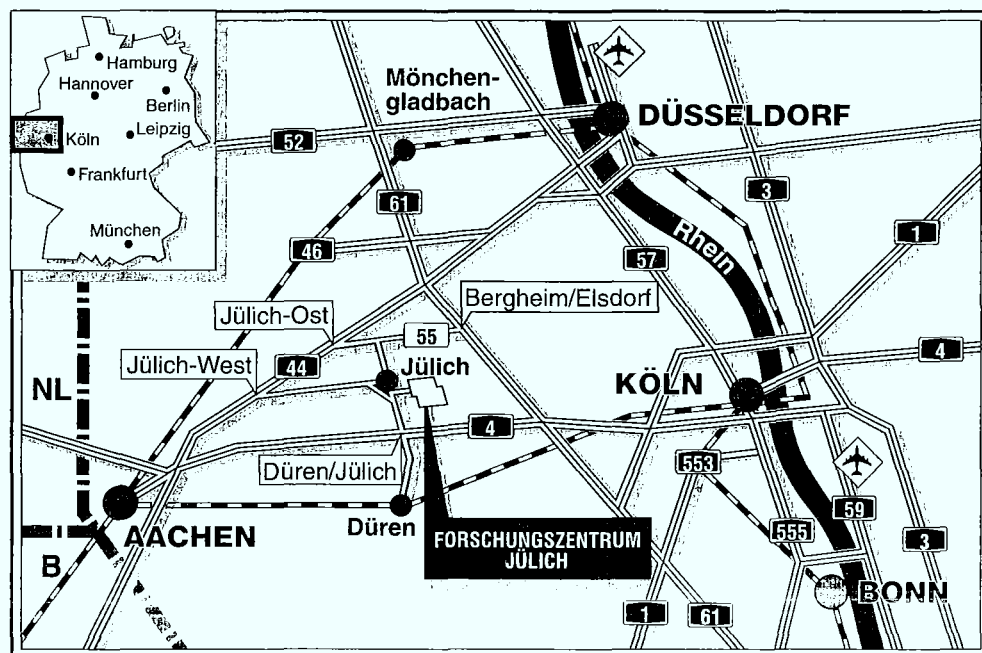


Institut für Nuklearchemie

**Untersuchungen zur Synthese und
Stabilität radiopharmazeutisch
relevanter Metall-Chelat-Peptid-Systeme**

Jörg Brockmann



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3316

ISSN 0944-2952

Institut für Nuklearchemie Jül-3316

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

**Untersuchungen zur Synthese und
Stabilität radiopharmazeutisch
relevanter Metall-Chelat-Peptid-Systeme**

Jörg Brockmann

Abstract

Labelling of bioactive molecules with radioactive metal-ions is one major field of chemistry engaged in nuclear medicine. In most cases radiolabelling with radiometals requires multidentate ligands to obtain high in vivo stabilities of the radiopharmaceuticals.

In this work two important aspects of metal-ligand-linker-peptide-systems were explored. First the ^{88}Y -DTPA-peptide-system was investigated with regard to complexation kinetics, stability constants and lipophilicity to obtain information about the radiodiagnostic ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotide and the potential endotherapeutic ^{90}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotide. The second aspect includes the insertion of different linker structures in [DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotide type radiopharmaceuticals to modify its pharmacokinetic properties.

Initially four DTPA-peptides containing phenylalanine as N-terminal amino acid were synthesised via the bisanhydride method. The decomplexation kinetics of these ^{88}Y -DTPA-peptides were determined by using the isotopic exchange method. The decomplexation kinetics of the Y-DTPA-peptide-system were shown to be independent of competing metal-ions. It is mostly affected by the pH of the solution in a multistep manner but should be nearly inert against decomplexation under physiological conditions (pH 7.4). To calculate thermodynamic stability constants of multidentate ligands attached to peptides or proteins a novel route was developed. This calculation mode is based on ligand-ligand-exchange reactions with small amounts of the metal-ion taking the advantage to measure activity ratios using carrier-free ^{88}Y . Furthermore the protonation constants of the basic sites of the chelator were determined along these reactions. The calculated stability constant of Y-DTPA-peptides ($\log \beta$ approx. 19.0 ± 0.5) and ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotide ($\log \beta = 19.25 \pm 0.05$) are in good accordance to values determined by standard methods. In animal studies with tumour bearing rats the applicability of ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotide as a PET-tracer for somatostatin receptor scintigraphy was tested. Although the Octreotide derivative has high receptor affinity the release of the metal-ion in vivo lead to high bone uptake and the low lipophilicity of the tracer to a high kidney accumulation.

For the second Octreotide derivative ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotide a higher in vivo stability was expected. To affect the pharmacokinetic properties of ^{67}Ga -DFO labelled Octreotides a synthesis route was developed for insertion of variable linkers instead of succinic acid. Different disuccinimidyl esters of dicarboxylic acids were tested for conjugation of ^{67}Ga -DFO to peptides. Applying these reaction conditions, ^{67}Ga -[DFO-B-glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotide and ^{67}Ga -[DFO-B-suberyl-(D)Phe¹]-Octreotide were synthesised. Increasing lipophilicity of these compounds reduced their kidney accumulation. Interestingly for the glutaryl derivative a higher hydrophilicity ($\log P = -1.85$) was measured compared to the succinyl form ($\log P = -1.56$). In a rat model the three different ^{67}Ga -DFO-Octreotides showed high uptake in organs with expected large amounts of somatostatin receptors but different kidney-to-liver excretion ratios depending on their lipophilicity.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Entwicklung der Nuklearmedizin	1
1.2.	Radionuklide für die nuklearmedizinische Diagnostik	2
1.3.	Die Verwendung metallischer Radionuklide	3
1.4.	Chemische Anwendungsformen von Radiometallen	6
1.5.	Metall-Ligand-Peptid- bzw. Proteinstrukturen	6
1.6.	Bifunktionelle Liganden	9
1.7.	Kopplung von Radiometallen an biologisch aktive Moleküle	9
1.8.	Medizinische Anforderungen an Metall-Chelat-Biomolekül-Systeme	12
1.9.	Physikochemische Beurteilung von Metall-Chelat-Biomolekül-Systeme	13
1.10.	Messung physikochemischer Parameter von Metall-Chelat-Biomolekülen	15
2.	Problemstellung	17
3.	Theoretische Überlegungen zur Aufklärung von Mechanismen in der Koordinationschemie	20
3.1.	Komplexierung im wäßrigen Medium	21
3.1.1.	Komplexierung im sauren Medium	21
3.1.2.	Komplexierung im alkalischen Medium	22
3.2.	Methoden zur Bestimmung von Kinetik und Stabilitätskonstanten im Komplexeleichgewicht	24
3.2.1.	Kinetik	24
3.2.2.	Stabilitätskonstanten	26
3.2.3.	Neue Methodik zur Berechnung von Stabilitätskonstanten	29
4.	Experimentelles	34
4.1.	Radionuklide	34
4.1.1.	$^{86}\text{Y}/^{88}\text{Y}$	34
4.1.2.	^{67}Ga	35
4.2.	Darstellung der Ligand-Peptid-Systeme	36
4.2.1.	Synthese von DTPA-Peptiden	37
4.2.1.1.	DTPA-Phe-Gly-Gly-OH	37
4.2.1.2.	DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly, DTPA-Phe-Trp, DTPA-Phe-Tyr-NH ₂	37
4.2.1.3.	[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid (SDZ 215-811)	38
4.2.2.	[DFO-B-Glutaryl-(D)Phe ¹]-Octreotid	39

4.2.3.	[DFO-B-Suberyl-(D)Phe ¹]-Octreotid	39
4.3.	Radioaktive Markierung von Chelat-Peptiden mit ^{88/86} Y, ⁶⁷ Ga	40
4.4.	Chromatographie der Radiometall-Chelat-Peptid-Systeme	41
4.4.1.	HPLC und Radio-HPLC	41
4.4.2.	Radiodünnschichtchromatographie	41
4.4.3.	Radiopapiererelektrophorese	42
4.5.	Meßmethoden	42
4.5.1.	Arbeiten unter inerten Bedingungen	42
4.5.2.	Messung von Komplexbildungskinetiken	44
4.5.3.	Messung von Komplexstabilitäten	44
4.5.4.	Aktivitätsmessungen	45
4.5.5.	pH-Messung	45
4.6.	Radiopharmakologische Untersuchungen	48
4.6.1.	Bestimmung der Lipophilie von ⁶⁷ Ga-[DFO-B-Linker-(D)Phe ¹]-Octreotiden und ⁸⁸ Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid	48
4.6.2.	Bestimmung der metabolischen Stabilität in Blut, Leber, Urin, Pankreas und Tumor	48
4.6.3.	Durchführung tierexperimenteller Studien	48
5.	Ergebnisse und Diskussion	50
5.1.	Untersuchungen am DTPA-Peptid-System	50
5.1.1.	Einfluß der Edukt-Konzentrationen auf das cross-linking	51
5.1.2.	Markierung der DTPA-Peptide mit ^{86/88} Y	52
5.1.3.	Komplexbildungskinetik von DTPA-Peptiden mit ⁸⁸ Y	54
5.1.3.1.	Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y ³⁺ von der Konzentration überschüssiger Metall-Kationen	56
5.1.3.2.	Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y ³⁺ von der Konzentration an Y-DTPA-Phe-Gly-Gly	58
5.1.3.3.	Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y ³⁺ vom pH-Wert der Lösung und unterschiedlichen ionischen Zusätzen	60
5.1.3.4.	Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y ³⁺ von der Temperatur	68
5.1.3.5.	Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y ³⁺ von der Ionenstärke	72
5.1.3.6.	Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y ³⁺ von der Peptidsequenz	75
5.2.	Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten von DTPA-Peptiden	77
5.2.1.	Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten von DTPA-Phe-Gly-Gly-COOH	78

5.2.2.	Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten von DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly-COOH, DTPA-Phe-Tyr-NH ₂ und DTPA-Phe-Trp-COOH	81
5.2.3.	Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von DTPA-Peptiden durch potentiometrische Titration	83
5.2.4.	Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von DTPA-Peptiden durch Ligandenverdrängung	86
5.2.5.	Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von DTPA-Phe-Gly-Gly	87
5.2.6.	Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von Y-DTPA-Phe-Trp und Y-DTPA-Phe-Tyr-NH ₂	91
5.2.7.	Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid	95
5.3.	Bestimmung der Lipophilie von ⁸⁸ Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid	98
5.4.	Zusammenfassende Beurteilung der DTPA-Peptid-Systeme	99
5.5.	Untersuchungen am DFO-B-Linker-Peptid-System	103
5.5.1.	Synthese von DFO-B-gekoppelten Modell-Peptiden mit Disuccinimidylestern als variable Linker	104
5.5.2.	Abhängigkeit der Reaktion von Disuccinimidylestern mit Peptiden vom Eduktverhältnis	105
5.5.3.	Darstellung verschiedener ⁶⁷ Ga-[DFO-B-Linker-(D)Phe ¹]-Octreotide im Vergleich zu ⁶⁷ Ga-[DFO-B-Succinyl-(D)Phe ¹]-Octreotid	107
5.5.4.	Darstellung von [DFO-B-Glutaryl-(D)Phe ¹]-Octreotid	109
5.5.5.	Markierung von [DFO-B-Linker-(D)-Phe ¹]-Octreotiden mit ⁶⁷ Ga	112
5.5.6.	Bestimmung der Lipophilie verschiedener ⁶⁷ Ga-[DFO-B-Linker-(D)Phe ¹]-Octreotide	113
6.	Tierexperimentelle Studien	116
6.1.	in vivo-Untersuchungen mit ^{86/88} Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid ([^{86/88} Y]SDZ 215-811)	116
6.1.1.	Bestimmung der ex vivo-Bioverteilung von ⁸⁸ Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid am Rattenmodell	116
6.1.2.	Pharmakokinetik von ⁸⁶ Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid mittels quantitativer Messungen am Positronenemissionstomographen	118
6.1.3.	in vivo-Stabilität von ⁸⁸ Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid	120
6.1.4.	Untersuchungen an ⁸⁸ Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid zur Minderung der ⁸⁸ Y-Hintergrund-Aktivität	121

6.2.	Bioverteilung von ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe ¹]-Octreotid, ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl-(D)Phe ¹]-Octreotid und ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl-(D)Phe ¹]-Octreotid	122
6.2.1.	ex vivo-Bioverteilung von ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe ¹]-Octreotid in Tumor-tragenden Ratten	122
6.2.2.	in vivo-Stabilität von ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe ¹]-Octreotid	123
6.2.3.	ex vivo-Bioverteilung von ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl-(D)Phe ¹]-Octreotid und ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl-(D)Phe ¹]-Octreotid	124
6.3.	Vergleichende Übersicht über die untersuchten Octreotid-Derivate sowie kritische Betrachtungen der Ergebnisse	125
7.	Zusammenfassung	129
8.	Abkürzungsverzeichnis	134
9.	Literaturverzeichnis	136

1. **Einleitung**

1.1. **Die Entwicklung der Nuklearmedizin**

Die nuklearmedizinischen Ursprünge gehen bis auf Georg de Hevesy zurück [1]. 1913 führte er in die Biowissenschaft das „Tracer-Prinzip“ ein, in dem radioaktive Isotope dazu verwendet werden, das Verhalten stabiler Isotope in chemischen und biologischen Prozessen nachzuvollziehen. Die ersten „Radioindikatoren“ waren die natürlich vorkommenden Radioisotope des Radium und Radon. Durch die Entwicklung des Zyklotrons von E.O. Lawrence (1931) [2] konnten weitere Radioisotope hergestellt und die nuklearmedizinischen Anwendungen ausgedehnt werden.

Hevesy's Untersuchungen mit dem *Tracer*-Prinzip deckten das Wesen des lebenden Organismus auf, wonach er sich in einem kontinuierlichen Prozeß chemischer Umwandlungen befindet, die durch ein empfindliches Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau charakterisiert sind. Radiotracer machten es somit auch möglich, Krankheit als Folge physiologischer und biochemischer Prozesse zu definieren. Neben der rein strukturellen Darstellung der Organe dienten radioaktive *Tracer* zunehmend zur Aufklärung funktioneller Zusammenhänge.

Die große Entwicklung der Nuklearmedizin begann dann nach dem zweiten Weltkrieg, als ^{14}C und Tritium allen wissenschaftlichen Einrichtungen zur Verfügung stand. Durch Radionuklidproduktion in Kernreaktoren stand neben den Beschleunigern eine alternative Quelle zur Herstellung neuer Isotope zur Verfügung. Dies eröffnete eine neue medizinische Disziplin, die zuerst als „atomare Medizin“ eingeführt wurde und heute die Nuklearmedizin darstellt.

In den 60er Jahren begann dann die „Renaissance“ des Zyklotrons. Neutronenarme Nuklide wie ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O sollten zur Aufklärung schneller physiologischer Prozesse eingesetzt werden. In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von kurzlebigen Positronen- als auch γ -Emittern zugänglich.

Aus diesen, und den Entwicklungen der Computertomographie entstanden zwei bildgebende Verfahren, die Single Photon Emissions-Tomographie (SPET) und die Positronen Emissions-Tomographie (PET), die heute wichtige Techniken in der nuklearmedizinischen Diagnostik darstellen. Darüber hinaus ist die Nuklearmedizin auch an endoradiotherapeutischen Ansätzen interessiert, die heute bereits für einige Anwendungen etabliert sind, für die Zukunft jedoch breitere Perspektiven bieten.

1.2. Radionuklide für die nuklearmedizinische Diagnostik

Die emissionstomographische Diagnose normaler und gestörter Stoffwechselvorgänge vor allem in der Neurologie, Kardiologie und Onkologie wird durch die beiden bildgebenden Verfahren PET und SPET ermöglicht. Die PET nutzt die Annihilationsstrahlung eines Positrons (β^+), die aus der Vernichtung eines Positrons mit einem Elektron unter Aussendung zweier 511 keV γ -Quanten unter einem Winkel von 180° resultiert. Durch γ - γ -Koinzidenz-Messung mittels hunderter, ringförmig angeordneter BGO-Kristalle kann die winkelabhängige Emission zur Bestimmung ortsabhängiger Aktivitätsverteilungen genutzt werden [3]. Die Aktivitätsverteilung mit Ortsauflösungen von 4-6 mm kann anschließend rechnerisch zur Bildgebung als auch - dank der Möglichkeit von Attenuations-Messungen - zur Quantifizierung der dynamischen Aktivitätsakkumulationen verwendet werden [cf. 4,5,6]. Die Single Photon Emissions-Tomographie nutzt die γ -Emission bei Elektronen-Einfang (EC) bzw. Innerer Konversion (IT). Die γ -Energie sollte bei 100 - 300 keV liegen, da in diesem Bereich die Ansprechwahrscheinlichkeit der verwendeten NaI-Detektor-Systeme am größten ist. Die γ -Emission dieser Kernumwandlungen ist jedoch nicht winkelkorreliert - demnach die Ortsauflösung schlechter (8-20 mm) und die Quantifizierung schwieriger rechnerisch anzupassen als bei PET. SPET-Tomographen neuerer Bauart sind deshalb mit rotierenden Detektoren ausgestattet, die eine semi-quantitative Berechnung der Aktivitätsanreicherung erlauben (zur Übersicht [cf. 7,8,9]) .

Voraussetzung für die Anwendung dieser Verfahren ist die Verfügbarkeit von geeigneten Radionukliden [cf. 10,11,12] sowie die Bereitstellung geeigneter endogener und exogener Substrate [cf. 13,14]. Kriterien für die Auswahl eines Radionuklides sind Zerfallsart und Zerfallsenergie sowie physikalische Halbwertszeit. Für ein geeignetes diagnostisches Konzept müssen diese Parameter mit den Syntheseanforderungen und biologischen Eigenschaften der Radiopharmaka korreliert werden. In Tabelle 1.1. sind einige medizinisch relevante Radionuklide zusammengefaßt.

Tabelle 1.1. Radionuklide für die Diagnostik

Nuklid		Halbwertszeit $T_{1/2}$	Zerfallsart [Häufigkeit]	E_{β^+max} [keV]	Haupt- γ -Linien [keV]
PET	^{11}C	20.4 min	β^+ [99.8%]	960	511 [199.6%]
	^{13}N	9.96 min	β^+ [100%]	1190	511 [200%]
	^{15}O	2.03 min	β^+ [99.9%]	1723	511 [200%]
	^{18}F	109.7 min	β^+ [96.9%]	635	511 [193.8%]
	^{62}Cu	9.7 min	β^+ [98%]	2930	511 [196%]
	^{68}Ga	68.3 min	β^+ [88%]	1900	511 [176%], 1077 [3%]
	^{73}Se	7.1 h	β^+ [65%]	1300	511 [130%], 361 [97.1%]
	^{75}Br	97 min	β^+ [75.5%]	1740	511 [151%], 286 [91.6%]
	$^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$	25 d/1.3 min	EC/ β^+ [100%/96%]	3400	511 [192%], 776 [13.4%]
	^{86}Y	14.7 h	β^+ [34%]	1200	511 [68%]; 1077 [2.3%]
	^{94m}Tc	52 min	β^+ [11%]	820	511 [22%]; 871 [80%]
	^{124}I	4.18 d	β^+ [25%]	2140	511 [50%]; 603 [36%]
SPET	^{99m}Tc	6.01 h	IT [>95%]		141 [87%]
	^{123}I	13.27 h	EC		159 [97%]
	^{201}Tl	71.1 h	EC		167 [44%]; 135 [11%]
	^{67}Ga	78.3 h	EC		93 [53%]; 184 [23%]
	^{97}Ru	69.2 h	EC		216 [88%]; 325 [11%]
	^{111}In	67.9 h	EC		245 [94%]; 171 [100%]

1.3. Die Verwendung metallischer Radionuklide

In der Entwicklung geeigneter Radiopharmaka sind aus chemischer Sicht zwei Teilgebiete zu unterscheiden. Die in Tabelle 1.1. aufgeführten Positronen-Emitter ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O und ^{18}F sowie das SPET-Nuklid ^{123}I gehören zu den am meisten genutzten Radionukliden [cf. 15]. Der große Vorteil dieser Nuklide liegt in der identischen bzw. analogen Substitution ihrer stabilen Isotope in interessanten Biomolekülen. Ein negativer Faktor gerade bei der Verwendung von ^{11}C , ^{13}N und ^{15}O ist die kurze Halbwertszeit dieser Nuklide mit dadurch limitiertem zeitlichen Umfang für den Syntheseweg der Radiopharmaka sowie für die zu untersuchenden medizinischen Prozesse ($T_{1/2}(\text{bio})$ vs. $T_{1/2}(\text{phys})$). Ein zweiter besteht in der Anwendungslogistik, die für die Synthese der Radionuklide als auch der Pharmaka die lokale Nähe zu medizinischen Einrichtungen verlangt.

Diesen „organischen“ Nukliden steht eine größere Auswahl an metallischen Nukliden gegenüber [cf. 16]. Metallische Radionuklide können aus nuklearmedizinischer als auch kommerzieller Sicht mehrere Defizite der „organischen“ Nuklide ausgleichen.

Für pharmakologische Prozesse, deren zeitlicher Verlauf sich über Stunden oder sogar Tage erstreckt, sowie in Fällen, wo günstige Organ-zu-Hintergrund-Verhältnisse sich erst nach 24 bis 72 h einstellen, sind die Halbwertszeiten der „organischen“ Radionuklide (mit Ausnahme der Iod-Isotope, deren Markierung jedoch häufig in vivo nicht ausreichend stabil ist) zu kurz. Aus der großen Anzahl metallischer Radionuklide mit günstigen Zerfallsparametern läßt sich dagegen praktisch für jeden benötigten Meßzeitraum das geeignete Nuklid finden [cf. 17,18]. Die längeren Halbwertszeiten einiger dieser Isotope ermöglichen außerdem eine bessere Kommerzialisierung von Radiopharmaka, da Produktions- und Anwendungsstätten nicht in unmittelbarer Nähe liegen müssen, wodurch der Investitionsbedarf für technische Anlagen zur Radionuklidproduktion als auch die Bereitstellung von know how und Personal entfallen.

Unter den metallischen Radionukliden nimmt das ^{99m}Tc eine Sonderstellung ein [cf. 19]. Diese wird zwar durch die Umwandlungsparameter (geeignete γ -Linie von 141 keV bei einer Halbwertszeit von 6 Stunden) begründet; wesentlicher Vorteil dieses Nuklides ist aber vor allem seine kommerzielle Verfügbarkeit als Generator-System. ^{99m}Tc ist das Tochternuklid von ^{99}Mo , welches in Kernreaktoren produziert werden kann. 1958 wurde im Brookhaven National Laboratory ein Generatorsystem entwickelt, in dem ^{99}Mo auf einer Al_2O_3 -Festphase fixiert wurde. Das aus dem Zerfall des ^{99}Mo ($T_{1/2} = 66 \text{ h}$) gebildete ^{99m}Tc kann nach Zeitabständen von $t_{\text{optimal}} = 23 \text{ h}$ von dieser Phase „gemolken“ werden [20]. Dieses „verschickbare“ Generatorsystem bietet somit die Möglichkeit, an jeder Klinik auch ohne radionuklidproduzierende Großanlagen über ^{99m}Tc -Pharmaka zu verfügen.

Über diese eher praktischen Vorteile für die direkte tomographische Anwendung hinaus eröffnen metallische Radionuklide Einblicke in ein neues interessantes Gebiet, daß den organischen Nukliden verborgen bleibt [cf. 21,22]: Nach dem *Tracer*-Prinzip von Hevesy können Metallkationen, deren Beteiligung an einer Vielzahl biologischer Prozesse nachgewiesen ist, durch ihre radioaktiven Isotope substituiert werden, um bioanorganische Mechanismen aufzuklären.

Der Vorteil der metallischen Radionuklide wird schließlich am deutlichsten bei dem Schritt von der diagnostischen zur therapeutischen Anwendung. Der LET (linear energy transfer) und damit der therapeutische Nutzen eines Radionuklides wird in erster Linie durch die Art und Energie der emittierten Teilchen, die Halbwertszeit und die begleitende γ -Strahlung bestimmt. Die Auswahl, ob α -, β^- oder Auger-Elektronen-Emitter diese Kriterien erfüllen, wird in erster Linie durch die Energie-Reichweite-Korrelation für einen bestimmten pathologischen Status einer Krankheit bestimmt.

In Tabelle 1.2. sind einige therapeutischer Radiometalle sowie deren Zerfallsparameter und durchschnittliche Emissionsreichweiten im Gewebe aufgelistet [23]. Zusätzlich wurde

mit ^{131}I ein therapiefähiges „organisches“ Radionuklid in die Tabelle aufgenommen [cf. 24,25,26,27].

Tabelle 1.2. Wichtige β^- - bzw. α -emittierende Radionuklide für die Endoradiotherapie

Radionuklid	Halbwertszeit [h]	$E_{\max} \beta^- / \alpha$ [MeV]	mittlere Reichweite [mm]	γ -Linie [keV] [Häufigkeit]
^{32}P	342	β^- [1.71]	1.85	
^{67}Cu	62	β^- [0.57]	0.27	92 [11%]; 185 [49%]
^{90}Y	64	β^- [2.27]	2.76	
^{131}I	193	β^- [0.61]	0.40	364 [81%]
^{153}Sm	47	β^- [0.80]	0.53	103 [28%]
^{177}Lu	162	β^- [0.50]	0.28	113 [6.4%]; 208 [11%]
^{186}Re	89	β^- [1.07]	0.92	137 [9%]
^{188}Re	17	β^- [2.12]	2.43	155 [15%]
^{211}At	7.2	α [5.87]	0.06	670 [0.3%]
^{212}Bi	1.0	β^- [1.36]		727 [7%]
		α [6.09]	0.06	

Die meisten Radionuklide aus Tabelle 1.2. weisen neben der für die Endoradiotherapie günstigen Teilchenemission eine für die Diagnostik geeignete γ -Linie auf, die die Boverteilung in vivo sichtbar machen könnten. Vielversprechender Kandidat bei der Entwicklung neuer Radiotherapeutika ist das ^{90}Y , welches neben den günstigen Zerfallsparametern außerdem in Form eines Generator-Systems ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) zur Verfügung steht [28]. Da in diesem Fall jedoch keine begleitende γ -Emission gemessen werden kann, ist eine simultane Diagnostik nur schlecht durchzuführen. Dieses Problem kann durch eine Substitution mit ^{86}Y (Tabelle 1.1.) umgangen werden [29]. Durch die Quantifizierung der Aktivitätsakkumulation analoger ^{86}Y -Diagnostika mittels PET ist es darüber hinaus möglich, vorab exakte dosimetrische Berechnungen für den therapeutischen Einsatz des ^{90}Y -Analogons vorzubereiten.

Zusammenfassend bieten metallische Radionuklide für spezielle Fragestellungen sehr gute medizinische Eigenschaften für die Radiodiagnostik und besonders für die Radiotherapie.

1.4. Chemische Anwendungsformen von Radiometallen

Die chemische Form, in der metallische Radionuklide zur Anwendung kommen, hängt in erster Linie von der Problemstellung ab. Man kann unterscheiden in Metall-Kationen, Komplexe, Partikel und markierte Biomoleküle.

Metall-Kationen: Die direkte Nutzung der Metall-Kationen ist auf wenige Metalle beschränkt. Als Vertreter dieser chemischen Form finden $[^{38}\text{K}]\text{K}^+$, $[^{201}\text{Tl}]\text{Tl}^+$ und $[^{82}\text{Rb}]\text{Rb}^+$ als myocardiale Blutfluß-*Tracer* [cf.30] und $[^{89}\text{Sr}]\text{Sr}^{2+}$ als Nuklid für die palliative Therapie von Knochenmetastasen Anwendung [cf.31].

Metall-Komplexe: Die Anwendungsbeispiele für reine Metall-Komplexe sind aufgrund der unspezifischen Wirkungsweise dieser Radiopharmaka gering. Zwei wichtige Vertreter sind die Citrat-Komplexe des ^{67}Ga und $^{86/90}\text{Y}$. ^{67}Ga -Citrat kann als Tumormarker über einen Transferrin-gekoppelten Mechanismus [cf. 32] eingesetzt werden, während $^{86/90}\text{Y}$ -Citrat in der Diagnose bzw. Endoradiotherapie von Knochenmetastasen Anwendung findet [cf. 33]. Eine Sonderstellung nehmen die vielfältigen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Komplexe ein, die vor allem als myocardiale und cerebrale Blutfluß-*Tracer* große kommerzielle Verwendung besitzen.

Metall-Partikel: Dieser therapeutische Ansatz ist auf Anwendungen beschränkt, in denen die applizierte Aktivität direkt durch Injektion an ihren Wirkort gebracht werden kann und dort in einem engen lokalen Bereich verbleibt. Zur Therapie von rheumatischen Gelenkerkrankungen werden je nach Größe des Gelenkes β^- -Emitter entsprechend ihrer Energie-Reichweite-Beziehung eingesetzt. Die Metalle werden in Form von Kolloiden, Glasmikrosphären, Makroaggregaten, Ionenaustauschpartikeln und Hydroxylapatit eingesetzt [cf. 34,35].

Metall-Komplex-Biomolekül: Die wohl wichtigste weil funktionale Form, in der metallische Radionuklide in der Radiodiagnostik und Radiotherapie zum Einsatz kommen, beinhaltet die Kopplung des Metalles an ein Biomolekül, welches günstige pharmakologische Eigenschaften für den medizinischen Einsatz liefert. In der Regel erfolgt diese Bindung über einen Liganden, der kovalent an das Biomolekül gekoppelt ist und das Radionuklid koordinativ aufzunehmen vermag. Der Komplexbildner übernimmt dabei die Aufgabe, die Freisetzung des Metalles im Verlauf der Messung zu verhindern [cf. 16,21].

1.5. Metall-Ligand-Peptid- bzw. Proteinstrukturen

Die Metall-Ligand-Biomolekül-Verbindungen bilden in der heutigen nuklearmedizinischen Entwicklung einen eigenständigen Bereich. Hierbei verläuft die Entwicklung geeigneter Metall-Komplexsysteme parallel mit der Entwicklung neuer Strategien zur Ankopplung dieser Systeme an nuklearmedizinisch relevante Biomoleküle [cf. 36,37,38,39]. Hier wird jedoch zugleich der Nachteil gegenüber „organischen“ Nukliden deutlich. Isotope wie ^{11}C , ^{13}N , ^{18}F können zur Markierung von Biomolekülen eingesetzt werden, ohne deren Struktur (im Falle der beiden erstgenannten Isotope) bzw. diese nur geringfügig (^{18}F) zu modifizie-

ren. Die Einführung eines Metall-Komplexes ist dagegen immer mit relativ großen strukturellen Änderungen verbunden, die sich auf die biologische Wirksamkeit vor allem kleinerer Biomoleküle unter Umständen drastisch auswirken können. Andererseits existieren nuklearmedizinisch hochinteressante Ansätze für den Einsatz von Radiometall-Komplex-Biomolekülen z.B. bei monoklonalen Antikörpern (Mab) oder Rezeptor-Liganden, so daß intensiv an der entsprechenden Markierung gearbeitet wird [cf. 40,41,42,43].

Für die Kopplung eines Metall-Komplexes an diese Strukturen muß das Biomolekül bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Zum einen muß es über bindungsfähige funktionelle Gruppen verfügen und zum anderen muß diese Kopplung an ausgewählten Untereinheiten der Biomoleküle erfolgen. Der zweite Punkt ist gerade in Bezug auf die Erhaltung der biologischen Wirksamkeit des Pharmakons entscheidend. Für die Biomoleküle des Typs Peptid oder Protein sind in Abb.1.1. die Aminosäuren dargestellt, die reaktionsfähige Gruppe für die Ankopplung eines Metall-Komplexes besitzen.

Demzufolge stehen mit $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$ und $-SH$ prinzipiell mehrere funktionelle Gruppen zur Verfügung. Die Kopplung eines Liganden über eine der dargestellten funktionellen Gruppen muß nun in einer kovalenten Bindung zum Liganden resultieren, die eine hohe in vivo Stabilität besitzt, d.h. nur sehr langsam metabolisiert wird.

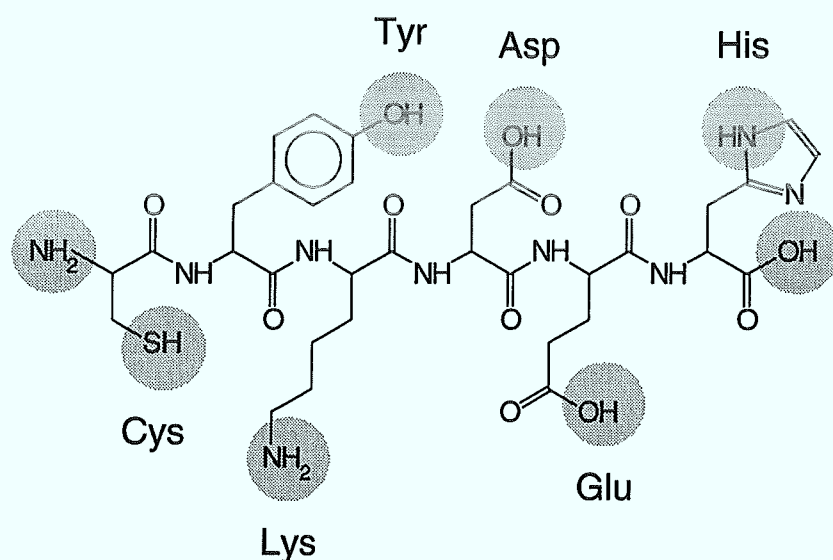
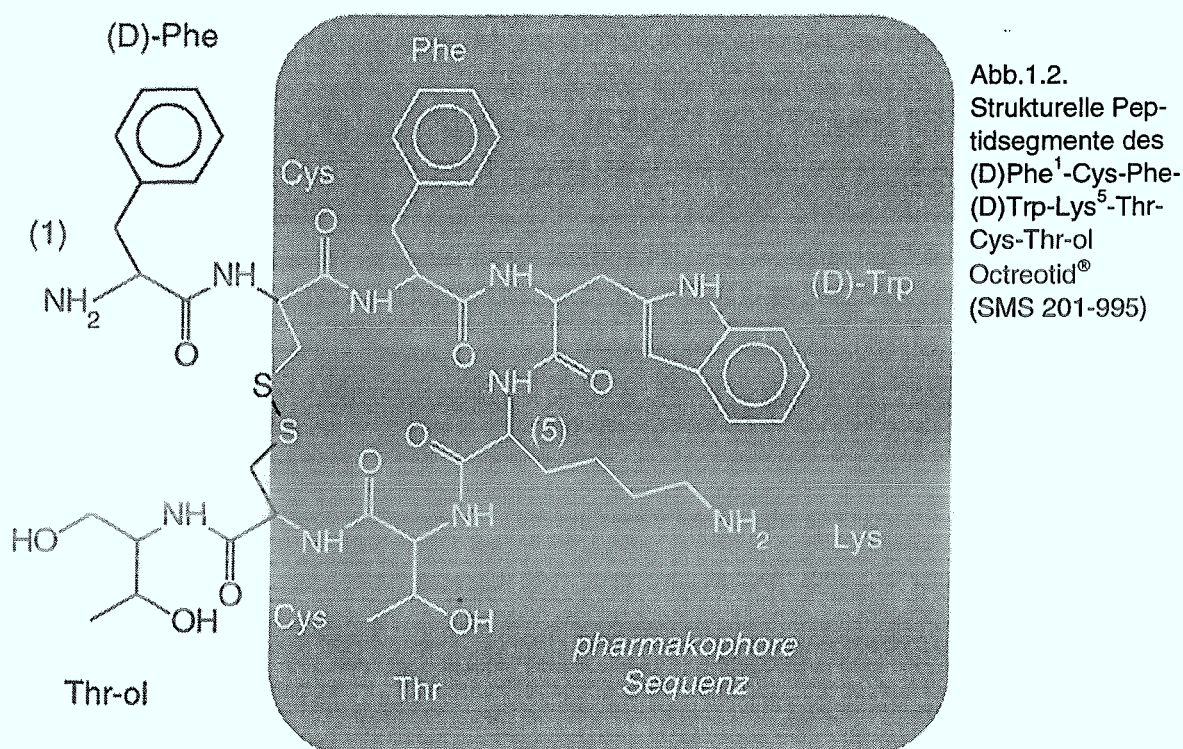


Abb.1.1
Peptidsequenz aus Aminosäuren mit reaktionsfähigen Gruppen

Ausgehend von dem Grundgerüst der Proteine, die im wesentlichen substituierte Polyamide darstellen (welche offensichtlich über eine hohe metabolische Stabilität verfügen), sollte die Ausbildung von Amid-Bindungen unter diesem Aspekt am günstigsten sein. Eine Amidbindung kann zum einen durch die Reaktion einer Aminfunktion mit den Carbonsäureresten der Aminosäuren Glutaminsäure (Glu), Asparaginsäure (Asp) oder dem C-terminalen Ende der Peptid-Kette und zum anderen durch Reaktion der Amin-Funktion des Lysins oder dem N-Terminus mit Carbonsäureresten des Komplexbildners erfolgen. Welche Aminosäure zur Bindung herangezogen wird, kann in den meisten Fällen durch die Synthesestrategie bestimmt werden.

Ein wichtiger Vertreter der Peptid-Pharmaka ist das Octreotid. Octreotid ist ein synthetisches Analogon des Somatostatin, dem *Somatotropin Release Inhibiting Factor* (SRIF) [cf. 44,45]. Dieses Analogon wird zur Detektion von Somatostatin-Rezeptoren eingesetzt, die in vielen Tumoren vermehrt exprimiert werden [cf. 46,47]. Somatostatin selbst ist ein aus 14 Aminosäuren aufgebautes Hormon-Peptid, welches jedoch rasch metabolisiert wird und somit für diagnostische Anwendungen nicht geeignet ist [cf. 48]. Octreotid hingegen zeigt eine sehr hohe metabolische Stabilität [cf. 49]. Die Peptidsequenz dieses Octapeptides sowie die biologisch wirksame Teilsequenz (pharmakophore Gruppe [cf. 50]) sind in Abb.1.2. abgebildet.



Ein Vergleich der Abb.1.2. mit Abb.1.1. zeigt drei Positionen, die eine Kopplung eines Metall-Komplexes erlauben würden. Zum einen kann nach Öffnung der Disulfidbrücke eine Reaktion über die Thiol-Funktionen erfolgen und zum anderen stehen zwei Amin-Funktionen für die Bindung zur Verfügung: (D)Phe¹ und Lys⁵. Aus Abbildung 1.2. wird jedoch ersichtlich, daß sowohl die Disulfid-Brücke als auch die Lysin-Gruppe für die biologische Wirksamkeit des Pharmakons entscheidend sind und somit nicht an einer Kopplungsreaktion beteiligt sein dürfen [51].

Octreotid wurde bereits mit einer Reihe von Radionukliden markiert, wobei alle Reaktionen am N-terminalen Amin-Stickstoff (D)-Phe¹ erfolgten [cf. 52,53,54,55,56]. Eine Ausnahme bildet das ¹²³I-Tyr³-Derivat, in dem das Phenylalanin (Phe³) durch eine Tyrosin-Gruppe substituiert wurde [cf. 57].

1.6. *Bifunktionelle Liganden*

Die Kopplung eines metallischen Radionuklides über einen Komplexbildner an biologisch relevante Moleküle stellt an den Komplexbildner zwei wesentliche Anforderungen.

1. Der verwendete Komplexbildner muß das Radiometall koordinativ genügend stabil binden, um dessen Freisetzung im Körper zu verhindern. Als Komplexbildner eignen sich deshalb vor allem Chelat-Bildner, die mehrere Gruppen zur Komplexierung des Metalles besitzen, wodurch die gebildeten Komplexe zumeist hohe thermodynamische wie kinetische Stabilität besitzen.
2. Der Komplexbildner muß neben den zur Komplexierung benötigten koordinationsfähigen Gruppen mindestens eine funktionelle Gruppe besitzen, die zur kovalenten Kopplung an das Biomolekül herangezogen werden kann. Auch diese Bindung sollte hohe Serum-Stabilität zeigen.

1974 wurde zum erstenmal ein „bifunktionaler“ Ligand eingeführt, der die beiden Funktionen Komplexierung und Kopplung erfüllt. Dieser Ligand, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), gehört zu der Gruppe der offenkettigen Polyaminopolycarbonsäuren [cf. 58]. Die Polyaminopolycarbonsäuren sind die herausragende Verbindungsklasse in dieser nuklearmedizinischen Anwendung. Alle interessanten Radiometalle wurden anfänglich mit diesen Chelat-Bidnern in Biomoleküle eingefügt. Da Metalle in diesen Komplexen nur über Sauerstoff und Stickstoffatome gebunden sind, eigneten sich die Polyaminopolycarbonsäuren hauptsächlich für die Komplexierung von kleinen Kationen mit hoher Ladung. Für Metall-Kationen, die diesen Eigenschaften nicht entsprachen, wurden Chelat-Bidner entwickelt, in denen das Metall über Schwefelatome gebunden ist, wodurch deren Stabilität erheblich gesteigert wurde. Die Entwicklung der bifunktionellen Liganden in der nuklearmedizinischen Anwendung läßt sich jedoch am besten an den Polyaminopolycarbonsäuren darstellen (Schema 1.1.) [cf. 18,19,43].

1.7. *Kopplung von Radiometallen an biologisch aktive Moleküle*

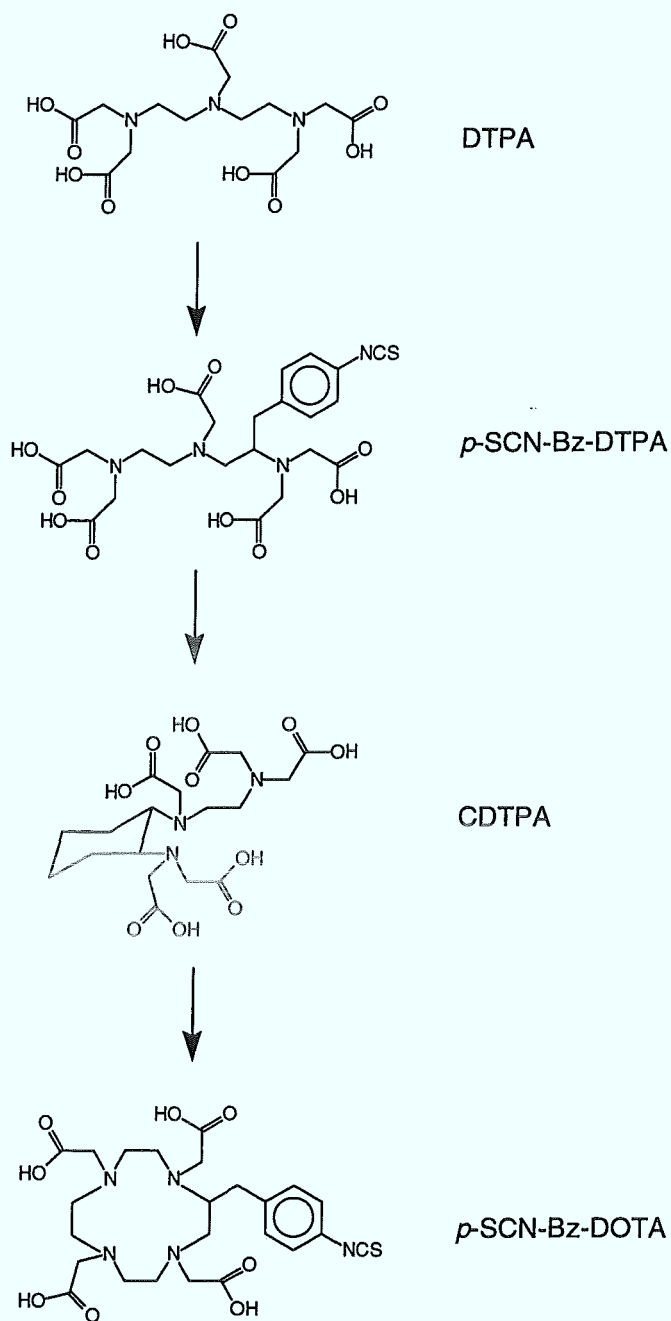
DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) als wichtigster Vertreter zur Komplexierung dreiwertiger Metall-Kationen wird über eine der Acetat-Gruppen an biologisch interessante Moleküle gebunden [cf. 37,59,60]. Durch die Kopplung kommt es zur Blockade einer der Carboxyl-Funktionen. Metalle, die über acht Koordinationsstellen verfügen und die durch DTPA vollständig abgesättigt werden (z.B. $^{111}\text{In}^{3+}$ und $^{90}\text{Y}^{3+}$), werden in neue Koordinationspolyeder gezwungen [61]. Gegenüber der Grundstruktur zeigt sich dieses vor allem in der Erniedrigung der Gesamt-Stabilitätskonstante dieser Komplexe und einer teilweisen Dekomplexierung in vivo. Dieser Umstand führte zu den über eine Ethyleneinheit des DTPA gekoppelten *p*-Isothiocynat-Benzyl-DTPA-Derivaten (*p*-SCN-Bz-DTPA) [cf. 39,62, 63]. Durch die Einführung der *p*-SCN-Benzyl-Gruppe wurde zum einen die ursprüngliche

Koordinationszahl 8 ermöglicht, zum anderen aber die Flexibilität des Grundgerüsts eingeschränkt. Die Kopplung dieser Derivate erfolgt durch Reaktion mit Aminen, woraus eine Thioharnstoff-Bindung resultiert, die metabolisch über längere Zeiträume stabil ist. Diese DTPA-Derivate zeigten eine deutliche Verbesserung der in vivo-Stabilität gegenüber der ersten Variante.

In der nächsten Stufe wurde versucht, den Komplex durch Einführung eines Cyclohexyl-Ringes in die DTPA-Struktur (CDTPA) zu stabilisieren. Durch den Cyclohexyl-Ring wird die Struktur in eine verankerte Konformation gezwungen, wodurch die Öffnung der Komplexstruktur erschwert wird. Diese Strukturen lieferten Komplexe, die über einen großen Zeitraum auch in vivo kinetisch stabil waren [cf. 64,65,66].

Die neuen Ansätze beinhalten die Anwendung von zyklischen Polyaminopolycarboxyl-Derivaten. Der wichtigste Vertreter für die Komplexierung von Y^{3+} -Kationen ist hierbei das *p*-Isothiocyanat-Benzyl-DOTA (*p*-SCN-Bz-DOTA). DOTA-Derivate zeichnen sich durch hohe thermodynamische wie auch kinetische Stabilität aus.

Die Auswahl geeigneter zyklischer Polyazapolycarbonsäuren wird in erster Linie durch den Radius des Metall-Kations bestimmt [cf. 67,68].



Schema 1.1. Entwicklung verschiedener bifunktioneller Chelatligand-Strukturen

Tabelle 1.3. gibt einen Überblick über evaluierte Metall-Polyaminopolycarbonsäure-Systeme wieder, die zur Markierung von Monoklonalen-Antikörpern, d.h. Proteinen aus der

Gruppe der Immunoglobuline, verwendet wurden. Ebenfalls aufgeführt sind die Bindungen, die bei der Kopplung des Komplexbildners an den Antikörper primär entstehen.

Tabelle 1.3. Polyaminopolycarbonsäuren zur Markierung von Antikörpern mit Radiometallen
(EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, DTPA: Diethylentriaminpentaessigsäure, TTHA: Triethylentetraaminhexaessigsäure, DOTA: Tetraazadodekan-Tetraessigsäure, TETA: Tetraazatetradekan-Tetraessigsäure)

Chelat	Radiometall	Bindung	Literatur
1-(<i>p</i> -Benzoldiazo)-EDTA	In	Azo-	[58]
DTPA (gemischtes Anhydrid)	In	Amid-	[36]
1-(<i>p</i> -Carboxymethylbenzyl)-EDTA	In	Amid-	[39]
1-(<i>p</i> -SCN-Benzyl)-EDTA	In	Thioharnstoff-	[69]
DTPA (Bisanhydrid)	In, Y, Tc	Amid-	[37][97]
TTHA (Bisanhydrid)	In	Amid-	[70]
1-(<i>p</i> -SCN-Benzyl)-DTPA	In, Y	Thioharnstoff-	[71]
1-(<i>p</i> -SCN-Benzyl)-TTHA	In	Thioharnstoff-	[72]
Propionyl-EDDHA	Ga	Amid-	[73]
Cyclohexyl-EDTA (Monoanhydrid)	In, Co, Pb, Ru	Amid-	[64][65][74][75][76]
Cyclohexyl-EDTA (NHS-Ester)	In, Co, Pb, Ru	Amid-	[64][65]
Cyclohexyl-EDTA (N(CH ₃) ₂ NCS)	In, Co, Pb, Ru	Thioharnstoff-	[64][65]
Cyclohexyl-DTPA	In, Co, Pb, Ru	Amid-	[64][65]
Cyclohexyl-TTHA	In, Co, Pb, Ru	Amid-	[64][65]
1-(<i>p</i> -SCN-Benzyl)-TETA	Cu	Thioharnstoff-	[77]
1-(<i>p</i> -Nitrobenzyl)-DOTA	Y	Thioharnstoff-	[67][78]
1-(<i>p</i> -SCN-Benzyl)-DOTA	Bi	Thioharnstoff-	[79]
Aminobutyl-DOTA	Y	Thioether-	[68]
1-(<i>p</i> -Aminobenzyl)-DOTA	Y	Amino-Glucose-	[80]

Einige Komplexbildner mit geeigneten thermodynamischen Eigenschaften weisen als bifunktionellen Liganden allerdings zum Teil nicht die erforderliche funktionelle Gruppe auf, die eine direkte Kopplung an das Biomolekül erlaubt. In diesem Fall muß der Umweg über die Einführung sogenannter Linker erfolgen. Linker sind wiederum bifunktionelle Reagentien, die sich ebenfalls durch zwei funktionelle Gruppen auszeichnen, die sowohl stabile kovalente Bindungen mit der funktionellen Gruppe des Biomoleküls als auch mit der des Komplexbildners bilden. Beispielsweise kann die Kopplung eines bifunktionellen Liganden, dem eine Aminfunktion als reagierende Gruppe zur Verfügung steht, mit einer Aminfunktion des Biomoleküls durch Einführung einer Dicarbonsäure erfolgen, wodurch zwei in vivo stabile Amidbindungen resultieren [cf. 83,84]. In Tabelle 1.4. sind einige häufig verwendete bifunktionelle Linker, sowie die aus der Reaktion mit dem Biomolekül und dem Komplexbildner resultierende Bindung, aufgeführt.

Tabelle 1.4. Verschiedene Linker zur Kopplung von Komplexbildnern an Biomoleküle (NHS-Ester: N-Hydroxysuccinimid-Ester)

Bifunktionelle Linker	Bindung zum Biomolekül	Bindung zum Komplexbildner	[Lit]
Iminothiolan	Disulfid-	Amidin-	[cf. 81]
Maleimid / NHS-Ester	Thioether-	Amid-	[cf. 82]
NHS-Ester/NHS-Ester	Amid-	Amid-	[cf. 83,84]
Aldehyd/Aldehyd	Imin-	Imin-	[cf. 85,86]

Dieses Konzept wird heute einerseits in der Syntheseentwicklung von Kopplungsreaktionen umgesetzt und andererseits als zusätzliche Möglichkeit aufgenommen, die pharmakokinetischen Eigenschaften von Pharmaka, z.B. durch Verwendung metabolisierbarer Linker [cf. 83,84,87], zu verändern.

1.8. Medizinische Anforderungen an Metall-Chelat-Biomolekül-Systeme

Ein wichtiger Faktor für die Anwendung von Radiometallen in der Radiodiagnostik wie auch Endoradiotherapie ist die Möglichkeit bzw. Notwendigkeit, das betrachtete Radioisotop in trägerfreier Form herzustellen. Durch die Herstellung von Radiopharmaka mit sehr hohen spezifischen Aktivitäten im Bereich von TBq/mMol sind Einsätze von zentralwirksamen wie auch toxischen Substanzen möglich, da die geringe applizierte Substanzmenge keinerlei pharmakodynamischen Effekt zeigen sollte.

Entscheidend jedoch für die Anwendbarkeit ist die Stabilität der synthetisierten Metall-Chelat-Biomolekül-Systeme. Zum einen weisen viele Metall-Kationen Affinitäten zu Kompartimenten des Körpers auf, die in den meisten Fällen nicht den Zielgeweben entsprechen. So wird z.B. die Freisetzung von ^{90}Y -Kationen zu einer vermehrten Akkumulation an Knochenoberflächen führen, was zu einer unnötigen wie auch gefährlichen Dosisbelastung des Knochenmarks führt [cf. 88,89]. Grundsätzlich muß in nuklearmedizinischen Anwendungen die Dosisbelastung von Nicht-Zielgewebe so gering wie möglich gehalten werden, um dem Krankheitsbild des Patienten keine neue Indikation hinzuzufügen.

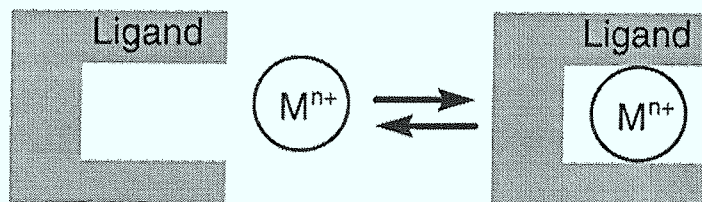
Um diesem Problem Herr zu werden, lief die Entwicklung der Nuklearmedizin auf der Basis metallischer Radioisotope parallel zur Entwicklung neuer Metall-Ligand-Komplexe. Ziel dabei war in allen Fällen, Komplexe mit sehr hohen Stabilitätskonstanten herzustellen. Die Stabilität von Metall-Komplexen in „normalen“ wäßrigen Medien wird in der Praxis als Kriterium für die Beständigkeit des Komplexes in vivo herangezogen. Die systematische Verbesserung solcher Metall-Komplexe führte zu Verbindungen mit sehr hohen Stabilitätskonstanten ($\log \beta > 30$) [cf. 91]. Als zwei herausragende Komplexe seien in diesem Zusammenhang der N,N'-Bis(2-Hydroxybenzyl)-Ethylendiamindiessigsäure-Komplex (HBED) des Ga^{3+} ($\log \beta = 39.57$ [134]) und In^{3+} ($\log \beta: 39.66$ [102]) genannt. Es zeigte sich trotz allem,

daß das Kriterium „Stabilitätskonstante“ für einen Komplex nicht ausreichte um eine befriedigende in vivo-Stabilität garantieren zu können. Die Gründe für die Diskrepanz zwischen einem definierbaren wäßrigen Medium und einem biologischen System sind vor allem durch die Minimierung der einfließenden Parameter gegeben. Hierbei zeigte sich deutlich, daß die Übertragung physikochemischer Größen isolierter Komplexe, gemessen bei inerten Hintergrundelektrolyten, auf Metall-Ligand-Systeme, die an Biomoleküle gekoppelt sind, nicht zum Erfolg führte. Für die Weiterentwicklung nuklearmedizinisch relevanter Systeme sollte somit vorab eine Bewertung der Einflußparameter erfolgen. Die Simulation eines biologischen Systems durch Korrelation von Eigenschaften, die dieses System charakterisieren, sollte ein Erfolg versprechender Ansatz sein, erstens das Schicksal eines Metallkomplexes in vivo voraussagen zu können und zweitens Einblicke in die komplexen physiologischen Gleichgewichte zu liefern, denen Metalle in diesen Medien ausgesetzt sind. Um diese Größen beschreiben zu können bedarf es einer guten Meßmethodik, da sich gerade medizinisch relevante Pharmaka oftmals Standardmethoden (z.B. potentiometrische Titration) entziehen. Würden aber durch geeigneten Methoden physikochemische Größen mit nuklearmedizinischer Relevanz mit großer Genauigkeit bestimmbar sein, könnten unter Berücksichtigung physiologischer Mindestanforderungen, Komplexe für spezifische Probleme dargestellt und in vitro bewertet werden.

Die genaue Kenntnis dieser Größen würde für die Aufklärung pharmakologischer Prozesse bedeuten, daß die Messung der akkumulierten Aktivität in den unterschiedlichen Regionen dem Effekt des intakten Pharmakons zuzuordnen wäre und nicht auf die unkontrollierte Verteilung eines Radiometalles als Kataboliten zurückginge.

1.9. *Physikochemische Beurteilung von Metall-Chelat-Biomolekül-Systemen*

Aus rein chemischer Sicht kann ein Metall-Chelat-Biomolekül-System auf die Betrachtung eines wäßrigen Metall-Chelat-System reduziert werden. Ein Metall-Chelat-Komplex ist hierin als Folge einer Lewis-Säure-Base-Reaktion zu betrachten, in der Zentralatome (hier Metall-Kationen) durch Koordination mit freien Elektronenpaaren der Lewis-Base (Chelat-Bildner) stabilisiert werden (Schema 1.2.) [cf. 90].



Schema 1.2.
Schematische Komplexbildung des Metallkations durch einen Chelat-Bildner

Die wichtigste Aussage dieses Schemas beinhaltet der Gleichgewichtspfeil. Dieses Schema läßt sich auf jede Lewis-Base in einem betrachteten System anwenden. Alle möglichen

Reaktionen werden solange ablaufen, bis aus thermodynamischer Sicht die Struktur mit der größten Stabilität gebildet wird. Für die Stabilität des Komplexes läßt sich dann eine Konstante definieren, deren Größe einen Vergleich mit anderen Systemen zuläßt.

$$(1) \quad K = \frac{k_{\text{hin}}}{k_{\text{rück}}} = \frac{[\text{ML}]}{[\text{L}] \cdot [\text{M}]}$$

Die sogenannte *thermodynamische* (bei Ionenstärke = 0) oder *stöchiometrische* (bei realen Ionenstärken) Bildungskonstante oder Stabilitätskonstante K wurde als erstes Kriterium für die Auswahl geeigneter Komplexbildner unter Vorgabe des Radiometalles herangezogen [cf. 91,92]. Gleichung (1) als Ausdruck für die Bildungskonstante eines Komplexes betrachtet nur die völlig deprotonierte Form des Komplexbildners. Sie repräsentiert deshalb nicht in jedem Fall das tatsächliche Gleichgewicht in wäßrigen Medien. Gerade bei den Polyaminopolycarbonsäuren wird sich zwischen den basischen Gruppen und dem Medium Wasser mit der jeweiligen Protonenkonzentration ein Gleichgewicht einstellen, das die Konzentrationen der protonierten Formen des Komplexbildners bestimmt.

Unter „realen“ Bedingungen liefert das Reaktionsgleichgewicht für jeden pH-Wert deshalb eine *konditionelle* Stabilitätskonstante [cf. 93], die den vorliegenden Protonierungsstufen des Komplexbildners als auch protonierten Formen des Komplexes Rechnung trägt und das tatsächlich vorhandene Gleichgewicht beschreibt.

Besitzt der betrachtete Komplexbildner sehr basische Gruppen, die entsprechend hohe Säuredissoziationskonstanten aufweisen, wird die konditionelle Stabilitätskonstante mit abnehmenden pH-Wert ebenfalls abnehmen. Dieses hat zur Folge, daß selbst bei sehr großen Gesamt-Bildungskonstanten eines betrachteten Komplexes dessen Stabilität im Säuren stetig sinkt und sich das Gleichgewicht bei Anwesenheit anderer Lewis-Säuren und -Basen in der Lösung ständig neu einstellt [cf. 94,95]. Letzterer Aspekt ist in reinen „Modell“-Elektrolyten wie z.B. isotonischer NaCl häufig vernachlässigbar, da z.B. Na-Chelat-Komplexe bzw. Metall-Chloro-Komplexe nur geringe Stabilität besitzen. In dramatischen Umfang tritt dieser Effekt ein, wenn man - wie dies bei Radiopharmaka der Fall ist - von herkömmlichen wäßrigen Medien zu dem äußerst „komplexen“ Serum überwechselt. Durch die Anwesenheit endogener Anionen (Citrat, Phosphat, Carbonat,...) als auch Metall-Kationen ($\text{Fe}^{2+/3+}$, Ca^{2+} , ...) wird das Schicksal des Metall-Ligand-Komplexes und somit das des Radiopharmakons von den Konzentrationen bzw. den Stabilitätskonstanten jeder einzelnen Komponente mit dem Radiometall als auch dem Komplexbildner bestimmt. Dieser Umstand wird weiterhin durch den Einsatz von trägerfreien Radiometall-Kationen erschwert, da die Konzentration des Metalles gegenüber den im Serum vorhandenen Konzentration von „Metallkonkurrenten“ sehr gering ist.

