tracers nach der Reduktion unter *in vivo* Bedingungen problematisch. In diesem Zusammenhang wurde auch eine reduktive *in vivo* Fluoreszenzaktivierung der Tracer untersucht. Hier wäre ein störender Untergrund der Muttersubstanz ausgeschlossen, so daß eine hohe Auflösung schon nach kurzen Inkubationszeiten erreicht werden könnte. Die Fluoreszenzanalyse ist zwar grundsätzlich für *in vivo* Untersuchungen geeignet, wird aber durch die Verfügbarkeit geeigneter Frequenzen des Anregungslasers eingeschränkt [209].

Darüber hinaus wurde eine Detektion von hypoxischen Zellen auf der Basis von **monoklonalen Antikörpern** [210,211] und durch **immunohistochemische Verfahren** in Verbindung mit einer Auswertung sowohl durch Autoradiographie [212] als auch durch Fluoreszenz [213] vorgestellt. Auch ein entsprechender **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wurde entwickelt [214]. All diese Verfahren wurden ausgehend vom Bis-trifluormethylmisonidazol (CCI-103F) erarbeitet.

2. Problemstellung

Im Rahmen der nuklearmedizinischen Diagnostik steht mit den Nitroimidazolen (NI) eine Verbindungsklasse zur Verfügung, die als Hypoxietracer prinzipiell eine nicht-invasive Diagnostik von hypoxischen Geweben und deren Unterscheidung von nekrotischen Bereichen erlaubt. Mit Misonidazol als Leitsubstanz konnte mittels autoradiographischer Studien grundsätzlich die Eignung dieser Verbindungsklasse zur Entwicklung eines Meßverfahrens zur quantitativen Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in Tumoren, Herz und Hirn aufgezeigt werden. Auch für die Emissionstomographie (PET und SPET) wurden Hypoxietracer für diesen Zweck vorgeschlagen und getestet. Eine diagnostische Routineanwendung zur Auswahl einer geeigneten Therapieform in diesen Bereichen steht jedoch bis heute nicht zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue ^{123}I -markierte Hypoxietracer auf der Basis von NI, insbesondere dem 2-Nitroimidazol (2-NI) für SPET-Untersuchungen entwickelt werden. Hierbei war vor allem die Konjugation dieser Basisverbindungen mit Aminosäuren vorgesehen, die mit Radioiod zu *in vivo* stabilen Verbindungen markierbar sind. Als Radioisotop für die Synthese und Optimierung sollte zunächst anstelle des ^{123}I -Iod das ^{131}I -Iod verwendet werden, da es eine günstige Halbwertszeit in Verbindung mit einer meßtechnisch vorteilhaften Strahlenemission aufweist und kommerziell kostengünstig erhältlich ist.

Für die einzelnen Hypoxietracer sollten geeignete Markierungsvorläufer und entsprechende Standardverbindungen synthetisiert werden. Es war die Ausarbeitung einer praktisch trägerfreie (n.c.a.) Markierung und die Optimierung deren Reaktionsparameter geplant. Hierzu sollten eine leistungsfähige Reinigung und Trennung der Markierungsprodukte unter Einsatz der HPLC erarbeitet und optimiert werden. Schließlich war die Überführung der Tracer in eine applizierbare Form vorgesehen, um pharmakokinetische Organverteilungsstudien am Tiermodell vornehmen zu können.

Zunächst sollte der N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p- ^{131}I -iod-D,L-Phenylalaninmethylester (^{131}I -P2NI-Me), ein Konjugat von 2NI mit Phenylalanin synthetisiert werden. Hierbei waren prinzipiell zwei Radiosynthesewege möglich. Zum einen war eine Markierung ausgehend vom synthetisch leicht zugänglichen N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-brom-D,L-Phenylalaninmethylester (Br-P2NI-Me) durch Cu(I)-katalysierten "Brom gegen Radioiod"-Austausch denkbar. Zum anderen konnte alternativ die Iodmetallierung ausgehend von der Tributylstannylverbindung versucht werden, bei der durch die elektrophile Destannylierung eine einfache regioselektive Radioiodierung möglich ist. Nach der erfolgreichen Durchführung einer Markierungsmethode sollten die Markierungsparameter optimiert und schließlich anhand der ermittelten Pharmakokinetik und der *in vivo* Stabilität der Verbindung gegenüber der Deiodierung eine Optimierung der pharmakologischen Eigenschaften durch entsprechende funktionale Veränderungen erreicht werden. Auch die durch diese Überlegungen erhaltenen neuen Verbindungen sollten markiert und ihre pharmakokinetischen Daten bestimmt werden.

Als weiterer Ansatz war die Radioiodierung des Tyrosinanalogen α -Methyl-N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3- ^{131}I -iod-L-tyrosinmethylesters durch direkte elektrophile Substitution geplant. Auch hier war nach der Syntheseoptimierung und Aufarbeitung die Bestimmung der Pharmakokinetik und der *in vivo* Stabilität der Verbindung gegenüber der Deiodierung vorgesehen. Aufgrund der pharmakokinetischen Daten sollte gegebenenfalls eine Variation der Struktur vorgenommen werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Theoretischer Ansatz zur Syntheseplanung der Nitroimidazoltracer

In dieser Arbeit bestand die Aufgabe darin, neue Nitroimidazolderivate zu synthetisieren, die sich aufgrund ihrer physikalischen, chemischen und biochemischen Eigenschaften zur Radiodiagnostik von hypoxischem Gewebe eignen sollten. Zur Konstruktion solcher Verbindungen wurden die geforderten Eigenschaften jeweils auf verschiedene molekulare Strukturen übertragen, wobei sich ein zusammengesetztes Zielmolekül ergibt. Hieraus lässt sich das in Abb. 3.1-1 aufgeführte, allgemeine modellhafte Bild eines Zielmoleküls ableiten.



Abb. 3.1-1 Modell eines Radiotracer

Folglich kann man sich das Zielmolekül aus folgenden Elementen zusammengesetzt denken:

A: Akkumulationsteil

Diese Struktureinheit ist der eigentliche Wirkstoff, von dem bei der Konstruktion ausgegangen wird und dessen biochemische Eigenschaften bekannt sind. Es sollte eine möglichst spezifische biochemische Reaktion bzw. Akkumulation innerhalb bestimmter Gewebe auftreten. Weiterhin sind chemische Funktionen erforderlich, die das Verknüpfen mit den anderen Komponenten, ohne eine Einschränkung der erwünschten biochemischen Reaktionen, erlauben.

Im Fall der Hypoxiemarker handelt es sich hier um Nitroaromaten, wobei sich Nitroimidazole als besonders geeignet herausgestellt haben. In dieser Arbeit wird das 2-Nitroimidazol als Akkumulationsteil verwendet.

B: Markierungsteil

Der Markierungsteil stellt die zur Detektion des Tracers erforderliche Struktureinheit dar. Je nach Detektionsverfahren werden an diesen Teil verschiedene Anforderungen gestellt. So kann es sich hier beispielsweise

- um ein radioaktives Isotop oder einen einfachen markierbaren Molekülteil für PET- und SPET-Untersuchungen,
- um ^{19}F tragende Moleküle für die ^{19}F -Kernspintomographie
- oder aber um fluoreszierende Moleküle für die Fluoreszenzdetektion handeln.

Der Markierungsteil sollte eine hohe *in vivo* Stabilität sowohl gegenüber dem metabolischen Abbau als auch bezüglich der Bindung an das Wirkstoffmolekül aufweisen. Weiterhin darf natürlich die spezifische biochemische Reaktion des Zielmoleküls nicht beeinträchtigt werden.

Speziell für die Einführung von Radioiod als SPET-Nuklid sind die unter 1.6 diskutierten Parameter von Bedeutung. Neben den Stabilitätsanforderungen ist hier auch eine einfache Markierbarkeit dieser Struktureinheit zu berücksichtigen.

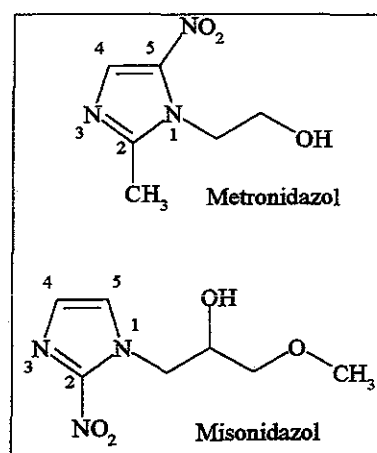
C: Modifikator

Für die Brauchbarkeit eines Diagnostikums ist nicht nur das spezielle, durch Teil A repräsentierte biochemische Verhalten, sondern auch das allgemeine *in vivo* Verhalten wie Pharmakokinetik, Metabolismus und Verteilung innerhalb des Organismus von großer Wichtigkeit. Diese Eigenschaften können durch geeignete Wahl des Modifikators gesteuert werden. So kann durch die Einführung von Strukturelementen, deren Metabolismus bekannt ist, die Pharmakokinetik des Tracers vorherbestimmt werden. Hier ist beispielsweise der Einbau einer "metabolischen Sollbruchstelle" vorstellbar (z.B. Heroin-Trapping [183]). Auch das Ankoppeln von "Carriern", die unter Ausnutzung von Transportsystemen die Überschreitung von Diffusionsbarrieren (Blut-Hirn-Schranke [183]) oder aber eine erhöhte Diffusion ins Zielgebiet erlauben, ist hier denkbar. Weiterhin kann durch den Modifikator die Lipophilie und mittels der Einführung bestimmter Funktionen, wie z.B. saurer oder basischer Gruppen [215,216], die Gesamtverteilung des Zielmoleküls im Organismus stark beeinflusst werden [217,218]. Grundsätzlich ist für die Modifikation des Zielmoleküls ein breites Wissen über Struktur-Wirkungsbeziehungen notwendig. Darüber hinaus dürfen natürlich die *in vivo* Stabilität und die Wirksamkeit des Zielmoleküls nicht negativ beeinflusst werden.

Diese theoretische Aufteilung des Zielmoleküls ist nicht zwingend. So können die Funktionalitäten auch in einem Molekül vereinigt vorliegen oder aber durch die Einführung funktioneller Gruppen in das "Basismolekül" gewährleistet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aromatische Aminosäuren zur Ankopplung eingesetzt, die sowohl als Modifikator als auch als Markierungsteil dienten.

3.2 Aminosäurekonjugate des 2-Nitroimidazols

Zur Markierung wurden innerhalb der Themenstellung Konjugate des 2-Nitroimidazols mit Aminosäuren ins Auge gefaßt. 2-Nitroimidazole wurden sowohl als Radiosensibilisatoren als auch bei der Diagnostik von hypoxischen Geweben erfolgreich eingesetzt. Anders als bei den zum Metronidazol analogen 5-Nitroimidazolen sind sie chemisch einfacher handhabbar, da das 4,5-Tautomerieproblem hier nicht berücksichtigt werden muß. Die häufig bei der Synthese von 5-Nitroimidazolen als Nebenprodukt anfallenden 4-Nitroimidazole weisen mit ihren niedrigen Reduktionspotentialen auch eine bedeutend geringere pharmakologische Aktivität auf.



Durch den Einsatz der Aminosäuren als wichtige Stoffwechselprodukte sollte in folgender Hinsicht eine Modifikation bewirkt werden:

- Erleichterung der Diffusion durch Zellmembranen durch aktiven Beitrag von Transportsystemen
- Beitrag zur Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke durch Nutzung der Aminosäure-Carrier
- Anreicherung in schnell wachsenden Tumoren aufgrund des erhöhten Nährstoffbedarfs

- Realisierung von brauchbaren Auswaschraten des Tracers über die Ausnutzung eines geeigneten Metabolismus

Die natürlichen Aminosäuren können durch künstliche Derivate ersetzt werden, deren biochemische Eigenschaften durch einfache Modifikationen gezielt verändert worden sind. Als Beispiele seien hier der Einsatz der enantiomeren D-Formen und die Modifikation durch die Einführung von α -Methyl- oder α -Trifluormethylgruppen genannt. Die Auswirkungen reichen vom Auftreten veränderter Metabolisierungsraten über die Veränderungen der Metabolisierungspfade bis hin zur völligen Blockade entsprechender Enzyme [27, 219, 220].

Mit dem Einsatz der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin können im Fall der Markierung mit Radioiod der Markierungsteil und der Modifikator in einem Molekül vereinigt werden (s. 1.7.3). Nitroimidazolderivate dieser Aminosäuren sind zwar in der Literatur bekannt [221, 222], wurden aber bisher nicht markiert und für die Diagnostik hypoxischer Gewebe getestet. Die Aminosäuren wurden in dieser Arbeit als Enantiomergemische (D,L-Aminosäuren) eingesetzt.

Phenylalanin

Beim Phenylalanin wurde durch den Einsatz des Methylesters eine metabolische "Sollbruchstelle" eingebaut. Der lipophile Ester sollte *in vivo* hydrolysiert und damit in eine über den Säuretransporter der Niere schnell ausscheidbare hydrophile Form verwandelt werden. Bei nicht zu hohen Hydrolyseraten könnte so sowohl eine Hirnanreicherung, als auch eine zur schnellen Diagnostik notwendige moderate Clearancerate erreicht werden. Radioiodphenylalanin sollte zudem eine hervorragende Stabilität gegenüber der *in vivo* Deiodierung aufweisen.

Tyrosin

Tyrosin zeichnet sich durch die Möglichkeit der einfachen elektrophilen Radioiodierung aus, so daß entsprechende Derivate grundsätzlich zur Besteck-Präparation (Kit) geeignet sind. Durch die aromatische Hydroxyfunktion sollte die Hydrophilie zur moderaten Ausscheidung genügend groß sein. Zur *in vivo* Stabilisierung sowohl des Radioiods als auch des Methylesters wurde in dieser Arbeit das α -D,L-Methyltyrosin eingesetzt.

3.3 N-(2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl)-p-iod-D,L-phenylalaninmethylester (I-P2NI-Me)

3.3.1 Synthesestrategien zur Radioiodierung

Zur n.c.a.-Darstellung des ^{131}I -P2NI-Me boten sich 2 Methoden an. Zum einen kann die Markierung ausgehend vom p-Bromphenylalanin-Derivat über den Cu(I)-katalysierten "Brom gegen Radioiod"-Austausch erfolgen, zum anderen kann ausgehend vom p-Tributylstannylphenylalanin-Vorläufer durch elektrophile Substitution mit Radioiodid markiert werden.

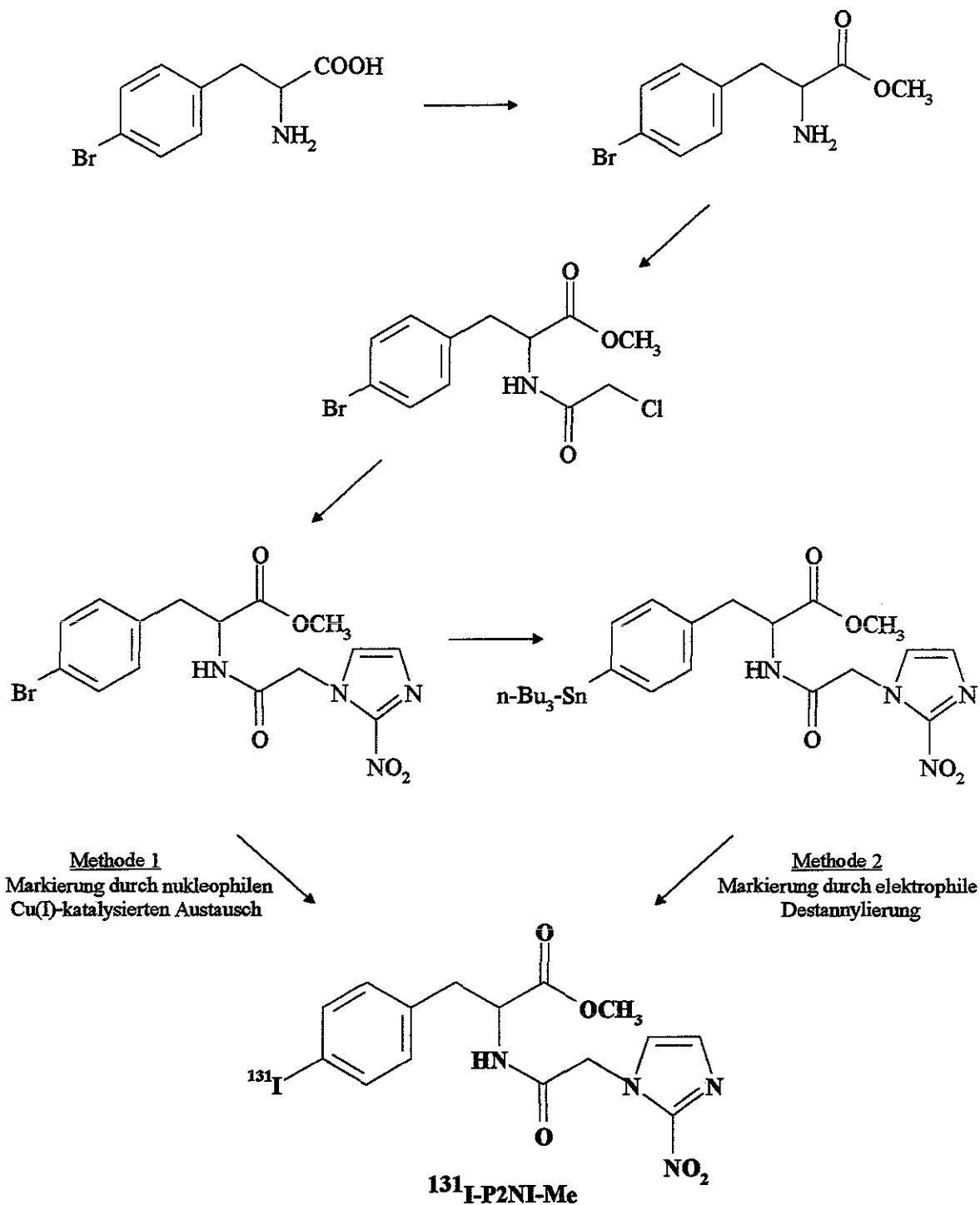
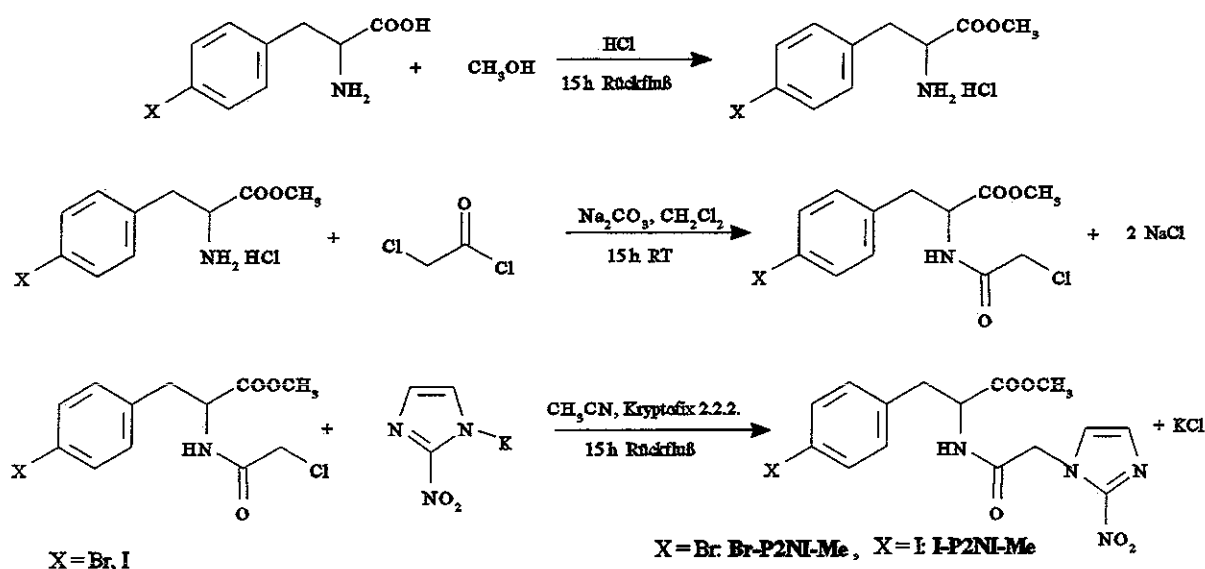


Abb. 3.3-1 Syntheserouten zur Darstellung von N-(2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl)-p- ^{131}I -iod-D,L-phenylalaninmethylester

Der bedeutend einfacheren Vorläufersynthese der 1. Methode standen die relativ milden Markierungsbedingungen der 2. Methode gegenüber (s. 3.9). Zum Zeitpunkt dieser Überlegungen war die Cu(I)-katalysierte Radioiodierung des Phenylalanins in der Literatur bekannt [91], wohingegen die Tributylstannylierung erst später veröffentlicht worden ist [49]. Daher wurde zur Darstellung des ^{131}I -P2NI-Me Methode 1 gewählt. Zur Übersicht sind in Abb. 3.3-1 die Syntheserouten der beiden Methoden aufgeführt.

3.3.2 Synthese von Br-P2NI-Me und I-P2NI-Me

Ausgehend vom käuflichen p-Brom-D,L-Phenylalanin bzw. p-Iod-D,L-Phenylalanin wurde der zur Markierung notwendige Brom-Vorläufer und die entsprechende Iod-Standardverbindung in einer dreistufigen Synthese erhalten. Hierbei wurde der von Garg et al. vorgeschlagene, aber nicht beschriebene Syntheseweg beschritten [222]:



Die Veresterung der Aminosäure konnte in absolutem Methanol unter Zusatz von Chlorwasserstoff mit Ausbeuten von 95 % durchgeführt werden. Auch bei der nachfolgenden Acylierung der Aminofunktion mit Chloracetylchlorid wurden Ausbeuten von 76 % erzielt. Die erhaltenen Verbindungen konnten durch Umkristallisation gereinigt werden. Als Schlüsselstelle der Reaktionssequenz erwies sich die Ankopplung von 2-Nitroimidazol. Das gewünschte Nitroimidazolderivat konnte weder mit Natriummethanolat noch mit K_2CO_3 oder Na_2CO_3 als Base durch einfaches Erhitzen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln erhalten werden. Das Arbeiten in alkalisch-wässrigen Systemen war aufgrund der dann auftretenden Hydrolyse des Aminosäureesters nicht möglich. Schließlich gelang die Darstellung mit dem System "Kaliumimidazolid/Kryptofix/Acetonitril" in Ausbeuten von 70-80 % [223]. Die Verbindungen wurden nach der säulenchromatographischen Reinigung in hoher Reinheit erhalten.

3.4 Cu(I)-katalysierte Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me

Durch die Wahl der Markierung mittels des Kupfer(I)-katalysierten nukleophilen, aromatischen "Brom gegen Radioiod"-Austausches konnte im Vergleich zur elektrophilen Demetallierung ein zusätzlicher, schwieriger Reaktionsschritt bei der Vorläufersynthese vermieden werden.

Zur Auswahl eines geeigneten Markierungssystems wurden die in der Literatur verwendeten Cu(I)-Methoden geprüft. Ein kurzer Überblick wird in den folgenden Tabellen gegeben. Da die Cu(I)-Methode erst relativ spät auf die schwierigere Radioioddebromierung (s. 1.6.3) angewandt wurde, wird bei der Darstellung zwischen n.c.a.- und isotopem Austausch unterschieden.

Tab. 3.4-1 "Radioiod für Brom"-Austausch (n.c.a.)

Lit.	Solvens	Cu	Reduktion	Sonst.	T [°C]	t [h]	RCA [%]
[67]	DMSO	Cu(I)Cl	-	-	120-200	0,5-1	50-80
[71]	H ₂ O/AcOH 2:8	Cu(II)SO ₄	SnSO ₄ , DHB	ZS	100	0,5	75-80
[224]	H ₂ O/AcOH 1:9	Cu(II)SO ₄	SnSO ₄ , DHB	ZS	100	0,5-1	75
[225]	H ₂ O	Cu(II)SO ₄	SnSO ₄ , DHB	ZS	120	1	80-85
[226]	H ₂ O	Cu(II)SO ₄	SnSO ₄ , ASC	H ₂ SO ₄	100	0,5	97
[227]	H ₂ O/EtOH	Cu(II)SO ₄	ACS	H ₃ PO ₄	160	1	80-90
[74]	H ₂ O/AcOH	Cu(II)NO ₃	-	-	150	2	20-35

Tab. 3.4-2 "Radioiod für Iod"-Austausch (Isotopenaustausch)

Lit.	Solvens	Cu-Spezies	Reduktion	Sonst.	T [°C]	t [h]	RCA [%]
[66]	H ₂ O	Cu(II)SO ₄	ACS, SnSO ₄ , DHB, SnSO ₄	Kit	100	0,5	90-99
[229]	H ₂ O/AcOH 1:1	Cu(II)SO ₄	NaS ₂ O ₅	Kit	160	0,5-1	90-98
[75]	EtOH/H ₂ O	Cu(II)SO ₄	DHB	ZS	100 [*]	1	75
[76]	AcOH	Cu(II)NO ₃	SnCl ₂ / Sn	-	175	0,5	95
[59]	H ₂ O/EtOH, DMF, DMSO	Cu(I)Cl	-	-	120-130	1-3	80-90
[76]	EtOH/CH ₃ CN CHCl ₃ /IpOH	Cu(I)Cl	-	-	RT	72	40 8
[231]	CHCl ₃ /EtOH	Cu(I)Cl	-	-	100-170	4	40
[232]	DMF/H ₂ O 4:1	Cu(II)SO ₄	-	-	110	12-18	-

Lit.: Literatur, Sonst.: weitere Zusätze, T: Reaktionstemperatur, t: Reaktionszeit, RCA: radiochemische Ausbeute, AcOH: Essigsäure; ACS: Ascorbinsäure; DHB: 2,5-Dihydroxybenzoesäure; DMF: Dimethylformamid; DMSO: Dimethylsulfoxid; EtOH: Ethanol; IpOH: Isopropanol; ZS: Zitronensäure;

Da in der Auflistung nicht zwischen den verschieden aktivierten Vorläuferverbindungen unterschieden wird, können die angegebenen Ausbeuten nur als grobe Richtwerte dienen. Allerdings gelten die meisten Angaben für wenig aktivierte, mit dem Phenylalanin vergleichbare aromatische Systeme. Der gegebene Literaturüberblick der Markierungsmethoden zeigt, daß die Markierung nur beim Arbeiten in saurem, reduktivem Medium mit guten RCA innerhalb annehmbarer Zeiten durchführbar ist [s. auch 73,233]. Grundsätzlich kann zwischen 2 Methoden unterschieden werden. Bei der 1. Methode geht man von direkt eingesetzten Cu(I)-Salzen wie CuCl oder CuBr in organischen Lösungsmitteln aus. Bei der 2. Methode wird das Cu(I)-Ion in situ aus Cu(II)-Salzen durch den Zusatz geeigneter Reduktionsmittel erzeugt. Als

Reduktionsmittel dienen Dihydroxybenzoesäure (Gentisinsäure), Ascorbinsäure und besonders für die schwierige n.c.a.-Radioioddebromierung das Zinnsulfat. Hier scheint das Zinn(II) gerade in wäßrigen Systemen das gegenüber der Disproportionierung instabile Cu(I) zu stabilisieren und damit eine für die Markierung günstige Situation zu schaffen [76]. Die notwendige Ansäuerung des Reaktionsmediums erfolgt im allgemeinen durch Zitronensäure oder Essigsäure, aber auch Mineralsäuren wie Schwefel- oder Phosphorsäure wurden eingesetzt. Für die n.c.a.-Markierung wird vornehmlich nach der 2. Methode in wäßrigen, essigsauren Systemen gearbeitet, da diese einerseits ein höheres Markierungspotential aufweisen und sich andererseits am besten zur Kit-Präparation eignen. Hier kann die Reaktionslösung nach entsprechender Abpufferung analog zu den Tc-Kits direkt zur medizinischen Anwendung eingesetzt werden. Dementsprechend ist die 1. Methode eher zur isotopen Markierung verwendet worden.

Nitroimidazole sind gegenüber reduktiven Bedingungen nur wenig stabil. Ebenso ist das Arbeiten mit Methylestern in sauren, wäßrigen Lösungsmitteln bei hohen Temperaturen problematisch. Daher galt es bei der Auswahl des Markierungssystems den Zusatz von Reduktionsmitteln zu umgehen und in organischen Solvenzien zu arbeiten. Innerhalb der n.c.a.-Markierungen fand sich in der Literatur nur das System "DMSO/CuCl", das den Erfordernissen genügte. Zudem schien diese Methode auch aufgrund der wenigen variablen Parameter am besten für eine systematische Untersuchung geeignet zu sein.

3.4.1 Radioiodierung von Br-P2NI-Me mit CuCl

Aufgrund der obigen Überlegungen wurde für die Markierung des Br-P2NI-Me zunächst die CuCl/DMSO-Standardmethode in Anlehnung an S. M. Moerlein [67] eingesetzt, die bisher nur auf einfache aromatische Modellsysteme in Verbindung mit hohen Vorläuferkonzentrationen und ohne Zusätze angewandt wurde. Es konnten hier weder durch die Variation der Reaktionsparameter noch durch den Einsatz diverser Zusätze wie Säuren und Reduktionsmittel befriedigende Ergebnisse erzielt werden. Die Ausbeuten dieser Cu(I)-katalysierten Markierungsreaktion sind in erster Linie von der Temperatur, der Vorläuferkonzentration und der Cu(I)-Konzentration abhängig [67]. Durch eine Temperaturerhöhung wurden zwar etwas bessere RCA erhalten, wobei allerdings auch eine starke Zunahme von aktiven und inaktiven Nebenprodukten beobachtet wurde. Die Vorläuferkonzentration konnte in diesem Zusammenhang nicht beliebig erhöht werden, da der Vorläufer zum einen nur in begrenzten Mengen zur Verfügung stand und sich zum anderen die Abtrennung des Radioproduktes vom chemisch und chromatographisch sehr ähnlichen Vorläufer als problematisch erwies. Höhere Katalysatorkonzentrationen waren in diesem System einerseits durch die schlechte Löslichkeit der Cu(I)-Halogenide und andererseits durch ihre Eigenschaft, in höheren Konzentrationen katalytisch inaktive Oligomere zu bilden, begrenzt [67,72]. Durch den sonst üblichen Zusatz von komplexbildenden, chelatisierenden Säuren konnte die Katalysatoraktivität nicht positiv beeinflusst werden.

Auch der Einsatz anderer käuflicher Cu(I)-Salze wie CuBr und CuCN und die zusätzliche Reinigung der Katalysatoren führten nicht zu verbesserten RCA.

Bei der Markierung von Br-P2NI-Me mit dem CuCl/DMSO-System in Anlehnung an die Literatur [67] wurde bei deutlich geringeren Vorläuferkonzentrationen gearbeitet. Durch Reinigung konnte aus dem käuflichen, leicht grünlichen CuCl eine weiße Verbindung erhalten werden, die sich unter Luft und Licht langsam wieder verfärbte. Alle Reaktionen wurden unter Ausschluß von Sauerstoff in einer Argonatmosphäre durchgeführt. Trotzdem konnten für das Konjugat unter diesen Bedingungen die in der Literatur angegebenen Markierungsausbeuten von mehr als 80 % auch bei längeren Reaktionszeiten und höheren

Reaktionstemperaturen nicht erreicht werden.

Bei Kontrolluntersuchungen mit CuCl_2 als Katalysator wurde bei 160°C nach 180 min eine RCA von weniger als 8 % erhalten.

Die Abhängigkeit der RCA von der Vorläuferkonzentration wurde nur stichpunktartig überprüft, da größere Vorläufermengen aus trenntechnischen Gründen nicht in Frage kamen. Hier wurde eine Erhöhung der RCA um etwa 10 % bei der Verdopplung der Vorläuferkonzentration im Bereich von 10 - 50 mM beobachtet.

Weitere Optimierungsversuche der RCA blieben ohne Erfolg. Sowohl der Zusatz von Säuren (Essigsäure, Zitronensäure) als auch die Zugabe von Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure, Gentisinsäure, Na_2SO_3 und SnSO_4 führten zu einer Erniedrigung der RCA.

Auch die alternative Aktivierung der Reaktion durch Mikrowellenstrahlung wurde ergebnislos versucht.

3.4.1.1 Temperaturabhängigkeit

In Abb. 3.4-1 wird die Temperaturabhängigkeit der CuCl -katalysierten Radioioddebromierung des Br-P2NI-Me gezeigt. Schon bei einer Reaktionszeit von 60 min wurde bei Temperaturen über 170°C eine zunehmende Zersetzung sowohl des Vorläufers als auch des Radioiodproduktes beobachtet, was sich im Absinken der RCA in diesem Bereich niederschlug. Mit der Verlängerung der Reaktionszeit bei höheren Temperaturen konnten somit die Ausbeuten nicht verbessert werden. Im Unterschied zur Literatur [67] wurde unterhalb von 130°C keine RCA erhalten.

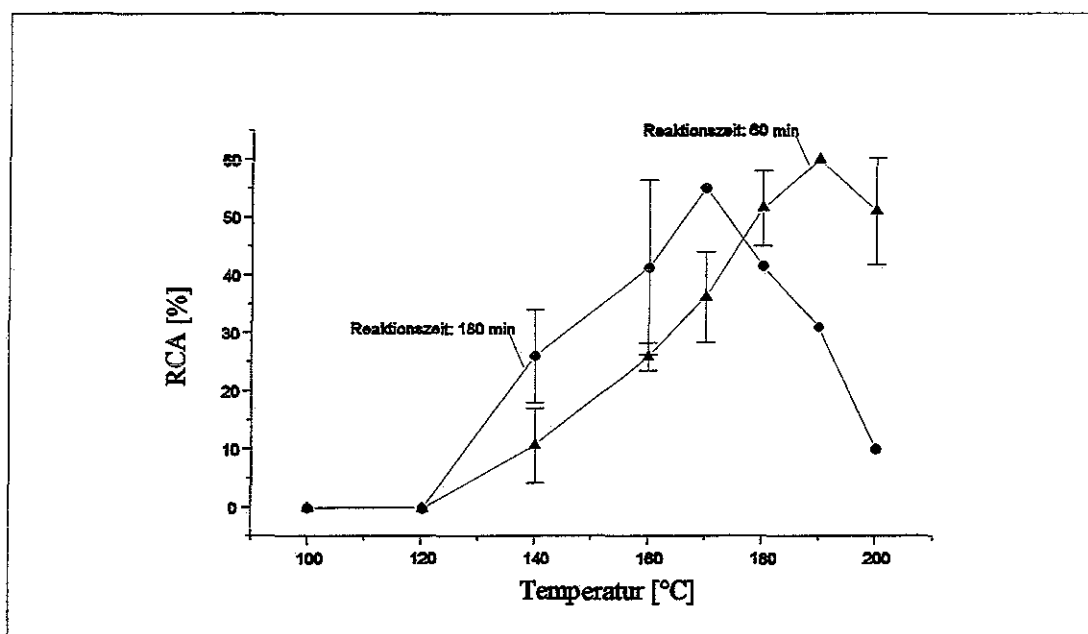


Abb. 3.4-1 Kinetik der CuCl -katalysierten Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me.
 CuCl : 1,5 mM, Br-P2NI-Me: 14 mM, DMSO

3.4.1.2 Kinetik der Reaktion

Die Zeitabhängigkeit der Radioiodde bromierung zeigte den erwarteten Verlauf einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung. Bei einer Reaktionstemperatur von 140 °C konnte auch nach 180 min noch keine Sättigung erreicht werden. Allerdings betrug hier die RCA trotz hoher Katalysator- und Vorläuferkonzentrationen nur etwa 30 % (Abb. 3.4-2).

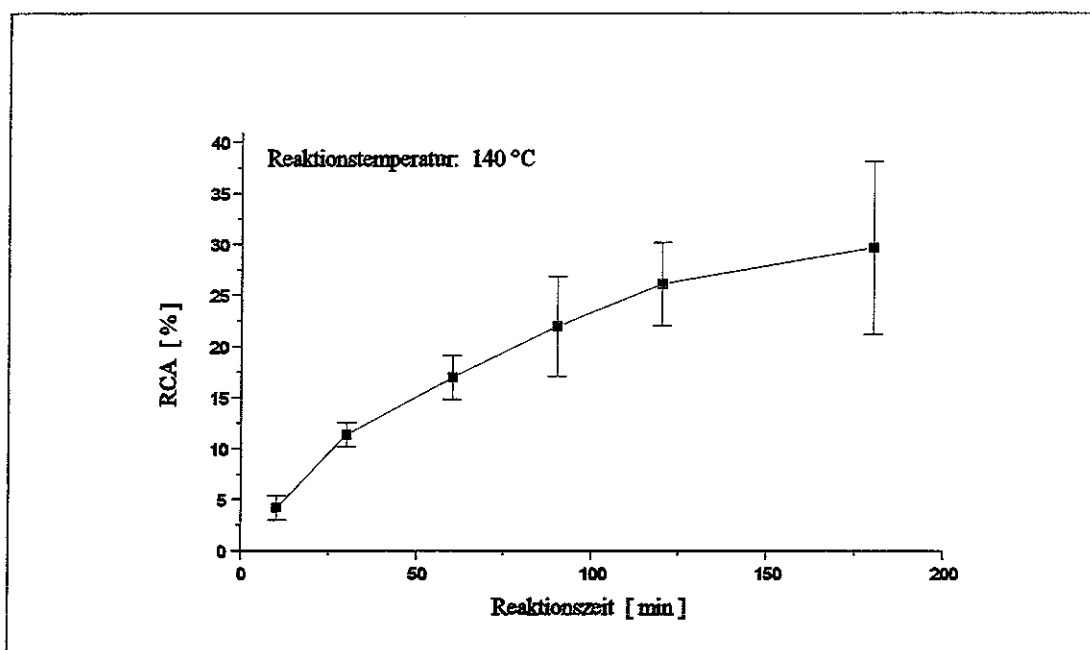


Abb. 3.4-2 Reaktionskinetik der CuCl-katalysierten Radioiodde bromierung von Br-P2NI-Me. CuCl: 15 mM, Br-P2NI-Me: 25 mM, T=140 °C, DMSO

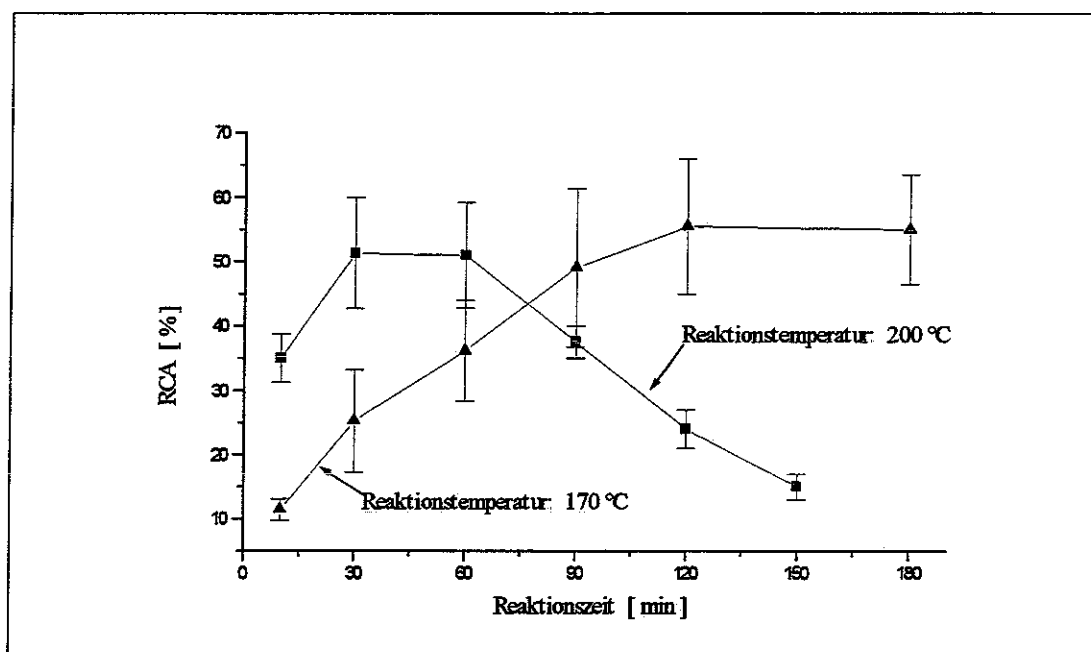


Abb. 3.4-3 Reaktionskinetik der Cu(I)-katalysierten Radioiodde bromierung von Br-P2NI-Me: CuCl: 1,5 mM, Br-P2NI-Me: 14 mM, DMSO

In Abb. 3.4-3 ist die Reaktionskinetik für höhere Temperaturen und geringere Katalysator- und Vorläuferkonzentrationen dargestellt. Bei einer Reaktionstemperatur von 170 °C wurde schon nach 120 min ein Plateau bei etwa 55 % RCA erreicht. Mit zunehmender Reaktionszeit machte sich hier der Zersetzungsprozeß bei

höheren Temperaturen durch das leichte Absinken der RCA bemerkbar. Dieser Effekt trat bei einer Reaktionstemperatur von 200 °C in den Vordergrund. Hier wurden nach 30 min maximale RCA von 50 % erhalten, die dann mit zunehmender Reaktionszeit erst in ein Plateau übergangen, um danach stark abzusinken. Gleichzeitig wurde hier eine starke Zersetzung des Vorläufers beobachtet.

Obwohl bei 190 °C innerhalb von 60 min RCA von etwa 60 % erzielt werden konnten, waren hier schon etwa 15 % des eingesetzten Vorläufers zersetzt. Ein vernünftiger Mittelweg zwischen der Reaktionszeit, den RCA und der Zersetzung stellte bei dieser Methode eine Reaktionstemperatur von 170 °C dar. Hier wurden nach 2 h immerhin noch 55 % RCA erreicht, wobei nur geringe Mengen an Zersetzungsprodukten beobachtet werden konnten.

3.4.1.3 RCA in Abhängigkeit von der CuCl Konzentration

Bezüglich der Abhängigkeit der RCA von der CuCl Konzentration wurden nur vereinzelte Messungen durchgeführt, die sich an den Literaturangaben für die Modellverbindung Brombenzol orientierten [67]. Trotz der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (s. Tab. 3.4-3) konnte die in der Literatur angegebene Abhängigkeit, die einen Maximalverlauf zeigt, im großen und ganzen bestätigt werden. Allerdings wiesen die eigenen Untersuchungen am Br-P2NI-Me engere Maximalbereiche und einen schnelleren Abfall der RCA mit steigender CuCl Konzentration auf. In Abb. 3.4-4 sind die Maximalbereiche der Messungen dargestellt. Hier sind auch die Ergebnisse für CuBr als Katalysator aufgeführt, bei dem ein zum CuCl ähnlicher Verlauf, bei allerdings geringeren RCA n beobachtet wurde.

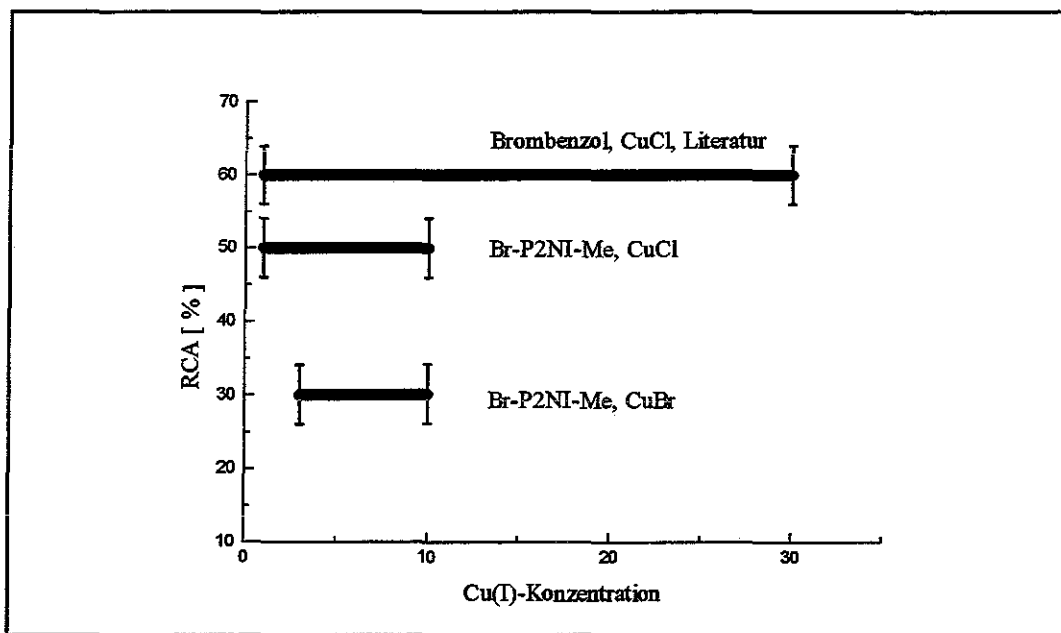


Abb. 3.4-4 Radioioddebromierung mit dem CuCl/DMSO System. Cu(I)-Konzentrationsbereiche der maximalen RCA für verschiedene Systeme. Vergleich mit den Literaturergebnissen für Brombenzol.

Tab. 3.4-3 Radioioddebromierung mit dem CuCl/DMSO System. Vergleich der Reaktionsbedingungen von Br-P2NI-Me und Brombenzol.

	Eigene Messung	Literatur [67]
Verbindung	Br-P2NI-Me	Brombenzol
Vorläuferkonzentration	14 mM	595 mM
Reaktionstemperatur	160°C	140°C
Reaktionszeit	120 min	30 min

3.4.2 Markierung mit CuBr und CuCN als Katalysator

CuBr und CuCN waren wie CuCl kommerziell erhältlich. Daher wurden in diesem Zusammenhang auch die Eigenschaften dieser Katalysatoren bezüglich der aromatischen n.c.a.-Radioioddebromierung überprüft. Nach dem weiter unten ausgeführten Modell (Abb. 3.4-8) des Reaktionsmechanismus über einen komplexartigen Übergangszustand sollten diese Katalysatoren gegenüber dem CuCl keine Vorteile bringen, da nach dem HSAB-Konzept und in Analogie zu den Ag(I)-Verbindungen die Stabilität der Komplexe in der Reihenfolge $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I} < \text{CN}$ zunimmt, so daß die Verbindungen zum einen eine immer schlechtere Löslichkeit und zum anderen eine immer geringere Tendenz zu Ligandenaustauschreaktionen bezüglich des Bromaromaten aufweisen sollten. Dementsprechend war CuCN nur sehr schlecht in DMSO löslich und führte nur zu geringen Markierungsausbeuten. Daher wurden hier, von einigen Vorversuchen abgesehen, keine weiteren Messungen unternommen.

Auch beim CuBr konnte das Modell bestätigt werden. Bezüglich der Radioioddebromierung wurden mit CuBr als Katalysator im Vergleich zum CuCl sowohl geringere RCA als auch eine etwas stärkere Bildung von Zersetzungsprodukten, insbesondere bei höheren Katalysatorkonzentrationen, beobachtet.

Ebenso wie das CuCl wurde auch das kommerziell erhältliche CuBr vor der Reaktion einer Reinigung unterzogen. Im folgenden wird das CuBr/DMSO-System anhand einiger wichtiger Parameter genauer untersucht.

3.4.2.1 Temperaturabhängigkeit

Die Abhängigkeit der RCA von der Reaktionstemperatur wurde für die CuBr-katalysierte Austauschreaktion nur bei höheren Temperaturen und kürzeren Reaktionszeiten untersucht, da hier die höchsten RCA gefunden wurden. Wie aus Abb. 3.4-5 ersichtlich ist, nahm die Zersetzungstendenz mit zunehmenden Reaktionszeiten zu. Hier wurde ab einer Reaktionszeit von 60 min ein Maximum bei 180-190°C beobachtet. Die vorliegenden Daten stimmten qualitativ gut mit den entsprechenden Beobachtungen beim CuCl überein.