Neben der Stabilitätskonstanten eines Radiometall-markierten Pharmakons ist auch die Kinetik der Komplexbildung eine entscheidende physikochemische Größe. Erfolgt die Dekomplexierung bzw. Umkomplexierung des Radiometalles mit Serumbestandteilen sehr

schnell, wird eine Freisetzung trotz hoher Stabilitätskonstante aufgrund der vorherrschenden Konzentrationsverhältnisse rasch erfolgen. Ist der Komplex hingegen „kinetisch inert“, wird die Freisetzung des Metalles erschwert und das Radiopharmakon behält seine gewünschte in vivo-Stabilität.

1.10. Messung physikochemischer Parameter von Metall-Chelat-Biomolekülen

Aus dem vorherigen Abschnitt wird deutlich, daß eine vollständige Beurteilung von Pharmaka auf der Basis von Radiometallen nur erfolgen kann, wenn auch die beiden physikochemischen Parameter *Gesamt-Stabilitätskonstante* und *Komplexierungskinetik* bekannt sind. Erst die Kenntnis dieser Größen und der Vergleich mit den Parametern der in vivo vorliegenden Gleichgewichte erlaubt es, die „Lebensdauer“ eines Radiopharmakons abzuschätzen.

Erster Ansatz muß hierbei die Bestimmung der *Komplexierungskinetik* sein. Zum einen werden Aussagen über die Geschwindigkeit der Bildung von Konkurrenzgleichgewichten unter physiologischen Bedingungen möglich. Zum anderen ist diese Größe bei der Bestimmung von Stabilitätskonstanten von Nöten, da letztere nur für ein vollständig eingestelltes, zeitunabhängiges Gleichgewicht definiert sind.

Die Messung von Einzelgleichgewichten kann in den meisten Fällen über spektroskopische Methoden (UV, IR, NMR) bzw. durch potentiometrische Titration erfolgen [cf. 96]. Diese Methoden haben im Fall der nuklearmedizinisch interessanten Metall-Chelat-Systeme den Nachteil, daß die Empfindlichkeit der Meßsysteme bei der Bestimmung von sehr großen Stabilitätskonstanten nicht ausreicht, um kleine Änderungen des Gleichgewichtes zu bestimmen. Aus diesem Grund wird in den meisten Fällen zur Bestimmung von sehr stabilen Komplexen die Ligand- bzw. Metall-Verdrängungstechnik verwendet, in der ein Komplexgleichgewicht durch die Anwesenheit eines Konkurrenzliganden bzw. Konkurrenzmetalles, deren Stabilitätskonstanten bekannt sind, gestört wird. Das Ausmaß dieser Störung kann durch Messung der Komplexverhältnisse im Gleichgewicht bestimmt werden und liefert über die Berechnung des Lösungsgleichgewichtes die unbekannte Stabilitätskonstante.

Voraussetzung dieser Anwendung ist, daß Einflüsse, denen der Ligand und das Metall in der betrachteten Lösung unterliegen, bestimmbar sind. Gerade im Falle von Chelat-Bildnern, die durch die vorhandenen basischen Gruppen Protonierungsgleichgewichten unterliegen, ist die Kenntnis der *Säuredissoziationskonstanten* Voraussetzung, um die Konzentrationsverhältnisse der verschiedenen Protonierungsformen zu bestimmen. Erst so läßt sich durch Extrapolation auf die stabilste Form des Chelat-Bildners im Komplex die Gesamt-Stabilitätskonstante des Komplexes berechnen. Ohne Kenntnis dieser Größen

kann zwar die *konditionelle* Stabilitätskonstante, aber nicht die *thermodynamische* Stabilitätskonstante bestimmt werden.

Betrachtet man nun die Strukturen von Peptiden und Proteinen so wird deutlich, daß eine exakte Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten der funktionellen Gruppen des kovalent gekoppelten Komplexliganden z.B. durch Titration nicht möglich ist: bei einer Titration kann nicht zwischen abstrahierbaren Protonen des Komplexbildners und der Proteine unterschieden werden. Aufgrund der großen Zahl basischer Gruppen am Protein sowie der Instabilität von Proteinen bei hohen pH-Werten wird dadurch eine Bestimmung und Zuordnung der Säuredissoziationskonstanten unmöglich. Dies hat jedoch zur Folge, daß die Gesamt-Stabilitätskonstante des Metall-Chelat-Komplexes im Metall-Chelat-Peptid-System nicht mit dem skizzierten Ansatz exakt bestimmbar ist. Somit müßte das Konzept der *ex vivo*-Beurteilung von Radiometall-markierten Pharmaka scheitern. Um dieses Konzept nicht von vornherein aufzugeben, sollte ein alternativer Ansatz zur Evaluierung solcher Systeme versucht werden.

2. Problemstellung

Ein Ansatz zur Tumordiagnostik mit dem Fernziel der möglichen Endoradiotherapie wurde in der Endokrinologie durch den Einsatz von Rezeptorliganden gesucht, welche aufgrund der Überexpression von Rezeptoren in proliferierenden Gewebeteilen höhere Akkumulationen des jeweiligen Hormons erwarten ließen. Ein in diesem Zusammenhang von der Sandoz AG, Basel entwickeltes Peptid SMS 201-995 (Octreotid®) zeigte eine hohe Affinität zu Somatostatinrezeptoren, welche in einer Anzahl verschiedener Tumorarten vermehrt exprimiert werden. Über eine Markierung dieses Peptides mit Radioisotopen sollte die tomographische Diagnose maligner Tumore mittels nuklearmedizinischer Techniken möglich sein [cf. 46,97]. Octreotid wird zur Zeit als ^{111}In -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid (Octreoscan®) zur Tumordiagnostik mittels SPET kommerziell vertrieben [cf. 52,97,98]. Die guten Erfahrungen mit dem SPET-Nuklid legen eine Anwendung mittels PET nahe, wobei als Radioisotope ^{68}Ga (III) [53] und ^{64}Cu (II) [99] untersucht werden.

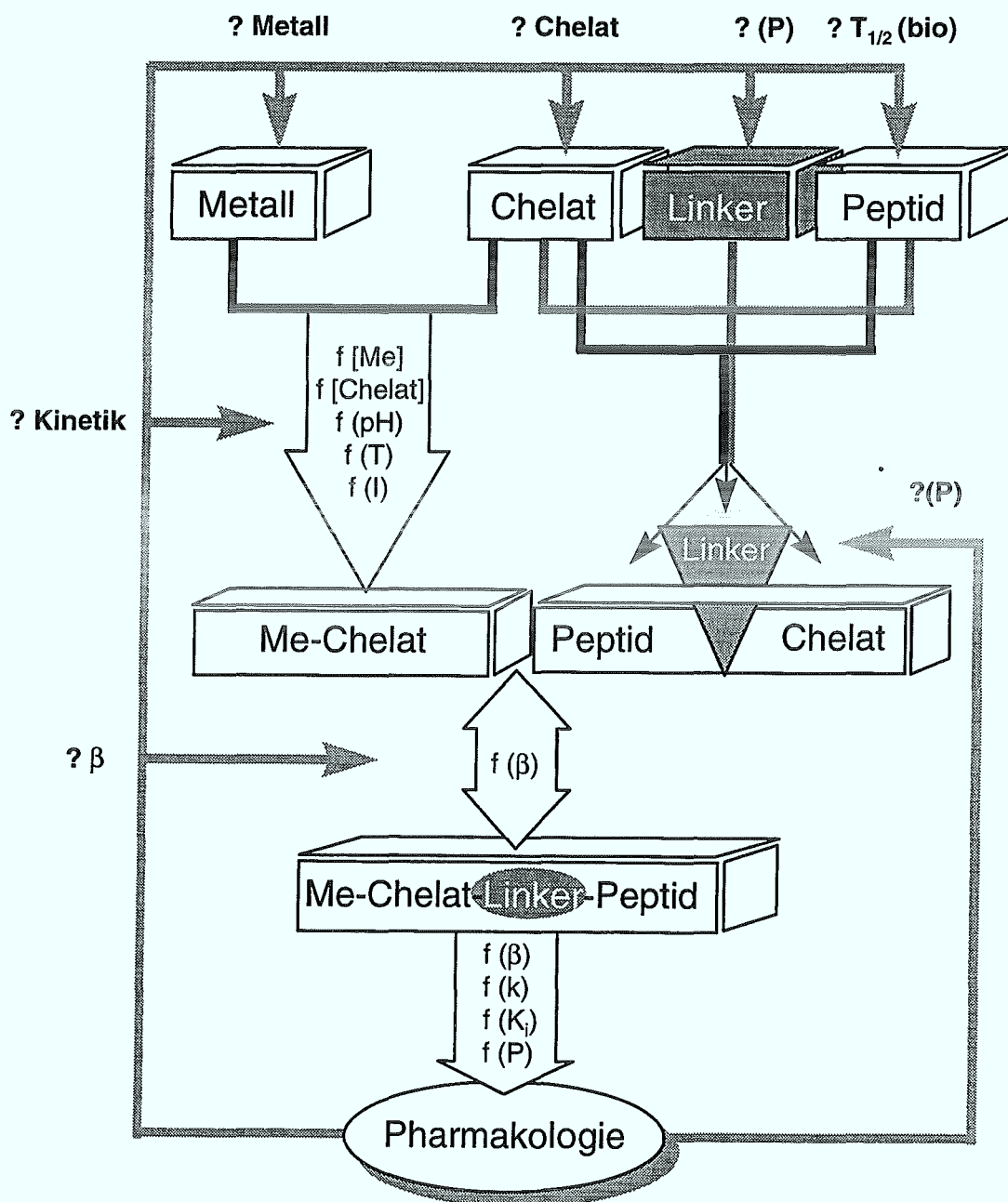
Im Zusammenhang mit einer möglichen Endoradiotherapie steht ^{90}Y im Vordergrund des Interesses. Ausgehend von der Struktur des ^{111}In -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid sollte eine Substitution des $^{111}\text{In}^{3+}$ durch $^{90}\text{Y}^{3+}$ möglich sein [100]. Um die therapeutische Eignung diagnostisch zu verifizieren, steht ein Yttrium-Isotop ^{86}Y zur Verfügung, das als Positronenstrahler mittels PET quantifiziert werden kann [55].

In der Entwicklung der Radioimmunotherapie mit ^{90}Y ist andererseits gezeigt worden, daß die Komplexfähigkeit des DTPA, wenn es über eine seiner Carboxyl-Gruppen an die Protein- und Peptid-Struktur gekoppelt ist, nicht ausreicht, um eine Freisetzung des Y^{3+} in vivo zu verhindern. Als Resultat dieser Freisetzung wurde in Tierversuchen eine erhöhte Knochenanreicherung des Radio-Yttriums gefunden [cf. 101].

Dieser Umstand ist dabei kein spezifisches Problem für Y-DTPA-Pharmaka, sondern steht als Beispiel für die Schwierigkeit, metallische Radionuklide gegenüber den Serumeinflüssen in vivo in geeigneten Radiopharmaka stabilisieren zu können.

Das Problem der in vivo-Freisetzung der Radiometalle wurde auf die zu geringen Stabilitätskonstanten der verwendeten Metall-Komplexe zurückgeführt. Zur Optimierung wurden Metall-Chelat-Komplexen mit sehr hohen Stabilitätskonstanten ($\log \beta > 30$) entwickelt [cf. 91,102]. Über die Kopplung dieser Komplexe an geeignete Biomoleküle sollte das Radiometall ausreichend stabil gebunden sein. Überprüft wurden diese Ansätze hauptsächlich an in vitro-Serumstabilitätsuntersuchungen. Hierbei zeigte sich, daß die Metall-Chelat-Komplexe über Tage stabil waren [cf. 67]. Dies war auch der Fall für den Y-DTPA-Komplex. Gekoppelt an ein Biomolekül reichte die Stabilität dieses Komplexes jedoch nicht aus, die in vivo-Freisetzung des Radiometalles zu verhindern [cf. 59,60,96]. Offen bleibt somit, welchen Einfluß die Kopplung des bifunktionellen Liganden an das Biomolekül auf die Stabilität des Komplexes hat bzw. ob die Stabilitätskonstante eines reinen Metall-Chelat-Komplexes als Kriterium für eine genügende in vivo-Stabilität ausreicht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, am Beispiel des Metall-Chelat-Octreotid-Systems die unterschiedlichen in vivo-Einflüsse auf ein Radiometall-Chelat-System durch Betrachtung von Einzelparametern zu simulieren. Mit der Kenntnis dieser Größen sollte dann die pharmakologische Antwort interpretierbar werden bzw. den Kreis zur Optimierung schließen. Das Konzept zur Beschreibung einzelner physikochemischer und chemisch struktureller Parameter von Me-Chelat-(Linker)-Peptid-Systemen ist in Schema 2.1. zusammengefaßt. „Leitmolekül“ dieser Arbeit war das Octreotid.



Schema 2.1. Schematische Darstellung des für diese Arbeit zugrunde liegenden Konzeptes. (P): Lipophilie; $T_{1/2}(\text{bio})$: biologische Halbwertszeit

Die physikochemischen Parameter (linke Hälfte in Schema 2.1.) sollten an Y-DTPA-Peptiden in Analogie zum Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid studiert werden. Nach der Darstellung der DTPA-Peptide sollten vor allem Komplexierungsparameter im System Y(III)-DTPA-Peptid bestimmt werden. Da die Bestimmung der Komplexstabilität von Peptid- bzw. Protein-gekoppelten Chelat-Bildnern in einem System fehlender Einzelparameter (pK_s-Werte des an das Peptid kovalent gebundenen Komplexbildners) erfolgt, mußte vorab ein methodisch neuer Ansatz entwickelt werden, der eine exakte Berechnung der Gesamt-Stabilitätskonstante von Y-DTPA-Peptid-Komplexen ermöglicht. Nach der Bestimmung der Komplexierungskinetik und Gesamt-Stabilitätskonstante von DTPA-Modell-Peptiden sollten diese Parameter für das konkrete Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid-System ermittelt werden. Mit der Kenntnis dieser physikochemischen Parameter sollte anschließend im Tiermodell (durch Verwendung von ⁸⁶Y am PET-Tomographen bzw. mit ⁸⁸Y in Bioverteilungsuntersuchungen) überprüft werden, ob die in vitro-Untersuchung des Komplexgleichgewichtes genügend gute Vorhersagen über das in vivo-Verhalten des Metall-Ligand-Peptid-Systems liefern kann.

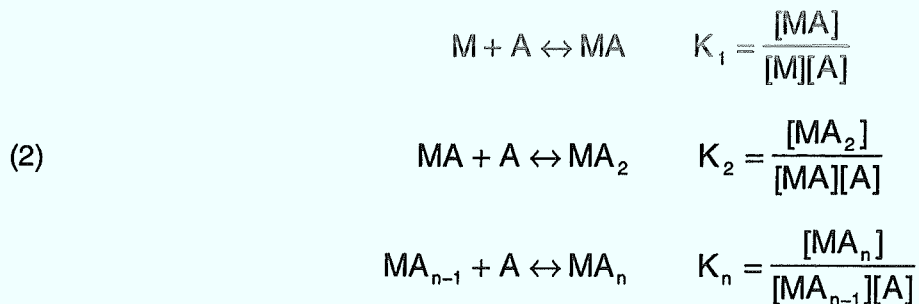
Parallel zu den physikochemischen Untersuchungen an DTPA-Peptid-Systemen sollte der Einfluß der Lipophilie (P) auf den pharmakologischen Gang von Octreotid-Derivaten bestimmt werden (rechte Hälfte in Schema 2.1.). Eine Möglichkeit zur Variation der lipophilen Eigenschaften könnte die Einführung von verschiedenen Linkern zwischen Komplexbildner und Peptid sein. Hierzu sollte am Beispiel des ⁶⁸Ga-[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid, einem bereits evaluierten Octreotid-Analogen, eine Synthesestrategie entwickelt werden, mit der die Einführung unterschiedlicher Linker zwischen DFO-B und Octreotid ermöglicht wird. Die Auswirkungen systematisch variiert Linker sollten anschließend im Tiermodell überprüft werden.

Die Zusammenführung aller untersuchten Parameter sollte somit einerseits eine umfassende Bewertung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Chelat-Octreotide bezüglich ihrer physikochemischen Größen Stabilitätskonstante und Komplexierungskinetik erlauben und andererseits über die Ergebnisse aus den tierexperimentellen Studien Aussagen zur Optimierung dieser Korrelation ermöglichen.

3. Theoretische Überlegungen zur Aufklärung von Mechanismen in der Koordinationschemie

Zentraler Bestandteil der koordinativen Chemie ist die Einbindung von Zentralatomen und hier im Besonderen von Metall-Kationen in „komplexe Strukturen“, in denen Liganden, also Moleküle mit zur Koordination befähigten Gruppen, durch sphärische Anordnung um das Zentralatom diese Struktur stabilisieren. Die Stabilität solcher Komplexverbindungen wird vor allem durch Größe und Ladung des Zentralatoms sowie durch Elektronendichte, Sterik und Größe der Liganden bestimmt. Die Stabilität der Komplexe kann weiterhin durch besondere Strukturmerkmale des Liganden erhöht werden. Ist ein Ligand nicht nur über ein einzelnes Ligandatom an das Zentralatom gebunden, so ist die Verdrängung durch einen Konkurrenz-Liganden statistisch erschwert. Ferner wird durch die Verdrängung von Liganden aus einer Komplexstruktur durch Ausbildung eines Komplexes mit anderen Liganden, welche mehrere Koordinationsstellen am Zentralatom besetzen, die Entropie dieser Lösung erhöht und liefert somit einen Beitrag zur höheren Stabilität des neuen Komplexes. Der Effekt der erhöhten Stabilität von „mehrzähligen“ gegenüber „einzähligen“ Liganden wird unter dem Oberbegriff „Chelat-Effekt“ zusammengefaßt.

Betrachtet man allgemein die Bildung und Dissoziation von Komplexverbindungen, so können Gleichgewichte analog denen von mehrbasigen Säuren beschrieben werden:



M ist hierbei das Zentralatom und A ein zur Koordination befähigter Ligand. $K_1, K_2, \dots, K_n$ bezeichnet man als *schrittweise* oder *individuelle Bildungskonstanten*. Die schrittweisen Bildungskonstanten können zur *Gesamtbildungskonstanten* oder *Gesamt-Stabilitätskonstanten* β_n zusammengefaßt werden.

Die Gesamtbildungskonstante β_n ist somit das Produkt der individuellen Bildungskonstanten $K_1, K_2, \dots, K_n$.

$$(3) \quad \beta_n = \prod_{i=1}^n K_i$$

Zur Abschätzung von Komplexstabilitäten lassen sich die verschiedenen Zentralatome und Liganden in Klassen einordnen. Das Hauptmerkmal dieser Einteilung ist hierbei die Polarisierbarkeit des Metallions. Unter der Betrachtungsweise einer Lewis-Säure-Base-Reaktion

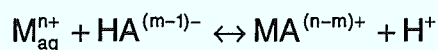
liefert das HSAB-Konzept gute Anhaltspunkte zur Darstellung geeigneter Komplexe. Hierbei werden die Metall-Kationen bzw. Lewis-Säuren, je nach Stärke der Polarisierbarkeit, in *harte* und *weiche* Säuren eingeteilt. Harte Säuren sind somit Zentralatome, die nur eine geringe Polarisierbarkeit aufweisen. Dieselbe Einteilung wird für Lewis-Basen, also Ligand-Atomen mit freien Elektronenpaaren, vorgenommen. Das HSAB-Konzept besagt, daß bei Verbindungen von harten Säuren mit harten Basen bzw. weichen Säuren mit weichen Basen besonders stabile Komplexe entstehen sollten. Das HSAB-Konzept sagt aber nicht, daß ein Komplex aus einer weichen Säure mit harten Basen nicht auch stabil sein kann.

3.1. *Komplexierung im wäßrigen Medium*

Findet eine Komplexierung im wäßrigen Medium statt, so liegen mindestens zwei weitere Konkurrenzgleichgewichte vor: die Protonierung des Liganden und die Hydrolyse des Metallkations [cf. 94,95].

3.1.1. *Komplexierung im sauren Medium*

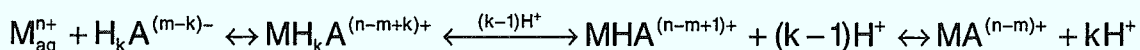
Wird die Komplexbildung bei niedrigen pH-Werten durchgeführt, muß die Konkurrenz der vorhandenen H^+ -Ionen in das Gleichgewicht einbezogen werden. Betrachtet man die in der Lösung vorhandenen Protonen als konkurrierende Lewis-Säuren im Komplexgleichgewicht, kann ein Ausdruck für die Gleichgewichtskonstante K_{Gl} des vorliegenden Gleichgewichtes formuliert werden:



(4)

$$K_{Gl} = \frac{[MA^{(n-m)+}][H^+]}{[M_{aq}^{n+}][HA^{(m-1)-}]}$$

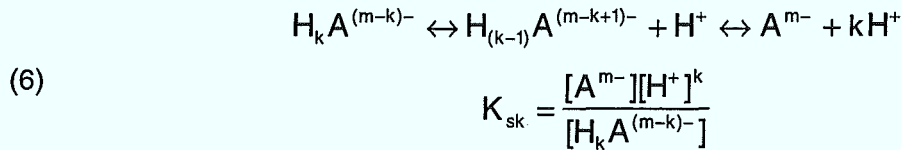
Handelt es sich bei dem Liganden A um einen mehrzähligen Liganden, so kann als Zwischenprodukt ein protonierter Komplex entstehen, der je nach Konzentration der Protonen bzw. je nach Größe der Säuredissoziationskonstanten des Liganden weiter deprotoniert wird. Unter Berücksichtigung der Protonierungsgrade der im Gleichgewicht vorliegenden Komplexe wird das Komplexgleichgewicht durch die Gleichgewichtskonstante $K_{Gl/k}$ beschrieben.



(5)

$$K_{Gl/k} = \frac{[MA^{(n-m)+}][H^+]^k}{[M_{aq}^{n+}][H_k A^{(m-k)-}]}$$

Zur vollständigen Beschreibung eines Komplexeleichgewichtes im sauren Medium müssen zusätzlich die Protonierungsgleichgewichte des Liganden betrachtet werden. Für das Säure-dissoziationsgleichgewicht des Liganden kann eine Gleichgewichtskonstante K_{sk} definiert werden.



Das in einer sauren Lösung vorliegende Komplexeleichgewicht $K_{Gl/k}$ ist somit durch die Säure-dissoziationskonstante K_{sk} des Liganden und der Gesamtbildungskonstante β_n des Komplexes bestimmt. Durch Umstellen und Einfügen von Gleichung (5) und (6) erhält man den Ausdruck:

$$\frac{K_{Gl/k}}{K_{sk}} = \beta_n = \frac{[MA^{(n-m)+}]}{[M_{aq}^{n+}][A^{m-}]} \quad (7)$$

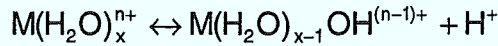
mit $[A^{m-}] = f(K_s)$

Bei Kenntnis der Säure-dissoziationskonstanten K_s des Liganden kann die Konzentration des maximal deprotonierten Liganden berechnet und in die Gleichung zur Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstante eingesetzt werden.

3.1.2. *Komplexierung im alkalischen Medium*

Analog zur Komplexierung im sauren Medium muß im Alkalischen die Konzentration der freien OH^- -Ionen in das Komplexeleichgewicht einbezogen werden. Hydroxo-Komplexe können einerseits durch Abspaltung eines Protons aus einem Aquo-Komplex des freien Metall-Kations durch eine einfache Säure-Base-Reaktion gebildet werden. Betrachtet man andererseits Hydroxid-Ionen (OH^-) als konkurrierende Lewis-Basen, kann die Darstellung von Hydroxo-Komplexen ebenso durch direkte Ligandenverdrängung erfolgen.

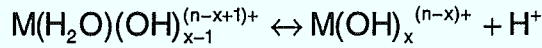
Ausgehend von einem Metall-Aquo-Komplex ergeben sich folgende Gleichgewichte:



$$K_{Hydr.1} = \frac{[M(H_2O)_{x-1}OH^{(n-1)+}][H^+]}{[M(H_2O)_x^{n+}]}$$

(8)

↓



$$K_{Hydr.x} = \frac{[M(OH)_x^{(n-x)+}][H^+]^x}{[M(H_2O)_x^{n+}]}$$

$K_{Hydr.x}$ wird als Gesamt-Hydrolyse-Konstante des Aquo-Komplexes bezeichnet. Sie setzt sich aus den Säuredissoziationskonstanten der Wassermoleküle im Aquo-Komplex zusammen. Betrachtet man die Änderung des Komplexgleichgewichtes durch den Einfluß der Hydroxid-Ionen als Lewis-Basen, läßt sich das vorliegende Gleichgewicht durch eine Gleichgewichtskonstante $K_{Gl/B}$ beschreiben:



(9)

$$K_{Gl/B} = \frac{[MA^{(n-m)+}][OH^-]^g}{[M(OH)_g^{(n-g)+}][A^{m-}]}$$

Dieser Ausdruck läßt sich unter Verwendung der Hydrolyse-Konstanten umformen. Das Gleichgewichtskonstante $K_{Gl/B}$ der Lösung setzt sich demnach aus dem Quotienten der Gesamtbildungskonstante β_n und der Hydrolyse-Konstanten $K_{Hydr.x}$ des betrachteten Komplexes zusammen. Durch Einsetzen und Umstellen erhält man den Ausdruck:

$$(10) \quad K_{Gl/B} \cdot K_{Hydr.x} = \beta_n = \frac{[MA^{(n-m)+}]}{[M(H_2O)_x^{n+}][A^{m-}]}$$

mit $\left[(M(H_2O)_x)^{n+} \right] = f(K_{Hydr.x})$

Unter der Voraussetzung, daß im wäßrigen Medium kein Metall-Kation frei, sondern als Aquo-Komplex bzw. in hydratisierter Form vorliegt, unterscheiden sich die Gleichungen (7) und (10) nicht. Allgemein kann also die Änderung des Komplexgleichgewichtes als der Einfluß des pH-Wertes betrachtet werden, wobei im sauren Medium die Ligandenverdrängung am Liganden und im Basischen am Metall-Kation erfolgt. In wäßriger Lösung liegen somit drei sich bedingende Gleichgewichte vor:

$$(12) \quad \beta_n = \frac{[MA^{(n-m)+}]}{[M_{aq}^{n+}][A^{m-}]} \quad K_{sk} = \frac{[A^{m-}][H^+]^k}{[H_k A^{(m-k)-}]} \quad K_{Hydr.x} = \frac{[(M(OH)_x)^{(n-x)+}][H^+]^x}{[(M(H_2O)_x)^{n+}]}$$

Alle Konstanten stellen in diesem Zusammenhang die *Gesamt-Stabilitäts-, Gesamt-Säuredissoziations- und Gesamt-Hydrolyse-Konstante* dar. Da alle Komponenten dieser Gleichgewichte eine Funktion des pH-Wertes sind, wird das vorliegende Gleichgewicht durch den Betrag der schrittweisen Konstanten bestimmt. Das Ergebnis einer Auftragung des Komplextgleichgewichtes in der Lösung vs. pH sollte eine Maximum-Kurve ergeben, in dem die Komplexbildung am größten ist¹.

Diese Gleichgewicht wird in dem Fall, daß weitere Komplexbildner vorhanden sind bzw. unterschiedliche Komplexe gebildet werden, entsprechend erweitert. Ist mehr als ein mehrzähniger Ligand in einem Komplex gebunden, gehen weiterhin alle Protonierungskonstanten der verschiedenen Chelat-Bildner sowie deren Verschiebungen, bedingt durch die Komplexbildung bzw. Lösungseigenschaften, in das Gleichgewicht ein. Die genaue Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstante wird entsprechend durch die Menge an neuen Parametern erschwert.

3.2. *Methoden zur Bestimmung von Kinetik und Stabilitätskonstanten im Komplextgleichgewicht*

3.2.1. *Kinetik*

Die Kinetik der Komplexbildung bzw. Dekomplexbildung und die daraus ableitbare Komplexbildungskonstante in einem Komplextgleichgewicht bilden eine Einheit nach:

$$(13) \quad \beta = \frac{k_{\text{Komplexbildung}}}{k_{\text{Dekomplexbildung}}}$$

Sie sind die interessanten Parameter, die Aussagen über Veränderungen des Komplexverhaltens bei Variation der Lösungsparameter zulassen. Am Anfang der Untersuchungen im wäßrigen Medien muß somit das Verhalten des gebildeten Komplexen gegenüber den Lösungsmittelinflüssen untersucht werden.

Vor der Messung der Stabilitätskonstanten eines Komplextgleichgewichtes muß gewährleistet sein, daß dieses zeitunabhängig ist. Nach Gleichung (13) ist dafür die Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung und Dekomplexbildung notwendig. Da das

¹ Diese theoretische Vorhersage wurde in pH-abhängigen Untersuchungen zur Stabilität von Indium, Gallium und Yttrium-Komplexen bestätigt. Zur Übersicht [16]

Gleichgewicht nicht nur durch die Komplexbildungskonstante, sondern außerdem durch die Säuredissoziationskonstanten der Liganden und Hydrolyse-Konstanten des Metalles bestimmt wird, müssen auch diese individuellen Kinetiken zur Gleichgewichtseinstellung berücksichtigt werden.

Zur Bestimmung von Komplexierungskinetiken in wäßrigem Medium stehen zahlreiche spektroskopische Methoden zur Verfügung. Alle Methoden beinhalten, daß charakteristische Änderungen des Lösungsgleichgewichtes quantifiziert und zugeordnet werden können. Dabei muß gewährleistet sein, daß das Meßergebnis das tatsächliche Verteilungsmuster der betrachteten Spezies im Gleichgewicht widerspiegelt und dieses entlang der Messung nicht durch die Meßanordnung verändert wird. Deshalb eignen sich besonders Anordnungen, die kontinuierlich das Reaktionsverhalten meßbar machen (z.B. Reaktionen, die innerhalb der Meßanordnung durchgeführt werden können (UV, NMR, IR)). In den Fällen, in denen durch spektroskopischen Methoden Reaktionsabläufe und Geschwindigkeiten nicht eindeutig bewertet werden können, bietet der Einsatz radioaktiver Metalle Möglichkeiten, mechanistische, funktionale Kontexte abzuleiten. Eine zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen und zur Bestimmung kinetischer Daten bewährte Methode stellt die Indikatormethode mit radioaktiven Isotopen dar [cf. 103,104]. Die Indikatormethode nutzt dabei aus, daß in Molekülen, die an der betrachteten Reaktion beteiligt sind, stabile Isotope durch radioaktive substituiert werden können, ohne chemische Änderungen des Systems hervorzurufen. Über die Aktivitätsverteilungen des radioaktiven Isotopes auf die Reaktionskomponenten können direkte Aussagen über den Reaktionsverlauf des betrachteten radioaktiven Isotopes und damit über das im großen Überschuß vorhandene, stabile Isotop gemacht werden (*Tracer*-Prinzip in der Chemie). Angewendet auf Komplexierungskinetiken beinhaltet die Isotopenaustauschmethode die Messung von Austauschgeschwindigkeiten der nicht-radioaktiven Formen des Zentralatoms bzw. des Liganden mit der radioaktiven Form [cf. 105].

Allgemein gilt für Isotopenaustauschreaktionen, bei denen stabile Isotope (M), die an der jeweiligen Reaktion beteiligt sind, durch radioaktive Isotope (M^*) „verdünnt“ werden, daß keine chemischen Änderungen im System auftreten. Daraus folgt für dieses System keine Änderung der Reaktionsenthalpie $\Delta H = 0$ (Masseneffekt vernachlässigt). Die freie Reaktionsenthalpie ΔG ist somit:

$$(14) \quad \Delta G = T \cdot \Delta S$$

Betrachtet man allgemein eine Isotopenaustauschreaktion der Form



so erhält man für die Geschwindigkeit dieser Isotopenaustauschreaktion unter Berücksichtigung der Hin- und Rückreaktion den Ausdruck

$$(16) \quad \frac{d[M^*B]}{dt} = R \left(\frac{[M^*B]}{[MB]} - \frac{[M^*A]}{[MA]} \right)$$

mit R = Reaktionsgeschwindigkeit.

Durch Integration dieser Gleichung erhält man die für Isotopenaustauschreaktionen wichtige *McKaysche* Gleichung:

$$(17) \quad \ln(1-\lambda) = -R \frac{[MA]+[MB]}{[MA][MB]} t$$

λ bezeichnet den Austauschgrad und ist gegeben durch:

$$(18) \quad \lambda = \frac{[M^*B] - [M^*B]_0}{[M^*B]_\infty - [M^*B]_0}$$

Der Index (0) bezeichnet den Anfangszustand, der Index (∞) den Gleichgewichtszustand. Bei einer Auftragung der Größe $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit t ergibt sich für die Halbwertszeit der Isotopenaustauschreaktion:

$$(19) \quad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{R} \frac{[MB][MA]}{[MB]+[MA]}$$

Für Reaktionen 1.Ordnung gilt für $R = k_1[MA]$. Für Reaktionen zweiter Ordnung gilt $R = k_2[MA][MB]$. Durch Umformung der Gleichung (19) lassen sich somit Ordnung und Geschwindigkeitskonstante ermitteln.

Solche Kinetikberechnungen liefern Aussagen über die kinetische Stabilität der betrachteten Komplexverbindungen. Man unterscheidet hierbei substitutionslabile (kinetisch labile) und substitutionsinerte (kinetisch inerte) Komplexe. Die Austauschgeschwindigkeit hängt vor allem von der Art des Liganden und der Elektronenkonfiguration des Zentralmetalles ab. Werden weiterhin die Einflüsse im wäßrigen Medium zu der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit in Beziehung gesetzt, kann die Reaktionsgeschwindigkeit entsprechend genauer beschrieben, bzw. der Einfluß verschiedener Parameter auf den Reaktionsverlauf exakter verifiziert werden. An die Quantifizierung der Komplexierungskinetik schließt sich die Berechnung der Stabilitätskonstante des entstandenen Gleichgewichtes an.

3.2.2. Stabilitätskonstanten

Wie bereits in Kapitel 3.1. geschildert kann die Gesamt-Bildungskonstante im wäßrigen Medium unter Kenntnis der beiden anderen pH-abhängigen Gleichgewichte (Ligandenprotonierung, Metall-Hydrolyse) bestimmt werden. Gehen weitere zusätzliche,

komplexfähige Liganden in das Reaktionsgleichgewicht ein, muß deren Stabilität sowie deren pH-Verhalten in das Gesamt-Lösungsgleichgewicht einbezogen werden. Darüber hinaus muß jede protonierte Form eines Komplexes, welche nicht zur Auflösung des Komplexes führt, in Betracht gezogen werden.

Da durch eine Meßanordnung nur eine begrenzte Anzahl von Spezies im Gleichgewicht quantifiziert werden kann, ist die Bestimmung von Komplexgleichgewichten nur möglich, wenn die Stabilitätskonstanten der gebildeten Komplexe sich um Größenordnungen unterscheiden, so daß bestimmte Komplexanordnungen ausgeschlossen werden können bzw. im Fehler der Meßgenauigkeit verschwinden.

Zur Bestimmung von Gesamt-Komplexbildungskonstanten stehen zahlreiche Standardmethoden zur Verfügung [cf. 92]:

- Potentiometrie
- Spektrophotometrie
- NMR-Spektrometrie
- Ionenaustausch
- Verteilung zwischen 2 Phasen usw..

Die Bestimmung der Konstanten sehr stabiler Komplexe erfolgt über:

- Metall-Metall-Verdrängung (z.B. spektrometrisch)
- Ligand-Ligand-Verdrängung (z.B. spektrometrisch, potentiometrisch)

Die Gemeinsamkeit dieser Methoden ist, daß die Kenntnis aller Formen des Komplexes und deren Stabilität als auch die Kenntnis aller Formen des Liganden in Lösung und im Komplex gewährleistet sein muß. Können die einzelnen Komponenten nicht genau beschrieben werden, müssen diese in unabhängigen Gleichgewichten ermittelt werden (z.B. Titration der verschiedenen Protonierungsstufen des Chelatbildners).

Versucht man Komplexgleichgewichte zu beschreiben, in denen einzelne Komponenten, welche in das Reaktionsgleichgewicht eingehen, nicht exakt definiert werden können, kann die Bestimmung des Gleichgewichtes nur durch Näherungen erfolgen. Gerade in der radiopharmazeutischen Chemie ist dieser Umstand häufig gegeben. Betrachtet man einen *Tracer*, ein Molekül, das aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften als guter Kandidat für nuklearmedizinische Anwendungen gelten sollte, muß bei der Verwendung radioaktiver Metalle vorerst ein Komplexbildner, und hier vor allem ein Chelat-Bildner, in die Struktur eingeführt werden. Ist eine kovalente Kopplung des Liganden an den *Tracer* erfolgt, kann ein zur Komplexbildung des Metalles entsprechendes Reaktionsgleichgewicht aufgestellt werden.

Wie eingangs bereits gezeigt, werden zur Berechnung der Stabilitätskonstante des Komplexes Angaben über die Konzentrationen aller im Reaktionsgleichgewicht vorhandenen

Spezies benötigt. Die Berechnung der Konzentrationen des Komplexes sowie der Konzentration der unterschiedlich protonierten Formen des Komplexbildners wird vor allem durch zwei Umstände erschwert.

1. Zur potentiometrischen Bestimmung von Säuredissoziationskonstanten mehrbasiger Säuren ist eine bestimmte Mindest-Substanzmenge erforderlich, um zu exakten Ergebnissen zu gelangen.
2. Die Grundstrukturen von radiopharmazeutischen *Tracern* sind oftmals Peptide und Proteine und hier vor allem monoklonale Antikörper. Die Eigenschaften der Aminosäuren in diesen Strukturen sowie die große Anzahl von Säuren und Basen macht eine Bestimmung der Säuredissoziationskonstante eines gekoppelten Komplexes, z.B. durch Titration, schier unmöglich.

Um geeignete Aussagen zur Komplexstabilität von Metall-Ligand-Komplexen, in denen der Ligand zusätzlich an Proteinstrukturen gebunden ist, machen zu können, wurden unterschiedliche Näherungsansätze vorgeschlagen.

Zum einen wurde versucht, über eine Metall-Metall-Verdrängungsreaktion die Stabilitätskonstante von DTPA-gekoppelten Proteinen zu bestimmen [106]. Für diese Reaktion wurde folgende Gleichung zugrunde gelegt:

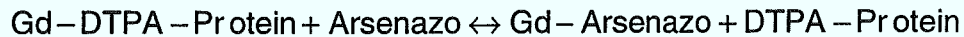


(20)

$$K = \frac{[\text{Fe-DTPA-Protein}][\text{In}^{3+}]}{[\text{In-DTPA-Protein}][\text{Fe}^{3+}]} = \frac{\beta_{\text{Fe-DTPA-Protein}}}{\beta_{\text{In-DTPA-Protein}}}$$

In dieser Studie wurden stöchiometrische Verhältnisse von Metall und Komplexbildner verwendet, wobei In^{3+} mit $^{114\text{m}}\text{In}$ versetzt wurde. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung des $^{114\text{m}}\text{In}$. Zur Berechnung der Gesamt-Stabilitätskonstante $\beta_{\text{In-DTPA-Protein}}$ wurde zur Vereinfachung in Gleichung (20) für $\beta_{\text{Fe-DTPA-Protein}}$ die Stabilitätskonstante des „freien“ Fe-DTPA-Komplexes eingesetzt. Als Ergebnis wurde die Stabilitätskonstante von In-DTPA-Protein mit $\log\beta = 28.3$ bzw. 29.3 bestimmt [106] ($\log\beta_{\text{In-DTPA}} = 29.0$ [91]). Die Berechnung der Stabilitätskonstante $\beta_{\text{In-DTPA-Protein}}$ wird daher mit dem Fehler dieser Vereinfachung behaftet sein.

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Gesamt-Stabilitätskonstanten eines nicht definierten Komplexes ist die Näherung über bekannte Derivate dieses Komplexes. In einer Studie von A.D.Sherry et al. [107] wurde durch eine Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion die Gesamt-Stabilitätskonstante $\beta_{\text{Gd-DTPA-Protein}}$ für verschiedene Gd-DTPA-Protein-Komplexe berechnet. Das Gleichgewicht K dieser Reaktion läßt sich durch Gleichung (21) beschreiben:



$$(21) \quad K = \frac{[\text{Gd-Arsenazo}][\text{DTPA-Protein}]}{[\text{Gd-DTPA-Protein}][\text{Arsenazo}]} = \frac{\beta_{\text{Gd-Arsenazo}}}{\beta_{\text{Gd-DTPA-Protein}}}$$

Für das betrachtete Beispiel wurde als Konkurrenzligand Arsenazo ((2,2'-[1,8-Di-Hydroxy-3,6-Di-Sulfo-2,7-Naphthalen-Bis-(Azo)]-Debenzol-Arsenige-Säure) verwendet. Zur Berechnung der Gesamt-Stabilitätskonstante des Gd-DTPA-Protein-Komplexes wurden näherungsweise die Säuredissoziationskonstanten des DTPA-Propylamids verwendet, welche vorher durch Titration bestimmt wurden.

Für die Gd-Protein-Komplexe wurden so Gesamt-Stabilitätskonstanten von $\log \beta = 18.80$ bzw. 18.87 [107] ($\log \beta_{\text{Gd-DTPA}} = 22.46$ [91]) gemessen. Der Fehler in der Stabilitätskonstante wird hier maßgebend durch den Einfluß der Derivatisierung bestimmt.

Diese Methoden lieferten gegensätzliche Aussagen. In der ersten Methoden zeigte offenbar die Derivatisierung des DTPA keinen Einfluß auf die Gesamt-Stabilitätskonstanten der In-DTPA-Komplexe, während in der zweiten Methode der Einfluß im Gd-DTPA-Protein-System zu einer drastischen Reduzierung dieser Konstanten führte. Da in beide Methoden Näherungen gemacht wurden, ist die Bewertung der Einzelergebnisse schwierig.

3.2.3. *Neue Methodik zur Berechnung von Stabilitätskonstanten*

Ausgehend von einer Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion könnte unter Berücksichtigung der Konzentrationsänderungen der protonierten Formen der konkurrierenden Liganden in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung und die Verwendung sehr geringer Metallkonzentrationen ein Ansatz gefunden werden, der eine Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstante von Protein-gekoppelten Chelat-Bildnern ermöglicht.

Für diesen Ansatz sind im Folgenden die Punkte aufgeführt, die die Grundlage zur neuen Berechnung der Gesamt-Stabilitätskonstante bilden:

1. Sind bei der Reaktion eines mehrbasigen Komplexbildner mit einem betrachteten Metall-Kation mehrere stabile Komplexe denkbar, so wird das Meßergebnis nur dann durch die stabilste Form des Komplexes bestimmt, wenn gilt:

$$[\text{A}] \cdot \beta_{\text{MA}} > [\text{HA}] \cdot \beta_{\text{MHA}} \cdot 100$$

d.h. der Komplex MHA ist nur $< 1\%$ in dem Komplexgleichgewicht vorhanden. $[\text{A}]$ und $[\text{HA}]$ repräsentieren die Konzentrationen der unterschiedlichen Protonierungsformen des Komplexbildners im Gleichgewicht.

2. Ist die Metallkonzentration klein im Verhältnis zu der Konzentration des Liganden, der die Form des stabilsten Komplexes bestimmt, wird das Komplexeleichgewicht nur durch die Gesamt-Stabilitätskonstante des stabilsten Komplexes bestimmt.

3. Mit steigendem pH-Wert muß die Konzentration des Liganden der stabilsten Komplexform zunehmen, so daß immer gilt:

$$[A] \cdot \beta_{MA} \gg [OH^-] \cdot K_{Hydrolyse}$$

Die Hydrolyskonstante $K_{Hydrolyse}$ des Metall-Aquo-Komplexes muß klein und die Hydrolyse dabei reversibel bzw. das Löslichkeitsprodukt des Metall-Hydroxids groß sein, so daß sich die Metallkonzentration im Gleichgewicht nicht ändert.

4. In einer Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion müssen auch für den Konkurrenzliganden die unter 1.-3. gemachten Angaben gelten. Der Zustand des Konkurrenzliganden muß bei jedem pH-Wert definierbar, d.h. Protonierungskonstanten und Gesamtbildungskonstante des Komplexes MB bekannt sein.

Sind die unter Punkt 1.-4. gemachten Angaben in der Lösung der Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion erfüllt, wird das Komplexeleichgewicht bei jedem pH-Wert durch Gleichung (22) wiedergegeben.



(22)

$$K_{Gl} = \frac{[MB^{(n-h)+}][A^{m-}]}{[B^{h-}][MA^{(n-m)+}]} = \frac{\beta_{MB}}{\beta_{MA}}$$

Um zu gewährleisten, daß die Metallkonzentration immer viel kleiner ist als die Konzentration des Liganden A^{m-} , bietet sich der Einsatz trägerfreier Radiometalle an.

In Gleichung (22) sind die Konzentration B^{h-} und die Konstante β_{MB} bekannt bzw. berechenbar. Die Konzentration des Liganden A^{m-} sowie die gesuchte Gesamtbildungskonstante des Komplexes MA sind nicht bekannt. Meßgröße ist das Verhältnis der beiden vorliegenden Komplexe, welches über Aktivitätsverteilungen bestimmt wird.

Da in Gleichung (22) nach β_{MA} aufgelöst werden soll, muß vorab die Konzentration des Liganden A^{m-} berechnet werden. Betrachtet man in einer Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion die Konzentrationen der konkurrierenden Liganden bei verschiedenen pH-Werten, so ist bei einer Auftragung des Ligandenverhältnisses $[A^{m-}]/[B^{h-}]$ vs. pH keine lineare Abhängigkeit zu erwarten. In Bereichen der Säuredissoziationskonstanten des Liganden A wird das Verhältnis je nach Höhe der Säuredissoziationskonstanten des Liganden B schneller anwachsen bzw. abfallen. Die Gesamtkurve, die sich über den gesamten pH-Bereich erstreckt, weist somit bei jeder nichtlinearen Steigerung der Konzentration der deprotonierten Form des Liganden A einen Wendepunkt auf, der der Säuredissoziationskonstante des Liganden A entspricht.

Dieser Effekt wird in Abb.3.1. an einem theoretischen Beispiel veranschaulicht. Für zwei Liganden A und B, mit den pK_s -Werten 2.5, 4, 6 und 11 für A und 2, 3, 6 und 10 für B läßt sich jedes Verhältnis der verschiedenen Ligandenspezies bei gegebenen pH-Wert berechnen. Die verschiedenen Kurven dieser Ligandenverhältnisse weisen bei $pH = pK_A$ einen Wendepunkt auf.

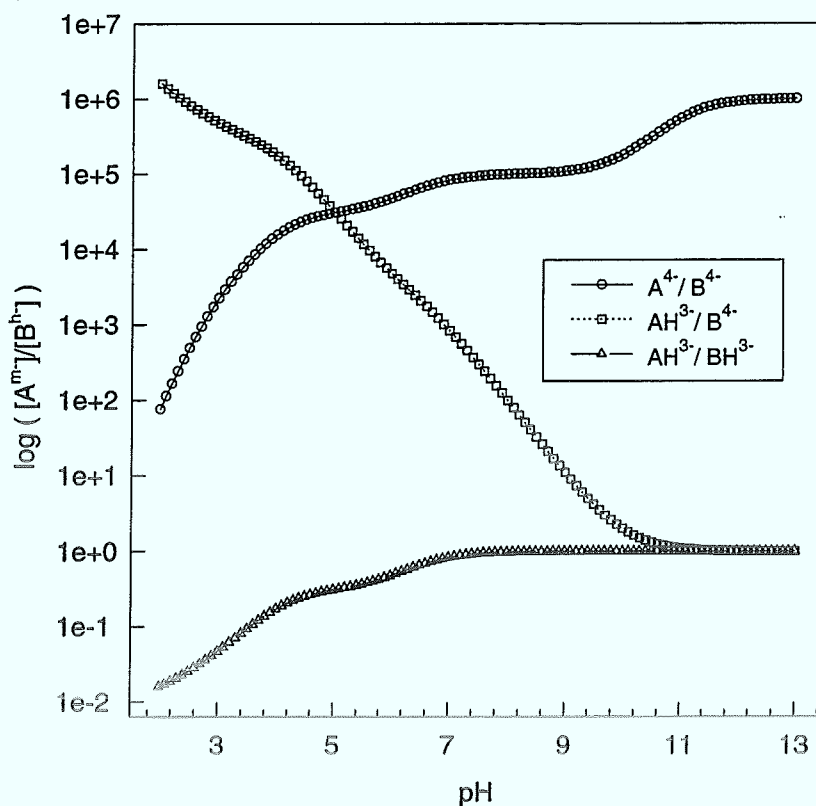


Abb.3.1. Auftragung $\log (A^{m-}/B^{h-})$ vs. pH; $pK_A = 2.5, 4, 6, 11$; $pK_B = 2, 3, 6, 10$

Nach Gleichung (22) sollte das Verhältnis der beiden Liganden, die die stabilste Form des jeweiligen Komplexes in der Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion repräsentieren, proportional zu dem gebildeten Komplexverhältnis sein, wobei die Proportionalitätskonstante durch das Verhältnis der Gesamtbildungskonstanten gegeben ist. Dies bedeutet, daß die Messung des Komplexverhältnisses den gleichen Kurvenverlauf zeigen sollte wie das Verhältnis der betrachteten Liganden. Aus einer Auftragung MA/MB vs. pH lassen sich somit folgende Informationen gewinnen:

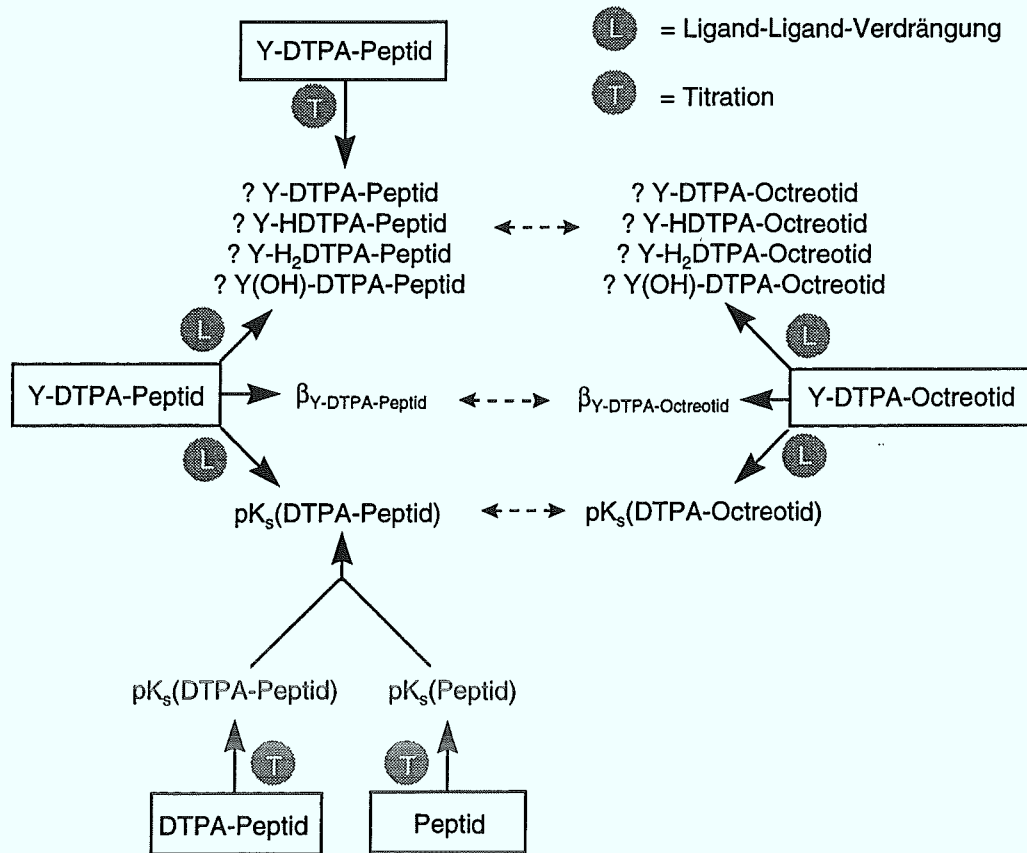
- Durch den Vergleich der Kurvenform von $[MA]/[MB]$ mit $[A^{m-}]/[B^{h-}]$ können die Ligandenspezies $[A^{m-}]$ und $[B^{h-}]$ ermittelt werden, die den stabilsten Komplex bilden.
- Aus den Wendepunkten sind die pK_s -Werte des Liganden A^{m-} bestimmbar. Mit diesen Konstanten läßt sich die Konzentration von A^{m-} in Gleichung (22) bestimmen. Da alle Variablen, $[A^{m-}]$, $[B^{h-}]$, $[MA]/[MB]$ und β_{MB} bekannt sind, kann Gleichung (22) nach β_{MA} gelöst werden.

Die Gesamt-Stabilitätskonstante des Komplexes MA kann dann durch Auftragung von $\log([MA]/[MB] + \log\beta_{MB}$ vs. $\log([A^m]/[B^h])$ erfolgen. Die Meßdaten sollten auf einer Geraden mit der Steigung 1 liegen, wobei der Y-Achsenabschnitt direkt die gesuchte Gesamtbildungskonstante des Komplexes MA wiedergibt.

Vor der Verwendung dieser Methode zur Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten eines unbekannten Komplexes sollte diese anhand von Standardmethoden überprüft werden. Hierzu müssen Derivate verwendet werden, die diesen Standardmethoden zugänglich sind und gleichzeitig das Komplexverhalten einer unbekannten Zielsubstanz möglichst gut simulieren. Die Daten aus den Standardmethoden können anschließend mit den Ergebnissen der Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion verglichen werden. Zeigen die berechneten Konstanten und Konzentrationen für die Modelle eine gute Übereinstimmung, sollte die Methode auf unbekannte Systeme anwendbar sein.

Die Methodik zur Bestimmung der einzelnen Konstanten und Konzentrationen ist für Y-DTPA-Peptide in Schema 3.2. dargestellt.

Mittels Titration sollen die pK_s -Werte der Einzelkomponenten, d.h. der DTPA-Peptide und der „Original“-Peptide, bestimmt, verglichen und einzelnen funktionellen Gruppen des Moleküls zugeordnet werden. Parallel erfolgt eine Titration der Y-DTPA-Peptide, über die protonierte Formen, bzw. die stabilste Struktur des Y-DTPA-Peptid-Komplexes, bestimmt werden können. Diese Daten, d.h. pK_s -Werte der DTPA-Peptide und stabilste Form des Y-DTPA-Peptid-Komplexes, sollten ebenfalls über die Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion berechenbar sein. Sind bei einer Gegenüberstellung die Resultate beider Methoden, bestimmt durch Titration und durch Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion, identisch, können die Stabilitätskonstanten ($\log\beta$) der Y-DTPA-Peptide nach der neuen Methode bestimmt werden. Abschließend kann dann die Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten und der Gesamt-Stabilitätskonstante von Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid erfolgen. Da bei den hier verwendeten Peptiden, analog zum Octreotid, die koppelnde Aminosäure das Phenylalanin ist, sollten als Ergebnis die Stabilitätskonstanten und Säuredissoziationskonstanten der Y-DTPA-Peptide und des Y-DTPA-Octreotids „vergleichbar“ sein.



Schema 3.2. Methodische Untersuchungen am Y-DTPA-Peptid-System zur Bewertung der Ergebnisse der Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion

4. Experimentelles

4.1. Radionuklide

4.1.1. $^{86}\text{Y}/^{88}\text{Y}$

Die Yttrium-Isotope ^{86}Y und ^{88}Y wurden über die Kernreaktion $^{86,88}\text{Sr}(p,n)^{86,88}\text{Y}$ aus angereichertem ^{86}Sr (96.3 %; Technabexport Moskau) bzw. natürlichem Sr (jeweils als Carbonat) dargestellt. Zur Produktion von ^{86}Y ($T_{1/2} = 14.7$ h, β^+ 32%) wurden SrCO_3 -Tabletten (300 mg; $\varnothing$ 13 mm Pellets) gepreßt. In einem Aluminium-Targethalter wurde das SrCO_3 -Pellet mittels einer 700 μm dicken Aluminium-Absorberfolie fixiert. Das Target wurde dann in einem Targetkopf mit 4π -Wasserkühlung [108] am Kompaktzyklotron CV 28 des Forschungszentrum Jülich GmbH mit Protonen bestrahlt. Für die Kernreaktion $^{86}\text{Sr}(p,n)^{86}\text{Y}$ lag die günstigste Energie im Bereich von 14→10 MeV [109]. In diesem Bereich ist der Anteil der $^{86}\text{Sr}(p,2n)^{85\text{m,g}}\text{Y}$ -Reaktion noch relativ gering und die Isotopenreinheit des erzeugten ^{86}Y mit >98% bei 2 h nach EOB recht hoch. Durch eine Bestrahlungsdauer von 4 h mit einem Strahlstrom von 4 μA wurden ca. 1000 MBq ^{86}Y erzeugt.

Die Darstellung von ^{88}Y ($T_{1/2} = 106.7$ d; EC) erfolgte analog über die $^{88}\text{Sr}(p,n)^{88}\text{Y}$ -Reaktion an $^{\text{nat}}\text{Sr}$. Durch die natürliche Isotopenzusammensetzung (^{84}Sr : 0.56%; ^{86}Sr : 9.86%; ^{87}Sr : 7.0%; ^{88}Sr : 82.58%) wurden weitere Yttrium-Isotope (^{85}Y , $^{85\text{m}}\text{Y}$, ^{87}Y , $^{87\text{m}}\text{Y}$) in Nebenreaktionen gebildet, spielten aber aufgrund der langen Halbwertszeit des ^{88}Y keine Rolle. Die Aktivitätsausbeute für ^{88}Y bei einer Bestrahlungsdauer von 5 h mit einem Strahlstrom von 5 μA im Energiebereich von 18→10 MeV lag insgesamt bei ca. 8 MBq.

Die Aufarbeitung des Targets wurde bei der Produktion von ^{86}Sr direkt im Anschluß an die Bestrahlung, bei der Produktion von ^{88}Y nach ca. 30 Tagen durchgeführt. Die radiochemische Abtrennung ist für ^{86}Y in Abb.4.1. dargestellt. Die Abtrennung von ^{88}Y aus dem $^{\text{nat}}\text{Sr}$ -Targetmaterial verlief analog [29].

Das SrCO_3 -Pellet wurde in 0.5 ml konz. HCl gelöst und mit 9.5 ml H_2O verdünnt. Die Abtrennung von ^{86}Y erfolgte durch Zugabe von Ammoniak und nach Zugabe von 1 mg La(III)-Träger durch Mitfällung an $\text{La}(\text{OH})_3$ in der Hitze. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und gewaschen. Die überstehende Lösung diente zur Rückgewinnung des ^{86}Sr .

Der La/Y-Hydroxid-Niederschlag wurde in 1-2 Tropfen $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ aufgenommen und mit 10 ml H_2O verdünnt. Zu dieser Lösung wurde Aminex A5 gegeben, welches nach Sorption der Y(III)- und La(III)-Kationen abzentrifugiert und in eine Kationentauschersäule (4x40mm) überführt wurde. Zur Beseitigung eventuell vorhandener Fe-Verunreinigungen wurde zuerst mit einer 0.07 M α -Hydroxyisobuttersäure-Lösung gespült. Die Elution des ^{86}Y erfolgte mit 0.15 M α -HIB, wobei die Hauptfraktion jeweils in wenigen Tropfen eluiert wurde. Der La-Träger verblieb quantitativ auf der Säule.

Zur Beseitigung der α -HIB wurde das Eluat mehrfach mit HClO_4 abgeraucht. Zur vollständigen Reinigung von α -HIB-Resten wurde der Rückstand in 0.15 M HCl aufgenommen, auf einen Kationentauscher (DOWEX 50W-X8) fixiert und mit 0.15 M HCl gespült. Die finale Elution des ^{86}Y erfolgte mit 6 M HCl.

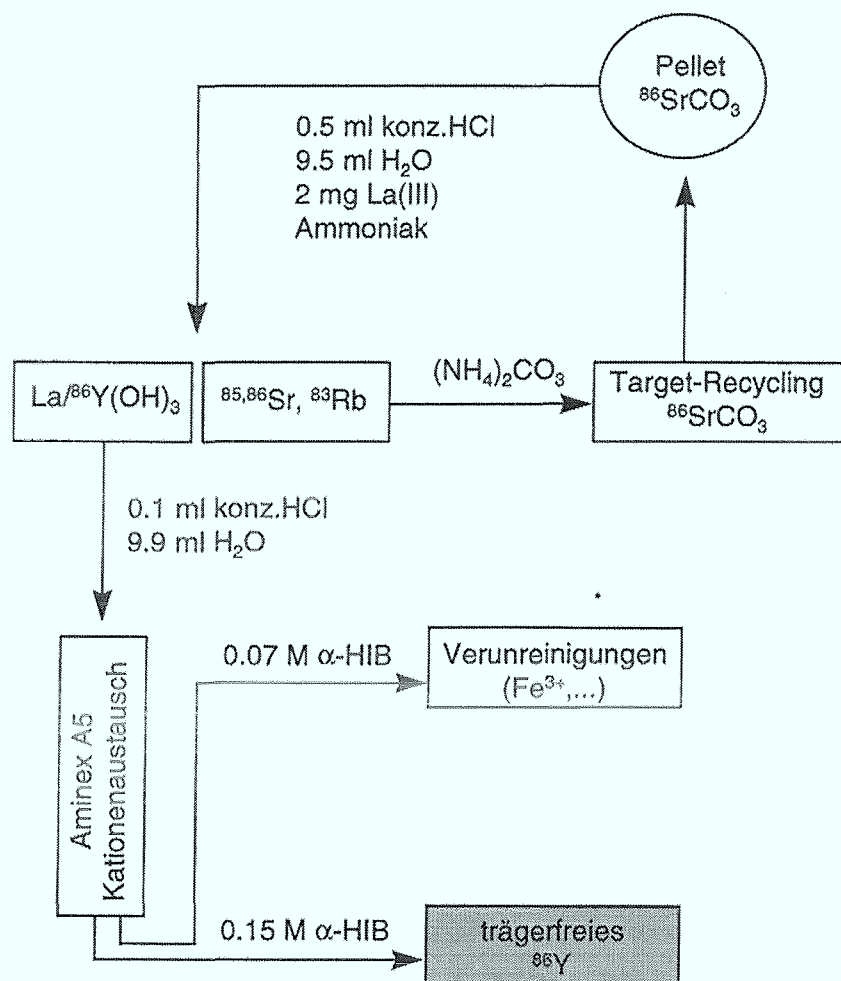


Abb.4.1.
Fließschema des radiochemischen Abtrennungsverfahrens für ^{86}Y

4.1.2. ^{67}Ga

^{67}Ga ($T_{1/2} = 78.3$ h; EC) wurde von Amersham Buchler als ^{67}Ga -Citrat bezogen (spez. Aktivität > 10 mCi/ μg) bzw. am CV 28 durch Bestrahlung von Zn-Targets in trägerfreier Form dargestellt.

^{67}Ga (Amersham) ^{67}Ga wurde als ^{67}Ga -Citrat geliefert und mußte deshalb vor der Verwendung von Citrat und Eisenspuren befreit werden. Die ^{67}Ga -Citrat-Lösung wurde auf einem Teflon-Plättchen bis zur Trockne eingengt, in 6 M HCl aufgenommen, zur Reduktion von $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ mit Zn-Körnchen versetzt und auf einen Anionentauscher (DOWEX 1-X8) aufgegeben. Durch Spülung mit 6 M HCl wurde das Citrat entfernt. Eluiert wurde die ^{67}Ga -Aktivität mit 1 M HCl. Fe^{2+} und Zn^{2+} wurden unter diesen Bedingungen nicht eluiert.

⁶⁷Ga-Produktion Die Darstellung von ⁶⁷Ga erfolgte durch Bestrahlung eines Zink-Targets mit Protonen über die Kernreaktion ^{nat}Zn(p,xn)⁶⁷Ga, wobei neben ⁶⁷Ga im wesentlichen ⁶⁶Ga (T_{1/2} = 9.4 h) koproduziert wurde. Die Zn-Targets wurden durch Pressen von Zn-Pellets (500 mg Zn; Ø 13 mm) aus ^{nat}Zn-Pulver hergestellt. Die Targetanordnung entspricht der für ^{86/88}Y beschriebenen. Die Strahlungsdauer am CV 28 betrug 6 h bei 4 µA.

Die Abtrennung der Gallium-Isotope vom Zn-Target erfolgte durch Kationenaustauschchromatographie. Das Target wurde in 8 M HCl gelöst und auf eine mit 8 M HCl konditionierte Kationenaustauschersäule (DOWEX 50W-X8; H⁺-Form; 5x30 mm) aufgegeben. Im Gegensatz zu Zn²⁺ wurden die Ga-Isotope unter diesen Bedingungen sorbiert. Die Elution erfolgte mit ca. 5 ml 4 M HCl. Zur Trennung von Fe³⁺ wurde die Lösung eingeeengt, in 8 M HCl aufgenommen und mit 10 mg KI versetzt. Die Lösung wurde auf eine Kationenaustauschersäule überführt, wobei das reduzierte Fe²⁺ eluiert und anschließend ^{66/67}Ga mit 4 M HCl eluiert wurde.

4.2. Darstellung der Ligand-Peptid-Systeme

Zur Darstellung von DTPA-Peptiden sowie von DFO-B-Linker-Peptiden wurden in Analogie zum Octreotid ausschließlich Peptide mit Phenylalanin als N-terminale Aminosäure verwendet. Im Vordergrund standen hierbei die Auswirkungen anderer Aminosäuren auf die Eigenschaften des Phenylalanins im Vergleich zur Aminosäuresequenz von Octreotid. Die angegebenen Konzentrationen in den Synthesen der Ligand-Peptid-Systeme wurden auf die vom Hersteller (Bachem) spezifizierten Peptidanteile bezogen.

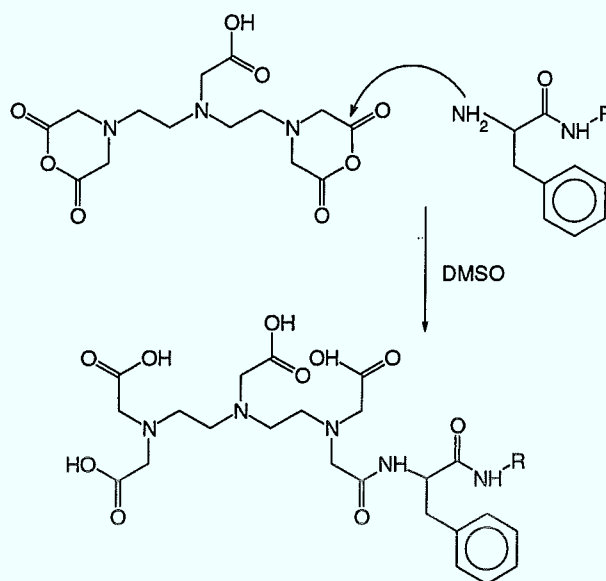
Tabelle 4.1. Herstellerangaben zu den verwendeten Peptiden

Peptid	M [g/Mol]	Peptidanteil [%]	Analysen- Nummer
H-Phe-Gly-Gly-OH	279.3	100	115118
H-Phe-Gly-Phe-Gly-OH	426.48	100	116172
H-Phe-Trp-OH·0.9 H ₂ O	367.6	>98	500617
H-Phe-Tyr-NH ₂ (· HCl)	327.4	84	123208
H-Phe-Gly-NH ₂ · HBr	302.2	100	122802
H-Phe-His-OMe (· 2 HCl)	316.4	80	123711
H-Phe-Ser-Val-OH · H ₂ O	370.3	>98	502463

4.2.1. Synthese von DTPA-Peptiden

4.2.1.1. DTPA-Phe-Gly-Gly-OH

In einem 50 ml Spitzkolben wurden 697 mg DTPA-Bisanhydrid (DTPA-BA) (1.95 mM) in 12 ml DMSO aufgenommen und gerührt. Nach der vollständigen Auflösung des DTPA-BA wurden 108.9 mg $\text{NH}_2\text{-Phe-Gly-Gly-OH}$ (0.39 mM) in 4 ml H_2O und 199 μl Diisopropylethylamin (1.17 mM) zugesetzt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt. Die klare, gelbliche Lösung wurde mit 17 ml 0.1 N NaOH versetzt und anschließend 4 mal mit je 50 ml Dichlormethan (CH_2Cl_2) ausgeschüttelt, wobei DMSO und Diisopropylethylamin in die organische Phase übergingen. Die wäßrige



Phase wurde eingeeengt und mit 7 ml 0.5 M HCl versetzt (pH ~ 3). Die Lösung wurde durch eine RP-18-Kartusche (4 ml) gedrückt und mit 20 ml H_2O nachgewaschen. Das Produkt wurde mit 30 ml $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/6) eluiert. Das Eluat wurde eingeeengt und auf eine SAX-Anionentauscher-Kartusche aufgegeben. Es wurde mit 20 ml Wasser gespült und anschließend mit 20 ml 0.1 N HCl eluiert. Das Eluat wurde eingeeengt und über eine RP-C-18-Kartusche gegeben. Nach dem Spülen mit 15 ml H_2O wurde mit 30 ml $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/6) eluiert. Das Eluat wurde eingeeengt und lyophilisiert. Die Analytik ergab folgende Werte:

DTPA-Phe-Gly-Gly:	(M 654.63); $\text{H}_{38}\text{C}_{27}\text{N}_6\text{O}_{13}$
Ausbeute:	170 mg (0.26 mM) = 67%
Produktanteil (Titration):	98.4%
Elementaranalyse:	
C:	47.7% (49.49% Theor.)
H:	5.8% (5.8%)
N:	12.4% (12.83%)

4.2.1.2. DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly, DTPA-Phe-Trp, DTPA-Phe-Tyr- NH_2

Die Darstellungen erfolgten analog DTPA-Phe-Gly-Gly unter folgenden Vorgaben:

Einwaage	(Phe-Gly-Phe-Gly):	50.25 mg (0.11782 mM)
	(Phe-Trp-0.9 H_2O):	41.75 mg (0.11357 mM)
	(Phe-Tyr- $\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$):	39.39 mg (0.10110 mM)

DTPA-BA wurde im fünffachen Überschuß, Diisopropylethylamin im dreifachen Überschuß zugegeben. Die Elution des Produktes von der RP-C18-Kartusche erfolgte mit:

DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly: MeOH/ H₂O (50/50)

DTPA-Phe-Trp: MeOH/ H₂O (70/30)

DTPA-Phe-Tyr-NH₂: MeOH/ H₂O (20/80)

Die Analytik ergab folgende Werte:

DTPA-Peptid [M]	Ausbeute [%] [mg]	Elementaranalyse [%] [theoretisch]			Anteil Titration [%]
		C	H	N	
DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly (H ₄₇ C ₃₆ N ₇ O ₁₄) (801.81)	58 [54.9]	51.6 [53.87]	5.9 [5.86]	11.6 [12.22]	96.5
DTPA-Phe-Tyr-NH ₂ (H ₄₂ C ₃₂ N ₆ O ₁₂) (702.72)	55 [39.4]	51.4 [54.64]	6.0 [5.98]	11.1 [11.95]	98.6
DTPA-Phe-Trp (H ₄₁ C ₃₄ N ₆ O ₁₂) (725.73)	56 [46.0]	51.6 [56.22]	5.7 [5.65]	10.4 [11.57]	85

4.2.1.3. [DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid (SDZ 215-811)

Zur Kopplung von DTPA an Octreotid (SMS 201-995) wurden 11.39 mg [ϵ -BOC-Lys⁵]- (SMS 201-995) (0.010175 mM) in 20 ml MeCN/0.05 M NaOAc (pH 6) (6/4) vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 36.4 mg DTPA-BA (0.10175 mM) zugegeben. Nach 60 min wurde die Lösung unter Membranpumpenvakuum (20 mbar) eingeeengt und mittels Dünnschichtchromatographie (Silicagel 60; CHCl₃/CH₃OH/ HOAc_{50%}(7/3/1)) und HPLC (Kromasil RP-C18; 5 μ m, 250x4 mm; MeOH/Phosphat-Puffer (0.06 M)/(CH₃)₄NOH (0.2 M) (75/20/5); 0.8 ml/min; UV: 287 nm) analysiert. Die DC bzw. HPLC ergaben folgende Werte:

	[R _f]	[k'] ²
[ϵ -BOC-Lys ⁵]-Octreotid:	0.83	2.5
[DTPA-(D)Phe ¹ - ϵ -BOC-Lys ⁵]-Octreotid:	0.35	1.2
[DTPA-([D-Phe ¹ - ϵ -BOC-Lys ⁵] ₂)-Octreotid:	0.88	7.1
DTPA:	0	0.1

Die Produkte wurden durch Fixierung auf einer RP-18-Kartusche vom überschüssigen DTPA abgetrennt. Die Elution erfolgt mit MeOH. Die methanolische Lösung wurde eingeeengt, der Rückstand mit 300 μ l Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und 1 min gerührt. Die

² k': (t-t₀)/t₀; t: Retentionszeit; t₀: Totzeit der HPLC-Anordnung

TFA wurde anschließend im N₂-Strom ausgetrieben und der Rückstand in 1 ml H₂O aufgenommen. Die Abtrennung des Produktes erfolgte mittels semi-präparativer HPLC (Kromasil RP-C18; 5 µm, 250x10 mm; MeOH/Phosphat-Puffer (0.06 M)/(CH₃)₄NOH (0.2 M)(65/30/5); 3 ml/min; UV: 287 nm). Zur abschließende Reinigung mittels Festphasenextraktion wurde das Produkt auf einer RP-18-Kartusche fixiert, mit MeOH eluiert, unter Vakuum vom Lösemittel befreit, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Ausbeute lag bei 7.3 mg (52%); DC-Analytik (s.o.) für [DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid: R_f 0.32

4.2.2. [DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid

3.53 mg ($3.1535 \cdot 10^{-6}$ M) BOC-Octreotid ([ε-BOC-Lys⁵](SMS 201-995)) wurden in 1 ml DMSO vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 50 µl ($2.87 \cdot 10^{-4}$ M) Diisopropylethylamin und 11.02 mg ($3.377 \cdot 10^{-5}$ M) Disuccinimidylglutarat (DSG) zugegeben. Die Lösung wurde anschließend bei RT 60 min gerührt. Zu dieser Lösung wurden 46.7 mg ($7.11 \cdot 10^{-5}$ M) Desferrioxamin-B (DFO-B) in 2 ml DMSO zugetropft. Nach 20 min war die Reaktion abgeschlossen. Die Lösung wurde mit 20 ml H₂O verdünnt und auf eine RP-18-Kartusche aufgegeben. Anschließend wurde nacheinander mit 20 ml H₂O, 10 ml H₂O/MeCN (90/10), 2 ml H₂O/MeCN (30/70) und 2 ml MeCN eluiert. Die Lösung H₂O/MeCN (30/70) wurde unter Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der weiße Rückstand wurde mit 300 µl TFA aufgenommen und 1 min gerührt. Die TFA wurde im N₂-Strom ausgetrieben und der Rückstand in 2 ml H₂O/MeCN (90/10) aufgenommen. Die abschließende Reinigung erfolgte durch erneute Fixierung des Produktes auf einer RP-18-Kartusche und nachfolgender Elution mit 10 ml H₂O, 3 ml H₂O/MeCN (60/40), 3 ml H₂O/MeCN (30/70) und 2 ml MeCN. Die Produktfraktion (H₂O/MeCN (60/40)) wurde eingengt, mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 2.5 mg (45%).

4.2.3. [DFO-B-Suberyl-(D)Phe¹]-Octreotid

3.35 mg ($2.9227 \cdot 10^{-6}$ M) BOC-Octreotid ([ε-BOC-Lys⁵](SMS 201-995)) wurden in 1 ml DMSO vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 50 µl ($2.87 \cdot 10^{-4}$ M) Diisopropylethylamin und 11.04 mg ($2.997 \cdot 10^{-5}$ M) Disuccinimidylsuberat (DSS) zugegeben und bei RT 60 min gerührt. Zu dieser Lösung wurden 39.92 mg ($6.078 \cdot 10^{-5}$ M) Desferrioxamin-B (DFO-B) in 2 ml DMSO zugetropft. Nach 20 min war die Reaktion abgeschlossen. Die Lösung wurde mit 20 ml H₂O verdünnt und auf eine RP-18-Kartusche aufgegeben. Anschließend wurde nacheinander mit 20 ml H₂O, 10 ml H₂O/MeCN (90/10), 2 ml H₂O/MeCN (30/70) und 2 ml MeCN eluiert. Die Lösung H₂O/MeCN (30/70) wurde unter Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der weiße Rückstand wurde mit 300 µl TFA aufgenommen und 1 min gerührt. Die TFA wurde im N₂-Strom ausgetrieben und der Rückstand in 2 ml H₂O/MeCN (90/10) auf-

genommen. Die Abtrennung erfolgte durch erneute Fixierung des Produktes auf einer RP-18-Kartusche und nachfolgender Elution mit 10 ml H₂O, 2 ml H₂O/MeCN (60/40), 2 ml H₂O/MeCN (30/70) und 2 ml MeCN. Die Produktfraktion (H₂O/MeCN (60/40) ~ 85% und H₂O/MeCN (30/70) ~ 15%) wurde eingeeengt und mit 10 ml 0.05 M NH₃-Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde auf eine Anionentauscher-Kartusche gegeben und anschließend mit 10 ml H₂O, 2 ml 0.02 M HCOOH, 2 ml 0.05 M HCOOH, 2 ml 0.2 M HCOOH und 2 ml 1 M HCOOH eluiert. Die Produktfraktion (0.2 M HCOOH) wurde bis zur Trockne eingeeengt, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Die Ausbeute lag bei 3.45 mg (67%).

4.3. Radioaktive Markierung von Chelat-Peptiden mit ^{88/86}Y, ⁶⁷Ga

Allgemein erfolgte die Markierung der Chelat-Peptid-Systeme durch Zugabe von Pufferlösungen, die das radioaktive Metall enthielten, zu definierten Mengen einer wäßrigen Chelat-Peptid-Stammlösung (NaOAc-Puffer bzw. NH₄OAc-Puffer, pH 4.5-6). In pH-abhängigen Untersuchungen wurden dazu Puffer mit hoher Pufferkapazität im zu untersuchenden Bereich verwendet (0.1 M Glycin/NaCl/HCl (pH 1.4-3.4); 0.1 M KHPthalat/HCl (2.4-4.0); 0.1 M KHPthalat/NaOH (pH 4.2-6.2); 0.1 M NaOAc/HOAc (pH 3.8-5.6)). Aufgrund der starken Komplexbildung von Citrat mit dreiwertigen Metall-Kationen wurde in Markierungsversuchen kein Citrat-Puffer verwendet. Die Puffer wurden so gewählt, daß eine Ionenstärke von ~ 0.1 resultierte.

^{88/86}Y bzw. ⁶⁷Ga wurden einer salzsauren Stammlösung aus den Target-Aufarbeitungen entnommen. Bestimmte Aktivitätsmengen bzw. Volumina, die dem jeweiligen Experiment angepaßt waren, wurden auf einem Teflon-Plättchen bis zur Trockne eingeeengt. Über dem Teflonplättchen wurde während des Eindampfens ein Becherglas plaziert, um Kontaminationen mit Metallverunreinigungen aus der Luft zu vermeiden. Die Aktivität wurde anschließend mit kleinen Mengen des verwendeten Puffers aufgenommen und der Chelat-Peptid / Puffer-Lösung zugeführt.

Die Bestimmung der Markierungsausbeute erfolgte 15-60 min nach Zugabe der Aktivität mittels Radiopapierelektrophorese, Radiodünnschichtchromatographie und Radio-HPLC. Nach der Qualitätskontrolle wurden die Lösung mit dem Puffersystem entsprechend den Versuchsanforderungen verdünnt.

4.4. Chromatographie der Radiometall-Chelat-Peptid-Systeme

4.4.1. HPLC und Radio-HPLC

Zur Bestimmung der Markierungsausbeute wurde ein Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System der Fa. Sykam verwendet (2 Pumpen: S1100; UV-Detektor: S3200). Die Anordnung ermöglichte isokratische als auch binäre Hochdruck-Gradienten-Systeme. Die Injektionen erfolgten über ein chemisch inertes Hochdruck-Injektionsventil (S9010) (PEEK-Ausführung), wodurch Kontaminationen des Injektionsventils mit trägerfreien Metallen vermieden werden konnte. Die kontinuierliche Radioaktivitätsmessung erfolgte mittels eines nachgeschalteten NaI-Szintillationsdetektors (M 2102.20; Meßelektronik Dresden GmbH). Zur Auswertung und Integration der UV- sowie Aktivitäts-Signale wurde das Axxiom Chromatographie Datensystem 727 (Sykam GmbH) verwendet.

Zur Analytik und Abtrennung der Proben wurden folgende Säulen eingesetzt:

„Reverse Phase“ Chromatographie:

Kromasil RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm

Nucleosil RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm

Nucleosil RP-18, 5 µm, 250 x 10 mm

Kromasil RP-8, 5 µm, 250 x 4 mm

PRP 1-10, 250 x 4.6 mm

Gelfiltrationschromatographie:

Bio-Sil SEC 250, 300 X 7.8 mm

Die Flußraten betrugen 1 ml/min bei Anwendung von analytische RP-Säulen auf Kieselsäure-Basis und der Gelchromatographie bzw. 1.5 ml/min bei Anwendung der RP-Säule (PRP 1-10) auf Polymerbasis. Die Abtrennungen mittels semi-präparativer RP-Chromatographie erfolgten mit Flußraten von 4-6 ml/min.

4.4.2. Radiodünnschichtchromatographie

Die Markierungsausbeuten wurden speziell im Vorfeld tierexperimenteller Untersuchungen mit ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid parallel zu den hochleistungsflüssigkeitschromatographischen Untersuchungen mittels Radiodünnschichtchromatographie bewertet. Für die Messungen wurde Silicagel Si-60 auf Aluminiumunterlage (Merck) verwendet. 2-5 µl der Markierungslösung wurden auf die DC-Streifen aufgetragen und anschließend in der Laufkammer (Laufmittel: Chloroform / Methanol / Essigsäure_{50%} 7/3/1 (v/v/v)) entwickelt. Die DC-Streifen wurden anschließend in 0.5-1 cm Streifen zerschnitten und am γ-Counter (Packard Instruments Company) ausgemessen.

4.4.3. Radiopapierelektrophorese

Als weitere schnelle Methode zur Bestimmung von Markierungsausbeuten diente die Radiopapierelektrophorese. Hierzu wurden 5 μl der Markierungslösung auf einen 40 cm langen, völlig mit Elektrolyt benetzten Papierstreifen (MN 260, Machery und Nagel) aufgetragen. Die Enden des Streifens tauchten in eine Elektrolyt-Lösung (0.075 M TRIS-Acetat-Puffer). Die Elektrophoresedauer betrug 1.5 h bei 400 V. Im Anschluß wurde der Papierstreifen vom Startfleck in Richtung Anode und Kathode in definierte Abschnitte (1 cm) zerschnitten und am γ -Counter gemessen.

4.5. Meßmethoden

4.5.1. Arbeiten unter inerten Bedingungen

Die Lösung von Funktionen zur Bestimmung physikalisch-chemischer Parameter von Metall-Ligand-Verbindungen ist eng gekoppelt an die Güte der Einzelmessungen, gerade in den Fällen, in denen unabhängige Gleichgewichte verglichen werden sollen. Voraussetzung hierfür sind größtmögliche Reinheit aller Edukte sowie inerte Umgebung der Reaktionslösungen [110].

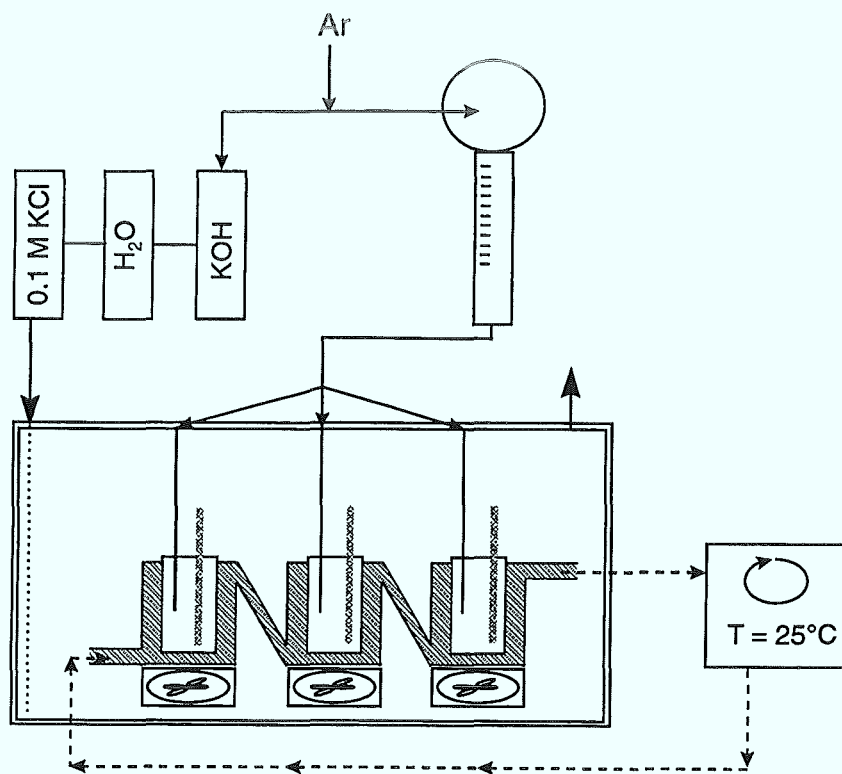


Abb.4.2. Versuchsanordnung für Untersuchungen unter inerten Bedingungen

Die zur Messung der Stabilitätskonstanten, der Säuredissoziationskonstanten sowie zur Eichung des pH-Meters verwendete Anordnung ist in Abb.4.2. dargestellt. Um eine inerte Atmosphäre zu erreichen, wurde eine Acryl-Glas-Box mit Inertgas-Ein- und Auslaß verwendet. Die Box wurde ständig unter einem Argon-Strom gehalten. Das Argon wurde vorher durch eine konzentrierte KOH-Lösung geleitet, um

CO₂-Spuren abzufangen, welche sich gerade bei exakten pH-Wert-Messungen negativ auswirken. Um den Dampfdruck über den Reaktionsgefäßen zu erniedrigen, wurde das Argon durch eine 0.1 M KCl-Lösung geleitet und mit Wasserdampf gesättigt. Zur guten Durchmischung der Reaktionslösungen wurden diese auf einem Magnetrührer plziert. Zusätzlich wurde außerhalb der Box eine Bürette an die Reaktionsgefäße angeschlossen, in der die Titrationslösung unter inerten Bedingungen aufbewahrt werden konnten. Die Temperatur in den Lösungen wurde mittels Durchfluß über einen externen Thermostaten konstant gehalten.

Die Versuchsanordnung der Reaktionsgefäße ist in Abb. 4.3. schematisch dargestellt. Die Lösungen wurden in einem Teflon-Gefäß mit geringer Wandstärke gerührt. Das Teflon-Gefäß war in ein Kupfergefäß eingefafßt, welches an den Thermostaten angeschlossen war. Im Deckel des Gefäßes befand sich ein Einlaß für die Elektrode und eine PEEK-Kapillare, über die Titrationslösungen zugeführt werden konnte.

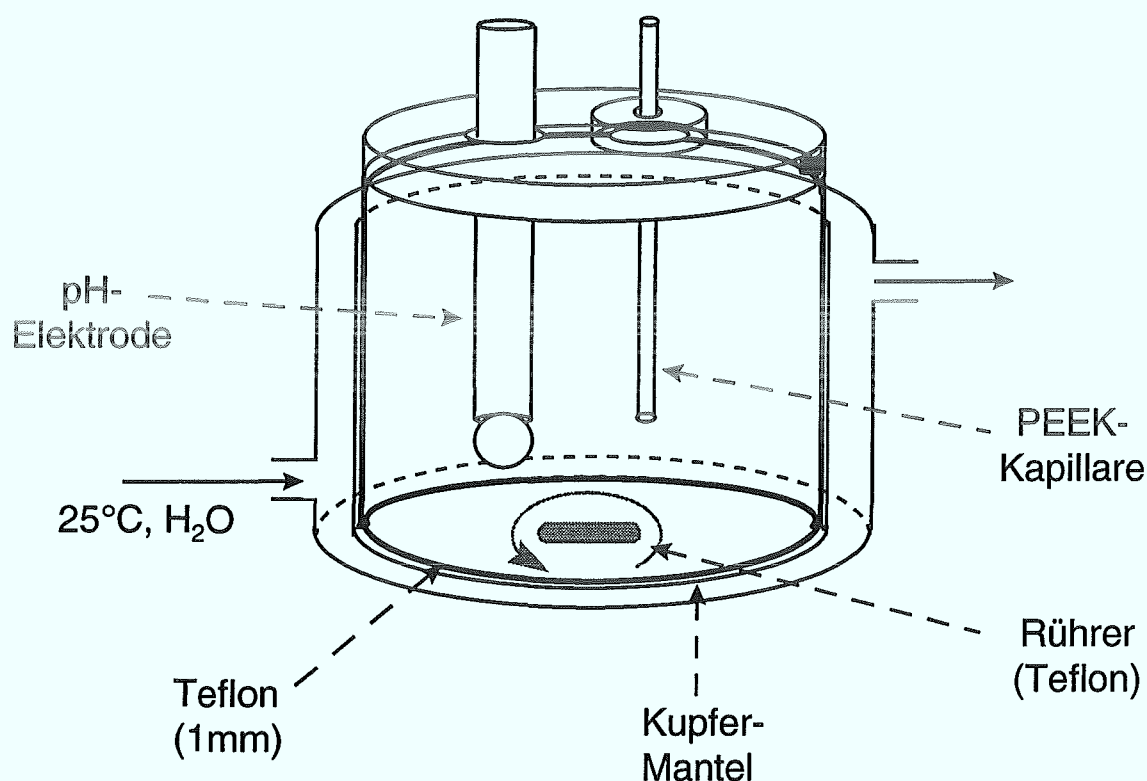


Abb.4.3. Reaktionsgefäß zur Bestimmung sensibler Gleichgewichte

Durch diese Anordnung wurden die Fehler durch Verunreinigung mit Metallen (Reaktions- und Titrationslösung hatten zu keiner Zeit Kontakt mit Metalloberflächen) sowie anderen Verunreinigungen (z.B. CO₂) minimiert (pH-Drift < 0.002/h).

4.5.2. Messung von Komplexbildungskinetiken

Die Bestimmung der Komplexbildungskinetik im ^{88}Y / DTPA-Peptid-System sollte durch die Isotopenaustauschmethode erfolgen. Der Austauschgrad wurde dabei durch den Vergleich der komplexierten ^{88}Y -Aktivität zur freien $^{88}\text{Y}^{3+}$ -Aktivität in der Lösung bestimmt. Für diese Untersuchungen wurde eine 0.28 mM/L ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly-Stammlösung angesetzt. Vor den Einzelexperimenten wurden definierte Mengen einer 2.9 mM/L YCl_3 -Lösung zu dieser Stammlösung gegeben, so daß ein Yttrium/DTPA-Phe-Gly-Gly-Verhältnis von 0.95/1 resultierte. Nach ca. 20 min wurde diese konzentrierte Lösung durch Zugabe eines Standardpuffers verdünnt. Zu dieser verdünnten Lösung wurden definierte Menge der YCl_3 -Lösung gegeben (Zeitpunkt: t_0 für die Isotopenaustauschreaktion). Die Reaktionen wurden in einem Reactivial (Wheaton, Aldrich) mit Teflon-Rührer und Schraubverschluß durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Reaktionslösungen betrug 2 ml. Die Reaktion wurde bis zum Erreichen des durch die Stöchiometrie Y-DTPA-Phe-Gly-Gly/ YCl_3 vorgegebenen Gleichgewichtes verfolgt. Bei festgelegten Zeitpunkten wurden 100 μl der Reaktionslösung entnommen und auf eine mit KCl, pH 7 konditionierte Kationenaustauscher Kartusche (SCX, 500 mg, Merck) gegeben. Die ^{88}Y -DTPA-Peptid-Fraktion wurde anschließend mit 2 ml 0.1 N KCl eluiert. Die Elution der freien $^{88}\text{Y}^{3+}$ -Aktivität erfolgte mit 3 ml 0.15 M Na_3Citrat -Lösung. Die beiden Fraktionen sowie der Nachlauf wurden am γ -Counter gemessen.

4.5.3. Messung von Komplexstabilitäten

Zur Berechnung von Stabilitätskonstanten waren eine inerte Atmosphäre als auch Reagenzien höchsten Reinheitsgrades erforderlich. Die Stabilitätsuntersuchungen wurden unter den in Abschnitt 4.5.1. beschriebenen Arbeitsmethoden durchgeführt.

Die Konzentrationen der DTPA-Peptide in der 0.1 N KCl lagen zwischen 0.5-1 mM/L. Das Anfangsvolumen betrug 27 ml. Die pH-Werte der Lösung wurden durch Zugabe einer 0.1 N HCl bzw. 0.1 N KOH eingestellt. Zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung ^{88}Y -EDTA / ^{88}Y -DTPA-Peptid wurden 2-5 Einzelmessungen 15 min - 120 h nach pH-Konstanz ($\text{pH} \pm 0.002$) durchgeführt. 100-300 μl der Lösung wurden auf eine mit 0.1 N KCl konditionierte RP-Kartusche (Lichrolut® EN, 200 mg, Merck) gegeben. Zur Abtrennung des ^{88}Y -EDTA wurde die Kartusche zweimal mit jeweils 3 ml 0.1 N KCl gespült. Die Elution des ^{88}Y -DTPA-Peptides erfolgte mit zweimal 3 ml MeOH. Zur Bestimmung der Aktivitäten wurden diezelfraktionen am γ -Counter gemessen.

Die Aktivitätsverteilung der 4 Fraktionen ist für ein typisches Beispiel in Abbildung 4.4. dargestellt.

Die KCl-Fractionen spiegeln hierbei den Anteil des ^{88}Y -EDTA und die MeOH-Fractionen den Anteil des ^{88}Y -DTPA-Peptides im Komplexeleichgewicht wieder.

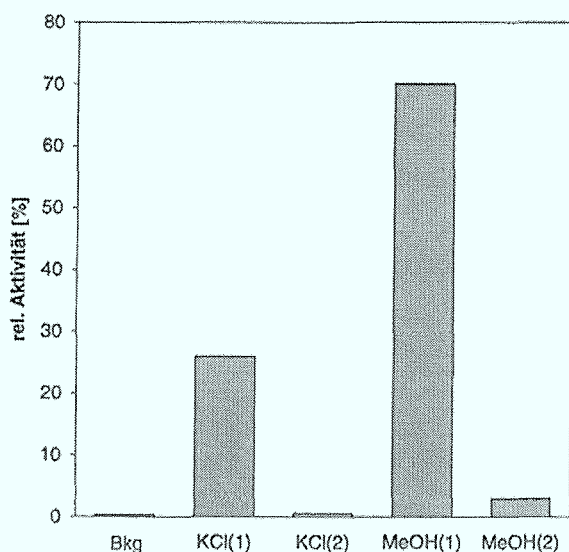


Abb.4.4
Verteilungsmuster der 0.1 N KCl und MeOH-Fractionen für das Komplexeleichgewicht ^{88}Y -EDTA / ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid auf einer RP-Kartusche (pH 4.700, n=3, Bkg: Untergrund)

4.5.4. Aktivitätsmessungen

Die Bestimmung von Radioaktivitätsverteilungen in HPLC-chromatographischen Analysen erfolgte bei genügend hoher Aktivität on line (s. Kapitel 4.4.1.). Zusätzlich wurden die Aktivitäts-Peaks in einzelnen Fraktionen aufgefangen. Diese Fraktionen, sowie die Einzelfractionen aus kinetischen und Stabilitätsuntersuchungen, wurden zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung an einem Auto-Gamma-Zählsystem (Cobra[®], Modell 5002, Packard Instruments Company) gemessen. Im Falle des ^{88}Y wurden zwei Energiefenster eingestellt (800-1000 keV und 1600-2000 keV). Analysen von ^{67}Ga -Verteilungen erfolgten in einem Energiefenster von 200-400 keV. Die Zähldauer lag je nach Aktivitätsmenge bei 2 -15 min, wodurch der statistische Fehler bei < 1% lag. Durch Messung von 10-20 Proben des HPLC-Eluens bzw. 0.1 N KCl wurde der Untergrund (Bkg) bestimmt, gemittelt und automatisch subtrahiert. Quantitative Aktivitätsmessungen bzw. Aktivitätsmessungen von Proben mit geringer Aktivität erfolgten durch Auswertung der 1836 keV- γ -Linie des ^{88}Y an kalibrierten Ge(Li)- und HPGe-Detektoren.

4.5.5. pH-Messung

Die pH-Werte wurden mit einem Mikroprozessor-pH-Meter 764 von Knick (pH-Bereich: -2.000...+16.000) gemessen. Die Temperaturkompensation erfolgte automatisch über einen Pt-1000 Temperaturfühler. Als Elektrode diente eine Halbmikro-pH-Einstabmeßkette (Schaftdurchmesser 6 mm) von Ingold.

Das pH-Meter wurde durch Bestimmung der Steilheit der Elektroden (mV/pH) sowie deren Nullpunkt (pH bei 0 mV) geeicht. Hierzu wurden definierte Mengen einer 0.1 N HCl-Lösung zu einem definierten Volumen 0.1 N KCl gegeben. Die Protonenaktivität in der Lösung wurde berechnet und das pH-Meter entsprechend eingestellt. Diese Lösung wurde anschließend gegen 0.1 N KOH titriert. Durch Vergleich der berechneten und gemessenen Protonenaktivität im sauren Bereich konnten Steilheit und Nullpunkt ermittelt werden. Für jede verwendete Elektrode wurden diese Daten bestimmt und jeweils durch drei unabhängige Titrationskurven auf ihre Genauigkeit überprüft.

Vor allen Experimenten wurden die elektrodenspezifischen Daten in das pH-Meter eingegeben und anhand von Standardpuffern überprüft.

4.5.5.1. Eichung der 0.1 N KOH

Als Standard KOH wurde eine Titriplex-Lösung von Merck verwendet. Naturgemäß beinhalten diese Lösungen kleine Mengen an Carbonat, die die Meßergebnisse verfälschen. Der Anteil an Carbonat wurde über einen *Gran's-Plot* [111] ermittelt.

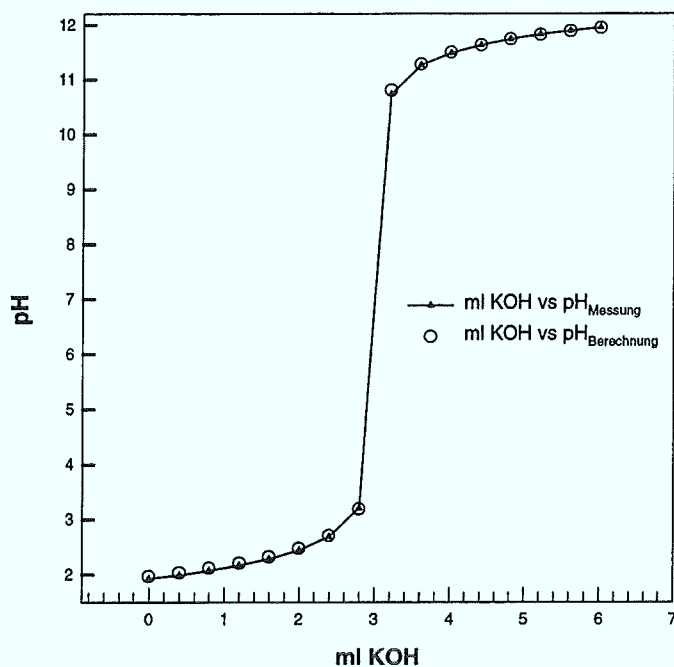
Im *Gran's Plot* wird ϕ :

$$\begin{aligned} \phi &= (V_0 + V_{\text{KOH}}) \cdot 10^{\pm R} \\ V_0 &= \text{Ausgangsvolumen} \\ V_{\text{KOH}} &= \text{Volumen KOH zugegeben} \\ R &= \text{pH-Meter-Anzeige} \\ \text{"-"} &= \text{bei pH} > 7 \\ \text{"+"} &= \text{bei pH} < 7 \end{aligned}$$

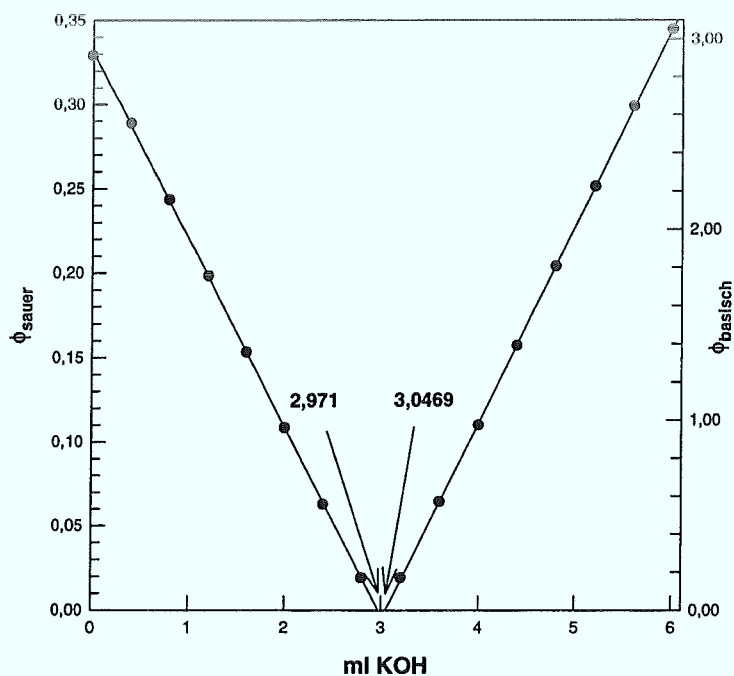
(23)

gegen die zugegebenen ml KOH aufgetragen.

In Abb. 4.5. ist eine typische Titrationskurve für 0.1 N KOH vs. pH dargestellt.



Die scheinbar exakten pH-Werte lassen sich durch Auftragung des *Gran's Plot* überprüfen.



Die Differenz der beiden x-Achsenabschnitte spiegelt den Gehalt an Carbonat wieder. In diesem Plot berechnet sich der Carbonat-Anteil zu 1.25%.

4.6. Radiopharmakologische Untersuchungen

4.6.1. Bestimmung der Lipophilie von ^{67}Ga -[DFO-B-Linker-(D)Phe¹]-Octreotiden und ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid

Die Lipophilie der ^{88}Y - bzw. ^{67}Ga -markierten Octreotide wurde durch Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungs-Koeffizienten ($\log P$) ermittelt [cf.112,113]. 15 μl der Metall-Ligand-Peptid-Lösung (1mM/L) wurden zu einem Gemisch aus 0.485 ml 0.1 M NaOAc/HOAc bzw. 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten und 4 ml n-Octanol gegeben. Diese Gemische wurden bei RT ca. 5 min geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Der Koeffizient wurde durch Vergleich der Aktivität eines 2 ml Aliquots der Octanol-Fraktion gegenüber der Restmischung bestimmt. Die Aktivitätsmessung erfolgte in einem γ -Counter mit Probenwechsler der Fa. Packard.

4.6.2. Bestimmung der metabolischen Stabilität in Blut, Leber, Urin, Pankreas und Tumor

Die Analytik der metabolischen Stabilität der im Tierexperiment untersuchten Verbindungen ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid und ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid erfolgte mittels Radio-HPLC.

Die Urinproben wurden direkt der Blase der Versuchstiere (Ratten) entnommen, mit dem Fünffachen des HPLC-Eluens verdünnt und aufgegeben. Die Blutfraktionen wurden zentrifugiert und das überstehende Serum von Blutplättchen befreit. Zur Untersuchung der Aktivität in Leber, Pankreas und Tumor wurden 0.2-0.5 g schwere Gewebeproben nach Versuchsende entnommen und nach Zugabe von 2-3 ml $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (50/50;v/v) homogenisiert. Die Suspensionen wurden zentrifugiert und Aliquote der überstehenden Lösung Radio-HPLC-chromatographisch analysiert. Die Bestimmung der Aktivitätsverteilung erfolgte durch Fraktionierung entlang der Chromatogramme und anschließender Messung am γ -Counter bzw. Ge(Li)-Detektor.

4.6.3. Durchführung tierexperimenteller Studien

In tierexperimentellen Studien wurden männliche und weibliche LEWIS-Ratten (250-300g) (Ifa Credo, Lyon, Frankreich) verwendet. Als Tumor-Modell stand ein exokrin pankreatischer Inselzell-Tumor zur Verfügung. Der Tumor wurde den Ratten durch subkutane Injektion einer Zell-Suspension in die Scapular-Region (5-7 Tage vor den Tier-Versuchen) implantiert.

Vor der Applikation der Radiopharmaka wurden die Ratten 1 min mit Isofluran betäubt und anschließend durch Injektion von Pentobarbital (60 mg/ml in 0.9%iger NaCl) narkotisiert. Die Injektion der Radiopharmaka erfolgte in die vena jugularis.

In ex vivo-Bioverteilungsuntersuchungen wurden die Ratten nach definierten Zeiten getötet, die Organe entnommen, und am γ -Counter gemessen.

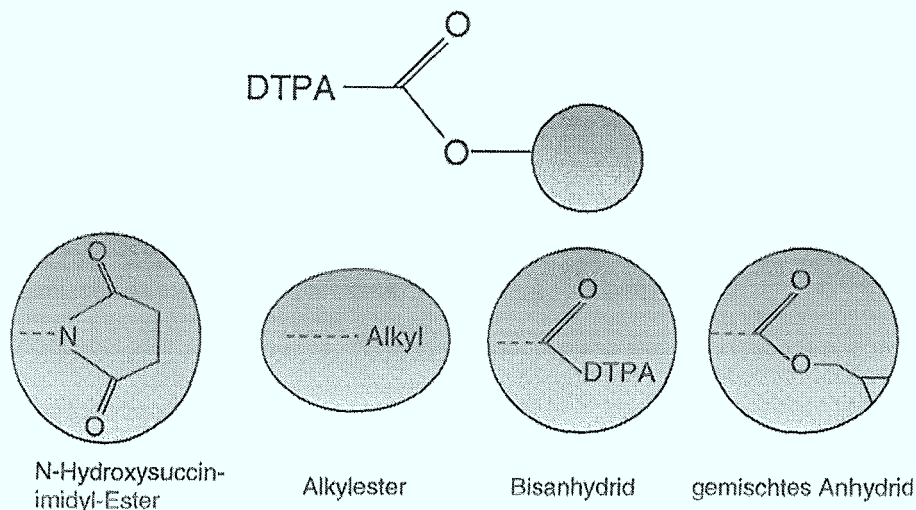
Für dynamische in vivo-PET-Messungen stand ein Scanditronix/GE Scanner PC4096-15B [114] zur Verfügung. Vor den PET-Messungen wurden die Ratten auf dem Scanner fixiert und eine Ganzkörper-Transmissionsmessung durchgeführt.

Nach den PET-Messungen wurden die Ratten für ex vivo-Bioverteilungsuntersuchungen getötet und die Organe am γ -Counter gemessen.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Untersuchungen am DTPA-Peptid-System

Zur Darstellung von DTPA-Peptid-Systemen, in denen das DTPA direkt über eine Carboxyl-Funktion an das Peptid gekoppelt ist, existieren mehrere Ansätze. Diese Ansätze beinhalten die Aktivierung einer Carbonsäure durch Bildung von Anhydriden, gemischten Anhydriden und Estern. (Schema 5.1.)



Schema 5.1.
Aktivierung einer Carbonsäure von DTPA

Die Vor- und Nachteile der einzelnen Aktivierungsmethoden sind in Tabelle 5.1. zusammengefaßt.

Tab.5.1. Vergleich der Aktivierungsmethoden von Carboxyl-Funktionen zur nuklearmedizinischen Anwendung

	Vorteil	Nachteil
Gemischtes Anhydrid [36]	• schnelle Reaktion	• unspezifisch • nicht isolierbar • hydrolyseempfindlich
Bisanhydrid [60]	• schnelle Reaktion • spezifisch (pH Kontrolle)	• cross-linking • hydrolyseempfindlich
N-Hydroxy-Succinimid-Pentaester [115]	• „stabil“ in wässriger Lösung	• cross-linking • langsame Reaktion
N-Hydroxy-Succinimid-Monoester [116]	• keine cross-linking-Produkte	• Darstellung schwierig • langsame Reaktion

Die gemischte Anhydrid-Methode zeichnet sich durch hohe Reaktionsfähigkeit aus, ist dadurch aber unspezifisch. Die Reaktion mit Tyrosin und Cystein liefert Produkte, die in vivo instabil sind. Die Aktivierung mit N-Hydroxy-Succinimydyl-Estern bietet die Möglichkeit auch bei relativ hohen pH-Werten hohe Reaktionsausbeuten zu erzielen. Bei Verwendung von Pentaestern werden jedoch vernetzte Strukturen möglich. Die Verwendung von Monoestern wird hauptsächlich durch seine Darstellung erschwert. Die Bis-anhydrid-Methode bietet zwar auch die Möglichkeit des cross-linkings, hat jedoch aufgrund der einfachen Herstellung sowie der spezifisch steuerbaren Reaktion Vorteile. Da DTPA-BA kommerziell erhältlich ist, werden direkte Kopplungen von DTPA in den meisten Fällen mit dem zyklischen Anhydrid durchgeführt.

Zur Synthese verschiedener DTPA-Peptid-Systemen wurde dieser Darstellungsweg gewählt.

Die Peptide mit der N-terminalen Aminosäure Phenylalanin wurden entsprechend dem N-Terminus des Octreotid (SMS 201 995) ausgewählt, da die weiteren Untersuchungen an dem DTPA-Peptid-System direkt auf Octreotid übertragen, bzw. Abhängigkeiten von der Peptidsequenz berücksichtigt werden sollten.

- NH_2 -Phenylalanin-Glycin-Glycin-COOH (Phe-Gly-Gly)
- NH_2 -Phenylalanin-Glycin-Phenylalanin-Glycin-COOH (Phe-Gly-Phe-Gly)
- NH_2 -Phenylalanin-Tryptophan-COOH (Phe-Trp)
- NH_2 -Phenylalanin-Tyrosin-CONH₂ (Phe-Tyr)
- NH_2 -Phe¹-ε-BOC-Lys⁵-Octreotid (BOC-Octreotid)

5.1.1. Einfluß der Edukt-Konzentrationen auf das cross-linking

Das Reaktionsverhalten von DTPA-BA mit den gewählten Peptiden und die daraus resultierende Produktzusammensetzung wird in erster Linie von den Edukt-Konzentrationen abhängen. Da beide aktivierte Gruppen des DTPA-BA gleiche Reaktionswahrscheinlichkeit besitzen, muß der Gang der Reaktion durch das Eduktverhältnis kontrolliert werden. Am Beispiel des Tripeptides Phe-Gly-Gly ist in Abb. 5.1. die Abhängigkeit der Ausbeute an DTPA-Phe-Gly-Gly bzw. DTPA-(Phe-Gly-Gly)₂ vom Eduktverhältnis aufgetragen.

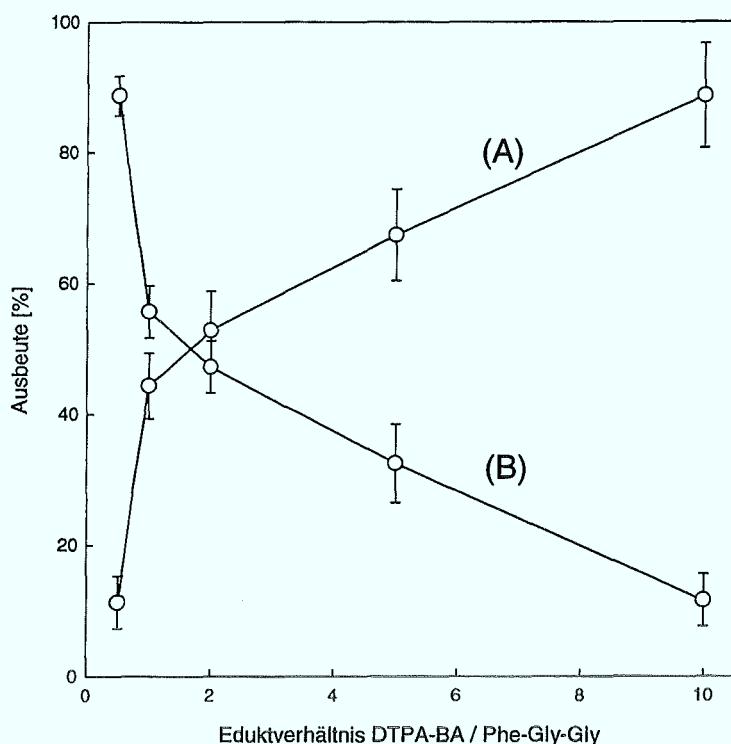


Abb. 5.1.
Abhängigkeit der Reaktionsausbeute an DTPA-Phe-Gly-Gly (Kurve A) bzw. DTPA-(Phe-Gly-Gly)₂ (Kurve B) vom Eduktverhältnis
Reaktionsbedingungen: 25°C;
DMSO/H₂O (9/1); Diisopropylethylamin;
[Phe-Gly-Gly]: 0.01 M = const.

Die Ausbeute an DTPA-Phe-Gly-Gly nahm stetig mit steigendem [DTPA-BA]/[Phe-Gly-Gly]-Verhältnis zu. Bei Eduktverhältnissen > 10 sollte die Reaktion fast quantitativ das gewünschte Produkt liefern. Limitiert war die Steigerung der Ausbeute an DTPA-Phe-Gly-Gly vor allem durch die Löslichkeit der Edukte in diesem Medium. Höhere Wasseranteile begünstigten zwar die Löslichkeit der Peptide, bedingten jedoch teilweise die Hydrolyse des DTPA-BA, wodurch der pH Wert der Lösung beträchtlich sank und die Reaktion erschwerte. Sehr hohe Konzentrationen an DTPA-BA wirkten sich wiederum bei der Isolierung der Produkte negativ aus, da eine Fixierung der Peptide auf der RP-Phase um so schwieriger wurde je höher die Konzentration an DTPA in der Lösung war. Zur Darstellung der DTPA-Peptide wurde aus diesem Grund ein Eduktverhältnis [DTPA-BA]/[Peptid] von 5 gewählt.

5.1.2. Markierung der DTPA-Peptide mit ^{86/88}Y

Die Markierung der dargestellten DTPA-Peptide mit ^{86/88}Y erfolgte in Analogie zu untersuchten ⁹⁰Y-DTPA-Systemen [cf. 117] durch Zugabe einer ^{86/88}Y-Acetat-Pufferlösung zu definierten Mengen einer DTPA-Peptid-Stammlösung. Die konzentrierte ^{86/88}Y-DTPA-Peptid-Lösung wurde anschließend mit dem experimentell vorgegebenen Standardpuffer bzw. isotonischer NaCl-Lösung verdünnt. Es konnte erwartet werden, daß in Puffersystemen, in denen das beteiligte Puffer-Anion keine stabilen Komplexe mit Yttrium bildet (Acetat, Chlorid, HEPES...), die Komplexbildung über weite pH-Bereiche mit schneller Kine-

tik erfolgt (DTPA: Komplexbildung >90% in 5 min bei einem DTPA/Yttrium-Verhältnis 1/0.95 und DTPA-Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ M/L [118]).

Die Annahme, daß die Komplexbildungskinetik für den trägerfreien Fall mit „Pseudo-erster Ordnung“ verläuft, bietet im Rahmen von kinetischen Untersuchungen die Möglichkeit, diesen sehr schnell verlaufenden Teilschritt gegenüber anderen zeitabhängigen Teilschritten zu vernachlässigen. Jedoch bei Anwesenheit von komplexfähigen Liganden (z.B. Citrat), die ebenfalls stabile Y-Komplexe bilden [119] und somit in jedem Fall über die Konzentrationsabhängigkeit in das Komplexgleichgewicht eingreifen, werden zeitabhängige Markierungsausbeuten meßbar sein. Die Markierung wurde deshalb in den meisten Fällen in NaOAc bzw. NH_4OAc -Puffern im pH-Bereich von 4.5 - 6 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen (0.05 M NaOAc, pH 4.5) wurden Markierungsausbeuten von >98% direkt nach der Zugabe der ^{88}Y -Acetat-Lösung erzielt.

Eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Analyse von ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid ist in Abbildung 5.2. dargestellt.

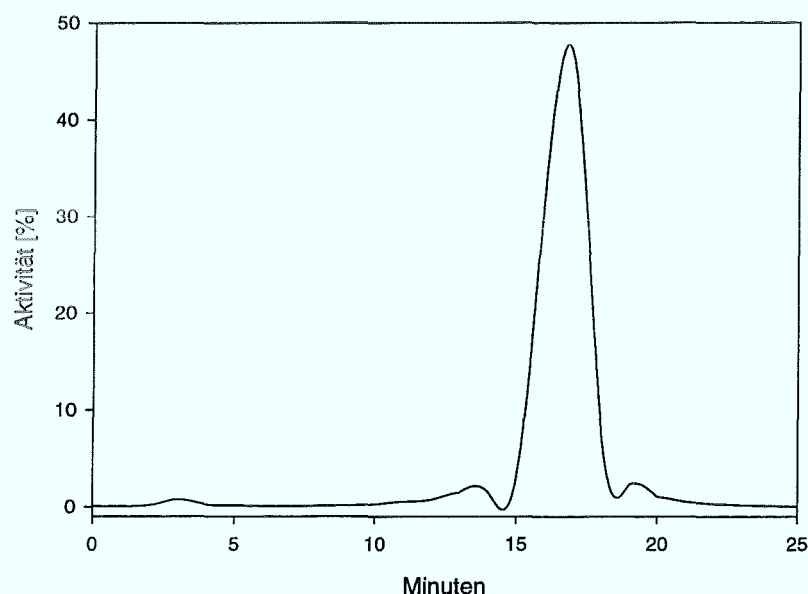


Abb. 5.2.
Chromatogramm von ^{86}Y -
[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid
HPLC: Nucleosil RP-18-5,
1 ml/min;
Fraktionierung 0.5 ml/min;
Gradient: A: 0.05 M
NaOAc, pH 4.5; B: MeOH;
40 → 80 %B; 0 → 20 min

Die Reproduzierbarkeit der Radio-Chromatogramme von ^{86}Y -DTPA-Peptiden war entscheidend abhängig von der Anordnung bzw. Reinigung des HPLC-Systems. Vergleiche zwischen Aliquoten und Gesamtfractionen der Chromatogramme zeigten deutlich, daß die Produkte entlang der Analyse eine Freisetzung des Metalles zuließen. Aktivitäten wurden dabei hauptsächlich im Bereich des Injektionsventils als auch in Bereichen der Säulen-Fritten gefunden, in denen die Aktivität an Ablagerungen nachgewiesen wurde. Aus diesem Grunde wurden HPLC-Systeme verwendet, in denen das zu analysierende Produkt zu keiner Zeit in Kontakt mit Metalloberfläche stand. Verunreinigungen vor der Säule wurden durch Einsatz von vorgeschalteten Fritten verhindert, die zu gegebener Zeit, d.h. wenn das Verhältnis zwischen Aliquot und Gesamtelution der Aktivität keinen Vergleich mehr zuließ, im Säurebad behandelt wurden. Durch die Optimierung der HPLC-Anordnungen konnten

ca. 10 Chromatogramme durchgeführt werden, in denen die Wiederfindungsrate in der Gesamtelution 100% im Vergleich zum Aliquot betrugen. Parallel wurden die Markierungsausbeuten von ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid mittels Radiodünnschichtchromatographie überprüft.