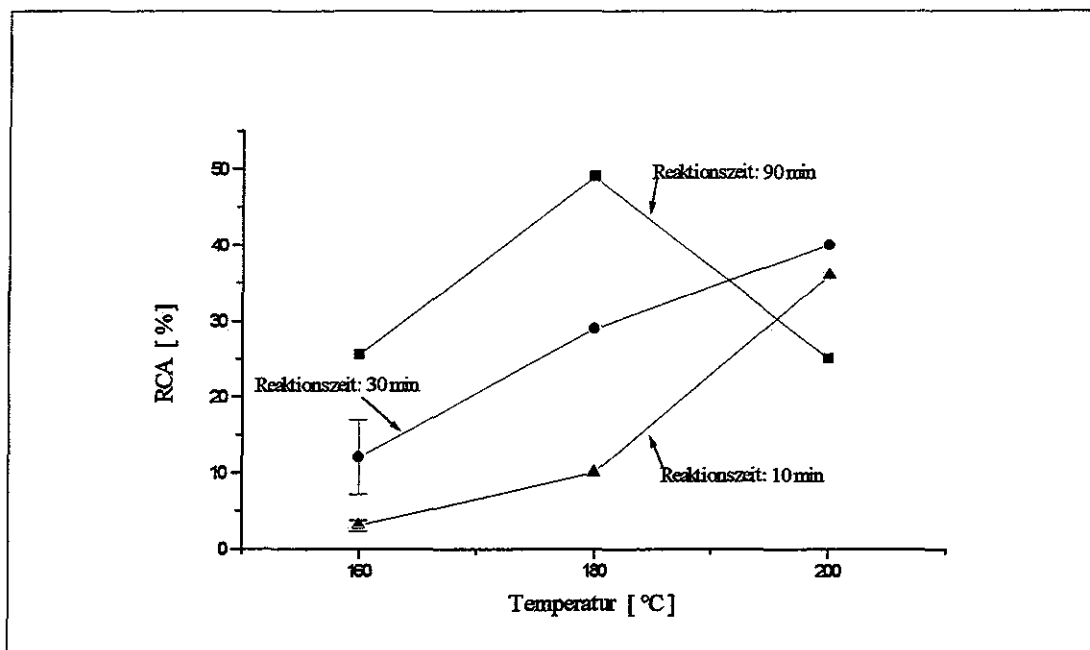


Abb. 3.4-5 Abhängigkeit der CuBr-katalysierten Radioiodde bromierung von Br-P2NI-Me von der Reaktionstemperatur. CuBr: 1,5 mM, Br-P2NI-Me: 14 mM, DMSO

3.4.2.2 Kinetik der Reaktion

In Abb. 3.4-6 ist die Abhängigkeit der RCA von der Reaktionszeit für zwei verschiedene Temperaturen dargestellt. Auch hier zeigte CuBr ein dem CuCl ähnliches Verhalten, wobei die geringeren Reaktionsgeschwindigkeiten zu um etwa 20 % niedrigere RCAn führten. Ebenso wurde die bei höheren Reaktionstemperaturen ausgeprägtere Zersetzungstendenz deutlich. So wurde bei einer Reaktionstemperatur von 200 °C analog zum CuCl nach etwa 30 min eine maximale RCA von 40 % erreicht. Allerdings wurde im weiteren Verlauf kein Plateau, sondern ein sofortiger starker Abfall der RCA infolge von Zersetzung beobachtet.

In Abb. 3.4-7 werden die Reaktionskinetiken der beiden Katalysatoren im Vergleich gezeigt. Hier wird die für CuBr erwartete Tendenz zu geringeren RCAn besonders deutlich. Der für CuBr bei einer Reaktionstemperatur von 160°C erhaltene Kurvenverlauf kann bezüglich der RCA mit der Kinetik von CuCl bei 140°C verglichen werden (Abb. 3.4-2). Demnach entspricht der Übergang vom Bromid zum Chlorid in der Kupferkoordinationssphäre einer Temperaturerhöhung von etwa 20 °C.

Aus den gezeigten Daten wird deutlich, daß der Einsatz von CuBr gegenüber CuCl innerhalb dieses Rahmens keine Vorteile bringt.

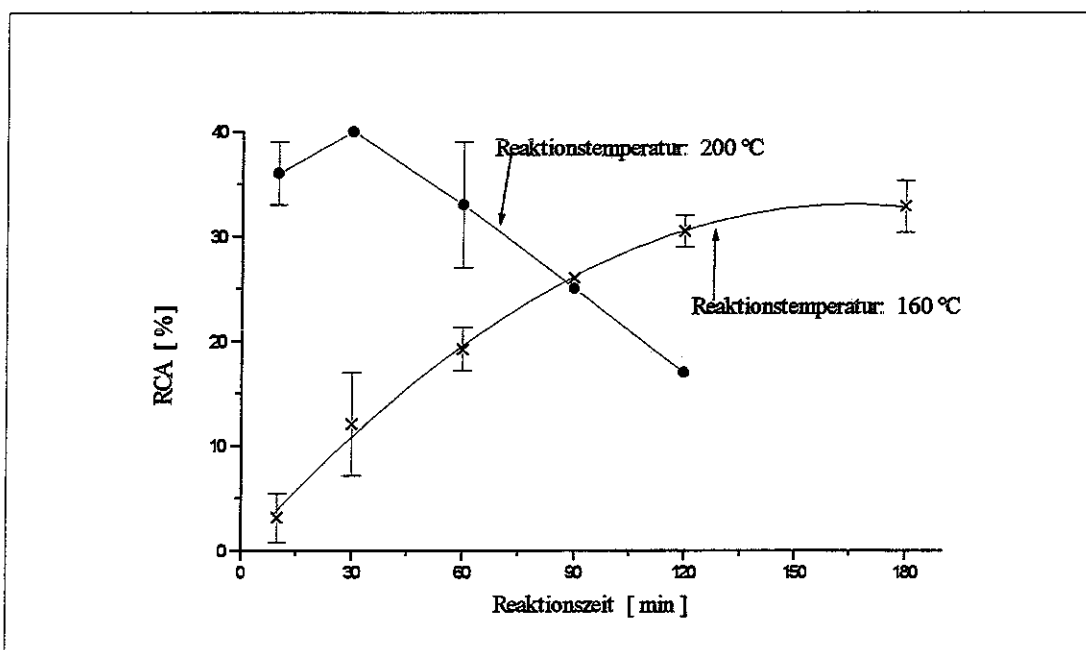


Abb. 3.4-6 Reaktionskinetik der CuBr-katalysierten Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me: CuBr: 1,5 mM, Br-P2NI-Me: 14 mM, DMSO

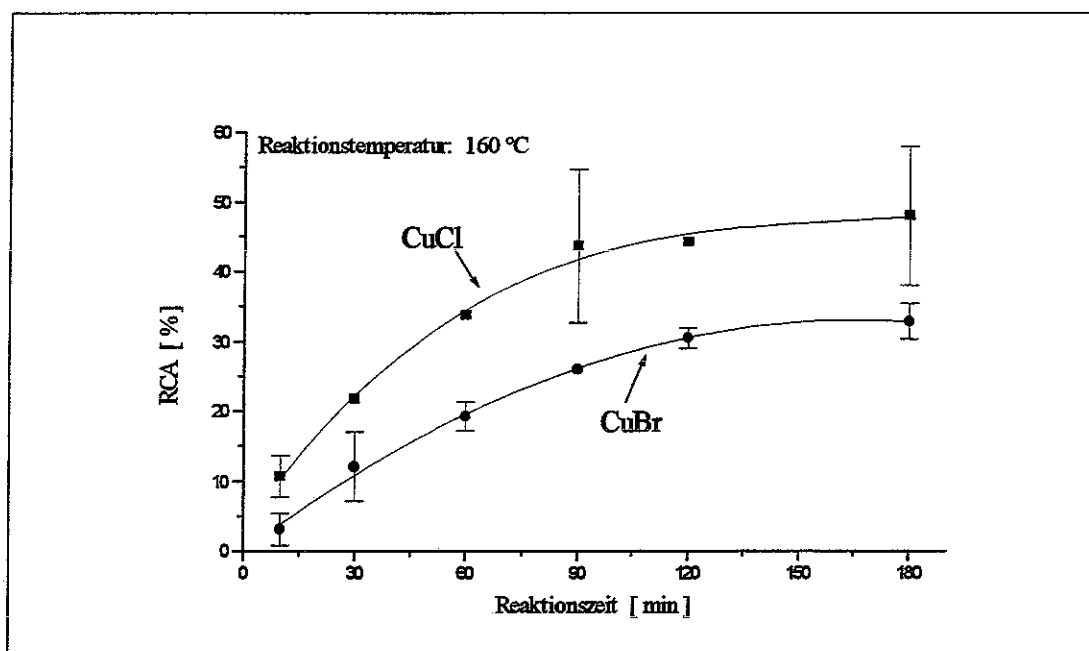


Abb. 3.4-7 Reaktionskinetiken der Cu(I)-katalysierten Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me. Vergleich CuBr/CuCl: CuBr, CuCl: 1,5 mM, Br-P2NI-Me: 14 mM, DMSO

3.4.3 Markierung mit Cu₂SO₄

Aufgrund der unbefriedigenden RCA bei der Radiosynthese des ¹³¹I-P2NI-Me mit dem CuCl/DMSO System wurde eine Weiterentwicklung zur Optimierung dieses Markierungssystems vorgenommen. Hierzu wurde von einem einfachen Modell des Reaktionsmechanismus ausgegangen [60,67]:

Da Cu(I) im allgemeinen tetraedrische Komplexe bildet, wird bei der Austauschreaktion im Übergangszustand von einem tetraedrischen Übergangskomplex ausgegangen. Die Reaktion kann in vier Reaktionsschritte aufgeteilt werden. Dies soll in Abb. 3.4-8 verdeutlicht werden, wobei mit X ein Halogen (Cl, Br, I) und mit L ein weiterer Ligand wie z.B. das Lösungsmittel angedeutet wird:

1. Ligandenaustausch von L oder X gegen Radioiod
2. Ligandenaustausch von L oder X gegen aromatisch gebundenes Halogen
3. Konstituierte Bindungsumbildung im Übergangszustand
4. Ligandenaustausch unter Freisetzung des Radioiodaromaten

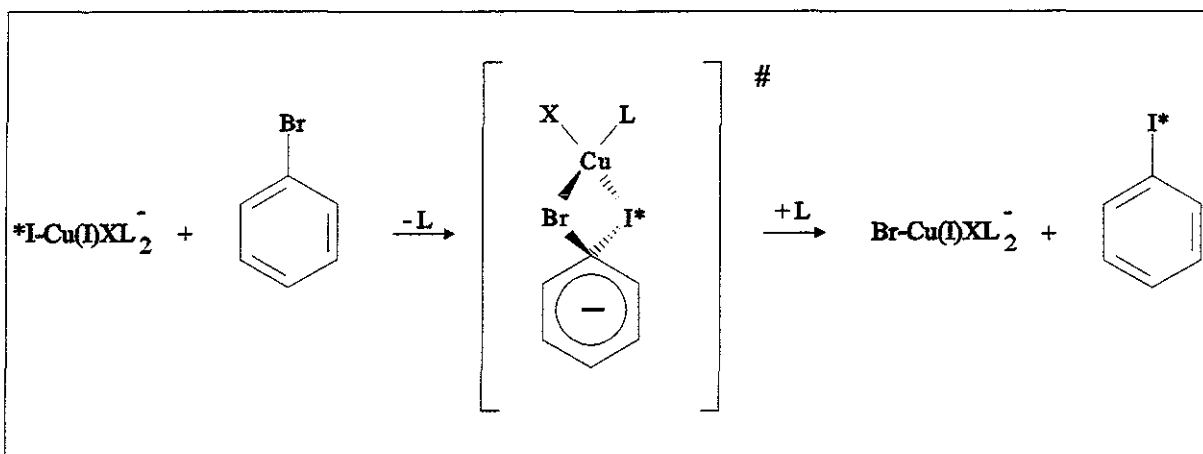


Abb. 3.4-8 Hypothetischer Reaktionsmechanismus der Cu(I)-katalysierten Austauschreaktion

Für alle Reaktionsschritte sollte die mit X und L angedeutete Koordinationssphäre eine entscheidende Rolle sowohl für die Reaktivität als auch für die Reaktionsgeschwindigkeit spielen. Da Cu(I) analog zum Ag(I) bevorzugt mit Halogenen stabile, schwerlösliche Komplexe bildet, sollte der Halogenanteil X im katalytisch wirksamen Komplex und damit die Halogenkonzentration in der Reaktionslösung für diese Austauschreaktion möglichst gering sein. Zudem dürfte sich ein zunehmender Halogenanteil sowohl für die Koordination von Radioiod als auch für die Anlagerung des Halogenaromaten störend auswirken (Reaktionsschritt 1 und 2). Auf die Bedeutung der Halogenkonzentration für die Austauschreaktion wurde hingewiesen [72]. Auch durch die Zugabe anderer, weniger stark bindender Liganden im Überschuß dürfte aufgrund der relativ stabilen Halogenkomplexe keine Verdrängung von X und damit keine Aktivierung des reaktiven Komplexes erreicht werden.

Aus diesem Modell wird der Vorteil der *in situ* Darstellung der Cu(I) Komplexe durch die Zugabe von halogenfreien Reduktionsmitteln deutlich. Hierbei wird sowohl die Konzentration an aktivem Kupferkomplex als auch die Austauschfähigkeit dieses Komplexes verbessert. Daher führt das Cu(II)/Reduktions-System im allgemeinen zu besseren RCA bei mildereren Reaktionsbedingungen und kürzeren Reaktionszeiten (s. Tab. 3.4-1,-2).

Um die Vorteile des Cu(II)/Reduktions-Systems auch für reduktions- und wasserempfindliche Verbindungen

nutzen zu können, sollte wie beim CuCl/DMSO-System eine Cu(I)-Verbindung direkt eingesetzt werden. Diese sollte eine bessere Löslichkeit aufweisen und weniger stark komplexierende Liganden enthalten. Hier bot sich das schon bei dem Cu(II)/Reduktions-System verwendete, aber *in situ* erzeugte Cu_2SO_4 an. Cu_2SO_4 ist zwar nicht kommerziell erhältlich, kann aber durch eine einfache Reaktion von Kupferoxid mit Dimethylsulfat synthetisiert werden [234]. Andere in der Literatur beschriebene Cu(I)-Verbindungen sind entweder schwer zugänglich oder enthalten stark komplexierende Chelatliganden [235,236].

Entsprechend dem obigen Modell konnten in dieser Arbeit bei der Radioioddebromierung mit dem Cu_2SO_4 deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Da über diese Reaktion in der Literatur keine Daten vorlagen, wurden weitere Untersuchungen und Optimierungen an diesem Markierungssystem vorgenommen. Aufgrund der schwachen Komplexbildung des Cu(I) konnten die RCA durch den Zusatz verschiedener Reagenzien wie Säuren, schwache Komplexbildner und schwache Reduktionsmittel auch in geringen Konzentrationen beeinflusst werden. Auffällig war die starke Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber Luftsauerstoff. Trotz dieser höheren Empfindlichkeit des Cu_2SO_4 im Vergleich zum CuCl gegenüber Luft und Feuchtigkeit war die Markierungsreaktion mit dem in Anlehnung an der Literatur oben eingesetzten CuCl-katalysierten Austausch vergleichbar, wobei mit Cu_2SO_4 bedeutend bessere Ausbeuten erzielt werden konnten. Wie in der Literatur wurde der Zusatz von Wasser (bis 15 %) problemlos toleriert. Zudem wies das Cu_2SO_4 eine bedeutend bessere Löslichkeit in DMSO auf.

3.4.3.1 Kinetik der Reaktion

In Abb. 3.4-9 ist die Abhängigkeit der RCA von der Konzentration für die Cu_2SO_4 -katalysierte Radioioddebromierung am Beispiel von Br-P2NI-Me aufgeführt.

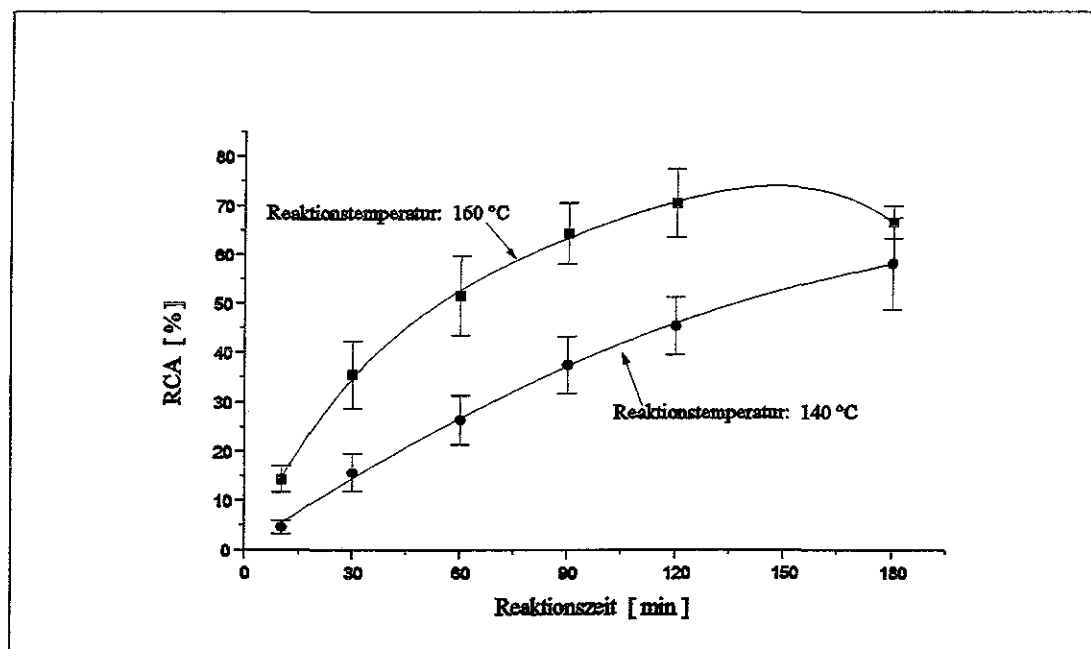


Abb. 3.4-9 Reaktionskinetik der Cu_2SO_4 -katalysierten Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me: Cu_2SO_4 : 2 mM, Br-P2NI-Me: 25 mM, DMSO

Bei nicht zu langen Reaktionszeiten und niedrigeren Temperaturen ist deutlich der erwartete Verlauf pseudoerster-Ordnung zu erkennen. Während bei einer Reaktionstemperatur von 140 °C auch nach 180 min noch keine Sättigung der RCA vorlag, ist bei 160 °C oberhalb einer Reaktionszeit von 120 min ein leichter Abfall

der RCA zu erkennen.

3.4.3.2 Temperaturabhängigkeit

Schon aus der Kinetik (Abb. 3.4-9) dieser Reaktion ist ersichtlich, daß bei Reaktionstemperaturen über 160°C, ähnlich dem Verhalten des CuCl bei höheren Temperaturen, mit einer zunehmenden Zersetzungstendenz zu rechnen ist. Mit Cu₂SO₄ konnten schon bei 160 °C um die 70 % RCA erhalten werden, so daß bei der weiteren Optimierung der obere Temperaturbereich nicht mehr betrachtet wurde. Unterhalb von 120 °C wurden keine RCA erhalten, während ab dieser Temperatur eine stetige Zunahme der RCA bis 160 °C beobachtet wurde. Weiterhin ist ersichtlich, daß höhere Temperaturen gerade in Verbindung mit langen Reaktionszeiten aufgrund der Zersetzung vermieden werden sollten.

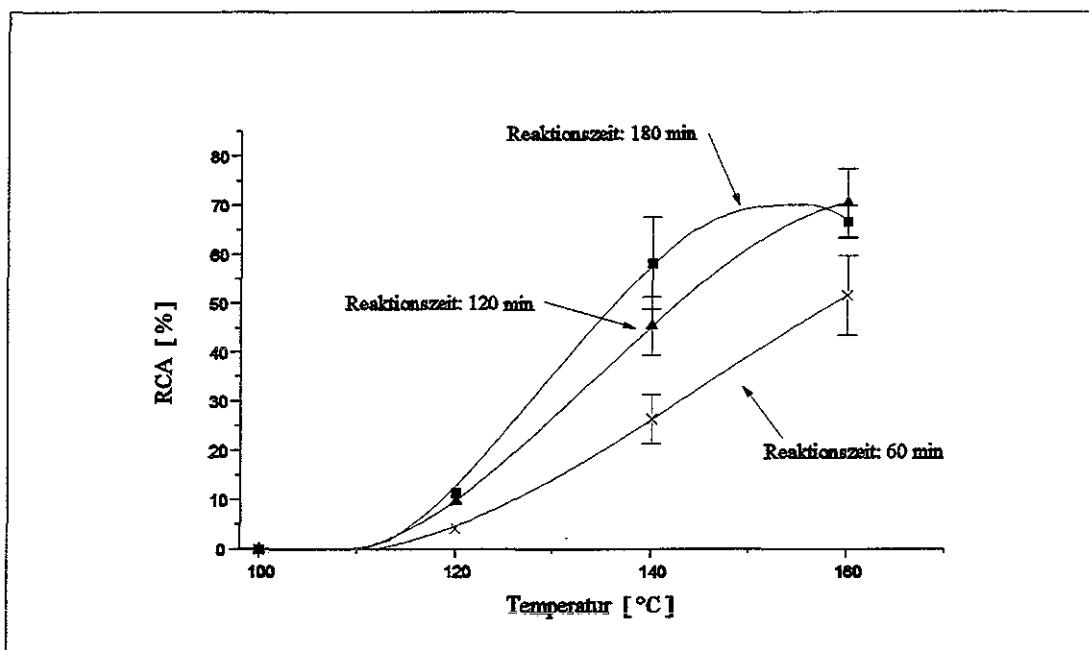


Abb. 3.4-10 Abhängigkeit der Cu₂SO₄-katalysierten Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me von der Reaktionstemperatur. Cu₂SO₄: 2 mM, Br-P2NI-Me: 25 mM, DMSO

Im Vergleich zur CuCl-katalysierten Austauschreaktion wurde eine Verschiebung zu niedrigeren Reaktionstemperaturen beobachtet. Schon bei deutlich geringeren Reaktionstemperaturen konnten gute RCA erzielt werden. Die "Starttemperatur" der Reaktion lag mit 120°C um etwa 20°C niedriger; auch die Tendenz zur Bildung von Zersetzungsprodukten war um etwa 20°C verschoben.

3.4.3.3 RCA in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration

In der Literatur wird die Vorläuferkonzentration als der wichtigste Parameter zur Steigerung der RCA der Cu(I)-katalysierten Austauschreaktion dargestellt [72]. Andererseits ist gerade bei der n.c.a.-Radioioddebromierung die Abtrennung großer Vorläufermengen problematisch, da sich Edukt und Produkt chemisch und chromatographisch nur wenig unterscheiden. Daher wurde während der Optimierung der Einfluß der Vorläuferkonzentration auf die RCA genauer untersucht.

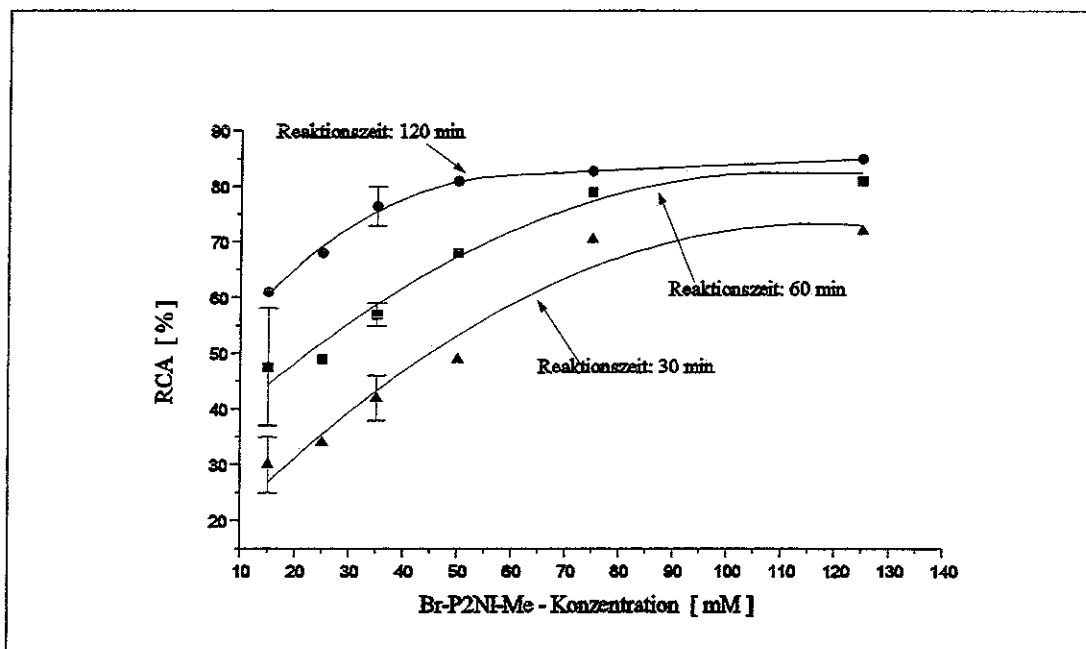
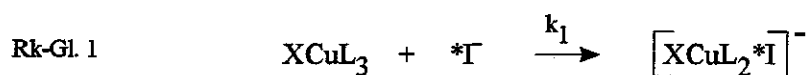


Abb. 3.4-11 Abhängigkeit der Cu_2SO_4 -katalysierten Radioiodde bromierung von der Vorläuferkonzentration Cu_2SO_4 : 2 mM, Reaktionstemperatur: 160°C , DMSO

In Abb. 3.4-11 ist die Abhängigkeit der RCA von der Vorläuferkonzentration bei verschiedenen Reaktionszeiten dargestellt. Hier wurde mit zunehmender Vorläuferkonzentration eine deutliche Sättigung der RCA erreicht. Mit kürzeren Reaktionszeiten gewann die Vorläuferkonzentration immer mehr an Bedeutung. Dieses Verhalten ist nach dem obigen Modell zu erwarten, wenn davon ausgegangen wird, daß die Bildungsgeschwindigkeit (k_1) des Radioiod-Kupferkomplexes ($[\text{XCuL}_2^*\text{I}]^- = \text{RIK}^-$) und dessen Abreaktion mit dem Bromaromaten (k_2) in der gleichen Größenordnung liegen:



$\text{X} = \text{SO}_4^{2-}, \text{Cl}^-, \text{Br}^-$; $\text{L} = \text{Ligand}$ (z.B. Lösungsmittel)

Für die Konzentration vom RIK^- ergibt sich dann aus den Reaktionsgleichungen Rk-Gl. 1 und Rk-Gl. 2:

$$[\text{RIK}^-] = \frac{k_1 [\text{XCuL}_3] [^*\text{I}^-]}{k_2 [\text{R-Br}]} \quad \text{Gl. 3.4-1}$$

Da beim Arbeiten im n.c.a.-Bereich die Konzentrationen des Kupferkomplexes und des Vorläufers als konstant angesehen werden können, faßt man diese mit der Geschwindigkeitskonstanten zusammen und erhält aus Gl. 3.4-1:

$$[\text{RIK}^-] = \frac{k'_1}{k'_2} [^*\text{I}^-] \quad k' = \text{apparente Geschwindigkeitskonstante} \quad \text{Gl. 3.4-2}$$

Demnach steht im Gleichgewicht nur eine begrenzte Menge an RIK^- zur Verfügung, dessen Gleichgewichtskonzentration mit der Vorläuferkonzentration abnimmt (Gl. 3.4-1). Auch mit zunehmender

Reaktionszeit ist nach Gl. 3.4-2 infolge der abnehmenden Radioiodidkonzentration ein geringerer Effekt bei zunehmenden Vorläuferkonzentrationen zu erwarten. Daher ist die optimale Vorläuferkonzentration so zu wählen, daß die Bildungs- und die Reaktionsgeschwindigkeit des RIK⁻ etwa in der gleichen Größenordnung liegen. Hinsichtlich der Aufarbeitung stellen Vorläuferkonzentrationen von 50 mM in Verbindung mit längeren Reaktionszeiten den besten Kompromiß dar.

3.4.3.4 RCA in Abhängigkeit von der Cu_2SO_4 Konzentration

Die Abhängigkeit der Austauschreaktion von der Katalysatorkonzentration ist in Abb. 3.4-12 dargestellt. Hier wird bei einer Cu(I)-Konzentration von 4 mM ein Maximum erreicht. Der Maximalbereich stimmt mit der für die Markierung von Br-P2NI-Me gefundenen optimalen CuCl Konzentration (3.4.1.3) gut überein.

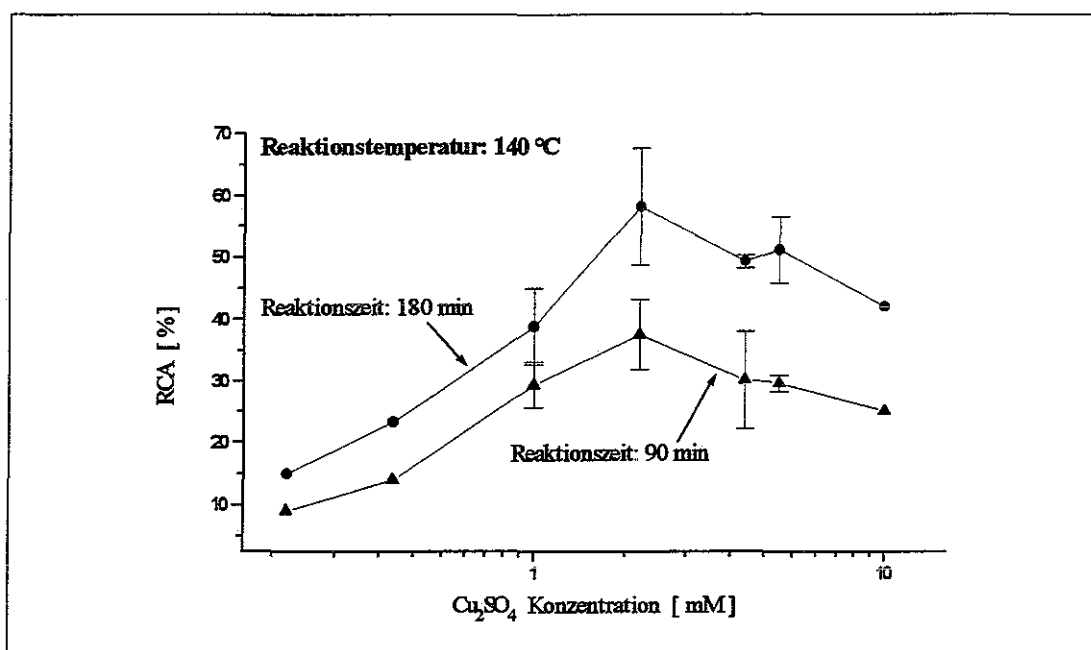


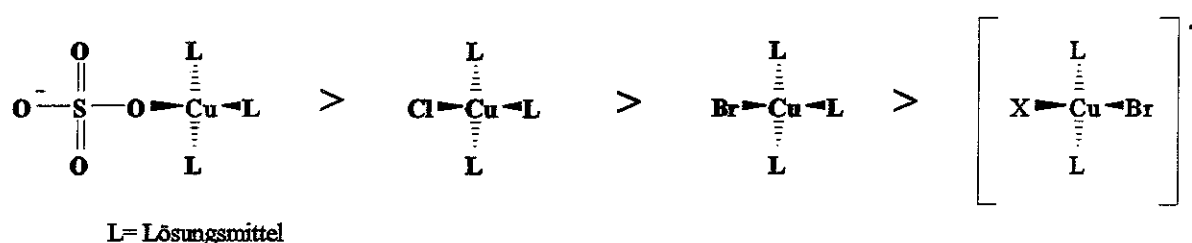
Abb. 3.4-12 Abhängigkeit der Cu_2SO_4 -katalysierten Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me von der Cu_2SO_4 -Konzentration: $T = 140^\circ\text{C}$, Br-P2NI-Me: 25 mM, DMSO

Verglichen mit dem in der Literatur für CuCl bei der Markierung einfacher Modellaromaten angegebenen Verhalten [67], wurde auch beim Cu_2SO_4 eine Ausdehnung des Maximalbereichs über einen kleineren Konzentrationsbereich gefunden. In der nicht logarithmischen linearen Skala ist ein starker Anstieg der RCA bei kleinen Konzentrationen zu erkennen, der nach dem Maximum in einen mäßigen Abfall übergeht. Dieser Kurvenverlauf gilt für die völlige Abwesenheit von Sauerstoff (s. 3.4.3.5). Für hohe Cu(I)-Konzentrationen wird auch bei 140°C eine leichte Zersetzung des Vorläufers beobachtet.

Für das Absinken der katalytischen Aktivität bei höheren Cu(I)-Konzentrationen werden beim CuCl hauptsächlich 2 Effekte verantwortlich gemacht. Zum einen bilden die Kupferhalogene bei höheren Konzentrationen oligomere Strukturen, die keine katalytische Aktivität aufweisen, zum anderen wird die Wahrscheinlichkeit der Kupfer-Disproportionierung nach $2 \text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^0 + \text{Cu}^{2+}$ mit zunehmender Kupferkonzentration immer größer. Ferner wird die Bildung anorganischer Kupfer-Radioiod-Spezies postuliert, die keine Austauschigenschaften mehr aufweisen [67].

Beim Einsatz von Cu_2SO_4 sollte die Bildung von Oligomeren keine Rolle spielen. Auch die Begrenzung der katalytischen Aktivität des CuCl aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit in DMSO ist hier ohne Bedeutung. Trotzdem wurde für Cu_2SO_4 ein vergleichbarer Verlauf der RCA in Abhängigkeit von der Katalysatorkonzentration gefunden. Demnach scheinen die mit der Kupferkonzentration zunehmende Disproportionierungsreaktion oder/und die Bildung inaktiver Kupfer-Radioiod-Spezies die wichtigsten begrenzenden Faktoren der Radioioddebromierung zu sein. Ausgehend von diesen Überlegungen sollte die höhere Aktivität des Cu_2SO_4 -Katalysators, verglichen mit der des CuCl , nicht auf die bessere Löslichkeit und den damit verbundenen höheren Cu(I) -Konzentrationen, sondern auf eine erhöhte Austauschaktivität des halogenfreien Kupferkomplexes zurückzuführen sein.

Aufgrund der vorliegenden Daten bezüglich der Radioioddebromierung kann in diesem Zusammenhang die folgende Reihenfolge in der Aktivität der Cu(I) -Komplexe aufgestellt werden:



Erwartungsgemäß ist die Aktivität umgekehrt proportional zur Komplexbildungsstärke (s. o.). Reagiert ein Kupferkomplex nach dem obigen Modell (s. 3.4.3), so wird prinzipiell ein Ligand gegen Brom ausgetauscht und ein negativ geladener Komplex erhalten, der nur noch geringe Austauschaktivität aufweisen dürfte. Nach dieser Umkomplexierung dürfte das relativ stark gebundene Bromid im Komplex verbleiben, so daß dieser Kupferkomplex nur noch im geringem Maße zur Austauschreaktion beitragen dürfte. Demnach kann im strengen Sinn nicht mehr von einer katalytischen Reaktion gesprochen werden, was für n.c.a.-Reaktionen allerdings ohne Bedeutung sein sollte.

Auffällig bezüglich der "katalytischen" Wirkung sind die für die Austauschreaktion relativ hohen Cu(I) -Konzentrationen. Diese können über die relativ geringe Gleichgewichtskonzentration oder einer geringen Bildungsrate des Radioiodkomplexes RIK^- in Rk-Gl.1 erklärt werden.

3.4.3.5 Luft- und Wasserempfindlichkeit

Luftempfindlichkeit

Auf die ausgeprägte Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber Luftsauerstoff wurde hingewiesen. Sowohl die RCA der Radioioddebromierung als auch deren Abhängigkeit von der Katalysatorkonzentration änderten sich beim Arbeiten in Anwesenheit von Sauerstoff. In Tab. 3.4-4 ist zur Verdeutlichung dieses Effekts ein direkter Vergleich aufgeführt. In Gegenwart von Sauerstoff muß mit Ausbeuteeinbußen von mehr als 50 % gerechnet werden. Gleichzeitig wurde für die Abhängigkeit der RCA von der Katalysatorkonzentration unter Anwesenheit von Sauerstoffspuren im Cu(I) -Konzentrationsbereich von 1-8 mM kein Maximum wie in Abb. 3.4-12, sondern ein stetiger Anstieg gefunden. Dieses Phänomen wurde bei anfänglichen Messungen beobachtet und verschwand mit der Einführung weiterer Maßnahmen zum konsequenten Ausschluß von Luftsauerstoff. Auch hier wurde die starke Sauerstoffempfindlichkeit der Markierungsreaktion deutlich.

Offensichtlich wird durch Sauerstoffspuren der sich relativ langsam bildende "aktive" Radiokomplex RIK⁻ schnell oxidiert und abgefangen, so daß die tatsächliche RIK⁻-Konzentration die des Maximalbereiches nicht überschreiten kann.

Tab. 3.4-4 Zur Luftempfindlichkeit der Reaktion

Reaktion	RCA [%]
Reaktion unter Argonatmosphäre	48
Vergleichsreaktion unter Luftatmosphäre	23
Reaktionsbedingungen: T= 140°C, Br-P2NI-Me: 25mM, Cu ₂ SO ₄ : 2 mM, Reaktionszeit: 180 min	

Wasserempfindlichkeit

Die Wasserempfindlichkeit von Radioiodierungsreaktionen ist insofern von Bedeutung, als das zur Markierung eingesetzte Radioiod als Iodid in alkalisch wäßrigen Lösungen vorliegt. Werden wasserempfindliche Vorläufer oder Reaktionsbedingungen verwendet, ist ein zusätzlicher Trocknungsschritt bei der Radiosynthese erforderlich. Mit dem Markierungssystem CuCl/DMSO konnte in der Literatur bei der Radioioddebromierung einfacher Modellaromaten auch in Anwesenheit von 25 % Wasser keine negative Beeinflussung der RCA beobachtet werden [67].

Auch bei Untersuchungen des Cu₂SO₄/DMSO Systems hinsichtlich der Wasserempfindlichkeit wurde innerhalb des untersuchten Bereiches bis zu einem Wasseranteil von 15 % keine Beeinträchtigung der RCA gefunden (Tab. 3.4-5).

Tab. 3.4-5 Einfluß von Wasser auf die RCA des Cu₂SO₄/DMSO Systems

Wassergehalt [Volumen %]	RCA [%]	Wassergehalt [Volumen %]	RCA [%]
0	86,50 ± 8,3	5	83,75 ± 9,5
1	84,00 ± 8,5	7	80,33 ± 8,9
2	78,50 ± 4,2	8	89,50 ± 4,4
3	73,50 ± 9,8	10	83,00 ± 2,9
4	86,00 ± 5,7	15	81,00 ± 7,5
Reaktionsbedingungen: T= 140°C; Br-P2NI-Me: 50mM; Cu ₂ SO ₄ : 2 mM; Reaktionszeit: 180 min			

3.4.3.6 Einfluß des Lösungsmittels

Nach dem obigen Modell hängt die Reaktion in entscheidendem Maße vom Lösungsmittel ab, da dieses den aktiven Komplex ([L₂CuXI*]) maßgeblich in der Koordinationssphäre und damit in seinen elektronischen und chemischen Eigenschaften beeinflussen sollte. Als weitere Reaktionsmedien bei der Radioioddebromierung mit dem Cu₂SO₄/DMSO-System wurden die Lösungsmittel Acetonitril, Dimethylformamid (DMF), Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT), Dimethyltetrahydropyrimidinon (DMPU) und Eisessig, allein oder im Gemisch mit DMSO, getestet.

Wäßrige Systeme wurden aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Methylesters nicht untersucht. Die Lösungsmittel wurden vor der Reaktion durch Trocknung und Destillation unter Argon gereinigt und vom Luftsauerstoff befreit. Eine Übersicht der Ergebnisse dieser Untersuchung wird in Tab. 3.4-6 gegeben.

Tab. 3.4-6 N.c.a.-Radioioddebromierung mit Cu_2SO_4 in verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen

Lösungsmittel	DMSO-Anteil [%]	RCA [%]	Kommentar
DMSO	100	58,2	zum Vergleich
Acetonitril	50	57,6	Verdampfungsverluste
DMF	0 50	45,5 47	Lösungsmittelreinheit
HMPT (frisch)	0	38	Lösungsmittelreinheit
HMPT (7 Tage)	0	14	
DMPU	0 75	5,6 48	ungeeignet

Reaktionsbedingungen: T= 140°C; Br-P2NI-Me.: 25 mM; Cu_2SO_4 : 2 mM; Reaktionszeit: 180 min

- Acetonitril

Mit Acetonitril als Lösungsmittel wurden ähnliche Ausbeuten wie mit DMSO erhalten, so daß Acetonitril in diesem Zusammenhang grundsätzlich als Reaktionsmedium geeignet ist. Allerdings wurden unter den Reaktionsbedingungen größere Verdampfungsverluste beobachtet, so daß hier eine Aussage über die Konzentrationsverhältnisse problematisch war. In Gemischen mit 50 % DMSO, bei denen das Verdampfungsproblem nicht auftrat, konnten mit reinem DMSO vergleichbare RCA erhalten werden (s. Tab. 3.4-6).

- Dimethylformamid (DMF)

Bei DMF wurden sowohl mit dem reinen Lösungsmittel als auch in Gemischen mit 50 % DMSO geringere RCA erhalten als mit dem DMSO-Standardsystem. Hierbei zeigte sich eine starke Abhängigkeit der RCA vom Alter des DMF. Offensichtlich wurde die Reaktion schon von Spuren der in diesem Lösungsmittel gebildeten Amine stark negativ beeinflusst. Die Bildung von stabilen Aminkomplexen ist vom Cu(I) bekannt [234].

- Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT)

Die Untersuchung von HMPT brachte zum DMF vergleichbare Ergebnisse. Die RCA war deutlich niedriger als bei den vorher eingesetzten Systemen. Aus Tab. 3.4-6 wird die starke Abhängigkeit der RCA von der Lösungsmittelqualität deutlich. Auch hier scheint, wie beim DMF, der Einfluß von freien Aminen eine Rolle zu spielen.

- Dimethyltetrahydropyrimidinon (DMPU)

DMPU ist als Lösungsmittel in diesem Zusammenhang ungeeignet. Nur im Gemisch mit DMSO wurden bei einem DMPU-Anteil von 25 % noch RCA von 48 % erreicht, was mit DMF als Lösungsmittel vergleichbar war. Bei reinem DMPU konnte auch nach 180 min nur eine RCA von 5,6 % erhalten werden.

- Eisessig

In Abb. 3.4-13 ist die RCA der Reaktion in der Abhängigkeit vom Essigsäurezusatz dargestellt. In reinem Eisessig konnte keine Radioiodierung erreicht werden. Vielmehr wurde eine starke Zersetzung des Br-P2NI-Me beobachtet, die vermutlich auf eine Hydrolyse des Methylesters zurückgeführt werden kann. Die Zersetzung wurde auch bei kleineren Essigsäurekonzentrationen in DMSO, allerdings in bedeutend

geringerem Ausmaß, beobachtet. Selbst bei einem 0,5 %igem Zusatz (87,3 mM) wurden noch geringere RCA als bei der essigsäurefreien Reaktion gefunden.

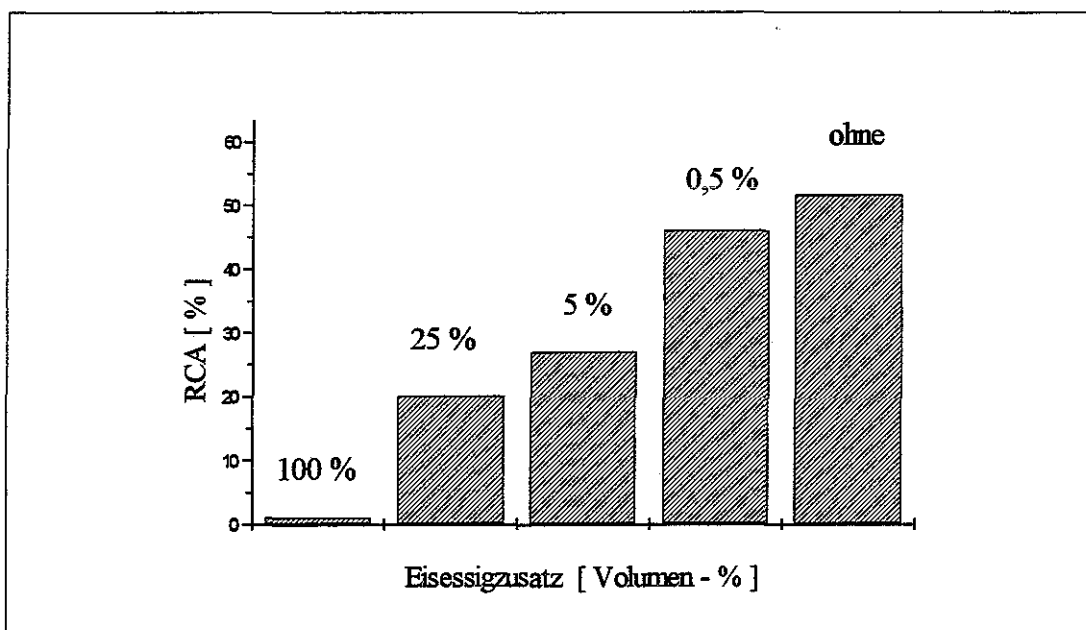


Abb. 3.4-13 Cu_2SO_4 -katalysierte Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me. Zusatz von Eisessig. T = 160 °C, Br-P2NI-Me: 25 mM, Cu(I): 4 mM, DMSO, t = 60 min

3.4.4 Untersuchung des Cu_2SO_4 /DMSO Systems mit weiteren Zusätzen

Zusammenfassend können aus den Untersuchungen des Cu_2SO_4 /DMSO Systems zum aromatischen n.c.a.-"Brom gegen Radioiod"-Austausch am Br-P2NI-Me folgende wichtige Punkte festgehalten werden:

1. Die RCA kann durch Erhöhung der Cu(I)-Konzentration nicht verbessert werden.
2. Die RCA kann zwar mit einer höheren Reaktionstemperatur gesteigert werden, wobei aber eine zunehmende Bildung von Nebenprodukten in Kauf genommen werden muß.
3. Die RCA kann durch den Einsatz höherer Vorläuferkonzentrationen verbessert werden, wobei auch hier eine Sättigung erreicht wird. Überdies wird die problematische Abtrennung des Vorläufers relevant.
4. Die Reaktion ist extrem sauerstoffempfindlich.
5. Die Reaktion verläuft über einen komplexartigen Übergangszustand.

Zudem wurde für das $\text{Cu}(\text{II})\text{SO}_4$ /Reduktions-System in wäßrigen Reaktionsmedien die große Bedeutung von sauren pH-Werten aufgezeigt [72]

Zur weiteren Optimierung der Reaktion boten sich demnach drei Punkte an:

- A: Zusatz von Säuren zur Neutralisation sowohl von eventuell gebildeten basischen Kupferoxiden als auch der eingesetzten alkalischen Radioiodidlösung.
- B: Zusatz von geeigneten Komplexbildnern, die zur Stabilisierung des Übergangszustandes beitragen.
- C: Zusatz von geringen Mengen an schwachen Reduktionsmitteln zur Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber Luftsauerstoff.

3.4.4.1 Zusatz von Carbonsäuren und Komplexbildnern

Carbonsäuren

Die Vorversuche mit Essigsäure hatten gezeigt, daß ein Säurezusatz in größeren Mengen die RCA der Reaktion nicht analog den wäßrigen Systemen steigern konnte. Neben der höheren Zersetzung des Vorläufers bei hohen Säurekonzentrationen wurden auch bei geringeren Säurekonzentrationen von 90 mM schlechtere Ergebnisse erzielt als ohne Essigsäurezusatz (3.4.3.6).

Üblicherweise werden in der Literatur bei den wäßrigen Systemen neben Essigsäure auch Zitronensäure oder die zusätzlich reduzierend wirkende Gentisinsäure eingesetzt (s. 3.4), wobei hier keine klare Differenzierung darüber zu treffen ist, ob die Schaffung eines sauren Reaktionsmediums oder die zusätzliche Komplexierung des Cu^+ -Ions ausschlaggebend für die besseren Markierungsausbeuten ist. Aufgrund des gleichzeitigen Einsatzes der Reagenzien neben Essigsäure sollten eher die komplexierenden Eigenschaften der Verbindungen im Mittelpunkt stehen. Daher kann dies nach dem obigen Modell des komplexartigen Übergangszustandes zumindest als ein Hinweis zur positiven Beeinflussung der Koordinationssphäre des Kupfers durch chelatisierend wirkende Carbonsäuren angesehen werden. Cu(I) -Komplexe von Monocarbonsäuren sind in der Literatur bekannt und werden, abgesehen von der charakteristischen Luft- und Feuchtigkeitsempfindlichkeit, als relativ stabile Verbindungen beschrieben [235,236]. Deshalb wurden trotz der Erfahrungen mit Essigsäure und trotz der problematischen Übertragung von den beschriebenen wäßrigen Systemen auf das DMSO, zur Ansäuerung neben Zitronensäure auch die chelatisierend wirkenden Säuren Weinsäure und Oxalsäure getestet. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tab. 3.4-7 zusammengefaßt.

Tab. 3.4-7 N.c.a.-Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me mit Cu_2SO_4 unter Zusatz chelatisierender Carbonsäuren

Säure	RCA [%] mit Br-P2NI-Me		Kommentar
	25 mM	50 mM	
ohne Zusatz (3.4.3)	$58,2 \pm 9,4$	$82,8 \pm 4,2$	zum Vergleich
Zitronensäure	$66 \pm 7,9$	$90 \pm 3,5$	gut geeignet
Weinsäure	$63 \pm 8,3$	$78 \pm 13,5$	gut geeignet
Oxalsäure	$44,5 \pm 7,2$	-	Zersetzungstendenz
Reaktionsbedingungen: $T = 140^\circ\text{C}$; Cu_2SO_4 : 2 mM; Säure: 2 mM; Reaktionszeit: 180 min			

Die RCA konnten durch den Zusatz von chelatisierenden Säuren in einem zum Cu(I) analogen Konzentrationsbereich grundsätzlich verbessert werden. Da dieser Effekt bei der Oxalsäure nicht beobachtet wurde, kann bedingt auf deren Wirkung als schwaches Reduktionsmittel zurückgeführt werden. Beim Einsatz von Oxalsäure in höheren Konzentrationen wurde auch eine dementsprechend höhere Zersetzungstendenz gefunden. Wein- und Zitronensäure zeigten in diesem Zusammenhang ein ähnliches Verhalten.