5.1.3. *Komplexierungskinetik von DTPA-Peptiden mit ^{88}Y*

In Kapitel 5.1.2. wurde bereits auf die schnelle Komplexierung von trägerfreiem Yttrium durch DTPA-Peptide hingewiesen. Diese Feststellung beinhaltet aber keinerlei Aussagen über die Änderungsmöglichkeiten der Reaktionsgeschwindigkeit sowie die diese Änderung herbeiführenden Faktoren. Betrachtet man die Komplexierung als einen mehrstufigen Prozeß, so sollte der Mechanismus der Metall-Ligand-Bindungsbildung und die Geschwindigkeit dieser Reaktion in wäßriger Lösung außer vom Metall und Komplexbildner noch durch andere Faktoren beeinflusst werden können. Gerade im Falle der Polyaminopolycarboxyl-Säuren, die sich durch eine Anzahl von Protonierungsstufen auszeichnen, muß vor der Komplexierung die Deprotonierung erfolgen. Dieser Vorgang geht einher mit einer Entropie- und Enthalpieverschiebung die durch das System aufgebracht werden muß [cf. 90]. Ausgehend von dem gebildeten Komplex steht gerade im Hinblick auf nuklearmedizinische Fragen die Umkomplexierung bzw. Dekomplexierung der Metalle im Vordergrund. Aussagen über die Kinetik dieser Reaktionen können als Eignungskriterium für Radiopharmaka als auch für relevante bioanorganische Prozesse herangezogen werden.

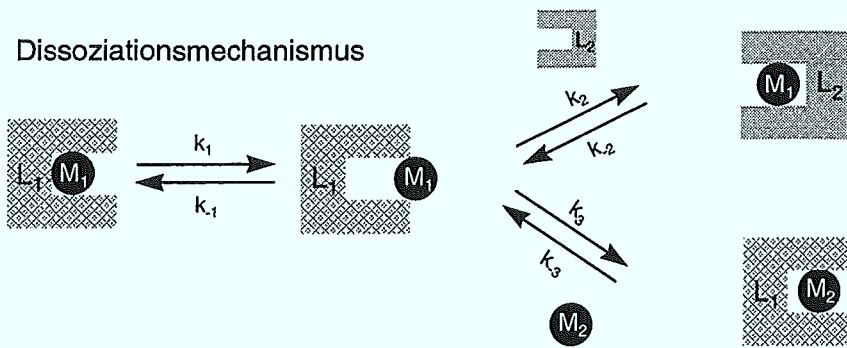
Mechanistisch lassen sich Dekomplexierungsreaktionen in zwei Gruppen teilen.

- Dissoziationsmechanismus
- Assoziationsmechanismus

Die wesentlichen Unterschiede sind im Schema 5.2 dargestellt.

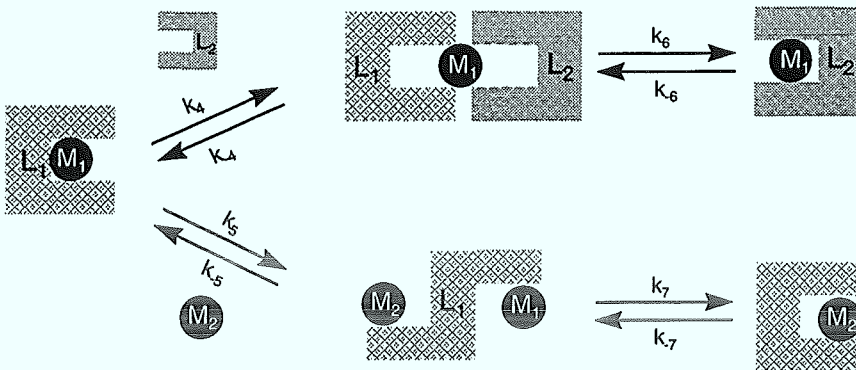
Beim Dissoziationsmechanismus steht die Freisetzung des Metalles im Vordergrund. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beinhaltet die Lockerung der Metall-Ligand-Bindung ($k_1 \ll k_{2,3}$). Die Reaktionskinetik einer solchen Reaktion sollte demnach 1.Ordnung sein. Der Assoziationsmechanismus geht von einer durch den eintretenden Liganden bzw. das eintretende Metall einsetzenden Umkomplexierung aus ($k_{4,5} \ll k_{6,7}$). Die Geschwindigkeit einer solchen Reaktion sollte demnach 2.Ordnung sein.

Dissoziationsmechanismus



Schema 5.2.
Mechanismen der
Dekomplexierung
von Metall-Chelat-
Komplexen

Assoziationsmechanismus



Diese schematische Darstellung gibt jedoch nicht die Gleichgewichte wieder, denen der Ligand (Protonierung) bzw. das Metall (Hydrolyse, Liganden) unterliegen. Sind diese Gleichgewichte geschwindigkeitsbestimmend, so wird die eigentliche Komplexbildung sekundär. Reaktionsgeschwindigkeiten werden dann nur durch die beeinflussenden Parameter auf die Einzelkomponenten in der Lösung bestimmt. Wie in der organischen Chemie lassen sich Komplexbildungsreaktionen nicht starr dem Assoziations- bzw. Dissoziationsmechanismus zuordnen. Zwischenstufen wie z.B. I_D (dissoziativer Austauschmechanismus) oder I_A (assoziativer Austauschmechanismus), die Beeinflussungen von eintretenden Liganden auf die Metall-Ligand-Bindung der ersten Koordinationssphäre durch Ausbildung eines „Außensphären-Komplexes“ beschreiben, machen die Aufstellung exakter Geschwindigkeitsgesetze schwierig.

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit bzw. der Geschwindigkeitskonstanten wurde im weiteren unter Berücksichtigung der beeinflussenden Parameter modellhaft für DTPA-Phe-Gly-Gly durchgeführt. Die ermittelte Gleichung sollte dann auf die strukturell verwandten DTPA-Peptide übertragbar sein und zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten führen. Darüber hinaus sollten Änderungen der Geschwindigkeitskonstante in diesem Zusammenhang direkt den Einfluß der Peptidsequenz widerspiegeln.

5.1.3.1. Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} von der Konzentration überschüssiger Metall-Kationen

Wie in Schema 5.2. dargestellt sollte im Falle eines Assoziationsmechanismus die Reaktionsgeschwindigkeit eine Funktion der Metall-Kationen-Konzentration in der Lösung sein. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der Umkomplexierung im System $^{nat/88}Y$ -DTPA-Phe-Gly-Gly / $^{nat}Y^{3+}$ erfolgte mittels Isotopenaustausch. Die für die Bestimmung zugrunde liegenden Gleichungen wurden bereits in Kapitel 3.2.1. beschrieben.

In Abbildung 5.3. ist die Kinetik des Isotopenaustausches für drei verschiedene Eduktverhältnisse $[Y\text{-DTPA-Phe-Gly-Gly}] / [Y^{3+}]$ dargestellt. Aus dem Abfall des prozentualen Anteils von ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly in den ersten 15 min wurde deutlich, daß unabhängig vom Metallüberschuß die Reaktionsgeschwindigkeit für alle drei Ansätze nahezu gleich war. In Abbildung 5.3. ist zusätzlich die Zeitabhängigkeit des Austauschgrades λ in der Form $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit dargestellt (kleine Abbildung).

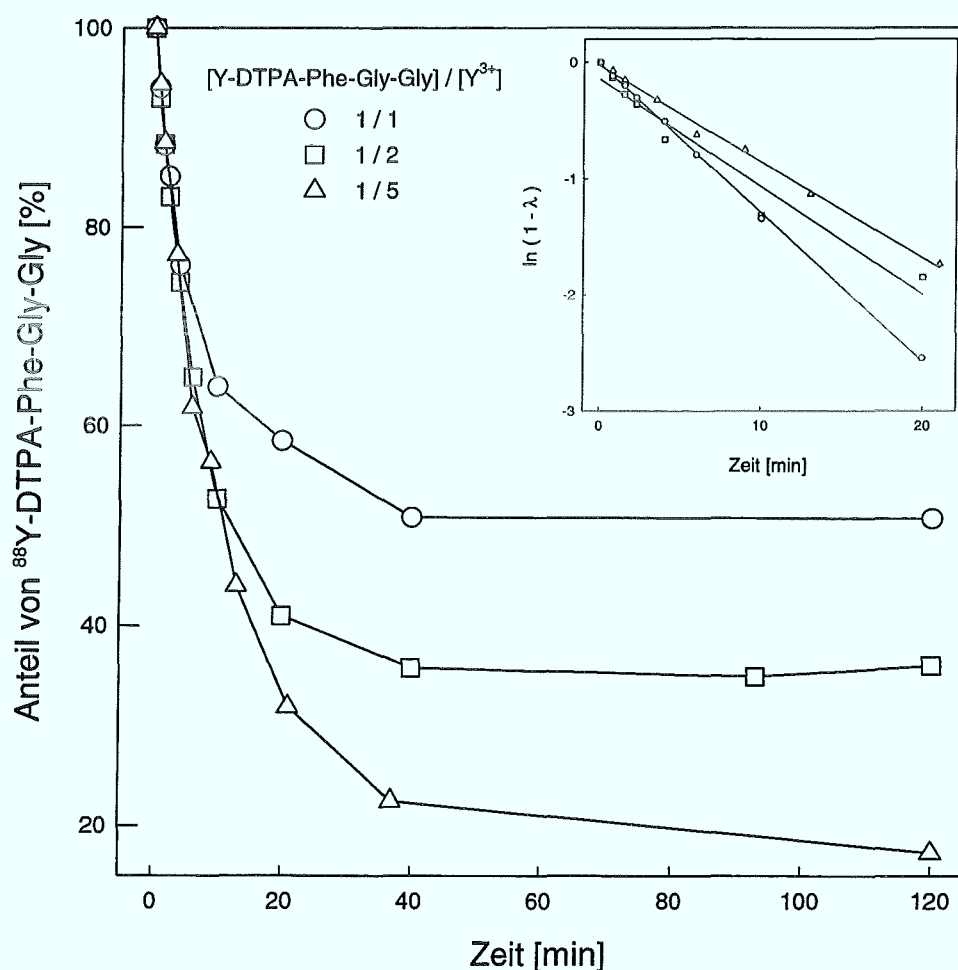


Abbildung 5.3. Änderung des ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly-Anteils mit der Konzentration an Y^{3+} (Kleine Abbildung: Änderung von $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit für verschiedene Eduktverhältnisse); [DTPA-Phe-Gly-Gly]: $3.0 \cdot 10^{-5}$ M/L = const.; 0.1 M KCl; 22°C

Im Bereich kleiner Austauschraten lagen alle Meßpunkte auf einer Geraden. In der Nähe des Gleichgewichtes differierten die Werte aufgrund der logarithmischen Auftragung naturgemäß, wodurch die Steigungen der Geraden aus den Einzelversuchen leichte Abweichungen zeigten. Aus den Steigungen der Geraden ließ sich die Reaktionsgeschwindigkeit R ermitteln:

$$(24) \quad \frac{\partial \ln(1-\lambda)}{\partial t} = -R \frac{[Y-DTPA-PHE-GLY-GLY] \cdot [Y^{3+}]}{[Y^{3+}] + [Y-DTPA-PHE-GLY-GLY]} = \Delta$$

Tabelle 5.2. vergleicht die nach Gleichung (24) berechneten Werte für die Steigung Δ und die Reaktionsgeschwindigkeit R [104].

Tabelle 5.2 Ergebnisse der Berechnung von Δ , R und k_Y für das Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-System

$[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]/[Y^{3+}]$	$\Delta [s^{-1}]$	R $[ML^{-1}s^{-1}]$	$k_Y [M^{-1}s^{-1}]$
1 / 1	$2.28 \cdot 10^{-3}$	$3.13 \cdot 10^{-8}$	$1.14 \cdot 10^{-3}$
1 / 2	$2.13 \cdot 10^{-3}$	$3.87 \cdot 10^{-8}$	$1.42 \cdot 10^{-3}$
1 / 5	$1.26 \cdot 10^{-3}$	$2.77 \cdot 10^{-8}$	$1.05 \cdot 10^{-3}$

Da R für die drei Konzentrationsverhältnisse nahezu konstant war, mußte die Reaktionsgeschwindigkeit durch:

$$(25) \quad R = k_Y [Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]$$

beschrieben werden können. Die Geschwindigkeitskonstante k_Y war also nur konstant, wenn die Reaktion unabhängig von der Konzentration des überschüssigen Y^{3+} war. Die über Gleichung (25) berechneten Geschwindigkeitskonstanten sind ebenfalls in Tabelle 5.2. aufgeführt. Mit dieser Aussage konnte somit ein reiner Assoziationsmechanismus unter Beteiligung von Y^{3+} ausgeschlossen werden. Die Dekomplexierung würde nur dann assoziativ verlaufen, wenn das Lösemittel geschwindigkeitsbestimmend am Übergangszustand beteiligt wäre und diesen assoziativ stabilisierte. Dieses Ergebnis stimmte mit Resultaten von Stimmel et al. [120] überein, wonach auch andere Metall-Kationen wie Fe^{2+} , Ca^{2+} und Zn^{2+} keinen Einfluß auf die Komplexierung von Y^{3+} durch freies DTPA hatten. Unabhängig von der exakten mechanistischen Beschreibung der Metall-Kationen-Beeinflussung konnte in Hinblick auf das in vivo Verhalten von Y-DTPA-Peptiden angenommen werden, daß eine Destabilisierung der Komplexe nicht primär durch die Anwesenheit von Metall-Kationen im Blut oder Gewebe hervorgerufen würde bzw., daß dieser Einfluß gegenüber anderen Parametern vernachlässigt werden könnte.

5.1.3.2. Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} von der Konzentration an Y-DTPA-Phe-Gly-Gly

In Kapitel 5.1.3.1 wurde gezeigt, daß der Isotopenaustausch zwischen ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly und freiem $^{88}Y^{3+}$ unabhängig von der Konzentration an freiem Y^{3+} war. Offen bleibt, ob und wie weit die Konzentration an Y-DTPA-Phe-Gly-Gly Einfluß auf die Dekomplexierung bzw. Umkomplexierung des Yttriums hatte.

Zur Überprüfung wurde der Isotopenaustausch zwischen Y-DTPA-Phe-Gly-Gly und Y^{3+} bei einem Verhältnis von 1 / 1 für drei verschiedene Ausgangskonzentrationen an Y-DTPA-Phe-Gly-Gly durchgeführt. Die Kinetik des Isotopenaustausches sowie die Änderung des Austauschgrades λ , in der Form $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit sind in Abbildung 5.4. dargestellt.

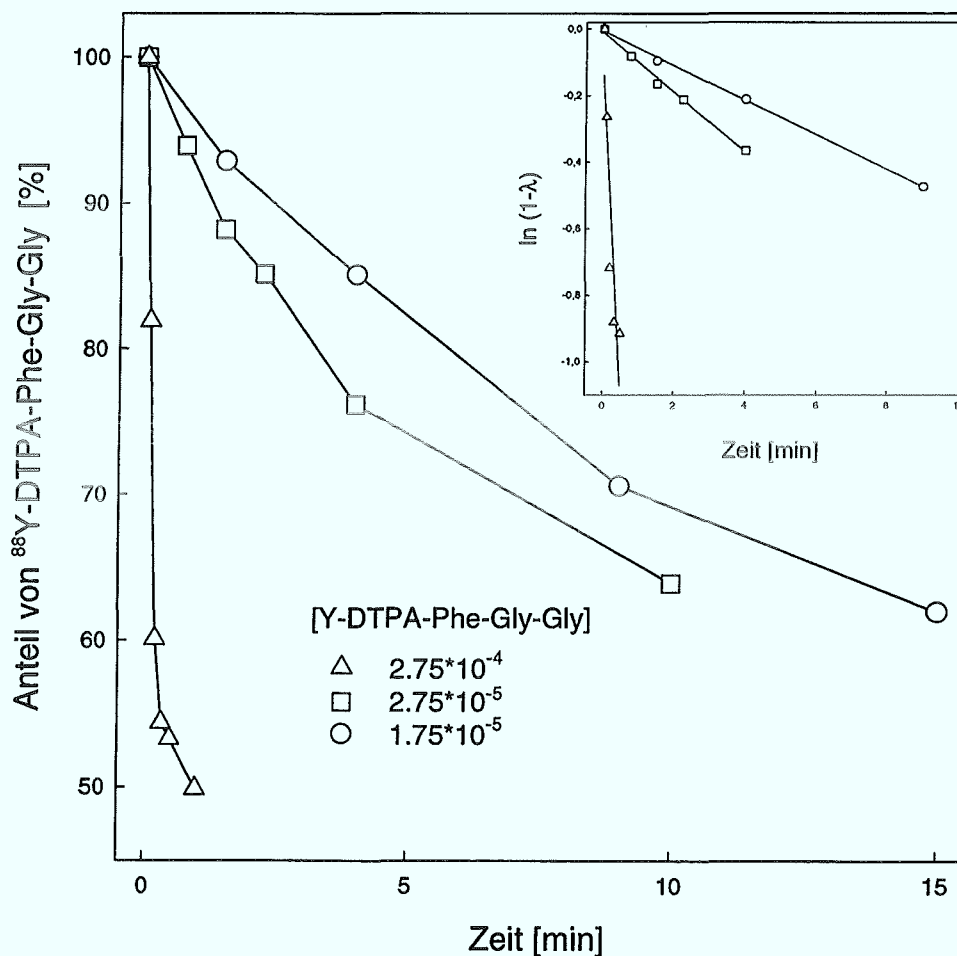


Abbildung 5.4. Änderung des ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly-Anteils mit der Konzentration an Y-DTPA-Phe-Gly-Gly
(Kleine Abbildung: Änderung von $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit für verschiedene Konzentrationen);
[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] / [Y^{3+}] = 1/1, 0.1 M KCl; 22°C

Im Gegensatz zur Reaktion bei variabler Y^{3+} -Konzentration war das Reaktionsverhalten von der Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-Konzentration abhängig. Für die Steigung Δ (kleine Abbildung), Reaktionsgeschwindigkeit R und Geschwindigkeitskonstante k_Y unter der Annahme

einer Reaktion 1. Ordnung bzgl. der Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-Konzentration ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 5.3. Ergebnisse der Berechnung von Δ , R und k_Y

[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]	Δ [s ⁻¹]	R [ML ⁻¹ s ⁻¹]	k_Y [s ⁻¹]
$1.75 \cdot 10^{-5}$ M	$0.87 \cdot 10^{-3}$	$7.58 \cdot 10^{-9}$	$4.33 \cdot 10^{-4}$
$2.75 \cdot 10^{-5}$ M	$1.50 \cdot 10^{-3}$	$2.06 \cdot 10^{-8}$	$7.49 \cdot 10^{-4}$
$27.5 \cdot 10^{-5}$ M	$31.1 \cdot 10^{-3}$	$4.28 \cdot 10^{-6}$	$1.57 \cdot 10^{-2}$

Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten waren nicht konstant, womit die zugrunde liegende Reaktionsgleichung in der Form:

$$(26) \quad R = k_Y [\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}]$$

nicht gelten konnte. Legt man alternativ eine Gleichung der Form:

$$(27) \quad R = k_Y [\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}]^n$$

zugrunde, sollte die Auftragung von $\log R$ vs. $\log[\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}]$ eine Gerade ergeben, deren Steigung die Molekularität der Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-Konzentration in der Reaktionsgleichung widerspiegeln würde.

Die Auftragung von $\log R$ vs. $\log[\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}]$ in Abb. 5.5. ergab eine Gerade mit der Steigung:

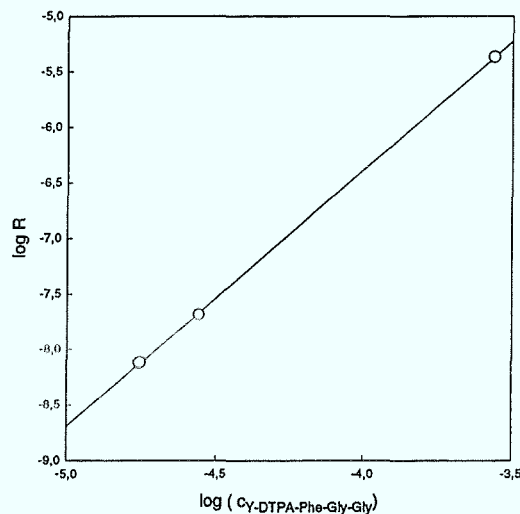


Abb. 5.5
Bestimmung der Molekularität (n) von Y-DTPA-Phe-Gly-Gly in der Reaktionsgleichung (27)

$$(28) \quad \frac{\partial \log R}{\partial \log [\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}]} = 2.306$$

Die Molekularität (n) von [Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] in der Reaktionsgleichung sollte demnach 2.3 betragen.

Die Richtigkeit dieses Ergebnisses könnte allerdings erst angenommen werden, wenn alle beeinflussenden Parameter bestimmt wurden. Die unter diesen experimentellen Bedingungen gemessenen Kinetiken des Isotopenaustausches in Abhängigkeit von der Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-Konzentration beinhalteten nicht die fehlende Annäherung der Werte bezüglich der durch die Auflösung des DTPA-Peptides in der wässrigen Lösung verursachten pH-Wert-Änderungen. Alle Versuche wurden in 0.1 N KCl durchgeführt, wodurch

eine Abpufferung des Systems nicht angenommen werden konnte. Daß der pH-Wert der Lösung und somit die Konzentration an H^+ -Ionen einen starken Einfluß auf das Reaktionsgeschehen hatte, wird im Folgenden diskutiert.

5.1.3.3. Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} vom pH-Wert der Lösung und unterschiedlichen ionischen Zusätzen

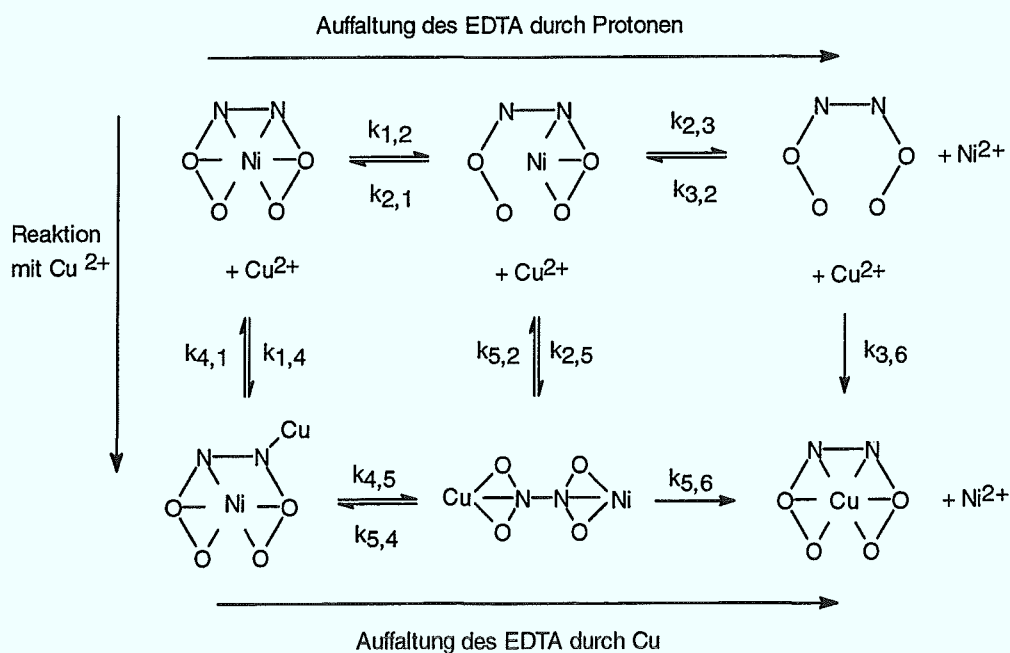
Die in den beiden vorherigen Abschnitten diskutierten Konzentrationsabhängigkeiten der Isotopenaustauschreaktion $^{88}Y\text{-DTPA-Phe-Gly-Gly}/^{88}Y^{3+}$ zeigten, daß die freie Yttrium-Konzentration in der Lösung unter diesen Bedingungen keine geschwindigkeitsbestimmende Rolle in dieser Reaktion spielte. Daß der Isotopenaustausch trotzdem erfolgt, impliziert eine Freisetzung des Yttriums aus der Komplexstruktur mit anschließender erneuter Komplexierung. Für die Isotopenaustauschreaktion könnte nun ein alternativer Reaktionsmechanismus aufgestellt werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Teilschritt in dieser Reaktion sollte die Freisetzung des Y^{3+} sein. Die nachfolgende erneute Komplexierung der freien Y^{3+} -Kationen sollte nach den Ausführungen in Kapitel 5.1.2. sehr schnell erfolgen. Offen bleibt, welche Faktoren diesen ersten Teilschritt beeinflussen.

Nach der Freisetzung des Metall-Kations unterliegen die funktionellen Gruppen des Komplexbildners wieder den Protonierungsgleichgewichten der wäßrigen Lösung. Würde das DTPA-Peptid nach der Freisetzung des Y^{3+} protoniert werden, müßte vor bzw. durch die nachfolgende Komplexierung des Y^{3+} wiederum eine Deprotonierung erfolgen. Für diesen Reaktionsmechanismus konnte somit ein starker Einfluß der Protonenkonzentration am Gang der Reaktion angenommen werden. Für viele Metall-Polyaminopolycarboxyl-Komplexe wurde die Abhängigkeit der Komplexierung vom pH-Wert experimentell nachgewiesen. Für die Komplexierung bzw. Dekomplexierung wurden z.T. komplizierte Reaktionsschemata aufgestellt, um die Rolle der Protonen beschreiben zu können [cf.121].

Am Beispiel der Umkomplexierung von $Ni\text{-EDTA} + Cu^{2+} \rightarrow Cu\text{-EDTA} + Ni^{2+}$ soll in Schema 5.3. verdeutlicht werden, wie komplex die scheinbar einfachen Reaktionen aufgebaut sind. Schema 5.3. gibt nur eine vereinfachte Darstellung des Reaktionsmechanismus wieder, beschreibt aber annähernd den für diese Reaktion beobachteten Verlauf [cf. 122]. Übertragen auf die Isotopenaustauschreaktion:



wären Cu^{2+} und Ni^{2+} durch Y^{3+} bzw. EDTA durch das DTPA-Peptid zu substituieren.



Schema 5.3. Schematischer Transfer von EDTA zwischen Ni^{2+} und Cu^{2+} [122]

Qualitativ lieferte das Reaktionschema folgende Aussagen:

Die Reaktion war erster Ordnung (d.h. unabhängig von der Cu^{2+} -Konzentration) bei

$[\text{Cu}^{2+}]$ klein $[\text{H}^+]$ groß $\Rightarrow k_{2,3}$ geschwindigkeitsbestimmend

$[\text{Cu}^{2+}]$ mittel $[\text{H}^+]$ klein $\Rightarrow k_{1,2}$ geschwindigkeitsbestimmend

$[\text{Cu}^{2+}]$ sehr groß $[\text{H}^+]$ klein $\Rightarrow k_{4,5}$ geschwindigkeitsbestimmend

und 2. Ordnung (d.h. abhängig von der Cu^{2+} -Konzentration)

$[\text{Cu}^{2+}]$ klein $[\text{H}^+]$ klein $\Rightarrow k_{5,6}$ geschwindigkeitsbestimmend

$[\text{Cu}^{2+}]$ groß $[\text{H}^+]$ klein $\Rightarrow k_{4,5}$ geschwindigkeitsbestimmend

Diese Aussagen verdeutlichen, daß bei kleinen bis sehr großen Cu^{2+} -Konzentrationen die Reaktion durch Protonen katalysiert werden kann und die Auffaltung der Komplexbildners durch Protonen geschwindigkeitsbestimmend wird.

Schema 5.3. verdeutlicht weiterhin, daß die Protonierung des Komplexbildners ein mehrstufiger Prozess ist. Würde ein Komplex gebildet, in dem alle koordinationsfähigen Stellen des Metalles durch die Polyaminopolycarbonsäure abgesättigt wären (In-DTPA; KZ 8) [61], würde der Einfluß der Protonen sich sicherlich im Vergleich zu Komplexen (Ga-DTPA; KZ 6) [123], in denen mindestens zwei funktionelle Gruppen des DTPA nicht in die Koordination einbezogen sind, unterscheiden.

Bei der Komplexierung von Yttrium durch DTPA-Peptide, in denen das DTPA nur noch über 7 koordinationsfähige Gruppen verfügte, Yttrium im freien Y-DTPA-Komplex aber die

Koordinationszahl 8 hat, ist eine Voraussage über das pH-Verhalten ohne Kenntnis der Struktur der Y-DTPA-Peptide im wäßrigen Medium nicht möglich.

Ausgehend von dem beschriebenen Isotopenaustauschgleichgewicht (Gleichung (24)) wurde der Einfluß der H^+ -Ionenkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit überprüft. In diesem Fall wurden unterschiedliche Puffergemische verwendet, deren Pufferbereich sich teilweise überlappten. Dadurch konnten gleichzeitig Lösungen mit unterschiedlichen ionischen Zusätzen verglichen werden.

In Abbildung 5.6. ist die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit mit dem pH-Wert der Lösung in 0.1 N KHPhtalat/0.1 N HCl-Puffer dargestellt.

Die Annahme, der pH-Wert der Lösung würde aufgrund der strukturellen Gegebenheiten des DTPA-Peptid Moleküls mit seinen 7 Protonierungsstufen direkten Einfluß auf das Komplexierungsverhalten von Y^{3+} / DTPA-Peptid haben, wurde eindeutig nachgewiesen. Mit steigender H^+ -Ionenkonzentration nahm die Kinetik der Isotopenaustauschreaktion stetig zu. Da alle Versuche unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, war eine durch andere Faktoren hervorgerufene Beeinflussung des Reaktionsgeschehens ausgeschlossen.

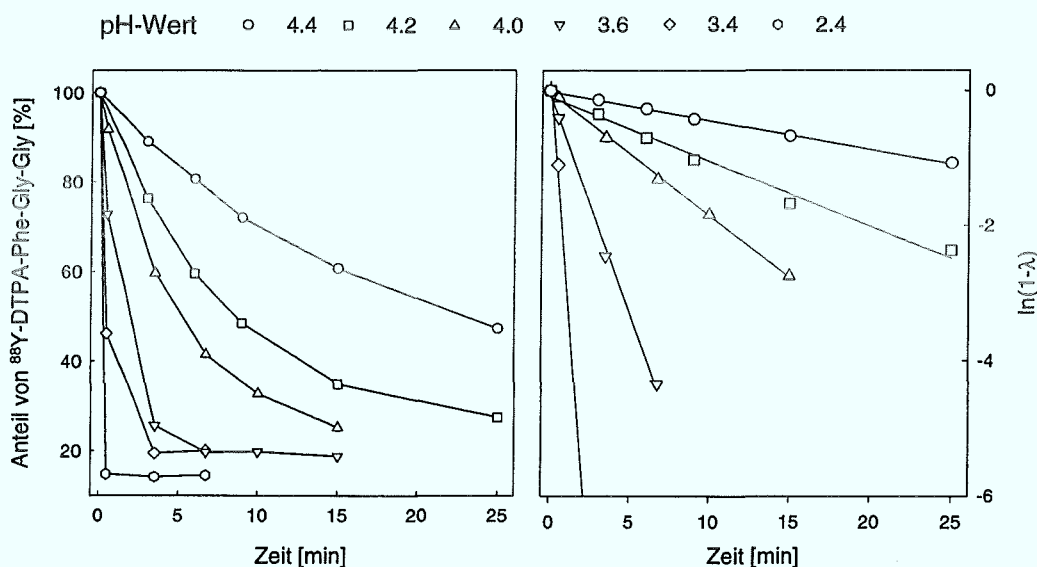


Abbildung 5.6. Änderung des Anteils von ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly in der Isotopenaustauschreaktion ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly/ $^{88}Y^{3+}$ mit der Konzentration an H^+ -Ionen im Phthalat-Puffer (rechte Grafik: Änderung von $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit mit dem pH-Wert)
RT (21 °C); 0.1 N KHPhtalat/0.1 N HCl; $[Y\text{-DTPA-Phe-Gly-Gly}] = 3.24 \cdot 10^{-5}$
Y-DTPA-Phe-Gly-Gly / Yttrium : 1 / 3.11

Über die berechneten Steigungen in der Auftragung $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit konnte die *McKaysche* Gleichung ausgewertet werden.

Vorab wurden weitere pH-Wert-Abhängigkeiten im Acetat- sowie Glycin-Puffer gemessen und mit den obigen Datenpunkten verglichen. Über die Auswertung dieser Versuche sollte gleichzeitig eine Abhängigkeit von ionischen Zusätzen offensichtlich werden, da die pH-Bereiche der verwendeten Puffer so gewählt wurden, daß ein direkter Vergleich möglich

war. In Abbildung 5.7. und Abbildung 5.8. sind die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen dargestellt.

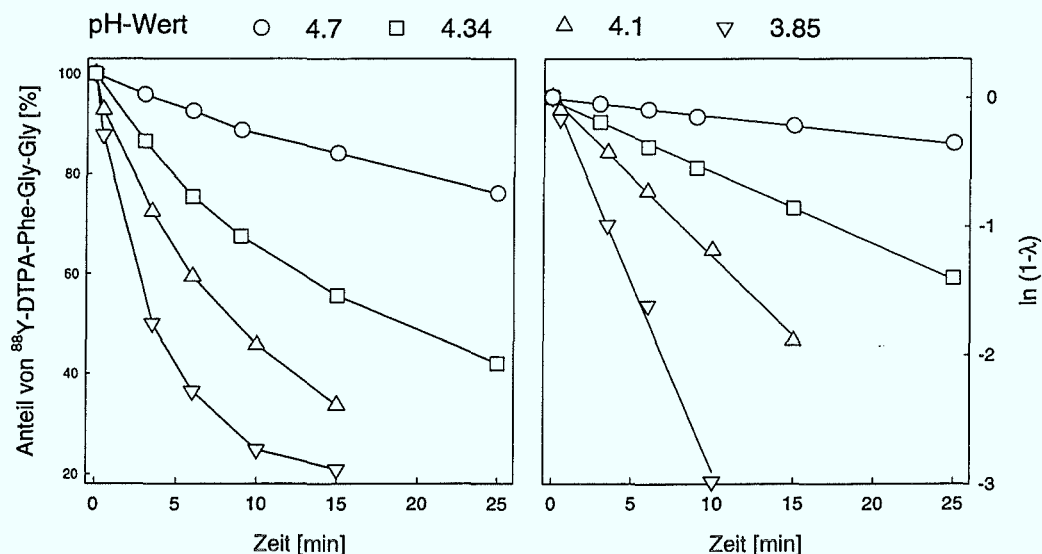


Abbildung 5.7. Änderung des Anteils von ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly in der Isotopenaustauschreaktion ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly/ $^{88}\text{Y}^{3+}$ mit der Konzentration an H^+ -Ionen im Acetat-Puffer (rechte Grafik: Änderung von $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit mit dem pH-Wert)
RT (21 °C); 0.1 N NaOAc/0.1 N HOAc; $[\text{DTPA-PHE-GLY-GLY}] = 3.24 \cdot 10^{-5}$
Y-DTPA-Phe-Gly-Gly / Yttrium : 1 / 3.11

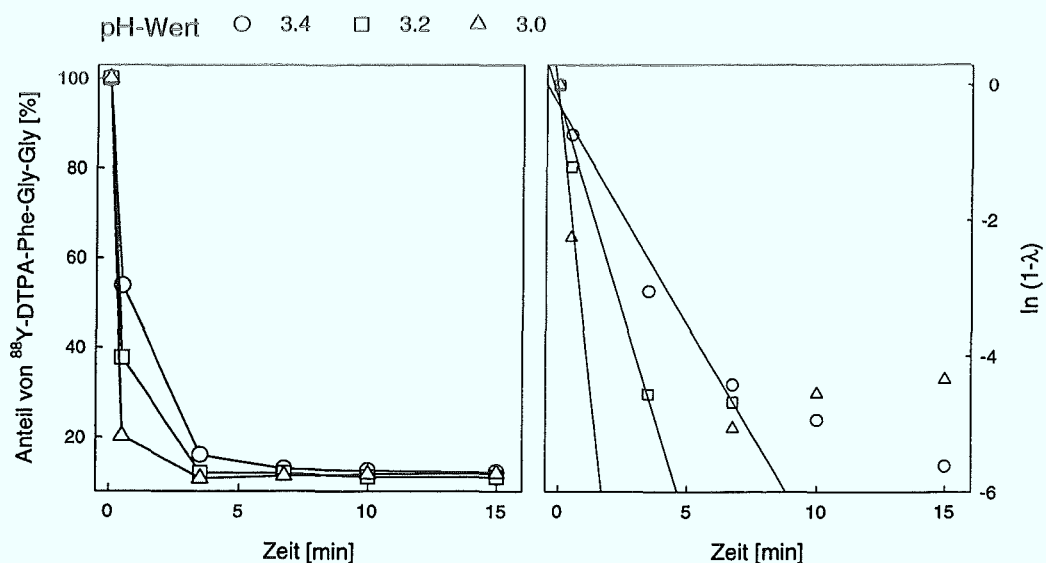


Abbildung 5.8. Änderung des Anteils von ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly in der Isotopenaustauschreaktion ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly/ $^{88}\text{Y}^{3+}$ mit der Konzentration an H^+ -Ionen im Glycin-Puffer (rechte Grafik: Änderung von $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit mit dem pH-Wert)
RT (22 °C); 0.1 N Glycin/0.1 N NaCl/0.1 N HCl;
 $[\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}] = 0.86 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; Y-DTPA-Phe-Gly-Gly / Yttrium : 1 / 7.23

In beiden Darstellungen war die prinzipielle Abhängigkeit von der H^+ -Ionen-Konzentration den Ergebnissen im Phthalat-Puffer-System vergleichbar. Im 0.1 N Acetat-Puffer lag darüber hinaus der zeitliche Verlauf des Isotopenaustausches auf einer Zeitskala, die genaue Messungen zuließ und somit gute Daten für eine Anpassung im $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit-Diagramm lieferte.

Die Kinetik des Isotopenaustausches der Versuchsreihe im Glycin-Puffersystem war trotz kleinerer Konzentration an Y-DTPA-Phe-Gly-Gly sehr schnell, wodurch das Gleichgewicht bereits nach 5 Minuten erreicht war. Zeitabhängige Änderungen von Aktivitätsverteilungen in der Nähe des Gleichgewichtes sind naturgemäß sehr gering, wodurch die Auswertung der Austauschgrade in diesen Bereichen stark fehlerbehaftet sein mußte. Aus diesem Grunde spiegelten die Geraden im $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit-Diagramm nur Näherungswerte wieder. Abweichungen der berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten sowie der Geschwindigkeitskonstanten von den Werten, bestimmt aus den Experimenten im KHPhtalat- bzw. Acetat-Puffer, sollten der Güte der Datenpunkte entsprechend gewertet werden.

Die aus den Meßwerten berechneten Steigungen im $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit-Diagramm sowie die Reaktionsgeschwindigkeiten und Geschwindigkeitskonstanten sind unter der Annahme, die Austauschreaktion wäre 1.Ordnung bezogen auf $[H^+]$, in Tabelle 5.4. zusammengefaßt.

Tabelle 5.4. Reaktionsparameter des Isotopenaustauschgleichgewichtes Y-DTPA-Phe-Gly-Gly / Y^{3+} in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung
 $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] : 3.24 \cdot 10^{-5} M/L$ (0.1 M Acetat (A), 0.1 M Phthalat (P))
 $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] / [Y^{3+}] = 1 : 3.11$; RT
 $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] : 0.86 \cdot 10^{-5} M/L$ (Glycin) (G)
 $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] / [Y^{3+}] = 1 : 7.23$; RT

pH-Wert (Anion)	$[H^+]$	$\Delta \cdot 10^{-3}$ $[s^{-1}]$	$R \cdot 10^{-8}$ $[ML^{-1}s^{-1}]$	$k_v \cdot 10^6$ $[M^{-2}s^{-1}]$	k_v korrigiert (siehe Text)
3.0 (G)	$1.00 \cdot 10^{-3}$	56.18	42.42	57.41	$6.212 \cdot 10^3$
3.2 (G)	$6.31 \cdot 10^{-4}$	20.63	15.58	33.41	$4.991 \cdot 10^3$
3.4 (P)	$3.98 \cdot 10^{-4}$	46.97	115.3	27.53	$21.43 \cdot 10^3$
3.4 (G)	$3.98 \cdot 10^{-4}$	10.76	8.126	27.62	$5.698 \cdot 10^3$
3.6 (P)	$2.51 \cdot 10^{-4}$	10.71	26.29	9.918	$10.70 \cdot 10^3$
3.85 (A)	$1.41 \cdot 10^{-4}$	4.877	11.97	8.059	$12.99 \cdot 10^3$
4.0 (P)	$1.00 \cdot 10^{-4}$	3.032	7.443	7.077	$14.48 \cdot 10^3$
4.1 (A)	$7.94 \cdot 10^{-5}$	2.057	5.049	6.045	$21.43 \cdot 10^3$
4.2 (P)	$6.31 \cdot 10^{-5}$	1.592	3.908	5.889	$16.63 \cdot 10^3$
4.34 (A)	$4.57 \cdot 10^{-5}$	0.926	2.273	4.729	$16.74 \cdot 10^3$
4.4 (P)	$3.98 \cdot 10^{-5}$	0.718	1.762	4.210	$16.42 \cdot 10^3$
4.7 (A)	$1.99 \cdot 10^{-5}$	0.236	0.579	2.761	$17.53 \cdot 10^3$

Für die Reaktionsgleichung wurde weiterhin eine Abhängigkeit von der Y-DTPA-Peptid-Konzentration des Typs $[Y-DTPA-Peptid]^2$ angenommen. Die Werte wurden unabhängig vom Elektrolyten mit steigendem pH-Wert aufgelistet, wodurch ein direkter Vergleich zwischen den einzelnen Anionen möglich war.

Aus den berechneten Steigungen Δ des $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit-Diagramm wurde deutlich, daß eine Abhängigkeit der Reaktion von dem pH-Wert der Lösung und damit der H^+ -Ionen-Konzentration bestand. Ausgehend von niedrigen pH-Werten folgte eine stetige Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit erwies sich dabei als unabhängig vom Elektrolyten. Bei niedrigen pH-Werten gingen aufgrund der schnellen Reaktionsgeschwindigkeit im Glycin-Puffer-System erwartungsgemäß große Fehler bei der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten ein (s.o.). Die im Vergleich zum Phthalat- und Acetat-Puffer abweichenden Geschwindigkeitskonstanten waren deshalb nicht als ein elektrolytabhängiger Effekt zu interpretieren.

Daß die Reaktionsgleichung des Isotopenaustausches in der angenommenen Form $R = k_Y \cdot [Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]^2 \cdot [H^+]$ nicht richtig sein konnte zeigte sich an den unter dieser Annahme berechneten Geschwindigkeitskonstanten, die keine Konstanz in dem betrachteten pH-Bereich aufwiesen (Tabelle 5.4.).

Die korrigierten k_Y -Werte in Tabelle 5.4. sind die Geschwindigkeitskonstanten, die aus den Austauschgraden der Isotopenaustauschreaktion unter Verwendung einer modifizierten Reaktionsgleichung berechnet wurden, die aus der Betrachtung der pH-Abhängigkeit des Isotopenaustausches abgeleitet wurde. Die Reaktionsgleichung, die zur Berechnung dieser Geschwindigkeitskonstanten führt, wird im Folgenden hergeleitet.

Legt man eine allgemeine Reaktionsgleichung der Form:

$$(29) \quad R = k_Y \cdot [Y - DTPA - Phe - Gly - Gly]^n \cdot [H^+]^m$$

zugrunde, folgt durch Logarithmieren:

$$(30) \quad \log(R) = \log(k_Y) + n \cdot \log([Y - DTPA - Phe - Gly - Gly]) - m \cdot pH$$

Eine Auftragung $\log R$ vs. pH sollte eine Gerade ergeben, deren Steigung die Molekularität m der H^+ -Ionen-Konzentration bzgl. des Isotopenaustausches liefert.

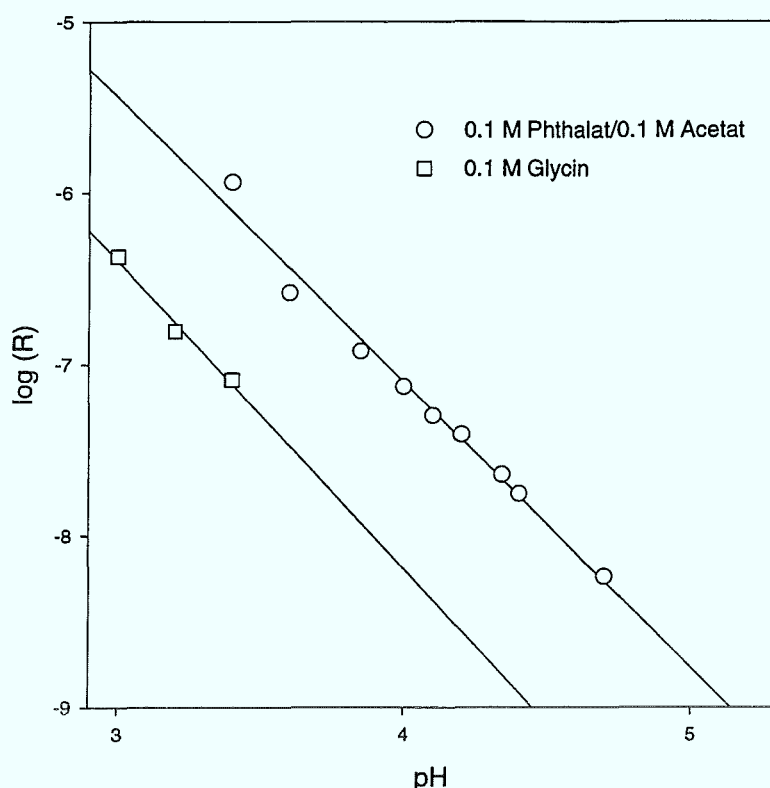


Abbildung 5.9.
Bestimmung der Molekularität von $[H^+]$ in der Reaktionsgleichung des Isotopenaustausches

Abbildung 5.9. bestätigte diese Form der Reaktionsgleichung und verdeutlichte darüber hinaus zwei weitere Eigenschaften der Reaktion.

1. Die Reaktion war unabhängig von der Art des Hintergrundelektrolyten.
2. Die Steigungen der Regressionsgeraden (Acetat/Phthalat: 1.659; Glycin: 1.794) ließen einen komplizierteren Mechanismus vermuten, in dessen Zwischenstufen die Konzentrationen der H^+ -Ionen beteiligt waren.

Aus den nahezu parallelen Geraden der Abbildung 5.9. ließ sich wiederum die Molekularität von $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]$ bestimmen. Nach Gleichung (30) sollte der Y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden im $\log R$ vs. pH-Diagramm den Wert $\log(k) + n \cdot \log[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]$ liefern, wobei zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten in Tabelle 5.4. $n = 2$ gesetzt wurde. Vergleicht man die berechneten Y-Achsenabschnitte der Glycin- und Acetat/Phthalat-Versuchsreihen, welche bei unterschiedlichen $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]$ -Konzentrationen durchgeführt wurden, so sollte durch Gleichsetzen der Y-Achsenabschnitte und Eliminierung der Geschwindigkeitskonstanten k_Y , unter der Voraussetzung $k_Y = \text{const.}$ im Acetat/Phthalat- und Glycin-Puffer, die Molekularität n direkt bestimmbar sein. Da im Glycin-Diagramm der größte Fehler in der Regressionsgeraden auftrat wurde die Steigung des Acetat/Phthalat-Systems auf die Datenpunkte des Glycin-Systems angewendet. Für die Molekularität n von $Y-DTPA-Phe-Gly-Gly$ ergab sich ein Wert von 0.984, d.h. eine sehr gute Näherung auf 1. Die Reaktionsgleichung des Iso-

topenaustauschgleichgewichtes konnte unter Verwendung von $n = 1$ und $m = \sim 1.7$ (Gleichung (30)) somit näherungsweise mit:

$$(31) \quad R = k_Y \cdot [Y - \text{DTPA} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Gly}] \cdot [\text{H}^+]^{-1.7}$$

aufgestellt werden. Eine Überprüfung der Reaktionsgleichung erfolgte an den Daten der Abhängigkeit des Isotopenaustausches von der Konzentration an Y-DTPA-Phe-Gly-Gly (Kapitel 5.2.3.2). Ohne Berücksichtigung des pH-Einflusses auf die Reaktion war eine Molekularität von 2.3 berechnet worden. Nicht betrachtet wurde bei diesem Ansatz, daß die Komplexbildung des Yttriums durch das gekoppelte DTPA die 4 Protonen des DTPA freisetzt und somit die H^+ -Konzentration der Lösung veränderte. Weiterhin wurde das Proton der C-terminalen Carbonsäure des Phe-Gly-Gly in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung freigesetzt und lieferte dadurch einen zusätzlichen Beitrag zur Protonenkonzentration. Die berechneten H^+ -Konzentrationen sowie die Geschwindigkeitskonstanten unter Verwendung von Gleichung (31) sind in Tabelle 5.5. zusammengefaßt.

Tabelle 5.5. Ergebnisse der Berechnung von Δ , R und k_Y

[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]	$[\text{H}^+]$	R [$\text{ML}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_Y [$\text{M}^{-1.7}\text{s}^{-1}$]
$1.75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$0.875 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$7.58 \cdot 10^{-9}$	$3.43 \cdot 10^3$
$2.75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$1.375 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$2.06 \cdot 10^{-8}$	$2.75 \cdot 10^3$
$27.5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$1.10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$4.28 \cdot 10^{-6}$	$1.67 \cdot 10^3$

Die Reaktionsgleichung (31) wurde rückwirkend auf die Daten der pH-Abhängigkeit des Isotopenaustausches angewendet und lieferte k_Y -Werte (Tabelle 5.4.: k_Y korrigiert), die gerade im Bereich hoher Meßgenauigkeit (pH 3.9 - 4.7) gute Konstanz aufwiesen.

Schlußfolgernd kann die Reaktionsgeschwindigkeit des Isotopenaustausches für den betrachteten pH-Bereich in erster Näherung durch Gleichung (31) beschrieben werden. Geschwindigkeitsbestimmend erwiesen sich die Konzentrationen des eingesetzten Y-DTPA-Phe-Gly-Gly und der pH-Wert der Lösung während die Metall-Kationen keinen Einfluß auf die Umkomplexierung bzw. Dekomplexierung zeigten. Die Reaktionsgeschwindigkeitsgleichung lieferte in diesem Zusammenhang einen guten Ansatz zur Beschreibung des Reaktionsverlaufes, war aber sicherlich nicht geeignet, um den Gesamtprozeß der Destabilisierung des Komplexes und die darin beteiligten Zwischenstufen mechanistisch zu beschreiben. Ein Vergleich mit dem in Schema 5.3. gezeigten Reaktionsmechanismus läßt auch für das Y-DTPA-Peptid-System einen mehrstufigen Prozess erwarten. Unter den experimentellen Bedingungen der Isotopenaustauschreaktion konnte nur die Summe aller parallel ablaufender Einzelprozesse gemessen werden, wodurch die Aussagen der Reaktionsgleichung nur qualitativ sein konnten.

Unter Verwendung der erstellten Reaktionsgleichung konnte nunmehr der Einfluß der Ionenstärke der Lösung als auch der Temperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht werden.

5.1.3.4. Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} von der Temperatur

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Reaktionsgleichung des Isotopenaustausches Y-DTPA-Phe-Gly-Gly / Y^{3+} in Bezug auf die geschwindigkeitsbestimmenden Komponenten evaluiert. Die aus den Darstellungen gewonnenen Reaktionsgleichungen ließen sich in der Gleichung (31) vereinen und lieferten dabei eine gute Näherungsgleichung zur Beschreibung des Isotopenaustausches und damit für die Dekomplexierungsreaktionen des Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-Systems.

Die Temperatur als weiterer beeinflussender Faktor der Geschwindigkeitskonstante der betrachteten Reaktion sollte zusätzliche Aufschlüsse über den Reaktionsablauf liefern. Zu diesem Zwecke wurde das Verhalten des Isotopenaustauschgleichgewichtes als Funktion der Temperatur betrachtet. Der Einfluß der Temperatur sollte danach Rückschlüsse auf den temperaturabhängigen Faktor der Geschwindigkeitskonstante zulassen [124].

In Abb. 5.10. ist die zeitliche Änderung des Anteils von ^{86}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly in der Isotopenaustauschreaktion für fünf verschiedene Temperaturen aufgetragen. Aufgrund der starken Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Temperatur wurden für höhere Temperaturen kleinere Konzentrationen des Y-DTPA-Phe-Gly-Gly verwendet, um meßbare Werte entfernt vom Isotopenaustauschgleichgewicht zu erhalten.

In der Auftragung $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit wurde die drastische Änderung des Austauschgrades mit steigender Temperatur deutlich (kleine Abbildung). Über die Steigungen der Geraden im $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit-Diagramm wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_T erfolgte nach Gleichung (31). Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 5.6. zusammengefaßt.

Abb. 5.10. Abhängigkeit des Anteils von ^{88}Y -DTPA-Phe-Gly-Gly in der Isotopenaustauschreaktion von der Temperatur der Lösung
 Reaktionsvolumen: 2 ml; 0.1 N KHPhtalat/0.1 N NaOH; pH 4.2
 $\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly} / \text{Y}^{3+} = 1 / 3.11$
 20°C, 35°C, 45°C: $[\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}] : 3.24 \cdot 10^{-5} \text{ M/L}$
 55°C: $[\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}] : 1.70 \cdot 10^{-5} \text{ M/L}$
 65°C: $[\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}] : 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ M/L}$
 (kleine Graphik: Änderung von $\ln(1-\lambda)$ mit der Zeit für die Temperaturabhängigkeit)

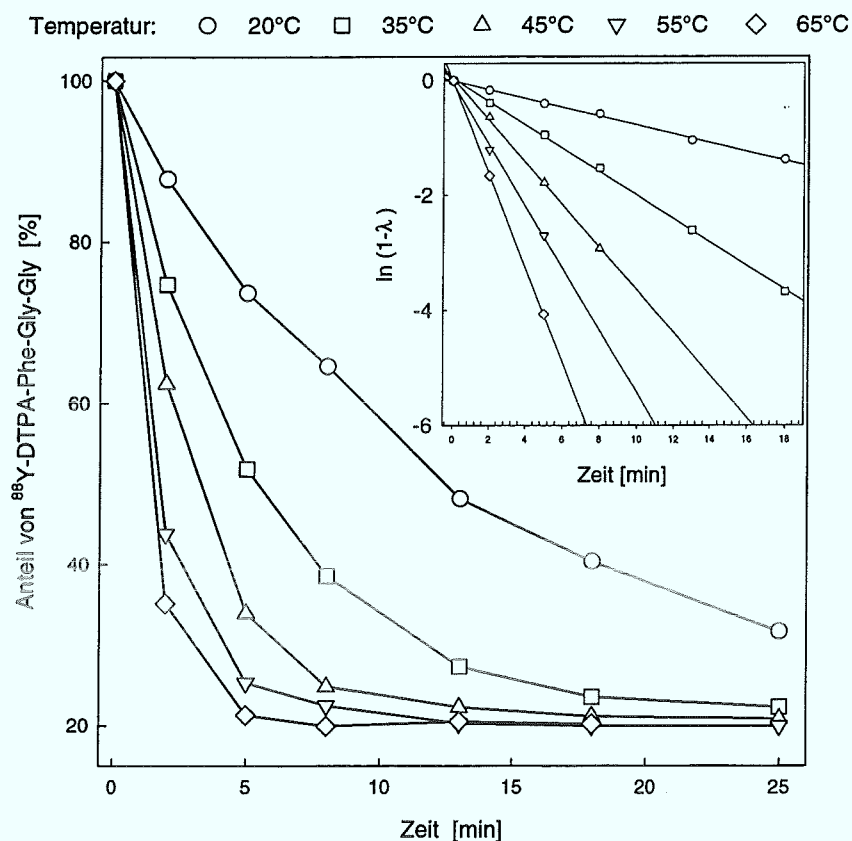


Tabelle 5.6. Reaktionsparameter des Isotopenaustauschgleichgewichtes $\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly} / \text{Y}^{3+}$ in Abhängigkeit von der Temperatur
 (0.1 M KHPhtalat pH 4.2) $[\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}] / [\text{Y}^{3+}] = 1 : 3.11$

Temp. [°C]	$[\text{Y-DTPA-P.}]$ [M/L]	$\Delta \cdot 10^{-3}$ [s ⁻¹]	$R \cdot 10^{-8}$ [ML ⁻¹ s ⁻¹]	k_T [M ^{-1.7} L ^{1.7} s ⁻¹]
20	$3.24 \cdot 10^{-5}$	1.29	3.17	$1.35 \cdot 10^4$
35	$3.24 \cdot 10^{-5}$	3.41	8.37	$3.57 \cdot 10^4$
45	$3.24 \cdot 10^{-5}$	6.15	15.10	$6.43 \cdot 10^4$
55	$1.70 \cdot 10^{-5}$	8.95	11.50	$9.35 \cdot 10^4$
65	$1.05 \cdot 10^{-5}$	13.56	10.67	$14.16 \cdot 10^4$

Die Variation der Geschwindigkeitskonstanten mit steigender Temperatur könnte nach *Arrhenius* zur Bestimmung der Aktivierungsenergie für die Reaktion herangezogen werden. Nach *Arrhenius* gilt für die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion:

$$(32) \quad k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad \text{bzw.} \quad \ln k = \ln A - \frac{E_A}{R \cdot T}$$

Eine Auftragung von $\ln k$ vs. $1/T$ sollte als Steigung den Wert $-E_A/R$ (E_A = Aktivierungsenergie) liefern. Der Y-Achsenabschnitt $\ln A$ ergibt einen Ausdruck für den präexponentiellen Faktor (Stoßfaktor A). In Abbildung 5.11. sind die Geschwindigkeitskonstanten k_T aus Tabelle 5.6. gegen die Temperatur der Lösung in der Form $\ln k_T$ vs. $1/T$ aufgetragen.