In Abb. 3.4-14 sind die kinetischen Daten der Radioioddebromierung beim Zusatz von Säuren im Vergleich zur Standardreaktion gezeigt. Hierbei ist das Verhalten der Reaktion mit Weinsäure- und Zitronensäurezusatz annähernd identisch, so daß auf die Darstellung beider Kurven verzichtet wurde. Durch den Einsatz der Säuren wird die Zeitabhängigkeit der Markierungsreaktion so geändert, daß die Kurven mit zunehmender Reaktionszeit divergieren. Dies deutet auf eine Veränderung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten k'

in Gl. 1.5-4 und damit auf eine Aktivierung bzw. Deaktivierung des reaktiven Komplexes hin. Da im Fall der Oxalsäure unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur eine relativ geringe Menge an Zersetzungsprodukten auftrat, sollte in diesem Fall eher von einer Inaktivierung durch Komplexbildung des Kupfers ausgegangen werden.

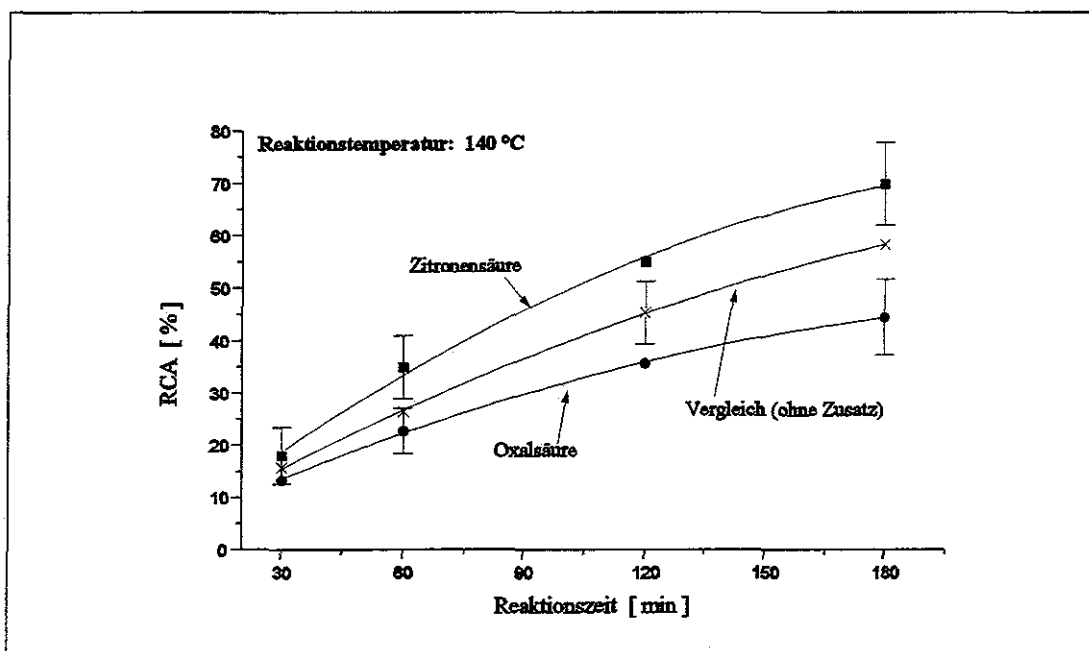


Abb. 3.4-14 Cu_2SO_4 -katalysierte Radioioddeobromierung. von Br-P2NI-Me. Zusatz von Säuren. $T = 140^\circ\text{C}$, Br-P2NI-Me: 25 mM, Cu(I): 4 mM, DMSO

Der Einfluß der Säuren auf die RCA, auch in relativ geringen Konzentrationen, konnte damit nicht auf die Säureeigenschaft zurückgeführt werden. Vielmehr wurde gerade die Zitronensäure als Reagens mit komplexierender Stabilisierung des Übergangszustandes auch in DMSO als Reaktionsmedium bestätigt. Folglich sollte sowohl in wäßrigen als auch in organischen Lösungen vom gleichen Reaktionsmechanismus ausgegangen werden können.

Konzentration der zugesetzten organischen Säure

Im Hinblick auf den Rückgang der RCA durch Essigsäure stellte sich die Frage nach dem Verhalten der Reaktion bei höheren Konzentrationen der untersuchten organischen Carbonsäuren.

Oxalsäure:

Auch wenn Oxalsäure als Zusatz bei der Cu(I)-katalysierten Radioioddeobromierung grundsätzlich geringere Ausbeuten lieferte, konnte mit zunehmender Konzentration (bis 40 mM) nur eine geringe Abnahme der RCA beobachtet werden. Die Zersetzungstendenz des Vorläufers wurde erwartungsgemäß größer, so daß die RCA nach 120 min ein Maximum aufwies, um dann wieder langsam abzufallen.

Weinsäure:

Wie bei der Oxalsäure wurde auch für Weinsäure oberhalb einer Konzentration von 10 mM eine zunehmende Zersetzungstendenz des Vorläufers beobachtet. Zudem wurde das Absinken der RCA mit steigenden Konzentrationen in stärkerem Maße beobachtet als bei der Oxalsäure, so daß bei Weinsäurekonzentrationen

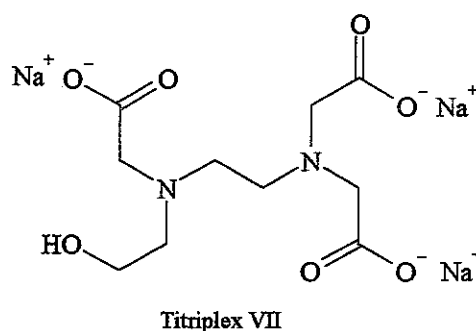
von 30 mM nur noch 60 % der RCA des niedrigen Konzentrationsbereiches gefunden wurden. Darüber hinaus wurde auch bei höheren Konzentrationen in der Reaktionskinetik bei einer Reaktionszeit von 120 min ein Maximum beobachtet.

Zitronensäure

Bis zu Konzentrationen von 30 mM wurde mit Zitronensäure keine Verschlechterung der RCA beobachtet. Im Unterschied zu den anderen Säuren konnte hier weder die typische Zersetzungstendenz noch ein Maximalverhalten der RCA in Abhängigkeit von der Reaktionszeit festgestellt werden.

Komplexbildner

Die Untersuchung des Einflusses von N-haltigen Komplexbildnern galt mehr dem mechanistischen Aspekt als der Optimierung der Markierungsreaktion, da die starke Cu(I)-Komplexierung mit N-Funktionen bekannt war [234]. Mit Harnstoff wurde eine Art deaktiviertes Amin bezüglich der Komplexbildungstendenz untersucht. Sowohl bei dem EDTA-



Derivat Titriplex VII als auch beim Harnstoff wurden geringere RCA gefunden. In Abb. 3.4-15 ist der Einfluß von Titriplex VII auf die "Brom gegen Radioiod"-Austauschreaktion aufgeführt. Die hohe Komplexbildungstendenz des Titriplex VII schlägt sich in einem ausgeprägten Effekt nieder. Schon bei einem Titriplex VII/Cu(I)-Verhältnis von 0,5 (2 mM) wurden weniger als 1,5 % RCA beobachtet.

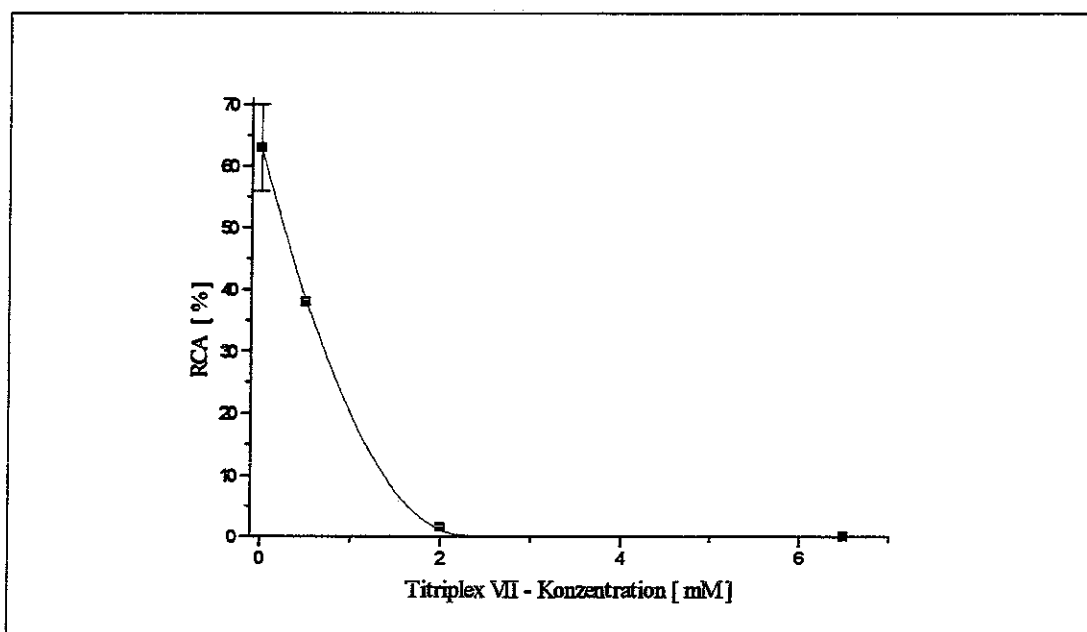


Abb. 3.4-15 Cu_2SO_4 -katalysierte Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me. Zusatz von Titriplex VII. Reaktionstemperatur: 140 °C, Br-P2NI-Me: 25 mM, Cu(I): 4 mM, DMSO

Der Effekt von Harnstoff war bedeutend geringer ausgeprägt. Hier wurden bei einem 10fachen Überschuß zum eingesetzten Cu(I) immerhin noch eine RCA von 9 % gefunden.

Auch diese Experimente stehen in Übereinstimmung mit dem obigen Modell eines komplexartigen Übergangszustandes, da offensichtlich eine Inhibition des Übergangskomplexes durch den Komplexbildner erfolgt.

3.4.4.2 Zusatz von Reduktionsmitteln

Reduktionsmittel sollten bei der Cu(I)-katalysierten Radioioddebromierung nicht nur für die Erzeugung einer geeigneten Konzentration von Cu(I) aus Cu(II) und der Rückoxidation von gebildetem Cu(II) sorgen, sondern auch zur Elimination von störendem Sauerstoff beitragen. Daher spielt die Sauerstoffempfindlichkeit dieser Reaktion bei den Cu(II)/Reduktions-Systemen keine Rolle. Hier wird im allgemeinen nicht unter Inertgasbedingungen gearbeitet. Gleichfalls sollte der Zusatz von Reduktionsmitteln auch die Sauerstoffempfindlichkeit der betrachteten Reaktion herabsetzen und dadurch deren Handhabbarkeit verbessern.

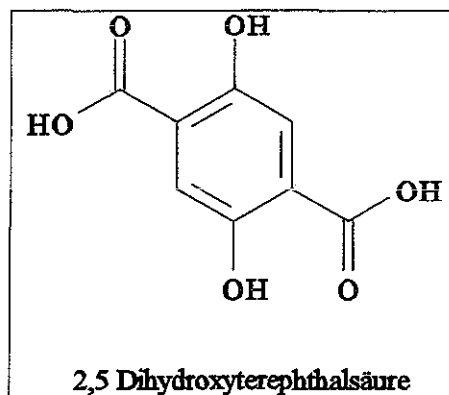
Die ausgeprägte Reduktionsempfindlichkeit der Nitroimidazole erlaubt in diesem Zusammenhang nur den Einsatz schwacher Reduktionsmittel. Erwartungsgemäß führte der Zusatz von Na_2SO_3 auch in geringen Konzentrationen von 2 mM bei dem reduktionsempfindlichen Vorläufer nach Reaktionszeiten von mehr als 90 min zur starken Abnahme der RCA und zur zunehmenden Bildung von radioaktiven und inaktiven Zersetzungsprodukten. Auf die Untersuchung von Ascorbinsäure wurde in diesem Zusammenhang verzichtet, da bei ihrem Einsatz innerhalb des Cu(I)/DMSO-Systems schon nach 10 Minuten eine Dunkelbraunfärbung in Verbindung mit vielen inaktiven Zersetzungsprodukten auftrat. Dabei wurde das Br-P2NI-Me nicht angegriffen.

Als schwaches Reduktionsmittel bot sich zunächst das Chinonderivat 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) an. Die DHB wurde bei der Cu(I)-katalysierten Radioioddebromierung als reduzierender Zusatz eingesetzt (s. 3.4). Diese Verbindung zeigte allerdings keine Vorteile gegenüber dem einfachen $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}$ -System und lieferte schlechtere RCA als die Markierungsreaktion unter Zitronensäurezusatz. Jedoch wurde mit DHB-Konzentrationen bis zu 35 mM unter den üblichen Reaktionsbedingungen nur eine geringe Zersetzung des Vorläufers beobachtet, so daß Chinone als Reduktionsmittel grundsätzlich geeignet zu sein schienen.

2,5-Dihydroxyterephthalsäure

Da sich die 1,5-Dicarbonsäure Zitronensäure bewährt hatte, lag der Gedanke nahe, die drei Optimierungsprinzipien Säure, Komplexierung und schwache Reduktion in einem Molekül zu vereinen. Hierzu wurde die käufliche 2,5-Dihydroxyterephthalsäure (DHT) ausgewählt.

Mit DHT als Zusatz zur Cu_2SO_4 -katalysierten Radioioddebromierung konnten RCA erhalten werden, die mit Zitronensäure als Zusatz vergleichbar waren. Bis zu einer DHT-Konzentration von 10 mM wurde keine negative Beeinträchtigung der Ausbeute bzw. keine Bildung von



Nebenprodukten beobachtet. Allerdings lagen die RCA bei höheren Konzentrationen (30 mM) deutlich niedriger. In Abb. 3.4-16 werden die Kinetiken des $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}$ -Systems bei der Markierung von Br-P2NI-Me mit und ohne DHT verglichen. Der Kurvenverlauf der Markierungsreaktion mit DHT stellt eine Parallelverschiebung zur Y-Achse gegenüber der zusatzfreien Reaktion dar.

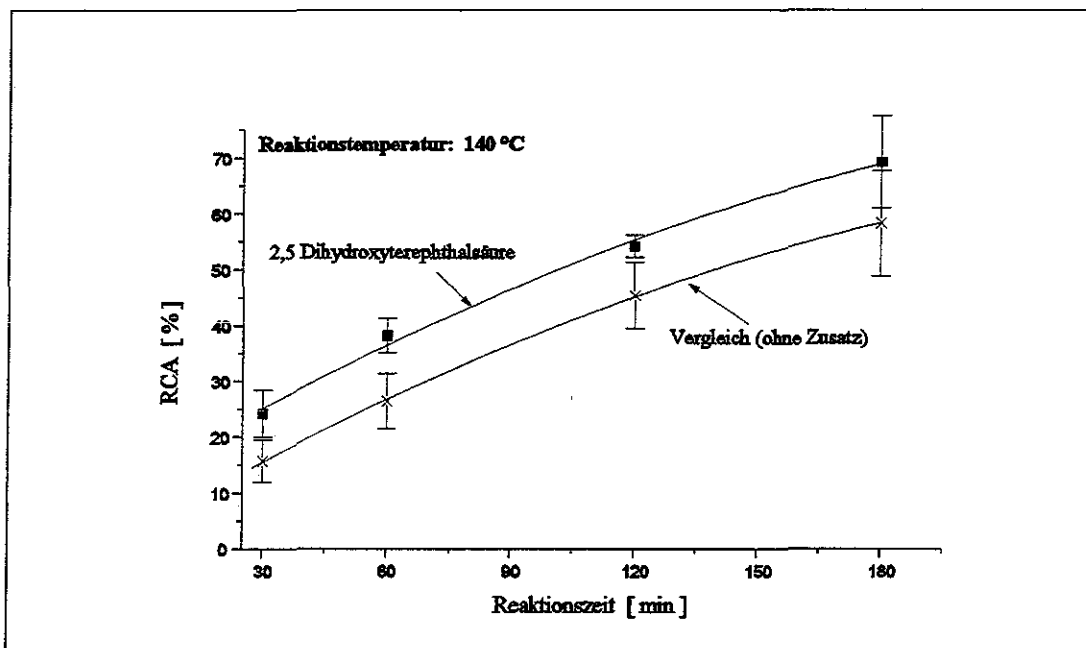


Abb. 3.4-16 2,5-Dihydroxyterephthalsäure in der Cu_2SO_4 -katalysierten Radioiodde-bromierung von Br-P2NI-Me: Br-P2NI-Me: 25 mM, Cu(I): 4 mM, DMSO, DHT: 2 mM

Auch wenn mit DHT gleich gute Resultate wie mit Zitronensäure erzielt werden, deutet der unterschiedliche Kurvenverlauf im Vergleich zur zusatzfreien Reaktionsführung auf einen unterschiedlichen Reaktionsmechanismus oder zumindest einen zusätzlichen Effekt hin. Kann der Kurvenverlauf bei der Zitronensäure durch eine Änderung der Geschwindigkeitskonstante k' in Gl. 1.5-4 und der dem zugrundeliegenden Reaktivitätsänderung des Cu(I)-Komplexes hinreichend erklärt werden, so weist der Parallelverlauf der Kurven in Abb. 3.4-16 auf eine Zunahme der Cu(I)-Konzentration bei annähernd unveränderter Geschwindigkeitskonstante hin. Zum Vergleich der reduktiven Zusätze sind die Ergebnisse in Tab. 3.4-8 zusammengefaßt.

Tab. 3.4-8 N.c.a.-Radioiodde-bromierung von Br-P2NI-Me mit Cu_2SO_4 unter Zusatz von Reduktionsmitteln

Säure	RCA [%] mit Br-P2NI-Me		Kommentar
	25 mM	50 mM	
ohne Zusatz (3.4.4)	58,2 ± 9,4	82,8 ± 4,2	zum Vergleich
Zitronensäure	66 ± 7,9	90 ± 3,5	
Na_2SO_3	38 ± 7,4	-	ungeeignet
Dihydroxybenzoesäure	48,5 ± 7,2	83 ± 6,5	leichte Zersetzungstendenz
Dihydroxyterephthalsäure	69,3 ± 8,3	90 ± 4,3	gut geeignet
Reaktionsbedingungen: T= 140°C; Cu_2SO_4 : 2 mM; Reduktionsmittel: 2 mM; Reaktionszeit: 180 min			

3.4.4.3 Weitere Cu(I)-Komplexe zur Radioioddebromierung

Grundsätzlich sollten nach den bisherigen Erfahrungen alle nicht zu schwer löslichen Cu(I)-Komplexe zur aromatischen Radioioddebromierung geeignet sein. Da in der Literatur stabile Komplexe mit aromatischen Carbonsäuren bekannt sind [235,236], sollte die Kombination von Cu(I) mit einer reduzierenden Verbindung durch die Darstellung eines Cu(I)-DHB- oder Cu(I)-DHT-Komplexes möglich sein. Durch die Komplexierung könnten eventuell weniger luft- und wasserempfindliche Cu(I)-Katalysatoren erhalten werden, die ebenso gute oder bessere RCAn ermöglichen.

Durch das Einbringen von Cu_2SO_4 in eine Lösung von DHB bzw DHT in Acetonitril konnten entsprechende Verbindungen erhalten werden. Diese konnten in Acetonitril umkristallisiert werden, waren bedeutend besser in organischen Lösungsmitteln löslich und ergaben eine relativ stabile Lösung. Allerdings wiesen diese Verbindungen die gleiche Luftempfindlichkeit und damit eine ähnlich schlechte Handhabbarkeit wie Cu_2SO_4 auf. Darüber hinaus wurden in Vorversuchen zur Markierung des Br-P2NI-Me zwar eine Markierungsaktivität gefunden, aber kaum die RCA des $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}$ -Systems erreicht. Daher wurde auf eine Charakterisierung und weitere Untersuchung dieser Verbindungen verzichtet.

3.4.5 Zusammenfassender Vergleich der Cu(I)-Markierungssysteme

Zum Überblick sind in Tab. 3.4-9 die RCAn der verschiedenen Markierungssysteme bezüglich der nukleophilen aromatischen Radioioddebromierung am p-Bromphenylalaninderivat Br-P2NI-Me zusammengefaßt. Soweit vorhanden sind auch die RCAn unter Synthesebedingungen im semipräparativen Maßstab bei einer Vorläuferkonzentration von 50 mM aufgeführt. Alle Messungen wurden bei 140°C durchgeführt.

Tab. 3.4-9 N.c.a.-Radioioddebromierung von Br-P2NI-Me mit Cu_2SO_4 . Vergleich der unterschiedlichen Cu(I)-Markierungssysteme

Markierungssystem	RCA [%] mit Br-P2NI-Me	
	25 mM	50 mM
CuCN/DMSO	9,5	-
CuBr/DMSO	31 ± 5,3	-
CuCl/DMSO	36,1 ± 3	-
$\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{HMPT}$	38	-
$\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMF}$	45,5 ± 2,2	-
$\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}$	58,2 ± 9,4	82,8 ± 4,2
$\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{ZS}$	66 ± 7,9	90 ± 3,5
$\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{DHT}$	69,3 ± 8,3	90 ± 4,3

Reaktionsbedingungen: T= 140°C; Cu(I)⁺: 4 mM; Reduktionsmittel: 2 mM; Reaktionszeit: 180 min. ZS: Zitronensäure; DHT: 2,5-Dihydroxyterephthalsäure, DMSO: Dimethylsulfoxid, DMF: Dimethylformamid; HMPT: Hexamethylphosphorsäuretriämid

Die Systeme der Wahl sind offensichtlich das $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{ZS}$ -System und das $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{DHT}$ -System, mit denen die besten Ergebnisse erhalten wurden.

Die Entscheidung über die Verwendung eines Markierungssystems hängt in erster Linie von den chemischen Eigenschaften des eingesetzten Vorläufers und des erhaltenen Radioiodproduktes ab. Bei sehr

reduktionsempfindlichen Verbindungen empfiehlt sich eher der Einsatz der Zitronensäure, wohingegen säureempfindliche Substanzen besser ohne Zusätze markiert werden sollten.

Bei den Cu-Halogenid/DMSO Systemen hat sich das CuCl als die beste Cu(I)-Verbindung erwiesen. Im Vergleich zur Cu₂SO₄-Variante werden hier zwar schlechtere RCAn erhalten, wobei sich aber die Handhabbarkeit des Katalysators leichter gestaltet. CuCl ist im Unterschied zu Cu₂SO₄ käuflich und kann an Luftatmosphäre abgewogen und umgefüllt werden. Andererseits weist CuCl eine relativ schlechte Löslichkeit in DMSO auf. DMSO ist in diesem Zusammenhang als das Lösungsmittel der Wahl anzusehen.

3.5 Optimierte Darstellung und Reinigung von ¹³¹I-P2NI-Me

Die optimalen Reaktionsbedingungen zur Darstellung von ¹³¹I-P2NI-Me über die Cu(I)-katalysierte nukleophile aromatische Radioioddebromierung am Br-P2NI-Me wurden in Abschnitt 3.4 erarbeitet. Für die Synthese wurden hauptsächlich zwei Systeme eingesetzt:

A: Cu₂SO₄/DMSO/Zitronensäure

B: Cu₂SO₄/DMSO/Dihydroxyterephthalsäure

Dabei wurde dem reduktionsmittelfreien System A der Vorzug gegeben.

Ein spezielles Problem der n.c.a.-Radioioddebromierungen ist die Abtrennung des chemisch und chromatographisch sehr ähnlichen Radioiodproduktes vom Vorläufer. Dementsprechend wurde die Reinigung mittels einer HPLC durchgeführt.

Nach der Aufarbeitung und Reinigung konnten 70-75 % der eingesetzten Radioaktivität in der applikationsfertigen Lösung erhalten werden. Das Radioiodprodukt lag in einer radiochemischen Reinheit von 99,0 % vor. Die spezifische Aktivität wurde zu 6,2-7,4 TBq/mmol (170 - 200 Ci/mmol) bestimmt.

3.5.1 Synthese der Radioiodverbindung: ¹³¹I-P2NI-Me

Anders als bei den Vorversuchen sollen bei der "Produktion" einer Radioverbindung hohe Aktivitätsmengen eingesetzt werden, so daß es sich hier um eine Art "Upscaling" in einen semipräparativen Maßstab handelt. Da die Wasserempfindlichkeit des Reaktionssystems nur gering war und höherer Alkalimengen durch die Zitronensäure abgefangen werden konnten, war der Einsatz größerer Aktivitätsmengen durch die Erhöhung der Menge der Radioiodidlösung unproblematisch. Darüber hinaus war es im Hinblick auf die Vereinfachung der nachfolgenden Aufarbeitung angebracht, mit möglichst geringen Substanz- und Lösungsmittelmengen zu arbeiten.

In diesem Zusammenhang konnten die optimalen Reaktionsbedingungen zur Markierung des Br-P2NI-Me, die sich aus der vorangegangenen Optimierung des Cu₂SO₄/DMSO/ZS-Systems ergaben, weitestgehend übernommen werden. Die optimalen Reaktionsbedingungen der Produktion sind in Tab. 3.5-1 zusammengefaßt. Ansonsten wurde eine zu den Optimierungsreaktionen analoge Reaktionsführung verwendet.

Tab. 3.5-1 Optimale Parameter der Cu(I)-katalysierten Synthesereaktion von ^{131}I -P2NI-Me

Parameter	Einstellung	Ergebnis	
DMSO	100 µl	RCA: spezifische Aktivität:	85 - 95 %
Cu ₂ SO ₄ - Konzentrationen	2 - 4 mM		6,2 - 7,4 TBq/mmol
Br-P2NI-Me- Konzentration	40 - 50 mM		
Zitronensäure- Konzentration	2 - 4 mM		radiochemische Reinheit:
Reaktionstemperatur	140 °C	99,0 %	
Reaktionszeit	150 - 180 min		
eingesetzte Aktivität	30 - 100 MBq		

3.5.2 Aufarbeitung und Formulierung von ^{131}I -P2NI-Me

Die Aufarbeitung der Reaktion umfaßt die Abtrennung des Reaktionsproduktes bis hin zur Formulierung einer applikationsfertigen Lösung. Diese kann in 3 Abschnitte unterteilt werden:

1. Auftrennung des Reaktionsgemisches, Abtrennung des Radioiodproduktes von den Zusätzen
2. Abtrennung des Radioiodproduktes vom Vorläufer
3. Formulierung einer applikationsfertigen Lösung

Dabei ist der problematische Schritt in der Abtrennung vom Vorläufer zu sehen.

1. Auftrennung des Reaktionsgemisches

Zur Auftrennung des Reaktionsgemisches mußten hauptsächlich hydrophile Verbindungen aus der DMSO-Lösung entfernt werden. Eine direkte Auftrennung durch den Einsatz der HPLC konnte aufgrund des Cu(I), das in Verbindung mit Wasser sofort einen unlöslichen Niederschlag ergab, nicht durchgeführt werden. Hier erwies sich der Einsatz von Sep-Pack-Kartuschen (RP-18 Material) als besonders günstig. Durch die Verdünnung des Reaktionsgemisches mit Wasser und die nachfolgende Fixierung der organischen Produkte auf der Kartusche konnten sowohl der Kupferkatalysator als auch die Zitronensäure sowie das DMSO und nicht abreagiertes Radioiod vollständig abgetrennt werden. Durch Elution mit Acetonitril wurde das Radioiodprodukt/Edukt-Gemisch in sauberer Form erhalten.

2. Abtrennung des Radioproduktes vom Vorläufer

Aufgrund der chemischen und chromatographischen Ähnlichkeit des Radioproduktes und des Eduktes war die HPLC-Abtrennung problematisch. Im allgemeinen wurde eine mehr oder weniger starke Überlagerung der Peaks beobachtet. Ferner führte eine Verlängerung der Retentionszeiten durch eine geeignete Änderung der Trennbedingungen gleichzeitig zu einer Peakverbreiterung, so daß zwar der Unterschied der Retentionszeiten vergrößert, aber die Trennung nur wenig verbessert werden konnte.

Die Trennung mit Si-60-Material bot zwar den Vorteil, daß hier die lipophilere Radioiodverbindung zuerst eluiert wurde und demnach nicht im unvermeidlichen Backtailing des Vorläuferpeaks auftrat, konnte aber nicht bis zu einem ausreichenden Unterschied der Retentionszeiten der Peaks weiterentwickelt werden. Zudem wurde bei geringen Spuren von Wasser eine Zersetzung der Radioiodverbindung auf der Säule beobachtet. Auf RP-Material (reversed phase) wurde andererseits zwar eine bessere Auftrennung der Peaks erreicht, wobei diese für die vollständige Auftrennung nicht ausreichte, da das Edukt zuerst eluiert wurde und somit das

Radioprodukt innerhalb dessen Backtailings auftrat. Die besten Trennergebnisse wurden mit einer RP-Phase erreicht, die mit "Nitroaromaten" (Säule S3, s. Abschnitt 5.5.1) beladen war. Allerdings waren auch hier zwei Durchläufe zur vollständigen Abtrennung des Vorläufers notwendig. Daher wurde die erste Trennung auf einer RP-18 Säule (Säule S2, s. Abschnitt 5.5.1) und die Endreinigung auf der Nitroaromatsäule (S3) durchgeführt. Bezüglich des eingesetzten Vorläufers (Br-P2NI-Me) konnte nach der ersten Trennung eine apparente spezifische Aktivität von etwa 1 Ci/mmol erhalten werden. Nach der 2. Trennung lag diese bei mehr als 400 Ci/mmol. Damit betrug die Br-P2NI-Me-Masse etwa die Hälfte des I-P2NI-Me-Trägers.

3. Formulierung einer applikationsfertigen Lösung

Bei den zur Anwendung an Lebewesen eingesetzten Tracerlösungen müssen folgende Punkte beachtet werden:

- Es dürfen keine giftigen oder stark reizenden Verbindungen enthalten sein.
- Es muß für ausreichende Sterilität gesorgt werden.
- Wäßrige Systeme müssen isotonisch zum Blutplasma sein.
- Speziell für Tierversuche an Mäusen dürfen nicht zu große Volumina eingesetzt werden.
- Üblicherweise werden wäßrige Kochsalzlösungen verwendet, die maximal 10 % Ethanol enthalten dürfen.

Das saubere Radioprodukt konnte nach dem Abdampfen des Acetonitrils trotz der hohen Lipophilie der Verbindung problemlos in 5 %iger Ethanol/isotonischer-Kochsalzlösung aufgenommen werden. Das Radioprodukt konnte so mit einer radiochemischen Reinheit von 99 % und einer Gesamt-RCA nach der Reinigung von 70-75 % erhalten werden.

3.6 N-(2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl)-p-[¹³¹I]iod-D,L-phenylalanin (¹³¹I-P2NI-S)

Im Tierexperiment trat beim ¹³¹I-P2NI-Me innerhalb kurzer Zeit ein einziger hydrophiler Metabolit auf, der schnell über die Nieren ausgeschieden wurde (Abschnitt 4.2). Die *in vivo* Hydrolyse des Ethylesters eines Nitroimidazol-Phenylalaninderivates ist bekannt [222]. Daher wurde auch hier eine Hydrolyse des Methylesters zur freien Säure angenommen. Eine Überprüfung dieser These sollte durch die Identifizierung des Metaboliten bzw. über die kinetische Untersuchung der Entstehung des ¹³¹I-P2NI-S am Mausmodell erfolgen. Dazu wurde sowohl der kalte Standard als auch die Radioiodverbindung synthetisiert.

3.6.1 Synthese der Radioiodverbindung: ¹³¹I-P2NI-S

Die Markierung des Br-P2NI-S sollte nach den Erfahrungen mit dem Cu₂SO₄/DMSO/ZS-System problemlos möglich sein, da Säurefunktionen in diesem Zusammenhang wenig stören. Trotzdem wurde für die Darstellung des ¹³¹I-P2NI-S der Weg über die alkalische n.c.a.-Hydrolyse des radioiodierten Methylesters eingeschlagen. Hierbei mußten zwar die Probleme des Arbeitens auf dem n.c.a.-Niveau (Abschnitt 1.5) in Kauf genommen werden, dafür entfiel aber die Erarbeitung einer zusätzlichen Abtrennung vom ähnlichen Vorläufer.

Zunächst wurde der pH-Wert als der wichtigste Parameter der alkalischen Hydrolyse zur Optimierung dieser Synthesereaktion genauer untersucht. Dann wurde eine effektive Aufarbeitung und Reinigung des Radioproduktes entwickelt.

In Abb. 3.6-1 ist die Abhängigkeit der RCA der alkalischen n.c.a.-Hydrolyse von der Reaktionszeit bei

verschiedenen pH-Werten aufgeführt. Aus Abb. 3.6-2 kann die Abhängigkeit der Hydrolysereaktion vom pH-Wert ersehen werden. Aus den dargestellten Kurven wird die hohe Empfindlichkeit des ^{131}I -P2NI-Me gegenüber alkalischen Lösungen deutlich. Die Verseifung wurde bei Raumtemperatur und verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Schon bei pH 9 war eine allmähliche Zersetzung zu erkennen, wobei nach 20 h noch 30 % der Ausgangsverbindung vorhanden waren. Auffällig war der sprunghafte Anstieg der Hydrolysegeschwindigkeit zwischen pH 10 und pH 11. Bei pH 12 wurde schon nach 5 Minuten eine 100 %ige Hydrolyse beobachtet.

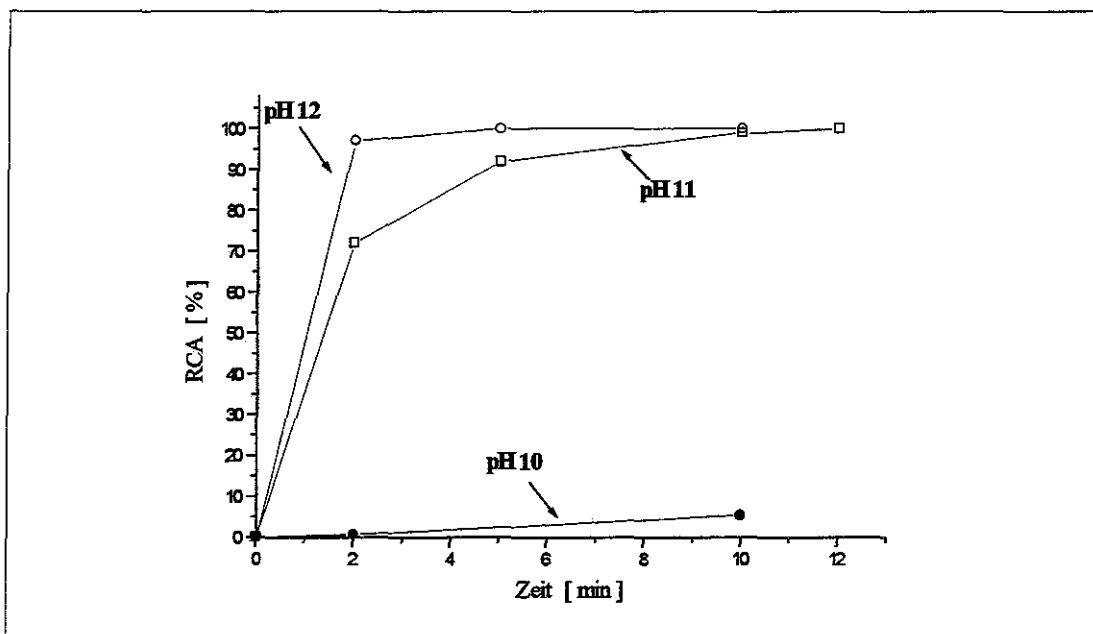


Abb. 3.6-1 Kinetik der alkalischen Hydrolyse von n.c.a.- ^{131}I -P2NI-Me bei verschiedenen pH-Werten. $T = 21^\circ\text{C}$

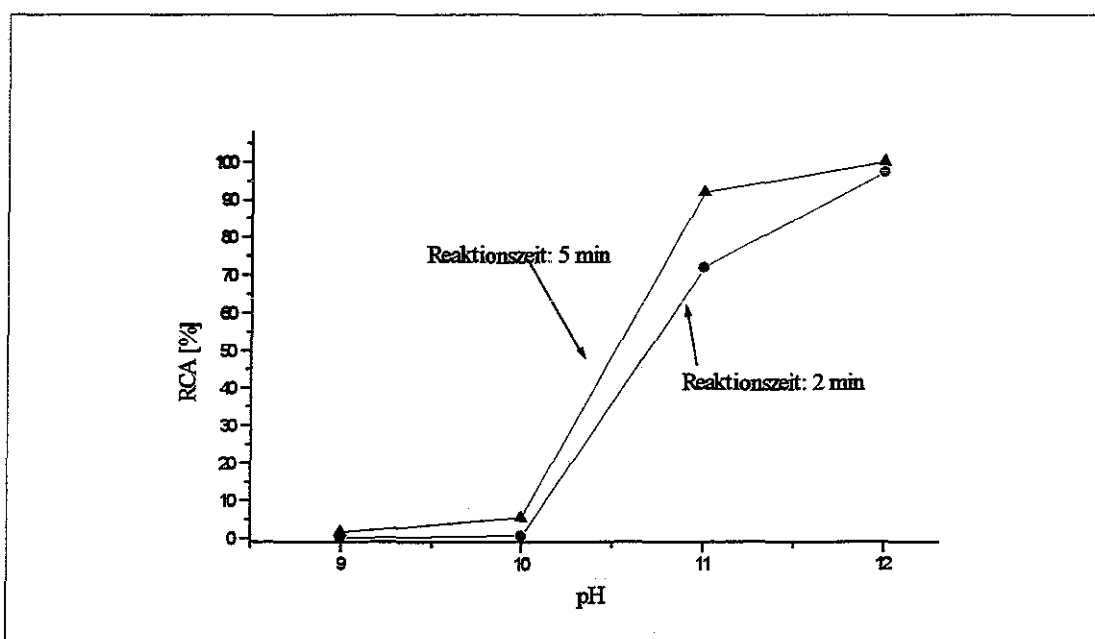


Abb. 3.6-2 Alkalische Hydrolyse von n.c.a. ^{131}I -P2NI-Me. Abhängigkeit der RCA vom pH-Wert. $T = 21^\circ\text{C}$

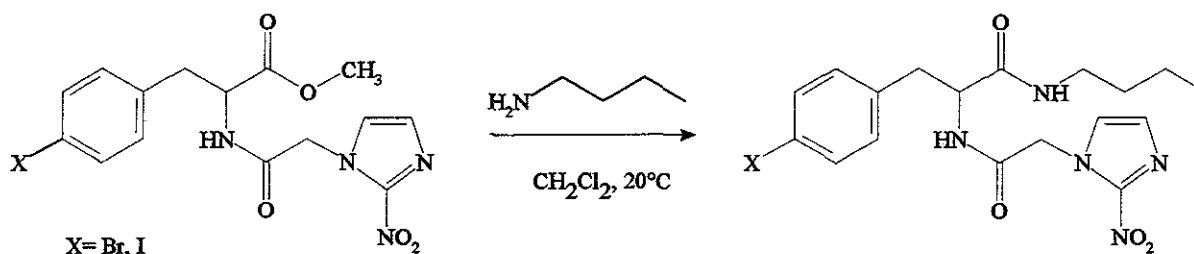
3.6.2 Aufarbeitung und Formulierung von ^{131}I -P2NI-S

Zur Darstellung des ^{131}I -P2NI-S wurde der Methylester ^{131}I -P2NI-Me wie oben beschrieben dargestellt und gereinigt. Die anschließende Hydrolyse wurde mit 10^{-3} N Natronlauge durchgeführt. Bei 50°C wurde die Lösung auf die Hälfte reduziert. Nach 5 min Reaktionszeit war die Hydrolyse vollständig abgelaufen. Ein dabei mit einem Anteil von 4 % entstandenes Nebenprodukt mußte durch den Einsatz der Radio-HPLC abgetrennt werden. Das aufgefangene ^{131}I -P2NI-S konnte über den Einsatz von RP18-Kartuschen aufkonzentriert und vom Eluens befreit werden. Eine applikationsfertige Lösung wurde durch die Elution mit Ethanol mit anschließendem Einengen bzw. Verdünnen des Eluats erhalten. Dabei wurde eine radiochemische Reinheit von mehr als 99,5 % erhalten.

3.7 N-(2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl)-p-iod-D,L-phenylalaninbutylamid (I-P2NI-Ba)

Aufgrund der hohen Hydrolyseempfindlichkeit und der schnellen Ausscheidung des ^{131}I -P2NI-Me bei der Maus (s. 4.2) wurde die Synthese eines Tracers ins Auge gefaßt, der chemisch eine höhere Stabilität und biochemisch eine geringere Elimination aufweisen sollte. Durch den Austausch der Methylesterfunktion mit einer Amidfunktion sollte die beobachtete *in vivo* Hydrolyse des ^{131}I -P2NI-Me verlangsamt bzw. unterdrückt werden und sich dadurch eine geringere Clearancerate ergeben. Der Einsatz eines sekundären bzw. langkettigen Amids sollte zudem durch die Erhöhung der Lipophilie eine bessere Hirnaufnahme zeigen. Andererseits sollte sich ein Amid chemisch und chromatographisch in ähnlicher Weise verhalten wie der Methylester, so daß die ausgearbeitete Markierung und Aufarbeitung mit leichten Abänderungen übernommen werden könnte. Hierbei sollten sowohl die Standardverbindung als auch der Markierungsvorläufer durch die Aminolyse der entsprechenden Methylester zugänglich sein.

Zunächst wurde das Dimethylamid als geeignetes Analogon ins Auge gefaßt, das aber aufgrund der sterisch anspruchsvollen Situation des I-P2NI-Me nicht durch einfache Aminolyse mit Dimethylamin erhalten werden konnte. Mit dem primären Amin Butylamin konnte dann das gewünschte Butylamid problemlos synthetisiert werden:



Die Markierung des Br-P2NI-Ba konnte mit dem $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{ZS}$ -System in Analogie zur Synthese des Radiomethylesters erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings mußten die Bedingungen für die Aufarbeitung, insbesondere die problematische Abtrennung des Vorläufers vom ^{131}I -P2NI-Ba, modifiziert werden.

3.7.1 Radioiodierung von Br-P2NI-Ba

Die Markierung des Butylamidderivates zum n.c.a.- ^{131}I -P2NI-Ba wurde mit dem für den Methylester erfolgreichen $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{ZS}$ -System durchgeführt. Die direkte Übertragung der Reaktionsparameter führte zu etwas niedrigeren RCA. Dies konnte aufgrund der Markierungsversuche mit Harnstoffzusatz (3.4.4.1) erwartet werden, da sich hier die Eigenschaft des $\text{Cu}(\text{I})$, mit Stickstoff unter Bildung weniger aktiver Komplexe zu koordinieren, bemerkbar machen sollte. Allerdings war einerseits der Einfluß des doch sterisch recht anspruchsvollen Butylamids, verglichen mit Harnstoff, relativ gering und andererseits die Stabilität des ^{131}I -P2NI-Ba unter den Markierungsbedingungen etwas größer, so daß hier nach Reaktionszeiten von 4 Stunden auch RCA von 85 % erreicht werden konnten.

In weiteren Untersuchungen sollte eine kurze Optimierung der Radioiodierung von Br-P2NI-Ba mit dem neuen $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{ZS}$ -Markierungssystem und ein Vergleich mit dem Methylester durchgeführt werden.

3.7.1.1 Kinetik und Vorläuferkonzentration

In Abb. 3.7-1 ist die Abhängigkeit der Cu(I)-katalysierten Radioioddebromierung des Br-P2NI-Ba von der Reaktionszeit bei verschiedenen Vorläuferkonzentrationen aufgezeigt. Grundsätzlich war bei der Markierung das gleiche Verhalten wie bei Br-P2NI-Me als Vorläufer zu erkennen. Die RCA konnte mit der Erhöhung der Vorläuferkonzentration deutlich verbessert werden.

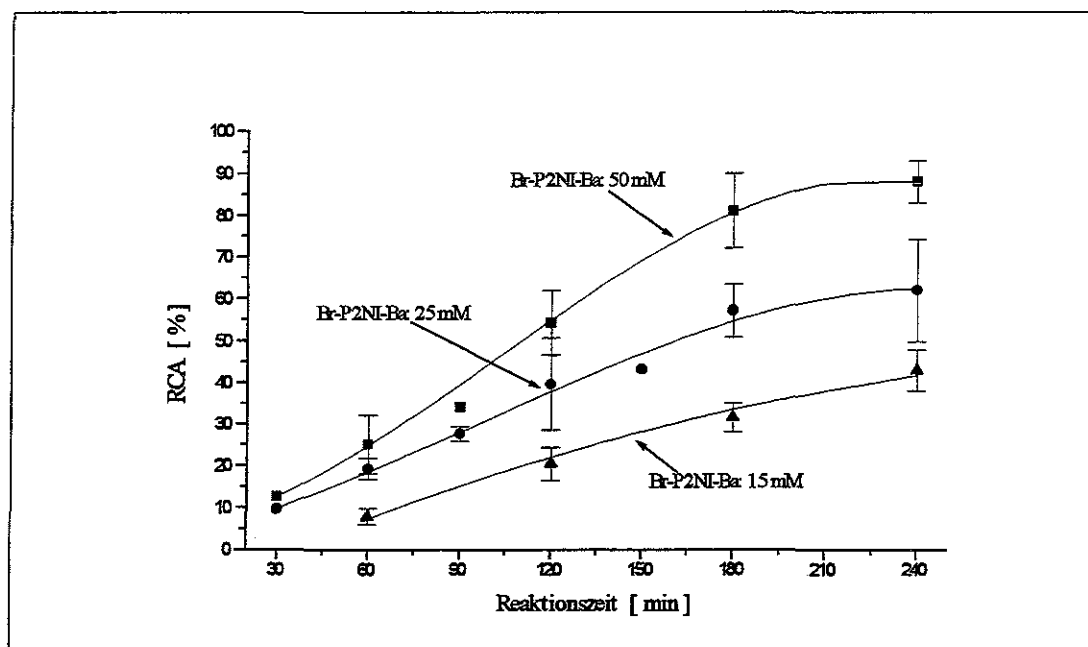


Abb. 3.7-1 Cu_2SO_4 -katalysierte Radioioddebromierung von Br-P2NI-Ba.
Reaktionskinetik bei verschiedenen Vorläuferkonzentrationen
 Cu_2SO_4 : 2 mM; Zitronensäure: 3 mM; Br-P2NI-Ba: s.o.; DMSO; $T = 140^\circ\text{C}$

3.7.1.2 Gegenüberstellung der Markierung von Br-P2NI-Me und Br-P2NI-Ba

In Abb. 3.7-2 sind die RCA der Radioioddebromierung mit dem Cu_2SO_4 /DMSO/ZS-System von Br-P2NI-Ba und Br-P2NI-Me in Form der Reaktionskinetiken bei 140°C gegenübergestellt. Hier wird die höhere Reaktivität des Methylesters deutlich, dessen Kurve zu der des Butylamides annähernd um 10 % RCA parallelverschoben ist. Bei höheren Vorläuferkonzentrationen (50 mM) wird der Abstand der Kurven geringer, so daß die schlechtere Reaktivität des Butylamides hier durch die Verlängerung der Reaktionszeit annähernd ausgeglichen werden kann.

Die Parallelverschiebung der RCA mit der Reaktionszeit bei den beiden Systemen deutet eine unterschiedliche Reaktivität des Cu(I)-Komplexes mit dem jeweiligem Edukt an, wobei der Unterschied in der Reaktivität entweder auf eine Veränderung des Kupferkomplexes oder aber auf die Veränderung des Eduktes zurückgeführt werden könnte.

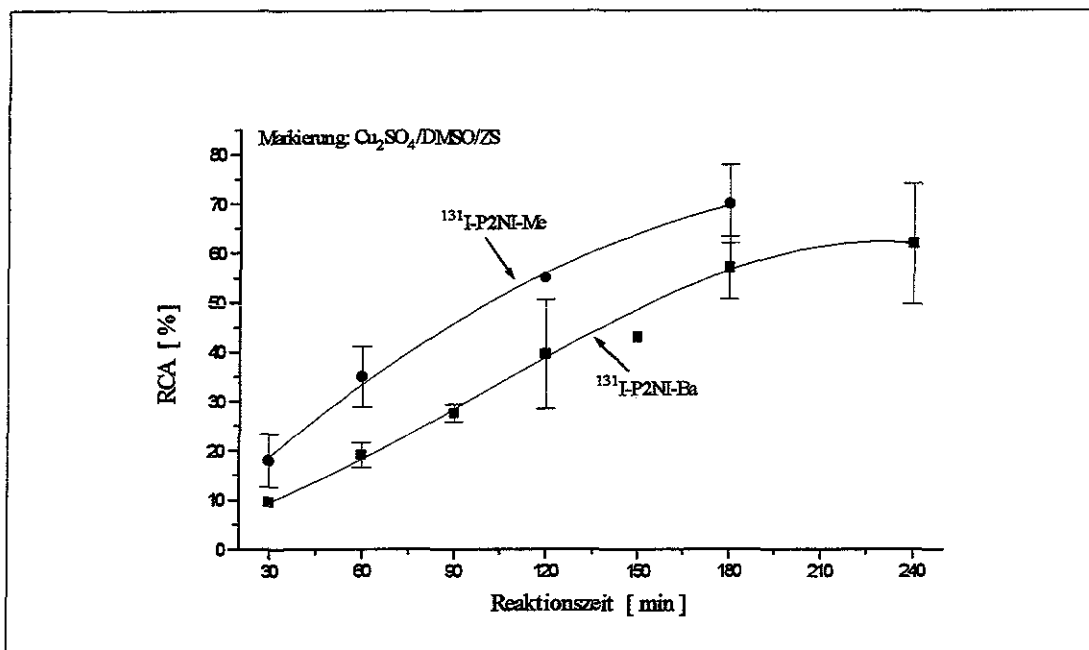


Abb. 3.7-2 Cu_2SO_4 -katalysierte Radioioddebromierung. Reaktionskinetik:
Vergleich von Br-P2NI-Ba/Br-P2NI-Me. Cu_2SO_4 : 2 mM; Zitronensäure: 2-3 mM;
Br-P2NI-Ba/Me: 25 mM; DMSO; $T = 140^\circ\text{C}$

Eduktänderung

Die Veränderung des Eduktes besteht in dem Austausch der Methylesterfunktion durch ein längerketziges Amid. Dieser Austausch findet relativ weit entfernt vom Reaktionszentrum der Radioioddebromierung statt, so daß sterische Effekte keine Rolle spielen sollten. Auch die elektronischen Änderungen des aromatischen Systems dürften vernachlässigbar sein, zumal die Cu(I)-katalysierte Austauschreaktion in DMSO auf elektronische Änderungen nur wenig reagiert [67]. Daher sollte die Änderung des Eduktes für den Unterschied in den RCA nicht ausschlaggebend sein.

Komplexänderungen

Bei den Untersuchungen zur Cu(I)-katalysierten Radioioddebromierung wurde der starke Effekt von komplexbildenden Verbindungen auf die Reaktivität des Kupferkomplexes deutlich. Besonders mit Stickstoff scheint eine hohe Affinität zur Komplexbildung zu bestehen, die sich auf die Markierungsreaktion negativ auswirkt. So wurde sogar mit Harnstoff als Zusatz eine geringere RCA beobachtet. Demnach sollte die Verringerung der RCA bei der Markierung des Butylamidderivates durch eine deaktivierende Komplexbildung des aktiven Kupferkomplexes verursacht werden.

3.7.2 Aufarbeitung und Formulierung von ^{131}I -P2NI-Ba

Die Markierung von Br-P2NI-Ba konnte in Analogie zum Br-P2NI-Me (Abschnitt 3.3.2) mit dem System $\text{Cu}_2\text{SO}_4/\text{DMSO}/\text{ZS}$ durchgeführt werden. Aufgrund der höheren Stabilität des ^{131}I -P2NI-Ba gegenüber den Markierungsbedingungen und der damit verbundenen geringeren Tendenz zur Bildung von Radionebenprodukten konnte die Reaktionszeit auf 4 h verlängert werden, wobei RCAn von 85-90 % erhalten wurden. Bei der Erarbeitung der Isolierung und Reinigung des ^{131}I -P2NI-Ba zeigte sich, daß die für das ^{131}I -P2NI-Me aufgestellten Reinigungsbedingungen nicht direkt auf das bedeutend lipophilere Amidderivat übertragen werden konnten. Jedoch konnte das beim Methylesterderivat durchgeführte Aufarbeitungsschema auch hier erfolgreich eingesetzt werden. Nach der Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch über eine Sep-Pack-Kartusche (RP-18-Phase) konnte die Radioiodverbindung durch einen veränderten Radio-HPLC-Trennschritt erhalten werden. Auch hier waren zwei HPLC-Trennungen erforderlich, wobei analog zur Abtrennung des Methylesterderivates erst eine RP-18-Phase und dann eine Cosmosilsäule (Nitroaromatensäule) eingesetzt wurden. Hierbei konnten für die Butylamidverbindung bessere Ergebnisse erzielt werden; nach dem zweiten Trennschritt konnte kein Edukt mehr nachgewiesen werden. Das ^{131}I -P2NI-Ba wurde aus dem aufgefangenem Eluat durch das Kartuschenverfahren aufkonzentriert. Zur Applikation wurde die aus der Aufkonzentration erhaltene Lösung eingedampft und der "Rückstand" in Ethanol aufgenommen. Die erhaltene Radiolösung wurde dann mit isotonischer Kochsalzlösung auf eine 7 %ige ethanolische Lösung verdünnt.

Obwohl bei der Radiosynthese des ^{131}I -P2NI-Ba vergleichsweise schlechtere Ergebnisse erzielt wurden, lagen die RCA des gesamten Verfahrens bis zur applikationsfertigen Lösung auch bei 70-75 %. Wie die etwas höhere radiochemische Reinheit von 99,9 % wurde dieses Ergebnis auf die größere Stabilität des Butylamidderivates zurückgeführt. Die spezifische Aktivität wurde mit 6,6-7,7 TBq/mmol (180-210 Ci/mmol) bestimmt.

3.8 N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-iod- α -methyl-D,L-tyrosinmethylester (I-MT2NI)

Als weitere Aminosäure zur Konjugation mit 2-Nitroimidazol und zur einfachen Radioiodierung wurde Tyrosin gewählt. Das entsprechende α -Methyltyrosin hatte sich als stabil gegenüber der *in vivo* Deiodierung erwiesen [27], ohne die Eigenschaft der einfachen elektrophilen Radioiodierung einzubüßen. Darüber hinaus sollte aufgrund der enzyminhibitorischen Wirkung der α -Methylfunktion möglicherweise eine größere *in vivo* Stabilität des Methylesters vorliegen als bei dem Phenylalaninderivat.

Der chemische und chromatographische Unterschied vom Vorläufer zum Radioiodderivat sollte ausreichen, um eine einfache Trennung durchführen zu können. Dadurch ist dieser Tracer grundsätzlich zum Einsatz in der Kit-Präparation (Markierungsbesteck) geeignet. Weiterhin sollten die Synthesen der Standard- und Vorläuferverbindungen einfach, in Anlehnung an die Synthese der entsprechenden Phenylalaninderivate möglich sein, zumal geplant war, das 3-Iod-Derivat als Standardverbindung durch direkte elektrophile Iodierung aus dem Vorläufer zu erhalten.

3.8.1 Synthese des Vorläufers MT2NI und der Standardverbindung I-MT2NI

MT2NI

Bei der Synthese des α -Methyl-D,L-tyrosin-2-nitroimidazolderivates in Analogie zum Phenylalaninderivat ergab sich das Problem der selektiven Einführung einer Schutzgruppe für die OH-Funktion, die unter den Reaktionsbedingungen der Acylierung auch reagiert, und die beim Schritt der nukleophilen Substitution störend wirkt. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die OH-Funktion in Konkurrenz zur Aminfunktion bevorzugt mit dem Acylierungsreagens Chloressigsäurechlorid reagiert. Der entstehende Phenylester war zwar als "Aktivester" relativ reaktiv, blieb aber unter den Bedingungen der Substitutionsreaktion stabil. Daher wurde auf die Blockierung der Phenolfunktion durch die Einführung einer Schutzgruppe verzichtet, was allerdings durch eine schwierige Aufarbeitung des reaktiven Phenylesters und durch den Einsatz der doppelten Menge an relativ teurem Kaliumnitroimidazolid erkaufte werden mußte. Überdies fand auch bei dem nukleophilen Substitutionsschritt durch 2NI ein bevorzugter Angriff an der Chloracylphenolester-Funktion statt, so daß ein relativ komplexes Produktgemisch erhalten wurde. Jedoch konnte diese "Schutzgruppe" in einfacher Weise bei der Aufarbeitung entfernt werden, so daß hier kein weiterer Reaktionsschritt zur Abspaltung einer Schutzgruppe anfiel. In Abb. 3.8-1 ist die Reaktionssequenz der Reaktion dargestellt.

Bei der Umsetzung mit Chloressigsäurechlorid im ersten Reaktionsschritt konnte das Di-chloracyl-Produkt glatt mit 60 %iger Ausbeute erhalten werden. Diese Reaktion konnte durch einen hohen Überschuß des billigen Chloressigsäurechlorids an beiden Funktionen nahezu vollständig durchgeführt werden. Allerdings mußte aufgrund des Aktivesters bei der Aufarbeitung vorsichtig vorgegangen werden. Durch einfaches Umkristallisieren konnte die Verbindung in genügend großer Reinheit erhalten werden. Die Substitutionsreaktion mit Kalium-2-nitroimidazolid gestaltete sich schwieriger. Hier konnte die bevorzugte Reaktion mit der phenolischen Chloracylesterfunktion nicht durch einen Überschuß des teuren Nitroimidazols ausgeglichen werden. Höhere Reaktionstemperaturen führten zur zunehmenden Bildung von Nebenprodukten, so daß nur über lange Reaktionszeiten maximale Ausbeuten erhalten werden konnten. Bei den angewandten Reaktionstemperaturen wurde ein relativ komplexes Produktgemisch erhalten, das eine chromatographische Auftrennung erforderte. Daher wurde hier nur eine Ausbeute von etwa 40 % erhalten.

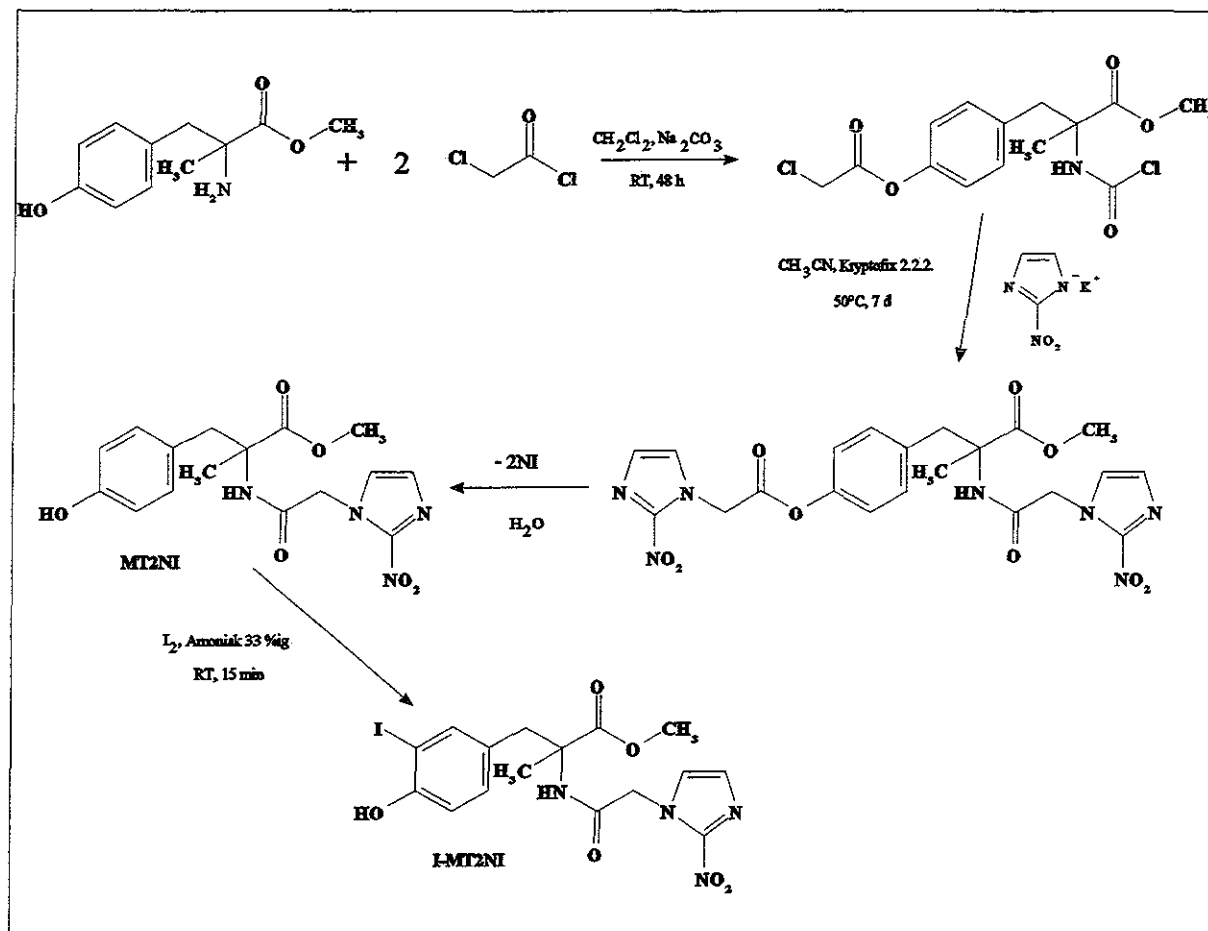


Abb. 3.8-1 Reaktionssequenz zur Darstellung von MT2NI und I-MT2NI

I-MT2NI

Bei der Syntheseplanung der Iodverbindung kamen grundsätzlich 2 Wege in Frage:

A: Eine mehrstufige Aufbaureaktion analog zur Synthese des MT2NI.

B: Die direkte elektrophile Iodierung des MT2NI.

Der Weg B beinhaltet zwar nur eine Synthesestufe, erfordert aber zur selektiven Iodierung des reaktiven Phenolderivates konzentrierte Ammoniaklösung, die wiederum zur schnellen Hydrolyse des Methylesters führen sollte. Die selektive Iodierung würde bei Weg A an den Anfang der Synthese gestellt. Die weiteren Syntheseschritte konnten schon für das empfindliche Methylesterderivat des Phenylalanins erfolgreich eingesetzt werden. In Vorversuchen wurde jedoch ein stark stabilisierender Einfluß der α -Methylfunktion auf den Methylester festgestellt, der wohl hauptsächlich auf sterische Effekte zurückgeführt werden kann. So wurde bei pH 13 auch nach 20 min bei Raumtemperatur keine Hydrolyse beobachtet. Daher wurde der einfache Reaktionsweg B näher untersucht. Bei der direkten Iodierung in reinen organischen Solvenzien wie Methanol bzw. Ethanol konnten unter Einsatz von NaHCO_3 als Base nur Gemische des Eduktes und der Mono- und Diiodverbindung erhalten werden. Erst durch Anwendung konzentrierter Ammoniaklösung wurde die Bildung des Diiodproduktes weitgehend unterdrückt. Erstaunlicherweise wurde auch unter diesen Bedingungen keine Hydrolyse des Methylesters beobachtet. Die Abtrennung des gewünschten I-MT2NI vom Diiodprodukt erwies sich als besonders schwierig und erforderte den Einsatz einer präparativen HPLC. Trotzdem konnte hier eine Ausbeute von 70 % erreicht werden.

3.8.2 Direkte elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI

Die Radioiodierung von Phenolen und Anilinen, insbesondere Tyrosin und seinen Derivaten, wird üblicherweise in wäßrigen Pufferlösungen durchgeführt. Zur Oxidation des Radioiodids werden im allgemeinen N-Halogenverbindungen eingesetzt (Abschnitt 1.6.1). Hierbei wird eine ausgeprägte Abhängigkeit der RCA vom pH der Lösung beobachtet [29,34]. Demgegenüber wird die elektrophile Demetallierung, bei der auch N-Halogenverbindungen als Oxidationsmittel verwendet werden, aufgrund des lipophilen Charakters der Verbindungen in organischen Solvenzien wie CHCl_3 , CCl_4 , Methanol, Ethanol und Eisessig durchgeführt [52,237].

Bei dem vorliegenden MT2NI handelt es sich um eine nur wenig wasserlösliche Verbindung, so daß der Einsatz wäßriger Puffersysteme aufgrund der erreichbaren Konzentration begrenzt war. Als Oxidationsmittel waren einfach handhabbare und käufliche N-Halogenamide vorgesehen. Hier wurden Dichloramin-T (DCAT) und Iodogen als organisch lösliche Verbindungen und Chloramin-T (CAT) und Chloramin-B (CAB) als wäßrig lösliche Verbindungen untersucht. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage nach dem optimalen Markierungssystem bezüglich der Variation des Lösungs- und Oxidationsmittels.

Die Untersuchungen zur Markierung des MT2NI zeigten, daß organische Solvenzien grundsätzlich weniger für die elektrophile n.c.a.-Radioiodierung geeignet sind als wäßrige Systeme. Zudem treten aufgrund der geringen erforderlichen Konzentrationen von Edukt und Oxidationsmittel während der elektrophilen Markierung Löslichkeitseffekte in den Hintergrund. Da der Zusatz mischbarer organischer Lösungsmittel von den wäßrigen Systemen problemlos toleriert wird, können optimale Ergebnisse mit 10-30 %igen ethanolischen Pufferlösungen erzielt werden. Hier werden bei einfacher Handhabbarkeit, geringer Empfindlichkeit gegenüber anderen Einflüssen wie z.B. dem pH der Radioiodidlösung und geringstmöglichen Konzentrationen von Edukt und Oxidationsmittel innerhalb von 5 Minuten RCA von 80-90% erreicht.

3.8.2.1 Markierung in organischen Lösungsmitteln

Als organische Lösungsmittel wurden Ethanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran, Essigsäureethylester, Dichlormethan, Chloroform und die Säuren Eisessig und Trifluoressigsäure untersucht. Den Solvenzien wurden zur Reaktion 5-10 % Ethanol zur Zuführung des Eduktes und des Oxidationsmittels zugesetzt. Für organische Lösungsmittel kam das sehr gut wasserlösliche Chloramin-B als Oxidationsmittel nicht in Frage. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 3.8-1 zusammengefaßt.

Die Übersicht zeigt, daß CH_2Cl_2 , CHCl_3 und Ethanol in Kombination mit allen Oxidationsmitteln grundsätzlich zur Markierung geeignet sind, wobei Chloroform die besten Ergebnisse liefert. Auffällig ist die mehr oder weniger starke Bildung von Radionebenprodukten bei der Verwendung von Acetonitril bzw. Tetrahydrofuran als Reaktionsmedium. In allen organischen Solvenzien wird allgemein die Bildung eines hydrophilen Radionebenproduktes (N1) beobachtet, dessen Menge vom Oxidationsmittel und vom Lösungsmittel abhängig ist. In Ethanol und ethanolischen Pufferlösungen wird sowohl mit steigendem Ethanolanteil als auch mit zunehmenden Oxidationsmittelkonzentrationen ein größerer Anteil des Radionebenproduktes gefunden. Dieser Effekt ist bei CAT besonders ausgeprägt (bis zu 30 %) und wird beim Iodogen kaum festgestellt (5-10 %), wohingegen DCAT mit 10-20 % eine Mittelstellung einnimmt. Generell zeigte sich bei den Untersuchungen, daß für dipolare aprotische Lösungsmittel (CH_3CN) Iodogen, für nicht chlorierte unpolare Lösungsmittel (Essigsäureethylester) Chloramin-T und für "saure" Lösungsmittel Dichloramin-T am besten geeignet sind. Dagegen wurde bei den unpolaren chlorierten Lösungsmitteln

(CHCl₃, CH₂Cl₂) und Ethanol, als Vertreter der protischen polaren Lösungsmittel, nur ein geringer Unterschied festgestellt. Eine Ausnahme bei dieser Betrachtung ist das Tetrahydrofuran. Hier wurde in Verbindung mit DCAT ein zweites lipophiles Radioprodukt (N2) als Hauptprodukt in einer RCA von über 65 % gebildet. Mit CAT in THF konnten beide Nebenprodukte (N1+N2) mit einer Gesamt-RCA von 60 % beobachtet werden, während mit Iodogen überhaupt keine Reaktion stattfand.

Tab. 3.8-1 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI in organischen Lösungsmitteln
Zusammenfassung der Ergebnisse.

Lösungsmittel	DCAT, RCA [%]	CAT, RCA [%]	Iodogen, RCA [%]
CH ₂ Cl ₂	60	70	60
CHCl ₃	80	80	70
EtOH	50-60	60-70	50-60
CH ₃ CN	5	35	40
THF	0	10	0
EE	4	50-60	25
CH ₃ COOH	47,7 ± 14,4	2,5	8,8
CF ₃ COOH	48,8 ± 11,6	16	9,6 ± 3,3

Zusammenfassend lagen bei der elektrophilen Radioiodierung des MT2NI mit den N-Halogen-Oxidationsmitteln die RCA grundsätzlich niedriger als bei der gleichen Reaktion in wäßrigen Puffersystemen. Gleichzeitig waren höhere Konzentrationen an Oxidationsmittel und Edukt notwendig, und es wurden geringere Reaktionsgeschwindigkeiten gefunden. Darüber hinaus haben sich die Markierungen im organischen Medium als stark abhängig von der eingesetzten Radioiodidlösung erwiesen. Dies wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß sowohl der pH-Wert als auch die eingesetzte Menge der gelieferten [¹³¹I]Iodidlösung schwankt und somit die wichtige "pH-Kontrolle" (Abschnitt 3.8.2.3) verloren geht.

Durch Voruntersuchungen konnte die hohe Stabilität des ¹³¹I-MT2NI, insbesondere gegenüber alkalischen wäßrigen Reaktionsmedien, aufgezeigt werden, so daß die Markierungsreaktion unter den üblichen, vorteilhaften Bedingungen der wäßrigen Puffersysteme durchführbar ist. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Vorläufers in Wasser wurden die Pufferlösungen mit Ethanol versetzt. Ethanol zeigte als einziges untersuchtes Lösungsmittel gute Markierungsausbeuten für alle Oxidationsmittel und neben der unbegrenzten Mischbarkeit mit Wasser ein zufriedenstellendes Lösungsverhalten für MT2NI.

3.8.2.2 Reaktionskinetik

Die elektrophile Markierung von MT2NI in wäßrigen Puffersystemen ist eine sehr schnelle Reaktion. Mit den üblichen Konzentrationen der Oxidationsmittel (0,01-0,1 mM) konnten für alle Oxidationsmittel nach 30 s nur noch geringe Zunahmen der RCA festgestellt werden. Daher wurden die kinetischen Untersuchungen bei um den Faktor 10 geringeren Konzentrationen durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen wurde noch eine schnelle Kinetik pseudo-erster-Ordnung beobachtet. Hier wurden etwa nach 10 Minuten die maximalen RCA

erreicht. Die Ergebnisse sind repräsentativ in Abb. 3.8-2 dargestellt.

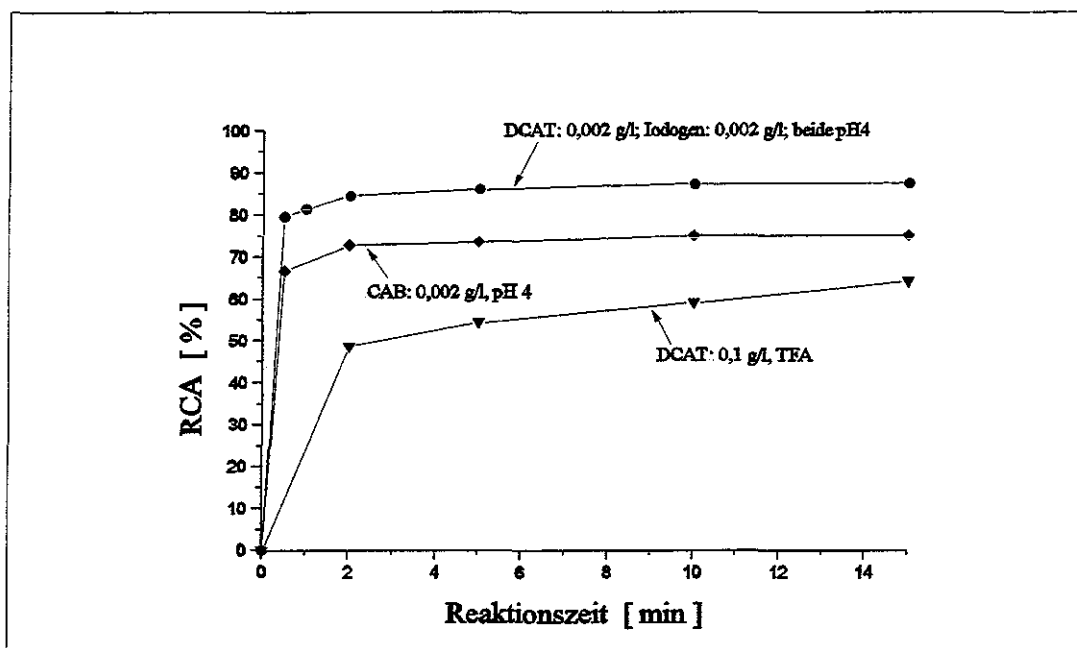


Abb. 3.8-2 Elektrophile Radioiodierung von MT2NI. Reaktionskinetik unter verschiedenen Bedingungen. MT2NI: 0,5 mM, EtOH: 10 %, T= 21°C. Für Iodogen und DCAT ist der Kurvenverlauf annähernd identisch.

Als Vergleich zum Verhalten der Markierungsreaktion in organischen Solvenzien ist die Kinetik der Markierung von MT2NI in Trifluoressigsäure mit aufgeführt. Hier wurden erst nach 25 - 40 min Sättigungsausbeuten erreicht.

3.8.2.3 Abhängigkeit vom pH-Wert

Die RCA der Markierungsreaktionen in wäßrigem Reaktionsmedium wurden für die Oxidationsmittel Iodogen, Dichloramin-T (DCAT) und Chloramin-T (CAT) untersucht. Die Reaktionen wurden in 60 %igen ethanolischen Pufferlösungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei allen Oxidationsmitteln wurde eine ähnlich ausgeprägte Abhängigkeit der RCA vom pH-Wert der Lösung beobachtet. Auffällig waren die 2 Maxima, jeweils bei niedrigen und hohen pH-Werten, und ein Minimum bei pH 6, bei dem keine RCA erhalten werden konnte. In früheren Arbeiten dieses Institutes wurde für die Radioiodierung von Tyrosin mit CAT eine abweichende pH-Abhängigkeit gefunden, bei der das Minimum bei einem pH von 6 und ein ausgeprägtes Maximum etwa bei einem pH von 8 auftraten. Hier wurde kein Maximum bei niedrigen pH-Werten und damit kein Abfall der RCA bei pH 1 gefunden [34]. Jedoch trat bei der Radioiodierung von α -Methyltyrosin mit Iodogen ein sehr ähnlicher Verlauf auf, wobei beim Minimum bei pH6 noch RCA von 35-40 % erhalten wurden [27]

Chloramin-T (CAT)

Mit Chloramin-T als Oxidationsmittel wurden für die RCA in Abhängigkeit vom pH-Wert Maximalbereiche zwischen pH 4 und 5 und bei pH 7 gefunden (Abb. 3.8-3). Das Minimum bei pH 4,5 konnte durch Mehrfachmessungen bestätigt werden; auch bei den anderen pH-Kurven wurden entsprechende Phänomene

bei anderen pH-Werten gefunden, so daß diese Feinstrukturen nicht auf eine fehlerhafte Pufferlösung zurückgeführt werden können. Der relativ zu den anderen Oxidationsmitteln auffällige Abfall der RCA unterhalb eines pH von 3,5 war auf die starke Bildung eines Radionebenproduktes zurückzuführen, die bei pH 3 ihren Maximalwert von 20-25 % erreichte.

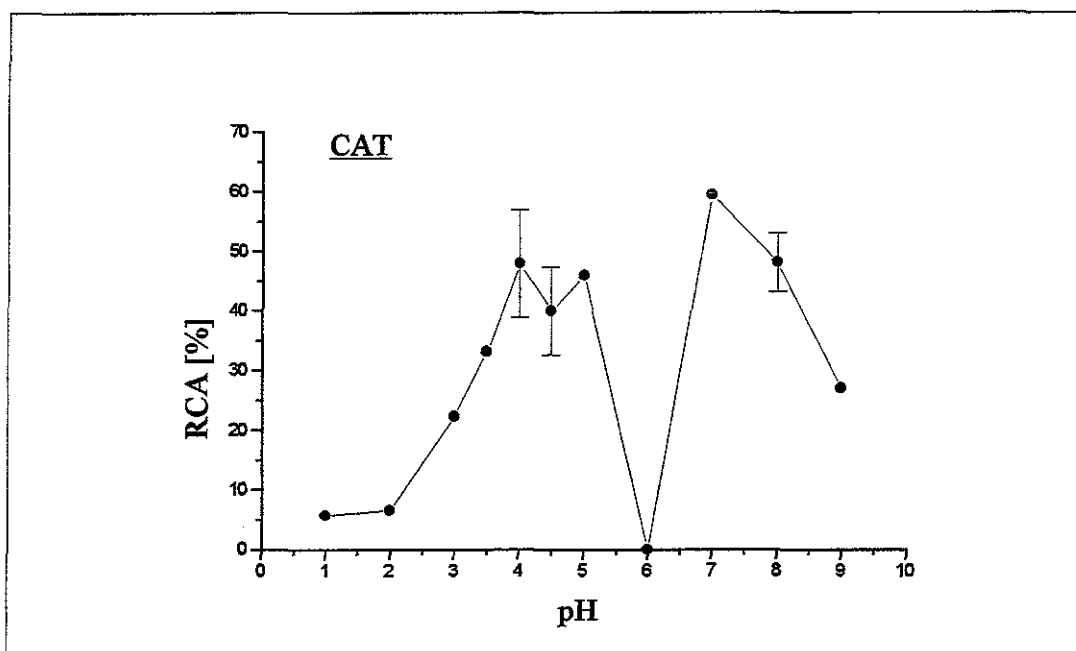


Abb. 3.8-3 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI. Abhängigkeit der RCA vom pH-Wert. T = 21 °C, t = 15 min, CAT: 0,12 mM, MT2NI: 1 mM, EtOH: 60 %

Der Markierungsvorläufer war unter den Reaktionsbedingungen stabil. Die Bildung des Radionebenproduktes, bei dem es sich um chloriertes oder oxidiertes ^{131}I -MT2NI handeln sollte, wurde durch niedrige pH-Werte, hohe Oxidationsmittelkonzentrationen und einen hohen Ethanolanteil der Reaktionslösung begünstigt. Bei höheren pH-Werten wurde das Nebenprodukt maximal zu 5 % und bei pH 6 überhaupt nicht gebildet. Bei den anderen Oxidationsmitteln, insbesondere auch bei Chloramin-B (CAB), wurde das Radionebenprodukt auch bei niedrigen pH-Werten nur bis maximal 5 % RCA beobachtet. Demnach ist das Markierungsverhalten von CAB bei niedrigen pH-Werten eher mit dem des Dichloramin-T's zu vergleichen.

Dichloramin-T (DCAT)

In Abb. 3.8-4 ist das Verhalten von Dichloramin-T bei verschiedenen pH-Werten für die Markierung von MT2NI dargestellt. Es weist bei niedrigen pH-Werten einen ausgedehnten Maximalbereich zwischen den pH-Werten 3 und 5 auf. In diesem pH-Bereich wurden erheblich bessere RCA gefunden als bei höheren pH-Werten, wo bei pH 8 ebenfalls ein Maximum erreicht wurde. Demnach war DCAT in besonderer Weise zur Markierung im sauren Bereich geeignet. Hier konnten hohe RCA auch bei Schwankungen des pH-Wertes erreicht werden. Wie bei CAT so fand sich auch bei DCAT ein drastischer Abfall der RCA auf 0 bei einem pH von 6.

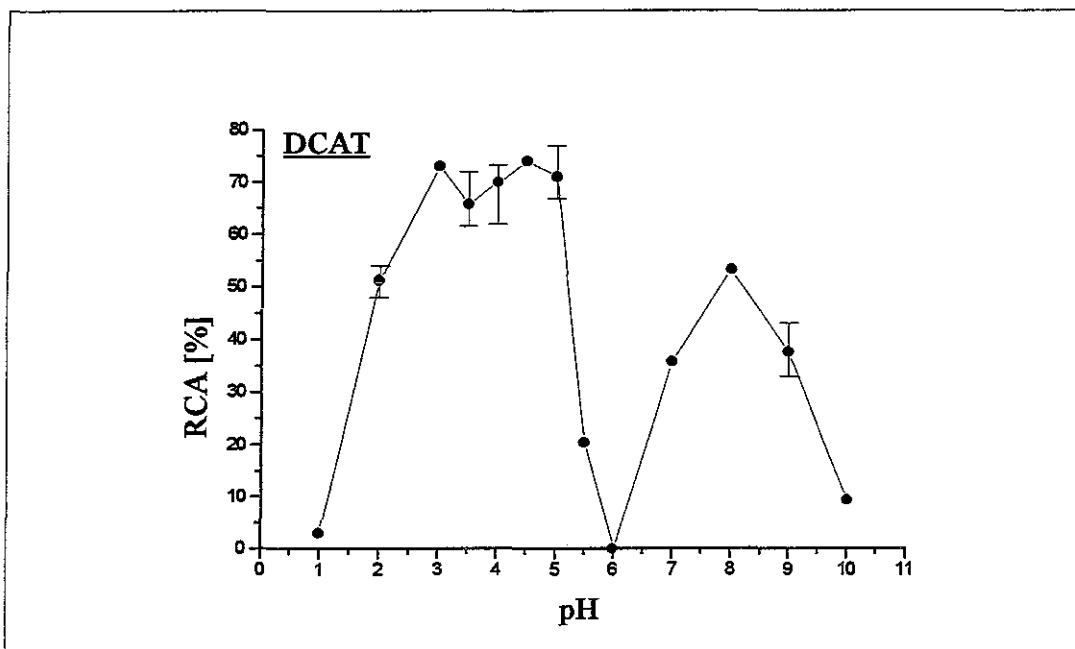


Abb. 3.8-4 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI mit DCAT. Abhängigkeit der RCA vom pH-Wert. MT2NI: 0,5 mM, $t = 15$ min, DCAT: 0,07 mM, EtOH: 60 %, $T = 21^{\circ}\text{C}$

Iodogen

Iodogen wurde bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Markierungsreaktion in homogener Lösung eingesetzt, so daß die erhaltenen Abhängigkeiten direkt miteinander verglichen werden können. Für Iodogen wurden bei der Markierungsreaktion sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich sehr gute RCA gefunden. Iodogen war bei dieser Reaktionsführung hervorragend zur Markierung bei hohen pH-Werten geeignet. Anders als bei CAT und DCAT, bei denen ab pH 10 kaum noch eine Markierung beobachtet wurde, konnten mit Iodogen noch bei einem pH von 11 gute Resultate erhalten werden. Folglich zeigte Iodogen bei den Untersuchungen die geringste Empfindlichkeit gegenüber pH-Wert-Schwankungen der Reaktionslösung, zumal die Unterschiede der Maximalausbeuten bei niedrigen und hohen pH-Werten vergleichsweise gering ausfielen. In diesem Experiment wurde auch die hohe Stabilität des Vorläufers gegenüber der alkalischen Hydrolyse deutlich. Bei der Radioiodierung von α -Methyl-L-tyrosin mit Iodogen wurde übrigens ein ähnlicher Verlauf gefunden (s. o.). Für alle Oxidationsmittel hatte sich gezeigt, daß die Markierungsausbeuten mit zunehmenden Anteil an Ethanol zurückgehen. Ethanol mußte aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Vorläufers zugesetzt werden. In Abb. 3.8-5 wird zur Verdeutlichung dieses Effekts die pH-Abhängigkeit der RCA bei verschiedenen Ethanolanteilen gezeigt.

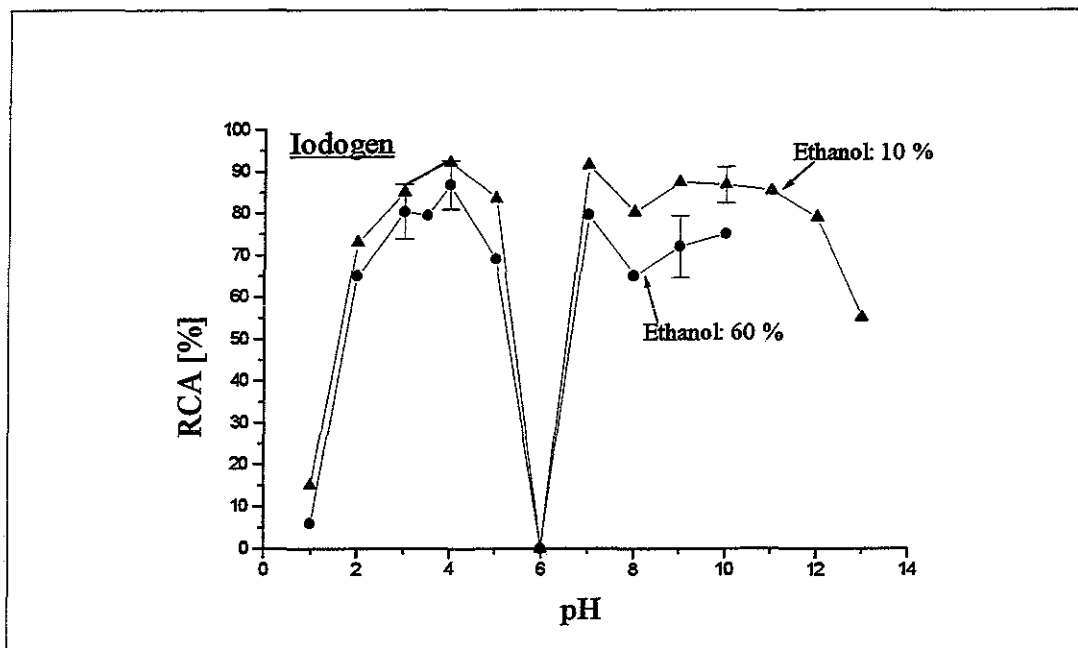


Abb. 3.8-5 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI mit Iodogen. Abhängigkeit der RCA vom pH-Wert. MT2NI: 1 mM, $t = 15$ min, Iodogen: 0,01 mM, EtOH: 60 %, $T = 21^\circ\text{C}$

Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die anderen Oxidationsmittel. Bis zu einem Ethanolanteil von 30 % wurden die RCA kaum beeinflusst und die Bildung von Nebenprodukten nicht beobachtet. Bis zu 60 % wirkte sich Ethanol leicht negativ auf die Markierungsausbeuten aus, wobei das Nebenprodukt, insbesondere mit CAT, deutlich zunahm. Bei mehr als 60 % wurde eine starke Abnahme der Markierungsausbeuten gefunden. Daher wurde bei der Markierung üblicherweise mit einem Ethanolanteil von 10-20 % gearbeitet.

3.8.2.4 Oxidationsmittelkonzentration

Die Untersuchungen der RCA in Abhängigkeit von der Konzentration des Oxidationsmittels wurden in wäßrigem Reaktionsmedium durchgeführt. Hierbei zeigt sich in der logarithmischen Darstellung für alle Oxidationsmittel ein ähnlicher Verlauf. Es handelt sich um eine "entartetes" pseudo-erster-Ordnung Verhalten der n.c.a.-Reaktionen. Bei höheren Konzentrationen werden allerdings weitere Reaktionspfade geöffnet, was die beobachtete Zunahme von Nebenprodukten zur Folge hat.

In den Abb. 3.8-6 bis -8 und der Tab. 3.8-2 sind die Kurvenverläufe für die untersuchten Oxidationsmittel dargestellt. Anders als bei der pH-Abhängigkeit waren CAT und CAB unter den Versuchsbedingungen durchaus vergleichbar. Auch wenn ein weiterführender Vergleich der Oxidationsmittel untereinander aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nur bedingt möglich ist, fällt doch die relativ große Ähnlichkeit des Konzentrationsverhaltens ins Auge.

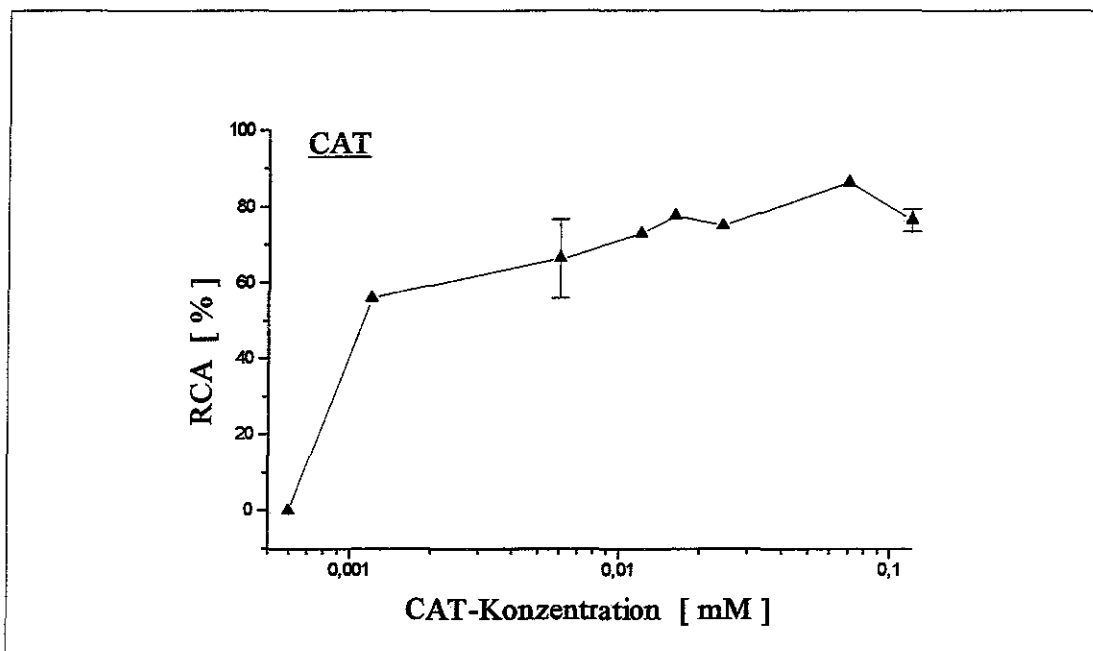


Abb. 3.8-6 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI mit CAT. Abhängigkeit der RCA von der CAT-Konzentration.
 $t = 15 \text{ min}$, $T = 21^\circ\text{C}$, MT2NI: 1 mM, Puffer pH4, EtOH: 10 %

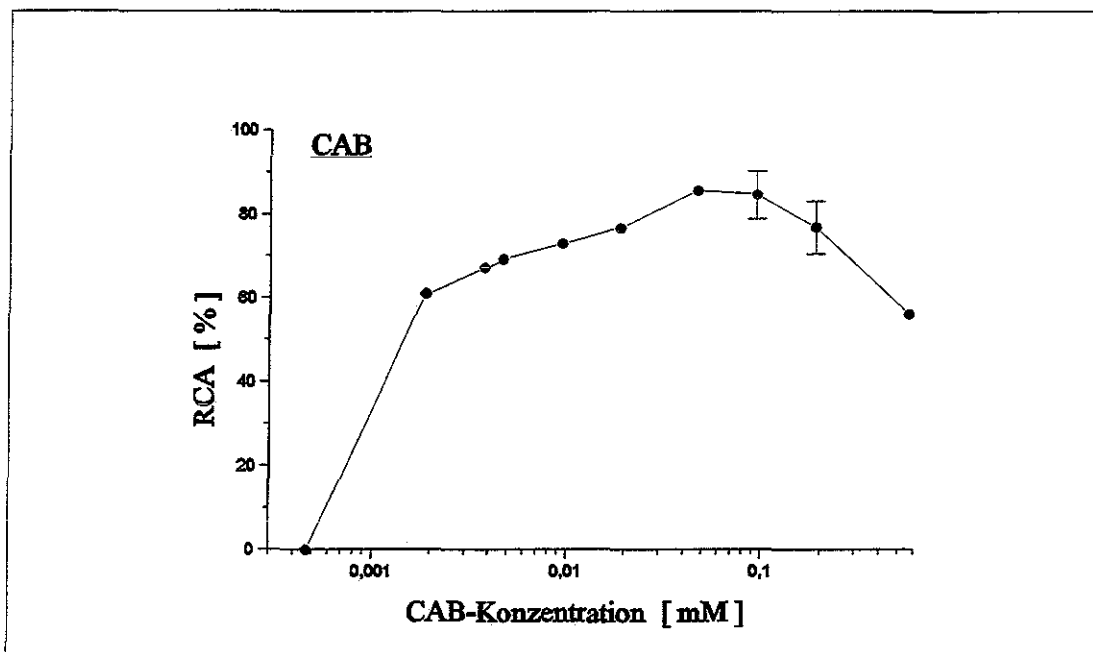


Abb. 3.8-7 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI mit CAB. Abhängigkeit der RCA von der CAB-Konzentration. MT2NI: 1 mM, $t = 15 \text{ min}$, $T = 21^\circ\text{C}$, pH 4, EtOH: 10 %

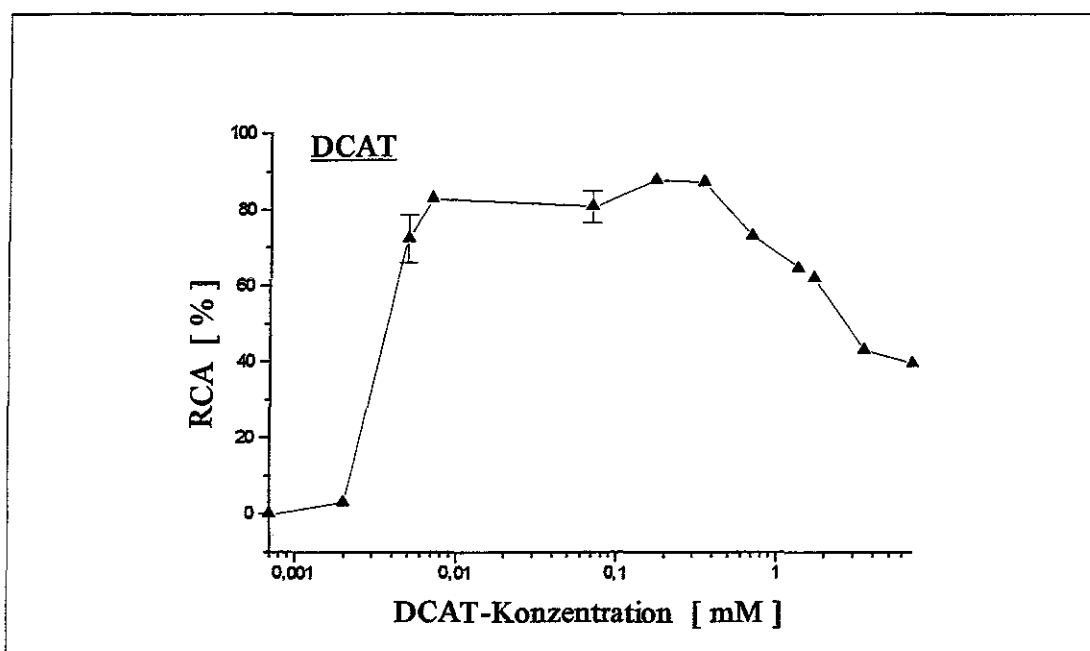


Abb. 3.8-8 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI mit DCAT. Abhängigkeit der RCA von der DCAT-Konzentration. $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$: 2:3 (v/v) (EtOH 60 %), $T = 21^\circ\text{C}$, MT2NI: 4,5 mM, $t = 15$ min

Der Einfluß der Iodogenkonzentration auf die RCA wurde nur innerhalb eines kleinen Konzentrationsbereiches untersucht (Tab. 3.8-2). Die gemessenen Werte befanden sich innerhalb des für die anderen Oxidationsmittel (Abb. 3.8-6 bis -8) dargestellten linearen Bereichs, wobei mit einer Iodogenkonzentration von 0,14 mM der abfallende Teil dieser Kurve im oberen Bereich erreicht scheint. Im Fall des Iodogens wurde weder für den untersuchten pH-Bereich noch für Ethanolanteile bis zu 60 % noch bei den beobachteten Iodogenkonzentrationen bis zu 0,14 mM eine veränderte Tendenz zur Bildung des Radionebenproduktes gefunden. Dieses trat im gesamten Bereich mit einer RCA von 2-5 % auf.

Tab. 3.8-2 Elektrophile n.c.a.-Radioiodierung von MT2NI mit Iodogen. Untersuchung der RCA in Abhängigkeit von der Iodogenkonzentration

Iodogenkonzentration [mM]	RCA [%]
0,003	76,5
0,007	73
0,01	73
0,03	86,3
0,07	90,6 ± 5,5
0,14	86,5
t=15 min, MT2NI: 1mM, pH 4, EtOH: 60%	

3.8.2.5 Vorläuferkonzentration

In Abb. 3.8-9 ist am Beispiel von CAB die Abhängigkeit der RCA von der Eduktkonzentration auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Ähnlich wie bei der Abhängigkeit vom Oxidationsmittel fand sich auch hier eine annähernde Abhängigkeit pseudo-erster-Ordnung. Bereits bei Vorläuferkonzentrationen von etwa 0,5-1 mM wurde eine Sättigungsausbeute erreicht.