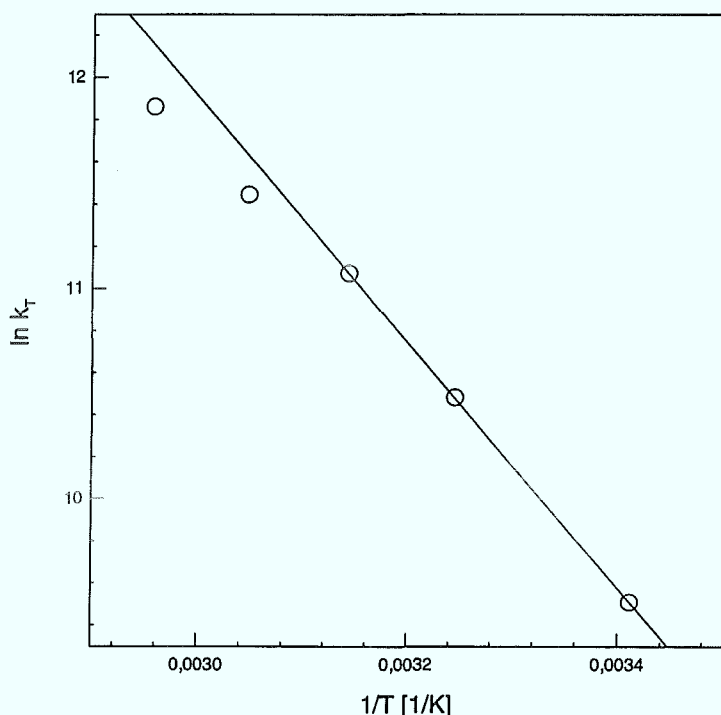


Abbildung 5.11.
Bestimmung des präexponentiellen Faktors und der Aktivierungsenergie durch Auftragung $\ln k_T$ vs. $1/T$ (Temperatur in Kelvin)

Die Regressionsgerade lieferte für den Y-Achsenabschnitt einen Wert von $\ln A = 29,4$. Der präexponentielle Faktor berechnete sich damit zu $5,8 \cdot 10^{12}$. Aus der Steigung Δ der Regressionsgeraden von -5830 ließ sich nun die Aktivierungsenergie bestimmen.

$$\Delta = -5830 = -\frac{E_A}{R} \quad \text{mit} \quad R = 8,3143 \quad \left[\frac{\text{J}}{\text{K} \cdot \text{M}} \right]$$

$$\Rightarrow E_A = 48,4 \quad \left[\frac{\text{kJ}}{\text{M}} \right]$$

Erweitert man dieses Konzept auf die *Eyring'sche Theorie* des Übergangszustandes, so gilt aus der Herleitung des aktivierten Komplexes für die Geschwindigkeitskonstante k :

$$(33) \quad k = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \cdot e^{\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

Die Aktivierungsenthalpie $\Delta H^\ddagger$ kann in flüssigen und festen Systemen näherungsweise durch den Ausdruck $\Delta H^\ddagger \approx E_A - RT$ [124] beschrieben werden. Für $\Delta H^\ddagger$ wurde ein Wert von $\Delta H^\ddagger = 45.9 \text{ kJ M}^{-1}$ berechnet.

Ein Vergleich mit der *Arrhenius*-Theorie der Geschwindigkeitskonstanten zeigt, daß der präexponentielle Faktor durch den Ausdruck: $kT_e/h \cdot e^{\Delta S^\ddagger/R}$ gegeben ist

(k: *Boltzmann*-Konstante ($1.38062 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$); h: *Planck'sches* Wirkungsquantum ($6.62620 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$); R: Gaskonstante ($8.3143 \text{ J K}^{-1} \text{ M}^{-1}$); e: *Euler'sche* Zahl (2.7183)).

Für die Isotopenaustauschreaktion ergibt sich somit die Aktivierungsentropie $\Delta S^\ddagger$ zu: $-8.7 \text{ J K}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

In der Literatur sind nur wenige Daten von Aktivierungsparameter ähnlicher Systeme beschrieben. Ein Beispiel ist die Umkomplexierung einiger Lanthanid- und Y-Komplexe der 1,2-Diamincyclohexan-Tetraessigsäure (CDTA) mit Cu^{2+} , die ebenfalls geschwindigkeitsbestimmend von der Protonenkonzentration abhängt. In Tabelle 5.7. sind die von G.A.Nyssen und D.W.Margerum [125] berechneten Werte der Aktivierungsenthalpie und Aktivierungsentropie für die pH-abhängige Reaktion: $\text{La-CDTA} + \text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu-CDTA} + \text{La}^{3+}$ einiger Lanthanid-CDTA-Komplexe aufgeführt.

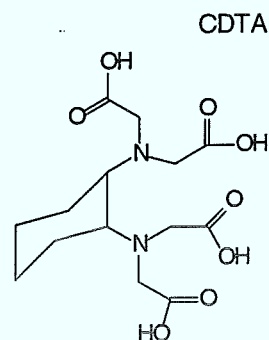


Tabelle 5.7. Aktivierungsparameter der H^+ -abhängigen Teilreaktionen für die Reaktion $\text{La-CDTA} + \text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu-CDTA} + \text{La}^{3+}$ einiger La-CDTA-Komplexe [125] im Vergleich zur Isotopenaustauschreaktion im Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-System (Y-DTPA-P.)

	$\Delta H^\ddagger [\text{kJ M}^{-1}]$	$\Delta S^\ddagger [\text{J K}^{-1} \text{ M}^{-1}]$
La-CDTA $\rightarrow$ Cu-CDTA	54.4	-21.7
Gd-CDTA $\rightarrow$ Cu-CDTA	53.5	-61.9
Dy-CDTA $\rightarrow$ Cu-CDTA	53.1	-77.4
Tm-CDTA $\rightarrow$ Cu-CDTA	72.8	-28.8
Lu-CDTA $\rightarrow$ Cu-CDTA	80.3	-8.8
Y-CDTA $\rightarrow$ Cu-CDTA	61.5	-46.0
Y-DTPA-P. $\rightarrow$ Y-DTPA-P.	45.9	-8.7

Der Vergleich der Aktivierungsparameter verdeutlicht die Parallelen der Umkomplexierungsreaktionen. Da die Aktivierungsparameter der CDTA-Versuche den geschwindigkeitsbestimmenden, H^+ -abhängigen Teilschritt der Umkomplexierung beschreiben, konnte für die Isotopenaustauschreaktion ein ähnlicher Mechanismus angenommen werden. Absolut-Vergleiche der Daten waren aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen CDTA und DTPA-Phe-Gly-Gly naturgemäß nicht möglich. Die für die Isotopenaustauschreaktion

berechnete Enthalpie richtete sich hierbei ausschließlich auf den Übergangszustand, da nach dem im Kapitel 3.2.1. erläuterten Eigenschaften von Isotopenaustauschreaktionen die Gesamtreaktion mit $\Delta H = 0$ abläuft.

5.1.3.5. *Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} von der Ionenstärke*

Bei Untersuchungen von Reaktionen in wässriger Lösung unter Beteiligung von konzentrationsabhängigen Termen geben die Meßdaten ein reales System wieder. Reaktionsgleichungen sind hingegen aus theoretischen Betrachtungen idealer Lösungen bzw. idealer Gase hergeleitet worden, müssen demnach um den Anteil des vorliegenden realen Systems faktorisiert werden.

Betrachtet man ein System unter Beteiligung unterschiedlicher Ionen in wässriger Lösung, so sind die vorgegebenen Konzentration um den Faktor des Aktivitätskoeffizienten verändert.

Aus der Herleitung der Aktivitätsbeziehungen in realen Lösungen folgt:

$$(34) \quad \begin{aligned} a &= \gamma \cdot c & 0 < \gamma < 1 \\ a &\rightarrow c & \text{und } \gamma \rightarrow 1 \text{ für } c \rightarrow 0 \end{aligned}$$

a: Aktivität; γ : Aktivitätskoeffizient; c: Konzentration.

Der Aktivitätskoeffizient läßt sich als Funktion der Ionenstärke I der Lösung beschreiben. Für wässrige Lösungen bei 298 K und geringen Ionenstärken könnte nach *Davies* [126] der Aktivitätskoeffizient durch folgende Formel abgeschätzt werden:

$$(35) \quad \log \gamma_{\pm} = -a \cdot (z^+ \cdot z^-) \cdot \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - bI \right) \quad \text{mit} \quad I = \frac{1}{2} \sum_j (c_j \cdot z_j^2)$$

I: Gesamtionenstärke; z_j : Ladung der individuellen Ionen; c_j : Konzentration der individuellen Ionen; a, b: Debye-Hückel-Koeffizienten

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Isotopenaustauschreaktion im Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-System sollte demnach bei verschiedenen Konzentrationen des Hintergrundelektrolyten eine Funktion des Aktivitätskoeffizienten sein. In logarithmierter Form folgt für die Reaktionsgeschwindigkeit des Isotopenaustausches:

$$(36) \quad \log R = \log k_Y + \log \left([Y - DTPA - P.] \cdot [H^+]^{1.7} \right) + \log \left(\gamma_{Y-DTPA-P.} \cdot \gamma_{H^+}^{1.7} \right)$$

Bei einer Auftragung der Ionenstärke in der Form $\sqrt{I}$ gegen $\log R$ sollte durch Extrapolation von $I \rightarrow 0$ die Reaktionsgeschwindigkeit bei unendlicher Verdünnung resultieren. In einer Versuchsreihe wurden dazu die Reaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Ionenstärken als inert betrachteter Grundelektrolyte bestimmt. Das Resultat ist in Abbildung 5.12. dargestellt:

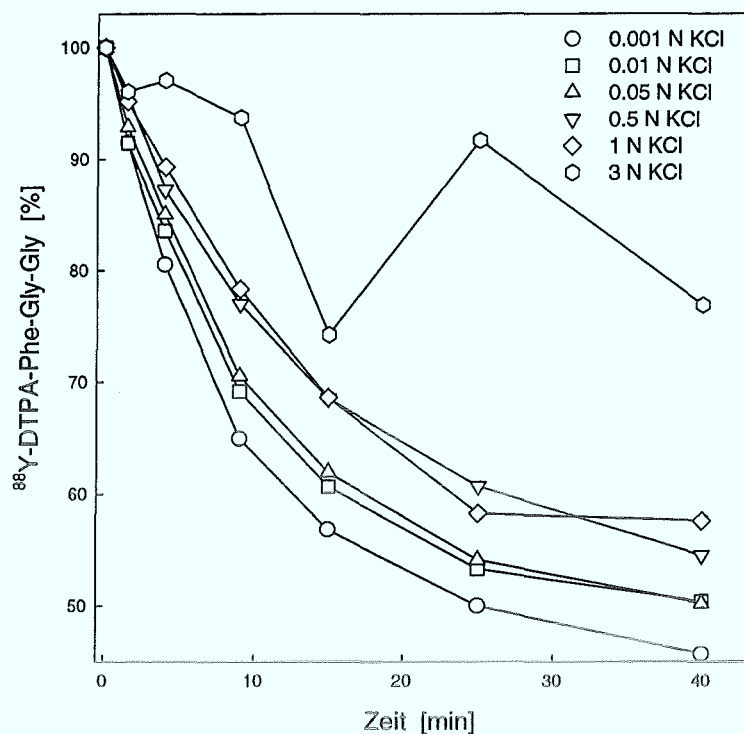


Abbildung 5.12.

Abhängigkeit der Isotopenaustauschreaktion von der Konzentration des Hintergrundelektrolyten

(0.01, 0.05 N KCl: $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] / [Y^{3+}] = 1 / 1$)

(0.001, 0.5, 1.0, 3.0 N KCl: $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] / [Y^{3+}] = 1 / 1.16$); 21°C; $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]: 2.13 \cdot 10^{-5} \text{ M/L}$

Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm mit wachsender Konzentration an KCl stetig ab. Die aus der Auftragung des Austauschgrades in der Form $\log(1-\lambda)$ vs. Zeit berechneten Daten (Auftragung nicht abgebildet) wurden in Tabelle 5.8. gegenübergestellt.

Tabelle 5.8. Reaktionsparameter des Isotopenaustauschgleichgewichtes Y-DTPA-Phe-Gly-Gly / Y^{3+} in Abhängigkeit von der Ionenstärke
21°C; $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]: 2.13 \cdot 10^{-5} \text{ M/L}$
(0.01, 0.05 N KCl: $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] / [Y^{3+}] = 1 / 1$)
(0.001, 0.5, 1.0, 3.0 N KCl: $[Y-DTPA-Phe-Gly-Gly] / [Y^{3+}] = 1 / 1.16$)

KCl [M/L]	Ionenstärke I	$\Delta \cdot 10^{-3}$ [s ⁻¹]	$R \cdot 10^{-8}$ [ML ⁻¹ s ⁻¹]	Faktor (ideal)
0.001	$1.222 \cdot 10^{-3}$	1.78	2.03	0.93
0.01	$1.020 \cdot 10^{-2}$	1.74	1.85	0.84
0.05	$5.020 \cdot 10^{-2}$	1.67	1.78	0.81
0.5	0.5002	0.99	1.13	0.52
1.0	1.000	0.98	1.12	0.51
3.0	3.000	0.21	0.24	0.11

Eine Auftragung von $\sqrt{I}$ vs. $\log R$ sollte nach Gleichung (36) eine Kurve ergeben deren Verlauf durch Gleichung (35) beschrieben werden kann. Die Auftragung ist in Abbildung 5.13. dargestellt. Die Meßwerte wurden durch Variation der Koeffizienten a und b iterativ an Gleichung (34) angepaßt.

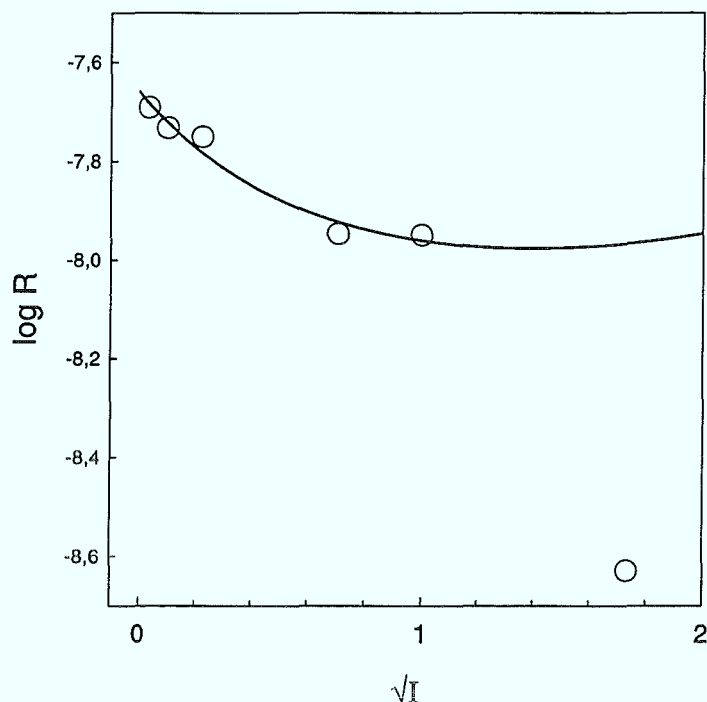


Abb.5.13.
Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Ionenstärke der Lösung
(Auftragung von $\log R$ vs. $\sqrt{I}$)
 $a: 0.6863$; $b: 0.0624$

Abbildung 5.13. zeigte, daß sich das Verhalten der Reaktionsgeschwindigkeit über weite Bereiche durch Gleichung (36) beschreiben ließ.

Die Iterationskurve lieferte einen Y-Achsenabschnitt von $\log R_0 = -7.66$ ($R_0 = 2.19 \cdot 10^{-8}$). Die Abweichungen vom idealen Verhalten könnten somit durch den Quotienten R/R_0 ausgedrückt werden. Die darüber berechneten Faktoren wurden in Tabelle 5.8. zusammengefaßt. Bei sehr kleinen Konzentrationen des Hintergrundelektrolyten wurde der Beitrag der Reaktionsmischung zur Ionenstärke gemäß der angegebenen Formel zur Berechnung der Ionenstärke in die Gesamtionenstärke einbezogen. Bei KCl-Konzentrationen > 0.05 M war dieser Anteil vernachlässigbar.

Zusammenfassend kann das Verhalten der Isotopenaustauschreaktion in wäßrigem Medium in einem Bereich, in der die Ionenstärken < 0.05 M sind, als annähernd ideal bezeichnet werden. Die vorangegangenen Versuchsreihen, die in den meisten Fällen bei einer Ionenstärke von 0.1 durchgeführt wurden, sollten entsprechend mit dem Faktor $R_{0,1}/R_0$ der Iterationskurve in Abbildung 5.13. korrigiert werden.

5.1.3.6. Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} von der Peptidsequenz

In den vorherigen Abschnitten wurden alle physikochemischen Parameter bestimmt, die die Isotopenaustauschreaktion beeinflussen könnten. Als weiterer biochemisch relevanter Parameter könnte die Peptidsequenz des Y-DTPA-Peptid-Systems die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Geschwindigkeitskonstante verändern. Da gerade sterische Komponenten bei der Ausbildung von Komplexverbindungen eine wesentliche Rolle in der Stabilität und Komplexierungskinetik einnehmen, würden ungünstige konfigurative und konformative Gegebenheiten sich in erhöhter bzw. verminderter Stabilität oder Kinetik der Komplexverbindungen darstellen [cf.127,128]. In Abschnitt 5.1.3.4. wurde bereits durch die Abhängigkeit der Reaktion von der Temperatur der Lösung gezeigt, daß die Entropieänderung zum Erreichen des Übergangszustandes eine untergeordnete Rolle spielte. Es wurde ferner gezeigt, daß sich die Dekomplexierung auf eine möglicherweise Protonenkatalysierte Reaktion zurückführen ließe. Diese beiden Erläuterungen legten nahe, daß bei Verwendung von Peptiden mit ähnlicher Sequenz eine starke Änderung des Reaktionsverhaltens nicht erwartet werden konnte. Dies sollte im Experiment überprüft werden.

Zur Untersuchungen des Verhaltens unterschiedlicher DTPA-Peptid-Systeme wurden die in Abschnitt 4.2.1.2. dargestellten Verbindungen verwendet. Da alle Peptide als koppelnde Aminosäure die Phenylalanin-Gruppe besaßen und die Peptid-Sequenzen nur sehr klein waren, sollten sterische Effekte praktisch auszuschließen sein. Änderungen des Komplexierungsverhaltens bei Verwendung unterschiedlicher NH_2 -Phe-Peptide sollten demnach auf direkte induktive Einflüsse der Peptidsequenz auf das Phenylalanin und über dieses auf das DTPA zurückzuführen sein.

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der Isotopenaustauschreaktion wurden vier DTPA-Peptide verwendet. Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion über weite Bereiche verfolgen zu können wurde in allen Fällen ein 0.1 N KHPhtalat-Puffer, pH 4.4 verwendet. Die Konzentrationen der DTPA-Peptide waren in allen Reaktionen ungefähr gleich (Tabelle 5.9.), so daß eine durch die Komplexierung des Yttriums hervorgerufene pH-Änderung vernachlässigt werden konnte. In Abbildung 5.14. sind die Ergebnisse der Isotopenaustauschreaktion Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} zusammengefaßt.

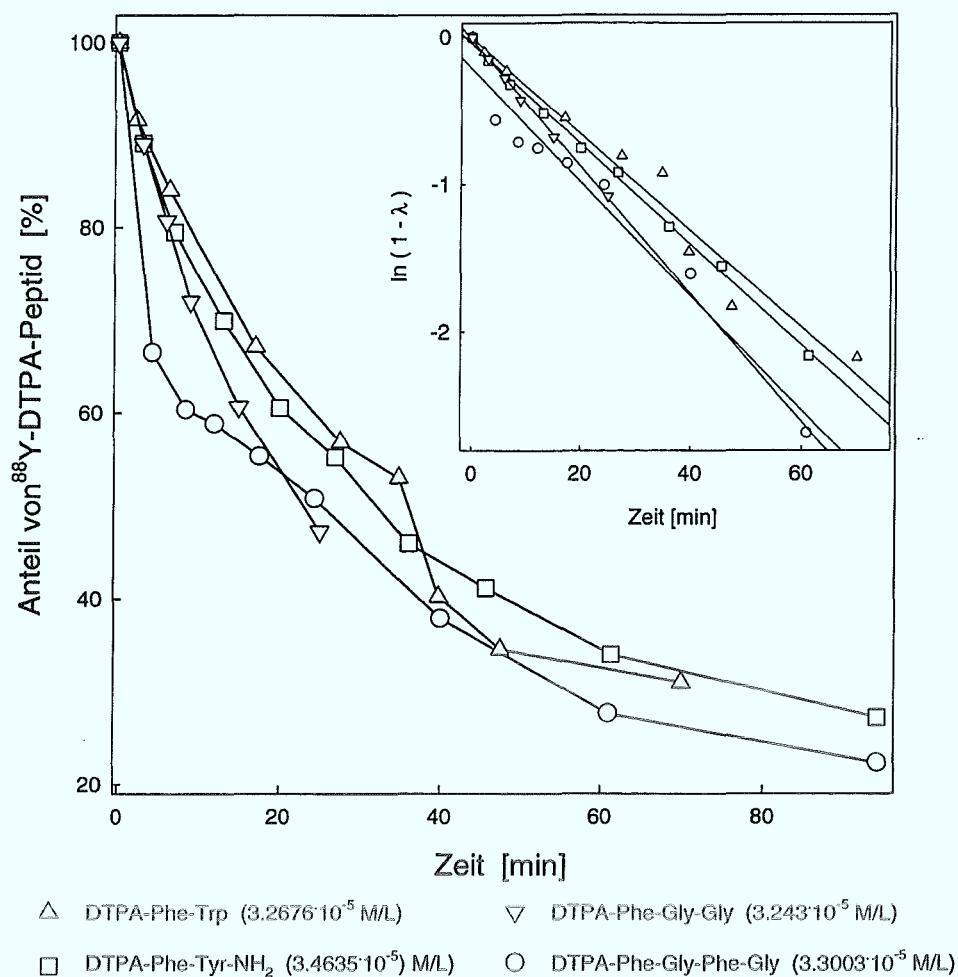


Abbildung 5.14. Abhängigkeit des Isotopenaustausches Y-DTPA-Peptid / Y^{3+} von der Peptid-Sequenz
 21°C; Reaktionsvolumen 2 ml; 0.1 N KHPhtalat, pH 4.4;
 $[\text{Y-DTPA-Peptid}] / [\text{Y}^{3+}] : 1 / 4$

Das Reaktionsverhalten der vier verwendeten DTPA-Peptide wies erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede auf. Die aus der Auftragung $\ln(1-\lambda)$ vs. Zeit bestimmten Daten sind in Tabelle 5.9. zusammengefaßt. Da der Isotopenaustausch bei gleicher Temperatur und in einem 0.1 N KHPhtalat-Puffer, pH 4.4 durchgeführt wurde, wurde als einzige Variable neben der Peptidsequenz die Konzentration des DTPA-Peptides betrachtet.

Tabelle 5.9. Reaktionsparameter des Isotopenaustauschgleichgewichtes Y-DTPA-Phe-Gly-Gly / Y^{3+} in Abhängigkeit von der Peptidsequenz
21°C; [Y-DTPA-Peptid] / [Y^{3+}]: 1 / 4; 0.1 N KHPthalat-Puffer, pH 4.4.

Peptid	[DTPA-Peptid] [M/L]	$\Delta \cdot 10^{-3}$ [s ⁻¹]	R [$\cdot 10^{-8}$] [ML ⁻¹ s ⁻¹]	k_Y [M ^{-1.7} L ^{1.7} s ⁻¹]
Phe-Gly-Gly	$0.3243 \cdot 10^{-4}$	0.72	1.86	$17.34 \cdot 10^3$
Phe-Gly-Phe-Gly	$0.33003 \cdot 10^{-4}$	0.64	1.70	$15.52 \cdot 10^3$
Phe-Trp	$0.32676 \cdot 10^{-4}$	0.54	1.43	$13.22 \cdot 10^3$
Phe-Tyr	$0.34635 \cdot 10^{-4}$	0.57	1.57	$13.70 \cdot 10^3$

Die Geschwindigkeitskonstanten wurden über die im Gang der Untersuchungen bestimmte Näherungsgleichung (Gleichung (31)) für die Isotopenaustauschreaktion berechnet und bestätigen deren Anwendbarkeit. Die für die Einzelversuche berechneten Geschwindigkeitskonstanten zeigten keine wesentlichen Unterschiede. Offensichtlich besaß die Peptidsequenz keinen Einfluß auf die Reaktionsführung des Isotopenaustausches.³

5.2. Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten von DTPA-Peptiden

Die Charakterisierung von mehrbasigen Chelat-Bildner geht immer einher mit der genauen Beschreibung jeder Protonierungsstufe der einzelnen funktionellen Gruppen innerhalb dieser Moleküle. In Abschnitt 3.2.2. wurde bereits beschrieben aufgrund welcher Formalismen die Kenntnis dieser Daten zur Beschreibung von Komplexgleichgewichten und zur Berechnung von Gleichgewichtskonstanten notwendig waren.

Die Beschreibung eines Systems kann jedoch nur erfolgen, wenn die Meßgenauigkeit der analytischen Methodik eine Unterscheidung einzelner Stufen ermöglicht. Zur exakten Bestimmung von Säuredissoziationskonstanten in einem mehrbasigen-System sollten sich die pK_s -Werte der einzelnen Komponenten um Werte von 1.5 (d.h. mehr als eine Größenordnung in K_s) unterscheiden [cf. 110].

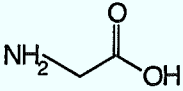
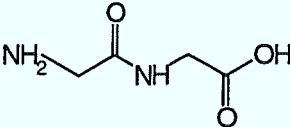
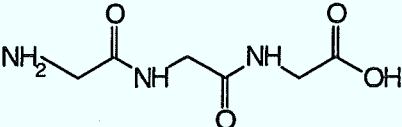
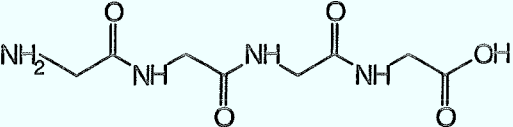
Betrachtet man nuklearmedizinisch relevante Systeme wie z.B. DTPA-gekoppelte Proteine und Antikörper, so sind die Säuredissoziationskonstanten nicht denen der isolierten Systeme gleichzusetzen [107]. Aufgrund induktiver Effekte innerhalb der Aminosäure-Ketten werden kleine Unterschiede in den Säuredissoziationskonstanten entstehen. Da die Richtung dieser Verschiebung nicht exakt vorhersagbar ist, wird mit steigender Anzahl abstrahierbarer Protonen die Bestimmung der Einzelwerte jeder Stufe schwieriger. Die Art der Verschiebung wird am Beispiel Glycin und die daraus ableitbaren Poly-Glycinen verdeutlicht [128].

³ Eine abschließende Bewertung dieser Daten erfolgt in Kapitel 5.4.

Ausgehend von der Aminosäure Glycin mit einem pK_s -Wert von 9.60 für die Ammoniumgruppe reduziert sich dieser Wert durch Bildung von Oligopeptiden des Glycins, d.h. Diglycin, Triglycin und Tetraglycin.

Im Fall des DTPA könnten die Carbonsäurereste als Teilstruktur eines N-alkylierten Glycins betrachtet werden.

Aus Schema 5.3. wurde deutlich, daß die Umwandlung des Carbonsäurerestes unter Ausbildung einer Amidbindung zur Erniedrigung des pK_s -Wertes der Ammoni-

pK_s (NH_3^+)	Aminosäure/Oligopeptid
9.60	
8.13	
7.96	
7.97	

Schema 5.3. pK_s -Werte der Ammoniumgruppe von Glycin, Diglycin, Triglycin und Tetraglycin

um-Gruppe führt. Dieser Effekt, angewendet auf das DTPA-Peptid-System, ließ erwarten, daß auch in diesem System die pK_s -Werte der sekundären Amine reduziert würden. Für die exakte Bestimmung von Stabilitätskonstanten ist die Kenntnis der Säuredissoziationskonstanten des betrachteten Komplexbildners essentiell. In diesem Fall würde dieses jedoch bedeuten, daß 1. die pK_s -Werte des freien Liganden nicht mit denen der gekoppelten Strukturen gleichzusetzen wären und 2. durch die Erniedrigung der pK_s -Werte die Konzentration des völlig deprotonierten Liganden bei Abnahme des pH-Wertes gegenüber dem freien Liganden erhöht würde. Die Auswirkung dieses Phänomens wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

5.2.1. Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten von DTPA-Phe-Gly-Gly-COOH

Für das DTPA-Phe-Gly-Gly-COOH, bei dem nur die C-terminale Carboxyl-Funktion als zusätzliche Protonierungsstufe zu erwarten ist, wurden die Säuredissoziationskonstanten per Titration bestimmt. Die Titration erfolgte unter Argon-Schutzgas in der in Abschnitt 4.5.1. dargestellten Anordnung. Die Titrations wurden teilweise nach Zusatz einer Standard 0.1 N HCl durchgeführt, um genauere Werte niedriger pK_s -Stufen zu erhalten. Vor jeder Titration erfolgte eine Überprüfung der Elektroden-Daten der jeweiligen Elektrode

durch Titration von 0.1 N HCl mit 0.1 N KOH. Diese Daten wurden, wie in Abschnitt 4.5.5.1. beschrieben, zur Berechnung der Carbonat-Anteils in der Standard KOH verwendet.

Zur Identifizierung bzw. Zuordnung der jeweiligen Säuredissoziationskonstanten im DTPA-Peptid-Molekül mußte vorab der pK_s -Wert der C-terminalen Carbonsäure im Molekül bestimmt werden. Hierzu wurde Phe-Gly-Gly gegen 0.1 N KOH titriert und die pK_s -Werte bestimmt. Das Ergebnis dieser Titration ist in Abbildung 5.15. wiedergegeben.

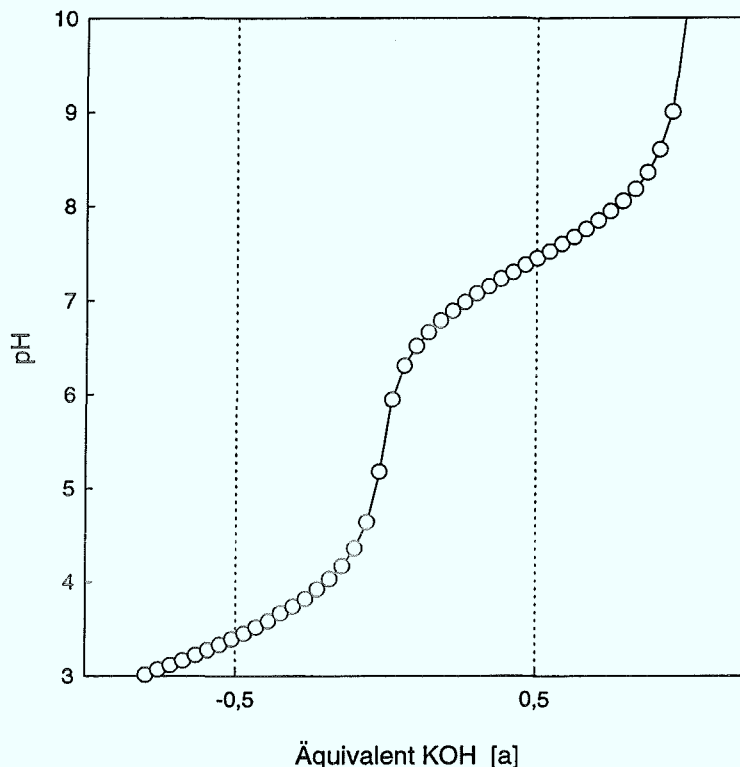


Abbildung 5.15.
Titration von Phe-Gly-Gly
[Phe-Gly-Gly]: $7.293 \cdot 10^{-3}$ M/L;
Zugabe 2.0 ml 0.1 N HCl;
RT; Volumen: 27 ml
Titrans: 0.1 N KOH
[a]: Mol KOH / Mol Peptid

Die pK_s -Werte ließen sich auf der pH-Skala bei den Halb-Neutralisationspunkten ablesen (-0.5 a; 0.5 a). Die negativen a-Werte resultieren dabei aus der Zugabe von 0.1 N HCl, die in die Rechnung einbezogen werden mußte. Die genaue Bestimmung der pK_s -Werte erfolgte durch das Iterationsprogramm PKAS von R.J.Motekaitis (Version 10/10/91; Fortran 77) [129]. In diesem Programm werden die Meßdaten bzgl. der Vorgaben (Konzentration, zugesetzte Säure, Carbonat-Anteil, Volumen, Molarität-Base; pH-Korrektur) iterativ angepaßt und das Minimum der Fehlerquadrate bestimmt.

Die Titration von DTPA-Phe-Gly-Gly erfolgte in entsprechender Art und Weise.

In Abbildung 5.16. ist die Titrationskurve für DTPA-Phe-Gly-Gly in 0.1 N KCl wiedergegeben. Es wurden die Ergebnisse mit und ohne Zusatz von 0.1 N HCl übereinandergelegt.

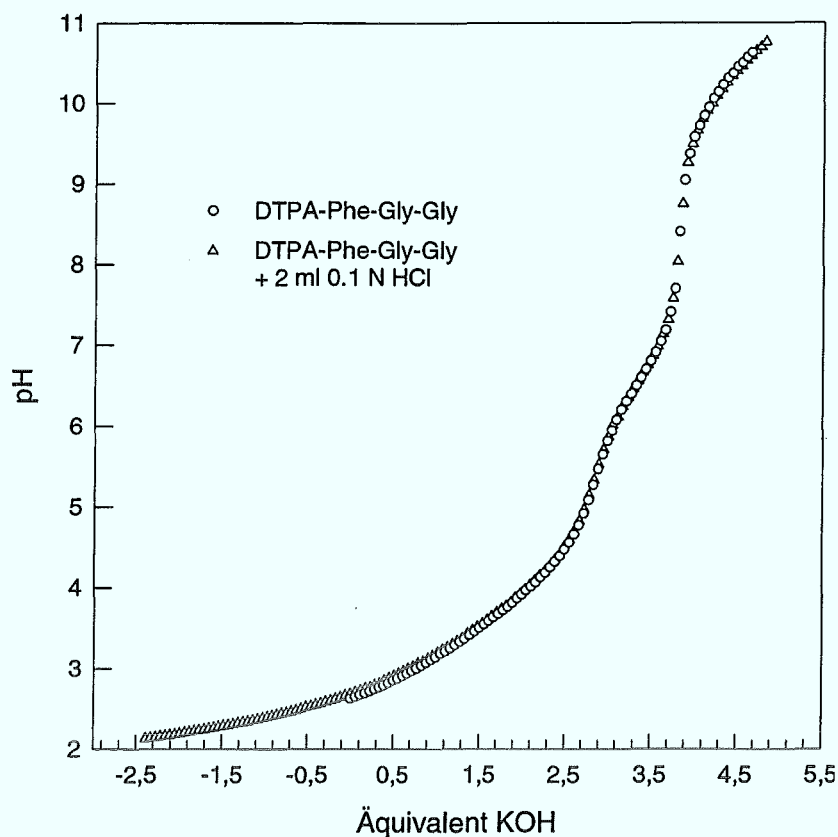


Abbildung 5.16.

Titration von DTPA-Phe-Gly-Gly und Phe-Gly-Gly mit 0.1 N KOH

○ [DTPA-Phe-Gly-Gly]: $2.881 \cdot 10^{-3}$ M/LΔ [DTPA-Phe-Gly-Gly]: $2.608 \cdot 10^{-3}$ M/L + 2 ml 0.1 M/L HCl
RT; Reaktionsvolumen 25 ml (27 ml bei HCl-Zugabe)

Eine Bestimmung der exakten pK_s -Werte war in diesem System weitaus schwieriger. Die Meßdaten an den Halb-Neutralisationspunkten fielen nicht exakt mit den Sattelpunkten des Polynoms zusammen. Die Korrektur der Meßdaten erfolgte wiederum mit dem Iterationsprogramm von Motekaitis. Die über die Iteration bestimmten Daten sowie der minimierte Gesamtfehler sind in Tabelle 5.10. zusammengefaßt. Das Ergebnis der Konzentrationskorrektur wurde als Korrektur der Ergebnisse der DTPA-Peptid-Synthesen übernommen (Peptid-Anteil: Titration) und anschließend bei Einwaagen von DTPA-Peptiden in die Berechnung der Molarität einbezogen.

Tabelle 5.10. Ergebnisse der pK_s -Wert-Korrektur für die Titrationskurven Abb.5.15. und Abb.5.16. (Iteration mit Computerprogramm: PKAS; R.J.Motekaitis; 1991 [129])

	DTPA-Phe-Gly-Gly	DTPA-Phe-Gly-Gly + 2 ml 0.1 N HCl	Phe-Gly-Gly
Konzentration (Vorgabe) [M/L]	$2.881 \cdot 10^{-3}$	$2.608 \cdot 10^{-3}$	$7.293 \cdot 10^{-3}$
Konzentration (korrigiert) [M/L]	$2.771 \cdot 10^{-3}$	$2.503 \cdot 10^{-3}$	$7.239 \cdot 10^{-3}$
Δ (Gesamtfehler) [$\Delta \log[H^+]$]	0.0179	0.0132	0.0577
pK_s (COOH) (DTPA)	2.20 ± 0.005	2.19 ± 0.007	
pK_s (COOH) (Phe-Gly-Gly)	3.41 ± 0.028	3.38 ± 0.004	3.46 ± 0.095
pK_s (NH ⁺) (DTPA)	4.15 ± 0.011	4.12 ± 0.012	
pK_s (NH ⁺) (DTPA)	6.53 ± 0.017	6.52 ± 0.020	
pK_s (NH ₂ ⁺) (Phe-Gly-Gly)			7.47 ± 0.028
pK_s (NH ⁺) (DTPA)	10.47 ± 0.033	10.49 ± 0.033	

Die Ergebnisse in Tabelle 5.9. verdeutlichen die gute Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse auch nach Zugabe der 0.1 N HCl. Die Zuordnung der pK_s -Werte erfolgte entsprechend den Untersuchungen am DTPA-System, in denen die ersten drei Protonierungsstufen den tertiären Aminen des DTPA zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung der pK_s -Stufe der C-terminalen Aminosäure im DTPA-Phe-Gly-Gly-System erfolgte durch direkten Vergleich mit den Werten des Phe-Gly-Gly-Systems. Eine Gegenüberstellung der pK_s -Werte des DTPA-Phe-Gly-Gly mit den pK_s -Werten des DTPA erfolgt im nächsten Abschnitt unter Verwendung aller evaluierten Titrationskurven der DTPA-Peptid-Systeme.

5.2.2. Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten von DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly-COOH, DTPA-Phe-Tyr-NH₂ und DTPA-Phe-Trp-COOH

Wie in Abschnitt 5.2.1. gezeigt, lieferten die Titrationskurven für DTPA-Phe-Gly-Gly-COOH gute und reproduzierbare Werte der Säuredissoziationskonstanten in diesem System. Im Folgenden sollten diese Daten mit den Ergebnisse der anderen DTPA-Peptide (DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly-COOH, DTPA-Phe-Tyr-NH₂ und DTPA-Phe-Trp-COOH) verglichen werden. Änderungen von den Meßwerten des DTPA-Phe-Gly-Gly-Systems sollten dabei direkt den Einfluß der Peptidkette auf die Basizität der funktionellen Gruppen im DTPA-Molekül widerspiegeln.

Die DTPA-Peptide wurden mit und ohne Zusatz von 0.1 N HCl titriert. Weiterhin erfolgte eine Titration des jeweiligen Peptides zur Bestimmung der zusätzlich vorhandene Protonierungsstufen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.11. aufgeführt und den Daten des DTPA-Phe-Gly-Gly-Systems sowie DTPA gegenübergestellt. Zum besseren Vergleich der DTPA-gekoppelten Peptide wurden Literaturwerte ähnlicher DTPA-Systeme hinzugefügt.

Tabelle 5.11. Vergleich der Säuredissoziationskonstanten unterschiedlicher DTPA-Systeme (DTPA-PA: DTPA-Mono-Propylamid; DTPA-PE: DTPA-Mono-Propylester)

	pK _s	pK _{s1}	pK _{s2}	pK _{s3}	pK _{s4}
DTPA [91]	1.82	2.65	4.28	8.53	10.45
DTPA-Phe-Gly-Gly		2.19	4.13	6.52	10.48
DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly		2.46	4.22	6.59	10.68
DTPA-Phe-Tyr -NH ₂		2.49	3.83	6.33	9.87
DTPA-Phe-Trp		2.91	4.52	6.71	10.46
DTPA-PA [107]		1.8	3.8	6.4	9.9
DTPA-PE [107]		1.8	3.8	6.6	9.8

Die Daten in Tabelle 5.11. verdeutlichen die Parallelen der betrachteten Systeme. Ausgehend von den pK_s-Werten des DTPA zeigte sich besonders bei der 3. Protonierungsstufe in den DTPA-gekoppelten Peptiden eine starke Verminderung der Basizität der Amin-Stickstoffatome. Obgleich in den Literaturdaten für DTPA-PA und DTPA-PE keine Fehlerbereiche angegeben wurden, war auch hier ein direkter Vergleich mit den DTPA-Peptiden möglich.

Gerade im Hinblick auf die Berechnung von Stabilitätskonstanten mehrbasiger Komplexbildner mit Metall-Kationen war dieses Verhalten von besonderem Interesse. In Abschnitt 3.1. wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Säuredissoziationskonstanten als Parameter der Gesamtkonzentration der Komplexbildners in das Komplexgleichgewicht einfließen. Die exakte Berechnung der Gleichgewichte führt nur unter der Verwendung der völlig deprotonierten Form des Komplexbildners zur tabellierten Gesamt-Bildungskonstante des Komplexes. Da diese Form bei DTPA-gekoppelten Proteinen bzw. Peptiden oftmals nicht genau definiert werden konnte, waren nur Näherungen über Derivate möglich. Daß gerade diese Näherung, die für DTPA bzw. DTPA-Derivaten durchgeführt wurden, von erheblichen Fehlern begleitet war, wurde aus den Unterschieden der pK_s-Werten in Tabelle 5.11. deutlich.

Eine Modellrechnung für einer Gleichgewichtsbestimmung bei z.B. pH 6 würde bei gleichen realen Gesamtkonzentrationen unterschiedliche Konzentrationen der deprotonierten Form liefern ($[DTPA^4] / [DTPA-Phe-Gly-Gly^4] / [DTPA-PA^4] = 0.0137 / 1 / 4,7824$). Für die berechneten Stabilitätskonstanten ($\log \beta$) lägen die Werte im Verhältnis zum DTPA-Phe-

Gly-Gly-System für DTPA nach Gleichung (12) um 1.864 unter und für DTPA-PA um 0.68 über dem tatsächlichen Wert.

Eine Evaluierung eines komplexen Systems, das sensibel auf Änderungen von Gleichgewichten reagiert, wäre bei diesen Abschätzungen quantitativ unzureichend. In biologischen Systemen, in denen eine Vielzahl von Parametern einfließt, mußte eine Bewertung in dem Augenblick scheitern, in dem sich die bedingenden und in den meisten Fällen dynamischen Komplexgleichgewichte überlagerten. Da in diesen Systemen weder die Komplexgleichgewichte als zeitlich konstant angesehen werden konnten und ferner die sie beeinflussenden Parameter der gleichen Dynamik unterlagen, waren Fehlerabschätzungen, die Größenordnungen überstrichen, kein geeigneter Ansatz, konkrete Aussagen zu machen.

Aus diesem Grund wurde ein neuer Ansatz (Abschnitt 5.2.4.) entwickelt, der die Berechnung von Gleichgewichten auch in komplizierteren Systemen zuließ und in dessen Gang die Parameter zur Darstellung dieser Gleichgewichte ermittelt werden konnten.

5.2.3. *Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von DTPA-Peptiden durch potentiometrische Titration*

Eine klassische Methode zur Bestimmung der Brutto-Stabilitätskonstante von Metallkomplexen stellt die potentiometrische Titration dar [cf. 130]. Die Titration eines Komplexbildners wie z.B. DTPA-Phe-Gly-Gly liefert die Säuredissoziationskonstante des betrachteten Systems. Durch die Komplexierung von Yttrium durch DTPA-Phe-Gly-Gly werden alle Protonen der an der Komplexierung beteiligten funktionellen Gruppen freigesetzt und können titriert werden.

Die Titrationskurven für DTPA-Phe-Gly-Gly und Y-DTPA-Phe-Gly-Gly sind in Abbildung 5.17. gegenübergestellt.

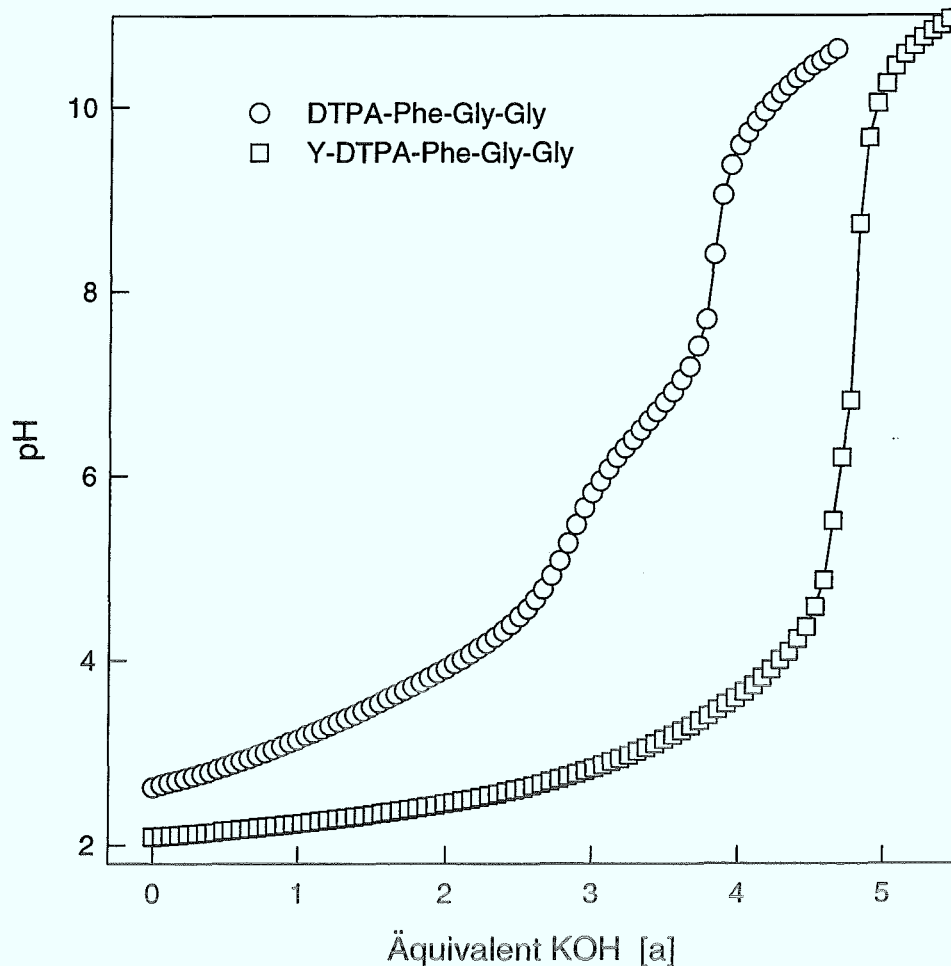


Abbildung 5.17. Titrationskurven für DTPA-Phe-Gly-Gly und Y-DTPA-Phe-Gly-Gly
 [DTPA-Phe-Gly-Gly]: $2.881 \cdot 10^{-3}$ M/L; [Y-DTPA-Phe-Gly-Gly]: $2.4318 \cdot 10^{-3}$ M/L
 21°C; 0.1 N KCl; Titrans: 0.1 N KOH.

Die Titrationskurve von Y-DTPA-Phe-Gly-Gly zeigte deutlich, daß durch die Komplexbildung insgesamt 4 Protonen freigesetzt wurden. Das fünfte Proton konnte dem C-Terminus des Peptides zugeordnet werden. Nach der Neutralisation der Protonen stieg der pH-Wert entsprechend der zugesetzten KOH an. Das in diesem Zusammenhang keinerlei weitere Protonierungsstufen titriert werden konnten deutete darauf hin, daß analog dem freien DTPA die Koordination des Y^{3+} über die 3 Stickstoffatome erfolgte. Ob alle 4 Carboxyl-Funktionen an der Komplexbildung beteiligt waren, konnte aufgrund der niedrigen pK_s -Werte dieser Gruppen aus der Titrationskurve nicht direkt geschlossen werden. Die Analyse der Datenpunkte durch Iteration mit dem Programm PKAS [129] ergab die in Tabelle 5.12. wiedergegebenen Daten.

Tabelle 5.12. Iterationsdaten bestimmt mit PKAS [129]

	DTPA-Phe-Gly-Gly	Y-DTPA-Phe-Gly-Gly
Konzentration (Vorgabe) [M/L]	$2.88 \cdot 10^{-3}$	$2.43 \cdot 10^{-3}$
Konzentration (korrigiert) [M/L]	$2.77 \cdot 10^{-3}$	$2.34 \cdot 10^{-3}$
Δ ($\emptyset$ -Fehler) [$\Delta \log[H^+]$]	0.018	0.010
pK_s (Phe-Gly-Gly -COOH))	3.41 ± 0.03	3.41 ± 0.02

Die aus Abbildung 5.17. berechnete Säuredissoziationskonstante für das fünfte Proton des Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-Systems konnte demnach exakt der C-terminalen Carbonsäure des DTPA-Phe-Gly-Gly-Systems zugeordnet werden.

Die Bestimmung der Stabilitätskonstante des Y-DTPA-Phe-Gly-Gly erfolgte danach über das Computerprogramm BEST von Motekaitis [131]. Der Algorithmus, der diesem Programm zugrunde liegt, basiert auf der Massenbilanz (T_i) der i-ten Komponente in Abhängigkeit von der k-ten Spezies summiert über all Spezies (s) in der Lösung. Jede Konzentration ist dabei wiederum ein Produkt der Brutto-Bildungskonstante (β) und der individuellen Komponentenkonzentration [C_m] mit dem stöchiometrischen Koeffizienten (e_{ik}).

$$(37) \quad T_i = \sum_{k=1}^s e_{ik} \beta_k \prod_m [C_m]^{e_{ik}}$$

Die simultanen Gleichungen der Einzelgleichgewichte werden dann nach Vorgabe eines Schätzwertes für die Stabilitätskonstante gelöst und die Fehler der Meßdaten iterativ minimiert.

Die Auswertung der Titrationsdaten von Y-DTPA-Phe-Gly-Gly (Abb.5.17.) mit einem Schätzwert der Stabilitätskonstante von $\log \beta = 19.5$ lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse für die Stabilitätskonstante. Der große Fehler von $\log \Delta = 1.5$ wurde zum einen darauf zurückgeführt, daß die zusätzlich vorhandene Protonierungsstufe des Peptides eine genaue Bestimmung der Einzelkomponenten C_m nicht zuließ. Zum anderen zeigte die Titrationskurve keine offensichtlichen Änderungen in hohen pH-Bereichen, was auf eine sehr hohe Stabilitätskonstante hinwies und somit eine Auswertung mittels potentiometrischer Titration erschwerte.

5.2.4. Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten von DTPA-Peptiden durch Ligandenverdrängung

Die Berechnung von Gesamt-Bildungskonstanten sehr stabiler Komplexe erfolgte in den meisten Fällen durch Verdrängungsreaktionen [cf. 132,133,134]. Die Verdrängung des Metalles aus einer Komplexstruktur konnte dabei entweder durch ein konkurrierendes Metall-Kation oder durch einen konkurrierenden Liganden erfolgen.

Bei einer Ligandenverdrängungsreaktion ausgehend von einem Komplex MA läßt sich die Verschiebung des Gleichgewichtes in der Lösung durch den konkurrierenden Liganden B:



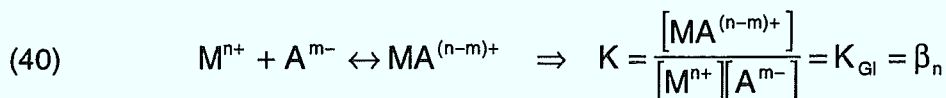
durch eine Gleichgewichtskonstante K_{Gl} beschreiben:

$$(39) \quad K_{\text{Gl}} = \frac{[\text{MB}^{(n-h)+}][\text{A}^{m-}]}{[\text{B}^{h-}][\text{MA}^{(n-m)+}]} = \frac{\beta_{\text{MB}}}{\beta_{\text{MA}}}$$

Die Gleichgewichtskonstante K_{Gl} läßt sich wiederum aus den Gleichgewichtskonstanten der individuellen Komplexgleichgewichte (β_{MA} , β_{MB}) herleiten. Die genaue Herleitung sowie die Gleichgewichte der Einzelkomponenten wurde in Abschnitt 3. beschrieben. Die Lösung dieser Gleichung würde bei Kenntnis aller Komponenten die gesuchte Gesamt-Stabilitätskonstante (β_{MA}) des betrachteten Komplexes liefern. Voraussetzung für die Lösbarkeit der Gleichung ist, daß neben dem untersuchten Gleichgewicht keine weiteren Komplexformen zu betrachten sind. In den Fällen, in denen protonierte Metall-Ligand-Spezies mit relevanter Stabilität sowie andere Gleichgewichtsbeeinflussungen, z.B. konkurrierende Hydrolyse des Metall-Aquo-Komplexes, in das Gleichgewicht eingehen, müßten die einzelnen Terme entsprechend den vorliegenden Massenbilanzen und schrittweisen Bildungskonstanten erweitert werden.

In Abschnitt 3.2.2.1. wurde bereits eine neue Möglichkeit der Komplexstabilitätsbestimmung beschrieben, die unter den gemachten Voraussetzungen auch ohne vorherige Kenntnis der Säuredissoziationskonstanten des betrachteten Komplexbildners eine Berechnung ermöglichen sollte. Das Prinzip dieser Methode basierte wiederum auf der Ligandenverdrängungsreaktion, die jedoch unter Verwendung sehr kleiner Metall-Ionen-Konzentrationen erfolgte. Um diese geringen Metall-Ionen-Konzentrationen als auch eine geeignete Meßmethodik zur Bestimmung des Gleichgewichtes gewährleisten zu können, bot sich der Einsatz trägerfreier Radiometalle an. Für die Beschreibung des Gleichgewichtes ließen sich die gleichen Kriterien anführen, die auch bei makroskopischen Untersuchungen galten. Im Gegensatz zu makroskopischen Systemen war jedoch die Konzen-

trationen der völlig deprotonierten Form des Liganden, die in die Gleichung für die Gesamt-Bildungskonstante β_n einging, gegenüber der Metallkonzentration selbst bei niedrigen pH-Werten im ständigen Überschuß. Ist die Stabilitätskonstante des gebildeten Komplexes viel größer als die Stabilitätskonstante von Konkurrenzgleichgewichten in der Lösung, sollte die Gleichgewichtskonstante K_{Gl} der Lösung direkt den Wert der Gleichgewichtskonstante der Reaktion:



liefern. In dieser Gleichung beschreiben die Exponenten $n+$ und $m-$ die Ladung der Spezies, die den Komplex mit der größten Stabilitätskonstante ausbilden. Für den Konkurrenzliganden gilt die entsprechende obige Gleichung, so daß das Verhältnis beider Gleichgewichte das Lösungsgleichgewicht beschreibt. Für das Gleichgewicht in der Ligandenverdrängungsreaktion läßt sich dann Gleichung (39) umstellen:

$$(41) \quad K_{\text{Gl}} = \frac{[MB^{(n-h)+}][A^{m-}]}{[B^{h-}][MA^{(n-m)+}]} = \frac{\beta_{\text{MB}}}{\beta_{\text{MA}}} \Rightarrow \beta_{\text{MA}} = \beta_{\text{MB}} \cdot \frac{[B^{h-}]}{[A^{m-}]} \cdot \frac{[MA^{(n-m)+}]}{[MB^{(n-h)+}]}$$

Wären die Säuredissoziationskonstanten der beteiligten Liganden bekannt, könnten die Konzentrationen $[B^{h-}]$ und $[A^{m-}]$ bei jedem pH-Wert berechnet werden.

Die Bestimmung der deprotonierten Formen der Komplexbildner erfolgt über die Säuredissoziationsgleichgewichte, die durch Titrations gemessen werden können. Die Gesamt-Stabilitätskonstante β_{MA} könnte dann unter Verwendung der Gesamt-Stabilitätskonstanten des Konkurrenzliganden β_{MB} durch Messung der Radioaktivitätsverteilung $[MA^{(n-m)+}] / [MB^{(n-h)+}]$ bestimmt werden.

Die Überprüfung dieses Ansatzes erfolgte durch Verwendung der DTPA gekoppelten Modell-Peptide: DTPA-Phe-Gly-Gly, DTPA-Phe-Trp und DTPA-Phe-Tyr. Bestimmt werden sollte die Gesamt-Bildungskonstante des Yttrium-Komplexes dieser Verbindungen. Im Hinblick auf die Berechnung von Stabilitätskonstanten von Komplexen mit Komplexbildnern, deren Säuredissoziationskonstanten unbekannt sind, stand gerade das pH-Verhalten der Ligandenverdrängungsreaktion im Vordergrund.

5.2.5. Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten von DTPA-Phe-Gly-Gly

Unter der Annahme, daß nur die jeweils stabilste Form des Komplexes gebildet würde, sollte die Konzentration des Komplexes eine Funktion von $[A^{m-}]$ und damit eine Funktion des pH-Wertes sein (Abschnitt 3.2.2.1.). Da dieser Ansatz entsprechend für den Konkur-

renzliganden gelten mußte, sollte sich das Verhältnis der deprotonierten Formen beider Liganden nicht linear mit dem pH-Wert ändern. Vielmehr sollte bei einer Auftragung $[MA]/[MB]$ vs. pH in Bereichen der Säuredissoziationskonstanten des betrachteten Komplexbildners ein Wendepunkt auftreten. Der Kurvenverlauf würde einer Auftragung in Abb. 3.1. entsprechen, d.h. aus dem Kurvenverlauf sollten die Säuredissoziationskonstanten sowie die stabilste Form des Komplexes ablesbar sein.

Der Ansatz wurde anhand der Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion:



überprüft. Die Bestimmung der Komplexverhältnisse $^{88}\text{Y} - \text{DTPA} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Gly} / ^{88}\text{Y} - \text{EDTA}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Abbildung 5.18. wiedergegeben.

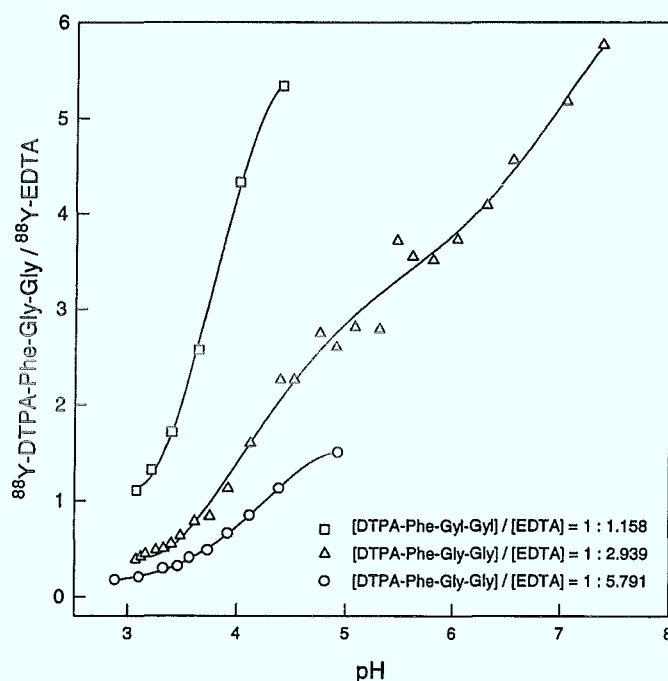


Abb.5.18.
Ligandenverdrängungsreaktion $^{88}\text{Y} - \text{DTPA} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Gly} / ^{88}\text{Y} - \text{EDTA}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen der beteiligten Liganden.
T: 25°C ; 0.1 N KCl

Das Komplexverhältnis wuchs mit steigendem pH-Wert stetig an. Im Bereich von pH 4 und pH 6.5 wurde diese Änderung maximal (Wendepunkt). Dieser Effekt erwies sich als unabhängig vom eingesetzten Ligandenverhältnis. Sollte Gleichung (41) gelten und keine protonierten Zwischenstufen der Liganden an der Reaktion beteiligt sein, sollten die drei Kurven durch Normierung ineinander überführbar sein. Zur Normierung wurde alle Ausgangskonzentrationsverhältnisse der Liganden mit 1 festgelegt. Das Ergebnis ist in Abb.5.19. dargestellt.