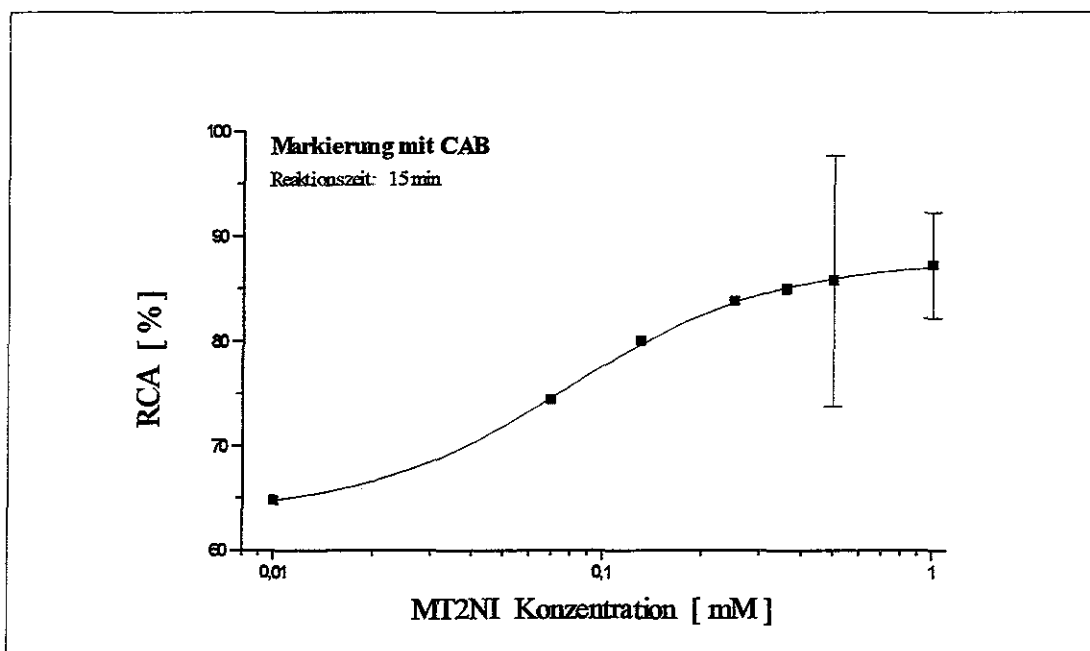


Abb. 3.8-9 Elektrophile Markierung von MT2NI mit CAB. Abhängigkeit der RCA von der Eduktkonzentration. T = 21°C, t = 15 min, CAB = 0,08 mM, Puffer 4; EtOH: 10 %

Der in Abb. 3.8-9 dargestellte Kurvenverlauf konnte auch für die anderen Oxidationsmittel und für andere Reaktionsbedingungen bestätigt werden. Bei höheren Ethanolkonzentrationen ist der Sättigungsbereich allerdings zu höheren Eduktkonzentrationen (2-5 mM) hin verschoben.

3.8.3 Zusammenfassender Vergleich der Oxidationsmittel

Obwohl es sich bei den eingesetzten Oxidationsmitteln um dieselbe Verbindungsklasse der Chloramide handelt, war doch ein sehr unterschiedliches Verhalten bei der elektrophilen Radiomarkierung des Tyrosinderivates MT2NI zu erkennen. Sowohl das Verhalten in organischen Lösungsmitteln als auch gegenüber der Markierung in wässrigen Puffersystemen unterschied sich teilweise stark. Wurde bei den chlorierten Lösungsmitteln Dichlormethan und Chloroform und beim hydrophilen Ethanol noch ein ähnliches Verhalten beobachtet, so waren bei den anderen Lösungsmitteln doch deutliche Unterschiede zu erkennen. Hierbei schien das Reaktionsmedium jeweils die Bildung von zwei weiteren, nicht identifizierten Radioprodukten stark zu beeinflussen.

Auch bei der Markierung in wässrigen Puffersystemen war für alle Oxidationsmittel ein stark unterschiedliches Verhalten zu erkennen. Dies galt sogar für die doch sehr ähnlichen Verbindungen CAT und CAB. Die Tendenz des CAT, in ethanolischen Pufferlösungen bei niedrigen pH-Werten und hohen Ethanolkonzentrationen das hydrophile Radionebenprodukt zu bilden, wurde bei CAB zwar auch, aber in geringerem

Maße gefunden. Als das universellste, für fast alle pH-Werte geeignete Oxidationsmittel erwies sich Iodogen. Seine schlechte Löslichkeit in wäßrigen Systemen wird bei der "Iodogen-Methode" [238] zur Abtrennung des Oxidationsmittels nach der Reaktion ausgenutzt. Grundsätzlich ließ sich diese Technik auch auf ethanolisch wäßrige Systeme übertragen, wobei hier der Anteil des Iodogens in der Lösung schon erheblich höher ausfiel. Bezüglich der Konzentration von Vorläufer und Oxidationsmittel war bei den untersuchten Oxidationsmitteln eine gute Übereinstimmung zu erkennen. In Tab. 3.8-3 sind die für das jeweilige Oxidationsmittel die optimalen Markierungsparameter für die Darstellung von ^{131}I -MT2NI aufgeführt.

Tab. 3.8-3 Optimale Markierungsbedingungen bei der Radiosynthese von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI

Oxidans	Konzentration ¹⁾ [mM]	pH-Bereich	organisches Solvens
CAB	0,03 - 0,1	pH 4-5; pH 7	-
CAT	0,01 - 0,1	pH 7	AcOH, TFA
DCAT	0,05 - 0,3	pH 3-5	EE, CH ₃ CN
Iodogen	0,03 - 0,1	pH 3-5; pH 7-12	CH ₃ CN
für alle:	Edukt: 0,5-1 mM; Puffer/EtOH 9:1; t= 5 min ²⁾		

1) Gilt für wäßrige Systeme. 2) Für organische Lösungsmittel 15 - 25 min; AcOH: Essigsäure; TFA: Trifluoressigsäure; EE: Essigsäureethylester

Die Ergebnisse dürften auch als Richtlinie für die Auswahl eines geeigneten Markierungssystems bei anderen Vorläufern gelten. In diesem Zusammenhang stellt Iodogen das interessanteste Oxidationsmittel dar, wobei allerdings gerade bei organischen Reaktionsmedien, die relativ hohe Konzentrationen des lipophilen Iodogens erfordern, Trennprobleme auftreten können. Generell ist der Einsatz wäßriger Puffersysteme gegenüber den organischen Lösungsmitteln zu bevorzugen.

3.8.4 Optimierte Radiosynthese und Aufarbeitung von ^{131}I -MT2NI

Die Radiosynthese zur Produktion von ^{131}I -MT2NI wurde in wäßriger Pufferlösung mit einem Volumenanteil von 10-20 % Ethanol bei pH 4 durchgeführt. Dadurch konnte der in Wasser schlecht lösliche Vorläufer als Ethanollösung zugegeben werden, ohne mit einer Nebenproduktbildung aufgrund des organischen Lösungsmittelanteils rechnen zu müssen. Zudem war eine direkte Zugabe der alkalischen Radioiodidlösung möglich. Als Oxidationsmittel wurde im allgemeinen das gut wasserlösliche Chloramin-B oder Iodogen gewählt, wobei sich das wasserlösliche CAB bei der Aufarbeitung als vorteilhaft erwies.

Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit einer Natriumsulfit-Pufferlösung (pH 9) gequench, um zum einen das Oxidationsmittel zu inaktivieren und zum anderen eventuelle Iodspezies zum gut über Radio-HPLC quantitativ nachweisbaren und abtrennbaren Iodid zu reduzieren. Aus dieser Lösung konnte dann das Radioprodukt durch einen HPLC-Trennschritt in einer radiochemischen Reinheit von 99,9 % erhalten werden. Die applikationsfertige Lösung wurde durch eine "Kartuschenaufkonzentration" mit anschließender Elution durch Ethanol und der Einstellung des Eluates mit isotonischer Kochsalzlösung auf eine 5 %ige ethanolische Lösung erhalten. Die RCA des gesamten Synthese- und Reinigungsverfahrens betrugen 80-85 % mit einem Zeitbedarf von 30 Minuten. Die spezifische Aktivität wurde zu 6,6-7,4 TBq/mmol (180-200 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) bestimmt.

3.9 Vergleich der Markierungsmethoden: Elektrophil/Cu(I)-Nukleophil

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei grundsätzlichen Methoden zur n.c.a.-Radioiodierung von aromatischen Systemen eingesetzt. Es soll eine kurze Gegenüberstellung dieser Methoden unter Berücksichtigung der hier nicht verwendeten elektrophilen Demetallierungsreaktionen gegeben werden. In Tab. 3.9-1 sind die Methoden stichpunktartig zusammengestellt. Alle Methoden liefern prinzipiell gute Markierungsausbeuten und sind zur n.c.a.-Radiosynthese geeignet; allerdings hängt die Auswahl wesentlich vom zu markierenden Edukt ab.

In Tab. 3.9-1 Gegenüberstellung der Radioiodierungsmethoden für Aromaten

Parameter	Elektrophil		Nukleophil
	Direkt	Demetallierung [50-52]	Cu(I)/DMSO
Edukt	nur aktivierte Aromaten	aufwendige Eduktsynthese	käufliche Bromaromaten
Reaktionsbedingungen	mild	mild	gemäßigt
Reaktionsmedium	oxidativ	oxidativ	schwach reduktiv
Zusatz	Oxidans (0,1 mM)		Cu(I): 1-8 mM
Temperatur	Raumtemperatur	Raumtemperatur	100-180°C
Lösungsmittel	wäßrige Puffer	organische	DMSO
Nebenbedingungen	pH-Einstellung	wasserfrei	sauerstofffrei
Vorläufermenge	gering: 0,1 - 0,01 mg		mind. 2 - 10 mg
Zeit	kurz, im Minutenbereich		2-3 Stunden
Kit-Eignung	gut		bedingt
Substitution	Isomerengemische	regioselektiv	regioselektiv
Edukt - Abtrennung	gut	sehr gut	problematisch
n.c.a.-RCA	gut - sehr gut	sehr gut	gut - befriedigend

Elektrophile Substitution

Die elektrophilen Substitutionsmethoden beinhalten sehr schnelle Markierungsreaktionen, die bei Raumtemperatur ablaufen. Hier werden nur geringste Mengen an Vorläufer und Oxidationsmittel benötigt, wodurch eine unkomplizierte Aufarbeitung und Produktisolierung ermöglicht wird. Daher sind diese Methoden im Prinzip für die Verwendung von Synthese-Kits zum klinischen Routineeinsatz geeignet. Am einfachsten ist in diesem Zusammenhang die direkte elektrophile Radioiodierung von aktivierten Aromaten wie Phenol- und Anilinderivaten. Diese Edukte sind häufig käuflich oder aber synthetisch einfach zugänglich. Hier können allerdings schwer zu trennende Isomerengemische von Radioprodukten entstehen. Darüber hinaus weisen die Radioiodverbindungen häufig nur begrenzte *in vivo* Stabilitäten gegenüber der enzymatischen Deiodierung auf.

Eine allgemein anwendbare Methode zur Radioiodierung aromatischer Moleküle stellen die Radioioddemetallierungsreaktionen dar (Abschnitt 1.6.2). Diese Methode ist praktisch nur durch die synthetische Zugänglichkeit der Vorläufer begrenzt. Neben den Vorteilen der elektrophilen Substitution wird hierbei ausschließlich ein regioselektives Produkt gebildet. Zudem ist auch eine hervorragende Abtrennung der Vorläufer gegeben. Die stark lipophilen metallorganischen Verbindungen werden auf RP-Systemen

normalerweise weit hinter den Produkten eluiert, so daß auch bei hohen Vorläufermengen sehr gute Trennungen erzielt werden können. Bei der Markierung muß die eventuelle Empfindlichkeit der Organometallverbindungen gegenüber alkalisch-wäßrigen Lösungen berücksichtigt werden.

Cu(I)-katalysierte nukleophile Substitution

In diesem Zusammenhang soll hauptsächlich auf die Markierung mit dem Cu(I)/DMSO-System eingegangen werden. Die entsprechenden wäßrigen Systeme benötigen stark saure, reduktive und damit drastische Reaktionsbedingungen, wodurch deren Anwendbarkeit auf wenige Moleküle beschränkt bleibt. Die Cu(I)-katalysierte Radioioddebromierung in organischen Solvenzien, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt und weiterentwickelt wurde, ist demgegenüber eine milde Methode, die sogar bei hydrolyse- und reduktionsempfindlichen Molekülen erfolgreich angewendet werden kann. Diese Methode ist demnach grundsätzlich für alle Bromaromaten geeignet. Sie liefert regioselektive Produkte in guten Ausbeuten. Meistens kann sowohl bei der Markierung als auch bei der Synthese von käuflichen Bromaromaten ausgegangen werden. Gerade für komplizierte, multifunktionale Biomoleküle wird hierdurch die Vorläufersynthese entschieden vereinfacht.

Nichtsdestoweniger erfordert diese Methode relativ hohe Reaktionstemperaturen und lange Reaktionszeiten. Die notwendigen hohen Vorläufer- und Cu(I)-Konzentrationen wirken sich zusätzlich erschwerend auf die Abtrennung des Radioproduktes aus. Darüber hinaus muß die Markierung unter Inertgasbedingungen durchgeführt werden (gilt nicht für die wäßrigen Systeme mit Zusatz von Reduktionsmitteln).

Die Cu(I)-Markierung ist zwar grundsätzlich universell einsetzbar, wird aber aufgrund ihrer relativ problematischen Handhabung eher eine Rolle in der Forschung oder aber bei der Markierung von speziellen Verbindungen spielen (z.B. bei oxidationsempfindlichen Tracern). Sie ist nur bedingt zur Verwendung bei Synthese-Kits geeignet.

3.10 N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-iod-O-methyl- α -methyl-D,L-tyrosinmethylester (I-MMT2NI)

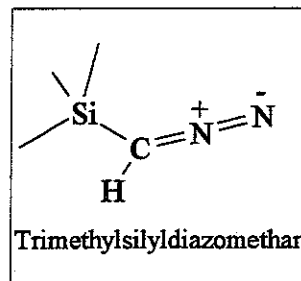
Bei der Überprüfung der Pharmakokinetik des ^{131}I -MT2NI am Mausmodell wurde eine schnelle Metabolisierung und eine geringe Aufnahme des Metaboliten ins Gehirn gefunden. Demnach galt es, den Tracer so zu verändern, daß eine höhere Lipophilie und eine geringere Metabolisierungsrate erreicht werden. Hier bot sich die Methylierung der Phenolfunktion an. Hierdurch sollte sowohl die Lipophilie vergrößert als auch die metabolische Stabilität der Verbindung verbessert werden.

Zur Darstellung des ^{131}I -MMT2NI waren grundsätzlich 2 Synthesewege praktikabel:

- A: Die direkte n.c.a.-Radioiodierung des MMT2NI-Vorläufers in Trifluoressigsäure (TFA) bei erhöhten Temperaturen. Bei dem entsprechenden O-methylierten L- α -Methyl-L-tyrosin konnten bei 60°C innerhalb von 45 min RCA von 50-55 % erhalten werden [27].
- B: Die Methylierung von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI.

In Vorversuchen zum Weg A wurde eine genügend hohe Stabilität zumindest von ^{131}I -MT2NI und MT2NI in TFA auch bei Temperaturen von 60 °C aufgezeigt, so daß auch von einer ausreichend hohen Stabilität der radioiodierten Verbindung unter den Reaktionsbedingungen ausgegangen werden konnte. Allerdings würde dieser Syntheseweg die Darstellung von 2 neuen Standardverbindungen und die Entwicklung eines Radio-HPLC-Verfahrens zur Abtrennung des neuen Vorläufers erfordern. Gleichzeitig müßte bei der Markierungsreaktion mit relativ geringen Ausbeuten von 30-55 % und, aufgrund der erhöhten Reaktionstemperaturen, mit der Zunahme von schwer abtrennbaren Nebenprodukten gerechnet werden. Daher erschien die unter B aufgeführte Variante interessanter. Die Synthese der dafür notwendigen Vorläufer-Radioiodverbindung (^{131}I -MT2NI), insbesondere die Abtrennung des MT2NI-Vorläufers, waren erarbeitet und konnten schnell und einfach durchgeführt werden (3.8.4). Neben der problemlosen chromatographischen n.c.a.-Trennung der sehr verschiedenen Radioiodverbindungen (O-H und O-Methyl) würde dieser Weg nur die Synthese einer Standardverbindung erfordern.

Hier stellte sich allerdings die Frage nach einem geeigneten Methylierungsagens, das eine einfache, selektive Methylierung der phenolischen OH-Funktion der n.c.a.-Verbindung innerhalb kurzer Zeit und mit hohen RCA ermöglichen sollte. Schnelle Reaktionen erfordern im allgemeinen starke Methylierungsagenzien wie z.B. Methyltriflat, das in der n.c.a.-Radiomethylierung erfolgreich eingesetzt worden ist [239]. Diese Reagenzien sind allerdings im allgemeinen schwer handhabbar und wenig selektiv. Beim MT2NI hätte in einem solchen Fall mit einer Konkurrenzmethylierung des Nitroimidazolkerns und der damit verbundenen Zerstörung der Verbindung gerechnet werden müssen. Anders liegt der Fall beim Diazomethan, bei dem die Methylierung nicht über einen nukleophilen Substitutionsmechanismus sondern über die Insertion in X-H- Funktionen (X= O, N, S) abläuft. Eine Konkurrenzmethylierung sollte daher im Fall des ^{131}I -MT2NI ausgeschlossen werden können. Allerdings ist Diazomethan schwierig handhabbar. Hier bot sich ein käufliches Diazomethanderivat, das Trimethylsilyldiazomethan (TMS-DA), an. Diese Verbindung wurde als 2 M Hexanlösung angeliefert und konnte im Kühlschrank gelagert werden. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen wird speziell eine Methylierung von Phenolen und Enolen erreicht [240]. Die Methylierung des n.c.a.-Eduktes wurde zunächst analog zur Literatur in Acetonitril/Methanol Gemischen unter Zusatz einer sterisch stark gehinderten Base durchgeführt. Als wichtigster Parameter der



Reaktionsgeschwindigkeit erwies sich dabei die Methanolkonzentration der Reaktionslösung. Alle Zusätze der Reaktion konnten nach der sauren Hydrolyse leicht als ionische Verbindungen entfernt werden. Unter den Reaktionsbedingungen wurde ein hydrophiles Radionebenprodukt mit einer RCA von 1-3 % erhalten, das gut über die Radio-HPLC abgetrennt werden konnte. Grundsätzlich dürfte hier aber auch eine einfache Abtrennung über eine Sep-Pack-Kartusche mit einem geeigneten Eluens möglich sein. Unter optimalen Reaktionsbedingungen konnten innerhalb von 20 min RCA von über 90 % erhalten werden.

Folglich konnte mit der Einführung von Trimethylsilyldiazomethan eine Alternative zur Synthese von n.c.a.-O-Methyltyrosin-Derivaten über die Markierung in TFA entwickelt werden. Am Beispiel der Radiosynthese von ^{131}I -MMT2NI konnte gezeigt werden, daß mittels einer zweistufigen Synthese unter Umgehung der Trifluoressigsäure innerhalb von 60 - 70 min das O-Methyltyrosin-Derivat mit einer Gesamt-RCA nach allen Trennschritten von 65 - 75 % und einer radiochemischen Reinheit von mehr als 99,9 % darstellbar ist. Die Methylierungsreaktion selbst konnte bei Raumtemperatur innerhalb von 20 min durchgeführt werden

3.10.1 Methylierung von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI mit Trimethylsilyldiazomethan (TMS-DA)

Zur Optimierung der Methylierung des n.c.a.- ^{131}I -MT2NI wurden die Parameter dieser Reaktion genauer untersucht. Die in der Literatur angegebenen Reaktionsbedingungen, die für synthetische Bereiche ermittelt worden sind, erwiesen sich bei der Methylierung des n.c.a.-Radioiodproduktes als unbrauchbar. Jedoch gelang es durch das Arbeiten in Methanol, die Methylierung auch für das n.c.a.-Arbeiten zu ermöglichen und innerhalb von vernünftigen Reaktionszeiten bei Raumtemperatur zu guten RCA zu gelangen. Für die eingesetzten sterisch gehinderten Basen DIPA und TMP wurde kein Unterschied in den RCA beobachtet.

3.10.1.1 Kinetik der Reaktion

In Abb. 3.10-1 ist die Abhängigkeit der Methylierung von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI mit TMS-DA bei verschiedenen Methanolkonzentrationen gezeigt. Die Methylierung erreichte bei einer Methanolkonzentration von 20 % nach etwa 30 min die maximale RCA. Bei höheren Methanolkonzentrationen wurde der Sättigungsbereich nach kürzeren Reaktionszeiten erreicht und lag um 10-15 % höher. Eine Zersetzung des Produktes nach längeren Reaktionszeiten, die sich in der Abnahme der RCA äußern würde, wurde nicht beobachtet. Daher kann von einer hochselektiven Reaktion des Trimethylsilyldiazomethans mit der phenolischen OH-Funktion ausgegangen werden.

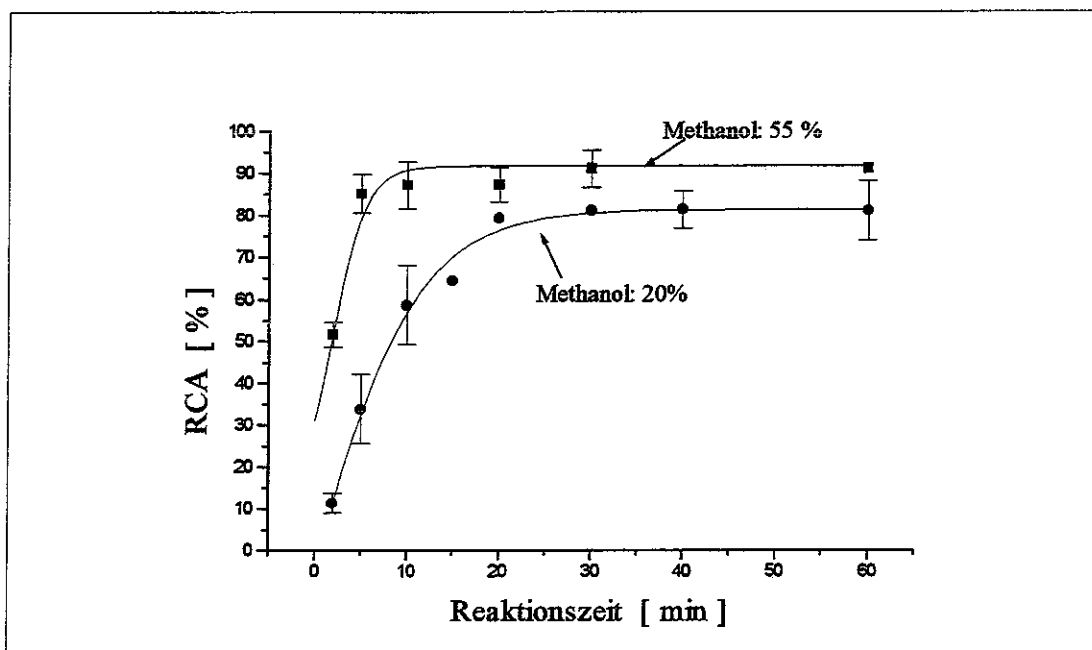


Abb. 3.10-1 Methylierung von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI mit TMS-DA. Abhängigkeit der RCA von der Reaktionszeit. TMS-DA: 0,66 M, DIPA: 0,67 M, $T = 21^\circ\text{C}$, CH_3CN , Hexan: 33 %

3.10.1.2 Trimethylsilyldiazomethan-Konzentration

Die Abhängigkeit der Methylierungsreaktion von der Konzentration des Methylierungsreagens soll anhand von Abb. 3.10-2 und 3.10-3 verdeutlicht werden. Hier sind die Kinetiken der Reaktion bei verschiedenen TMS-DA-Konzentrationen aufgeführt.

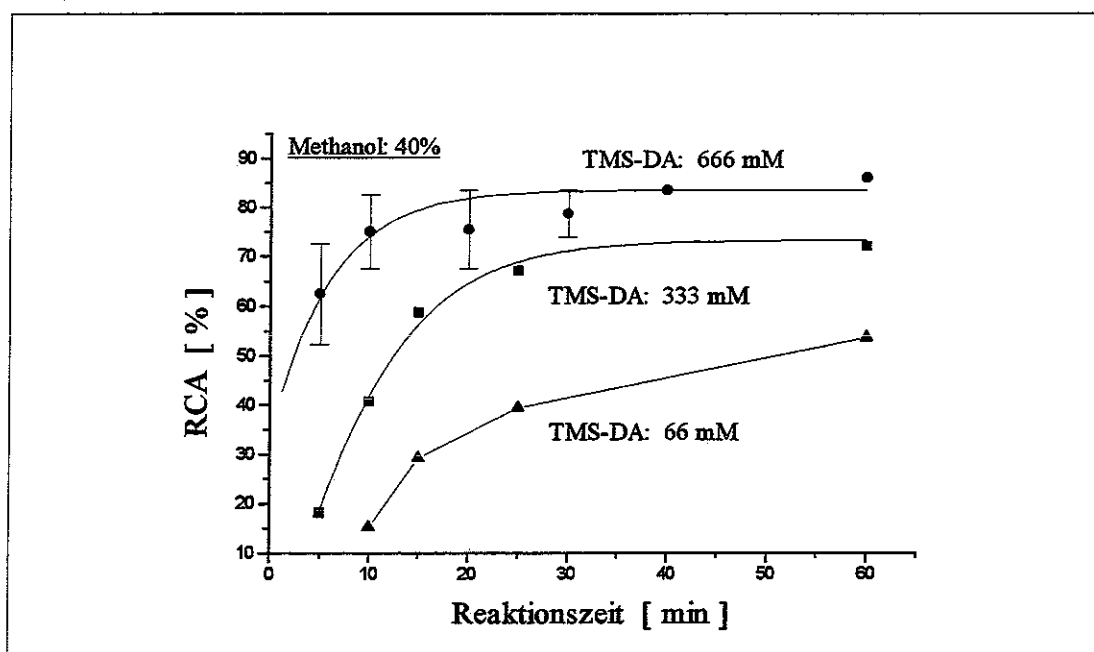


Abb. 3.10-2 Methylierung von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI mit TMS-DA. Abhängigkeit der RCA von der Reaktionszeit bei verschiedenen TMS-DA Konzentrationen. DIPA: 0,67 M, $T = 21^\circ\text{C}$, CH_3CN , MeOH, Hexan: 33 %

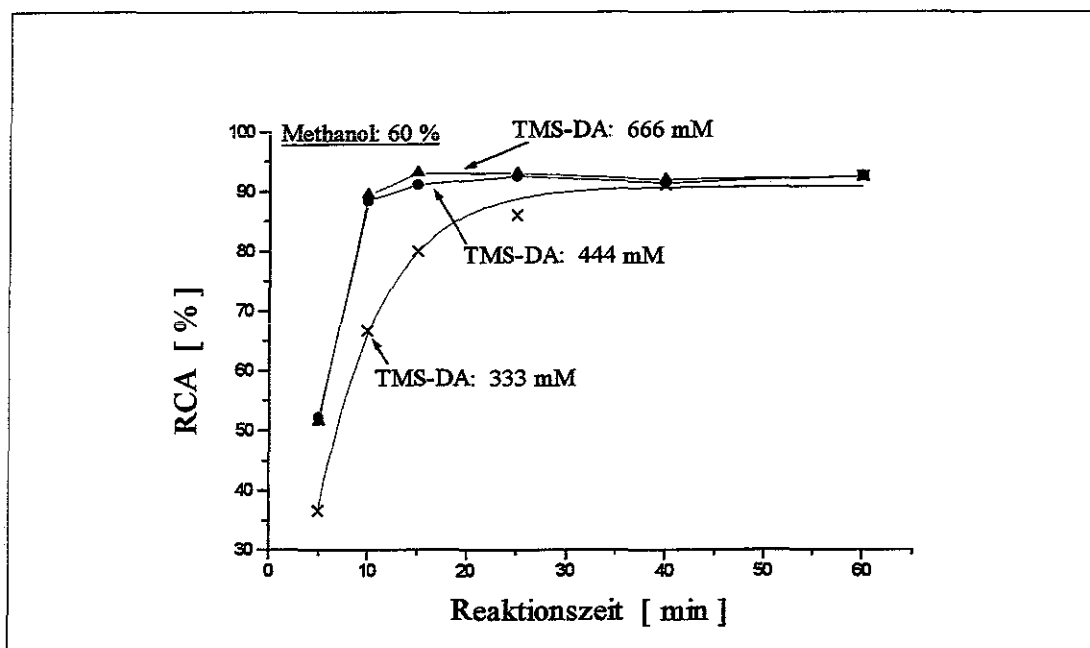


Abb. 3.10-3 Methylierung von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI mit TMS-DA. Abhängigkeit der RCA von der Reaktionszeit bei verschiedenen TMS-DA Konzentrationen. DIPA: 0,67 M, T= 21 °C, MeOH, Hexan: 33 %

Bei Methanol-Konzentrationen von 40 % machte sich der Effekt der Veränderung der TMS-DA-Konzentration stark bemerkbar. Die Reaktion wurde langsamer, und es wurden geringere RCA bei niedrigen TMS-DA-Konzentrationen erhalten (Abb 3.10-2). Bei höheren Methanol-Konzentrationen war der Effekt geringer ausgeprägt (Abb 3.10-3). Hier wurden mit sinkender TMS-DA-Konzentration etwas geringere Reaktionsgeschwindigkeiten bei jedoch gleichbleibenden radiochemischen Sättigungsausbeuten beobachtet. Bei der Radiosynthese des ^{131}I -MMT2NI wurde üblicherweise mit hohen Methanol-Konzentrationen gearbeitet und eine TMS-DA-Konzentration von 666 mM eingesetzt.

3.10.1.3 Methanol Konzentration

Als wichtigster Parameter dieser Reaktion erwies sich die Methanol-Konzentration. Bei den in der Literatur der "kalten" Methylierung angegebenen Methanol-Konzentrationen von 10 % und weniger wurden Reaktionszeiten im Stundenbereich und geringe RCA gefunden. Schon aus den vorhergehenden Abbildungen wird der starke Einfluß des Methanols auf die Methylierung deutlich. Ähnlich der Abhängigkeit der RCA von der TMS-DA-Konzentration wurden bei niedrigen Methanol-Konzentrationen geringere radiochemische Sättigungsausbeuten und geringere Reaktionsgeschwindigkeiten beobachtet. In Abb. 3.10-4 ist die Abhängigkeit der RCA von der eingesetzten Methanolmenge für zwei verschiedene Reaktionszeiten aufgezeigt.

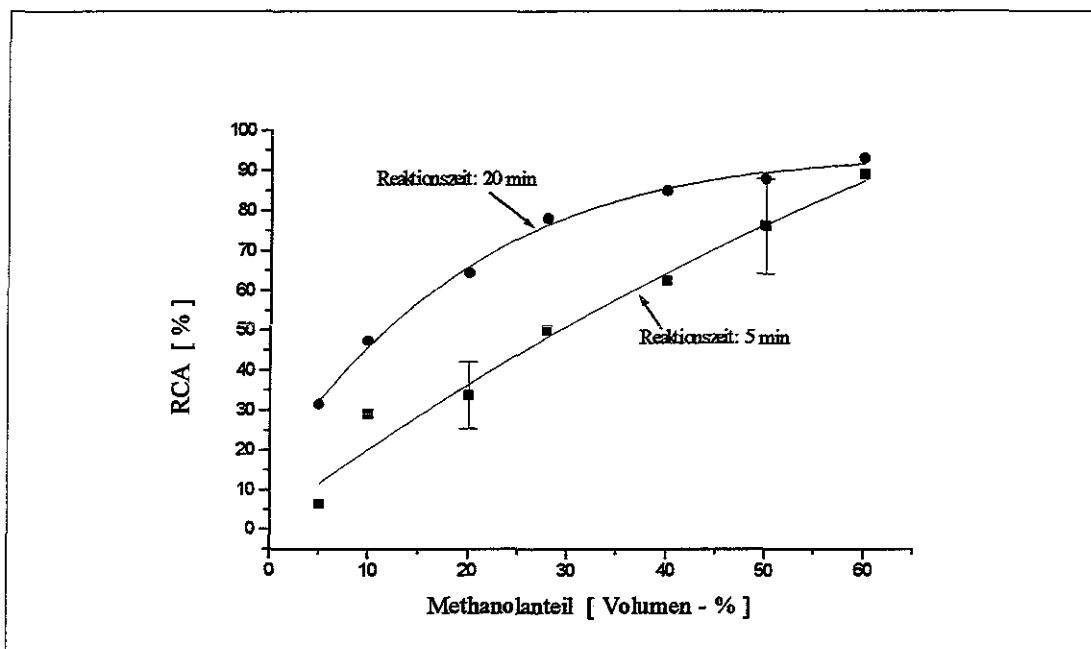


Abb. 3.10-4 Methylierung von n.c.a.- ^{131}I -MT2NI mit TMS-DA. Abhängigkeit der RCA von der Methanollmenge bei verschiedenen Reaktionszeiten DIPA: 0,67 M, TMS-DA: 0,66 M, $T = 21^\circ\text{C}$, CH_3CN , MeOH, Hexan: 33 %

Mit zunehmender Reaktionszeit und zunehmenden Methanolkonzentrationen wurde eine Sättigung der RCA erreicht. Das Sättigungsverhalten für hohe Methanolanteile war bei kürzeren Reaktionszeiten weniger ausgeprägt. Der Unterschied in den RCA für unterschiedliche Reaktionszeiten wurde mit zunehmenden Methanol-Konzentrationen geringer.

Die starke Abhängigkeit der RCA von der Methanol-Konzentration bestätigt den in der Literatur diskutierten Reaktionsmechanismus des TMS-DA [241]. Danach verläuft die Reaktion nicht über die *in situ* Bildung von Diazomethan, sondern über die Methanolyse eines TMS-DA-Eduktkomplexes.

Für die Methylierungsreaktion von n.c.a.-Verbindungen wurden die besten Ergebnisse in reinem Methanol als Lösungsmittel erzielt.

3.10.1.4 Wasserempfindlichkeit

Das für ^{131}I -MT2NI erarbeitete Abtrennverfahren über RP-HPLC und Sep-Pack-Kartuschen erfordert den Einsatz von wäßrigen Lösungen. Daher war es von Interesse, die Empfindlichkeit dieser Methylierungsreaktion gegenüber Wasser zu ermitteln. Bei der Untersuchung zeigte sich, daß Wasserzusätze bis zu 10 % unproblematisch sind. Es wurde eine leichte Beschleunigung der Reaktion beobachtet.

Demnach ist eine zusätzliche und aufwendige Trocknung der zur Methylierung eingesetzten methanolischen Radiolösung nicht erforderlich. Auch auf das Arbeiten mit getrockneten Lösungsmitteln und unter Inertgasatmosphäre kann verzichtet werden.

3.10.2 Optimale Radiosynthese und Aufarbeitung von ^{131}I -MMT2NI

Die n.c.a.-Methylierung konnte erfolgreich mit Trimethylsilyldiazomethan (TMS-DA) unter Zusatz einer sterisch gehinderten Base durchgeführt werden. Hier wurden Diisopropylamin (DIPA) und 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (TMP) gleichermaßen erfolgreich verwendet. Bei einer relativ hohen Konzentration von jeweils 0,6 M an TMS-DA und Base konnte in Methanol/Hexan-Gemischen nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur eine RCA von mehr als 90 % erhalten werden. Auch die Auftrennung des Produktgemisches mittels Radio-HPLC erwies sich erwartungsgemäß als unproblematisch. Zur Anfertigung der applikationsfertigen Lösung wurde analog zum ^{131}I -MT2NI (3.8.4) vorgegangen. Die Gesamt-RCA über die beiden Reaktionsschritte betrug nach 60-70 min 65-75 %. Das Produkt wurde in einer radiochemischen Reinheit von mehr als 99,5 % erhalten.

4. Pharmakokinetik und Metabolitenanalyse

Für die Pharmakokinetik einer Verbindung ist unter anderem deren Lipophilie von großer Bedeutung. Eine hohe Lipophilie ist im allgemeinen die Voraussetzung für eine Hirnaufnahme (vgl. 1.9). Daher wurde vor den Tierversuchen der Verteilungskoeffizient zwischen Octanol/Wasser als Maß für die Lipophilie der Tracer bestimmt. Der Verteilungskoeffizient wurde zweckmäßigerweise über eine Tracermethode gemessen. Die Werte sind in Tab. 4.-1 zusammengestellt. Entsprechend der Zielsetzung führten die vorgenommenen chemischen Veränderungen der Ausgangsverbindungen zur erwünschten Steigerung der Lipophilie.

Tab. 4.-1 Verteilungskoeffizienten der untersuchten Nitroimidazoltracer

Verbindung	Verteilungskoeffizient P Octanol / X		
	X = Wasser	isotonische NaCl	Puffer pH 7
I-P2NI-Me	29,8	30,3	35,8
I-P2NI-Ba	588	-	-
I-MT2NI	0,0352	0,0383	0,0245
I-MMT2NI	162,6	170,9	169,7

Anders als erwartet, zeigten alle untersuchten Radiotracer eine schnelle Biokinetik in der Maus. Sie wurden hauptsächlich über die Nieren in den Urin ausgeschieden. Trotzdem wurde die für Nitroimidazole typische zweiphasige Bioelimination beobachtet [242,243]. Zudem wurde die für diese Verbindungsklasse bekannte Anreicherung in verschiedenen Organen wie Leber, Magen-Darm-Trakt und den Nieren gefunden. Dabei war die Anreicherung im Magen-Darm-Trakt während des Beobachtungszeitraumes irreversibel, während die Leber- und Nierenradioaktivität langsam abnahm. Auch wenn bei einigen Tracern ein relativ geringe Anreicherung in der Schilddrüse auftrat, können die Verbindungen als stabil gegenüber der *in vivo* Deiodierung angesehen werden. Eine angestrebte Aufnahme ins Gehirn wurde bei keinem der Nitroimidazoltracer gefunden.

Bei der Untersuchung der Pharmakokinetik kann bezüglich der Größenordnung der Traceranreicherung grundsätzlich zwischen zwei Organgruppen unterschieden werden. Hier sind zum einen Blut, Herz, Schilddrüse, Pankreas und Hirn mit einer geringen Aufnahme und zum anderen Nieren, Gesamtdarm und Leber mit einer erhöhten Aufnahme zu nennen. Im Urin, der den Hauptausscheidungsweg der Verbindungen ausmachte, wurden mit Abstand die höchsten Radioaktivitätswerte gefunden. Die gesamten Untersuchungsergebnisse sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

4.1 Vergleich der pharmakokinetischen Eigenschaften

Um einen Überblick über die pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindungen zu bekommen, wird im folgenden anhand von einigen wichtigen Organen eine vergleichende Darstellung vorgenommen. Hierzu wurden die Organe Blut, Schilddrüse, Leber, Herz und Hirn ausgewählt.

Blut

Die vergleichende Pharmakokinetik bezüglich des Blutes zeigt, daß bei den Phenylalaninderivaten, insbesondere dem Methylester, höhere Blutwerte erreicht werden als bei den Tyrosinderivaten. Die hohe Blutaktivität des Phenylalaninmethylesters ^{131}I -MT2NI könnte in diesem Zusammenhang als relativ starke Plasma-Eiweiß-Bindung der entsprechenden Säure interpretiert werden.

Für alle Tracer wird eine relativ hohe Clearancerate beobachtet, die entweder durch die Bildung hydrophiler Metabolite, oder durch die Nutzung von biochemischen Transportmechanismen erklärt werden kann. Besonders beim sehr lipophilen ^{131}I -P2NI-Ba scheinen Transportmechanismen im Vordergrund zu stehen (s. Abschnitt 4.2)

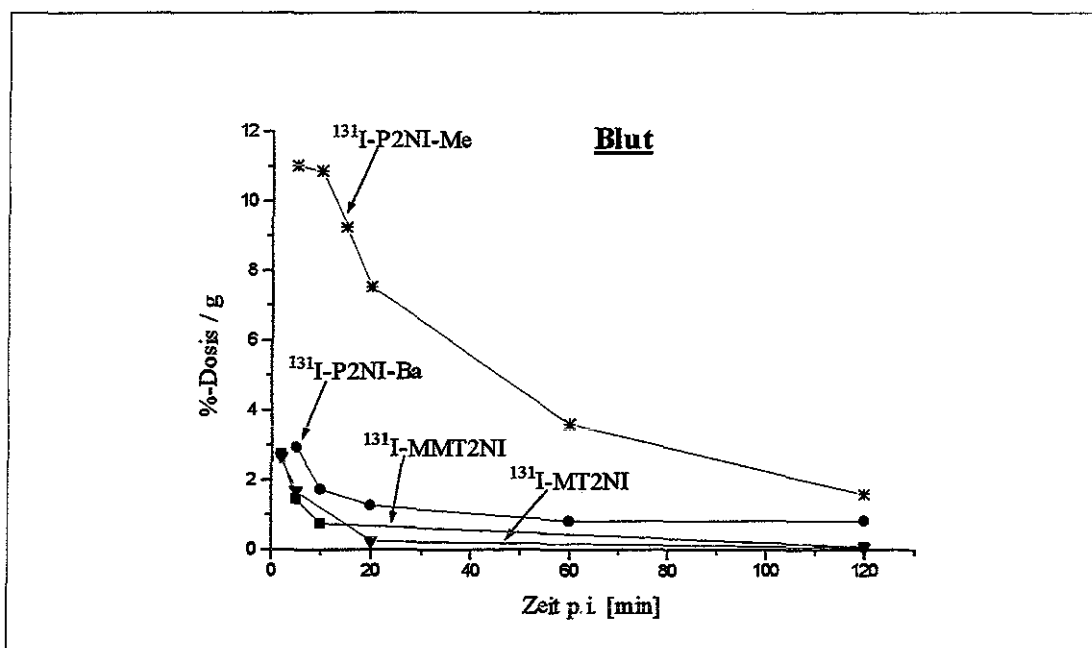


Abb. 4.-1 Vergleichende Pharmakokinetik in der Maus. Blut

Schilddrüse

Bei radioiodierten Verbindungen ist die Schilddrüsenradioaktivität ein wichtiger Indikator für die *in vivo* Stabilität der Verbindungen gegenüber der Deiodierung. Die Nitroimidazoltracer dieser Verbindungsreihe zeigen teilweise eine Aufnahme in die Schilddrüse, die allerdings innerhalb des untersuchten Bereiches deutlich niedriger ausfällt, als bei typischen Deiodierungen. Die vergleichende Pharmakokinetik bezüglich der Schilddrüse ist in Abb. 4.-2 für die untersuchten Nitroimidazoltracer aufgeführt. Abgesehen vom ^{131}I -MT2NI wird für alle Verbindungen ein ungewöhnliches Verhalten beobachtet.

Die anfängliche Anreicherung des ^{131}I -P2NI-Me in der Schilddrüse, gefolgt von einem allmählichen für Iodid untypischem Auswaschen der Radioaktivität, deutet auf eine direkte biochemische Wechselwirkung der Verbindung mit der Schilddrüse und nicht auf eine vorangehende Deiodierung hin. Zudem werden die

eingesetzten iodaromatischen Verbindungen im übrigen gegenüber der *in vivo* Deiodierung als stabil angesehen [27,29]. Daher könnte eine solche direkte biochemische Wechselwirkung auch bei den anderen Nitroimidazoltracern angenommen werden. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die relativ zu den anderen Tracern starke irreversible Anreicherung des ^{131}I -P2NI-Ba und des ^{131}I -MMT2NI in der Schilddrüse. Nach der obigen Argumentation sollte es sich bei der Anreicherung eher um einen Metaboliten dieser Verbindung als um freies Iodid handeln

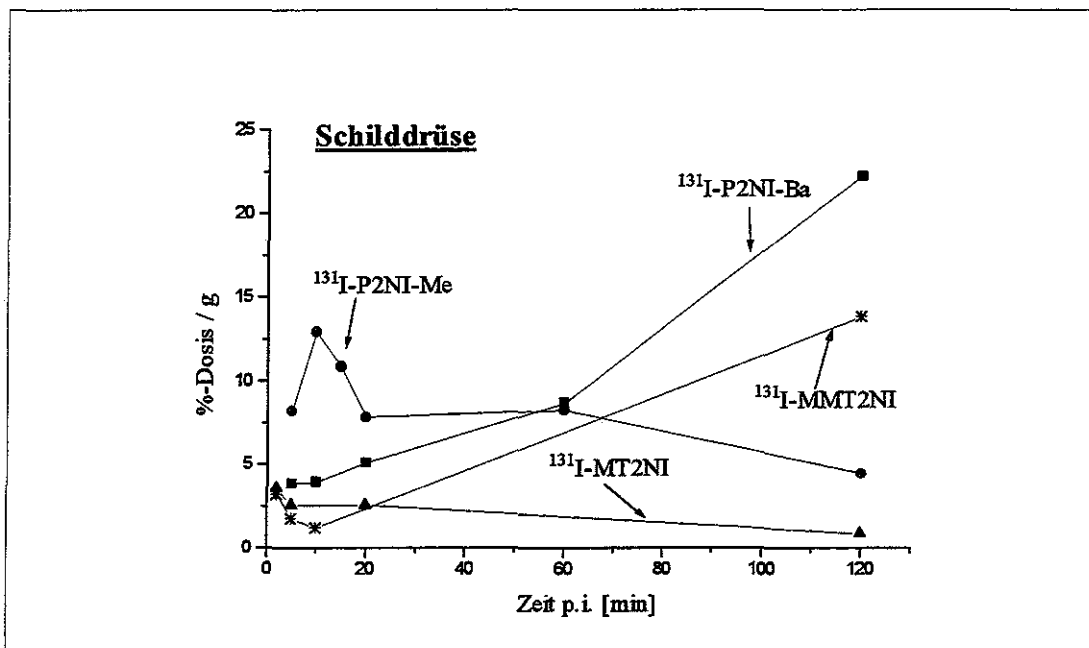


Abb. 4.-2 Vergleichende Pharmakokinetik in der Maus. **Schilddrüse**

Leber

Die Wechselwirkung mit der Leber ist für die Nitroimidazoltracern in zweifacher Hinsicht von Bedeutung. Zum einen wird allgemein ein relativ hoher Leberuntergrund erreicht, der sich störend auf die Messungen,

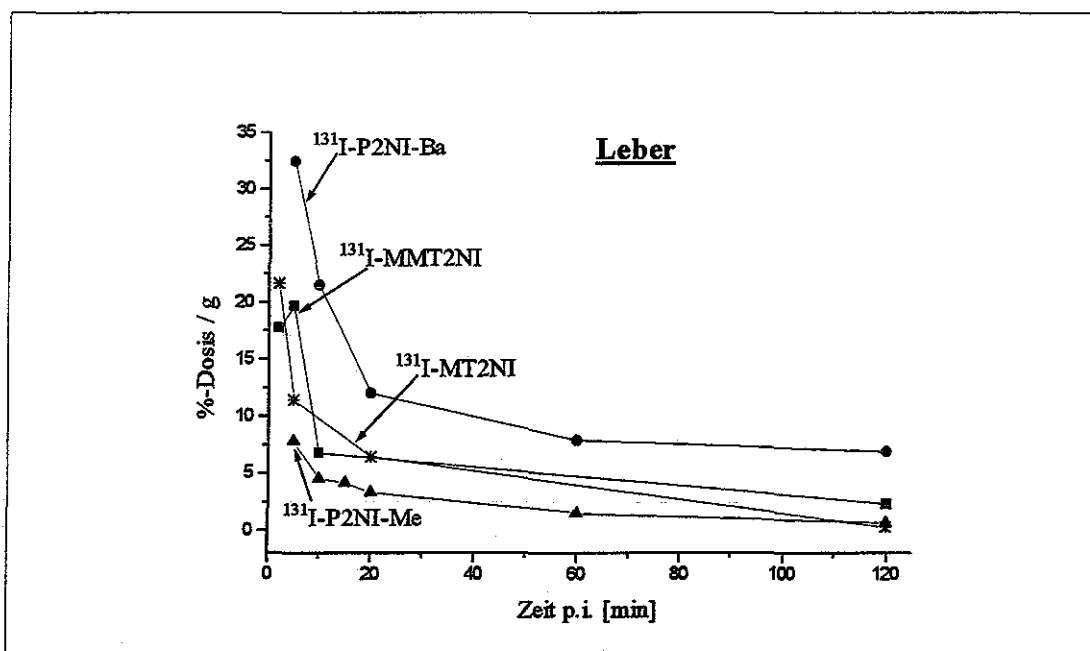


Abb. 4.-3 Vergleichende Pharmakokinetik in der Maus. **Leber**

insbesondere beim Herzen, auswirken würde. Zum anderen kann die Leberanreicherung unter der Voraussetzung, daß diese durch eine erhöhte Aktivität von Redoxenzymen hervorgerufen wird, auch als grobes Maß für die reduktive biochemische Aktivität der Nitroimidazole angesehen werden [150]. Daher ist in Abb. 4.-3 eine vergleichende Darstellung bezüglich der Pharmakokinetik in der Leber aufgeführt.

Für alle Tracer wird eine mehr oder weniger starke reversible Anreicherung beobachtet, die erwartungsgemäß grob mit der Lipophilie der Radioiodverbindungen korreliert. Auffällig ist die für Nitroimidazolderivate untypische, besonders geringe Aufnahme von ^{131}I -P2NI-Me in der Leber, die mit der schnellen Bildung des sehr hydrophilen Metaboliten ^{131}I -P2NI-S erklärt werden kann. Für die Tyrosin-Nitroimidazolkonjugate wird eine anfänglich relativ starke Leberaufnahme gefunden, die aber durch einen nachfolgenden starken Abfall der Radioaktivität in der Leber gekennzeichnet ist, so daß hier nach 2 h etwa die Blutwerte erreicht werden. Ein ähnliches Verhalten wird bezüglich der Niere beobachtet. Daher sollten bei diesen Tracern der sonst bezüglich dieser Organe auftretende Untergrund unbedeutend sein.