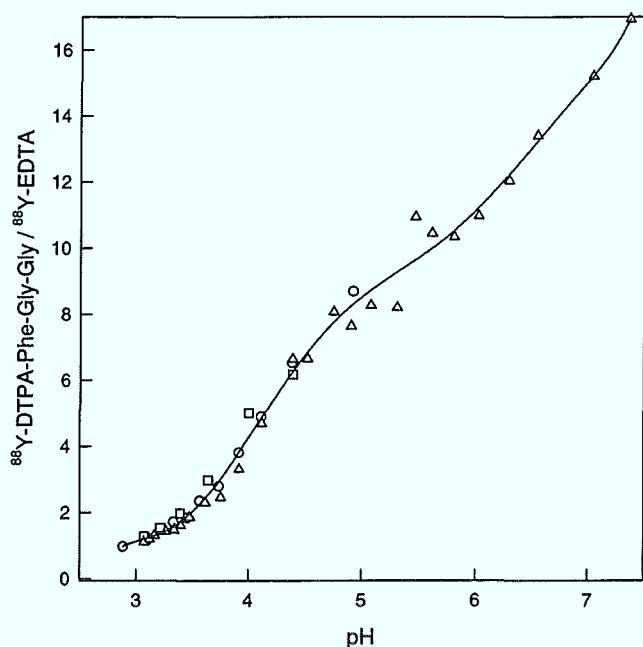


Abb.5.19.
Darstellung der Komplexverhältnisse $^{88}\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly} / ^{88}\text{Y-EDTA}$ vs. pH normiert auf ein Konzentrationsverhältnis DTPA-Phe-Gly-Gly / EDTA = 1

Tatsächlich befanden sich alle Werte in guter Deckung. Die in Abbildung 5.19. wiedergegeben Kurve gibt die polynome Regressionskurve an die vereinigten Datenpunkte wieder. Im Bereich pH 4.0 und pH 6.5 wurden die Wendepunkte bestimmt. Die exakten Werte berechneten sich zu: pH 4.13 und 6.66. Nach den Vorhersagen (Kapitel 3.2.2.1.) sollten diese Wendepunkte (W.P.) gerade die pK_s -Werte des DTPA im DTPA-Phe-Gly-Gly-System beschreiben. Ein Vergleich mit den Titrationsdaten aus Abschnitt 5.2.1. zeigte die gute Übereinstimmung der Werte:

Tabelle.5.13. Vergleich der Säuredissoziationskonstanten bestimmt durch Titration (pK_s) und Ligandenverdrängung (W.P.)

pK_s	W.P.
4.12	4.13
6.52	6.66

Die Übereinstimmung der Meßwerte mit den durch Titration bestimmten pK_s -Werten bestätigte, daß nach Gleichung (41) über die Messung der pH-abhängigen Ligandenverdrängungsreaktion bei einer Auftragung der Komplexverhältnisse im Gleichgewicht vs. pH durch Berechnung der Wendepunkte die Säuredissoziationskonstanten des beteiligten Liganden bestimmbar waren⁴. Diese Möglichkeit bot somit den ersten Schritt zur Bestimmung von Komplexgleichgewichten mit Liganden, deren Säuredissoziationskonstanten nicht bekannt waren. Diese wurden entlang der pH-Abhängigkeit der Ligandenverdrän-

⁴ Der scheinbar große Fehler des zweiten W.P. wird in Abschnitt 5.4. diskutiert

gungsreaktion durch die Anwendbarkeit der Gleichung (41) erhalten und konnten in die Berechnung der Gesamt-Stabilitätskonstante einbezogen werden.

Die Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstante konnte anschließend direkt durch Anwendung von Gleichung (41) erfolgen. Durch Umstellen und Logarithmieren folgte:

$$(42) \quad \log\left(\frac{MA^{(n-m)+}}{MB^{(n-h)+}}\right) + \log(\beta_{MB}) = \log(\beta_{MA}) + \log\left(\frac{A^{m-}}{B^{h-}}\right)$$

Eine Gleichung (42) entsprechende Auftragung sollte eine Gerade ergeben mit der Steigung 1 und dem Y-Achsenabschnitt $\log\beta_{MA}$. Der Berechnung der Ligandenkonzentrationen lagen die in Tabelle 5.14. aufgeführten pK_s -Wert zugrunde.

Tabelle 5.14. Zur Berechnung der Ligandenkonzentrationen verwendete Säuredissoziationskonstanten

	pK_{s1}	pK_{s2}	pK_{s3}	pK_{s4}
DTPA-Phe-Gly-Gly	2.19	4.13	6.52	10.48
EDTA [91]	2.00	2.68	6.11	10.17

Die Auftragung für die Meßergebnisse der Y-DTPA-Phe-Gly-Gly-Untersuchungen in Abb.5.20. ergab eine Regressionsgeraden mit der Steigung 0.887 und einem Y-Achsenabschnitt von 19.66.

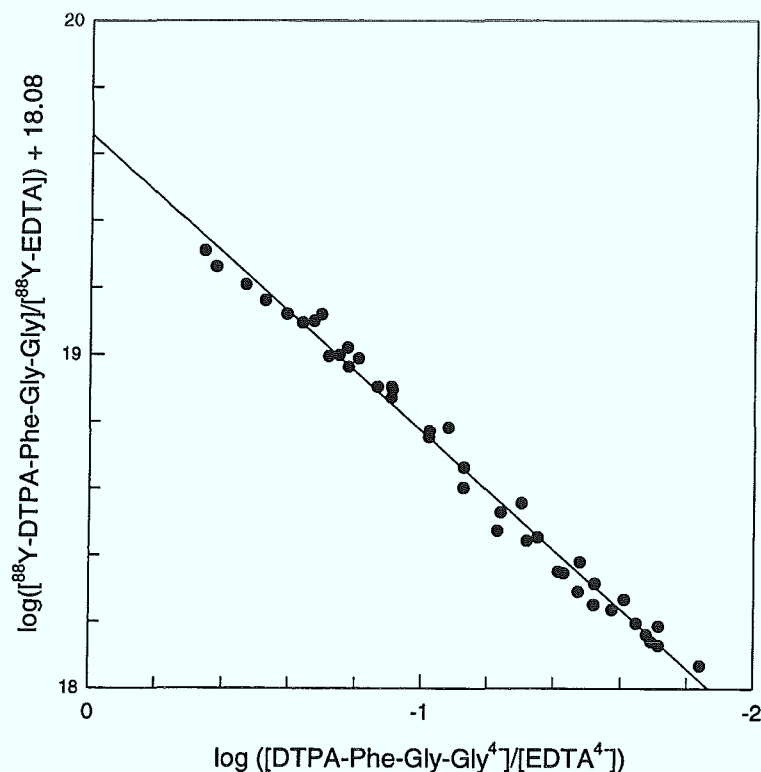


Abb.5.19. Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstante von Y-DTPA-Phe-Gly-Gly durch eine Auftragung entsprechend Gleichung (40)

Für die Gesamt-Stabilitätskonstante von Y-EDTA wurde der Literaturwert $\log \beta = 18.08$ [91] verwendet. Die Abweichung der Regressionsgeraden von 1 wurde auf die Fehler der pK_s -Wert-Bestimmung des DTPA-Phe-Gly-Gly zurückgeführt. Gerade im Bereich sehr niedriger pH-Werte als auch im Bereich sehr hoher pH-Werte war die Bestimmung der pK_s -Werte mittels Titration mit größeren Fehlern behaftet. Dieses galt nicht nur für die in dieser Arbeit durchgeführten Titrationsen, sondern auch für die in der Literatur tabellierten Werte. In Abbildung 5.20. zeigte sich dieses Verhalten besonders in den Abweichungen von der Regressionsgeraden bei großen Ligandenverhältnissen (hoher pH-Wert). Ferner gingen gerade in diese Meßwerte kinetisch bedingte Fehler ein, die in Abschnitt 5.4. diskutiert werden.

Grundsätzlich erwies sich diese Methode als gute Variante zur Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten von mehrbasigen Komplexbildnern mit Metall-Kationen. Auch durch Variation der Steigung der Regressionsgeraden lag der Fehler im Bereich von 0.3. Das Ergebnis dieser Untersuchungen lieferte somit die Gesamt-Stabilitätskonstante von Y-DTPA-Phe-Gly-Gly: $\log \beta = 19.7 \pm 0.3$.

5.2.6. Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von Y-DTPA-Phe-Trp und Y-DTPA-Phe-Tyr-NH₂

Neben der Berechnung der Gesamt-Stabilitätskonstante von DTPA-Phe-Gly-Gly wurden zur Überprüfung des Ansatzes die Bildungskonstanten für DTPA-Phe-Trp und DTPA-Phe-Tyr-NH₂ bestimmt.

Da die Ergebnisse aus Abschnitt 5.2.5. zeigten, daß bei der Anwendung kleiner Metall-Ionen-Konzentrationen das Gleichgewicht der Reaktionslösung direkt durch Gleichung (41) ausgedrückt werden konnte, wurde zur Bestimmung der Stabilitätskonstante von Y-DTPA-Phe-Trp und Y-DTPA-Phe-Tyr-NH₂ keine polynome Regression durchgeführt, sondern Gleichung (41) direkt auf die Datenpunkte im [Y-DTPA-Peptid]/[Y-EDTA] vs. pH-Diagramm angewendet.

Gleichung (41) wurde dazu mit den in Abschnitt 3.1. beschriebenen Ausdrücken für die Säuredissoziationsgleichgewichte der Liganden erweitert (Gleichung(43)).

$$(43) \quad \frac{[Y-DTPA-P.]}{[Y-EDTA]} = \frac{K_{D1} \cdot K_{D2} \cdot K_{D3} \cdot K_{D4}}{K_{E1} \cdot K_{E2} \cdot K_{E3} \cdot K_{E4}} \cdot \frac{\beta_{Y-DTPA-P.}}{\beta_{Y-EDTA}} \cdot \frac{[DTPA-P.]}{[EDTA]} \cdot A$$

$$A = \frac{1 + \frac{K_{E1}}{[H^+]} + \frac{K_{E1} \cdot K_{E2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{E1} \cdot K_{E2} \cdot K_{E3}}{[H^+]^3} + \frac{K_{E1} \cdot K_{E2} \cdot K_{E3} \cdot K_{E4}}{[H^+]^4}}{1 + \frac{K_{D1}}{[H^+]} + \frac{K_{D1} \cdot K_{D2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{D1} \cdot K_{D2} \cdot K_{D3}}{[H^+]^3} + \frac{K_{D1} \cdot K_{D2} \cdot K_{D3} \cdot K_{D4}}{[H^+]^4}}$$

K_{D1-4} = Säuredissoziationskonstanten des DTPA-Peptides; K_{E1-4} = Säuredissoziationskonstanten des EDTA; $[H^+]$ = Konzentration der Protonen in der Lösung; $[DTPA-P.]$, $[EDTA]$: Gesamtkonzentration der eingesetzten Liganden

Bei der Gegenüberstellung der Meßpunkte und der nach Gleichung (43) berechneten Werte wurden zur Vereinfachung die tabellierten Säuredissoziationskonstanten des EDTA (K_{E1-4}) (Tabelle 5.14. [91]) eingesetzt. Zur Minimierung der Iterationsschritte wurden für die Konstanten K_{D1-4} Schätzwerte (K_{D1} : 10^{-2} ; K_{D2} : 10^{-4} ; K_{D3} : $10^{-6.5}$; K_{D4} : 10^{-10}) vorgegeben, die mit den erwarteten K_s -Werten (Tabelle 5.11.) vergleichbar waren. Der theoretische Kurvenverlauf, beschrieben durch den Ausdruck A in Gleichung (43), wurde durch Variation der Konstanten K_{D1-4} mit dem durch die Meßpunkte vorgegebenen Kurvenverlauf in Übereinstimmung gebracht. Die Variation erfolgte bis zur iterativen Minimierung der Divergenz zwischen theoretischem und realem Kurvenverlauf.

Die Ergebnisse der Verteilung der Yttrium-Komplexe in der Ligandenverdrängungsreaktion zwischen DTPA-Phe-Trp / EDTA und DTPA-Phe-Tyr-NH₂ / EDTA in Abhängigkeit vom pH-Wert sind in den Abbildungen 5.20. und 5.21. dargestellt.

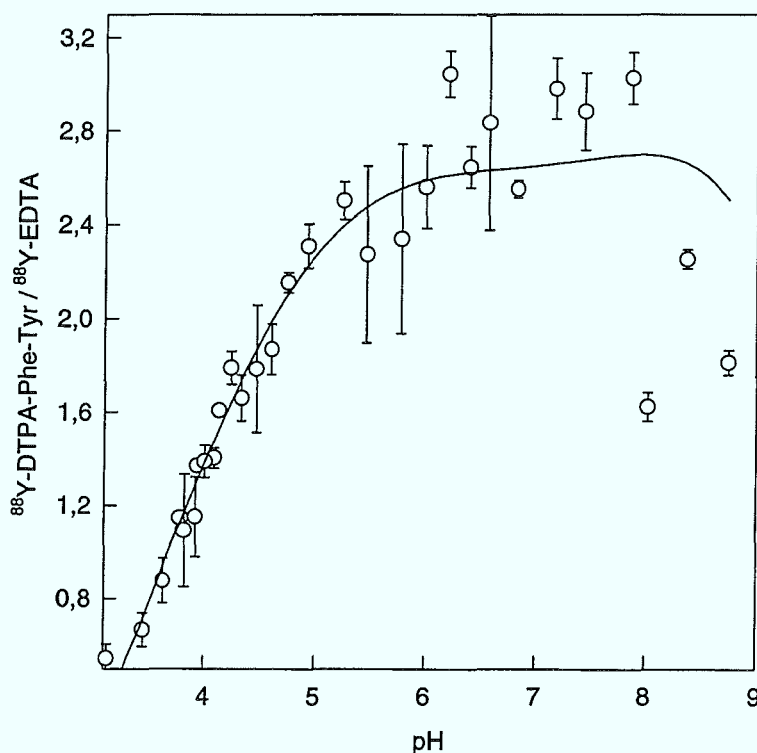


Abb.5.20.
Komplexverhältnisse ^{88}Y -DTPA-Phe-Tyr-NH₂ / ^{88}Y -EDTA vs. pH.
Der Kurvenverlauf wurde nach Gleichung (43) berechnet
Vorgaben: $\text{p}K_{E1-4}$ (EDTA): 2.00; 2.68; 6.11; 10.17
[DTPA-Phe-Tyr]: 0.765 mM/L
[EDTA]: 3.386 mM/L;
25°C; 27 ml

Die eingezeichneten Fehlerbreiten (s) wurden durch Wichtung ($1/s^2$) in der Regression berücksichtigt.

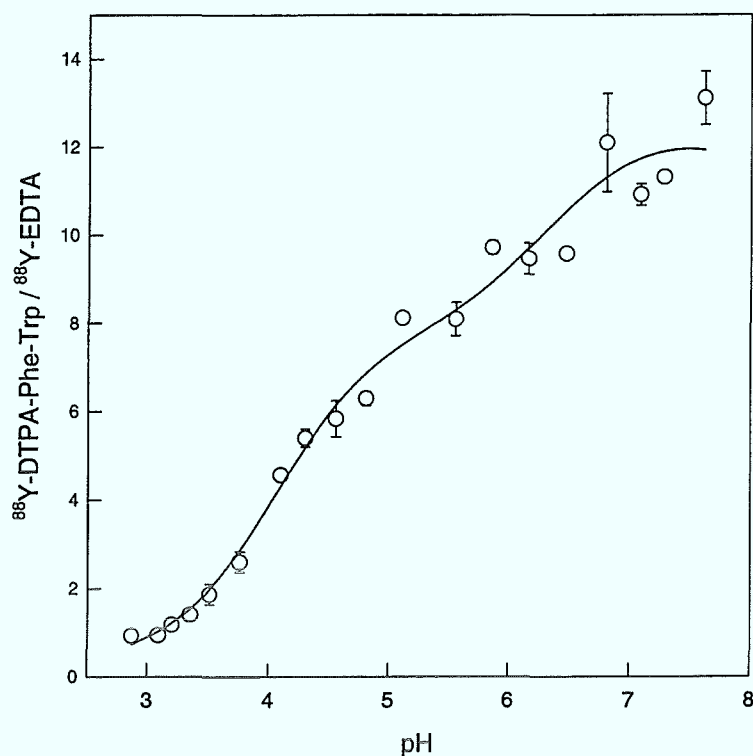


Abb.5.21.

Komplexverhältnisse $^{88}\text{Y-DTPA-Phe-Tyr-NH}_2 / ^{88}\text{Y-EDTA}$ vs. pH. Der Kurvenverlauf wurde nach Gleichung (43) berechnet
Vorgaben: $\text{pK}_{\text{E1-4}}(\text{EDTA})$: 2.00; 2.68; 6.11; 10.17
[DTPA-Phe-Tyr]: 1.0125 mM/L;
[EDTA]: 2.9572 mM/L; 25°C; 27 ml

Entsprechend den Ansätzen im DTPA-Phe-Gly-Gly- / EDTA-System ließen sich die gemessenen Datenpunkte iterativ an die Gleichung (43) anpassen. In die Iteration gingen die K_s -Literaturwerte des EDTA ein. Die K_s -Werte, einerseits als Resultat der Datenauswertung mit Gleichung (43) und andererseits bestimmt durch Titration, sind für das Y-DTPA-Phe-Tyr- NH_2 - und Y-DTPA-Phe-Trp-System in Tabelle 5.15. gegenübergestellt.

Tabelle 5.15. Vergleich der pK_s -Werte des DTPA-Phe-Tyr und DTPA-Phe-Trp aus der Ligandenverdrängungsreaktion (L.V.) mit den Titrationsdaten aus Abschnitt 5.2.1.

Ligand	pK_{s1}	pK_{s2}	pK_{s3}	pK_{s4}
EDTA	2.00	2.68	6.11	10.17
DTPA-Phe-Tyr- NH_2 (L.V.)	1.80 ± 0.20	3.96 ± 0.15	6.15 ± 0.40	9.74 ± 0.35
DTPA-Phe-Tyr- NH_2 (Titration)	2.58 ± 0.10	3.83 ± 0.03	6.33 ± 0.04	9.87 ± 0.03
DTPA-Phe-Trp (L.V.)	1.80 ± 0.20	4.05 ± 0.45	6.32 ± 0.40	9.07 ± 0.28
DTPA-Phe-Trp (Titration)	2.91 ± 0.03	4.52 ± 0.06	6.71 ± 0.03	10.46 ± 0.03

Gute Übereinstimmung wurde für die K_s -Werte gefunden, die im tatsächlich gemessenen pH-Bereich lagen (pH 3 ~ 9), d.h. K_{s2} und K_{s3} . Die Datenanpassung im Bereich hoher (K_{s4})

und sehr niedriger (K_{s1}) pH-Werte war naturgemäß mit größeren Fehlern behaftet. Da dieses sowohl für die Iteration der Titrations- als auch für die Ligandenverdrängungsreaktions-Daten galt, war die Beurteilung des korrekten Wertes schwierig.

Nach Gleichung (42) sollten die Datenpunkte im $\log([Y\text{-DTPA-Peptid}]/[Y\text{-EDTA}]) + 18.08$ vs. $\log([DTPA^{4-}]/[EDTA^{4-}])$ -Diagramm unter Verwendung der Säuredissoziationskonstanten der DTPA-Peptide auf einer Geraden mit der Steigung 1 liegen. Für die Meßreihen Y-DTPA-Phe-Tyr-NH₂ und Y-DTPA-Phe-Trp sind die Auftragungen in den Abbildungen 5.22. und 5.23. dargestellt. Zur Berechnung des Ligandenverhältnisses wurden die Säuredissoziationskonstanten aus der Berechnung der Gleichung (43) verwendet.

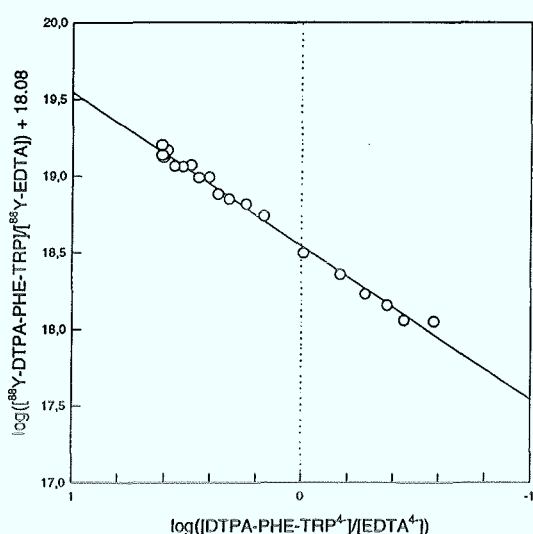


Abb 5.22.
Bestimmung der Stabilitätskonstante für Y-DTPA-Phe-Trp aus der Ligandenverdrängungsreaktion nach Gleichung (42).

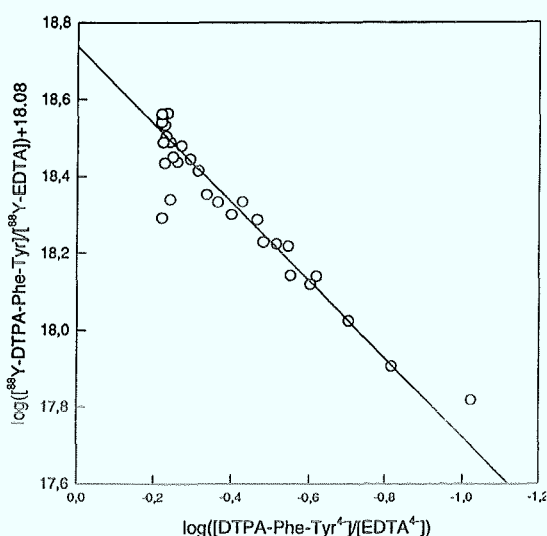


Abb.5.23.
Bestimmung der Stabilitätskonstante für Y-DTPA-Phe-Tyr-NH₂ aus der Ligandenverdrängungsreaktion nach Gleichung (42).

Aus den Abb.5.22. und Abb.5.23. konnten die Stabilitätskonstanten für Y-DTPA-Phe-Trp ($\log \beta = 18.54 \pm 0.1$) und Y-DTPA-Phe-Tyr-NH₂ ($\log \beta = 18.74 \pm 0.1$) bestimmt werden. Die einzelnen Säuredissoziationskonstanten konnten dabei im Gang der Ligandenverdrängungsreaktion ermittelt werden. Die pK_s -Werte außerhalb des Meßbereiches wurden dabei über die Gleichung (43) angenähert und liefern aus diesem Grunde nur unzureichend genaue Werte. Dieser Umstand wird in Abb. 5.23. durch Abweichungen bei sehr niedrigen als auch sehr hohen Konzentrationsverhältnissen der deprotonierten Liganden deutlich.

Zusammenfassend waren die Anzahl der Datenpunkte sowie der Meßbereich maßgebende Faktoren bei der exakten Bestimmung der Säuredissoziationskonstanten. Jede Abweichung von den tatsächlichen K_s -Werten wirkte sich direkt durch Verschiebung der Regressionsgeraden im $\log([Y\text{-DTPA-Peptid}]/[Y\text{-EDTA}]) + 18.08$ vs. $\log([DTPA\text{-Peptid}^{4-}]/[EDTA^{4-}])$

-Diagramm aus, wodurch die Stabilitätskonstante zwangsläufig auch dann mit großen Fehlern behaftet war, wenn die Regressionsgerade eine exakte Steigung von 1 lieferte. Diese Steigung resultierte aus der Anpassung von Gleichung (43) an die Meßergebnisse und mußte in der Regression 1 ergeben, auch wenn die Einzeldaten relativ stark von der Geraden abwichen.

Die Gesamt-Stabilitätskonstanten, die aus den vorangegangenen Versuchen bestimmt wurden, standen weitestgehend im guten Einklang mit ähnlichen Me-DTPA-Systemen [107]. In Tabelle 5.16. sind einige dieser Systeme gegenübergestellt.

Tabelle 5.16. Vergleich der Gesamt-Stabilitätskonstanten von Y-DTPA-Systemen mit Gd-DTPA-Systemen

Y-DTPA-Systeme	log β	Gd-DTPA-Systeme [107]	log β
Y-DTPA	22.05	Gd-DTPA	22.46
Y-DTPA-Phe-Gly-Gly	19.7	Gd-DTPA-PA	19.68
Y-DTPA-Phe-Trp	18.54	Gd-DTPA-PE	18.91
Y-DTPA-Phe-Tyr	18.74	Gd-([DTPA] ₁₁)-BSA	18.80 ^a
		Gd-([DTPA] ₁₅)-IgG	18.87 ^a

^a: Für die Berechnung wurden die Säuredissoziationskonstanten des DTPA-PA

(Tabelle 5.10.) verwendet.

(Gd-DTPA-PA: Gd-DTPA-Propylamid; Gd-DTPA-PE: Gd-DTPA-Propylester;

Gd-([DTPA]₁₁)-BSA: Gd-DTPA-Rinderserum-Albumin;

Gd-([DTPA]₁₅)-IgG: Gd-DTPA-Immunoglobulin G)

Tendenziell zeigten sowohl das Y-DTPA-System als auch das Gd-DTPA-System eine Reduzierung der Komplexstabilitätskonstante durch Blockierung einer Carboxyl-Funktion des DTPA. Die Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten der Gd-DTPA-Systeme erfolgte spektrophotometrisch, wobei die Säuredissoziationskonstanten des DTPA-PA verwendet wurden. Dieser Ansatz entspricht der in Kapitel 3.2.2. dargestellten Methodik, Gesamt-Stabilitätskonstanten von Komplexsystemen, die nicht direkten Messungen zugänglich sind, über „meßbare“ Derivate zu berechnen.

5.2.7. Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstanten (β_n) von Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid

Bei der Entwicklung von Yttrium-Komplexen hoher Stabilität in Hinblick auf mögliche Anwendungen von ⁹⁰Y-Radiotherapeutika war die Kenntnis der Gesamt-Stabilitätskonstante zusammen mit Aspekten der Komplexierung zentraler Bestandteil zur Abschätzung der in vivo-Stabilität der Komplexe. Für viele nuklearmedizinische Zwecke erfolgte diese Cha-

rakterisierung lediglich empirisch, jedoch wäre schon aus dosimetrischen und ethischen Gründen grundsätzlich die vorherige exakte physikochemische Messung vorzuziehen.

Als finale Anwendung der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Methode sollte dazu beispielhaft die Gesamt-Stabilitätskonstante (β_n) von Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid ([Y]-SDZ 215-811) bestimmt werden. Eine Kombination der kinetischen Daten mit der Stabilitätskonstante des Komplexes sollte Entscheidungen über die Anwendbarkeit dieses Systems ermöglichen.

Die Säuredissoziationskonstanten waren nicht bekannt, sollten sich aber im Verlauf der Untersuchungen berechnen lassen und letztendlich die Gesamt-Stabilitätskonstante des Komplexes liefern. Da die Bestimmung der 1. und 4. pK_s-Stufe bisher nur unzureichend erfolgte, sollte die Anzahl der Datenpunkte gerade in diesen pH-Bereich optimiert werden.

In Abbildung 5.24. sind die Ergebnisse aus zwei Versuchsreihen zusammengefaßt. Die Daten wurden für Ausgangskonzentrationsverhältnisse der Liganden von 1 / 14.8 und 1 / 3.35 bestimmt. Die Datenpunkte des ersten Ligandenverhältnis (1/14.8) wurden durch Normierung den Werten der zweiten Versuchsreihe angepaßt.

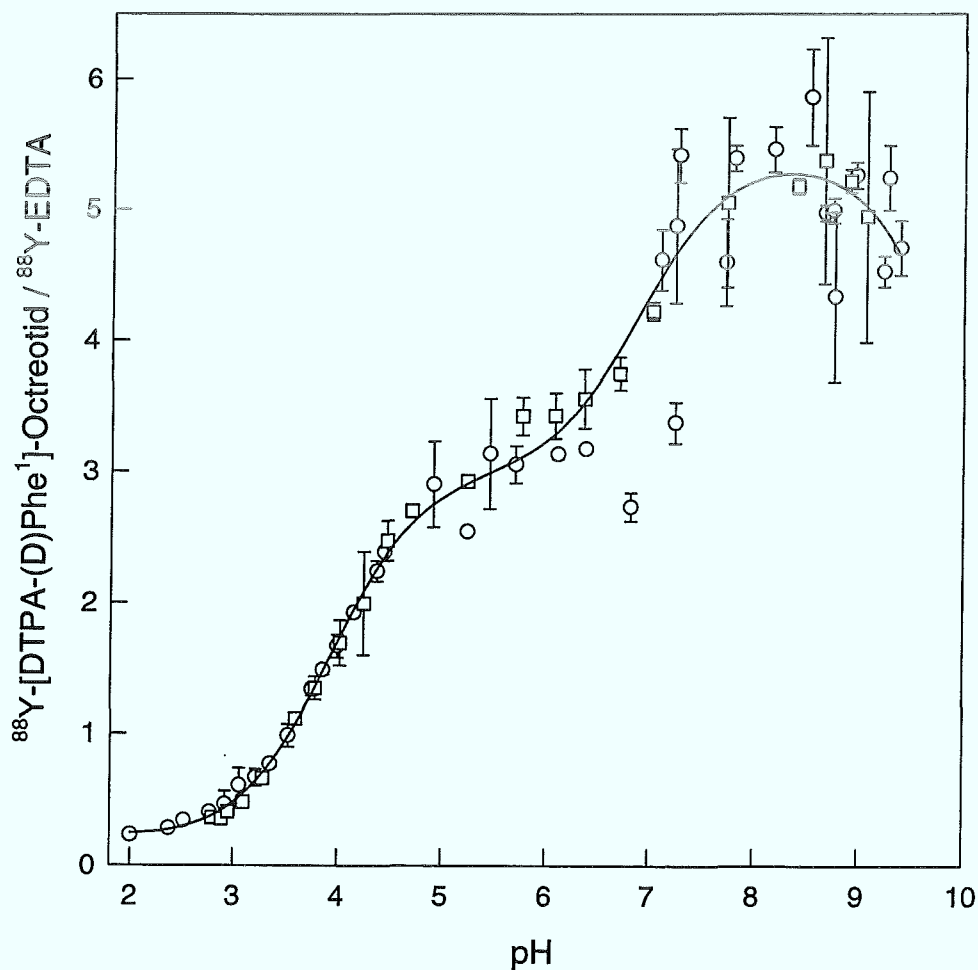


Abb. 5.24. Komplexverhältnisse $^{88}\text{Y}\text{-[DTPA-(D)Phe}^1\text{]-Octreotid} / ^{88}\text{Y-EDTA}$ vs. pH
[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid: 0.278 mM/L; [EDTA]: 0.931 mM/L; 25°C; 27 ml 0.1 N KCl

Die Iteration der Datenpunkte an den H^+ -abhängigen Term der Gleichung (43) erfolgte durch Variation aller beteiligten Protonierungsstufen der beiden Konkurrenzliganden, d.h. die Anpassung der Daten erfolgte nicht an die tabellierten pK_s -Werte des EDTA.

Abbildung 5.24. verdeutlichte die gute Korrelation zwischen Meßwerten und der theoretischen Beschreibung der Komplexgleichgewichte durch Gleichung (43). Die Fehlerbreiten der Meßwerte wurden durch Wichtung in der Iteration berücksichtigt. In Bereichen niedriger pH-Werte (pH 2-5) konnten die Wendepunkte in Abbildung 5.24. und damit die jeweils ersten beiden K_s -Werte der beteiligten Liganden mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Die in Abbildung 5.24. dargestellten Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils drei Einzelmessungen. Trotz der großen Datenfülle wirkte sich die relativ große Standardabweichungen in höheren pH-Bereichen direkt auf die Genauigkeit der K_s -Werte nach Gleichung (43) aus. Die Ergebnisse der pK_s -Bestimmung für [DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid und EDTA sind in Tabelle 5.17. zusammengefaßt. Ergänzend wurden die tabellierten pK_s -Werte des EDTA gegenübergestellt.

Tabelle 5.17. Ergebnis der pK_s -Wert-Berechnung für [DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid und EDTA aus Abb.4.26

^a: pK_s -Werte aus A.E.Martell; Stability Constants of metal-ion complexes [91]

	pK_{s1}	pK_{s2}	pK_{s3}	pK_{s4}
[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid	1.89 ± 0.1	3.92 ± 0.08	6.90 ± 0.03	10.07 ± 0.02
EDTA	2.00 ± 0.1	2.74 ± 0.08	6.64 ± 0.03	10.80 ± 0.02
EDTA ^a	2.00 ± 0.1	2.68 ± 0.1	6.11 ± 0.02	10.17 ± 0.02

Ein Vergleich der berechneten pK_s -Werte des EDTA mit den Literaturdaten verdeutlichte die gute Übereinstimmung der pK_{s1} und pK_{s2} . Die Abweichung der Säuredissoziationskonstanten pK_{s3} und pK_{s4} des EDTA von den tabellierten Werten mußte in Hinblick auf die größeren Fehler im höheren pH-Bereich akzeptiert werden. Grundsätzlich zeigte sich aber, daß sich Gleichung (41) direkt auf das Lösungsgleichgewicht anwenden ließ und somit die Möglichkeit bot, pK_s -Werte auf diese Art zu bestimmen.

Durch Einsetzen der Werte in Gleichung (41) konnte im Folgenden die Stabilitätskonstante von Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid analog den Untersuchungen in Abschnitt 5.3.6. bestimmt werden. Zur Berechnung des Konzentrationsverhältnisses $[[DTPA-(D)Phe^1]-Octreotid^4]/[EDTA^4]$ wurden die über Gleichung (43) bestimmten pK_s -Werte der beiden Liganden verwendet.

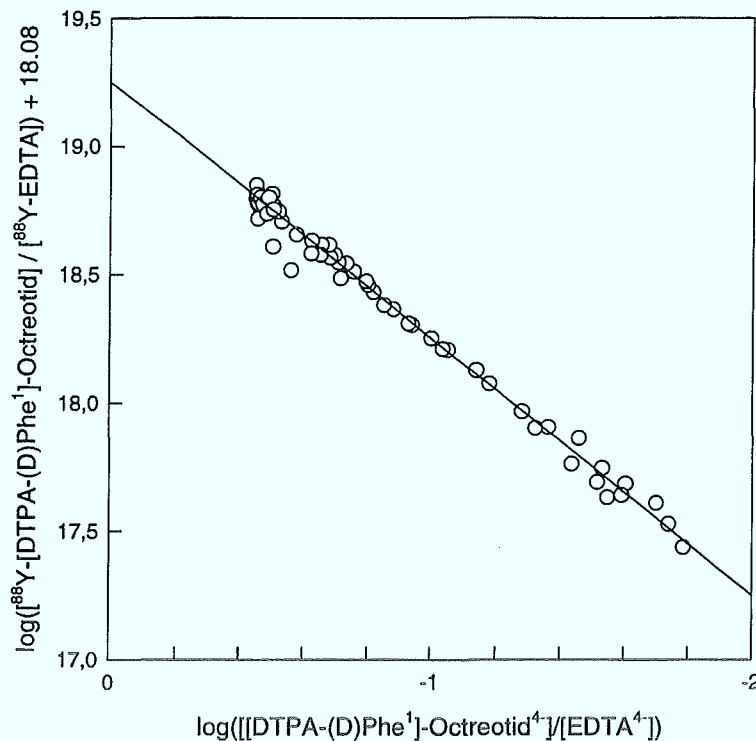


Abb.5.25.
Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstante von Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid im $\log([^{88}\text{Y}-[\text{DTPA}-(\text{D})\text{Phe}^1]\text{-Octreotid}] / [^{88}\text{Y-EDTA}]) + 18.08$ vs. $\log([[\text{DTPA}-(\text{D})\text{Phe}^1]\text{-Octreotid}^4] / [\text{EDTA}^4])$ -Diagramm aus den Daten in Abb.5.24.

Die Regressionsgerade in Abb.5.25. lieferte einen Y-Achsenabschnitt von 19.25 ± 0.05 . Aufgrund der großen Anzahl der Datenpunkte und der guten Anpassung der Gleichung (43) an die Meßpunkte konnte dieser Wert als gesichert angesehen werden, obwohl die experimentell ermittelten und in die Berechnung nach Gleichung (43) eingeführten pK_s -Werte des EDTA (Tab.5.15) von den Literaturwerten etwas abwichen. Eine Bewertung des Gleichgewichtes mittels Gleichung (43) alternativ unter Verwendung der pK_s -Literaturwerte des EDTA lieferte nur eine schlechtere Kurvenanpassung und bedingte damit stärker fehlerbehaftete pK_s -Werte des [DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid.

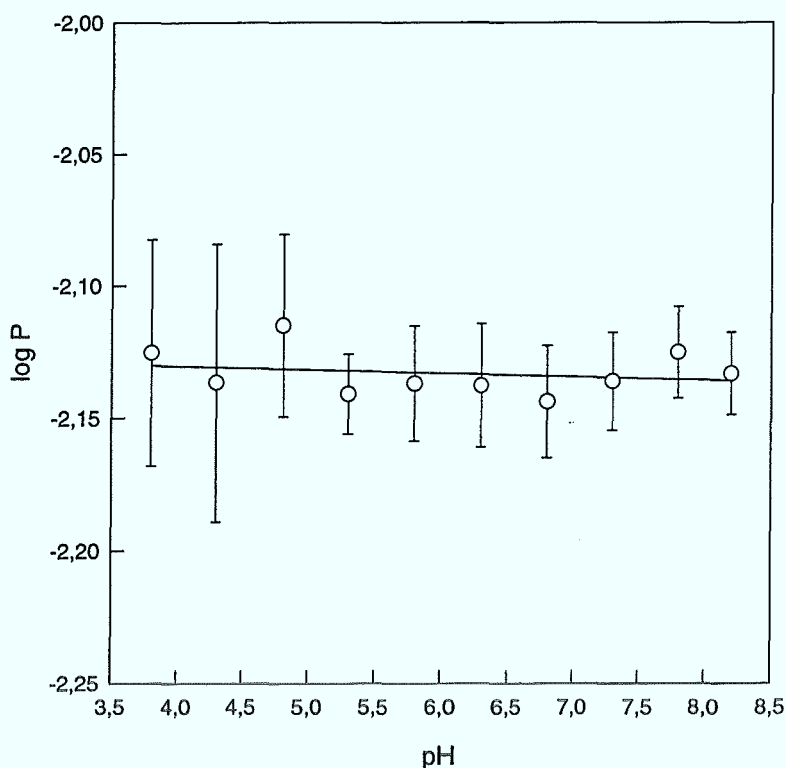
5.3. Bestimmung der Lipophilie von $^{88}\text{Y}-[\text{DTPA}-(\text{D})\text{Phe}^1]\text{-Octreotid}$

Neben den physikochemischen Parametern der ^{88}Y -DTPA-Peptid-Systeme ist in Hinblick auf medizinische Anwendungen die Lipophilie der Substanzen von besonderem Interesse [135]. Für $^{88}\text{Y}-[\text{DTPA}-(\text{D})\text{Phe}^1]\text{-Octreotid}$ mußte im Vergleich zu anderen Octreotid-Derivaten eine hohe Hydrophilie, d.h. ein niedriger Verteilungskoeffizient ($\log P$) im Octanol/Wasser-System erwartet werden [cf. 136,137].

Abb. 5.26.

Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten ($\log P$) von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid vom pH-Wert

(n-Octanol; 0.1 N Acetat-Puffer (pH 3.8-5.8); 0.1 M Phosphat-Puffer (pH: 5.3-8.3) RT; n=5)



Die Struktur des Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid-Komplexes ließ je nach Komplexstruktur unterschiedliche Ladungsanteile zu. Interessant in diesem Zusammenhang war das Verhalten des Komplexes bei Variation des pH-Wertes. In Abb.5.26. ist der Verteilungskoeffizient von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid für verschiedene pH-Werte aufgetragen.

Die Lipophilie von ^{88}Y -DTPA-Octreotid erwies sich als unabhängig vom pH-Wert der Lösung. Dieses experimentelle Verhalten ließ Rückschlüsse auf die Komplexstruktur zu. Demnach sollten in dem betrachteten pH-Bereich keine drastischen konformativen oder Ladungsänderungen auftreten bzw. diese intramolekular kompensiert werden. Der Aminstickstoff der Lysin-Funktion im Octreotid mit einem pK_s -Wert > 9.5 sollte erst bei höheren pH-Werten deprotoniert werden und dadurch zu einer gesteigerten Lipophilie von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid führen. Eine eventuelle Änderung der Koordinationssphäre des Metallions (z.B. KZ 7 $\rightarrow$ KZ 6) im betrachteten pH-Bereich konnte aus Unkenntnis über dadurch auftretende Ladungsverschiebungen nicht geklärt werden.

5.4. Zusammenfassende Beurteilung der DTPA-Peptid-Systeme

Komplexierungskinetik als auch thermodynamische Stabilität von Yttrium-Komplexen sind gerade in Hinblick auf die nuklearmedizinisch nutzbaren Isotope ^{86}Y und ^{90}Y von besonderem Interesse. Die Bestimmung dieser physikochemischen Größen von Yttrium-

Komplexen in wäßrigem Medium unter Einfluß verschiedener Parameter sollte eine Abschätzung ihres in vivo-Verhaltens ermöglichen.

Untersuchungen über die Isotopenaustauschreaktion von ^{88}Y -DTPA-Peptiden mit Y^{3+} am Beispiel des Y-DTPA-Phe-Gly-Gly (Abschnitt 5.1.3.1.-5.1.3.6.) lieferten durch die Betrachtung der an der Reaktion beteiligten Spezies einen Ausdruck für die Kinetik dieser Reaktion, die das Verhalten im betrachteten pH-Bereich annähernd beschrieb.

$$(31) \quad R = k_H \cdot [\text{Y} - \text{DTPA} - \text{Phe} - \text{Gly} - \text{Gly}] \cdot [\text{H}^+]^{-1.7}$$

Die Reaktion erwies sich dabei unabhängig von der Y^{3+} -Konzentration, zeigte jedoch ein stark pH-abhängiges Verhalten. Aus den kritischen Betrachtungen der jeweiligen Reaktionsbedingungen resultierte in allen Fällen annähernd die Gleichung (31). Ein Vergleich mit ähnlichen Komplexsystemen ($\text{Ni-CDTA} + \text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu-CDTA} + \text{Ni}^{2+}$ (Kapitel 5.2.3.3.)) deutete darauf hin, daß Gleichung (30) den protoneninduzierten Teilschritt zur Auflösung des Y-DTPA-Peptid-Komplexes innerhalb der Isotopenaustauschreaktion beschrieb. Da die Bildung des Y-Komplexes keinen Einfluß auf die Isotopenaustauschgeschwindigkeit hatte und somit das eintretende Metall-Kation substituierbar wäre, sollte Gleichung (31) allgemein für Dekomplexierungs- bzw. Umkomplexierungsreaktionen von Y-DTPA-Peptid-Komplexen gelten.

Aus den experimentellen Daten konnte für die Geschwindigkeitskonstante k ein Wert von $1.6 \cdot 10^4 \text{ (M}^{-1.7}\text{s}^{-1}\text{)}$ bestimmt werden. Aus der Temperaturabhängigkeit der Isotopenaustauschreaktion wurde eine Aktivierungsenergie von 48 kJ/M berechnet. Legt man für die Isotopenaustauschreaktion die Dekomplexierung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zugrunde, so läßt sich die Reaktion zum Übergangszustand hypothetisch formulieren als:



Mit den berechneten Säuredissoziationskonstanten des DTPA-Phe-Gly-Gly und der Gesamt-Stabilitätskonstante ließe sich die freie Reaktionsenthalpie für diese Reaktion mit $\sim 30 \text{ kJ/M}$ abschätzen. Da die Gesamtreaktion sicherlich komplexer war als die skizzierte Reaktion (Gleichung (44)), würden in die Aktivierungsenergie weitere energieabhängige Terme einfließen. Die Zahlenwerte verdeutlichten jedoch, daß die Energie der Dekomplexierung bei hoher Gesamt-Stabilitätskonstante ($\log \beta_{\text{DTPA-Phe-Gly-Gly}} \sim 19.5 = \sim 110 \text{ kJ/M}$) teilweise durch die Protonierung des Liganden kompensiert werden könnte.

Da diese Eigenschaften der Reaktion unabhängig von der Art des gekoppelten Peptides waren, sollte der Reaktionsverlauf der Dekomplexierung allgemein für Y-DTPA-Systeme gelten, in denen eine Carboxyl-Funktion des DTPA in eine Amid-Gruppe umgewandelt wurde.

Für die betrachteten Y-DTPA-Peptide wurden vergleichbare Gesamt-Stabilitäts-konstanten bestimmt (Tab.5.18), wobei durch die Verwendung geringer Metallkonzentrationen und hier in der Form trägerfreien ^{88}Y die Berechnung ohne Kenntnis der Säuredissoziationskonstanten der DTPA-Peptide erfolgen konnte.

Die Gegenüberstellung der Literatur-Daten von Gadolinium-DTPA-Komplexen [107] und den hier berechneten Gesamt-Stabilitätskonstanten der Yttrium-DTPA-Komplexe zeigte, daß die neue Methodik tendenziell vergleichbare Ergebnisse lieferte. Zum Vergleich sind die Gesamt-Stabilitätskonstanten der Gd-DTPA-Systeme sowie die Differenz zu der Gesamt-Stabilitätskonstante des Gd-DTPA ebenfalls in Tabelle 5.18. aufgeführt.

Tabelle 5.18. Gesamt-Stabilitätskonstanten der untersuchten DTPA-Peptide im Vergleich zu Gd-DTPA-Systemen [107]

Y-DTPA-Peptid	$\log \beta$	$\Delta (\log \beta - \log \beta_{\text{DTPA}})$
Y-DTPA	22.05	0
Y-DTPA-Phe-Gly-Gly	19.7 ± 0.3	- 2.35
Y-DTPA-Phe-Tyr-NH ₂	18.74 ± 0.1	- 3.31
Y-DTPA-Phe-Trp	18.54 ± 0.1	- 3.51
Y-[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid	19.25 ± 0.05	- 2.80
Gd-DTPA	22.26	0
Gd-DTPA-PA	19.68	- 2.58
Gd-DTPA-PE	18.91	- 3.35
Gd-([DTPA] ₁₁)-BSA	18.80	-3.46
Gd-([DTPA] ₁₅)-IgG	18.87	-3.39

Die gute Korrelation zwischen den Gd-DTPA-Systemen, deren $\log \beta$ -Werte spektrophotometrisch bestimmt wurden, und den Y-DTPA-Systemen, deren Konstanten mit der beschriebenen neuen Methodik bestimmt wurden, machte deutlich, daß Gesamt-Stabilitätskonstanten auch in Systemen berechenbar sind, in denen die Säuredissoziationskonstanten der Komplexbildner nicht vorher meßbar waren. Die für die Gd-DTPA-Systeme durchgeführten Derivatisierungen des Komplexbildners zur Bestimmung der pK_s -Werte dieser Derivate, die dann als Näherungswerte für die Berechnung der Stabilitätskonstante der Gd-DTPA-Protein-Systeme verwendet wurden, war nicht mehr notwendig. Da in diesem neuen Ansatz keine Näherungen gemacht werden mußten, sollten die darüber bestimmten Gesamt-Stabilitätskonstanten die exakteren Werte widerspiegeln.

Die größere Streuung der Einzeldaten bei höheren pH-Werten in den Stabilitätsuntersuchungen mußte als Effekt der langsameren Komplexbildungskinetik in diesen Bereichen gewertet werden. Da naturgemäß ein Gleichgewicht nur reproduzierbar gemessen werden kann wenn dieses zeitunabhängig ist, differierten die Meßwerte zwangsläufig in den Fällen,

in denen das Gleichgewicht nicht völlig eingestellt war. Aufgrund der pH-abhängigen Kinetik und dadurch bedingten langsameren Gleichgewichtseinstellung wurden die Zeitintervalle zwischen den Messungen mit steigendem pH-Wert vergrößert, um ein zeitlich konstantes Gleichgewicht zu gewährleisten. Da für die Kinetik eine Abhängigkeit von $[H^+]^{1.7}$ gemessen wurde, konnte den Anforderungen an die Gleichgewichtseinstellung nur bedingt Rechnung getragen werden.

In Hinblick auf medizinische Anwendungen sollte die Stabilität der Yttrium-Komplexe genügend hoch sein, um über den Zeitraum der Anwendung einen stabilen Komplex gewährleisten zu können. Betrachtet man die Kinetik der Dekomplexierung in vivo, d.h. bei pH 7.4, so konnte eine sehr geringe Radioyttrium-Freisetzung aus vergleichbaren Komplexen erwartet werden. In vitro-Stabilitätsuntersuchungen von Y-90-markierten Proteinen in Seren zeigten tatsächlich nur eine sehr langsame Freisetzung des Y-90 über mehrere Tage [cf. 117,138]. In vivo-Untersuchungen an Tiermodellen lieferten jedoch konträre Ergebnisse. Zum einen könnte dieses Verhalten unter Berücksichtigung der stark pH-abhängigen Dekomplexierungskinetik durch physiologisch bedingte pH-Wert-Senkungen, die in unterschiedlichen Kompartimenten und hier vor allem im Tumorgewebe nachgewiesen wurden, erklärt werden. Zum anderen sind Dekomplexierungskinetiken Teilreaktionen statischer Gleichgewichte. In vivo müssen jedoch alle Einzelkomponenten dieser Systeme als Bestandteile vieler paralleler, dynamischer Gleichgewichte betrachtet werden. Die Richtung und Kinetik einer Reaktion wäre aufgrund der Wechselwirkungen aller simultanen Reaktionen nicht mit der in isolierten Systemen identisch. Dieses könnte in letzter Konsequenz zur Destabilisierung des Komplexes führen, wenn eine langsame Dekomplexierungskinetik, die unter in vitro-Bedingungen nur eine geringe Freisetzung des Metalles vorhersagt, als Teil der Gesamtreaktionen eine untergeordnete Rolle spielt.

5.5. Untersuchungen am DFO-B-Linker-Peptid-System

Die Beobachtung, daß in den Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen gebildete Sideramine und Sideromycine, Metalle, und hier vor allem Eisen, an Hydroxamat-Gruppen gebunden sind, führte zum gesteigerten Interesse an Hydroxamat-Komplexen [cf. 139,140]. Hauptvertreter dieser Verbindungsklasse ist das Desferrioxamin B (Desferal; DFO-B) (Abb.5.27). Die Untersuchung des Fe-DFO-B-Komplexes lieferte Stabilitätskonstanten von $\log \beta_n \sim 30$, die somit um Größenordnungen über den als stabil zu betrachteten DTPA-Systemen lagen [141]. Die Analogie zwischen Eisen- und Gallium-Komplexen ließ eine Darstellung von stabilen Ga-DFO-B-Komplexen erwarten. Da Gallium-68 als Positronen-Emitter nuklearmedizinisch relevant ist, wurden die Untersuchungen an geeigneten Ga-Komplexsystemen in der jüngsten Vergangenheit stark voran getrieben [cf. 142,143,144]. Im Gegensatz zum DTPA-System ist die Kopplung des DFO-B nur über die Amin-Funktion (Abb.5.27.) möglich.

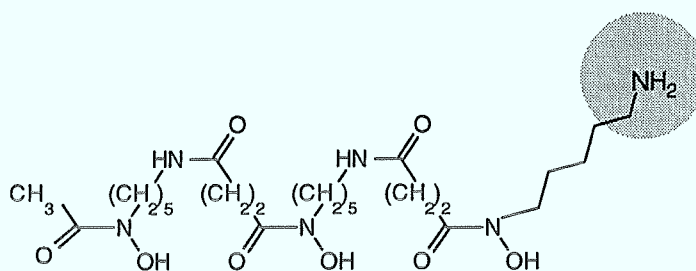


Abb.5.27. Desferrioxamin B (DFO-B)

Die Kopplung von DFO-B an Peptide oder Proteine kann nur dann unter Ausbildung von Amidbindungen erfolgen, wenn entweder direkt Carboxyl-Gruppen an den Zielsubstanzen zur Verfügung stehen oder Brückenmoleküle mit entsprechenden funktionellen Gruppen eingefügt werden. Das Konzept der Einführung von „Linkern“ bot in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, strukturelle Änderung gezielt metabolischen bzw. pharmakologischen Gegebenheiten anzupassen [cf. 83,84].

Voraussetzung für diesen Ansatz war eine günstige Reaktionsführung bei der Einführung des DFO-B als auch eine genügend hohe Stabilität des in diesem Falle gebildeten Ga-DFO-B-Komplexes nach der Kopplung. Die Kopplung von DFO-B durch Ausbildung einer Amidbindungen mußte, wie in Abschnitt 5.1. für das DTPA-System beschrieben, über aktivierte Carbonsäuren erfolgen. Durch die cross-linking-Untersuchungen an Proteinen standen eine Anzahl von homobifunktionellen als auch heterobifunktionellen Verbindungen zur Verfügung [cf.145]. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde das Reaktionsverhalten der Disuccinimidylester verschiedener Bicarbonsäuren untersucht. Die Reaktionsführung wurde so gewählt, daß sich die Ergebnisse an Modell-Peptiden direkt auf die Anforderungen des Zielsystems DFO-B/Octreotid übertragen ließen.

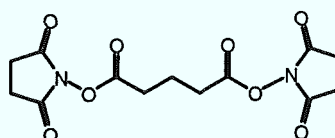
5.5.1. *Synthese von DFO-B-gekoppelten Modell-Peptiden mit Disuccinimidylestern als variable Linker*

Vorbereitende Untersuchungen wurden an kleinen Modell-Peptiden mit N-terminaler Phenylalanin-Gruppe durchgeführt. Für die Synthese wurden verwendet:

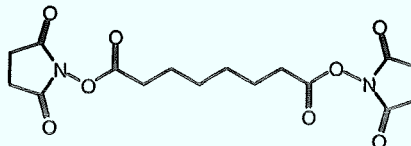
Phe-Trp; Phe-Tyr-NH₂; Phe-His-OMe; Phe-Gly-Gly; Phe-Gly-Phe-Gly; Phe-Ser-Val.

Als Linker wurden 4 verschiedene homobifunktionelle Disuccinimidylester verwendet: DSG: Disuccinimidylglutarat [146]; DSS: Disuccinimidylsuberat [147]; EGS: Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat) [148]; DSP: Dithiobis(succinimidylpropionat) [149].

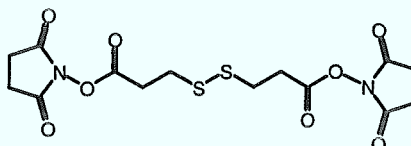
DSG
Disuccinimidylglutarat



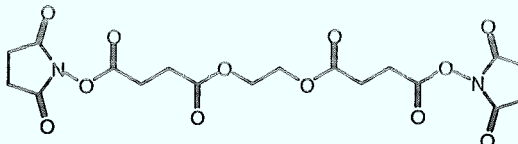
DSS
Disuccinimidylsuberat



DSP
Dithiobis(succinimidylpropionat)



EGS
Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)

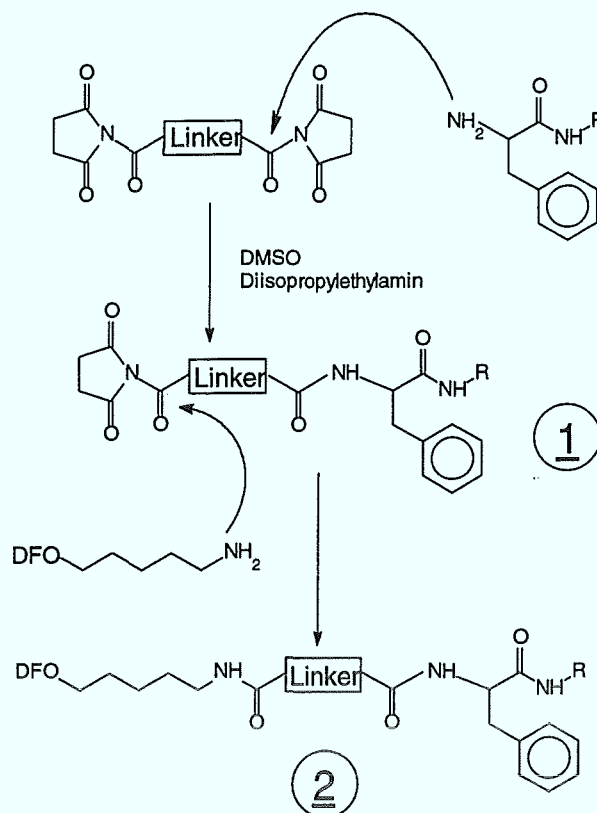


Die Kopplung an DFO-B erfolgte nach Schema 5.4.

Der erste Reaktionsschritt beinhaltete die Reaktion des Amin-Stickstoffs des Phenylalanins mit dem Succinimidylester der Dicarbonsäuren. Die Reaktion wurde in DMSO unter Zusatz von Diisopropylethylamin als Base durchgeführt. Das Zwischenprodukt 1 wurde direkt im Anschluß mit DFO-B umgesetzt (2). (Schema 5.4.)

Aufgrund der Natur der homobifunktionellen Linker war im ersten Reaktionsschritt die Möglichkeit der Bildung von cross-linking-Produkten gegeben. Die Reaktionsführung sollte dabei durch Änderung der Eduktverhältnisse steuerbar sein. Im zweiten Reaktionsschritt konnten anschließend alle reaktionsfähigen Zentren durch einen Überschuß an DFO-B umgesetzt werden. DFO-B wird in dieser Reaktion als DFO-B-Mesylat eingesetzt und bedarf der Hilfsbase zur Deprotonierung der Ammoniumgruppe am DFO-B.

Schema 5.4.
Reaktionsschema zur Kopplung
von DFO-B an Peptide.



5.5.2. Abhängigkeit der Reaktion von Disuccinimidylestern mit Peptiden vom Eduktverhältnis

Der Einfluß der Eduktverhältnisse auf die Reaktionsführung wurde untersucht. Als Modell ist die Reaktion von EGS mit Phe-Trp in Abhängigkeit von den Eduktverhältnissen dargestellt. (Abb.5.28. und Abb.5.29).

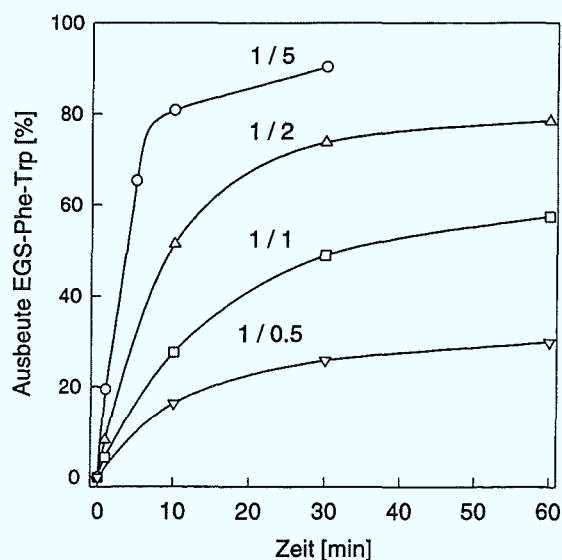


Abb. 5.28.
Kinetik der Reaktion EGS+Phe-Trp für verschiedene Eduktverhältnisse
[Phe-Trp]: $1.5 \cdot 10^{-3}$ M/L; DMSO; RT

Bereits bei einem Eduktverhältnis von EGS / Phe-Trp von 5 / 1 wurden nach 30 min Reaktionszeit Ausbeuten von 90% erreicht (Abb.5.28.).

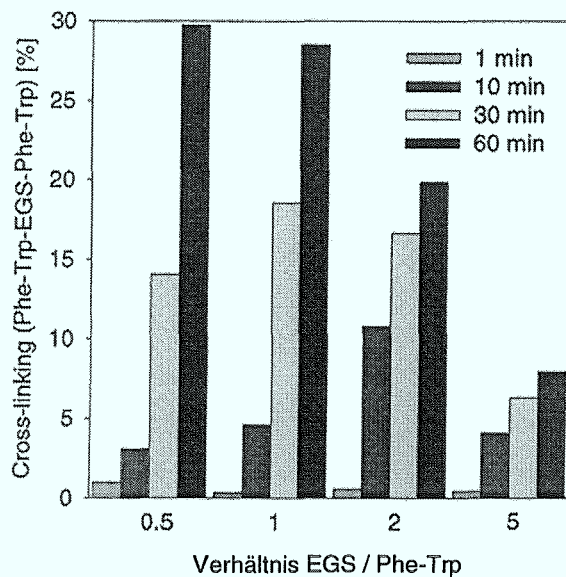


Abb.5.29.