Herz

Einer der wichtigsten Bereiche zur Diagnose von hypoxischen Zellen ist das Herz. In Abb. 4.-4 ist die vergleichende Pharmakokinetik der untersuchten Nitroimidazoltracer bezüglich des Herzens aufgeführt. Abgesehen vom ^{131}I -P2NI-Me zeigen hier alle Tracer ein günstiges Verhalten. Ähnlich wie beim Blut wird nach relativ hohen Anfangswerten ein schnelles Auswaschen der Tracer beobachtet. Im Hinblick auf die anderen biochemischen Eigenschaften sollte das ^{131}I -MT2NI vergleichsweise am besten für Herzuntersuchungen geeignet sein.

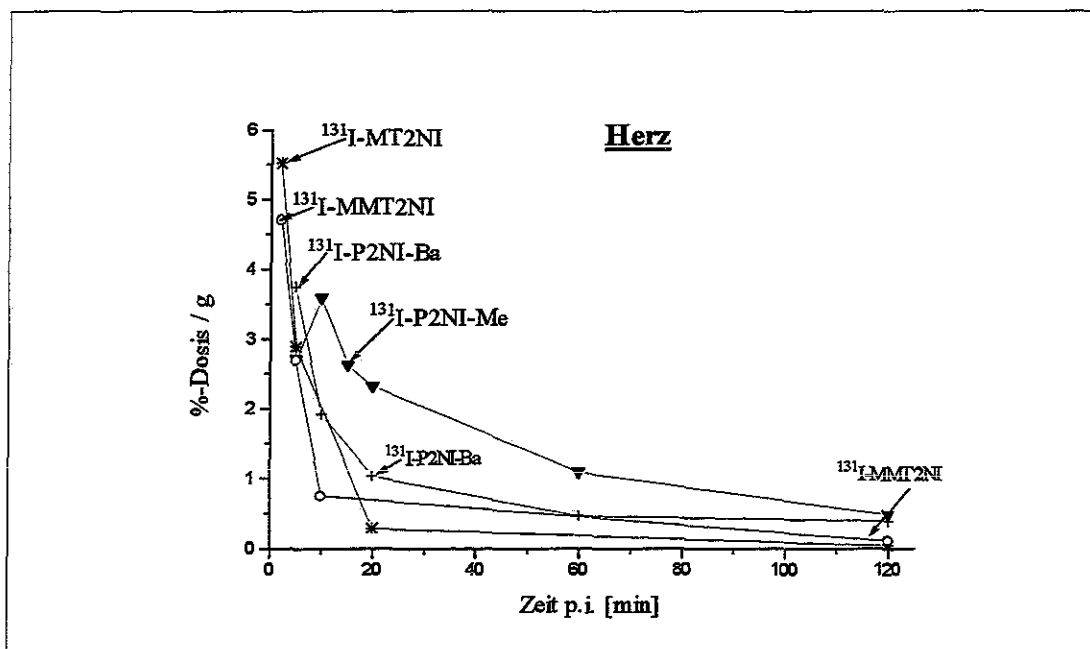


Abb. 4.-4 Vergleichende Pharmakokinetik in der Maus. Herz

Hirn

Eine Zielsetzung der Tracerentwicklung war die Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke und damit die Möglichkeit, auch Messungen im Gehirn vornehmen zu können. Allerdings wird mit keinem der Tracer eine erwünschte Anreicherung erzielt. Zum Vergleich sind in Abb. 4.-5 die entsprechenden Daten der Tracer zusammengestellt.

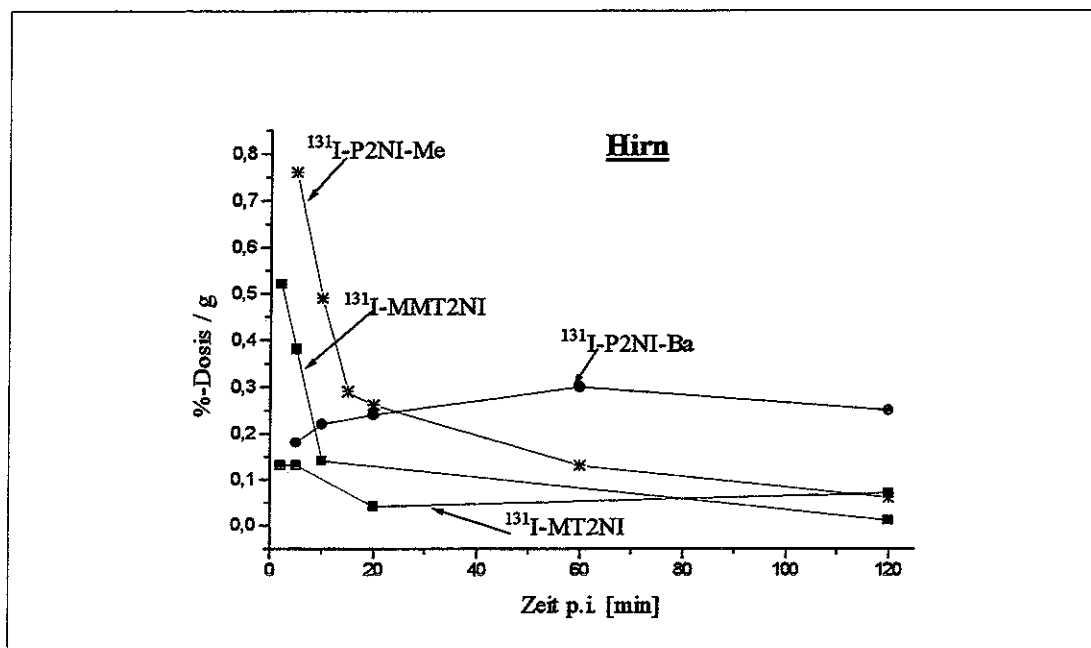


Abb. 4.-5 Vergleichende Pharmakokinetik in der Maus. **Hirn**

Demnach sollte das Phenylalaninmethylester-Derivat, das *in vivo* schnell zur freien Säure ^{131}I -P2NI-Me hydrolysiert, für Hirnuntersuchungen am besten geeignet sein. Hier scheint die Amino-Säurefunktion für eine erhöhte Anreicherung über aktive Transportmechanismen zu sorgen.

Alle zur Steigerung der Hirnaufnahme eingesetzten pharmakologischen Konzepte blieben ohne Erfolg. Sowohl die starke Steigerung der Lipophilie durch gezielte chemische Veränderungen als auch ein ins Auge gefaßter "trapping"-Mechanismus über die Methylester- bzw. Butylamidfunktion als biochemische "Sollbruchstelle" führten wider erwarten nicht zu einer erhöhten Aufnahme ins Gehirn. Aber auch mit einer Aufnahme von 0,8 %-Dosis/g sollte in Verbindung mit den erhaltenen Auswaschraten und bei guter hypoxischer Anreicherung ein "positiv imaging" des Gehirns möglich sein.

4.2 Blut- und Urinuntersuchungen

Die Blut- und Urinuntersuchungen wurden in Analogie zur Literatur [244] mit Hilfe der Radio-HPLC durchgeführt. Das Verfahren wurde anhand von Humanblut erarbeitet und dann auf Mausblut übertragen. Zur besseren Kontrolle der Analyse wurden dem Blut und Urin vor der Aufarbeitung die entsprechenden Standardverbindungen als Träger zugesetzt. Das erarbeitete Analyseverfahren erlaubte nur bedingt eine quantitative Aussage, da etwa 20-30 % der Radioaktivität nicht aus dem Blutrückstand extrahiert werden konnten. Für die Urinuntersuchungen wurde das gleiche Verfahren wie bei den Blutuntersuchungen verwendet, wobei hier 100 % der Radioaktivität für die Untersuchung zugänglich waren.

Darüber hinaus wurde vor den Tierversuchen ein Stabilitätstest der Verbindungen in Humanblut durchgeführt. Hierbei wurde das Blut 2 h bei 37 °C inkubiert und eine Blutanalyse bezüglich der Verbindungen vorgenommen. Abgesehen von dem Phenylalaninmethylester-Derivat ^{131}I -P2NI-Me, bei dem nach 2 h etwa 10 % des Hydrolyseproduktes (^{131}I -P2NI-S) gefunden wurden, konnte bei diesen Versuchen nur eine vernachlässigbare *in vitro* Metabolisierung der Verbindungen festgestellt werden.

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der Blut- und Urinuntersuchungen für die einzelnen Verbindungen aufgeführt. Alle Angaben verstehen sich als grobe Richtwerte des *in vivo* Verhaltens der Verbindungen und nur bedingt als quantitative Aussagen.

Für alle Verbindungen zeigte sich in der Maus schon nach kurzen Inkubationszeiten eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Metabolisierung. Es wurden ausschließlich hydrophile Metaboliten gebildet. Abgesehen vom O-Methyl- α -methyltyrosin-Derivat (I-MMT2NI) wurden die Tracer selbst kaum direkt, sondern nur als Metabolite über die Nieren ausgeschieden.

I-P2NI-Me und I-P2NI-S

Das Phenylalaninmethylesterderivat (^{131}I -P2NI-Me) zeigte das einfachste Metabolisierungsverhalten der untersuchten Tracer. Es wurde praktisch vollständig in einen Metaboliten, nämlich die freie Säure (^{131}I -P2NI-S), umgewandelt. Schon nach 2 Minuten Inkubationszeit konnte *in vivo* sowohl im Blut als auch im Urin kein Edukt mehr nachgewiesen werden.

Tab. 4.1-1 Metabolitenanalyse von Blut und Urin für I-P2NI-Me im Mausmodell

I-P2NI-Me	Blut 5 min [%]	Urin 5 min [%]
^{131}I -P2NI-Me	n.n	0,9
^{131}I -P2NI-S	96	95,4
P1 Hydrophil	3	2

In Tab. 4.1-1 sind die Ergebnisse der Metabolitenanalyse aufgeführt. Demnach entspricht die erhaltene *in vivo* Pharmakokinetik der Maus nicht dem ^{131}I -P2NI-Me, sondern dessen Hydrolyseprodukt, das heißt der freien Säure ^{131}I -P2NI-S, so daß zur Bestimmung von deren Bioverteilung keine Tierversuche durchgeführt wurden. Diese wird als ionische Verbindung, wahrscheinlich über den Säuretransporter der Niere, schnell ausgeschieden.

Auch zur Untersuchung und Abtrennung des ^{131}I -P2NI-S aus dem Blut wurden Vorversuche unternommen. Hier konnte gezeigt werden, daß die Säure und der Methylester gleichermaßen mit Methanol extrahiert werden konnten. Daher erlaubt das Verfahren bezüglich der Mengenverhältnisse dieser Verbindungen eine

quantitative Aussage.

Unter der Annahme einer langsameren *in vivo* Hydrolyse im Menschen sollte das ^{131}I -P2NI-Me aufgrund des einfachen definierten Metabolismus und der guten Ausscheidungsrate des Metaboliten zumindest bezüglich des pharmakokinetischen Verhaltens optimal als Tracer geeignet sein. Die hohen Auswaschraten in Verbindung mit einer relativ geringen Leberaufnahme könnten bei vorhandener hypoxischer Anreicherung einen großen Vorteil bezüglich des Strahlungsuntergrundes und des Zeitbedarfs einer Messung darstellen. Insbesondere bei der Untersuchung von Hypoxien im Herzen und in Tumoren ist dieses Verhalten relevant.

I-P2NI-BA

Beim Phenylalaninbutylamid-Derivat sollte mit der Amidfunktion zwar eine "Sollbruchstelle" für die Metabolisierung zu einem schnell ausscheidbaren hydrophilen Metaboliten eingebaut werden, von der allerdings geringere Umsatzraten erwartet wurden als bei der Methylesterfunktion. Für die freie Säure hatte sich zumindest im Mausmodell eine definierte und schnelle Ausscheidungsrate ergeben, so daß eine stabilere Amidfunktion als Sollbruchstelle geeignet schien. Wie die Metabolitenanalyse zeigt, konnte dieses Konzept nur teilweise verwirklicht werden (Tab. 4.1-2).

Tab. 4.1-2 Metabolitenanalyse von Blut und Urin für I-P2NI-BA im Mausmodell

I-P2NI-BA	Blut		Urin	
	5 min [%]	120 min [%]	5 min [%]	120 min [%]
^{131}I -P2NI-BA	70	15	5	0
^{131}I -P2NI-S	15	25	85	70
Andere	15	60	10	30

Die Analyse von Blut und Urin der Maus ergab die Bildung eines Metabolitengemisches. Neben der erwarteten freien Säure wurden noch 3 weitere, nicht identifizierte, hydrophile Metabolite gefunden, die in der Tabelle zusammengefaßt aufgeführt sind. Die freie Säure war nach 5 Minuten zu 15 % an der Gesamtradioaktivität und zu 50 % an der Metabolitenbildung beteiligt. Der Anteil der nicht identifizierten Metabolite im Blut nahm nach 120 Minuten auf 60% zu. Zur gleichen Zeit bestand die Radioaktivität des Urins zu 70 % aus der freien Säure. Folglich wurden die "anderen" Metabolite deutlich langsamer über die Nieren ausgeschieden als das ^{131}I -P2NI-S. Anders als beim Methylester bestand die Radioaktivität des Blutes nach 5 Minuten noch zu 70 % aus unveränderter Ausgangsverbindung. Trotzdem wurde auch hier eine relativ hohe mit dem Methylester vergleichbare Clearancerate gefunden. Erstaunlicherweise konnte die sehr lipophile Ausgangsverbindung auch zu 5 % im Urin nachgewiesen werden, was auf einen aktiven Transportmechanismus der Niere hinweist.

Durch die Blutanalyse konnte eine verglichen mit dem Methylester höhere *in vivo* Stabilität des ^{131}I -P2NI-Ba bestätigt werden. Hauptmetabolit war wie beim Methylester die vorgesehene freie Säure, die erwartungsgemäß langsamer gebildet wurde. Allerdings traten noch weitere relativ schlecht ausscheidbare Metabolite auf. Diese sollten sich störend auf eine moderate Clearancerate und damit auf eine schnelle Bildung eines geringen Untergrundes auswirken. Gleichzeitig könnte die irreversible Aufnahme in der Schilddrüse (Abb. 4.-2) auf einen der gebildeten Metabolite zurückgeführt werden. Aufgrund dieser zusätzlichen metabolischen Pfade konnte das Konzept der "Sollbruchstelle" in diesem Fall nur bedingt umgesetzt werden.

I-MT2NI

Auch für das α -Methyltyrosin-Derivat (I-MT2NI) wurde eine relativ schnelle Metabolisierung gefunden. Schon nach 2 min waren nur noch 26 % der Ausgangsverbindung vorhanden. Es entstanden hauptsächlich zwei weitere hydrophile Metabolite, die über die Niere ausgeschieden wurden. Aufgrund der hohen Stabilität des Methylesters der α -Methylaminosäure sollte die enzymatische Hydrolyse zur freien Säure ausgeschlossen werden können. Hier wird vermutlich der für Phenole bekannte Stoffwechselweg der metabolischen Phase-II-Reaktion beschritten, bei dem durch die Anlagerung von hydrophilen Gruppen wie Glucuronsäure oder Schwefelsäure ausscheidungsfähige Produkte gebildet werden. Im Urin trat die Verbindung selbst nur in geringen Mengen auf (s. Tab. 4.1-3).

Tab. 4.1-3 Metabolitenanalyse von Blut und Urin für ^{131}I -MT2NI im Mausmodell

I-MT2NI	Blut		Urin		
	2 min [%]	5 min [%]	2 min [%]	5 min [%]	120 min [%]
^{131}I -MT2NI	26	20,3	0	1,6	0
M1	65	51	95	77,6	64
M2	9	11	4	20	17

I-MMT2NI

Beim O-Methyl- α -methyltyrosin-Derivat sollte unter der Voraussetzung der obigen Metabolisierungsthese des I-MT2NI durch die Einführung der O-Methylgruppe eine zusätzliche biochemische Stabilisierung erfolgen. Zur Anlagerung einer hydrophilen Gruppe müßte erst eine Demethylierung innerhalb der metabolischen Phase-I erfolgen, wodurch sich die Clearancerate erhöhen sollte. Sowohl die Pharmakokinetik als auch die Metabolitenanalyse zeigten, daß dies nicht der Fall ist. Die Verbindung wies ein zum ^{131}I -MT2NI ähnliches *in vivo* Verhalten auf. Nach 5 Minuten wurden noch 24 % der Radioaktivität des Blutes in der Ausgangsverbindung gefunden. Neben wenig α -Methyltyrosin-Derivat (^{131}I -MT2NI) wurden noch zwei weitere hydrophile Metabolite gebildet. Ein Vergleich der Metabolite P1 und P2 mit denen des ^{131}I -MT2NI, M1 und M2 wurde nicht vorgenommen. ^{131}I -MMT2NI wurde erstaunlicherweise zu 8,5 % im Urin gefunden. Sowohl aus der Metabolitenanalyse als auch aus der Pharmakokinetik wurde deutlich, daß die Einführung der O-Methylgruppe in das ^{131}I -MT2NI keinerlei Vorteile bringt. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung ^{131}I -MT2NI wurde ein annähernd analoges biochemisches Verhalten gefunden, wobei eine zusätzliche nachteilige irreversible Anreicherung in der Schilddrüse auftrat.

Tab. 4.1-4 Metabolitenanalyse von Blut und Urin für ^{131}I -MMT2NI im Mausmodell

I-MMT2NI	Blut			Urin
	2 min [%]	5 min [%]	120 min [%]	5 min [%]
Edukt: ^{131}I -MMT2NI	24	25	2,5	8,5
^{131}I -MT2NI	0	11	2,3	3,3
P1	15	15	12,5	24
P2	50	31	80	58

5. Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien und Geräte

Tab. 5.1-1 Eingesetzte Reagenzien und Solvenzien

Verbindung	Hersteller	Qualität
Acetonitril	Merck	pro analysi
Argon	Messer Griesheim	99,99 %
Ascorbinsäure	Fluka	puriss. >99,5 %
p-Brom-D,L-phenylalanin	Bachem	-
Bromwasserstoffsäure	Merck	47 %, reinst
Butylamin	Fluka	puriss.
Chloramin-T	Merck	zur Synthese
Chloramin-B	Fluka	purum, 28% chlorine
Chlorwasserstoffsäure	Merck	37 %, p.a.
Chloressigsäurechlorid	Aldrich	99 %
Chloroform	Merck	p.a.
Chloroform, deuteriert	Fluka	purum, 99,5 %
DC-Platten, Si-60, F ₂₅₆	Merck	auf Aluminium
Dichloramin-T	TCL, Japan	-
Dichlormethan	Merck	z.A.
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Fluka	puriss.; 99 %
2,5 Dihydroxyterephthalsäure	Aldrich	98%
Diisopropylamin	Merck-Schuchardt	99 %
Dimethylsulfat	Fluka	puriss., 99 %
Diethylether	Merck	p.a.
Dimethylformamid	Fluka	p.a.
Dimethylsulfoxid	Merck	Uvasol, 99,8 %
Dimethylsulfoxid-d ₆ , deuteriert	Fluka	puriss., >99,95 %
DMPU	Fluka	puriss., absolut
Essigsäureethylester	Riedel-de Haën	z.A.
Ethanol	Riedel-de Haën	absolut
HMPT	Fluka	purum, 97 %
Iod	Aldrich	p.a., 99,99 %
Iodogen	Pierce	-
p-Iod-D,L-phenylalanin	Bachem	-

Tab. 5.1-1 Fortsetzung: Eingesetzte Reagenzien und Solvenzien

Verbindung	Hersteller	Qualität
Kaliumhydroxid	Fluka	p.a., H ₂ O<14%
Kaliumcarbonat	Merck	p.a.
Kryptofix 2.2.2	Merck-Suchardt	99%, zur Synthese
Kupfer(I)bromid (CuBr)	Fluka	purum, 99 %
Kupfer(I)chlorid (CuCl)	Fluka	purum, 97 %
Kupfer(I)cyanid (CuCN)	Fluka	p.a. >99 %
Kupfer(I)oxid	Fluka	purum, 97 %
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	Merck	pro analysi
Magnesiumsulfat	Fluka	wasserfrei, purum, 99%
Methanol	Riedel-de Haën	für Analyse
α -Methyl-D,L-tyrosinmethylester	Fluka	-
Natrium (Metall)	Fluka	-
Natriumborhydrid	Riedel-de Haën	95%
Natriumhydrogencarbonat	Merck	pro analysi
Natriumcarbonat	Merck	pro analysi
2-Nitroimidazol (Azomycin)	Merck-Schuchardt	>99%
Natriumsulfit (Na ₂ SO ₃)	Merck	p.a.
L(+)-Weinsäure	Merck	p.a.; 99,5 %
ortho-Phosphorsäure	Merck	85%
Radioiodidlösung ([¹³¹ I]NaI)	Amersham-Buchler	IBS30
Tetrahydrofuran	Merck	p.a.
Trimethylsilyldiazomethan in Hexan	Aldrich	2 M Lösung
2,2,4,4 Tetramethylpiperidin	Merck-Schuchardt	97 %
Zitronensäure-Monohydrat	Fluka	puriss.; 99,5 %

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien direkt und ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt.

Radioiodlösung

Radioiod (IBS 30) wurde von Amersham Buchler bezogen. Das Radioiod wurde als Radioiodid in alkalischer NaOH-Lösung mit einer spezifischen Volumenradioaktivität von $3,7 \cdot 10^6$ [Bq]/ μ l angeliefert und sofort unter Inertgas gesetzt. Diese Lösung wurde direkt zur Markierung eingesetzt. Die spezifische Aktivität dieser Lösung wurde am 09.08.1993 mit 11,1 TBq/mmol (300 Ci/mmol) bestimmt.

Trocknung und Reinigung der Lösungsmittel

Die Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders angegeben, nach den Standardmethoden der Organischen Chemie getrocknet und gereinigt [245]. Abweichend von diesem Verfahren wurden alle Lösungsmittel für die Cu(I)-katalysierten Markierungsreaktionen unter Argon destilliert.

Weitere Materialien

- isotonische Kochsalzlösung

Zur Herstellung der Lösung werden 0,88g NaCl in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

Zur Charakterisierung der Vorläufer und Standardverbindungen wurden folgende Geräte bzw. Serviceabteilungen verwendet:

¹H-NMR-Spektroskopie

Bruker Typ WP-80; Signale wurden gegen TMS als internen Standard gemessen; alle Werte werden in δ [ppm] angegeben.

Infrarot-Spektroskopie

Shimadzu IR-460; die Verbindungen wurden als KBr-Preßling gemessen.

UV-Spektroskopie

Shimadzu UV 160 A. Alle Verbindungen wurden in Methanol vermessen.

Schmelzpunktbestimmung

Mettler FP 61; Proben wurden in Schmelzpunktbestimmungsröhrchen vermessen. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Elementaranalyse

Zentralabteilung für Chemische Analyse (ZCH) der KFA Jülich

Massenspektroskopie

Institut für Erdöl- und Organische Chemie (ICG4) der KFA Jülich; U. Disko

Gammacounter

Von Packard; Typ: Minaxi γ , Auto-Gamma 5000 Series

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

S. Abschnitt 5.4.1

Als Inertgas wurde Argon verwendet, das zur vollständigen Trocknung über Phosphorpentoxid geleitet wurde. Die hohe Luft- und Feuchtigkeitsempfindlichkeit der eingesetzten Kupferverbindungen, insbesondere des Cu_2SO_4 , erforderte das Arbeiten unter Inertgasatmosphäre. Daher wurden diese Verbindungen in einem Plexiglas-Handschuhkasten unter Argon in mit Septum verschließbare 2 ml Glasampullen überführt. Die mittels Bördelkappe verschlossenen Glasampullen wurden über Phosphorpentoxid und unter Ausschluß von Licht gelagert.

5.2 Synthese von Standardverbindungen und Markierungsvorläufern

5.2.1 Nitroimidazolderivate des Phenylalanins

5.2.1.1 Darstellung von I/Br-P2NI-Me

Die Synthesen der Brom- und Iodverbindung wurden in gleicher Weise durchgeführt und werden daher zusammen beschrieben.

a) p-I/Br-D,L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid [246]

400 ml Methanol

4,0133 g (13,7 mmol) p-I-Phenylalanin

bzw. 4,15 g (17 mmol) p-Br-Phenylalanin

HCl-Gas: unbestimmt, wird über Gasflasche eingeleitet.

Die Halogenaminosäure wird in das trockene Methanol gegeben und durch Einleiten von HCl-Gas aufgelöst. Man kocht das Reaktionsgemisch 15 h unter Rückfluß und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der gelbliche Rückstand wird zur Kristallisation mit absolutem Diethylether verrieben, abfiltriert und mit 10 ml Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt wird zur vollständigen Entfernung der HCl über NaOH gelagert und aus Methanol unter Zugabe von Diethylether umkristallisiert.

Brom-Verbindung (Hydrochlorid): 4,9 g (16,6 mmol) 98 %, Fp. 183,3°C

Iod-Verbindung (Hydrochlorid): 4,5 g (13,1 mmol) 95 %, Fp. 196,8°C, zer.

b) N-(2-Chloracetyl)-p-I/Br-D,L-phenylalaninmethylester [247]

50 ml trockenes Dichlormethan

1,964 g (5,73 mmol) p-I-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid

3,01 g (10,17 mmol) p-Br-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid

0,79 g (7 mol, 557 µl)/ 1,38 g (12,2 mmol) Chloracetylchlorid

1,1 g (10,3 mmol)/1,3 g (12,2 mmol) Na₂CO₃ (wasserfrei)

Das Na₂CO₃ wird fein gepulvert und mit dem Halogenphenylalaninmethylester in 100 ml trockenem CH₂Cl₂ aufgeschwemmt. Zu der weißen Suspension gibt man das Chloracetylchlorid und rührt 24 h bei Raumtemperatur. Nach dem Filtrieren wäscht man die organische Phase 1mal mit 20 ml Ammoniumacetat-Lösung und 3mal mit je 20 ml Wasser. Man trocknet über MgSO₄ und befreit im Vakuum vom Lösungsmittel. Es wird ein öliger Rückstand erhalten, den man aus Ethanol/Petrolether umkristallisiert.

Brom-Verbindung: 3,1 g (7,3 mmol) 72 %, Fp. 73,5°C. ¹H-NMR: (CDCl₃) 7,46 ppm, d, (2H); 7,02 ppm, d, (2H); 4,89, m, (1H); 4,06 ppm, s, (2H); 3,73 ppm, s, (3H); 3,12 ppm, d, (2H). UV: Maxima: 230 nm, 205 nm

Iod-Verbindung: 1,6 g (2,1 mmol) 74 %, Fp. 110,9°C. ¹H-NMR: (CDCl₃) 7,61 ppm, d, (2H); 6,85 ppm, d, (2H); 4,85, m, (1H); 4,04 ppm, s, (2H); 3,75 ppm, s, (3H); 3,1 ppm, d, (2H).

c) N-Acetyl-2-(2-nitroimidazol-1-yl)-p-I-D,L-phenylalaninmethylester (I-P2NI-Me) [223]

70 ml Acetonitril

2,23 g (6,6 mmol) N-Chloracetyl-I-D,L-Phenylalaninmethylester

1 g (6,6 mmol) Kalium-2-Nitroimidazolid (s. e)

295 mg (0,78 mmol) Kryptofix 2.2.2

Die Substanzen werden zusammengegeben, wobei man eine orangegelbe Suspension erhält. Nach 48 h

Rühren bei 70°C erhält man eine gelbe Lösung mit orangebraunem Niederschlag. Man dampft bis zur Trockne ein und nimmt den Rückstand in 100 ml Chloroform auf. Es wird filtriert und erst mit 20 ml gesättigter NH_4Cl -Lösung, dann 3mal mit 20 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase trocknet man über MgSO_4 . Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird in trockenem Ethanol umkristallisiert und die erhaltene Verbindung mit Diethylether gewaschen. Man erhält 2,14 g (5,2 mmol, 79 %) einer leicht gelblichen Verbindung. Nach einer Säulenchromatographie (Si-60, Essigsäureethylester) erhält man eine weiße Verbindung, die in Ethanol umkristallisiert wird. 1,5 g (3,27 mmol) 49 %, **Fp.** 178°C, zer. **$^1\text{H-NMR}$: (d6-DMSO)** 8,88 ppm, d, (1H); 7,7 ppm, s, (1H); 7,58 ppm, s, (2H); 7,15 ppm, d, (1H); 7,08, 6,95 ppm, (2H); 5,15 ppm, s, (2H); 4,55 ppm, m, (1H); 3,65 ppm, s, (3H); 3,05-2,75 ppm, m, (2H). **IR(KBr)** NH-Banden: 3300, 1529 cm^{-1} , C=O-Banden: 1736, 1657 cm^{-1} , NO_2 -Banden: 1481, 1398 cm^{-1} **UV: Maxima:** 232 nm, 313 nm. **Massenspektrum (70 eV, EI):** M^+ = 458, M^+ -70, M^+ -193, M^+ -241, M^+ -169. **$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{I}$: ber./gef.** C: 39,32/39,9; H: 3,30/4,0; N: 12,23/12,4; I: 27,70/29; O: 17,64/17,6

d) N-Acetyl-2-(2-nitroimidazol-1-yl)-p-Br-D,L-phenylalaninmethylester (Br-P2NI-Me)

70 ml Acetonitril

2,27 g (6,76 mmol) N-Chloracetyl-p-Br-Phenylalaninmethylester

1 g (6,6 mmol) Kalium-2-Nitroimidazolid

1,5 g (4 mmol) Kryptofix 2,2,2

Die Reaktion wird wie bei der entsprechenden Iodverbindung durchgeführt. 1,5 g (3,64 mmol) 54 %. **Fp:** 175,9°C zer. **$^1\text{H-NMR}$: (d6-DMSO)** 8,84 ppm, d, (1H); 7,63-7,0 ppm, m, (6H); 5,11 ppm, s, (2H); 4,53 ppm, m, (1H); 3,63 ppm, s, (3H); 3,13-2,85 ppm, m, (2H). **IR(KBr)** NH-Banden: 3300, 1532 cm^{-1} , C=O-Banden: 1740, 1662 cm^{-1} , NO_2 -Banden: 1483, 1374 cm^{-1} , **UV: Maxima:** 218 nm, 313 nm. **Massenspektrum (70 eV, EI):** M^+ = 411, M^+ -170, M^+ -202, M^+ -242. **$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{Br}$: ber./gef.** C: 43,81/43,85; H: 3,68/4,1; N: 13,62/14,01; Br: 19,43/19,9; O: 19,45/19,75

e) Kalium-2-nitroimidazolid

2-Nitroimidazol 1,015 g (8,98 mmol)

89,2 ml 0,1007 M KOH (8,98 mmol)

Das 2-Nitroimidazol wird in Wasser aufgeschwemmt und mit der KOH-Lösung versetzt, wobei eine tiefe Gelbfärbung auftritt. Nach 2 h Rühren bei 80°C wird das Wasser eingeeengt und heiß vom festen Rückstand filtriert. Man wäscht mit heißem Wasser und dampft das Filtrat zur Trockne ein. Der orange-gelbe Feststoff wird 12 h bei 100°C über CaCl_2 im Vakuum getrocknet. 1,2 g (8 mmol) 90%.

5.2.1.2 Darstellung von I-P2NI-S

I-P2NI-Me: 100 mg (0,218 mmol)

0,01 N NaOH Lösung: 10 ml

Das I-P2NI-Me wird in 4 ml CH_3CN aufgelöst. Zu dieser Lösung gibt man unter Rühren bei Raumtemperatur die Natronlauge. Nach 30 min Rühren wird mit 10 ml Wasser verdünnt und die Lösung 3mal mit je 3 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird mit 0,1 N Salzsäure angesäuert und der weiße Niederschlag abfiltriert. Man wäscht den Rückstand mit wenig kaltem Wasser und trocknet im Exsikkator über P_4O_{10} . Es werden 78 mg (80%) einer leicht gelblichen Verbindung erhalten. **Fp.** 185,3°C, zers. **$^1\text{H-NMR}$: (d6-DMSO)**

8,68 ppm, d, (1H); 7,68 ppm, d, (1H); 7,58 ppm, s, (2H); 7,13 ppm, d, (1H); 7,08, 6,98 ppm (2H); 5,13 ppm, s, (2H); 4,63-4,25 ppm, m, (1H); 2,98 ppm, m, (2H). **IR(KBr)** NH-Bande: 3300, 1543 cm^{-1} , C=O-Banden: 1711, 1661 cm^{-1} , NO_2 -Banden: 1508, 1395 cm^{-1} .

5.2.1.3 Darstellung von Br/I-P2NI-Ba

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-brom-D,L-phenylalaninbutylamid [248].

Br-P2NI-Ba: 320 mg (0,779 mmol)

Butylamin: 1 ml (10 mmol)

Das eingesetzte Butylamin wird zuvor über KOH destilliert. Man löst das Br-P2NI-Me in 3 ml CH_2Cl_2 unter leichtem Erwärmen auf und tropft unter Rühren eine Lösung des Butylamins im 5 ml CH_2Cl_2 hinzu. Die Lösung wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit Eisessig neutralisiert und 2mal mit 2 ml Wasser gewaschen. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Beide Rückstände werden vereinigt und durch eine nachfolgende Säulenchromatographie auf Si-60 (Essigsäureethylester/Hexan 9:1) gereinigt. Die erhaltene Verbindung wird in Ethanol umkristallisiert. Man erhält 200 mg (56 %) Verbindung. **Fp.** 218 °C, zer. **IR(KBr)** NH-Banden: 3275, 1561 cm^{-1} , C=O-Banden: 1642, 1669 cm^{-1} , NO_2 -Banden: 1489, 1365 cm^{-1} , **Massenspektrum (70 eV, EI)**: M^+ = 451, M^+ -30, M^+ -46, M^+ -98, M^+ -145, M^+ -168, M^+ -210, M^+ -212. **C,H,N,Br**: ber./gef. C: 47,8/47,3; H: 4,9/5,3; N: 15,48/15,7; Br: 17,67/16,5

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-iod-D,L-phenylalaninbutylamid

Die Iod-Standardverbindung wird analog zur oben beschriebenen Synthese des Brom-Vorläufers erhalten. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des I-P2NI-Ba wird im Dunkeln gearbeitet. Nach der Chromatographie wird in Acetonitril umkristallisiert. Ausbeute: 45 %. **Fp.** 195°C, zer. **$^1\text{H-NMR}$: (d₆-DMSO)** 8,63 ppm, s, (1H); 7,88 ppm, s, (1H); 7,65 ppm, d, (1H); 7,55 ppm, s, (2H); 7,15 ppm, d, (1H); 7,05, 6,95 ppm, (2H); 5,1 ppm, s, (2H); 4,5 ppm, m, (4H); 3,05-2,75 ppm, m, (2H); 1,5-0,63 ppm, m, (9H) **IR(KBr)** NH-Banden: 3280, 1555 cm^{-1} , C=O-Banden: 1642, 1667 cm^{-1} , NO_2 -Banden: 1484, 1362 cm^{-1} . **C,H,N,I**: ber./gef. C: 43,3/43,0; H: 4,44/4,6; N: 14,03/14,3; I: 25,42/23,2 **Massenspektrum (70 eV, EI)**: M^+ = 498,9, M^+ -47, M^+ -100, M^+ -147, M^+ -169, M^+ -212.

5.2.2 Darstellung und Reinigung der Kupferkatalysatoren

Reinigung von CuCl [249]

5 g grünes käufliches CuCl werden zusammen mit 2 g Na_2SO_3 gemörsert und zu 500 ml verdünnter Salzsäure (500 ml Wasser + 1 ml konz. Salzsäure) gegeben. Es wird bei Raumtemperatur 20 min kräftig gerührt. Man läßt absitzen und dekantiert die klare türkisfarbene Lösung. Der graue Niederschlag wird mit 200 ml verdünnter Schwefelsäure (5 ml H_2SO_4 auf 200 ml Wasser) in eine Fritte gespült und gewaschen. Dann wäscht man 4mal mit je 10 ml Eisessig, 3mal mit je 10 ml absolutem Ethanol und schließlich mit 50 ml Diethylether. Das weiße Pulver wird im Exsikkator unter Vakuum und über P_4O_{10} getrocknet und unter Argon gelagert. Es werden 4,2 g (84 %) erhalten.

Reinigung von CuBr

CuBr wird analog dem CuCl gereinigt. Anstelle von Salzsäure wird Bromwasserstoffsäure eingesetzt.

Darstellung von Cu_2SO_4 [234]

2,45 g (17,12 mmol) Cu_2O

20 ml (211,3 mmol) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ (frisch destilliert).

Man gibt die Substanzen zusammen und rührt die rote Suspension bei 160°C , bis keine weitere Gasentwicklung mehr zu erkennen ist. Nach 3 h hat sich die rötliche Suspension grau-weiß verfärbt. Man läßt erkalten, filtriert und wäscht den Rückstand mit 100 ml trockenem Diethylether. Die grau-weiße Substanz wird im Vakuum getrocknet und unter Ar gelagert. Man erhält 3,75 g (98%) der Verbindung. Diese wird ohne weitere Reinigung zur Radiomarkierung eingesetzt.

Darstellung von Cu-DHB bzw. Cu-DHT

(DHB= 2,5-Dihydroxybenzoesäure, DHT= 2,5-Dihydroxyterephthalsäure)

1g (6,5 mmol DHB, 5 mmol DHT) DHB bzw. DHT

1g (4,5 mmol) Cu_2SO_4

10 ml CH_3CN

Zu der Lösung des Chinons in CH_3CN wird unter Rühren das Cu_2SO_4 gegeben. Es wird 90 min bei 80°C unter Argon gerührt, bis eine tiefgrüne Lösung entstanden ist. Man läßt erkalten, filtriert vom festen Rückstand und fällt das Produkt durch Zugabe von 10 ml Diethylether aus. Der hellgrüne Niederschlag wird mit Diethylether gewaschen und im Exsikkator im Vakuum getrocknet.

Die so erhaltenen Verbindungen werden unter Argon gelagert und direkt zur Radiomarkierung eingesetzt. Eine weitere Charakterisierung wurde nicht vorgenommen.

5.2.3 Darstellung der Tyrosinderivate

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]- α -methyl-D,L-tyrosinmethylester (MT2NI), Vorläufer

a) O, N-Di-(chloracetyl)- α -methyl-L-tyrosinmethylester

2 g (8,14 mmol) α -Methyl-D,L-tyrosinmethylester-Hydrochlorid

2,5 g (22,1 mmol) Chloressigsäurechlorid

3,5 g (33 mmol) Natriumcarbonat

Das Tyrosinderivat wird zusammen mit dem Natriumcarbonat in 60 ml trockenem Dichlormethan suspendiert. Unter Rühren wird das Chloressigsäurechlorid in 10 ml Dichlormethan zugetropft. Dann wird bei Raumtemperatur 48 h gerührt. Man filtriert vom festen Rückstand und wäscht die Dichlormethanphase erst 2mal mit je 20 ml gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung, dann 2mal mit je 10 ml Wasser. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Diethylether umkristallisiert. Man erhält 1,8 g (61%) der Substanz. Fp. $138,7^\circ\text{C}$.

$^1\text{H-NMR}$: (d_6 -DMSO) 8,4 ppm, s, (1H); 7,13 ppm, s, (4H); (4H); 4,68 ppm, s, (2H); 4,1 ppm, s, (2H); 3,63 ppm, s, (3H); 3,48-2,88 ppm, q, (2H); 1,25 ppm, s, (3H);

b) MT2NI

1 g (2,8 mmol) O, N-Di-(chloracetyl)- α -methyl-D,L-tyrosinmethylester

890 mg (5,9 mmol) Kaliumimidazolid

650 mg (1,72 mmol) Kryptofix (2.2.2)

Das Diacetyltyrosinderivat wird in 60 ml Acetonitril aufgelöst. Nun gibt man das Kaliumimidazolid und das Kryptofix hinzu und rührt das Reaktionsgemisch 7 Tage bei 50 °C. Es wird filtriert und das Acetonitril abgedampft. Dann versetzt man mit 50 ml Essigsäureethylester und wäscht 2mal mit je 10 ml Pufferlösung (pH= 9), dann 3mal mit je 10 ml Wasser. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird durch eine Säulenchromatographie gereinigt (Si-60, 1 Diethylether, 2. Diethylether/Ethanol 8:2) und in Ethanol umkristallisiert. Man erhält 410 mg (40 %) der sauberen Verbindung. **Fp.** 106 °C, zer. **¹H-NMR: (d6-DMSO)** 8,4 ppm, s, (1H); 7,13 ppm, s, (4H); (4H); 4,68 ppm, s, (2H); 4,1 ppm, s, (2H); 3,63 ppm, s, (3H); 3,48-2,88 ppm, q, (2H); 1,25 ppm, s, (3H); **C,H,N:** ber./gef. C: 53,04/52,9; H: 5,01/5,2; N: 15,46/15,9. **UV:** Maxima: 225 nm, 314 nm, 303 nm. **IR (KBr)** NH-Banden: 3290,1610 cm⁻¹, C=O-Banden: 1740, 1689 cm⁻¹, NO₂-Banden: 1512, 1369 cm⁻¹, **Massenspektrum** (70 eV, EI): M⁺= 362,1, M⁺-17, M⁺-59, M⁺-106, M⁺-123, M⁺-170, M⁺-255.

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-iod- α -methyl-D,L-tyrosinmethylester(I-MT2NI), Standardverbindung [250]

180 mg (0,5 mmol) MT2NI

2050 μ l (0,513 mmol) methanolische Iodlösung (0,25 M)

20 ml wäßrige Ammoniaklösung (33 %ig)

Das MT2NI wird in der Ammoniaklösung aufgelöst. Dann tropft man langsam unter starkem Rühren bei Raumtemperatur die Iodlösung hinzu. Nach dem Zutropfen wird 30 min gerührt. Dann dampft man die Lösung im Vakuum ein, wobei sich ein gelber Niederschlag bildet. Dieser wird 2mal mit je 5 ml Puffer (pH= 4), dann mit Wasser gewaschen. Der Niederschlag wird in Wasser umkristallisiert und mit einer präparativen HPLC aufgetrennt. (Säule: Cosmosil 5NPE 150 x 20 mm; Eluens: CH₃CN/H₂O 40:60; Volumendurchfluß: 9 ml/min; k'= 6,53 min). Das aufgefangene Eluat wird im Vakuum entfernt. Man erhält nach dem Trocknen 169 mg (70 %). **Fp.** 120°C. **¹H-NMR: (d6-DMSO)** 8,55 ppm, s, (1H); 7,63 ppm, d, (1H); 7,43 ppm, d, (1H), 7,2 ppm, d, (1H); 7,0-6,7 ppm, m, (2H); 5,1 ppm, s, (2H); 3,53 ppm, s, (3H); 2,95 ppm, d, (2H); 1,23 ppm, s, (3H); **UV:** Maxima: 225 nm, 314 nm, 303 nm. **UV:** Maxima: 207 nm, 314 nm, Schulter: 230 nm. **Massenspektrum** (70 eV, EI): M⁺= 487,9, M⁺-17, M⁺-59, M⁺-170, M⁺-255.

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-I- α -methyl-O-methyl-D,L-tyrosinmethylester (I-MMT2NI), Standardverbindung [240]

84,3 mg (172 μ mol) I-MT2NI

140 μ l (280 μ mol) Trimethylsilyldiazomethan in Hexan (2 M)

60 μ l (426 μ mol) Diisopropylamin

5 ml CH₃CN/MeOH 8:2 (v/v)

Das I-MT2NI wird unter Argon im getrockneten Lösungsmittel gelöst. Man gibt unter Rühren bei Raumtemperatur erst das Diisopropylamin und dann das Trimethylsilyldiazomethan hinzu. Dann wird 3 Tage bei Raumtemperatur bis zur Entfärbung der gelben Reaktionslösung gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 50 μ l Eisessig versetzt. Man befreit vom Lösungsmittel und nimmt den Rückstand in 10 ml

Essigsäureethylester auf. Es wird mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel entfernt. Man nimmt die Verbindung in Ethanol auf und reinigt durch HPLC (Säule: Cosmosil 5NPE 150 x 20 mm; Eluens: CH₃CN/H₂O 40:60; Volumendurchfluß: 9 ml/min; k' = 12,6 min). Das aufgefangene Eluat wird eingedampft und der Rückstand in Ethanol umkristallisiert. Man erhält 54 mg (61 %) der Verbindung. ¹H-NMR: (d6-DMSO) 8,6 ppm, s, (1H); 7,6 ppm, d, (1H); 7,53 ppm, d, (1H), 7,15 ppm, d, (1H); 7,1-6,75 ppm, m, (2H); 5,13 ppm, s, (2H); 3,83 ppm, s, (3H); 3,53 ppm, s, (3H); 3,0 ppm, d, (2H); 1,25 ppm, s, (3H); Massenspektrum (70 eV, EI): M⁺ = 502, M⁺-18, M⁺-60, M⁺-170, M⁺-225, M⁺-255

5.3 Radiosynthesen

Alle Radiosynthesen wurden in durch Isogewinde (GL14) verschließbaren Quarzglasgefäßen durchgeführt, die mit einem teflonbeschichteten Magnetrührstäbchen versehen werden konnten. Die Gefäße hatten einen Innendurchmesser von 11 mm und eine Höhe von 60 bzw. 30 mm. Als Verschuß wurden Silikon- oder teflonbeschichtete Septen verwendet. Die Reaktionstemperatur wurde durch ein Kontaktthermometer gesteuertes Ölbad eingestellt. Als Inertgas wurde Argon verwendet, das über eine Kanüle zugeführt werden konnte. Die Proben wurden über das Septum durch eine Hamiltonspritze entnommen und mittels Radio-HPLC bzw. Radiodünnschichtchromatographie untersucht.

5.3.1 Radiosynthesen mit Cu(I)-Verbindungen als Katalysator

Die hier eingesetzten Lösungsmittel wurden zuvor nach den üblichen Verfahren getrocknet und unter Argonatmosphäre destilliert und aufbewahrt. Die Reaktion wurde unter Inertgasbedingungen durchgeführt. Dazu wurde das Reaktionsgefäß vor Reaktionsbeginn mit dem Vorläufer beschickt und 5 min mit Argon durchspült. Dann wurden der unter Inertgas im Reaktionsmedium gelöste Katalysator, die im Reaktionsmedium gelösten Zusätze und die wäßrige Radioiodidlösung durch eine Hamiltonspritze nacheinander zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend in das auf Reaktionstemperatur erhitzte Ölbad gebracht. Zur Bestimmung der RCA wurden 20 µl Proben entnommen, mit 100 µl einer Quenchlösung (CH₃CN:H₂O 1:1 (v/v), Na₂SO₃: 0,1 M, Titriplex VII: 0,1 M) verdünnt und mittels HPLC analysiert. Üblicherweise wurde mit folgenden Mengen gearbeitet:

¹³¹I- Radioiodidlösung: 1-10 µl (30-100 MBq)

Brom-Vorläufer: 2-4 mg

Kupfer-Katalysator: 50-100 µg

Lösungsmittelvolumen: 200 - 300 µl

5.3.2 Radiosynthese von ¹³¹I-P2NI-Me

Markierungssynthese

Die Markierung von Br-P2NI-Me erfolgte bei 140°C mit dem Cu₂SO₄/DMSO-System mit Zitronensäure oder Dihydroxyterephthalsäure als Zusatz. Hier wurde ansonsten wie unter 5.3.1 beschrieben verfahren. Während der Reaktion wurden 20 µl Proben entnommen, in 100 µl Quenchlösung eingebracht und mittels HPLC analysiert.

HPLC Analysebedingungen:

Säule: S1; Eluens: Methanol/Wasser 60:40; Volumendurchfluß: 1 ml/min; $k' = 5,1$

Aufarbeitung zur applikationsfertigen Lösung

Die wie oben angesetzte Reaktion läßt man 3 h bei 140°C rühren. Nach dem Abkühlen wird mit 4 ml Wasser versetzt und das Reaktionsgemisch über eine Sep-Pack-Kartusche (100 mg RP-18) gegeben. Die Kartusche wird mit 20 ml Wasser gewaschen und anschließend durch einen leichten Luftstrom trocken geblasen. Man eluiert mit 2 ml Acetonitril, engt bei 50°C im Argonstrom auf 100 µl ein und gibt die Lösung zur Abtrennung des Vorläufers auf die HPLC. Zur vollständigen Abtrennung des Vorläufers sind zwei Reinigungsschritte erforderlich, bei denen unterschiedliche Trennsysteme eingesetzt werden. Die aus der HPLC-Trennung aufgefangene Fraktion des Radioproduktes wird zur Abtrennung des Eluens mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und nochmals über eine Sep-Pack-Kartusche gegeben. Das Radioprodukt wird nach obigem Verfahren eluiert und zur 2. Trennung auf die HPLC gegeben. Die aufgefangene Produktlösung wird wieder über eine Sep-Pack-Kartusche aufkonzentriert. Die erhaltene Radioproduktlösung wird wie oben eingengt und in 1-2 ml 5 %iger ethanolischer isotonischer NaCl-Lösung aufgenommen. Nach der Sterilfiltration wird die so erhaltene applikationsfertige Lösung direkt für die Tierversuche eingesetzt.

HPLC Trennbedingungen der Aufarbeitung

A: Säule S2 (s. 5.4); Eluens: MeOH/H₂O 55:45; Volumendurchfluß: 1,4 ml/min, $k' = 12,8$

B: Säule S3 (s. 5.4); Eluens: CH₃CN/H₂O 40: 60; Volumendurchfluß: 1,4 ml/min, $k' = 12,1$

5.3.3 Radiosynthese von ¹³¹I-P2NI-S

Die unter 5.3.2 erhaltene Acetonitril-Radiolösung des ¹³¹I-P2NI-Me wird im Argonstrom bei 50°C eingedampft. Man versetzt mit 200 µl 10⁻³ N Natronlauge und engt die Lösung bei 50°C im Argonstrom auf die Hälfte ein. Das Reaktionsgemisch wird nach 5 min mit 10 µl Essigsäure (98 %) angesäuert und zur Reinigung direkt auf die HPLC gegeben. Die aufgefangene ¹³¹I-P2NI-S Fraktion wird mit der gleichen Menge an Wasser verdünnt und das Radioprodukt auf einer Sep-Pack Kartusche (RP-18, 100 mg) fixiert. Man wäscht mit 5 ml Wasser und eluiert mit 3 ml Ethanol. Die Lösung wird bei 50°C im Argonstrom entfernt und mit 5 %iger ethanolischer isotonischer Kochsalzlösung versetzt.

HPLC Trennbedingungen:

A: Säule S3 (s. 5.4); Eluens: MeOH/H₂O 60:40 pH 4,5; Volumendurchfluß: 1,4 ml/min, $k' = 2,4$

5.3.4 Radiosynthese von ¹³¹I-P2NI-Ba

Die Radiosynthese von ¹³¹I-P2NI-Ba wird in gleicher Weise wie die des ¹³¹I-P2NI-Me nach Abschnitt 5.3.1 durchgeführt. Zur Markierung wird das Cu₂SO₄/DMSO/ZS-System verwendet. Die Markierung wird bei 140°C und einer Reaktionszeit von 240 min durchgeführt. Mit Eduktkonzentrationen von 50 mM können RCA von 85-90 % erzielt werden.

Zur Analyse während der Reaktion werden mit einer Hamiltonspritze 20 µl Proben entnommen und in 100 µl einer Quenchlösung (s. o.) gebracht. Die Lösung wird auf dem HPLC-System untersucht. Radio-DC-Untersuchungen werden direkt mit der Reaktionslösung durchgeführt.

HPLC Trennbedingungen der Analyse:

Säule S1 (s. 5.4); Eluens: CH₃CN/H₂O 50:50; Volumendurchfluß: 1 ml/min, $k' = 4,2$

Aufarbeitung zur applikationsfertigen Lösung

Die Aufarbeitung der Reaktionslösung zur Abtrennung des ^{131}I -P2NI-Ba erfolgt nach dem gleichen Schema wie die des Radiomethylesters. Zur vollständigen Abtrennung des Vorläufers sind auch hier zwei Radio-HPLC-Reinigungsschritte erforderlich. Zur Applikation wird nach dem Eindampfen des CH_3CN -Kartuscheneluates in Ethanol aufgenommen und mit isotonischer Kochsalzlösung auf eine 7 %ige Lösung verdünnt.

HPLC Trennbedingungen der Aufarbeitung:

A: Säule S2 (s. 5.4): Eluens: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 40:60; Volumendurchfluß: 1,4 ml/min, $k' = 13,7$

B: Säule S3 (s. 5.4): Eluens: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 30: 70; Volumendurchfluß: 1,4 ml/min, $k' = 12,6$

5.3.5 Radiosynthese von ^{131}I -MT2NI

In ein mit Septum verschließbares Reaktionsgefäß mit Magnetrührstäbchen werden 60 µl Pufferlösung (pH 4), 10 µl einer wäßrigen frisch angesetzten Chloramin-B Lösung (0,2 g/l) und 25 µl einer ethanolischen MT2NI-Vorläufer-Lösung (2 mM) gegeben. Nun werden 5 - 20 µl der Radioiodidlösung zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Zur Untersuchung der Reaktion werden zu entsprechenden Zeiten 20 µl aus dem Reaktionsgemisch entnommen und in 100 µl einer Quenchlösung (0,5 M Na_2SO_3 Puffer, pH 9) gegeben. Diese Lösung wird direkt zur Analyse auf die HPLC gegeben.

Zur präparativen Synthese wird das Reaktionsgemisch mit 200 µl der Quenchlösung versetzt und auf die HPLC gegeben. Das Radioprodukt wird mittels einer Sep-Pack-Kartusche (RP-18, 100 mg) aus dem aufgefangenen HPLC-Eluat abgetrennt und mit 3 ml Ethanol eluiert. Die Lösung wird bei 50°C im Argonstrom eingedampft. Man nimmt zur Präparation der applikationsfertigen Lösung in 50 µl Ethanol auf und verdünnt mit 1 ml isotonischer Kochsalzlösung.

Analytische HPLC-Bedingungen:

Säule S1 (s. 5.4); Eluens: MeOH/Puffer pH 7 55:45, Volumendurchfluß: 1,2 ml/min; $k' = 3,2$

Präparative HPLC-Bedingungen:

Säule S3 (s. 5.4), Eluens: CH_3CN /Puffer pH 7: 30:70; Volumendurchfluß: 1,4 ml/min; $k' = 8,2$

5.3.6 Radiosynthese von ^{131}I -MMT2NI

Das unter 5.3.5 erhaltene ^{131}I -MT2NI wird nach dem Radio-HPLC-Trennschritt mittels einer Sep-Pack-Kartusche (RP-18, 100 mg) aufkonzentriert. Man eluiert mit 2 ml trockenem Methanol und engt die Lösung in einem verschließbaren Reaktionsgefäß auf 200 - 300 µl ein. Das Reaktionsgefäß wird mit einem Septum verschlossen und zu der Lösung werden 100 - 150 µl der 2 M Trimethylsilyldiazomethanlösung gegeben. Dann gibt man unter Rühren 30 - 35 µl Diisopropylamin hinzu und rührt bei Raumtemperatur. Bei der Analyse der Reaktion werden 20 µl Proben entnommen und in 100 µl 50 %ige Essigsäure gegeben. Diese Lösung wird dann mittels der HPLC untersucht.

Im Fall der Radiosynthese zur Abtrennung des ^{131}I -MMT2NI wird das Reaktionsgemisch nach 20 min Rühren bei Raumtemperatur mit 200 µl 50 %iger Essigsäure versetzt. Die so erhaltene Lösung wird zur Trennung auf die HPLC gegeben und das Radioprodukt aufgefangen. Dann wird mittels einer Sep-Pack-Kartusche aufkonzentriert (s. o.). Als Eluens wird Ethanol verwendet. Man engt das Eluat bei 50°C im Argonstrom ein und verdünnt mit isotonischer Kochsalzlösung auf eine 5 %ige ethanolische Lösung. In Bezug auf der

eingesetzten Radioaktivität des ^{131}I -MT2NI wird eine RCA von 85-90 % und in Bezug auf der eingesetzten Radioiodid-Aktivität wird über alle Schritte eine RCA von 65-75 % erhalten. Die radiochemische Reinheit ist größer als 99,9 %.

Analytische und präparative HPLC-Bedingungen:

Säule S1 (s. 5.4); Eluens: MeOH/Puffer pH 6, 60:40, Volumendurchfluß: 1 ml/min; $k' = 5,2$

5.4 Analytische Verfahren

5.4.1 Radio-HPLC und Produktidentifizierung

Die Reaktionsgemische wurden mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) analysiert und aufgetrennt. Die Identifizierung der n.c.a. markierten Verbindungen wurde durch den Vergleich der Retentionszeiten des radioaktiven Peaks und des UV-Peaks des inaktiven Standards auf zwei verschiedenen Trennsystemen erreicht. Die HPLC-Anlage bestand aus einer Merck-Hitachi HPLC Pumpe L-6000, einem Merck-Hitachi UV-Detektor L-4000 mit variabler Wellenlänge und einem NaI(Tl)-Bohrlochkristalldetektor (EG&G Ortec) mit entsprechendem Photomultiplier (EG&G Ortec, Model 276 Photomultiplier Base) und Verstärker (EG&G ACE MateTM Model 925-Scint Amplifier and Bias Supply). Sowohl die Probenaufgabe der aufzutrennenden Probe als auch der Vergleichsprobe (Aliquot) erfolgten über je ein Injektionsventil (Rheodyne, Typ 7125) mit einer 500 µl Probenschleife. Die Meßdaten der Detektoren wurden durch das Meßwerterfassungs- und Auswerteprogramm Nina, Version 1.3 der Firma Nuclear Interface, gespeichert und analysiert. Zur Analyse wurde ein Computer der Firma Roda Soft (486, 33 MHz, 4 MB Ram, 14" Targa-Monitor) verwendet. Alle Messungen wurden bei einer Detektionswellenlänge von 230 nm des UV-Detektors durchgeführt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte kontinuierlich durch den nachgeschalteten Strahlendetektor.

Alle Messungen wurden bei konstanter Volumendurchflußgeschwindigkeit und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Da in der Literatur keine Angaben über die chromatographische Trennung gefunden werden konnten, wurden für alle Verbindungen sowohl für die Analyse als auch für die präparative Abtrennung entsprechende HPLC-Bedingungen erarbeitet. Die zur Trennung verwendeten Säulen sind in Tab. 5.4-1 zusammengestellt.

Tab. 5.4-1 Zusammenstellung der zur Radio-HPLC-Trennung verwendeten Säulen

Nr.	¹⁾ Größe [mm]	Material	²⁾ Flow [ml/min]	Hersteller
S1	250 x 4	Lichrosorb RP18-7	1	CS-Chromatographieservice, Düren
S2	300 x 4,6	Lichrosorb RP18-7	1,4	CS-Chromatographieservice, Düren
S3	150 x 4,6	Cosmosil 5 NPE	1,4	Waters

1) Größenangaben: Länge x Innendurchmesser; 2) gebräuchliche Einstellung

Zur Trennung der Verbindungen wurden Acetonitril/Wasser- bzw. Methanol/Wasser-Gemische als Eluens verwendet. Als Puffer wurde entweder Phosphat- oder Acetatpuffer eingesetzt. Bei allen Trennsystemen lag die Retentionszeit des Radioiodids im Bereich von $k' = 0,3-0,6$.

In Tab. 5.4-2 sind die relevanten k' -Werte der Verbindungen mit den entsprechenden Trennbedingungen zusammengefaßt. Hier wird zwischen der analytischen und der semipräparativen Auftrennung bei der

Aufarbeitung der Produkte unterschieden.

Tab. 5.4-2 k'-Werte und Radio-HPLC-Trennbedingungen der Vorläufer und Radioiodverbindungen

Anwendung	Verbindung	Säule	Eluens (v/v)	Flow ¹⁾	k'
analytisch	¹³¹ I-P2NI-Me	S1	MeOH/H ₂ O 60:40	1	4,3
	Br-P2NI-Me				3,8
	[¹³¹ I]Iodid				0,5
semipräparativ	¹³¹ I-P2NI-Me	S2	MeOH/H ₂ O 55:45	1,4	12,8
	Br-P2NI-Me				9,6
	¹³¹ I-P2NI-Me	S3	CH ₃ CN/H ₂ O 40:60	1,4	12,1
	Br-P2NI-Me				7,8
analytisch	¹³¹ I-P2NI-Ba	S1	CH ₃ CN/H ₂ O 50:50	1	4,2
	Br-P2NI-Ba				3,6
semipräparativ	¹³¹ I-P2NI-Ba	S2	CH ₃ CN/H ₂ O 40:60	1,4	13,7
	Br-P2NI-Ba				11,2
	¹³¹ I-P2NI-Ba	S3	CH ₃ CN/H ₂ O 30:70	1,4	12,6
	Br-P2NI-Ba				8,4
analytisch	¹³¹ I-P2NI-S	S3	MeOH/Puffer pH 4,5 60:40	1,4	2,4
	¹³¹ I-P2NI-Me				8,0
analytisch	¹³¹ I-MT2NI	S1	MeOH/Puffer pH 7 55:45	1,2	3,2
	MT2NI				1,7
semipräparativ	¹³¹ I-MT2NI	S3	CH ₃ CN/Puffer pH 7 30:70	1,4	8,2
	MT2NI				2,9
analytisch	¹³¹ I-MMT2NI	S1	MeOH/Puffer pH 6 60:40	1	5,2
	¹³¹ I-MT2NI				2,1

1) Volumendurchflußgeschwindigkeit in [ml/min]

5.4.2 Blut- und Urinuntersuchungen

Untersuchung der Blutproben

Die Blutproben werden zur Unterdrückung der Gerinnung mit 20 % einer 3 %igen Natriumcitratlösung versetzt. Dann wird die entsprechende Standardverbindung zugegeben und das Blut mit dem Zusatz von organischem Lösungsmittel zur Gerinnung gebracht. Die Proben werden zentrifugiert und der Überstand entnommen. Der Rückstand wird ein zweites Mal eluiert. Die vereinigten Eluate werden filtriert. Man engt die erhaltene Lösung am Rotationsverdampfer ein, filtriert über einen Sterilfilter und gibt die Lösung zur Analyse auf die Radio-HPLC. Das HPLC-Eluat wird fraktioniert gesammelt und am Gammacounter ausgemessen.

Untersuchung der Urinproben

Die Aufarbeitung des Urins erfolgt in gleicher Weise wie beim Blut. Hier wird allerdings ohne Citratlösung gearbeitet.

Zur Extraktion der Blut- und Urinproben wird je nach Verbindung Methanol bzw. Acetonitril verwendet. Die

Analyse- und Extraktionsbedingungen sind in Tab. 5.4-3 zusammengefaßt. Mit dem Extraktionsverfahren können durch 2 Extraktionen je nach Verbindung 75-90 % der Gesamtradioaktivität des Blutes extrahiert werden.

Tab. 5.4-3 Extraktions- und Analysebedingungen der untersuchten Radiotracer

	Extraktionsmittel	Extraktion ¹⁾	HPLC
¹³¹ I-P2NI-Me	MeOH	75 %	AC/W 40:60 pH 5
¹³¹ I-P2NI-Ba	CH ₃ CN	90 %	AC/W 50:50 pH 5
¹³¹ I-MT2NI	CH ₃ CN	78 %	AC/W 35:65 pH 5
¹³¹ I-MMT2NI	MeOH	86 %	AC/W 40:60 pH 5

1) nach zweimaliger Extraktion

5.4.3 Radiodünnschichtchromatographie

Dieses Verfahren wurde zum einen zur groben Bestimmung von organisch gebundenem Iod in Vorversuchen und zum anderen zur Bestimmung der RCA eingesetzt. RCA wurden nur dann mit DC bestimmt, wenn aufgrund der Radio-HPLC Untersuchung des Markierungssystems das Auftreten von Radionebenprodukten ausgeschlossen werden konnte. Folglich ging es bei den Radio-DC Messungen in erster Linie um die Abtrennung der anorganischen Radioiodidaktivität. Die Bestimmungen der RCA mittels Radio-HPLC und Radio-DC lagen bei den verwendeten Systemen in zufriedenstellender Übereinstimmung.

Für die Messung werden etwa 1-2 µl des Reaktionsgemisches auf eine Silicagelplatte Si-60 (Merck) aufgetragen und die DC-Platte anschließend in Essigsäureethylester/Hexan 9:1 (v/v) entwickelt. Die DC-Platte wird zur Fixierung der Radioaktivität mit einer selbstklebenden Folie beklebt und entsprechend den Rf-Werten der inaktiven Referenzsubstanzen in mehrere Teile zerschnitten. Die Radioaktivität der Teile wird am Gamma-counter bestimmt, um daraus die RCA zu berechnen. Zur Bestimmung des Aliquots wird sowohl die Gesamtaktivität der DC-Platte ermittelt, als auch eine entsprechende Volumenmenge der Reaktionslösung ausgemessen. Unter der eingesetzten Trennbedingung bleibt die anorganische Radioiodidaktivität weitestgehend am Startpunkt. Für die Phenylalanin-2-Nitroimidazolderivate unterscheiden sich die Rf-Werte der Iod- und Brom-Verbindungen kaum voneinander, so daß der Spot der im UV sichtbaren Bromverbindung als Kontrolle der jeweiligen Messung und als Richtwert für den Produktbereich angenommen werden kann. In Tab. 5.4-4 sind die Rf-Werte der Verbindungen aufgeführt.

Tab. 5.4-4 Rf-Werte der Verbindungen unter der eingesetzten Trennbedingung

Verbindung	Rf-Wert	Trennbedingungen:
Br-P2NI-Ba	0,4	Si-60 DC-Platten Laufmittel: Essigsäureethylester/Hexan 9:1 (v/v)
I-P2NI-Ba	0,42	
Iodid	0-0,1	
I-MT2NI	0,5	
MT2NI	0,4	

5.4.4 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Radioprodukte

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurde die Masse an Verbindung in der Radiolösung (Träger) und die absolute Aktivität der Lösung bestimmt. Aus beiden Werten konnte dann die spezifische Aktivität berechnet werden (Abschnitt 1.5).

Die Menge an isotopelem und nicht-isotopelem Träger wird durch die HPLC bestimmt. Hierzu wird über eine Verdünnungsreihe der entsprechenden Verbindung eine Eichgerade bis zur Nachweisgrenze des UV-Detektors aufgenommen, so daß über die Fläche eines Peaks die Substanzmasse bestimmt werden kann. Alle Messungen werden bei einer Wellenlänge des UV-Detektors von 230 nm durchgeführt.

Die absolute Aktivität der Lösung wurde mit einem Curiemeter der Firma CAPINTEC (Radioisotop Calibrator CRC-10) gemessen, dessen Eichfaktor mit einem Ge(Li)-Detektor bestimmt wurde [251]. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten bezüglich des isotopelem Trägers lagen in der Größenordnung von 6 - 8 TBq/mmol (170 - 220 Ci/mmol). Im folgenden sind die zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verwendeten Eichgeraden aufgeführt. Die spezifischen Aktivitäten werden bei den entsprechenden Verbindungen aufgeführt.

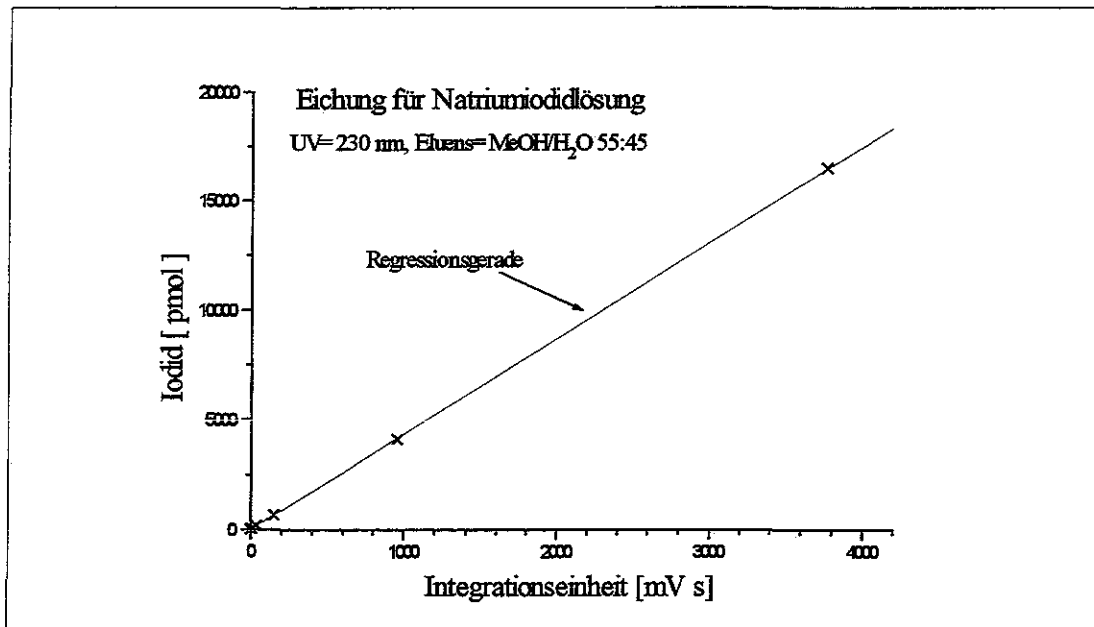


Abb. 5.4-1 Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des eingesetzten ^{131}I iodids. Trennbedingungen: S1; Volumenfluß: 1 ml/min

Da über die spezifische Aktivität der Radioiodidlösung von der Lieferfirma (Amersham) keine Auskünfte erhalten werden konnten, wurde auch die spezifische Aktivität dieser Lösung bestimmt. Die dazu verwendete Eichgerade ist in Abb. 5.4-1 dargestellt. Zweckmäßigerweise wurde der Iodidanteil der Lösung erst nach 3 Wochen bestimmt und die Radioaktivität auf das Lieferdatum zurückgerechnet. Die Messung wurde am 09.08.1993 durchgeführt, wobei die spezifische Aktivität zu 11,1 TBq/mmol (300 Ci/mmol) bestimmt wurde.

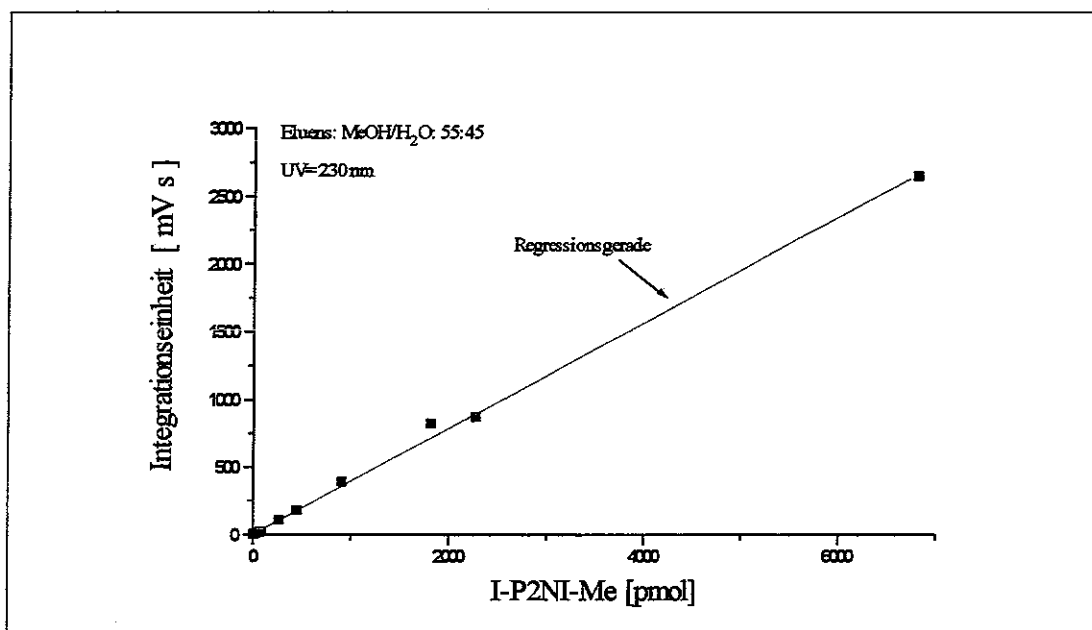


Abb.5.4-2 Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von ¹³¹I-P2NI-Me
Trennbedingungen: S1; Volumenfluß: 1 ml/min

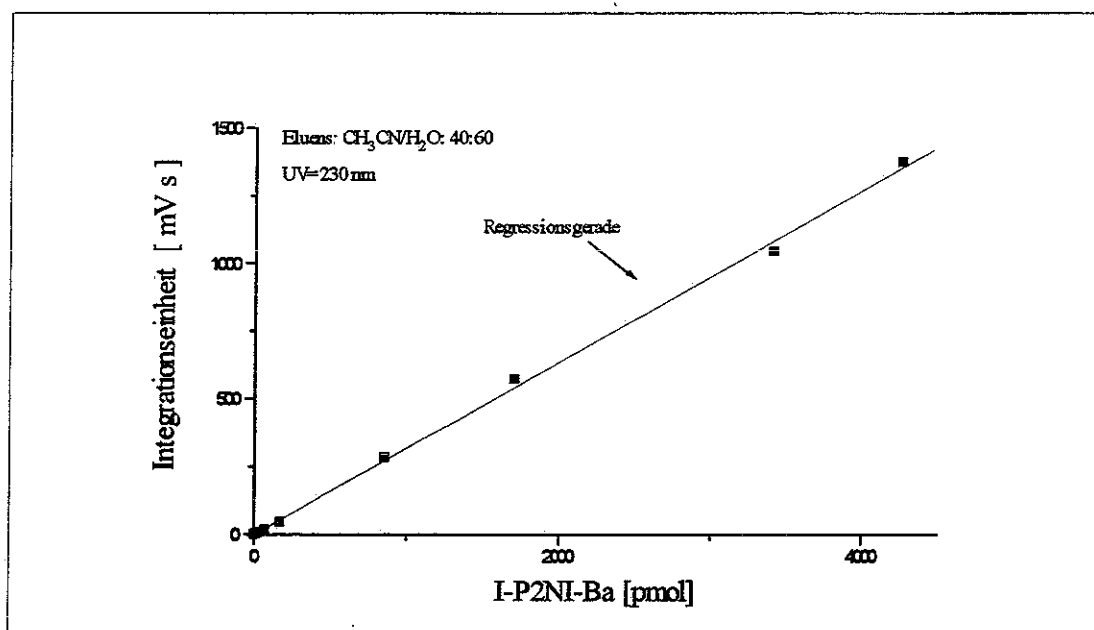


Abb.5.4-3 Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von ¹³¹I-P2NI-Ba
Trennbedingungen: S3; Volumenfluß: 1,4 ml/min

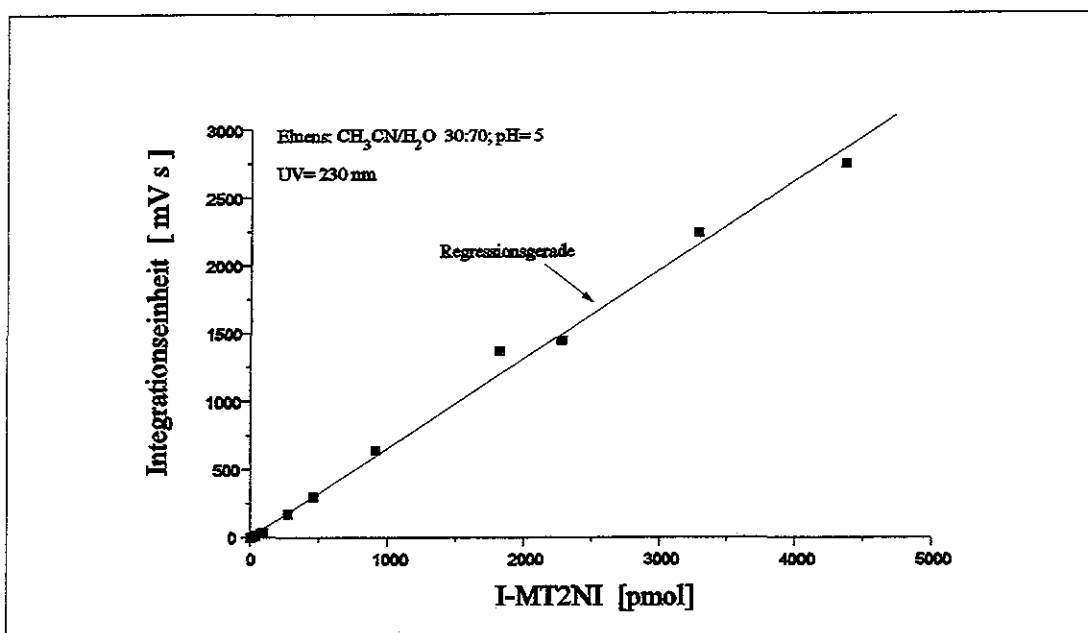


Abb.5.4-4 Eichgerade zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^{131}I -MT2NI
Trennbedingungen: S1; Volumenfluß: 1 ml/min

5.4.5 Bestimmung der radiochemischen Reinheit

Die radiochemische Reinheit ist ein wichtiges Qualitätskriterium bei der Darstellung und Anwendung von Markierungsprodukten. Sie gibt den Anteil der Gesamtaktivität in der Produktlösung an, der im Radioprodukt selbst gefunden wird. Auch diese Größe wird über eine HPLC Messung bestimmt. Zur Untersuchung der radiochemischen Reinheit wird die chromatographisch isolierte Fraktion des Radioproduktes einer weiteren HPLC-Trennung unterzogen, wobei die eingesetzten HPLC-Systeme unterschiedliche Trenneigenschaften aufweisen sollten. Hier wurden die Cosmosilsäule (S3) und die RP-18-Säule (S1) als unterschiedliche Trennsysteme verwendet.

5.4.6 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

In einem 2 ml Glasröhrchen mit Schraubverschluß werden jeweils 500 µl Octanol und 500 µl der wäßrigen Phase eingefüllt. Als wäßrige Phase werden isotonische Kochsalzlösung, Phosphatpuffer pH 7 und bidestilliertes Wasser eingesetzt. Die Glasröhrchen werden jeweils mit wenigen µl (74-185 MBq) der Radiolösung der zu untersuchenden Verbindung versetzt. Man verschließt die Gefäße, schüttelt kräftig durch und läßt 24 h stehen. Nun werden vorsichtig 3mal jeweils etwa 100 µl von jeder Phase abgenommen und deren Aktivität am Gammacounter bestimmt. Die Phasen werden durch ein geeignetes Radio-HPLC-Verfahren auf eventuelle Zersetzungsprodukte untersucht. Aus den erhaltenen Aktivitätsmengen wird der Verteilungskoeffizient des entsprechenden Systems berechnet.

5.4.7 Tierexperimente

Die Tierversuche wurden im INC der KFA-Jülich von Herr W. Wutz durchgeführt (Genehmigungs Nr.: 23.203.2 KFA 4/92). Pro Meßpunkt werden 3 Tiere untersucht. Es werden 1 - 2 μCi in 100 μl Lösung pro Maus in die Schwanzvene injiziert. Die Maus wird nach der entsprechenden Inkubationszeit getötet und die Organe zur Ermittlung der jeweiligen Aktivitätsmenge herauspräpariert. Das Gewicht und die Radioaktivitätsdosis der Organe werden bestimmt. Die Werte werden als %Dosis/g Organ angegeben. Die einzelnen Ergebnisse der Tierversuche sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

6. Zusammenfassung

Für die nicht-invasive Detektion von hypoxischen Zellbereichen mittels der Single-Photonen-Emissions-Tomographie (SPET) wurden die folgenden vier neuen Aminosäurekonjugate des 2-Nitroimidazols synthetisiert, praktisch trägerfrei (n.c.a.) mit Radioiod markiert und radiobiochemisch evaluiert:

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-Iod-D,L-phenylalaninmethylester (I-P2NI-Me),

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-Iod-D,L-phenylalaninbutylamid (I-P2NI-Ba),

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-Iod- α -methyl-D,L-tyrosinmethylester (I-MT2NI) und

N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-Iod-O-methyl- α -methyl-D,L-tyrosinmethylester (I-MMT2NI).

Darüber hinaus wurde auch das N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-Iod-D,L-phenylalanin (I-P2NI-S), ein Metabolit des I-P2NI-Me, als Radioiodverbindung synthetisiert. Zur Markierung der Nitroimidazoltracer und zu ihrer Identifizierung wurden sowohl die Markierungsvorläufer als auch die inaktiven Standardverbindungen dargestellt und charakterisiert.

Zur Aufarbeitung und Abtrennung der Reaktionsprodukte mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) konnten für alle Verbindungen sowohl im analytischen als auch im semipräparativen Maßstab effiziente Trennverfahren entwickelt werden. Dabei wurde eine radiochemische Reinheit von über 99 % erreicht.

Das pharmakokinetische Verhalten, die Organverteilung und Metabolisierung der Radioiodverbindungen wurden am Mausmodell untersucht. Hierzu wurde eine applikationsfertige Lösung hergestellt und auf HPLC-Basis ein Verfahren zur Analyse von Blut und Urin entwickelt.

Die Markierung des p-Bromphenylalaninderivates Br-P2NI-Me erfolgte über die Cu(I)-katalysierte nukleophile aromatische Radioioddebromierung. Zunächst wurde hierzu das CuCl/DMSO-System verwendet, das bisher nur zur Markierung einfacher Modellaromaten eingesetzt worden ist. Alle anderen aus der Literatur bekannten Systeme konnten wegen des reduktions- und hydrolyseempfindlichen Vorläufers nicht verwendet werden.

Aufgrund der unbefriedigenden Markierungsausbeuten wurde eine Weiterentwicklung dieser Methode vorgenommen. Sie führte zur Verwendung des Cu₂SO₄/DMSO-Systems, das durch den Zusatz von Zitronensäure (ZS) oder 2,4-Dihydroxyterephthalsäure (DHT) noch weiter verbessert werden konnte. Zur Optimierung der radiochemischen Ausbeuten (RCA) wurde dieses neue Markierungssystem genauer untersucht. Hier wurden die Abhängigkeiten hinsichtlich der Parameter Lösungsmittel, Temperatur, Reaktionszeit, Vorläuferkonzentration, Cu₂SO₄-Konzentration, Zusatz von Säuren und Reduktionsmitteln bestimmt. Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Cu(I)-Markierungssystemen, insbesondere dem CuCl/DMSO-System, konnte mit der neuen Cu₂SO₄/DMSO-Methode ein mildes, höchst effizientes, für reduktions- und hydrolyseempfindliche Verbindungen geeignetes Markierungsverfahren zur Herstellung von Radioiodverbindungen entwickelt werden. Der für die Cu(I)-katalysierte aromatische Radioioddebromierung in der Literatur angegebene Reaktionsmechanismus eines komplexartigen Übergangszustandes konnte auch für dieses System bestätigt werden.

Die Synthese des Phenylalaninmethylesterkonjugates ¹³¹I-P2NI-Me mit Hilfe des Cu₂SO₄/DMSO/ZS-Systems führte innerhalb von 3 h zu einer RCA von über 90 %. Auch das analoge Phenylalaninbutylamiderivat ¹³¹I-P2NI-Ba konnte so nach 4 h mit einer RCA von 85-90 % erhalten werden. Die spezifische Aktivität betrug für beide Verbindungen 6-8 TBq/mmol.

Im Hinblick auf die pharmakokinetischen Eigenschaften der Tracer wurde ein einfaches Modell zur Optimierung entwickelt. Hierbei standen Überlegungen sowohl zur Steigerung der Hirnaufnahme als auch zur Beeinflussung der Clearance-Raten der Hypoxietracer im Vordergrund. Allerdings erwiesen sich die chemischen Modifikationen als wenig erfolgreich. In diesem Zusammenhang wurden u. a. die Verteilungskoeffizienten (Octanol/Wasser) der Hypoxietracer und die Bioverteilung im Mausmodell bestimmt.

Das α -Methyltyrosinkonjugat (^3I -MT2NI) des 2-NI konnte durch direkte elektrophile Radioiodierung markiert werden. Zunächst wurde die Markierung des schwer wasserlöslichen Vorläufers in organischen Lösungsmitteln untersucht, wobei die gängigen Oxidationsmittel Chloramin-T, Dichloramin-T und Iodogen verwendet wurden. Es zeigte sich, daß Ethanol und chlorierte Lösungsmittel wie Chloroform und Dichlormethan hierfür am besten geeignet sind.

In wäßrigen, ethanolischen Puffersystemen konnten jedoch deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Durch die zur elektrophilen Radioiodierung notwendigen geringen Vorläuferkonzentrationen führten schon 10 %ige wäßrige-ethanolische Lösungen zu optimalen RCA. In diesem Zusammenhang wurde außerdem das Chloramin-B als Oxidationsmittel eingesetzt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden der Einfluß des pH-Wertes, der Ethanolkonzentration sowie der Vorläufer- und Oxidationsmittelkonzentration untersucht. Mit zunehmenden Ethanolkonzentrationen wurden schlechtere RCA und die Bildung von Radionebenprodukten beobachtet. Mit Chloramin-B und Iodogen als Oxidationsmittel konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Für die Abhängigkeit der RCA vom pH-Wert wurde für alle Oxidationsmittel ein ähnliches Verhalten gefunden. Sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich trat jeweils ein Maximum auf. Iodogen zeigte die beste Eignung, da es bei beiden Maxima zu einer etwa gleich guten RCA von 85-90 % führte, und die Markierung bis zu einem pH-Wert von 12 möglich war.

Das α -Methyltyrosinkonjugat MT2NI konnte mit Chloramin-B in 20 %iger ethanolischer Pufferlösung bei einem pH-Wert von 4 innerhalb von 5 min mit einer RCA von über 90 % radioiodiert werden. Hier bietet sich die Möglichkeit einer einfachen Besteck-Markierung (Kit). Durch die Einführung der α -Methylgruppe wurde sowohl die bereits von den α -Methylaminosäuren bekannte, mit den Radioiodphenylalanin-Derivaten vergleichbare Stabilität gegenüber der *in vivo* Deiodierung als auch eine erstaunliche chemische und biochemische Stabilität des Methylesters erhalten.

Zur Darstellung des n.c.a.-O-Methyl- α -methylderivates ^{131}I -MMT2NI aus dem zuvor markierten ^{131}I -MT2NI konnte eine selektive Methylierungsmethode durch die Verwendung von Trimethylsilyldiazomethan entwickelt werden. Dieses Reagens konnte damit erstmals erfolgreich für die Methylierung einer trägerfreien (n.c.a.) Verbindung eingesetzt werden. Nach der Optimierung der Reaktionsparameter wurde innerhalb von 20 min eine RCA von 85-90 % erhalten.

Damit konnte ein alternativer Weg über eine einfache 2-stufige Synthesereaktion zur direkten Radioiodierung von O-methylierten Aromaten unter Umgehung der üblichen Trifluoressigsäure als Reaktionsmedium aufgezeigt werden, wobei die RCA des Gesamtprozesses um 10-20 % höher lag.

Die Auswertung der pharmakokinetischen Eigenschaften ergab, daß ^{131}I -P2NI-Me und ^{131}I -MT2NI hinsichtlich ihrer Eignung als Hypoxietracer die besten Voraussetzungen besitzen. Beide Tracer waren gegenüber der *in vivo* Deiodierung stabil und zeigten nur eine geringe Tendenz zur Leberanreicherung, die

üblicherweise für Nitroimidazolderivate gefunden wird. Insbesondere das Phenylalaninmethylesterkonjugat (^{131}I -P2NI-Me) zeichnete sich durch einen einfachen Metabolismus und eine damit verbundene schnelle renale Ausscheidung aus.

7. Literaturverzeichnis

- [1] E. Phelps, J. C. Maziotta, H. R. Schelbert; PET und Autoradiography, Raven Press, New York, (1986)
- [2] K. Wienhard, R. Wagner, W.-D. Heiss, PET - Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, (1989)
- [3] G. Stöcklin; Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen zyklotron-produzierten Radiopharmaka. Aus Handbuch der medizinischen Radiologie, Band XV/1B, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, (1988)
- [4] J. Ledoussal, A. Chetanneau, A. Gruaz-Gyon, M. Martin, E. Gautherot, P.-A. Lehur, J.-F. Chatal, M. Delaage, J. Barbet; J. Nucl. Med. 34, 1662 (1993)
- [5] L. Yuanfang, W. Chuanchu; Pure & Appl. Chem. 63, 427 (1991)
- [6] M. M. Ter-Pogossian; Spekt. der Wissenschaft 12, 121 (1980)
- [7] Table of Isotopes. Seventh Edition. Editors: C. M. Lederer, V. S. Shirley John Wiley & Sons, INC., New York, Chichester, Brisban, Toronto, (1982)
- [8] S. C. Srivastava, R. C. Mease; Progress in research on ligands, nuclides and techniques for labeling monoclonal antibodies. Nucl. Med. Biol. 18, 589-603 (1991)
- [9] W. Seelmann-Eggebert, G. Pfennig, H. Münzel, H. Klewe-Nebenius; Nuklidkarte, Kernforschungszentrum Karlsruhe, 5. Auflage. Gersbach u. Sohn Verlag, München, 1981
- [10] J. V. Hiltunen; Search for new and improved radiolabeling methods for monoclonal antibodies. A review of different methods. Acta Oncol. 32, 831-9 (1993)
- [11] G. Stöcklin; In Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage, Bd 20 "Radionuklide" Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1981
- [12] S. M. Qaim; Nuclear Data Relevant to Cyclotron Produced Short-Lived Medical Radioisotopes. Radiochim. Acta 30, 147-62 (1982).
- [13] G. Stöcklin; Bromine-77 und Iodine-123 Radiopharmaceuticals. Int. J. Appl. Radiat. Isot. 28, 131-48 (1977)
- [14] A. Halpern, G. Stöcklin; Rad. and Environm. Biophysics. 14, 167-183 (1977)
- [15] Iodine-125. Guide to radioiodination techniques, Amersham Life Science, Little Chalfont, Bucks. (1993)
- [16] S. M. Qaim, G. Stöcklin; Production of Some Medically Important Short-Lived Neutron Deficient Radioisotopes of Halogens. Radiochim. Acta 34, 25-40 (1983)
- [17] F. Tárkányi, S. M. Qaim, G. Stöcklin, M. Sajjaad, R. M. Lambrecht, H. Schweickert; Excitation functions of (p, 2n) and (p, pn) reactions and differential and integral yields of ^{123}I in proton induced nuclear reactions on highly enriched ^{124}Xe . Appl. Radiat. Isot. 42, 221-8 (1991)
- [18] H. Michael, H. Rosezin, H. Apelt, G. Blessing, J. Knieper, S. M. Qaim; Some technical improvements in the production of ^{123}I via the $^{124}\text{Te}(p, 2n)^{123}\text{I}$ reaction at a compact cyclotron. Int. J. Appl. Radiat. Isot. 32, 581-7 (1981)

- [19] J. Mertens, M. Gysemans; Cu¹⁺assisted nucleophilic exchange radiohalogenation: Application and mechanistic approach. "New trends in radiopharmaceutical synthesis, quality assurance, and regulatory control" Edited by Ali M. Emran; S. 53-65., Plenum Press, New York, London, (1991)
- [20] R. H. Seevers, R. E. Counsell; Radioiodination techniques for small organic molecules. *Chem. Rev.* 82, 575-90 (1982)
- [21] D. M. Doran, I. L. Spar; *J. Immunol. Methods* 39, 155 (1980)
- [22] R. M. Lambrecht, C. Mantescu, C. Redvanly, A. P. Wolf; *J. Nucl. Med.* 13, 266 (1971)
- [23] U. Tisliar, G. Kloster, F. Ritzl, G. Stöcklin; Accumulation of radioiodinated L- α -Methyltyrosin in pancreas of mice: Cocise Communication. *J. Nucl. Med.* 20, 973-6 (1979)
- [24] M. A. Trivedi, P. Carnochan; An improved synthetic procedure for L-3-Iodo- α -Methyl Tyrosine suitable for preparation in kit form. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 33, 61-4 (1993)
- [25] K. Kawai, Y. Fujibayashi, H. Saji, J. Konishi, A. Yokoyama; *J. Nucl. Med.* 29, 778 (1988)
- [26] K. Langen, N. Roosen, H. H. Coenen, J. T. Kuikka, T. Kuwert, H. Herzog, G. Stöcklin, L. E. Feinendegen; *J. Nucl. Med.* 32, 1225 (1991)
- [27] C. Krummeich, M. Holschbach, G. Stöcklin; Direct n.c.a. electrophilic radioiodination of tyrosin analogues; Their in vivo stability and brain-uptake in mice. *Appl. Radiat. Isot.* 45, 929-35 (1994)
- [28] W. M. Hunter, F. C. Greenwood, J. S. Glover; *Biochem. J.* 89, 114 (1963).
- [29] H. H. Coenen, S. M. Morelein, G. Stöcklin; No-carrier-added-radiohalogenation methods with heavy halogens. *Radiochim. Acta* 34, 47-68 (1983)
- [30] M. J. Adam, Y. Zea Ponce, J. M. Berry; Synthesis of L-6-[¹²³I]Iodo-m-tyrosine. A potential SPECT brain imaging agent. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 28, 1065-72 (1990)
- [31] M. M. Campbell, G. Johnson; Chloramine T and related N-halogeno-N-metallo reagents. *Chem. Rev.* 78, 65-79 (1978)
- [32] P. Chen, A. Hussain, H. H. Tai, An improved method of radioiodination with chloramine T. *Anal. Biochem.* 219, 159-61 (1994)
- [33] A. A. Hussain, R. Awad, P. A. Crooks, L. W. Dittert; Chloramine-T in radiolabeling techniques I Kinetics and mechanism of the reaction between chloramine-T and amino acids. *Anal. Biochem.* 214, 495-9 (1994)
- [34] G. S. Petzold; Untersuchungen zur elektrophilen Radiobromierung und -iodierung aromatischer Verbindungen mit N-Halogenverbindungen ohne Trägerzusatz. Dissertation Universität Köln, 1982
- [35] P. J. Fraker, J. C. Speck; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849 (1978)
- [36] S. M. Moerlein, W. Beyer, G. Stöcklin; N.c.a. radiobromination and radioiodination of aromates with in situ generated peracetic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 779 (1988)
- [37] M. M. Morrison; *Methods Enzymol.* 70, 214 (1980)
- [38] J. I. Thorell, B. G. Johansson; *Biochim. Biophys. Acta* 251, 363 (1971)

- [39] P. Angelberger, O. Buchheit, M. Egger, R. Portner;
J. Label. Compds. Radiopharm. Symposium Abstracts, 32, 230 (1993)
- [40] U. Rosa et al.; Biochim. Biophys. Acta. 252, 363 (1972)
- [41] J. Katz, G. Bonorris; J. Lab. Clin. Med. 72, 966 (1968)
- [42] R. K. Donabedian, R. A. Levine, D. Seligson; Clin. Chim. Acta 36, 517 (1972)
- [43] D. Canney, M. P. Kung, Y-Z. Guo, H. F. Kung;
J. Label. Compds. Radiopharm. Symposium Abstracts, 32, 199 (1993)
- [44] C. Foulon, Y. Frangin, J. C. Besnard, D. Guilloteau;
J. Label. Compds. Radiopharm. Symposium Abstracts, 32, 240 (1993)
- [45] G.W. Kabalka, K. A. R. Sastry, V. Somayaji; 1,3,2-Benzodioxaborole in organic synthesis: Preparation of vinyl iodides. Heterocycles 18, 157-61 (1982)
- [46] J. R. Behling, J. S. Ng, K. A. Babiak, A. L. Campbell; The synthesis of β -hydroxy-(E)-vinylstannanes using an "in-situ" generated cuprate reagent derived from (E)-bis-(tributylstannyl)ethylene. Tetrahedron Lett. 30(1), 27 (1989)
- [47] J. A. Clanton et. al.; J. Label. Compds. Radiopharm 29, 745 (1991)
- [48] S. Chumpradit, M. P. Hung, H. F. Kung;
J. Label. Compds. Radiopharm. Symposium Abstracts, 32, 225 (1993)
- [49] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, R. R. Srivastava, H. D. Burns; Synthesis and radioiodination of N-boc-p-(tri-n-butylstannyl)-L-phenylalanine tetrafluorophenyl ester: preparation of a radiolabeled phenylalanine derivative for peptide synthesis. Bioconjug. Chem. 4, 574-80 (1993)
- [50] S. M. Moerlein, C. A. Mathis, Y. Yano; Comparative evaluation of electrophilic aromatic iododemetalation techniques for labeling radiopharmaceuticals with iodine-122. Appl. Radiat. Isot. 38, 85-90 (1987)
- [51] S. M. Moerlein; N.c.a. aromatic radiobromination and radioiodination via halogenodegermylation. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1687-92 (1985)
- [52] R. N. Hanson; Radioisotope incorporation via aryl and alkenyl trialkyltin intermediates. S. 303-315; New trends in radiopharmaceutical synthesis, quality assurance, and regulatory control" Edited by Ali M. Emran; Plenum Press, New York, London, (1991)
- [53] A. L. Allred; Electronegativity Values from Thermochemical Data. J. Inorg. Nucl. Chem. 17, 215-21 (1961)
- [54] G. W. Kabalka, S. A. R. Sastry, H. C. Hsu, M. D. Hylarides; J. Org. Chem. 46, 2582 (1981)
- [55] G. W. Kabalka, M. M. Goodman; Synthesis of radiopharmaceuticals via organoboranes. S. 289-301; New trends in radiopharmaceutical synthesis, quality assurance, and regulatory control" Edited by Ali M. Emran; Plenum Press, New York and London, (1991)
- [56] R. J. Flanagan; The synthesis of halogenated radiopharmaceuticals using organomercurials. S. 279-288; "New trends in radiopharmaceutical synthesis, quality assurance, and regulatory control" Edited by Ali M. Emran; Plenum Press, New York, London, (1991)