Bildung von cross-linking Produkten im System EGS + Phe-Trp

Der Anteil der cross-linking-Produkte, also [Phe-Trp-EGS-Phe-Trp], wurde bei diesem Verhältnis auf 7%, bezogen auf EGS, reduziert (Abb.5.29). Reaktionen bei niedrigeren Eduktverhältnissen bis hin zu einem zweifachen Überschuß an Phe-Trp (EGS / Phe-Trp: 1 / 0.5) resultierten in einem erwarteten hohen Anteil des nicht erwünschten Nebenproduktes von bis zu 30%.

Die anschließende Umsetzung erfolgte durch Zugabe eines zweifachen Überschusses an DFO-B (bezogen auf EGS), wodurch alle vorhandenen aktivierten Carbonsäuren umgesetzt wurden. Aus der Nebenreaktion ist in diesem Zusammenhang ein Produkt DFO-B-EGS-DFO-B zu erwarten, daß im gleichen Anteil wie das cross-linking-Produkt entsteht. Die Abtrennung des Reaktionsproduktes erfolgte am zweckmäßigsten durch präparative HPLC.

Die Ausbeuten aus den Reaktionen der 6 zur Verfügung stehenden Peptiden mit DSS und DFO sind in Tabelle 5.19. zusammengefaßt. Das Reaktionsverhalten der betrachteten Peptide erwies sich als annähernd gleich. Einzige Ausnahme war in diesem Zusammenhang das Phe-His, das erwartungsgemäß (s. Abschnitt 5.2.) instabile Nebenprodukte durch Reaktion des Histidyl-Restes mit den Succinimidylestern lieferte [150]. Auch in den EGS- bzw. DSG-Systemen waren die Reaktionsausbeuten mit den in Tabelle 5.19. dargestellten Ausbeuten vergleichbar.

Tabelle 5.19. Ausbeuten der Kopplung von Modell-Peptiden mit DFO-B durch Verwendung von Disuccinimidylsuberat
 [Peptid]: $1.5 \cdot 10^{-3}$ M; [Peptid]/[DSS]: 1 / 5; [DSS]/[DFO-B]: 1 / 2; DMSO; Diisopropylethylamin; RT; 60 min
^a: Hauptsächlich nicht definierte Nebenprodukte

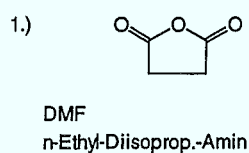
Peptid	Edukt (Peptid)	Produkt <u>1</u>	Produkt <u>2</u>	cross-linking (Pept.-EGS-Pept.)
Phe-Trp	2.0%	91.9%	83%	6.1%
Phe-Tyr	0%	96.4%	89.9%	3.6%
Phe-His	3.1%	64.4%	61.8%	32.5% ^a
Phe-Gly-Gly	0%	99.3%	98.8%	0.7%
Phe-Gly-Phe-Gly	0%	94.8%	94.3%	5.2%
Phe-Ser-Val	0%	99.5%	92.5%	0.5%

Die Reaktionsführung im DSP / Peptid-System erwies sich hingegen als abhängig von der zugesetzten Base. Im Laufe der Reaktion wurden verschiedene Nebenprodukte gemessen deren Anteil mit steigender Basenkonzentration zunahm.

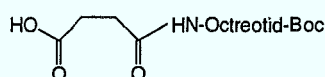
Im Weiteren wurde der Ansatz zur Darstellung unterschiedlicher Ga-DFO-B-Octreotide (Ga-DFO-B-Linker-SMS 201 995) verwendet.

5.5.3. *Darstellung verschiedener Ga-DFO-B-Linker-Octreotide im Vergleich zu ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid*

Von P. M. Smith-Jones et al. [53] wurde die Synthese eines Octreotid-Derivates für den Einsatz von $^{67/68}\text{Ga}$ entwickelt. Zur Komplexierung des Galliums wurde DFO-B an das Octreotid gekoppelt. Die Kopplung an das N-terminale Phenylalanin des Octreotides erfolgte über Bernsteinsäure. Im ersten Reaktionsschritt wurde [(D)Phe¹-ε-BOC-Lys⁵]-Octreotid mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt. Die Kopplung von DFO-B erfolgte anschließend nach Aktivierung der freien Carbonsäure der Bernsteinsäure mittels DCCI/HOBT.

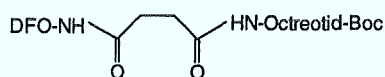
A) $\text{H}_2\text{N-Octreotid-Boc}$ 

2.) Reinigung

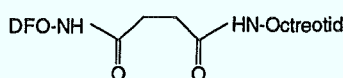
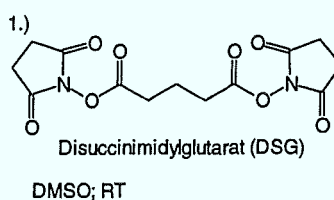


3.) DFO
Aktivierung (DCCI/HOBT)

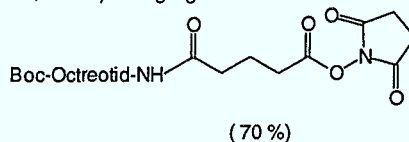
DMF
4.) Reinigung



5.) TFA
6.) Reinigung

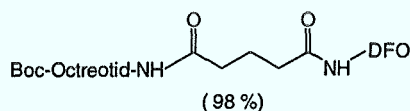
B) $\text{H}_2\text{N-Octreotid-Boc}$ 

2.) Reinigung

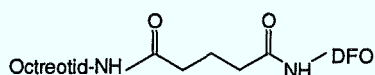


3.) DFO
DMSO / Diisopropyl-Ethyl-Amin

4.) Reinigung



5.) TFA
6.) Reinigung



Schema 5.5.
Vergleich der Synthesestrategie von P. M. Smith-Jones (A) [53] mit dem hier beschriebenen Ansatz (B) für DFO-B-Octreotide

Ziel der neuen Synthesestrategie war es, über die Variation des Brückenmoleküls mögliche pharmakologischen Änderungen des Moleküls zu bewirken. Beide Synthesevorschläge sind in Schema 5.5. gegenübergestellt. Der Syntheseweg (B) ist hierin für das DSG zusammengefaßt.

Der Syntheseaufwand für beide Ansätze war vergleichbar. Der Vorteil der Synthese (A) lag in der Vermeidung von cross-linking-Produkten im ersten Reaktionsschritt. Der zweite Reaktionsschritt bedurfte jedoch einer erneuten Aktivierung der Carbonsäure mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid / 1-Hydroxybenzotriazol (DCCI/HOBT), wodurch Umlagerungsprodukte in Nebenreaktionen auftraten [151]. Grundsätzlich könnte Syntheseweg (B) als erweitertes Konzept zur Variation der pharmakologischen Eigenschaften von DFO-B-

Octreotiden betrachtet werden, hätte aber im Falle der Derivatisierung über Bernsteinsäure sicherlich keine Vorteile⁵.

5.5.4. Darstellung von [DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid

Die Synthese neuer Ga-DFO-B-Octreotid-Derivate sollte in Hinblick auf pharmakologische Aspekte im Vergleich zum Ga-SDZ 216 927 von Interesse sein. Die Einführung einer C₂-Kette (Bernsteinsäure) wurde auf eine C₃-Kette (Glutarsäure) und C₆-Kette (Korksäure) erweitert. Durch Variation der Alkylkette sollte sich der lipophile Charakter der Verbindungen ändern [113].

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Reaktionsführung wurde HPLC-chromatographisch verfolgt. Hierbei konnten die jeweiligen Reaktionsprodukte entlang der Synthese eindeutig zugeordnet werden. Die Chromatogramme der Produkte in der dreistufigen Synthese sind in Abbildung 5.30. übereinandergelegt.

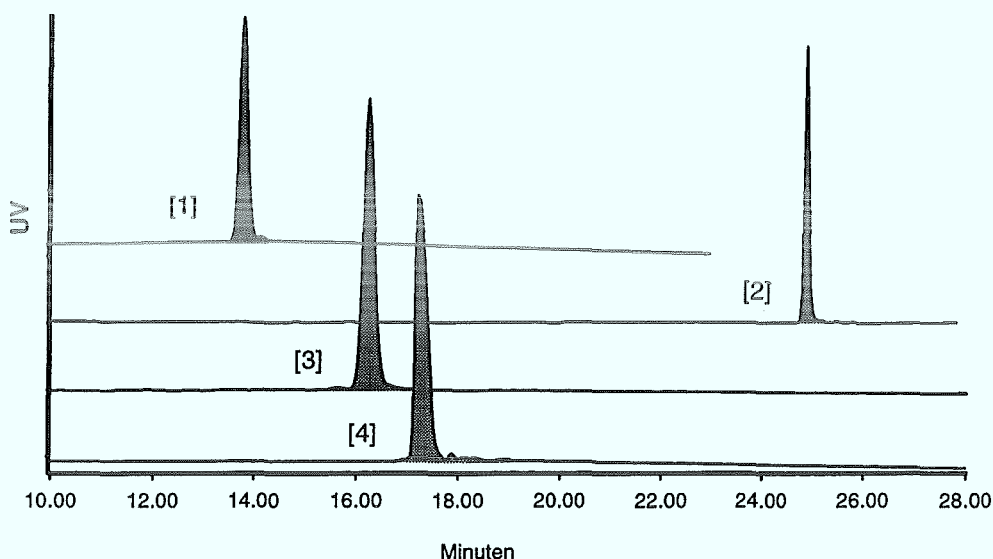


Abb. 5.30. HPLC-Chromatogramme der Zwischenprodukte der Reaktion Boc-Octreotid + Disuccinimidylglutarat + DFO-B.
 [1]: Boc-Octreotid
 [2]: [Succinimidylglutarat-(D)Phe¹-ε-Boc-Lys⁵]-Octreotid
 [3]: [DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹-ε-Boc-Lys⁵]-Octreotid
 [4]: [DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid
 Boc-Octreotid: $3.15 \cdot 10^{-6}$ M; Disuccinimidylglutarat: $3.15 \cdot 10^{-5}$ M; DFO-B: $6.4 \cdot 10^{-5}$ M
 HPLC: Kromasil RP-18, 5μ, UV: 287 nm; Injektionsvol.: 5 μl;
 A: 0.1 % HOAc, B: MeCN; Gradient: [1,2,3]: 2-2-40-45-100% B, 0-3-5-20-25 min;
 [4]: 2-2-35-100% B, 0-3-5-20-25 min

⁵ Daß die Synthesestrategie (B) sich schon bei geringer Variation im pharmakologischen Gang der ⁶⁷Ga-markierten Pharmaka auszählte, wurde im Tiermodell (Abschnitt 6.2.3.) eindeutig gezeigt, wobei die biologische Wirksamkeit des Somatostatin-Analogons nicht beeinträchtigt wurde.

Die Reaktion des [ϵ -Boc-Lys⁵]-Octreotid mit Disuccinimidylglutarat erfolgte mit 10 fachen Überschuß des Diesters. Die anschließende Reaktion zum [DFO-B-Glutaryl- ϵ -Boc-Lys⁵-(D)Phe¹]-Octreotid wurde durch Zugabe eines 2.1fachen Überschuß an DFO-B vervollständigt. Abschließend wurde das Zwischenprodukt an der Lys⁵-Stellung entschützt und lieferte [DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid.

Diese Reaktionsführung wurde aus den Untersuchungen am DFO-B + Disuccinimidylglutarat + Peptid-System abgeleitet. Die einzelnen Teilreaktionen wurden bzgl. der Eduktverhältnisse untersucht.

Der erste Reaktionsschritt beinhaltete wiederum die Reaktion zwischen dem N-terminalen Phenylalanin des Octreotids und dem Succinimidylester der Glutarsäure. Die Kinetik dieser Reaktion in Abhängigkeit von der Eduktkonzentration ist in Abb.5.31. dargestellt.

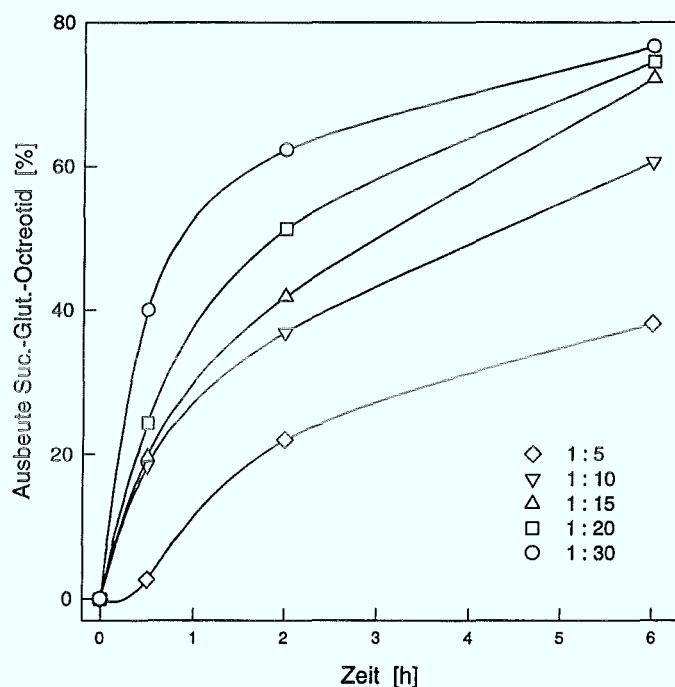


Abb.5.31.
Kinetik der Reaktion Disuccinimidylglutarat + Octreotid in Abhängigkeit von verschiedenen Eduktverhältnissen (Octreotid : DSG).
[Boc-Octreotid]: 0.18 mM/L
RT; DMSO; Diisopropylethylamin

Die Reaktion bedurfte bei den geringen Boc-Octreotid-Konzentrationen mehrere Stunden selbst bei hohen Überschüssen an DSG. Bei einem 10 fachen Überschuß wurden Reaktionsausbeuten für den ersten Teilschritt der Reaktion von >70% (Suc.-Glut.-Octreotid) erzielt. Das Zwischenprodukt konnte isoliert und im zweiten Reaktionsschritt mit DFO-B umgesetzt werden.

Parallel zu den Untersuchungen an den Modell-Peptiden reagierte die Pentylamin-Funktion des DFO-B mit dem Succinimidylester der Carbonsäure sehr viel schneller ab als die Aminfunktion des Phenylalanins mit dem Aktivester.

Die Kinetik dieser Reaktion in Abhängigkeit vom überschüssigen DFO-B ist in Abbildung 5.32. dargestellt.

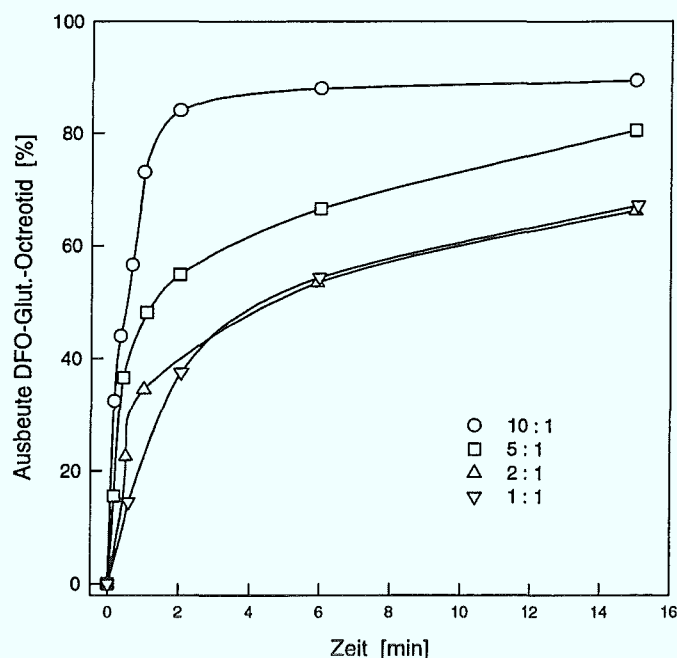


Abb.5.32.
Abhängigkeit der Reaktion Suc.-Glut.-Octreotid + DFO-B von verschiedenen Eduktverhältnissen (DFO-B / Suc.-Glut.-Octreotid).
[Suc.-Glut.-Octreotid]: 0.17 mM/L; RT;
DMSO; Diisopropylethylamin;

Ein vollständiger Umsatz des Zwischenproduktes (1) sollte durch eine 1 / 1-Stöchiometrie Succinimidyl-Glutarat-Octreotid / DFO-B gewährleistet sein. Reaktionsbeschleunigend wirkten sich der überschüssige DFO-B-Anteil als auch die Konzentration der zugesetzten Base aus.

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionskinetiken beider Teilreaktionen sollte eine Art „Eintopfsynthese“ durchführbar sein. Durch Anpassung der DFO-B-Zugabe könnte die Reaktionszeit vermindert und der Überschuß an DFO-B minimiert werden. Dieses könnte dann von besonderem Interesse sein, wenn nicht nur das Peptid sondern auch der Komplexbildner in nur geringen Mengen zur Verfügung stünde.

Der Reaktionsverlauf einer Synthese von [DFO-B-Glutaryl]-Octreotid in einer „Eintopfsynthese“ ist in Abbildung 5.33. dargestellt.

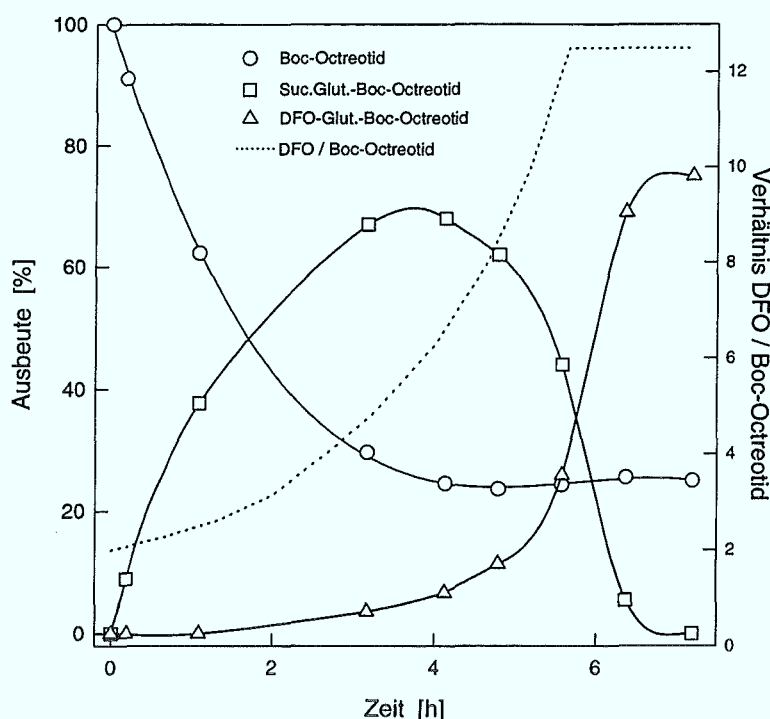


Abb. 5.33.
Synthese von [DFO-B-Glutaryl]-Octreotid in einer „Eintopf-synthese“ bei kontinuierlicher Zugabe von DFO DSG/Octreotid (10:1) DMSO; RT; Diisopropylethylamin; [Boc-Octreotid]: 0.1 mM/L

Die DFO-B-Zugabe zu der Reaktionsmischung wurde kontinuierlich gesteigert (Verhältnis DFO-B / Octreotid: rechte Y-Achse). Durch die anfänglich geringe Konzentration an DFO-B konnte sich das Zwischenprodukt bilden und wurde dann im Laufe der Reaktion durch das DFO-B in der Lösung abgefangen. Diese Reaktionsführung hatte den Vorteil, daß die Bildung von cross-linking-Produkten weiter reduziert, jedoch eine vollständige Umsetzung des Octreotids nicht mehr erreicht wurde. Die Synthese von [DFO-B-Glutaryl]-Octreotid über eine „Eintopfreaktion“ lieferte Ausbeuten von 75%. Verglichen mit der Zweischritt-Synthese wurden somit gleiche Ausbeuten erzielt. Der Anteil an cross-linking-Produkten konnte gesenkt werden, wodurch mittels präparativer HPLC eine hohe Rückgewinnungsrate des nicht umgesetzten Octreotides gewährleistet war.

An die Kopplung des DFO-B schloß sich die Entfernung der BOC-Schutzgruppe an, die analog dem DTPA-System unter Verwendung von TFA mit nachfolgender Reinigung erfolgte [152]. Mittels dieser Methode wurden [DFO-B-Glutaryl]-Octreotid und [DFO-B-Suberyl]-Octreotid dargestellt.

5.5.5. Markierung von [DFO-B-Linker-(D)Phe¹]-Octreotiden mit ⁶⁷Ga

Die Markierung von DFO-B-Octreotiden mit ^{67/68}Ga erfolgte in 0.1 N NH₄OAc-Puffer, pH 4.5. Die Komplexbildung war in diesem Falle vergleichsweise langsam (~15-20 min ⇒ Markierungsausbeute > 95%) gegenüber der schnellen Kinetik im ⁸⁸Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid-System (< 1 min ⇒ Markierungsausbeute > 98%). Nach ca. 1 h wurden die Proben mittels HPLC analysiert. Da wie beim ⁸⁸Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid während der

HPLC-chromatographischen Analyse teilweise Freisetzungen des ^{67}Ga aus den DFO-Octreotiden beobachtet wurden, erfolgte parallel die Auswertung der Chromatogramme stets durch Fraktionierung und Messung am γ -Counter. Die Chromatogramme in Abb.5.34. verdeutlichen, daß die Einführung unterschiedlicher Linker in die DFO-B-Octreotid-Struktur die Retentionszeiten der verschiedenen ^{67}Ga -DFO-B-Octreotid-Derivate auf der RP-Phase der HPLC-Säule zwar beeinflussten, die Retentionszeitenverlängerung jedoch nicht parallel mit steigender Anzahl an Methyleneinheiten in der Linker-Struktur zunahm [cf. 153,154]. Zwar zeigte das Suberyl-Derivat erwartungsgemäß die höchste Retentionszeit; für das Glutaryl-Derivat, das gegenüber dem Succinyl-Derivat um eine Methyleneinheit verlängert war, wurde allerdings eine kürzere Retentionszeit gefunden.

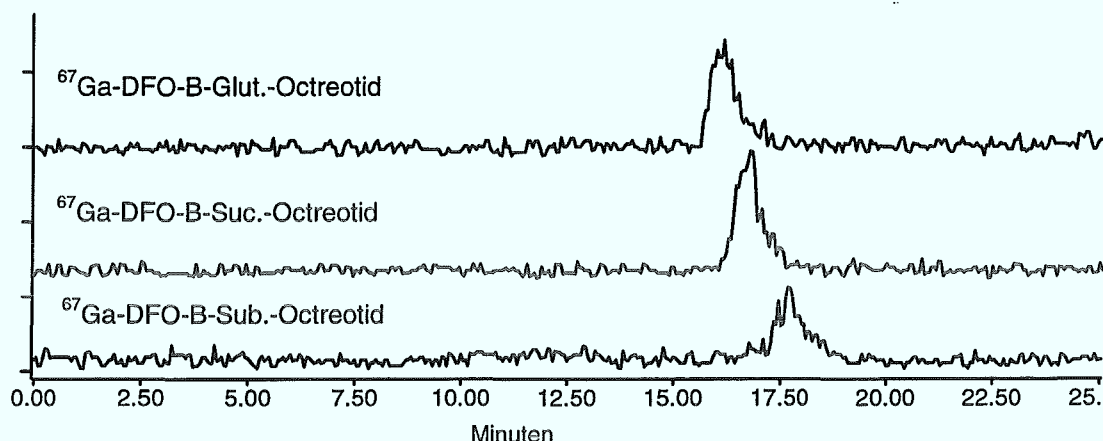


Abb.5.34. Radio-HPLC-Chromatogramme von ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl]-Octreotid, ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl]-Octreotid und ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl]-Octreotid (Markierung in 0.1 N NH_4OAc , pH 4.5; 60 min, RT, HPLC: Kromasil RP-18, 5 μm A: 0.1% HOAc; B: MeCN, Gradient: 15-25-65%B, 0-6-20 min)

Aus den Retentionszeiten auf der RP-Phase einer HPLC-Säule lassen sich erste Zusammenhänge zwischen der Lipophilie von Molekülen ableiten. Danach sollte das Ga-[DFO-B-Glutaryl]-Derivat hydrophiler sein als das kurzkettigere Ga-[DFO-B-Succinyl]-Derivat. Die Lipophilie wurde daher im Folgenden im Octanol/Wasser-System bestimmt.

5.5.6. Bestimmung der Lipophilie verschiedener ^{67}Ga -[DFO-B-Linker-(D)Phe¹]-Octreotide

Aufgrund der direkten Beziehung zwischen der Löslichkeit von organischen Verbindungen in wäßrigen Medien und der Membranpermeabilität ist die Lipophilie ein ausgezeichnetes Kriterium zur Abschätzung bestimmter pharmakologischer Eigenschaften von biologisch wirksamen Verbindungen [cf. 155,156]. Die Lipophilie bzw. Hydrophobie ist definiert über die Verteilung von Verbindungen zwischen wäßrigen und organischen Phasen. Am häufigsten findet hierbei n-Octanol als organische Phase Verwendung. Aufgrund der langen Al-

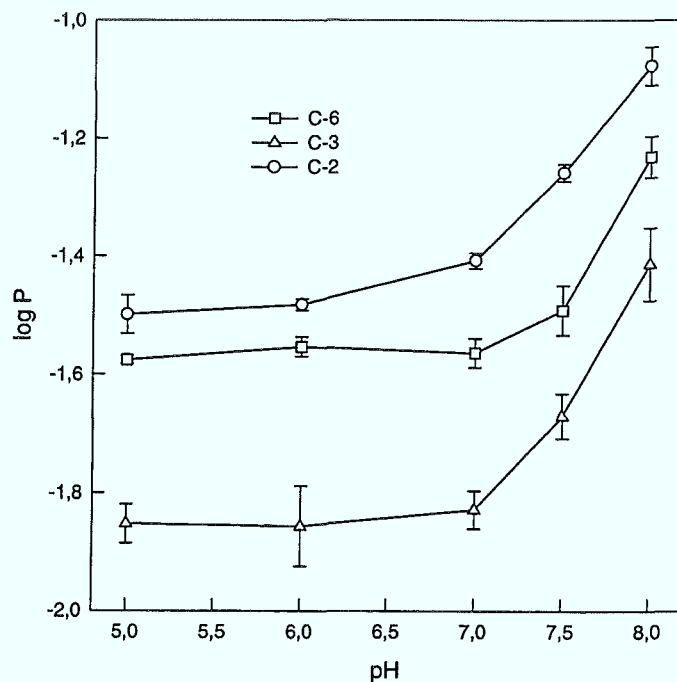
kylkette und der polaren Hydroxyl-Gruppe wird n-Octanol als gutes Modell für biologische Membranen betrachtet [cf. 113].

Mit diesen Modellen können Aussagen über z.B. die Permeabilität von Blut-Hirn-Schranken [cf. 157], Toxizität oder Ausscheidungsverhalten der Verbindungen getroffen werden [cf. 136]. Letzteres ist gerade bei der Anwendung von Radiodiagnostika in der Positronen-Emissions-Tomographie entscheidend, da die die Güte bzw. der Kontrast der PET-Aufnahmen stark von der Eliminationsgeschwindigkeit aus dem Blutpool abhängen wird. Renale Ausscheidungen über die Nieren sind somit günstiger, da die Aktivität relativ schnell in der Blase akkumuliert wird, während hepatobiliäre Ausscheidung zu einer diffusen Aktivitätsverteilung über den gesamten Leber-Galle-Darm-Bereich führt.

Zur Beurteilung der Lipophilie von drei ^{67}Ga -DFO-B-Octreotiden wurden die Octanol/Wasser-Verhältnisse ($\log P$) bestimmt und mit denen des ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid-System verglichen. Hierbei sollten sich die Auswirkungen des „Linker-Konzeptes“ auf die DFO-B-Octreotid-Derivate zeigen.

Da z.B. die Anzahl der Ladungen ausschlaggebend für die lipophilen Eigenschaften der Moleküle sein werden [158], wurde der Verteilungskoeffizient in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist für die drei DFO-B-Octreotide: ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl]-Octreotid (C-2) (^{67}Ga -SDZ 216 927), ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl]-Octreotid (C-3) und ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl]-Octreotid (C-6) in Abbildung 5.35. zusammengefaßt.

Abb.5.35.
Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten ($\log P$) für ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl]-Octreotid (C-2); ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl]-Octreotid (C-3); ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl]-Octreotid (C-6) vom pH-Wert (n-Octanol; 0.1 M Phosphat-Puffer; RT; n=4)



Die Lipophilie der ^{67}Ga -DFO-B-Octreotid-Derivate war konstant im Bereich von pH 5 -7. Steigerungen darüber hinaus resultierten in einer Zunahme des log P-Wertes. Das Verhalten der Lipophilie der drei ^{67}Ga -DFO-B-Octreotide beinhaltete somit 2 Phänomene:

1. Die Lipophilie des ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl]-Octreotid war höher als die des ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl]-Octreotid.

Als Folge der Derivatisierung der verschiedenen Octreotide über den Einbau unterschiedlicher langer Alkylketten sollte mit zunehmender Zahl an Methylenheiten die Lipophilie der Substanzen zunehmen. Das ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl]-Octreotid mit einer C-6-Kette als verbrückende Einheit lieferte erwartungsgemäß den größten Verteilungskoeffizienten der betrachteten Moleküle. Der Vergleich der C-3-Kette im ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl]-Octreotid und der C-2-Kette im ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl]-Octreotid zeigte eine nicht erwartete hohe Hydrophilie des Glutaryl-Derivates. Dieses Verhalten mußte auf konformative Änderungen der Gesamtstruktur zurückgeführt werden, da das pH-Verhalten der Verbindungen eindeutige Analogieschlüsse zuließ⁶.

2. Die drastische Zunahme des Verteilungskoeffizienten bei pH > 7.

Die Änderung der Lipophilie bei höheren pH-Werten konnte nicht eindeutig geklärt werden. In Hinblick auf Pharmakokinetiken der Moleküle würde das Akkumulationsverhalten der Verbindungen in einzelnen Kompartimenten von dem jeweils vorliegenden pH-Werten bestimmt werden [cf. 159]. Die Vermutung, daß sich die Zunahme der Lipophilie durch die Deprotonierung der Ammoniumgruppe der Lys⁵-Funktion im Octreotid (pK > 9.5) erklären ließe, kann durch einen Vergleich mit der pH-Abhängigkeit der Lipophilie von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid (Kapitel 5.2.8.) ausgeschlossen werden, da dort kein Anwachsen der Lipophilie im pH-Bereich > 7 beobachtet wurde. Ein Vergleich mit Literaturdaten [cf. 160,161] zeigte, daß Veränderungen der Komplexstrukturen (am Beispiel Fe-DFO-B) nur im pH-Bereich < 2 gefunden wurden. In diesen Bereichen konnten Komplexe unterschiedlichen Protonierungsgrades bzw. Hydrolysegrades nachgewiesen werden.

⁶ Interessanterweise spiegelte sich dieses „abnorme“ Verhalten in den tierexperimentellen Studien wieder (Kapitel 6.3.), in denen die lipophilen Eigenschaften dem Ausscheidungsverhalten (Nieren/Leber-Verhältnis) gegenübergestellt wurden.

6. Tierexperimentelle Studien

6.1. *In vivo*-Untersuchungen mit $^{86/88}\text{Y}$ -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid

Im Tiermodell wurde das *in vivo* Verhalten von $^{86/88}\text{Y}$ -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten durch *ex vivo*-Bioverteilungs- sowie durch *in vivo*-PET-Untersuchungen.

6.1.1. *Bestimmung der ex vivo-Bioverteilung von ^{88}Y -[DTPA-(D)-Phe¹]-Octreotid am Rattenmodell*

Im Rattenmodell wurden männliche und weibliche Lewis-Ratten (250-300 g) verwendet. Das Tiermodell beinhaltete sowohl Kontroll- als auch tumortragende Ratten. Als Tumormodell wurde ein exokrin pankreatischer Inselzell-Tumor verwendet [162]. [^{88}Y]SDZ 215-811 wurde im 0.01 M NaOAc/HOAc-Puffer, pH 6, mit einer spezifischen Aktivität von ~17 MBq/ μM dargestellt. 50-100 μCi (~ 1.5 MBq) wurden in die vena jugularis injiziert. Die Ratten wurden nach 60 bzw. 120 min getötet und die Aktivitätsanreicherung in den Organen am γ -Counter bestimmt.

Die relativen Organverteilungen, dargestellt als Prozent injizierte Dosis pro Gramm (%iD/g), sind in Tabelle 6.1. zusammengefaßt.

Die Organanreicherungen für tumortragende und Kontrollratten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Tumoranreicherung bei 60 min p.i. war deutlich. Da aber im Vergleich zum Blut keine höhere Akkumulation gemessen wurde, wäre in diesem Fall keinerlei Kontrast zwischen Tumor und Hintergrund zu erwarten. Erst bei 120 min p.i. zeigte sich eine signifikante Minderung der Restaktivität im Blut, während die Aktivität im Tumor kaum reduziert war

Tab.6.1. Ex vivo-Bioverteilung von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid in Tumorratten (exokrin pankreatischer Inselzell-Tumor) sowie Kontrollratten 60 und 120 min p.i. (%iD/g; n=3)

Organ	Tumor-Ratten		Kontrollratten
	60 min p.i.	120 min p.i.	60 min p.i.
Hypophyse	0.63±0.17	1.39±1.17	2.03±1.12
Hirn	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
Knochen	1.31±0.21	1.59±0.14	2.08±0.24
Knochenmark	0.06±0.01	0.03±0.00	0.10±0.05
Darm	0.17±0.04	0.15±0.07	0.08±0.02
Pankreas	0.18±0.02	0.15±0.07	0.14±0.01
Nebenniere	0.25±0.02	0.19±0.04	0.79±0.19
Leber	0.65±0.20	0.76±0.01	0.24±0.03
Blut	0.46±0.05	0.13±0.05	0.16±0.01
Nieren	1.10±0.07	0.98±0.16	2.60±0.18
Herz	0.41±0.02	0.27±0.00	0.10±0.01
Lunge	0.50±0.07	0.23±0.05	0.16±0.02
Tumor	0.44±0.17	0.39±0.05	
Milz	0.86±0.58	0.95±0.15	0.26±0.02

Die Güte eines Radiopharmakons hängt grundsätzlich von dem Verhältnis der akkumulierten Aktivität im Zielorgan zur Anreicherung in Blut, also dem Hintergrund, sowie zur Anreicherungen in umgebenden Organen, ab. Zur Bewertung von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid sind in Tab.6.2. die Tumor-zu-Organ-Verhältnisse einiger Organe zusammengefaßt.

Tab.6.2. Tumor/Organ-Verhältnisse, berechnet aus den Ergebnissen der Tab.6.1. 60 und 120 min p.i. für ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid

Tumor/Organ	60 min / 120 min	Tumor/Organ	60 min / 120 min
Leber	0.68±0.33/0.51/0.07	Nebenniere	1.76±0.69/2.05±0.51
Niere	0.40±0.16/0.40±0.08	Pankreas	2.44±0.98/2.60±1.26
Knochen	0.34±0.14/0.25±0.04	Blut	0.96±0.38/3.00±1.22
Milz	0.51±0.40/0.41±0.08	Darm	2.59±1.17/2.6±1.26

Die Tumor/Organ-Verhältnisse in der linken Spalte zeigen die „kritischen“ Organe. Leber und Niere hatten als Ausscheidungsorgane erwartungsgemäß große Anreicherungen und somit kleine Tumor/Organ-Verhältnisse. Die hohe Anreicherung in der Milz war mit einfachen Modellen nicht interpretierbar.

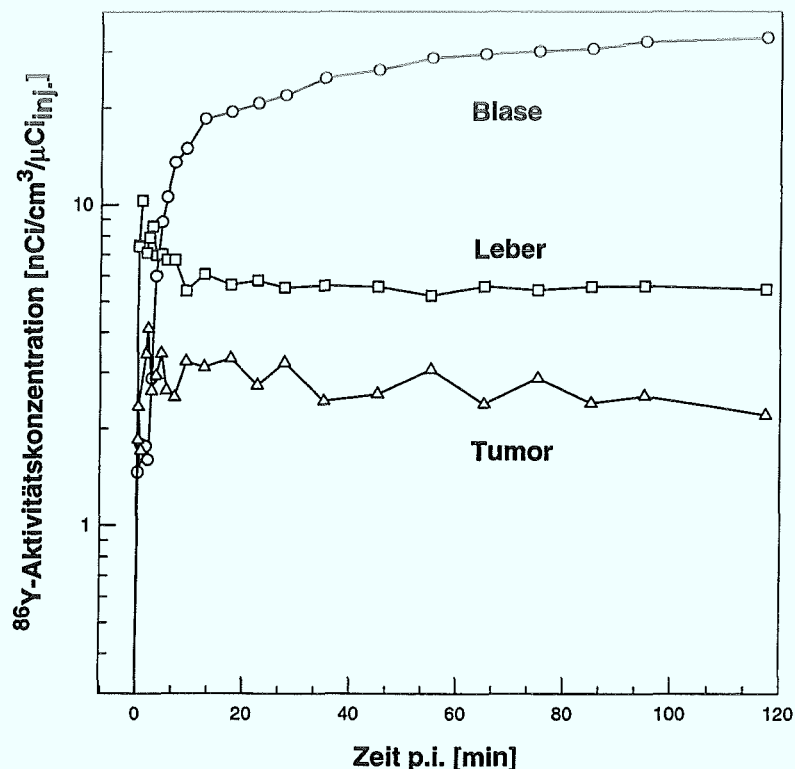
Die scheinbar große Affinität des Octreotid-Analogons ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid zu Knochen war kaum durch die Somatostatin-analogen Eigenschaften des Pharmakons zu erklären, sondern vielmehr auf die Substitutionsfähigkeit des Y^{3+} gegenüber Ca^{2+} in der Hydroxylapatit-Struktur der Knochen zurückzuführen [cf. 163]. Dieses Phänomen implizierte eine Instabilität des Yttrium-Komplexes in vivo. Daß diese Anreicherung in der Knochenstruktur und nicht im Knochenmark erfolgte, wurde durch separate Messung des Knochenmarks (Tab.6.1.) bestätigt.

6.1.2. *Pharmakokinetik von ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid mittels quantitativer Messungen am Positronenemissionstomographen*

Die quantitative Erfassung der in vivo-Pharmakokinetik von ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid erfolgte mittels der Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Für diese Untersuchungen wurden 2 Ratten mit einem exokrin pankreatischen Inselzell-Tumor in der scapular-Region verwendet. Die PET-Aufnahmen erfolgten dynamisch bis zu 120 min p.i.. In Abb.6.1. sind die mittels PET quantitativ gemessenen Kinetiken der Aktivitätsakkumulation in Blase, Leber und Tumor dargestellt.

Die verzögerte Anreicherung der Aktivität in der Blase sowie deren absoluten Menge bestätigte die erwartete starke renale Ausscheidung des Pharmakons.

Abb.6.1.
Aufnahmekinetiken von ^{86}Y in Blase, Leber und Tumor (exokrin pankreatisch) gemessen mit PET (Auf die injizierte Aktivität normiert ($\text{nCi}/\text{cm}^3/\mu\text{Ci}_{\text{inj.}}$))

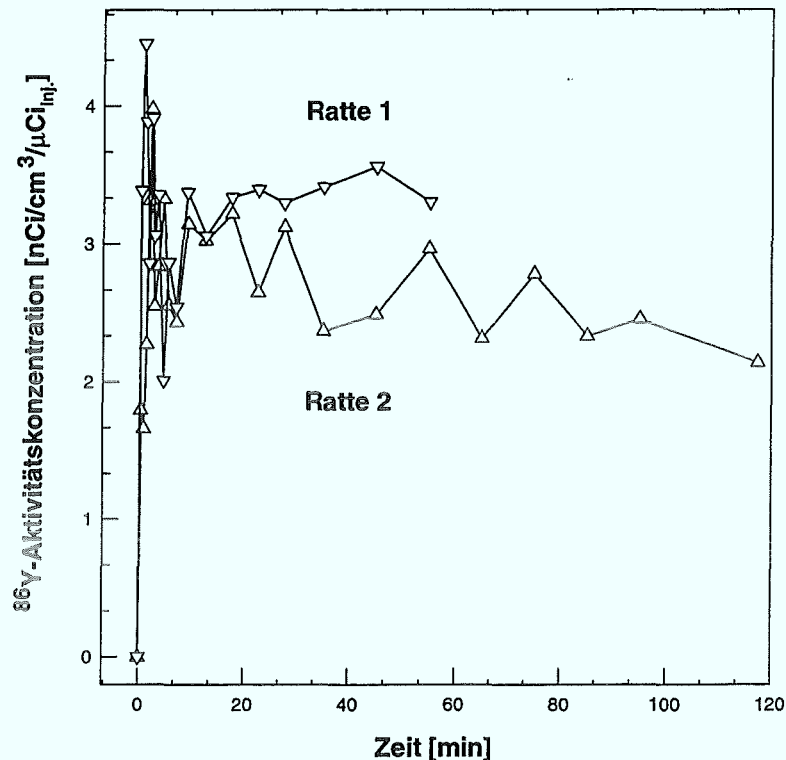


Die Anreicherung der ^{86}Y -Aktivität im Tumor hatte ihr Maximum bereits nach 4-5 Minuten erreicht. Die akkumulierte Aktivität wurde jedoch, verglichen mit halogenierten Octreotid-

Derivaten [56], anschließend nur sehr langsam aus dem Tumorgewebe transportiert. Derselbe Effekt wurde bei der Leberanreicherung beobachtet. Die langsame Abnahme der Aktivität in Leber und Tumor legte somit wiederum nahe, daß die Aktivität nicht der des eingesetzten Pharmakons entsprach, sondern ^{86}Y trium in nicht zu definierender Form beschrieb. Ein Vergleich zweier unterschiedlicher Ratten bestätigte, daß dieser Effekt kein individueller Effekt einer Einzelratte war. Abb.6.2. zeigte deutlich die nahezu identische maximale Anreicherung im Tumorgewebe und die vergleichbar langen Aktivitätsabnahmen entlang der Meßzeit.

Abb.6.2.

An zwei verschiedenen Ratten mittels PET gemessene Aufnahme- und Abnahme-kinetik des Tumors. Normierte ^{86}Y -Aktivität ($\text{nCi}/\text{cm}^3/\mu\text{Ci}_{\text{inj.}}$).



Die Aktivitätskonzentration, gemessen mit PET, und die Aktivitätskonzentration, bestimmt durch ex vivo-Bioverteilungsuntersuchungen, sind in Tab.6.3. gegenübergestellt. Bedingt durch den Umrechnungsfaktor ($\text{nCi}/\text{cm}^3/\mu\text{Ci} \Rightarrow \% \text{iD/g}$) sollten die Datenpunkte der PET-Messung ($\text{nCi}/\text{cm}^3/\mu\text{Ci}$) um den Faktor 10 größer sein als die Daten der Bioverteilungsuntersuchungen ($\% \text{iD/g}$). Ferner wurde zur Vereinfachung $1 \text{ cm}^3 \text{ (PET-ROI)} = 1 \text{ g}$ (ex vivo Organprobengewicht) gesetzt.

Tab.6.3. Vergleich von ^{86}Y -Akkumulationen nach ex vivo-Bioverteilung (BV) und in vivo-Messung (PET) (Angaben in $\% \text{iD/g}$)

	60 min		120 min	
	BV	PET	BV	PET
Tumor	0.44	0.35	0.39	0.27
Leber	0.65	0.53	0.76	0.56
Leber/Tumor	1.48	1.51	1.95	2.07

Beide Untersuchungsmethoden zeigten eine relativ gute Übereinstimmung. Diese Übereinstimmung wurde in der Gegenüberstellung der Organverhältnisse noch deutlicher. Die Organakkumulationen, gemessen mit PET oder über Bioverteilungsuntersuchungen ließen sich somit durch einen Korrekturfaktor ineinander überführen.

6.1.3. *in vivo*-Stabilität von ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid

Zur Bestimmung der offensichtlichen *in vivo*-Instabilität des ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid wurden Analysen von Blut, Urin, Leber und Pankreas durchgeführt. Die Probenvorbereitung wurde in Kapitel 4.6.1. beschrieben. Die chromatographische Analyse erfolgte anschließend mit HPLC auf einer RP-Phase und durch Gelausschlußchromatographie. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb.6.3. und 6.4. zusammengefaßt

Die Chromatogramme bestätigen die Instabilität des ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid *in vivo*. Nach 60 min wurde nur ein geringer Anteil des chemisch intakten Pharmakons im Blut sowie in den Organen wiedergefunden. Die Aktivität konnte nur zu ~10% aus den Organen extrahiert werden, wodurch Absolutangaben nicht möglich waren.

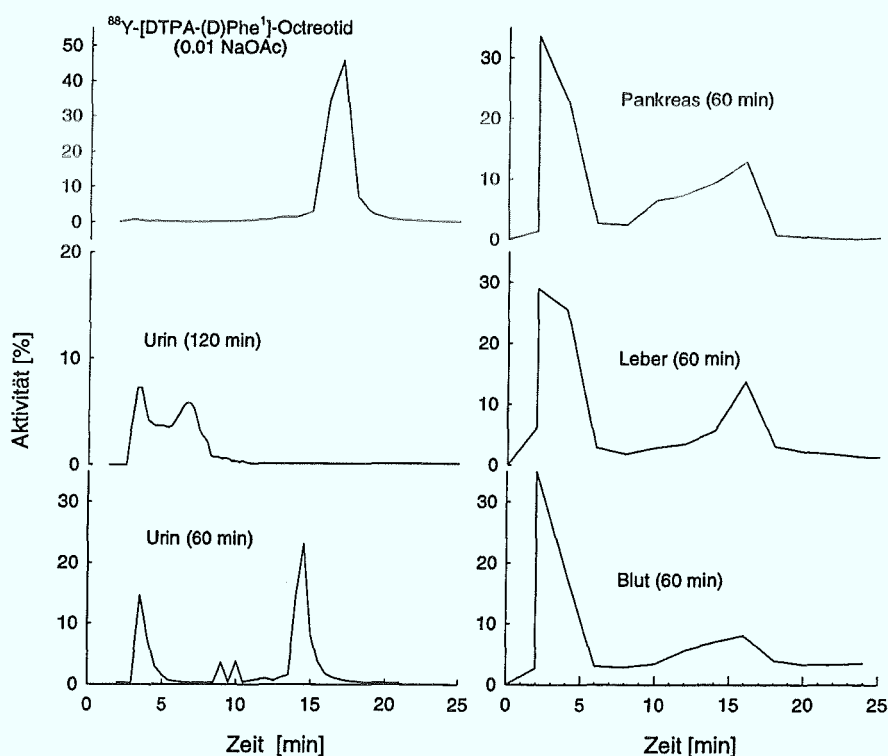


Abb.6.3.
HPLC-Chromatogramme der Aktivitätsbestimmung in Urin, Blut, Leber und Pankreas.
Kromasil RP-18, 5 μm ; A: 0.01 NaOAc (pH 5.5); B: MeOH; 40 $\rightarrow$ 80 %B; 0 $\rightarrow$ 17 min

Bei Pankreas- und Leber-Proben könnte dieses auf eine ungenügende Homogenisierung zurückzuführen sein, während beim Blut eindeutig nachgewiesen wurde, daß die Aktivität an Serum-Proteinen gebunden war. Das Zentrifugat der Serumfällung enthielt ~ 90% der Gesamt-Blut-Aktivität, während sich die restlichen 10% auf Blutplättchen und Überstand

der Protein-Fällung (s.Abb.(6.3.)) verteilt. In Abb.6.4. ist die Analyse des Blutplasma 120 min p.i. mittels Gelausschlußchromatographie dargestellt.

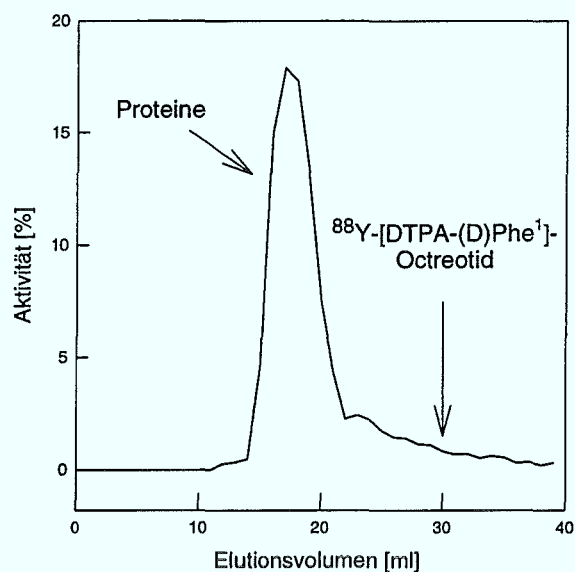


Abb. 6.4.
Elutionsprofil der Serum Probe nach 120 min p.i.
Sephadex G-25; 25 ml; 0.75 M TRIS-Acetat; pH 7

Das eingesetzte Pharmakon konnte in den Serumproben nicht in signifikanter Konzentration nachgewiesen werden. Die Analyse des Serums zeigte vielmehr, daß das Radioyttrium an Serum-Proteine gebunden war. Das dieser Ergebnis richtig sein konnte, zeigten Untersuchungen innerhalb einer Dissertation [164] über die Bindungsfähigkeit von Yttrium an Serum-Proteine. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Y^{3+} -Kationen mit Phosphat und Serum-Proteinen ternäre Verbindungen bildet, für die Stabilitätskonstanten von $\log \beta = 10.9$ gemessen wurden. Selbst bei Anwesenheit komplexfähigen Liganden (z.B. Citrat) wurde die Bildung solcher ternärer Strukturen nachgewiesen.

6.1.4. Untersuchungen an ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid zur Minderung der ^{88}Y -Hintergrund-Aktivität

Aufgrund der Instabilität des ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid-Komplexes und der damit einhergehenden Freisetzung des $^{88}Y^{3+}$ wurde in einer Versuchsreihe mit männlichen Lewis-Ratten der Einfluß eines injizierten Komplexbildners auf die Minderung der Aktivität im Blut und in den Organen untersucht.

Jeweils 3 Ratten wurde nach 40 min 0.03 mg/kg bzw. 0.3 mg/kg (bezogen auf das Körpergewicht der Ratten) Ethylendiamintetramethylphosphonsäure (EDTMP) injiziert. Die Tiere wurden nach 60 min getötet und eine ex vivo-Bioverteilungsuntersuchung durchgeführt.

Tabelle 6.4. Ex vivo-Bioverteilungsuntersuchungen von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid in männlichen Lewis-Ratten 60 min p.i.. Vergleich zwischen Kontrollratten und EDTMP-behandelten Ratten (EDTMP-Injektion 20 min p.i.) (n = 3; Angaben in %iD/g)

Organ	Kontrollratten 60 min p.i.	0.03 mg EDTMP/kg 60 min p.i.	0.3 mg EDTMP/kg 60 min p.i.
Niere	2.56±0.16	2.25±0.12	2.56±0.19
Leber	0.24±0.03	0.36±0.09	0.30±0.03
Knochen	0.23±0.01	0.44±0.16	0.43±0.16
Blut	0.16±0.01	0.16±0.02	0.16±0.02
Milz	0.26±0.02	0.40±0.12	0.42±0.09

Die erwartete Minderung der akkumulierten Aktivität z.B. in Leber und Knochen konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. In erster Linie war dieses Ergebnis durch die schnelle renale Ausscheidung des EDTMP erklärbar, weil dadurch eine hohe lokale Konzentration des Komplexbildners über längere Zeiträume nicht vorliegen konnte.

6.2. Bioverteilung von ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid, ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid ([^{67}Ga]-Glut.-Octreotid) und ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Su-beryl-(D)Phe¹]-Octreotid ([^{67}Ga]-Sub.-Octreotid)

Die drei Octreotid-Derivate wurden hinsichtlich des in vivo Verhaltens am Rattenmodell untersucht. Die Evaluierung von ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid erfolgte an Tumor-Ratten mit einem exokrin pankreatischen Inselzell-Tumor, während die Untersuchungen der beiden neuen Derivate auf Kontrollratten beschränkt wurde.

6.2.1. ex vivo-Bioverteilung von ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid in Tumor-tragenden Ratten.

Jeweils 5-10 μCi (100 μl) einer ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid-Stammlösung (16 MBq/ μM) wurden männlichen Lewis-Ratten mit einem exokrin pankreatischen Inselzell-Tumor in der scapular Region in die vena jugularis injiziert. Nach 5, 15, 60 und 120 min wurden jeweils 3 Tiere getötet und die Organe nach Entnahme am γ -Counter gemessen. Die hierbei bestimmten Aktivitätsverteilungen sind in Tab.6.5. zusammengefaßt.

Tab.6.5. Ex vivo-Bioverteilung für ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid in tumortragenden Ratten. Vergleich zu Untersuchungen an Lewis-Ratten mit einem endokrin pankreatischen Tumor (n=4). (Angaben in %iD/g)

Organ	5 min	15 min	60 min	60 min (Sandoz)	120 min
Hypophyse	0.59±0.11	0.59±0.16	0.58±0.04		0.71±0.06
Gehirn	0.03±0.01	0.02±0.00	0.01±0.01		0.02±0.01
Knochen	0.20±0.02	0.24±0.02	0.26±0.02		0.33±0.15
Darm	0.15±0.01	0.16±0.02	0.15±0.02	0.27±0.09	0.13±0.03
Pankreas	0.58±0.01	0.68±0.03	0.59±0.12		0.33±0.02
Leber	0.48±0.08	0.58±0.04	0.81±0.33	0.21±0.04	0.56±0.21
Blut	1.29±0.45	0.83±0.04	0.45±0.07	0.16±0.04	0.58±0.23
Nieren	5.06±0.64	4.68±0.55	4.14±0.36	3.31±0.58	2.71±0.26
Herz	0.45±0.09	0.35±0.03	0.23±0.03	0.05±0.01	0.22±0.11
Nebenniere	1.95±0.30	2.53±0.86	3.35±0.84		2.62±0.35
Milz	0.46±0.13	0.92±0.06	1.74±0.89	0.14±0.03	0.76±0.29
Tumor	0.34±0.03	0.45±0.16	0.82±0.11	0.38±0.08	0.57±0.18

Aus den Daten der ex vivo-Bioverteilung konnte der zeitliche Verlauf der Aktivität in den Organen nachvollzogen werden. Während die Aktivitätskonzentration im Blut nach Injektion kontinuierlich abnahm, durchlief sie in Organen wie Leber, Nebenniere und Tumor ein Maximum. Dieser Effekt konnte wiederum für die Leber nicht exakt erklärt werden, während das Anwachsen der Aktivität in Nebenniere und Tumor auf die pharmakologischen Eigenschaften des Somatostatin-Analogen und damit auf die Affinität zu SRIF-Rezeptoren zurückzuführen war. Aufgrund der stetig abnehmenden Blut-Aktivitätskonzentration sollte sich für diese Organe das Organ/Hintergrund-Verhältnis positiv bei der Verwendung von ^{68}Ga und PET auswirken. Als Hauptausscheidungsorgan zeigte die Niere sehr hohe Aktivitätsanreicherungen, die aber auch hier stetig mit der Zeit abnahmen.

Ein Gegenüberstellung der Datenpunkte mit den Literaturwerten für ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid [53] in Tab.6.5. zeigte zwar einige Ähnlichkeiten in den Organanreicherungen, war aber in der Absolutbetrachtung nicht zu vergleichen. Ob dieser Effekt auf die unterschiedlichen Tumorarten zurückzuführen war, kann zu diesem Zeitpunkt nicht bewertet werden.

6.2.2. In vivo-Stabilität von ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid

Die in vivo-Stabilität von ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid wurde nach 5, 15 und 120 min p.i. in Blut, Urin, Tumor, Niere und Leber bestimmt. Die Probenvorbereitung waren entsprechend den Ausführungen in Kapitel 4.6.1..

Die Blutaktivität zeigte eine erwartete Abnahme an intaktem *Tracer*. Nach 120 min war ^{67}Ga in der injizierten Form nicht mehr nachweisbar. Die Aktivität in Niere und Urin hingegen konnte noch nach 120 min bis zu 30% dem ^{67}Ga -[Desferrioxamin-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid zugeordnet werden. Die Stabilität des *Tracers* in Tumor und Leber konnte nur unzureichend bestimmt werden, da die applizierte Aktivität relativ gering und die Aktivitätskonzentration in diesen Organen niedrig und unzureichend extrahierbar waren.

6.2.3. *Ex vivo*-Bioverteilung mit ^{67}Ga -[DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid ([^{67}Ga]-Glut.-Octreotid) und ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl-(D)Phe¹]-Octreotid ([^{67}Ga]-Sub.-Octreotid)

Die Biodistribution von [^{67}Ga]-Glut.-Octreotid und [^{67}Ga]-Sub.-Octreotid wurde im Rattenmodell an männlichen Lewis-Ratten untersucht. Die Narkose der Ratten wurde entsprechend Kapitel 6.1.1. durchgeführt. Jeweils 3 Ratten wurde 0.5 MBq [^{67}Ga]-Glut.-Octreotid bzw. [^{67}Ga]-Sub.-Octreotid (80MBq/ μM) appliziert. Nach 60 Minuten wurden die Ratten getötet und die Aktivitätskonzentration der Organe am γ -Counter bestimmt. Die Ergebnisse der *ex vivo*-Bioverteilung sind in Tab.6.6. zusammengefaßt.

Die Biodistributionsergebnisse verdeutlichten die hohe Affinität der [^{67}Ga]-Octreotid-Analoga gegenüber SRIF-Rezeptoren. Die Organe mit erwartet hoher Konzentration an Rezeptoren, z.B. Nebenniere, Pankreas und Hypophyse [165,166] zeigten eine hohe Akkumulation des Rezeptor-Liganden. Die Akkumulationen in der Leber waren gegenüber der Niere deutlich niedriger, was auf eine renale Ausscheidung hindeutete.

Tab.6.6. Ergebnisse der Biodistribution von [^{67}Ga]-Glut.-Octreotid und [^{67}Ga]-Sub.-Octreotid in Lewis-Ratten nach 60 min p.i.. (Angaben in %ID/g; n=3)

	[^{67}Ga]-Glut.-Octreotid 60 min	[^{67}Ga]-Sub.-Octreotid 60 min
Hypophyse	3.39±0.38	1.30±0.109
Gehirn	0.01±0.01	0.01±0.01
Dünndarm	0.20±0.04	0.20±0.08
Dickdarm	0.18±0.02	0.24±0.07
Pankreas	1.20±0.15	1.07±0.12
Nebenniere	1.92±0.39	1.22±0.11
Leber	0.47±0.12	0.54±0.11
Blut	0.18±0.05	0.22±0.06
Nieren	3.64±0.51	5.68±1.38
Herz	0.11±0.02	0.12±0.07
Milz	0.69±0.25	0.62±0.19

6.3. Vergleichende Übersicht über die untersuchten Octreotid-Derivate, sowie kritische Betrachtungen der Ergebnisse

Die im Kapitel 6. gezeigten Untersuchungen am Rattenmodell sowie die aus den Daten der Biodistributionen diskutierten Ergebnisse sollten durch direkten Vergleich mit bereits dargestellten und evaluierten Verbindungen, z.B. ^{123}I -[Tyr³]-Octreotid (^{123}I SDZ 204-090) [57], ^{111}In -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid (^{111}In SDZ 215-811) [167] und 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹-Octreotid [56], Schlüsse bezüglich des pharmakologischen Verhaltens der Einzelkomponenten erlauben.