- [57] M. J. Adam, Y. Zea Ponce, J. M. Berry, K. Hoy; Synthesis and preliminary evaluation of L-6-iododopa as a potential SPECT brain imaging agent. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **28**, 155-66 (1990)
- [58] Th. J. Mangner, Jiann-long Wu, D. M. Wieland; Solid-Phase exchange radioiodination of aryl iodides Facilitation by ammonium sulfate. *J. Org. Chem.* **47**, 1484-8 (1982)
- [59] V. I. Stanko, N. G. Iroshnikova, A. F. Volkov, A. I. Klimova; Copper catalysis on isotopic exchange as a novel approach to incorporating iodine and bromine into benzene derivatives. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **35**, 1129-32 (1984)
- [60] R. G. R. Bacon, H. A. O. Hill; Copper-promotes reactions in aromatic chemistry. *Q. Rev. Chem. Soc.* **19**, 95 (1965)
- [61] R. G. R. Bacon, H. A. O. Hill; Metal ions and complexes in organic reaktions. Part I: Substitution reactions between aryl halides and cuprous salts in organic solvents. *J. Chem. Soc.*, 1097 (1964)
- [62] J. Lindley; Copper assisted nucleophilic substitution of aryl halogen. *Tetrahedron* **40**, 1433-56 (1984)
- [63] J. Clark, C. W. Jones; Reverse halogenation using supported Copper (I) Iodide. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1409-10 (1987)
- [64] R. Diercks, K. P. C. Vollhardt; *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 3150-52 (1986)
- [65] H. Suzuki, A. Kondo, T. Ogawa; Preparation of aromatic iodides from bromides via the reverse halogen exchange. *Chem. Lett.*, 411 (1985)
- [66] J. Mertens, W. Vanryckeghem, M. Gysemans, J. Eersels, E. Finda-Panek, L. Carlsen; New fast preparation of ¹²³I-labelled radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med.* **13**, 380-1 (1987)
- [67] S. M. Moerlein; Regiospecific aromatic radioiodination via no-carrier-added copper(I)-assisted iododebromination. *Radiochim. Acta* **50**, 55-61 (1990)
- [68] S. M. Moerlein, D.-R. Hwang, M. J. Welch; No-carrier-added radiobromination via cuprous chloride-assisted nucleophilic aromatic bromodeiodination. *Appl. Radiat. Isot.* **39**, 369-72 (1988)
- [69] R. G. Pearson; Hard and soft acids and bases. *Survey Prog. Chem.* **5** 1-52 (1969)
- [70] Gmelins Handbuch der anorg. Chemie. 8. Auflage, Cu [B] 1374-80 (1965)
- [71] J. Mertens, M. Thomas; Synthesis of radioiodo-[4-(2-iodo-4-fluoro-benzoyl)piperidin-1-yl]-2'-Acetonaphthone. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **29**, 963-7 (1991)
- [72] M. Gysemans, J. Mertens; Optimal yields for the Cu¹⁺ assisted radiohalogenation by respecting the mechanistic parameters. *J. Label. Compd. Radiopharm., Symposium Abstracts*, **28**, 195 (1990)
- [73] A. R. Wafelman, M. C. P. Konings, C. A. Hoefnagel, R. A. A. Maes, H. H. Beijnen; Synthesis, radiolabelling and stability of radioiodinated m-iodobenzylguanidine, a review. *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 997-1007 (1994)
- [74] A. Najafi; Modified and improved method for synthesis of p-halogenated-N-isopropylamphetamine leading to synthesis of "no carrier added" I-131 Iodoamphetamine. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **24**, 1167-71 (1985)

- [75] J. Mertens, J. Eersels, W. Vanryckeghem; New high yield Cu(I) assisted ^{123}I radioiodination of 15(p-I-phenyl)-9-methyl pentadecanoic acid, a potential myocardial tracer. Eur J. Nucl. Med. 13, 159-60 (1987)
- [76] J. Mertens, W. Vanryckeghem, A. Bossuyt; High yield preparation of ^{123}I -N-isopropyl-p-iodoamphetamine (IAMP) in persence of Cu(I). J. Label. Compd. Radiopharm. 22, 89-91 (1985)
- [77] S. Hamant, J. P. Mathieu, C. Morin, I. Trimcev, M. Vidal; The beta-Iodoethoxyl group - A stable unit for radioiodination. Bioorg. Med. Chem. Lett. 4, 1687-90 (1990)
- [78] P. C. Srivastava, C. R. Lambert, J. F. Albert, S. J. Kennel, A. Hasan; I-125 labeled azomycin acylnucleoside: Design and synthesis of an attractive misonidazole analogue for imaging hypoxia. Proceedings of the 37th Annual Meeting, J. Nucl. Med. 31, 900 (1990) No.831
- [79] M. M. Goodman, R. N. Waterhouse, G. W. Kabalka, F. F. Knapp; Synthesis and biological evaluation of 3-C((E)-2-[^{125}I]iodoethenyl)-D-Allose: A new strategy for the preparation of in vivo stable radioiodinated carbohydrates. NucCompact 22, 62-9 (1990)
- [80] R. N. Hanson, D. E. Seitz, J. C. Botarro; E-17 α -[^{125}I]Iodovinylestradiol. An estrogen-receptor-seeking radiopharmaceutical. J. Nucl. Med. 23, 431-36 (1982)
- [81] J. E. Biskupiak, J. R. Grierson, J. S. Rasey, G. V. Martin, K. A. Krohn; Synthesis of an (Iodovinyl)misonidazole derivative for hypoxia imaging. J. Med. Chem. 34, 2165-2168, (1991)
- [82] H. Dougan, B. A. Rennie, D. M. Lyster, S. L. Sacks; No-carrier-added [^{123}I]1-(beta-D-arabinofuranosyl)-5(E)-(2-iodovinyl)uracil (IVaraU): high yield radiolabeling via organotin and exchange reactions. Appl. Radiat. Isot. 45, 795-801 (1994)
- [83] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, J. C. Livesey, R. R. Srivastava, G. E. Laramore, T. W. Griffin; Synthesis and radioiodination of a *nido*-1,2-carboranyl derivative of 2-nitroimidazole. Nucl. Med. Biol. 21, 601-11 (1994)
- [84] D. S. Wilbur; Review: Radiohalogenation of proteins: an overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling. Bioconjug. Chem. 3, 433-70 (1992)
- [85] P. K. Garg, S. Garg, M. R. Zalutsky; N-succinimidyl 4-methyl-3-(tri-n-butylstannyl)benzoate: synthesis and potential utility for the radioiodination of monoclonal antibodies. Nucl. Med. Biol. 20, 379-87 (1993)
- [86] Y. Arano, K. Wakisaka, Y. Ohmomo, T. Uezono, T. Mukai, H. Motonari, H. Shiono, H. Sakahara, J. Konishi, C. Tanaka, A. Yokoyama; Maleimidoethyl 3-(tri-n-butylstannyl)hippurate: a useful radioiodination reagent for protein radiopharmaceuticals to enhance target selective radioactivity localization. J. Med. Chem. 37, 2609-18 (1994)
- [87] M. J. Adam, Y. Z. Ponce, J. M. Berry; J. Label. Compds. Radiopharm. 28, 1065 (1990)
- [88] T. J. Tsomides, H. N. Eisen; Stoichiometric labeling of peptides by iodination on tyrosyl or histidyl residues. Anal. Biochem. 210, 129-35 (1994)
- [89] C. A. Mathis, T. Dargent, A. T. Shulgin; Iodine-122-labeled amphetamine derivative with potential for PET brain blood-flow studies. J. Nucl. Med. 26, 1295-1301 (1985)
- [90] P. Gielow; Int. J. Appl. Radiat. Isotop. 28, 326 (1977)

- [91] J. Mertens, M. Gysemans, W. Vanryckeghem, M. Guillaume, C. Brihaye; New high yield Cu(I) assisted nucleophilic radiobromination. *J. Label. Compd. Radiopharm.* 23, 1273-75 (1986)
- [92] H. Henneken, C. Krummeich, M. Holschbach, G. Stöcklin; Copper(I) Assisted n.c.a. radioiododebromination using cuprous sulfate; Radioiodination of reduction sensitive 2-nitroimidazole amino acid conjugates. Poster, Symposium in Vancouver, Canada 1995
- [93] P. Vaupel, M. Höckel; Sauerstoffdruck-Verteilung in bösartigen Tumoren. *Forschungsmagazin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz* 10, 57 (1994)
- [94] D. P. Jones, T. Yee Aw, X. Shan, D. L. Tribble; Characteristics of hypoxic cells that enhance their susceptibility to chemical injury. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 1-10 (1990.)
- [95] P. Vaupel; Physiological Properties of Malignant Tumours. *NMR in Biomedicine* 5, 220-225 (1992)
- [96] M. Löffler, F. Schneider; The tumor cell's ability to survive under hypoxic conditions: Cytokinetic, biochemical, morphological criteria. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 343-344 (1990)
- [97] Stanley Dische; A Review of hypoxic cell Radiosensitization. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20, 147-52 (1991)
- [98] W. Muelle-Klieser, K.- H- Schlenger, S. Walenta, M. Gross, U. Karbach, M. Hoeckel, P. Vaupel; Pathophysiological approaches to identifying tumor hypoxia patients. *Radiother. Oncol. Suppl.* 20, 21-8 (1991)
- [99] M. Höckel, C. Lnoop, K. H. Schlenger, B. Vorndran, P. G. Knapstein, P. Vaupel; Intratumoral pO₂ histography as predictive assay in advanced cancer of the uterine cervix. *Adv. Exp. Med. Biol.* 345, 445-50 (1994)
- [100] R. A. Gatenby, H. B. Kessler, J. S. Rosenblum, L. R. Coia, P. J. Moldofsky, W. H. Hartz, G. J. Broder; Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship in outcome of radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 14, 831-38 (1988)
- [101] G. S. Cruickshank, R. P. Rampling, W. Cowans; Direct measurement of the pO₂ distribution in human malignant brain tumours. *Adv. Exp. Med. Biol.* 345, 465-70 (1994)
- [102] P. W. Vaupel; Oxygenation of solid tumors. Beverly A. Teicher (Editor); *Drug Resistance in Oncology*, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong 1993
- [103] E. J. Hall; The oxygen effect and reoxygenation. In: E. J. Hall, ed. *Radiobiology for the radiologist*, 3rd ed. New York (1988), Lippincott Co.
- [104] R. S. Bush, R. D. T. Jenkin, W. E. C. Allt, F. A. Beale, A. J. Dembo, J. F. Pringle; Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy. *Br. J. Cancer* 37, 302 (1978)
- [105] H. B. Stone, J. M. Brown, T. L. Phillips, R. M. Sutherland; Meeting Report: Oxygen in human tumors: Correlations between methods of measurement and response to therapy. *Radiat. Res.* 136, 422-34 (1993)
- [106] W.-J. Koh, J. S. Rasey, M. L. Evans, J. R. Grierson, Th. K. Lewellen, M. M. Graham, K. A. Krohn, Th. W. Griffin; Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]Fluormisonidazole. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 199-212 (1991)

- [107] A. J. Franko; Misonidazole and other hypoxia markers: Metabolism and application. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12, 1195-202 (1986)
- [108] D. J. Chaplin; Bioreductive Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 685-87 (1992)
- [109] A. G. Beaman, W. Tautz, T. Gabriel, R. Duschinsky; The synthesis of acromycin. *J. Am. Chem. Soc.* 87 389, (1965)
- [110] G. C. Lancini, E. Lazzari; The synthesis of azomycin (2-nitroimidazole). *Experientia*, 21:2, 83 (1965)
- [111] D. I. Edwards; Review: Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 9-20 (1993)
- [112] D. I. Edwards; Metronidazole. *Antibiotics (NY)* 6, 121-35 (1983)
- [113] J. L. Forster, R. L. Wilson; Radiosensitization of anoxic cells by metronidazole. *Br. J. Radiol.* 46, 234-5 (1973)
- [114] J. A. Raleigh, J. D. Chapman, J. Brosa, W. Kremers, A. P. Reuvers; Radiosensitisation of mammalian cells by p-nitroacetophenone; III. Effectiveness of nitrobenzene analogues. *Int. J. Radiat. Biol.* 23, 377-87 (1973)
- [115] G. E. Adams, E. D. Clarke, I. R. Flockhart, R. S. Jacobs, D. S. Sehmi, J. Stratford, P. Wardmann, M. E. Watts, J. Parrick, R. G. Wallace, C. E. Smithen; Structure-activity relationships in the development of hypoxic cell radiosensitizers. I. Sensitization efficiency. *Int. J. Radiat. Biol.* 35, 151-60 (1979)
- [116] G. E. Adams, E. D. Clarke, P. Gray, R. S. Jacobs, I. J. Stratford, P. Wardman, M. E. Watts, J. Parrick, R. G. Wallace, C. E. Smithen; Structure-activity relationships in the development of hypoxic cell radiosensitizers. II. Cytotoxicity and therapeutic ratio. *Int. J. Radiat. Biol.* 35, 133-51 (1979)
- [117] J. D. Chapman, J. Lee, B. E. Meeker; Cellular reduction of nitroimidazole drugs: Potential for selective chemotherapy and diagnosis of hypoxic cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 911-17 (1989)
- [118] J. D. Chapman; Current concepts in cancer. Hypoxic sensitizers - implications for radiation therapy. *New Engl. J. Med.* 301, 1429-32 (1979)
- [119] J. D. Chapman, A. J. Franko, J. Sharplin; A marker for hypoxic cells in tumors with potential clinical applicability. *Br. J. Cancer* 43, 546-50 (1981)
- [120] J. D. Chapman, A. J. Franko, J. Sharplin; A marker for hypoxic cells in tumors with potential clinical applicability. *Br. J. Cancer* 43, 546-50 (1981)
- [121] C. J. Koch, C. C. Stobbe, K. A. Baer; Metabolism induced binding of ¹⁴C-Misonidazole to hypoxic cells: Kinetic dependence on oxygen concentration and misonidazole concentration. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10, 1327-31 (1984)
- [122] A. J. Franko, C. J. Koch; Binding of misonidazole to V79 spheroids and g+fragments of dunning rat prostatic and human colon carcinomas in vitro: Diffusion of oxygen and reactive metabolites. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10, 1333-36 (1984)
- [123] J. D. Chapman, J. Lee, B. E. Meeker; Adduct formation by 2-Nitroimidazole in mammalian cells: Optimization of markers for tissue oxygenation. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 313-324 (1990)

- [124] G. V. Martin, J. H. Caldwell, Z. Grunbaum, M. Cerqueria, K. A. Krohn; Enhanced binding of the hypoxic cell marker [³H]Fluormisonidazole in ischemic myocardium. *J. Nucl. Med.* 30, 194-201, (1989)
- [125] J. M. Hoffmann, J. S. Rasey, A. M. Spence, D. W. Shaw, K. A. Krohn; Binding of the hypoxia tracer [³H]Misonidazole in cerebral ischemia. *Stroke* 18, 168 (1987)
- [126] R. J. Hodgkiss, P. Wardman; The measurement of hypoxia in tumours. *Br. J. Radiol. Suppl.* 24, 105-10 (1994)
- [127] J. E. Biskupiak, J. S. Rasey, G. V. Martin, J. H. Caldwell, K. A. Krohn; Synthesis of 4-substituted misonidazole derivatives for imaging hypoxia. *Proceedings of the 40th Annual Meeting. J. Nucl. Med.* 34, 79P (1993)
- [128] I. J. Stratford, P. O'Neill, B. W. Sheldon, A. R. J. Silver, J. M. Walling, G. E. Adams; RSU 1069, a nitroimidazole containing an aziridine group. *Biochem. Pharmacol.* 35, 105-9 (1986)
- [129] E. M. Fielden, G. E. Adams, D. Cole, M. A. Naylor, P. O'Neill, M. A. Stephens, I. J. Stratford; Assessment of a range of novel nitro-aromatic radiosensitizers and bioreductive drugs. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 707-11 (1992)
- [130] D. S. M. Cowan, V. M. Kanagasabapathy, R. A. McClelland, A. M. Rauth; Mechanistic studies of enhanced in vitro radiosensitization and hypoxic cell cytotoxicity by targeting radiosensitizers to DNA via intercalation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 541-44 (1992)
- [131] A. M. Rauth; Pharmacologie und toxicology of sensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10, 1293-1300 (1984)
- [132] H. Kappus; An overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. *Biochem. Pharmacol.* 35, 1-6 (1986)
- [133] R. A. McClelland; Molecular interaction and biological effects of the products of reduction of nitroimidazoles. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 125-138 (1990)
- [134] R. A. McClelland, J. R. Fuller, N. E. Seaman; 2-Hydroxylaminoimidazoles - unstable intermediates in the reduction of 2-nitroimidazoles. *Biochem. Pharmacol.* 33, 303-9 (1984)
- [135] Ch. B. Brezden, R. A. McClelland, A. M. Rauth; Mechanism of the selective hypoxic cytotoxicity of 1-methyl-2-nitroimidazole. *Biochem. Pharmacol.* 48, 361-70 (1994)
- [136] R. A. MacClelland, R. Panicucci, A. M. Rauth; Products of the reduction of 2-nitroimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 4308-14, (1987)
- [137] D. I. Edwards, J. H. Tocher, L. D. Dale, D. Widdick, N. Virk; Effects on DNA of bioreducible nitroimidazole and benzotriazine drugs. *NATO ASJ Ser., Ser. A*, 198 (Sel. Act. Redox Processes), S. 275-83 (1990)
- [138] David I. Edwards; Mode of action of 5-Nitroimidazoles. *Acta Univ. Carol. Biol.*, 30(5-6), 471-83 (1988)
- [139] P. O'Neill, T. J. Jenner, O. Sapora, P. W. Crump, S. M. T. Cunniffe, E. M. Fielden; The role of DNA damage in the bioreductive action of 2-Nitroimidazoles. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 53-61 (1990)

- [140] P. O'Neill, S. M. T. Cunniffe; Assessment of the repair and damage of DNA induced by parent and reduced RSU-1069, a 2-Nitroimidazole-aziridine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 963-66 (1989)
- [141] D. I. Edwards; Reduction of nitroimidazoles *in vitro* and DNA damage. *Biochem.Pharmacol.* 35, 53-8 (1986)
- [142] G. G. Miller, J. Ngan-Lee, J. D. Chapman; Intracellular localization of radioactively labeled misonidazole in EMT-6 tumor cells *in vitro*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 741-44 (1982)
- [143] L. M. Cobb, F. R. C. Path, J. Nolan, T. Hacker; Retention of misonidazole in normal and malignant tissues: Interplay of hypoxia and reductases. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 655-59 (1992)
- [144] L. M. Cobb, T. Hacker, J. Nolan; NAD(P)H nitroblue tetrazolium reductase levels in apparently normoxic tissues: a histochemical study correlating enzyme activity with binding of radiolabelled misonidazole. *Br. J. Cancer* 61, 524-29 (1990)
- [145] Leon M. Cobb, F. R. C. Path, John Nolan; Autoradiographic study of tritium-labeled misonidazole in the mouse. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 953-6 (1989)
- [146] D. J. Van Os-Corby, C. J. Koch, J. D. Chapman; Is misonidazole binding to mouse tissues a measure of cellular pO₂? *Biochem. Pharmacol.* 36, 3487-94 (1987)
- [147] I. J. Stratford; Mechanisms of hypoxic cell radiosensitization and the development of new sensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 391-8 (1982)
- [149] P. Workman, M. I. Walton; Enzyme-directed bioreductive drug development. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 173-191 (1990)
- [150] P. Joseph, A. K. Jaiswal, C. C. Stobbe, J. D. Chapman; The role of specific reductases in intracellular activation and binding of 2-nitroimidazoles. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29, 351-5 (1994)
- [151] J. L. Prekeges, J. S. Rasey, Z. Grunbaum, K. H. Krohn; Reduction of fluoromisonidazole, a new imaging agent for hypoxia. *Biochem.Pharmacol.* 42, 2387-95 (1991)
- [152] K. C. Agrawal, M. Sakaguchi; A new potent radiosensitizer: 1-(2',3'-dideoxy- α -D-erythro-hex-2'-enopyranosyl)-2-nitroimidazole (RA-263). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 403-7 (1982)
- [153] P. Workman; Bioreductive Mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 631-7 (1992)
- [154] S. Sved, B. Foster; Nitroimidazoles: proposed studies on the toxicity of bound redidues. *Drug Metab. Rev.* 22(6-8), 849-61 (1990)
- [155] A. Bumo, N. Y. Yu, J. M. Brown; Role of glutathione in the hypoxic cell cytotoxicity of misonidazole. *Br. J. Cancer* 43, 997-1002 (1983)
- [156] Peter Wardman, Eric D. Clarke; One-electron reduction potentials of substituted nitroimidazoles measured by pulse radiolysis. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.1*, 72, 1377-90 (1976)
- [157] G. E. Adams, I. R. Flockhart, C. E. Smithen, I. J. Stratford, P. Wardmann, M. E. Watts; Electron-affinic sensitization. VII. a correlation between structures, one-electron potentials, and efficiencies of nitroimidazoles as hypoxic radiosensitizers. *Radiation Research* 67, 9-20 (1976)

- [158] P. Goldman, R. L. Koch, T. C. Yeung, E. J. T. Chrystal, B. B. Beaulieu, M. A. MacLafferty, G. Sudlow; Comparing the reduction of nitroimidazoles in bacteria and mammalian tissues and relating it to biological activity. *Biochem. Pharmacol.* 35(1), 43-51 (1986)
- [159] G. E. Adams, I. J. Stratford, J. C. M. Bremner, S. Cole, H. S. Edwards, E. M. Fielden; Nitroheterocyclic compounds as radiation sensitizers and bioreductive drugs. *Radiother. Oncol. Suppl.* 20, 85-91 (1991)
- [160] A. Zahoor, R. C. Knight, P. Whitty, D. I. Edwards; Satranidazole: mechanism of action on DNA and structure-activity correlations. *J. Antimicrob. Chemother.* 18, 17-25, (1986)
- [161] J. M. Brown; Hypoxic cell-radiosensibilisation: Where next? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 987-93 (1989)
- [162] J. E. Biskupiak, K. A. Krohn; Editorial: Second generation hypoxia imaging agents. *J. Nucl. Med.* 34, 411 (1993)
- [163] M. I. Walton, R. Wolf, P. Workman, Molecular enzymology of the reductive bioactivation of hypoxic cell cytotoxins; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 983-86 (1989)
- [164] A. Nunn, K. Linder, H. W. Strauss; Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur. J. Nucl. Med.* 22, 265-80 (1995)
- [165] W. J. Koh, T. W. Griffin, J. S. Rasey, G. E. Laramore; Positron emission tomography. A new tool for characterization of malignant disease and selection of therapy. *Acta Oncol.* 33 323-7 (1994)
- [166] W. L. Rumsey, B. Patel, B. Kuczynski, R.K. Narra, Y-W. Chan, K. E. Linder, J. Cyr, N. Raju, K. Ramalingam, A. D. Nunn; Potential of nitroimidazoles as markers of hypoxia in heart. *Adv. Exp. Med. Biol.* 345, 263-70 (1994)
- [167] R. C. Urtasun, C. J. Koch, A. J. Franko, J. A. Raleigh, J. D. Chapman; A novel technique for measuring human tissue pO₂ at the cellular level. *Br. J. Cancer* 54, 453-57 (1986)
- [168] A. E. Brewster, J. L. Moore; O₂-levels in normal tissues; *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19(6), 1682 (1990)
- [169] C. J. Mathias, M. J. Welch, M. R. Kilbourn, P. A. Jerabek, T. B. Patrick, M. E. Raichel, K. A. Krohn, J. S. Rasey, D. W. Shaw; Radiolabeled hypoxic cell sensitizers: Tracers for assessment of ischemia. *Life Science* 41, 199-206, (1987)
- [170] K. E. Linder, Y. W. Chan, J. E. Cyr, D. P. Nowotnik, W. C. Eckelman, A. D. Nunn; Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of nitroimidazole-BATO complexes: new technetium compounds designed for imaging hypoxic tissue. *Bioconj. Chem.* 4, 326-33 (1993)
- [171] A. Hasan, C. R. Lambert, P. C. Srivastava; Synthesis and biological evaluation of 5-substituted-4-nitroimidazole ribonucleosides. *J. Heterocycl. Chem.* 27, 1877 (1990)
- [172] Z. Grunbaum, S. J. Freau, K. A. Krohn, D. S. Willbur, S. Magee, J. S. Rasey; Synthesis and characterization of congeners of misonidazole for imaging hypoxia. *J. Nucl. Med.* 28, 68-75, (1987)
- [173] L. I. Wiebe, D. C. Jette, J. D. Chapman; Electron-affinic compounds for labelling hypoxic cells: the synthesis and characterization of 1-[2-(2-iodophenoxy)-Ethyl]-2-nitroimidazole. *Nuklearmedizin* 23, 63-7 (1984)

- [174] D. C. Jette, L. I. Wiebe, R. J. Flanagan, J. Lee, J. D. Chapman; Iodoazomycin roboside (1-(5'-Iodo-5'-deoxyribofuranosyl)-2-nitroimidazole), a hypoxic cell marker. *Radiat. Res.* 105, 169-179, (1986)
- [175] R. H. Mannan, V. V. Somayaji, J. Lee, J. R. Mercer, J. D. Chapman, L. I. Wiebe; Radioiodinated 1-(5-Iodo-5-deoxy-β-D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazole (IAZA): a novel marker of tissue hypoxia. *J. Nucl. Med.* 32, 1764-1770 (1991)
- [176] R. H. Mannan, J. R. Mercer, L. I. Wiebe, V. V. Somayaji, J. D. Chapman; Radioiodinated 1-(2-Fluoro-4-iodo-2,4-dideoxy-β-L-xylopyranosyl)-2-nitroimidazole: a novel probe for the noninvasive assessment of tumor. *Radiat. Res.* 132, 368-74 (1992)
- [177] G. V. Martin, J. E. Biskupiak, J. H. Caldwell, J. S. Rasey, K. A. Krohn; Characterization of Iodovinylmisonidazole as a marker for myocardial hypoxia. *J. Nucl. Med.* 34, 918-924 (1993)
- [178] J. R. Mercer, L. I. Wiebe, J. D. Chapman; Non-invasive probes of tissue hypoxia: synthesis, radiolabelling and evaluation of hydroxyacetophenone derivatives of 2-nitroimidazole. *NucCompact* 22, 40-6 (1991)
- [179] M. B. Parliament, L. I. Wiebe, A. J. Franko; Nitroimidazole adducts as markers for tissue hypoxia: mechanistic studies in aerobic normal tissues and tumour cells. *Br. J. Cancer* 66, 1103-89 (1992)
- [180] R. H. Mannan, J. R. Mercer, L. I. Wiebe, P. Kumar, V. V. Somayaji, J. D. Chapman; Radioiodinated azomycin pyranoside (IAZPA): a novel non-invasive marker for the assessment of tumor hypoxia. *J. Nucl. Biol. Med.* 36, 60-7 (1992)
- [181] J. S. Rasey, Z. Grunbaum, S. Magee, N. J. Nelson, P. L. Olive, R. E. Durand, K. A. Krohn; Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. *Radiat. Res.* 111, 292-304, (1987)
- [182] J. S. Rasey, N. J. Nelson, L. Chin, M. L. Evans, Z. Grunbaum; Characteristics of the binding of labeled fluoromisonidazole in cells in vitro. *Radiat. Res.* 122, 301-8, (1990)
- [183] G. W. Goldstein, A. L. Betz; Die Blut-Hirn-Schranke. *Spektrum der Wissenschaft*, November 1986
- [184] P. A. Jerabek, T. B. Patrick, M. R. Kilbourn, D. D. Dischino, M. J. Welch; Synthesis and biodistribution of ¹⁸F-labeled fluoronitroimidazoles: potential *in vivo* markers of hypoxic tissue. *Appl. Radiat. Isot.* 37, 599-605, (1986)
- [185] T. J. McCarthy, C. S. Dence, M. J. Welch, Application of microwave heating to the synthesis of [¹⁸F]fluoromisonidazole. *Appl. Radiat. Isot.* 44, 1129-32 (1993)
- [186] J.-L. Lim, M. S. Berridge; An efficient radiosynthesis of [¹⁸F]fluoromisonidazole. *Appl. Radiat. Isot.* 44, 1085-91 (1991)
- [187] J. S. Rasey, W. J. Koh, J. R. Grierson, Z. Grunbaum, K. A. Krohn; Radiolabeled fluormisonidazole as an imaging agent for tumor hypoxia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 17, 985-91 (1989)
- [188] G. V. Martin, J. H. Caldwell, M. M. Graham, J. R. Grierson, K. Kroll, M. J. Cowan, Th. K. Lewellen, J. S. Rasey, J. J. Casciari, K. A. Krohn; Noninvasive detection of hypoxic myocardium using fluorine-18-fluoromisonidazole and positron emission tomography. *J. Nucl. Med.* 33, 2202-8 (1992)

- [189] M. E. Shelton, C. S. Dence, D.-R. Hwang, P. Herrero, M. J. Welch, St. R. Bergmann; In vivo delineation of myocardial hypoxia during coronary occlusion using fluorine-18 fluoromisonidazole and positron emission tomography: a potential approach for identification of jeopardized myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* **16**, 477 (1990)
- [190] P. E. Valk, C. A. Mathis, M. D. Prados, W. J. Jagust, T. F. Budinger; Demonstration of hypoxia in human gliomas by PET with F-18-fluormisonidazole. *J. Nucl. Med.* **32**, 955 (1991) No. 195
- [191] W. J. Koh, J. S. Rasey, M. L. Evans, J. R. Gierson, M. M. Graham, T. K. Lewellen, K. A. Krohn; Imaging human tumor hypoxia using [F-18]fluoromisonidazole. *J. Nucl. Med.* **32**, 955 (1991) No. 196
- [192] L. Zheng, C. Ma, T. J. McCarthy, M. J. Welch; Synthesis of 1-(2-Nitro-1-imidazolyl)-3-(2-[F-18]-fluoromethyl-1-aziridinyl)-2-propanol, a potential hypoxic radiosensitizer for PET. *J. Nucl. Med. Suppl.* **35**, 73P (1994)
- [193] T. C. Jenkins, M. A. Naylor, P. O'Neill, M. D. Threadgill, Sh. Cole, I. J. Stratford, G. E. Adams, E. M. Fielden, M. J. Suto, M. A. Stier; *J. Med. Chem.* **33**, 2603-610 (1990)
- [194] K. A. Skov; Toxicity of metal complexes with radiosensitizing properties. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 263-273 (1990)
- [195] P. H. Fackler, M. J. Lindsay, M. J. Clarke; Synthesis and structure of *trans*-[O₂(Im)₄Tc]Cl 2H₂O, *trans*-[O₂(1-meIm)₄Tc]Cl 3H₂O and related compounds. *Inorg. Chim. Acta* **109**, 39-49 (1985)
- [196] P. K. L. Chan, K. A. Skov, B. R. James; Further studies on toxic and radiosensitizing properties of ruthenium complexes of 4-nitroimidazoles. *Int. J. Radiat. Biol.* **52**, 49-55 (1987)
- [197] D. Parker; Targeting metal complexes. *Chem. Brit.* 818-22 (1994)
- [198] N. Raju, K. Ramalingam, D. P. Nowotnik; Synthesis of some nitroimidazole substituted boronic acids: precursors to Tc-99m complexes with potential for imaging hypoxic tissue. *Tetrahedron* **48**, 10233-38 (1992)
- [199] K. E. Linder, Y.-W. Chan, J. E. Cyr, M. F. Malley, D. P. Nowotnik, A. D. Nunn; TcO(PnAO-1-(2-nitroimidazole)) [BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization, and xanthine oxidase-catalyzed reduction. *J. Med. Chem.* **37**, 9-17 (1994)
- [200] W. L. Rumsey, B. Patel, B. Kuczyński, R. K. Narra, Y.-W. Chan, K. E. Linder, J. Cyr, N. Raju, K. Ramalingam, A. D. Nunn; Potential of nitroimidazoles as markers of hypoxia in heart. *Adv. Exp. Med. Biol.* **345**, 263-70 (1994)
- [201] W. L. Rumsey, J. E. Cyr, N. Raju, R. K. Narra; A novel [99m]technetium-labeled nitroheterocycle capable of identification of hypoxia in heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 1239 (1993)
- [202] K. Sasai, S.-I. Nishimoto, K. Shimokawa, Y. Hisanaga, Y. Kitakabu, Y. Shibamoto, L. Zhou, J. Wang, M. Takahashi, T. Kagiya, M. Abe; A fluorinated 2-nitroimidazole, KU-2285, as a new hypoxic cell radiosensitizer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **20**, 1249-54 (1991)
- [203] K. Sasai, H. Iwai, T. Yoshizawa, S.-I. Nishimoto, Y. Shibamoto, N. Oya, T. Shibata, M. Abe; Fluorinated 2-nitroimidazole derivative hypoxic cell radiosensitizers: radiosensitizing activities and pharmacokinetics. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **29**, 579-82 (1994)

- [204] R. J. Maxwell, P. Workmann, J. R. Griffiths; Demonstration of tumor-selective retention of fluorinated nitroimidazole probes by ^{19}F magnetic resonance spectroscopy *in vivo*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **16**, 925-29 (1989)
- [205] L. Kwock, M. Gill, H. L. McMurry, W. Beckman, J. A. Raleigh, A. P. Joseph; Evaluation of a fluorinated 2- nitroimidazole binding to hypoxic cells in tumor-bearing rats by ^{19}F magnetic resonance spectroscopy and immunohistochemistry *Radiat. Res.* **129**, 71-8 (1992)
- [206] R. J. Hodgkiss, A. C. Begg, R. W. Middleton, J. Parrick, M. R. L. Stratford, P. Wardman, G. D. Wilson; Fluorescent markers for hypoxic cells. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 533-41 (1991)
- [207] R. J. Hodgkiss, R. W. Middleton, J. Parrick, H. K. Rami, P. Wardman, G. D. Wilson; Bio-reductive fluorescent markers for hypoxia. *J. Med. Chem.* **35**, 1920-6 (1992)
- [208] R. J. Hodgkiss, G. W. Jones, A. Long, R. W. Middleton, J. Parrick, M. R. L. Stratford, P. Wardman, G. D. Wilson; Fluorescent markers for hypoxic cells: a study of nitroaromatic compounds, with fluorescent heterocyclic side chains, that undergo bio-reductive binding. *J. Med. Chem.* **34**, 2268-74 (1991)
- [209] J. Parrick, R. J. Hodgkiss, G. W. Jones, R. W. Middleton, H. K. Rami, P. Wardman; Fluorescent probes for hypoxia: chemical aspects. *Nato ASJ Ser. A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 249-262 (1990)
- [210] E. M. Lord, L. Harwell, C. J. Koch; Detection of hypoxic cells by monoclonal antibody recognizing 2-nitroimidazole adducts. *Cancer Res.* **55** 5721-6 (1993)
- [211] C. J. Koch, E. M. Lord; Detection of hypoxia. International patent application WO 94/11348 (1994)
- [212] J. M. Cline, D. E. Thrall, R. L. Page, A. J. Franko, J. A. Raleigh; Immunohistochemical detection of a hypoxia marker in spontaneous canine tumours. *Br. J. Cancer* **62**, 925-31 (1990)
- [213] J. A. Raleigh, G. G. Miller, A. J. Franko, C. J. Koch, A. F. Fuciarelli, D. A. Kelly; Fluorescence immunohistochemical detection of hypoxic cells in spheroids and tumours. *Br. J. Cancer* **56**, 395-400 (1987)
- [214] J. A. Raleigh, J. K. La Dine, J. M. Cline, D. E. Thrall; An enzyme-linked immunosorbent assay for hypoxia marker binding in tumours. *Br. J. Cancer* **69**, 66-71 (1994)
- [215] M. F. Dennis, M. R. L. Stratford, P. Wardman, M. E. Watts; Cellular uptake of misonidazole and analogues with acidic or basic functions. *Int. J. Radiat. Biol.* **47**, 629-43 (1985)
- [216] M. E. Watts, N. R. Jones; The effect of extracellular pH on radiosensitization by misonidazole and acidic or basic analogues. *Int. J. Radiat. Biol.* **47**, 645-53 (1985)
- [217] G. E. Adams, I. Ahmed, E. D. Clarke, P. O'Neill, J. Parrick, I. J. Stratford, R. G. Wallace, P. Wardman, M. E. Watts; Structure-activity relationships in the development of hypoxic cell radiosensitizers. III. Effects of basic substituents in nitroimidazole sidechains. *Int. J. Radiat. Biol.* **38**, 613-26 (1980)
- [218] P. Wardman, E. D. Clarke, I. R. Flockhart, R. G. Wallace; The rationale for the development of improved hypoxic cell radiosensitizers *Br. J. Cancer, Suppl. III* **37**, 1 (1978)
- [219] J. Kollonitsch in "Biomedical Aspects of Fluorine Chemistry". R. Filler, Y. Kobayashi, Edit., Kodansha Ltd., Tokio, Elsevier Biomedical, Amsterdam- New York Oxford (1982)

- [220] R. H. Gordonsmith, M. J. Raxworthy, P. A. Gulliver; *Biochem. Pharmacol.* **31**, 433 (1982)
- [221] K. C. Agrawal, C. A. Larroquette, P. K. Garag; Pharmacokinetic studies of amino acid analogues of 2-nitroimidazole. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **10**, 1301-5 (1984)
- [222] P. K. Garg, S. Garg, W. G. Degraff, M. R. Zalutsky, J. B. Mitchell; 4-Fluorobenzylamine and phenylalanine methyl ester conjugates of 2-nitroimidazole: evaluation as hypoxic cell radiosensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **22**, 593-96 (1992)
- [223] A. Long, J. Parrick, R. J. Hodgkiss; An efficient procedure for the 1-alkylation of 2-nitroimidazoles and the synthesis of a probe for hypoxia in solid tumours. *Synthesis* **9**, 709-13 (1991)
- [224] J. Mertens, M. Gysemans, C. Bossuyt-Piron, M. Thomas; High yields preparation of pure 2-radioiodo-ketanserin of high specific activity, a serotonin S2 receptor tracer for SPECT. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **28**, 731-37 (1990)
- [225] W. M. P. B. Menge, H. van der Goot, H. Timmerman, J. L. H. Eersels, J. D. M. Herscheid; Synthesis of S-[3-(4(5)-Imidazolyl)propyl-N-[2-(4-{¹²⁵I}-Iodophenyl)ethyl]isothiurea sulfate (¹²⁵I-Iodophenpropit), a new probe for histamine H₃ receptor binding sites. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **31**, 781-6 (1992)
- [226] H. Dougan, D. M. Lyster, J. S. Vincent, T. Rihela; Kit type labelling of [¹²³I]metaiodobenzylguanidine. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **25**, 531-44 (1988)
- [227] H.-F. Beer, S. Lin, I. Novak-Hofer, P. Bläuenstein, P. A. Schubiger; Large scale preparation strategy for labelling of [¹²³I]-SCH 23982, a dopamine D1 receptor binding agent. *Appl. Radiat. Isot.* **46**, 781-7 (1992)
- [229] M. Neves, A. Paulo, L. Patricio; A kit formulation of [¹³¹I]meta-iodobenzylguanidine (MIBG) using Cu(I) generated "in situ" by sodium disulphite. *Appl. Radiat. Isot.* **43**, 737-40 (1992)
- [230] C. J. Koch; The reductive activation of nitroimidazoles; modification by oxygen and other redox-active molecules in cellular systems. *Nato ASJ Ser A*, 198 (Sel. Act. Drugs Redox Processes) S. 237-248 (1990)
- [231] M. Tarle, R. Padovan, S. Spaventi; Preparation of 2- α -¹²⁵I₁-dihydrotestosterone by exchange labelling and direct radioiodination. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **16**, 177 (1979)
- [232] A. R. Fritzberg, D. Eshima; Iodophenylsulfonamide fatty acid analogs as potential myocardial imaging agents. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **33**, 451-3 (1982)
- [233] J. Mertens, M. Gysemans; Cu¹⁺ assists nucleophilic exchange radiohalogenation: Application and mechanistic approach. "New trends in radiopharmaceutical synthesis, quality assurance, and regulatory control" Edited by Ali M. Emran; Plenum Press, New York and London, S. 53-65 (1991)
- [234] Gmelins Handbuch der anorg. Chemie, 8. Auflage, Cu [B] 487 (1965)
- [235] Gmelins Handbuch der anorg. Chemie. 8. Auflage, Cu [B] 719 (1965)
- [236] Gmelins Handbuch der anorg. Chemie. 8. Auflage, Cu [B] 665 (1965)
- [237] S. M. Moerlein, H. H. Coenen; Regiospecific n.c.a.-radiobromination and radioiodination of aryltrimethyl-group IVb-organometallics. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 1941-7 (1985)

- [238] M. A. K. Markwell, C. F. Fox; *Biochemistry* **17**, 4807-17 (1978)
- [239] M. Holschbach, M. Schüller; *Appl. Rad. Isot.* **44**, 1129 (1993)
- [240] T. Aoyama, S. Terasawa, K. Sudo, T. Shioiri; *New methods and reagents in organic synthesis*. 46. Trimethylsilyldiazomethane: a convenient reagent for the O-methylation of phenols and enols. *Chem. Pharm. Bull.* **32(9)**, 3759-60 (1984)
- [241] N. Hashimoto, T. Aoyama, T. Shioiri; *New methods and reagents in organic synthesis*. 14. A simple and efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 1475-78 (1981)
- [242] M. R. Stratford; *Pharmacokinetics and subcellular localization of radiosensitizers*. *Br. J. Radiol. Suppl.* **24**, 100-4 (1994)
- [243] P. Workman; *Pharmacokinetics of hypoxic cell radiosensitizers*. *Cancer Clin. Trials* **3**, 237-51 (1980)
- [244] B. Mazière, R. Cantineau, H. H. Coenen, M. Guillaume, Ch. Halldin, A. Luxen, Ch. Loc'h, S. K. Luthra; *PET radiopharmaceutical metabolism- Plasma metabolite analysis*. Aus G. Stöcklin, V. W. Pike (eds.), *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography*, 151-178. Kluwer Academic Publishers (1993).
- [245] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego; *Purification of laboratory chemicals*; 3. Ed., Pergamon Press (1988)
- [246] K. H. Deimer; *Veresterung von Aminosäuren*; Houben Weyel, *Methoden der Org. Chem.*; *Synthese von Peptiden I*. Bd. 15.1, S.: 316, 356 (1974) Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- [247] H. Guhlke, Hausinterne Mitteilung, Institut für Nuklearchemie, Forschungszentrum Jülich GmbH
- [248] Jerry March; *Organic Chemistry*: 0-55 Acylation of Amines by Carboxylic Esters. Seite 421-24
- [249] *Inorganic Synthesis*, Chapter I, Copper(I) Chlorid;
- [250] M. Holschbach; Hausinterne Mitteilung, Institut für Nuklearchemie, Forschungszentrum Jülich GmbH
- [251] S. M. Qaim, Kalibrierung vom 07.08.1990; Institut für Nuklearchemie, Forschungszentrum Jülich GmbH

Anhang:

Abkürzungsverzeichnis

2NI	2-Nitroimidazol
abs.	absolutiert
AcOH	Essigsäure
BMS-181321	TcO(PnAO) = Oxo[[3,3,9,9-tetramethyl-1-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)-4,8-diazaundecan-2,10-dione dioximato] (3-)-N,N',N'',N''']technetium
Br-P2NI-Ba	N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-Br-D,L-phenylalaninbutylamid
Br-P2NI-Me	N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-Br-D,L-phenylalaninmethylester
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DHT	2,5-Dihydroxyterephthalsäure
DIPA	Diisopropylamin
DMF	Dimethylformamid
DMPU	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon (Dimethylpropylenharnstoff)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
F-Azomycin	1-(2-Fluorethyl)-2-nitroimidazol
FLAZP	1-(2-Fluor-4-iod-2,4-deoxy-β-L-xylopyranosyl)-2-nitroimidazol
FMeRSU-1069	1-(2-Nitroimidazol-1-yl)-3-(2-fluormethyl-1-aziridiny)-2-propanol
F-Metro	1-(2-Fluorethyl)-2-methyl-5-nitroimidazol
F-Miso	Fluormisonidazol = 1-(2-Nitroimidazol-1-yl)-3-fluor-2-hydroxypropan
HCR	Hypoxic cell Cytotoxicity Ratio; zur Bewertung der bioreduktiven Eigenschaften
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
¹ H-NMR	Meßwert der Protonenresonanz-Spektroskopie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatographie)
5'-IAZA	1-(5-Iod-5-deoxy-β-D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazol
IAZP	1-(4-Iod-4-deoxy-β-L-xylopyranosyl)-2-nitroimidazol
5'-IAZR	1-(5-Iod-5-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-2-nitroimidazol
I-MMT2NI	N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-I-O-methyl-α-methyl-D,L-tyrosinmethylester
I-MT2NI	N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-3-I-α-methyl-D,L-tyrosinmethylester
I-P2NI-Ba	N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-I-D,L-phenylalaninbutylamid
I-P2NI-Me	N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-p-I-D,L-phenylalaninmethylester
IPENI	1-[2-(2-Iodphenoxy)-ethyl]-2-nitroimidazol
IpOH	Isopropanol
IR	Meßwert der Infrarot-Spektroskopie
Kryptofix®2.2.2.	4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosan
MOH	Methanol
MT2NI	N-[2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-acetyl]-α-methyl-D,L-tyrosinmethylester
n.c.a.	no carrier added
PET	Positronen-Emissionstomographie

pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RCA	radiochemische Ausbeute (Angaben in [%])
s.	siehe
SER	Sensitizer Enhancement Ratio; zur Bewertung der radiosensibilisierenden Eigenschaften
s. o.	siehe oben
SPET	Einzel-Photonen-Emissionstomographie
s. u.	siehe unten
Titriplex VII	N-(2-Hydroxyethyl)-ethylendiamin-N,N',N'-triessigsäure- trisatrium-Salz
TMP	2,2,6,6 Tetramethylpiperidin
TMS-DA	Trimethylsilyldiazomethan
zer.	Zersetzung
ZS	Zitronensäure Monohydrat

Pharmakokinetiken der Organverteilung der untersuchten Radiotracer in der Maus

Tab. A-1 Ergebnisse der Pharmakokinetik und Verteilung von ¹³¹I-P2NI-Me in der Maus

	5 min	10 min	15 min	20 min	60 min	120 min
¹³¹ I-P2NI-Me	Angaben in [%-Gesamtdosis/g-Organ]					
Hirn	0,76	0,49	0,29	0,26	0,13	0,06
Leber	7,8	4,51	4,15	3,33	1,47	0,62
Blut	11,03	10,86	9,23	7,52	3,58	1,57
Herz	2,72	3,59	2,63	2,32	1,09	0,48
Schilddrüse	8,21	12,93	10,88	7,82	8,25	4,44
Nieren	26,4	11,79	7,9	10,09	2,99	1,51
Urin	203,05	2048,67	653,67	565	218,69	106,88

Tab. A-2 Ergebnisse der Pharmakokinetik und Verteilung von ¹³¹I-P2NI-Ba

	5 min	10 min	20 min	60 min	120 min
¹³¹ I-P2NI-Ba	Angaben in [%-Gesamtdosis/g-Organ]				
Hirn	0,18	0,22	0,24	0,30	0,25
Pankreas	4,87	2,6	1,33	1,01	0,93
Leber	32,42	21,48	11,97	7,87	6,87
Blut	2,93	1,73	1,25	0,81	0,81
Herz	3,75	1,92	1,03	0,47	0,39
Schilddrüse	3,86	3,94	5,11	8,63	22,22
Ges.Darm	20,58	21,96	26,23	40,47	32,98
Nieren	17,52	10,99	4,96	1,84	1,33
Urin	178,13	355,9	536,99	236,75	157,65
Fett	1,18	0,82	0,54	0,19	0,11

Tab. A.-3 Ergebnisse der Pharmakokinetik und Verteilung von ^{131}I -MMT2NI in der Maus

	2 min	5 min	20 min	120 min
^{131}I -MT2NI	Angaben in [%-Gesamtdosis/g-Organ]			
Hirn	0,13	0,13	0,04	0,07
Pankreas	7,29	4,77	1,28	0,07
Leber	21,6	11,43	6,43	0,25
Blut	2,66	1,68	0,24	0,05
Herz	5,53	2,89	0,29	0,04
Schilddrüse	3,59	2,56	2,56	0,84
Ges.Darm	5,99	1015	29,4	23,92
Nieren	23,94	14,11	1,58	0,31
Urin	237,14	250,38	225,95	30,97
Fett	-	0,65	-	0,02
Hypophyse	3,9	-	16,9	-
Nebennieren	5,56	-	1,75	-

Tab. A.-4 Ergebnisse der Pharmakokinetik und Verteilung von ^{131}I -MMT2NI in der Maus

	2 min	5 min	10 min	120 min
^{131}I -MMT2NI	Angaben in [%-Gesamtdosis/g-Organ]			
Hirn	0,52	0,38	0,14	0,01
Pankreas	7,55	4,29	1,47	0,41
Leber	17,69	19,64	6,67	2,3
Blut	2,73	1,44	0,74	0,07
Herz	4,7	2,7	0,75	0,11
Schilddrüse	3,22	1,77	1,19	13,83
Ges.Darm	7,47	10,32	27,69	36,72
Nieren	13,49	9,24	3,69	0,26
Urin	37,32	53,17	71,31	52,39
Hypophyse	6,38	5,55	9,14	16,29
Nebennieren	6,79	5,5	2,03	1,28

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Stöcklin danke ich für die interessante Themenstellung, die begleitenden konstruktiven Diskussionen und die vielfältigen Anregungen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die Schaffung der ausgezeichneten wissenschaftlichen und materiellen Rahmenbedingungen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. M. Holschbach möchte ich besonders für die Betreuung, die vielfältigen Anregungen und ausführlichen Diskussionen sowie das motivierende, offene Arbeitsklima danken.

Herrn Dr. K. Hamacher danke ich für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn W. Wutz und Herrn D. Unterlugauer gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen und der spektroskopischen Messungen.

Mein genereller Dank gilt allen Mitarbeitern und Kommilitonen des Institutes für Nuklearchemie, die durch ihre Hilfsbereitschaft und ihrer kollegialen herzlichen Haltung zu einem produktiven Arbeitsklima beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meinem Vater bedanken, der mir das Studium und diese Arbeit ermöglicht hat.

Jül-3162
Dezember 1995
ISSN 0944-2952