In Kapitel 5.3. und Kapitel 5.5.6. wurden die Ergebnisse der Lipophilie-Untersuchungen von ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid bzw. ^{67}Ga -[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid, ^{67}Ga -DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹-Octreotid und ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl-(D)Phe¹]-Octreotid diskutiert. Ein Vergleich der Lipophilie zeigte deutliche Unterschiede. Dieses sollte sich aus pharmakologischen Gesichtspunkten im Ausscheidungsverhalten der *Tracer* äußern. In Abb.6.5. sind aus diesem Grund die Verteilungskoeffizienten den Nieren/Leber-Verhältnissen gegenübergestellt.

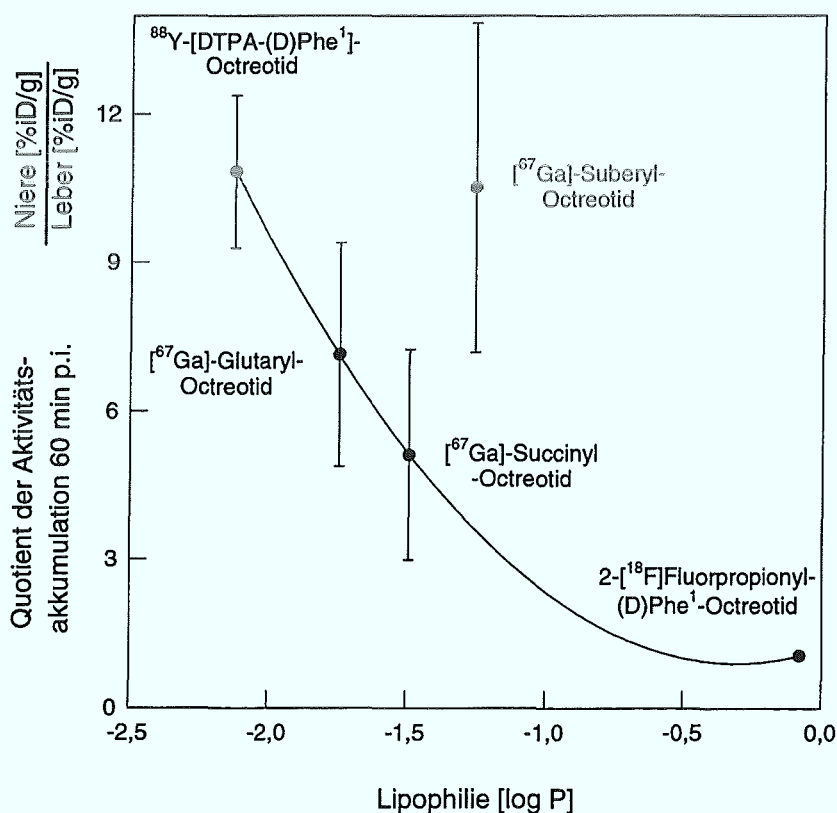


Abb.6.5.
Korrelation zwischen dem Akkumulationsverhältnis Niere/Leber und der Lipophilie verschiedener SMS 201-995 Derivate (pH 7.4)
2-[^{18}F]Fluorpropionyl-(D)Phe¹-Octreotid [168]
(Die Werte repräsentieren die Mittelung der Niere/Leber-Verhältnisse von Einzelratten (n=3) sowie die daraus resultierenden Fehlerbreiten)

Der dargestellte Kurvenverlauf zeigt eindeutig die Korrelation zwischen dem Verteilungskoeffizienten Octanol-Wasser (log P) als einer physikochemischen Größe und dem Niere/Leber-Verhältnis als einer physiologischen bzw. pharmakologischen Größe. Obwohl die Datenpunkte der Niere/Leber-Verhältnisse individuelle Größen einzelner Versuchstiere

waren, wodurch die Mittelwerte zwangsläufig relativ große Fehler aufwiesen, war eine grundsätzliche Abhängigkeit sichtbar. Die lipophilen Eigenschaften der unterschiedlichen [^{67}Ga]-Octreotide spiegelten sich in den Akkumulationswerten von Nieren und Leber wieder. Die überraschend geringere Lipophilie des Glutaryl-Derivates gegenüber dem Succinyl-Derivat fand ebenfalls im pharmakologischen Gang der beiden Octreotide ihre Entsprechung. Das ^{88}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid, das aufgrund der veränderten Struktur der DTPA-Einheit eine Koordination des Yttriums mit 6 als auch mit 7 Bindungsstellen möglich machte, sollte durch die „innere“ Kinetik des Komplexes im zeitlichen Mittel höhere Ladungsanteile, bzw. bei einer 6-fachen Koordination sogar eine Nettoladung mehr tragen. Die Zunahme der Hydrophilie sollte sich dann in einer erhöhten Ausscheidung über die Niere zeigen. Das abnorme Verhalten des ^{67}Ga -[DFO-B-Suberyl-(D)Phe¹]-Octreotid, welches trotz seiner lipophilen Eigenschaften unerwartet hohe Nieren-Aktivitätsakkumulationen zeigte, kann mit diesem einfachen Modell nicht erklärt werden.

Neben dem Ausscheidungsverhalten der verschiedenen Octreotid-Derivate war natürlich vor allem die Rezeptor-Affinität gegenüber SRIF-Rezeptoren für die diagnostische Anwendung entscheidend. In der Literatur wurde das Verhalten verschiedener Octreotid-Derivate gegenüber SRIF-Rezeptoren untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Rezeptor-Subtypen identifiziert, die gegenüber einzelnen Derivaten unterschiedliche Affinitäten aufwiesen [46,50,169].

Aus den Überlegungen, daß in den unterschiedlichen Organen mit erhöhter Somatostatin-Rezeptor-Dichte bei unterschiedlichen Affinitäten einzelner Octreotid-Derivate unterschiedliche Akkumulation resultierten, wurde in Abb.6.6. der Vergleich der Aktivitätsakkumulation in Organen mit erhöhter Rezeptor-Dichte durchgeführt. In Abb.6.6. sind die in dieser Studie gewonnenen Daten der Bioverteilung in männlichen Lewis-Ratten mit Literaturdaten verglichen worden.

Es wurden die Datenpunkte 60 min p.i. verwendet. Als Organe mit erhöhter Somatostatin-Rezeptor-Dichte galten vor allem Hypophyse, Pankreas und Nebenniere. Als Tumormodell wurde ein exokrin pankreatischer Inselzell-Tumor verwendet (Abweichungen s. Abbildungslegende). Durch die Auftragung der Größe %iD/g wurde der Masse der einzelnen Organe nicht Rechnung getragen.

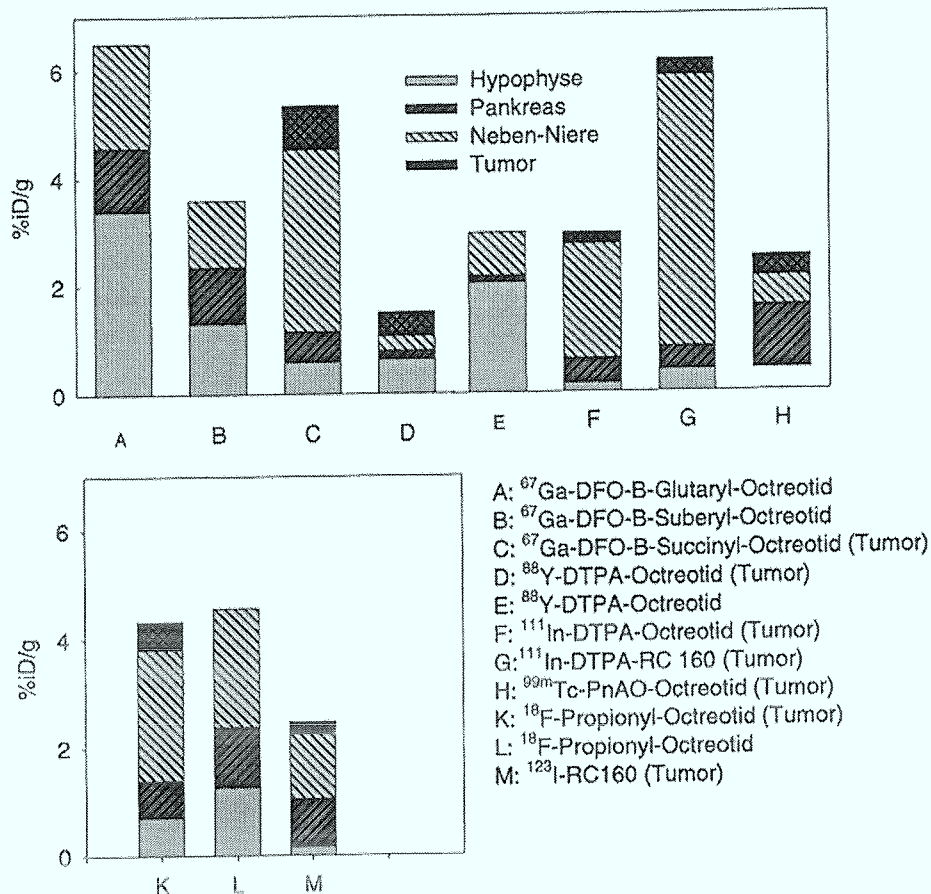


Abb.6.6. Datenvergleich der SRIF-Rezeptor-Organ-Anreicherungen
 Tumormodelle: exokrin pankreatische Inselzell-Tumore; Biodistribution 60 min p.i.
 (F: 4 h p.i.[170]; G: 4 h p.i.[147]; H: 1.5 h p.i. [171], (Hypophysen-Anreicherung nicht dokumentiert); M: 0.5 h p.i.[172])

In dem Fall, in dem die Affinität der Somatostatin-Analoga einheitlich und die Bindung an den komplementären Rezeptor nur durch die pharmakophore Sequenz der Derivate bestimmt wäre, sollte die Akkumulation in den skizzierten Organen allein durch die Masse der Organe und die Rezeptor-Dichte bestimmt sein, was zu einem stets gleichen Verteilungsmuster führen müßte. Durch den Vergleich der in dieser Studie untersuchten Octreotid-Derivate (A, B, C, D, E) wurde deutlich, daß die Anreicherung der Aktivität in den einzelnen SRIF-Rezeptor-Organen innerhalb der ^{67}Ga -Derivate ähnlich waren, sich aber nicht mit den Organverteilungen anderer Derivate vergleichen ließen. Vielmehr hatte es den Anschein, daß jedes Derivat verschieden große Affinität zu den Rezeptoren in den einzelnen Organen besaß, was zum einen die auf die durch die Derivatisierung bedingten pharmakologischen Änderungen und zum anderen auf Rezeptor-Subtypen [46,50,169] mit unterschiedlichen Affinitäten zu einzelnen Derivaten zurückgeführt werden könnte. Durch den Vergleich der Organanreicherungen in Tumor- und Kontrollratten wurde ebenfalls deutlich, daß die Aktivitätsakkumulation in den SRIF-Organen offensichtlich auch eine Funktion der Tumoranreicherung waren (D-E, K-L). Dieses könnte ein statistischer Effekt sein, wenn die

Rezeptoren entsprechend ihrer Affinität belegt würden, oder aber ein physiologischer Effekt, der durch die down- oder up-Regulierung von Rezeptoren [46], bedingt durch die biochemischen Änderungen bei Anwesenheit von Tumoren, auftritt.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei nuklearmedizinische Aspekte von Metall-Chelat-Linker-Peptid-Systemen untersucht. Für den ersten Aspekt wurde das ^{88}Y -DTPA-Peptid-System hinsichtlich der Komplexbildungskinetik, Komplexstabilität und Lipophilie evaluiert, um Aussagen über das potentielle Radiodiagnostikum ^{86}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid bzw. potentielle ^{90}Y -[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotide in der Endoradiotherapie machen zu können. Für den anderen Aspekt wurde der Einfluß von Derivatisierungen über Linker-Strukturen zwischen Komplexbildner und Peptid am Beispiel des DFO-Octreotid bestimmt, um gezielt pharmakologische Eigenschaften von Octreotid-Derivaten zu variieren.

Zusammenfassend beinhaltete diese Arbeit die physikochemische Bewertung von Metall-Chelat-Peptid-Systemen in Form ihrer Gesamt-Stabilitätskonstante bzw. ihrer Reaktionskinetiken speziell in Hinblick auf eine gezielte Korrelation zwischen Physikochemie einerseits und in vivo-Stabilität bzw. Radiopharmakologie andererseits.

Als weiter Aspekt wurden Möglichkeiten zur systematischen Variierung der chemischen Einbindung des Chelat-Linker-Teiles der Systeme bearbeitet, in Hinblick auf eine Korrelation zu deren pharmakologischen Eigenschaften.

Für die Bearbeitung beider Themen wurde das Octapeptid Octreotid eingesetzt.

Zur Bestimmung physikochemischer Parameter von Y-DTPA-Peptiden wurden vorab verschieden DTPA-Peptide hergestellt. Zur Markierung der DTPA-Peptide wurde aufgrund der längeren Halbwertszeit ($T_{1/2} = 106 \text{ d}$) ^{88}Y gewählt. Die Produktion von ^{88}Y erfolgte über den $^{nat}\text{Sr}(p,x)^{88}\text{Y}$ -Kernprozeß am Kompaktzyklotron CV 28 des Forschungszentrum Jülich GmbH. Die Synthesen der DTPA-Peptide erfolgten nach einer bekannten Methode durch Reaktion von DTPA-Bisanhydrid mit der N-terminalen Aminosäure der Peptide. In Hinblick auf die Evaluierung von [DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid war die N-terminale Aminosäure in allen Fällen das Phenylalanin. Die Modell-DTPA-Peptide DTPA-Phe-Gly-Gly, DTPA-Phe-Gly-Phe-Gly, DTPA-Phe-Trp und DTPA-Phe-Tyr-NH₂ wurden mit Ausbeuten von 55-65% hergestellt. Die Reinigung der Systeme erfolgte durch Festphasenextraktion an RP-Phasen und Anionentauscher-Harzen. Die Synthese wurde schließlich analog für [DTPA-(D)Phe¹-BOC-Lys⁵]-Octreotid durchgeführt, wobei hier nach der Umsetzung die Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (BOC) folgte. Die Gesamtausbeute dieser Synthese lag bei 50%.

Die Komplexbildung des $^{86/88}\text{Y}$ durch die DTPA-Peptide erfolgte in den für die jeweilige Untersuchung verwendeten Standardpuffern mit Ausbeuten >99%.

Für die anschließenden physikochemischen Untersuchungen wurde ein Apparaturaufbau zusammengestellt, der Arbeiten unter inerten Bedingungen zuließ.

Um die kinetische Stabilität der Y-DTPA-Peptide abschätzen zu können, wurde zuerst der Einfluß der Yttrium-Konzentration und der DTPA-Peptid-Konzentration in 0.1 M Standardpuffern auf die Dekomplexbildungskinetik am Beispiel des Y-DTPA-Phe-Gly-Gly studiert.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch Bestimmung des Isotopenaustausches zwischen ^{88}Y und stabilem Y verfolgt und durch Auflösung der *McKayschen* Gleichung berechnet. Hierbei zeigte sich, daß die Konzentration des DTPA-Peptides Einfluß auf die Isotopenaustauschgeschwindigkeit hatte, die Yttrium-Konzentration jedoch nicht.

Als nächstes wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die Isotopenaustauschreaktion untersucht. Die Austauschgeschwindigkeit nahm stetig mit steigendem pH-Wert ab. Durch Lösung der *McKayschen* Gleichung für die einzelnen Versuchsreihen konnte für den betrachteten pH-Bereich in erster Näherung die Gleichung der Reaktionsgeschwindigkeit des Isotopenaustausches aufgestellt werden.

$$(31) \quad \frac{-\partial [^{88}\text{Y} - \text{DTPA} - \text{Peptid}]}{\partial t} = k \cdot [\text{Y} - \text{DTPA} - \text{Peptid}] \cdot [\text{H}^+]^{-1.7}$$

Da Gleichung (31) keine Abhängigkeit von der Yttrium-Konzentration aufwies, konnte die Reaktionsgeschwindigkeit als allgemeiner Ausdruck für eine Umkomplexierung bzw. Dekomplexierung angesehen werden. Dieser lieferte für die Geschwindigkeitskonstante k einen Wert von $1.6 \cdot 10^4 [\text{M}^{-1.7} \text{s}^{-1}]$.

Über die Temperaturabhängigkeit wurde die Aktivierungsenergie der Isotopenaustauschreaktion zu 48 kJ/mol bestimmt und durch Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten in Medien mit unterschiedlichen Ionenstärken des Hintergrundelektrolyten der Einfluß der ionischen Umgebung einbezogen.

Final erfolgte dann die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten für die vier synthetisierten DTPA-Peptide um den Einfluß der Peptidstruktur auf die Dekomplexierung beurteilen zu können. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten lagen im Bereich von $1.3\text{--}1.6 \cdot 10^4 [\text{M}^{-1.7} \text{s}^{-1}]$. Dies bedeutete zwar, daß die an das Phenylalanin anschließenden Aminosäuren in den betrachteten Y-DTPA-Peptide keine drastischen Änderungen der Komplexierungskinetik bewirkten, bewies aber nicht, daß dieser Einfluß gänzlich auszuschließen war.

Zur Bestimmung von Gesamt-Stabilitätskonstanten von Y-DTPA-Peptiden mußten vorab die Säuredissoziationskonstanten der funktionellen Gruppen des gekoppelten DTPA bestimmt werden. Diese waren dem freiem DTPA nicht gleichzusetzen. Durch Titration der DTPA-Peptide konnten die pK_s -Werte sehr genau bestimmt werden. Da bei der Titration der DTPA-Peptide die pK_s -Werte der funktionellen Gruppen der Peptide (in diesem Fall die C-terminale Carbonsäure) ebenfalls gemessen werden, wurden diese vorher durch Titrationskurven der Ausgangspeptide separat bestimmt und dann durch Vergleich mit der Titrationskurve des jeweiligen DTPA-Peptid-Systems für letztere eindeutig zugeordnet.

Für die Stabilitätskonstanten dieser Y-DTPA-Peptid-Systeme konnten Werte von $\log \beta \sim 19$ erwartet werden. Als methodischer Ansatz wurde deshalb die Ligandenverdrängungsreaktion mit EDTA ($\log \beta_{\text{Y-EDTA}} = 18.08$ [91]) gewählt. Ziel war es dabei, durch den Einsatz von trägerfreien Yttrium-Kationen über die Bestimmung des Komplexgleichgewichtes bei verschiedenen pH-Werten einen direkten Ausdruck für die Gesamt-Stabilitätskonstante ab-

zuleiten, obwohl alle Protonierungsstufen der Liganden zu betrachten waren. Über die pK_s -Werte des DTPA in den DTPA-Peptiden und des EDTA konnten die Konzentrationen der völlig deprotonierten Spezies bei gegebenen pH-Wert berechnet werden. Da die Konzentrationen des völlig deprotonierten Liganden größer waren als die Radiometall-Konzentration in der Lösung, spiegelte das gemessene Gleichgewicht direkt das Verhältnis der beiden Gesamt-Stabilitätskonstanten von Y-DTPA-Peptid und Y-EDTA in Abhängigkeit von den Konzentrationsverhältnissen der völlig deprotonierten Liganden bei gegebenen pH-Wert wieder.

Die pH-Abhängigkeit der Ligandenverdrängungsreaktion unter Verwendung trägerfreier Metall-Kationen wurde durch Kombination der Komplexgleichgewichte und der Protonierungsgleichgewichte des Liganden theoretisch abgeleitet. Nach dieser Theorie sollte das gemessene Komplexverhältnis in Abhängigkeit vom pH-Wert in Bereichen der pK_s -Werte der Liganden einen Wendepunkt aufweisen.

Der Vergleich der Wendepunkte mit den über die Titration bestimmten Säuredissoziationskonstanten der DTPA-Peptide zeigte, daß die Meßergebnisse die theoretische Vorhersagen bestätigten. Zur Überprüfung wurde in Umkehrung die für das Gleichgewicht abgeleitete Formel direkt auf die Datenpunkte angewendet. Diese Kurven zeigten nur geringe Abweichungen von den realen Meßpunkten. Die so bestimmten Säuredissoziationskonstanten stimmten in Bereichen hoher Meßgenauigkeit gut mit denen aus Titrationsmessungen überein.

Mit diesen Daten wurden die Stabilitätskonstanten von $\log \beta (^{88}\text{Y-DTPA-Phe-Gly-Gly}) = 19.7 \pm 0.3$, $\log \beta (^{88}\text{Y-DTPA-Phe-Trp}) = 18.54 \pm 0.1$ und $\log \beta (^{88}\text{Y-DTPA-Phe-Tyr-NH}_2) = 18.74 \pm 0.1$ bestimmt.

Diese Methodik ließ die Berechnung von Gesamt-Stabilitätskonstanten bei verschiedenen pH-Werten zu und ermöglichte darüber hinaus, aus den Kurven die Säuredissoziationskonstanten der Liganden abzuleiten. Damit sollten diese Konstanten (pK_s) auch für nukleomedizinisch relevante Systeme bestimmbar sein, in denen andere Techniken wie z.B. Titrations der pK_s -Werte des gekoppelten Liganden nicht möglich waren.

Die Bestimmung der Gesamt-Stabilitätskonstante von Y-[DTPA-(D)Phe¹]-Octreotid wurde schließlich auf diese Art und Weise durchgeführt. Durch Messung der Komplexverhältnisse $^{88}\text{Y-[DTPA-(D)Phe}^1\text{]-Octreotid} / ^{88}\text{Y-EDTA}$ als Funktion des pH-Wertes konnten die pK_s -Werte zu: $pK_{s1} = 1.89$; $pK_{s2} = 3.92$; $pK_{s3} = 6.90$ und $pK_{s4} = 10.07$ bestimmt werden.

Unter Verwendung dieser Konstanten wurde die Gesamt-Stabilitätskonstante mit $\log \beta = 19.25 \pm 0.05$ berechnet. Ein Vergleich mit dem Y-DTPA-System ($pK_{s1} = 1.82$; $pK_{s2} = 2.65$; $pK_{s3} = 4.28$; $pK_{s4} = 8.53$; $pK_{s5} = 10.45$; $\log \beta = 22.05$) zeigte, daß die Kopplung an ein Biomolekül eine Erniedrigung der pK_s -Werte aller funktionellen Gruppen im DTPA-Molekül bewirkte. Diese Erniedrigung wirkte sich auf die Konzentration des deprotonierten Liganden und damit auf die Gesamt-Stabilitätskonstante aus.

Die Pharmakokinetik als auch die in vivo-Stabilität von ^{86}Y -[DTPA-(D)-Phe¹]-Octreotid wurde anschließend zum einen in ex vivo-Bioverteilungsstudien und zum anderen in PET-Studien unter Verwendung des ^{86}Y -Analogons (β^+ ; $T_{1/2} = 14.7$ h) untersucht. Die Bioverteilungsuntersuchungen zeigten dabei deutlich, daß das Pharmakon in Organen mit hoher Somatostatin-Rezeptordichte akkumuliert wurde. Die Untersuchungen der metabolischen Stabilität in Tumor, Leber, Pankreas, Blut und Urin jedoch belegten, daß in vivo eine Freisetzung des Radiometalles erfolgte. Dieses drückte sich ex vivo vor allem in einer erhöhten Knochenakkumulation aus. In den PET-Untersuchungen wurde dieser Umstand durch eine langsame Eliminierung der Aktivität aus Leber und Tumor sichtbar, die in dieser Form bei intakten Analoga nicht gefunden wurde [56].

Der Versuch, die Eliminierung der freigesetzten Aktivität durch Injektion von EDTMP als Komplexligenanden zu beschleunigen, konnte experimentell nicht erreicht werden.

Zusammenfassend konnten aus diesen tierexperimentellen Studien für das Y-DTPA-Octreotid-System zwei grundsätzliche Aspekte abgeleitet werden. Zum einen wurde gezeigt, daß durch den Einsatz von ^{86}Y die PET-Evaluierung relevanter ^{90}Y -Octreotid Endoradiotherapeutika möglich war. Zum anderen erwies sich das Y-DTPA-Octreotid-System in der vorliegenden Form als unzureichend stabil. Die Freisetzung des Radiometalles in vivo konnte somit als Folge der im Verhältnis zum Y-DTPA niedrigeren Stabilitätskonstante als auch der pH-abhängigen Dekomplexierung gewertet werden.

Für das zweite Teilgebiet dieser Arbeit wurde eine von der Sandoz AG publizierte Synthese des $^{67/68}\text{Ga}$ -[DFO-B-Succinyl-(D)-Phe¹]-Octreotid in der Art variiert, daß Änderungen der pharmakologischen Eigenschaften des Radiopharmakons über Systemvariationen des Linkers möglich waren. Hierzu wurde eine Synthesestrategie auf der Basis von N-Hydroxy-Succinimidylestern verschiedener Dicarbonsäuren entwickelt die es ermöglichen sollten, den Liganden DFO-B unter Variation verbrückender Gruppen an das Octreotid via der N-terminalen Phenylalanin-Gruppe zu binden. Auch für diese Synthesen wurden vorbereitend Modellpeptide mit N-terminalen Phenylalanin-Gruppen (Phe-Gly-Gly, Phe-Gly-Phe-Gly, Phe-Trp, Phe-Tyr-NH₂, Phe-His-OMe und Phe-Ser-Val) verwendet. Primäres Kriterium war, die pharmakologischen Eigenschaften hinsichtlich der Ausscheidung des Pharmakons zu variieren. Dieses sollte zum einen durch Einführung eines metabolisierbaren Linkers als auch durch die Änderung der lipophilen Eigenschaften des Pharmakons selbst erreicht werden.

In dem ersten Schritt wurden die Eduktparameter der Reaktion zwischen den Disuccinimidylestern und den Modellpeptiden bestimmt. Hierbei wurden bei einem Eduktverhältnis Disuccinimidylester / Peptid = 5 / 1 Ausbeuten von > 90% erzielt. Die weitere Umsetzung mit DFO-B zum DFO-B-Linker-Peptid erfolgte rasch mit vergleichbaren Ausbeuten. Ausnahme dabei stellte das Phe-His dar, daß aufgrund der Bildung von instabilen Histidylestern nur Ausbeuten von 60% ergab. Die optimierten Bedingungen wurden zur Darstellung von zwei Octreotid-Derivaten verwendet. Als verbrückende Dicarbonsäuren wurden in

Anlehnung an die Synthese von DFO-B-Succinyl-Octreotid anstatt Bernsteinsäure (C2) die Glutarsäure (C3) und Korksäure (C6) verwendet. Im Rahmen dieser Synthesen wurden die Reaktionsführung beider Teilreaktionen in einer Art „Eintopfsynthese“ vereinigt. Diese Reaktion lieferte Gesamtausbeuten von 75% für [DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid und [DFO-B-Suberyl-(D)Phe¹]-Octreotid. Die anschließende Markierung erfolgte quantitativ mit ⁶⁷Ga, welches am Kompaktzyklotron über die ^{nat}Zn(p,xn)⁶⁷Ga-Kernreaktion produziert worden war.

Die Lipophilie (logP) der ⁶⁷Ga-markierten Octreotid-Derivate wurde bestimmt. Die lipophilen Eigenschaften der synthetisierten Octreotide waren durch die Variation der Linker unterschiedlich, wobei interessanterweise keine lineare Abhängigkeit der Lipophilie von der Länge der Alkylkette in der Linkerstruktur gefunden wurde. Die größte Lipophilie konnte von dem ⁶⁷Ga-[DFO-B-Suberyl-(D)Phe¹]-Octreotid erwartet werden. Der Verteilungskoeffizient (logP) im Octanol-Wasser-System war -1.48 bei pH 5-7, und nahm bis pH 8 auf -1.1 zu. Das ⁶⁷Ga-[DFO-B-Glutaryl-(D)Phe¹]-Octreotid hingegen zeigte mit logP-Werten von -1.85 (pH 5-7) und -1.41 (pH 8) im Verhältnis zum ⁶⁷Ga-[DFO-B-Succinyl-(D)Phe¹]-Octreotid (log P: -1.56 (pH 5-7) und -1.23 (pH 8)) unerwartet niedrige Verteilungskoeffizienten.

Diese lipophilen Eigenschaften sollte sich im Tiermodell durch Änderungen des Verhältnisses zwischen renaler und hepatobilärer Ausscheidung widerspiegeln. Im Rattenmodell konnte tatsächlich gezeigt werden, daß bei vergleichbarer Somatostatin-Rezeptor-Affinität die hepatobiläre Ausscheidung mit steigender Lipophilie der Derivate zunahm. Dies hätte Konsequenzen für die Entwicklung weniger Nieren-aktiver Octreotid-Derivate.

Die Untersuchungen der metabolischen Stabilität zeigten eine gegenüber dem ⁸⁸Y-DTPA-Octreotid-System langsamere Freisetzung des Radiometalles, wobei nach 120 min p.i. auch hier kein intaktes Radiopharmakon mehr nachgewiesen werden konnte. Dieser Umstand erfordert darum eine weitere Minimierung der in vivo-Freisetzung von Ga(III).

Die dargestellten Octreotid-Derivate wurden hinsichtlich ihrer Affinität zu Somatostatin-Rezeptoren in Organen mit erhöhter SRIF-Rezeptor-Dichte verglichen. Hierbei zeigte sich, daß sowohl das ⁸⁸Y- als auch die ⁶⁷Ga-Octreotid-Derivate in Nebenniere, Pankreas und Hypophyse, den Organen, in denen hohe SRIF-Rezeptor-Dichten nachgewiesen wurden, bevorzugt akkumulierten. Die absoluten Anreicherungen in diesen Organen waren jedoch für die vier untersuchten Octreotid-Derivate verschieden. Ein Vergleich mit Literatur-Daten bereits evaluierter Octreotid-Derivate belegte, daß offensichtlich die Verteilung auf diese Organe eine individuelle Größe jedes einzelnen Pharmakons war und weiterhin von der Anwesenheit SRIF-Rezeptor-exprimierender Tumore abhing.

8. Abkürzungsverzeichnis

Arsenazo	(2,2'-[1,8-Di-Hydroxy-3,6-Di-Sulfo-2,7-Naphthalen-Bis-(Azo)]-Debenzol-Arsenige-Säure
β_n	Gesamt-Bildungskonstante; Gesamt-Stabilitätskonstante
$\beta_{MA}; \beta_{MB}$	Gesamt-Stabilitätskonstante des Komplexes MA; MB
Bkg	Background; Hintergrundaktivität
BOC	tert.-Butyloxycarbonyl
Bq	Bequerel; (Zerfälle/sec)
BSA	Bovine serum albumin; Rinderserum-Albumin
BV	Bioverteilung
CDTA	Diaminocyclohexantetraessigsäure
CDTPA	Cyclohexyl-DTPA
cf.	confer
Ci	Curie ($3.7 \cdot 10^{10}$ Bq)
E_A	Aktivierungsenergie
EC	Elektronen-Einfang
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTMP	Ethylendiamintetramethylphosphonsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DFO-B	Desferrioxamin B
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOTA	Tetraazadodekantetraessigsäure
DSG	Disuccinimidylglutarat
DSP	Dithiobis-(succinimidylpropionat)
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTPA-BA	DTPA-Bisanhydrid
DTPA-PA	DTPA-Propylamid
DTPA-PE	DTPA-Propylester
EGS	Ethylenglycolbis-(succinimidylsuccinat)
γ	Aktivitätskoeffizient der Debye-Hückel-Theorie
Gly	Glycin
HBED	N,N'-Bis(2-Hydroxybenzyl)-Ethylendiamindiessigsäure
His	Histidin
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I	Ionenstärke
IgG	Immunoglobulin G
IT	Innere Konversion
k	Geschwindigkeitskonstante
k_T	Geschwindigkeitskonstante in temperaturabhängigen Versuchen
k_Y	Geschwindigkeitskonstante in Isotopenaustauschreaktionen
k_I	Geschwindigkeitskonstante in Ionenstärke-abhängigen Versuchen
K_{GI}	Gleichgewichtskonstante
$K_{GI/K}$	Gleichgewichtskonstante in Abhängigkeit vom Protonierungsgrad
$K_{Hydr.x}$	Gesamt-Hydrolysekonstante des Metall-Aquo-Komplexes
$K_{GI/B}$	Gleichgewichtskonstante in Abhängigkeit von der Metall-Hydrolyse
K_{sk}	Säuredissoziationsgleichgewichte
K_n	schrittweise Bildungskonstanten
λ	Austauschgrad

log P	= ($C_{\text{Octanol}}/C_{\text{Wasser}}$); Lipophilie
L.V.	Ligand-Ligand-Verdrängungsreaktion
M	Molmasse
NHS-	N-Hydroxysuccinimid-
PET	Positron emission tomography; Positronenemissionstomographie
Phe	Phenylalanin
p.i.	post injectionem; Nach Injektion
ROI	Regend of interest
%ID/g	Prozent injizierte Dosis pro Gramm Gewebe
RP-	Reversed-Phase-
RT	Raumtemperatur
SAX	Anionenaustauscher; Trimethylaminopropyl-Phase
Ser	Serin
<i>p</i> -SCN-Bz-DOTA	<i>p</i> -Isothiocyanatobenzyl-DOTA
<i>p</i> -SCN-Bz-DTPA	<i>p</i> -Isothiocyanatobenzyl-DTPA
SDZ 204-090	[Tyr ³]-Octreotid
SDZ 215-811	[DTPA-(D)Phe ¹]-Octreotid
SDZ 216-927	[DFO-B-Succinyl-(D)Phe ¹]-Octreotid
SMS 201-995	Octreotid®; Somatostatin-analoges Peptid (Sandoz)
SPET	Single photon emission tomography; Einzelphotonenemissionstomography
SRIF	Somatotropin Release Inhibiting Factor
T _{1/2}	Halbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
TETA	Tetraazatetradekantetraessigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
TTHA	Triethylentetraminhexaessigsäure
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

9. Literaturverzeichnis

- [1] G.Hevesy, *Chem.News* 108, 166 (1913)
- [2] E.O.Lawrence, *Phys.Rev.* 38, 834 (1932)
- [3] M.M.Ter-Pogossian, *Spektrum der Wissenschaft* 12, 121 (1980)
- [4] G.Stöcklin, In: *Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1B , Emissionscomputertomographie mit kurzlebigen zyklotronproduzierten Radionukliden*, Springer-Verlag (1989)
- [5] K.Wienard, R.Wagner, W.D.Heiss, *PET-Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie*, Springer-Verlag (1989)
- [6] M.M.Ter-Pogossian, In: *Principles of Nuclear Medicine; 19: Positron Emission Tomography*, 342-377, W.R.Saunders Company (1995)
- [7] J.Jaszcek, M.W.Tsui, In: *Principles of Nuclear Medicine; 18: Single Photon Emission computed Tomography*, 317-327, W.R.Saunders Company (1995)
- [8] F.H.Fahey, B.A.Harkness, In: *Nuclear Medicine, 19: SPECT Imaging with Rotating Gamma Camera Systems*, 232-246, Mosby-Year Book, Inc. (1996)
- [9] D.L.Bailey, J.A.Parker, In: *Nuclear Medicine in Clinical Diagnosis and Treatment; 109: Single Photon Emission Computed Tomography*, 1315-1326, CHURCHILL LIVINGSTONE Edinburgh London Madrid Melbourne New York and Tokyo (1994)
- [10] S.M.Qaim, G.Stöcklin, *Radiochim.Acta* 34, 25-40 (1983)
- [11] F.Helus (Ed.), *Radionuclide Production*, Boca Raton, Fla: CRC Press (1983)
- [12] R.M.Lambrecht, *Radiochim.Acta* 34, 9-24 (1983)
- [13] A.M.Mauer, *J.Lab.Clin.Med.* 120, 828-830 (1992)
- [14] R.P.Spencer, In: *Nuclear Medicine in Clinical Diagnosis and Treatment, 55: Tumor-seeking radiopharmaceuticals: nature and mechanisms*, 649-665, CHURCHILL LIVINGSTONE Edinburgh London Madrid Melbourne New York and Tokyo (1994)
- [15] G.Stöcklin, V.W.Pike (Eds.), *Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography, Methodological Aspects*, Kluwer Academic Publishers (1993)
- [16] U.K.Brunner, O.Renn, M.Li, C.F.Meares, In: *Principles of Nuclear Medicine; 6: Radio metals and Their Chelates*, W.B.Saunders Company (1995)
- [17] S.C.Srivastava, R.C.Mease, *Nucl.Med.Biol.* 18, 589-603 (1991)
- [18] L.Yuanfang, W.Chuanchu, *Pure&Appl.Chem.* 63, 427-463 (1991)
- [19] S.Jurisson, D.Berning, W.Jia, D.Ma, *Chem.Rev.* 93, 1137-1156 (1993)
- [20] W.D.Tucker, M.W.Greene, *Am.Nucl.Soc.* 1, 160 (1958)
- [21] S.J.Lippard, J.M.Berg, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag (1995)
- [22] M.N.Hughes (Ed.), *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*, John Wiley&Sons (1981)
- [23] R.Loewinger, E.Tapha, G.Brownell [Ed.], In: *Radiation Dosimetry: Discrete Radioisotope Sources*, 693-799, Academic Press, New York (1956)
- [24] A.R.Fritzberg, R.W.Berninger, S.W.Hadley, D.W.Wester, *Pharm.Res.* 5, 325-334 (1988)
- [25] L.F.Mausner, S.C.Srivastava, *Med.Phys.* 19, 503-509 (1993)

- [26] W.A.Volkert, W.F.Goeckeler, G.J.Ehrhardt, A.R.Ketring, *J.Nucl.Med.* 32, 174-185 (1991)
- [27] B.W.Wessels, R.D.Rogers, *Med.Phys.* 11, 638-645 (1984)
- [28] W.J.Skraba, H.Arino, H.H.Kramer, *Int.J.Appl.Rad.Isot.* 29, 91-96 (1978)
- [29] F.Rösch, S.M.Qaim, G.Stöcklin, *Appl.Radiat.Isot.* 44, 677-681 (1993)
- [30] R.Tailleur, R.Lambert, C.D.Phaneuf, L.Leveille, *J.Nucl.Med.* 33, 1091-1098 (1992)
- [31] G.M.Blake, M.A.Zivanovic, R.M.Blaquiere, *J.Nucl.Med.* 29, 549-557 (1988)
- [32] S.M.Larson, D.R.Allen, J.S.Rasey, Z.Greenbaum, *J.Nucl.Med.* 19, 1245-1249 (1978)
- [33] H.Herzog, F.Rösch, G.Stöcklin, C.Lueders, S.M.Qaim, L.E.Feinendegen, *J.Nucl.Med.* 34, 2222 (1993)
- [34] K.Fellinger, J.Schmid, *Z.inn.Med.* 33, 351 (1952)
- [35] B.M.Ansell, A.Crook, J.R.Mallard, E.G.L.Bywaters, *Ann.Rheum.Dis.* 22, 435 (1963)
- [36] G.E.Krejcarek, K-L-Tucker, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 77, 581 (1977)
- [37] D.J.Hnatowich, W.W.Layne, R.L.Childs, *Science* 220, 613 (1983)
- [38] S.M.Yeh, D.G.Sherman, C.F.Meares, *Analyt.Biochem.* 100, 152 (1979)
- [39] C.F.Meares, M.J.McCall, D.T.Reardan, D.A.Goodwin, C.I.Diamanti, M.McTigue, *Analyt.Biochem.* 142, 68 (1984)
- [40] D.M.Goldenberg, *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 113, 203-208 (1987)
- [41] O.A.Gansow, *Nucl.Med.Biol.* 18, 369-381 (1991)
- [42] L.C.Washburn, T.T.Sun, *Nucl.Med.Biol.* 18, 313-321 (1991)
- [43] D.J.Hnatowich, *Nucl.Med.Biol.* 17, 49-55 (1990)
- [44] J.Pless, U.Briner, U.Doepfner, P.Marbach, R.Maurer, T.J.Petcher, J.C.Reubi, *Scand.J.Gastroenterol.* 21, 54-64 (1986)
- [45] J.C.Reubi, *Life Sciences* 36, 1829-1836 (1985)
- [46] S.W.J.Lamberts, E.P.Krenning, J.C.Reubi, *Endocrine Reviews* 12, 450-482 (1991)
- [47] E.P.Krenning, S.W.J.Lamberts, J.C.Reubi, In: *Principles of Nuclear Medicine; 46: Neuroendocrine and Other Tumors*, 1104-1110, W.B.Saunders Company (1995)
- [48] S.Reichlin, *N.Eng.J.Med.* 309, 1495-1501 und 1556-1562 (1983)
- [49] W.Bauer, U.Briner, J.Pless, *Life Science* 31, 1133-1140 (1982)
- [50] F.Raulf, J.Perez, D.Hoyer, C.Bruns, *Digestion* 55, 46-53 (1994)
- [51] J.Pless, W.Bauer, U.Briner, W.Doepfner, P.Marbach, R.Maurer, T.Petcher, J.C.Reubi, J.Vanderscher, *Int.Congr.Ser.-Excerpta Med.* 683, 319 (1986)
- [52] W.H.Bakker, E.P.Krenning, W.H.Breeman, L.J.Hofland, P.Marbach, J.Pless, J.W.Koper, S.W.J.Lamberts, T.J.Visser, *Life Sciences* 49, 1583-1591 (1991)
- [53] P.M.Smith-Jones, B.Stolz, C.Bruns, R.Albert, H.W.Reist, R.Freidrich, H.R.Mäcke, *J.Nucl.Med.* 35, 317-325 (1994)
- [54] B.Stolz, T.Marina, R.Albert, C.Bruns, P.Koch, H.Mäcke, *Eur.J.Nucl.Med.* 21, 437-444 (1994)
- [55] J.Brockmann, F.Rösch, H.Herzog, B.Stolz, C.Bruns, G.Stöcklin, *J.Label.Compds.Radiopharm.* 27, 519-521 (1995)
- [56] H.J.Wester, J.Brockmann, F.Rösch, B.Stolz, W.Wutz, H.Herzog, P.M.Smith-Jones, C.Bruns, G.Stöcklin, *J.Nucl.Med.* 36, 113-114 (1995)
- [57] W.H.Bakker, E.P.Krenning, W.H.Breeman, J.W.Koper, P.P.Koolj, J.C.Reubi, J.G.Klijn, T.J.Visser, R.Docter, S.W.J.Lamberts, *J.Nucl.Med.* 31, 1501-1509 (1990)

- [58] M.Sundberg, C.F.Meares, D.A.Goodwin, C.T.Diamanti, *Nature* 250, 587-588 (1974)
- [59] D.J.Hnatowich, W.W.Layne, R.L.Childs, *Int.J.Appl.Radiat.Isot.* 33, 327-332 (1982)
- [60] D.J.Hnatowich, R.L.Childs, D.Lanteigne, A.Najafi, *J.Immuno.Methods.* 65, 147-157 (1983)
- [61] H.R.Mäcke, A.Riesen, W.Ritter, *J.Nucl.Med.* 30, 1235-1239 (1989)
- [62] D.J.Hnatowich, *Nucl.Med.Biol.* 17, 49 (1986)
- [63] W.C.Cole, S.J.DeNardo, C.F.Meares, *J.Nucl.Med.* 28, 83 (1987)
- [64] R.C.Mease, S.C.Srivastava, *J.Nucl.Med.* 29, 1324 (1988)
- [65] R.C.Mease, S.C.Srivastava, G.E.Meinken, Z.Steplewski, *J.Nucl.Med.* 30, 934 (1989)
- [66] R.C.Mease, S.C.Srivastava, C.Lambert, G.E.Meinken, Z.Steplewski, *J.Label.Compds.Radiopharm.* 30, 196 (1990)
- [67] M.K.Moi, C.F.Meares, *J.Am.Chem.Soc.* 110, 6266 (1988)
- [68] J.P.L.Cox, K.J.Jankowski, R.Kataky, D.Parker, N.R.A.Beely, B.A.Boyce, M.A.W.Eaton, K.Miller, A.T.Millican, A.Harrison, C.Walker, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.*, 797-798 (1989)
- [69] C.F.Meares, T.G.Wensel, *Acc.Chem.Res.* 17, 202 (1984)
- [70] R.G.Buckley, P.Barnett, F.Searle, R.Pedley, J.A.Boden, *Eur.J.Nucl.Med.* 12, 394 (1986)
- [71] M.W.Brechbiel, O.A.Gansow, R.W.Atcher, *Inorg.Chem.* 25, 2772 (1986)
- [72] K.K.Bhargava, Z.Y.Zhang, B.S.Chun, *J.Labe.Compds.Radiopharm.* 30, 216 (1990)
- [73] J.Schumacher, R.Matys, H.Hauser, W.Maier-Borst, S.Matzku, *Eur.J.Nucl.Med.* 12, 397 (1986)
- [74] R.C.Mease, S.C.Srivastava, G.E.Meinken, Z.Steplewski, *J.Label.Compds.Radiopharm.* 30, 319 (1990)
- [75] R.C.Mease, S.C.Srivastava, G.E.Meinken, Z.Steplewski, *J.Nucl.Med.* 31, 896 (1990)
- [76] S.C.Srivastava, R.C.Mease, G.E.Meinken, L.F.Mausner, Z.Steplewski, *Acta Radiol.Suppl.* , 374 (1991)
- [77] M.K.Moi, C.F.Meares, M.J.McCall, W.C.Cole, S.J.DeNardo, *Anal.Biochem.* 148, 249 (1985)
- [78] S.V.Deshpande, S.J.DeNardo, D.L.Kukis, *J.Nucl.Med.* 31, 473 (1990)
- [79] O.A.Gansow, K.Kumar, M.W.Brechbiel, *J.Nucl.Med.* 31, 824 (Abstr.) (1990)
- [80] L.C.Washburn, Y.Lee, T.T.H.Sun, *J.Nucl.Med.* 31, 824 (Abstr.) (1990)
- [81] S.F.Carroll, S.L.Bernard, D.A.Goff, R.J.Bauer, W.Leach, A.H.C.Kung, *Bioconjugate Chem.* 5, 248-256 (1994)
- [82] Y.Arano, T.Inoue, T.Mukai, K.Wakisaka, H.Sakahara, J.Konishi, A.Yokoyama, *J.Nucl.Med.* 35, 326-333 (1994)
- [83] S.V.Deshpande, S.J.DeNardo, C.F.Meares, M.J.McCall, G.P.Adams, G.L.DeNardo, *Nucl.Med.Biol.* 16, 587-597 (1989)
- [84] C.H.Paik, S.M.Quadri, R.C.Reba, *Nucl.Med.Biol.* 16, 475-481 (1989)
- [85] M.C.Ward, K.R.Roberts, J.H.Westwood, R.C.C.Coombes, V.R.McCready, *J.Nucl.Med.* 27, 1746-1750 (1986)
- [86] J.D.Rodwell, V.L.Alvarez, C.Lee, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83, 2632-2636 (1983)
- [87] C.F.Meares, M.J.McCall, S.V.Deshpande, *Int.J.Cancer.* 2, 99 (1988)
- [88] P.A.Williams, A.R.Peacock, *Biochem.J.* 105, 1177 (1967)

- [89] R.W.Kozak, A.Raubitschek, S.Mirzadeh, M.W.Brechbiel, R.Junghaus, O.A.Gansow, A.Waldmann, *Cancer Res.* **49**, 2639-2644 (1989)
- [90] J.H.Huheey, *Anorganische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin New York (1988)
- [91] A.E.Martell, R.M.Smith, *Critical Stability Constants 1-6*, Plenum Press, New York (1974-1989)
- [92] F.Rosotti, H.Rosotti, *Determination of Stability Constants*, McGraw-Hill Book Company (1961)
- [93] A.Ringbom, *Complexation in Analytical Chemistry*, Interscience, New York (1963)
- [94] F.Basolo, R.G.Pearson, *Mechanismen in der anorganischen Chemie; Eine Untersuchung von Metall-Komplexen in Lösung*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1973)
- [95] A.E.Martell, *Coordination Chemistry, Vol.2*, ACS Monograph 174; American Chemical Society, Washington D.C. (1978)
- [96] G.Anderegg, *Pure&Appl.Chem.* **54**, 2693 (1982)
- [97] E.F.Pfeiffer, G.M.Reaven, *Somatostatin Receptor Imaging*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1992)
- [98] J.W.Yabro, R.S.Bornstein, M.J.Mastrangelo, *Seminars in Oncology* **21** (1994)
- [99] M.V.Lanahan, L.A.Bass, M.J.Welch, C.J.Anderson, *J.Label.Compds.Radiopharm.* **27**, 510-512 (1995)
- [100] P.M.Smith-Jones, B.Stolz, R.Albert, G.Ruser, H.Mäcke, U.Briner, L.Tolcsvai, G.Weckbecker, C.Bruns, *J.Label.Compds.Radiopharm.* **27**, 499-501 (1995)
- [101] W.T.Anderson-Berg, R.A.Scurie, M.Strand, *Cancer Research* **47**, 1905-1912 (1987)
- [102] C.H.Taliaferro, R.J.Motekaitis, A.E.Martell, *Inorg.Chem.* **23**, 1188-1192 (1984)
- [103] K.H.Lieser, *Einführung in die Kernchemie*, Verlag Chemie, Weinheim, (1980)
- [104] V.Majer, *Grundlagen der Kernchemie*, Johann Ambrosius Barth, Leipzig (1982)
- [105] H.A.C.McKay, *Principles of Radiochemistry*, Butterworth, London (1971)
- [106] K.M.Subramanian, W.Wolf, *J.Nucl.Med.* **31**, 480 (1990)
- [107] A.D.Sherry, W.P.Cacheris, K.T.Kuan, *Magn.Reson.Med.* **8**, 180-190 (1988)
- [108] H.Michael, H.Rosezin, H.Apelt, G.Blessing, S.M.Qaim, *Int.J.Appl.Radiat.Isot.* **32**, 581 (1981)
- [109] F.Rösch, S.M.Qaim, G.Stöcklin, *Radiochim.Acta* **61**, 1 (1993)
- [110] A.E.Martell, R.J.Motekaitis, *Determination and Use of Stability Constants*, VCH Publishers, New York (1992)
- [111] G.Gran, *Analyst* **77**, 661 (1952)
- [112] C.Hansch, *Accounts Chem.Res.* **2**, 232 (1969)
- [113] A.Leo, C.Hansch, D.Elkins, *Chem.Rev.* **71**, 525-616 (1971)
- [114] E.Rota Kops, H.Herzog, A.Schmid, S.Holte, L.E.Feinendegen, *J.Assist.Comput.Tomogr.* **14**, 437-445 (1990)
- [115] A.Najafi, R.L.Childs, D.J.Hnatowich, *Int.J.Appl.Radiat.Isot.* **35**, 554 (1984)
- [116] R.G.Buckley, F.Searle, *FEBS Letters* **166**, 202 (1984)
- [117] D.J.Hnatowich, F.Virzi, P.W.Doherty, *J.Nucl.Med.* **26**, 503-509 (1985)
- [118] A.Harrison, C.A.Walker, D.Parker, *Nucl.Med.Biol.* **18**, 469-476 (1991)
- [119] A.Ohyoshi, *J.Inorg.Nucl.Chem.* **34**, 1955-1960 (1972)
- [120] J.B.Stimmel, M.E.Stockstill, F.C.Kull, *Bioconjugate Chem.* **6**, 219-225 (1995)
- [121] P.Glenworth, D.A.Newton, *J.Inorg.Nucl.Chem.* **33**, 1701 (1971)

- [122] D.W.Magerum, D.L.Janes, H.M.Rosen, *J.Am.Chem.Soc.* 87, 4463 (1965)
- [123] R.J.Motekaitis, A.E.Martell, *Inorg.Chem.* 19, 1646-1651 (1980)
- [124] W.J.Moore, D.O.Hummel, *Physikalische Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, New-York (1976)
- [125] G.A.Nyssen, D.W.Margerum, *Inorg.Chem.* 9, 1815-1821 (1970)
- [126] C.W.Davies, *Ion Association*, Butterworth, London (1962)
- [127] M.N.Hughes, *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*, John Wiley&Sons (1981)
- [128] I.Svago, In: *Biocoordination Chemistry; Metal Complexes of Peptides and their Derivatives*, Ellis Horwood Limited, England (1990)
- [129] R.J.Motekaitis, A.E.Martell, *Can.J.Chem.* 60, 168 (1982)
- [130] G.Schwarzenbach, *Die Komplexometrische Titration*, Ferdinand Enke, Stuttgart (1955)
- [131] R.J.Motekaitis, A.E.Martell, *Can.J.Chem.* 60, 2403 (1982)
- [132] W.R.Harris, A.E.Martell, *Inorg.Chem.* 15, 713-720 (1976)
- [133] W.R.Harris, R.J.Motekaitis, A.E.Martell, *Inorg.Chem.* 14, 975-979 (1975)
- [134] G.Schwarzenbach, E.Freitag, *Helv.Chim.Acta* 34, 1492 (1951)
- [135] E.Tomlinson, *J.Chromatogr.* 113, 1-45 (1975)
- [136] G.Fricker, V.Dubost, D.Schwab, C.Bruns, C.Thile, *Hepatology* 20, 191-200 (1994)
- [137] G.Beschiaschvili, J.Seelig, *Biochemistry* 29, 10995 (1990)
- [138] G.Rowlinson-Busza, D:Snook, A.A.Epenetos, *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 28, 1257-1265 (1994)
- [139] H.Bickel, E.Gäumann, W.Keller-Schierlein, V.Prelog, E.Vischer, A.Wettstein, H.Zähner, *Experientia* 16, 129 (1960)
- [140] G.Schwarzenbach, K.Schwarzenbach, *Helv.Chim.Acta* 22, 1390-1400 (1963)
- [141] G.Anderegg, F.L'Eplattenier, G.Schwarzenbach, *Helv.Chim.Acta* 22, 1409-1422 (1963)
- [142] G.A.Janoki, J.F.Harwig, W.Chanachai, W.Wolf, *Int.J.Appl.Radiat.Isot.* 34, 871-877 (1983)
- [143] Y.Ohmomo, A.Yokoyama, J.Susuki, H.Tanaka, *Eur.J.Nucl.Med.* 7, 458 (1982)
- [144] C.Motta-Hennessy, S.A.Eccles, C.Dean, G.Coghlan, *Eur.J.Nucl.Med.* 11, 240-245 (1985)
- [145] S.S.Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Inc., Boca Raton (1991)
- [146] S.M.Waugh, E.E.DiBella, P.F.Pilch, *Biochemistry* 28, 3448-3455 (1989)
- [147] P.F.Pilch, M.P.Czech, *J.Biol.Chem.* 254, 3375-3381 (1979)
- [148] A.J.Lomant, G.Fairbanks, *J.Mol.Biol.* 104, 243-261 (1976)
- [149] R.M.Abdella, P.K.Smith, G.P.Royer, *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 87, 734-742 (1979)
- [150] P.Cuatrecasas, I.Parikh, *Biochemistry* 11, 2291-2299 (1972)
- [151] D.H.Rich, J.Singh, *The Carbodiimid Method. In: Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol.1., Major Methods of Peptide Bond Formation, Kap.5*, Academic Press, New York (1979)
- [152] E.Schnabel, H.Klostermeyer, H.Berndt, *Liebigs Ann.Chem.* 749, 90-108 (1971)

- [153] J.E.Haky, A.M.Young, *J.Liquid Chrom. Z.* 675-689 (1984)
- [154] M.S.Mirrlees, S.J.Moulton, C.T.Murphy, P.J.Taylor, *J.Med.Chem.* 19, 615-619 (1976)
- [155] G.Beschiaschvilli, J.Seelig, *Biochemistry* 31, 10044-10053 (1992)
- [156] G.Beschiaschvilli, J.Seelig, *Biochim.Biophys.Acta* 1061, 78-84 (1991)
- [157] W.A.Banks, A.J.Kastin, *Brain Res.Bull.* 15, 287-292 (1985)
- [158] J.Seelig, S.Nebel, P.Ganz, C.Bruns, *Biochemistry* 32, 9714-9721 (1993)
- [159] M.deJong, W.H.Bakker, W.A.P.Breeman, M.E.van de Pluijm, P.P.M.Kooij, T.J.Visser, R.Docter, E.P.Krenning, *J.Nucl.Med.* 34, 2025-2030 (1993)
- [160] M.Birus, Z.Bradic, G.Krznaric, N.Kujundzic, M.Pribanic, P.C.Wilkins, R.G.Wilkins, *Inorg.Chem.* 26, 1000-1005 (1987)
- [161] B.Monzyk, A.L.Crumbliss, *J.Am.Chem.Soc.* 104, 4912-4929 (1982)
- [162] J.C.Reubi, J.Rivier, M.Perrin, M.Brown, W.Vale, *Endocrinology* 110, 1049-1051 (1982)
- [163] G.Pfeiffer, *Nucl.Med.* 15, 273 (1976)
- [164] B.Neumaier, *Dissertation Universität zu Köln* (1995)
- [165] J.C.Reubi, M.Perrin, J.Rivier, W.Wale, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 105, 1538-1545 (1982)
- [166] R.Raulf, J.Perez, D.Hoyer, C.Bruns, *Hormone and Metabolic Research, Suppl.Ser.* 27, 4-11 (1993)
- [167] W.H.Bakker, E.P.Krenning, J.C.Reubi, W.A.P.Breeman, B.Setyono-Han, M.deJong, P.P.M.Kooij, C.Bruns, P.M.van Hagen, P.Marbach, T.J.Visser, J.Pless, S.W.J.Lamberts, *Life Science* 49, 1593-1601
- [168] H.J.Wester, persönliche Mitteilung, Forschungszentrum Jülich GmbH
- [169] G.Srkalovic, R.Z.Cai, A.V.Schally, *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 70, 661 (1990)
- [170] W.A.P.Breeman, L.J.Hofland, M.van der Pluijm, P.M.van Koetsfeld, M.deJong, B.Setyono-Han, W.H.Bakker, D.J.Kwekkeboom, T.J.Visser, S.W.J.Lamberts, E.P.Krenning, *Eur.J.Nucl.Med.* 21, 328-335 (1994)
- [171] T.Maina, B.Stolz, R.Albert, C.Bruns, P.Koch, H.Mäcke, *Eur.J.Nucl.Med.* 21, 437-444 (1994)
- [172] W.A.P.Breeman, L.J.Hofland, W.H.Bakker, M. van der Pluijm, P.M. van Koetsveld, M. deJong, B.Setyono-Han, D.J.Kwekkeboom, T.J.Visser, S.W.J.Lamberts, E.P.Krenning, *Eur.J.Nucl.Med.* 20, 1089-1094 (1993)

Danksagung

Herrn PD. Dr. S. M. Qaim und Herrn Prof. Dr. G. Stöcklin danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und wertvollen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Rösch nicht nur für die ständige Unterstützung sowie für die fachliche Diskussion sondern darüberhinaus für das angenehme Arbeitsklima und die motivierenden „Schulterklopfer“.

Bei den Herren Dr. K. Hamacher und Dr. M. Holschbach möchte ich mich für ihre uneigennützige Hilfe bei theoretischen und experimentellen Fragestellungen bedanken.

Herrn Dr. H. J. Wester möchte ich für die intensive Zusammenarbeit im Rahmen der Markierung von SMS 201-995 danken sowie für die gewinnbringenden, freundschaftlichen und nikotinreichen Diskussionen.

Meinen Kommilitonen, den Herrn Dipl. Chem. F.O.Denzler, Dr. B. Neumaier und Dipl. Chem. A. Klein danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und der kollegialen Atmosphäre.

Zudem danke ich Herrn W. Wutz für die Durchführung tierexperimenteller Studien.

Auch danke ich den Betriebsgruppen des Kompaktzyklotron CV 28 und des Babyzyklotrons des Instituts für Nuklearchemie des Forschungszentrums Jülich GmbH für die Durchführung der Bestrahlungen.

Mein genereller Dank gilt allen Kollegen der Forschungs- und Routinelabors des Instituts für Nuklearchemie für das herzliche, unkomplizierte und außergewöhnlich angenehme Arbeitsklima.

Für die Bereitstellung des Boc-Octreotids danke ich der SANDOZ AG, Basel.

Für die Durchführung von Untersuchungen am PET-Tomographen danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. H. Herzog.

Nicht zuletzt danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung in dieser Zeit im Rahmen der DFG-Beihilfe Ro 985/2-2.

Jül-3316
Dezember 1996
ISSN 0944-2952