

Synthese, Radioiodierung und Evaluierung von neuen MGMT-Inhibitoren und ihren Glucose-Konjugaten

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
vorgelegt von

Ute Mühlhausen
geboren in Worms

Mainz 2005

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 6 |
| 1.1 | Radioaktive Markierungsisotope in den Lebenswissenschaften | 6 |
| 1.2 | Verwendung von Radioiod in den Lebenswissenschaften | 8 |
| 1.3 | Herstellung medizinisch relevanter Iodisotope | 9 |
| 1.3.1 | Iod-123 | 9 |
| 1.3.2 | Iod-131 | 11 |
| 1.3.3 | Iod-124 und Iod-120g | 12 |
| 1.4 | Emissionstomographie | 13 |
| 1.5 | Kernchemische Aspekte bei der Verwendung von Radionukliden | 15 |
| 1.6 | Methoden zur Radioiodierung organischer Moleküle | 16 |
| 1.6.1 | Elektrophile Substitution | 16 |
| 1.6.1.1 | Direkte elektrophile Substitution | 16 |
| 1.6.1.2 | Elektrophile Substitution durch Demetallierungsreaktionen | 19 |
| 1.6.2 | Nukleophile Substitution | 20 |
| 1.7 | O ⁶ -Methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT) | 21 |
| 1.7.1 | Das MGMT-Enzym und sein Mechanismus | 22 |
| 1.7.2 | MGMT-Inhibitoren | 24 |
| 1.7.3 | Glucose-konjugierte MGMT-Inhibitoren | 26 |
| 1.7.4 | Radioaktiv-markierte MGMT-Inhibitoren | 27 |
| 2 | Problemstellung | 30 |
| 3 | Ergebnisse und Diskussion der organischen Synthesen | 33 |
| 3.1 | Methoden zur Darstellung von O ⁶ -substituierten Guanin-Derivaten | 33 |
| 3.2 | Darstellung von (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid | 34 |
| 3.3 | Darstellung der Alkohole zur Kopplung an die O ⁶ -Position des Guanins | 35 |
| 3.3.1 | Synthese der Bromothenylalkohole | 35 |
| 3.3.2 | Darstellung von 5-Iodothenylalkohol | 36 |
| 3.4 | Darstellung der O ⁶ -substituierten Guanine | 37 |
| 3.4.1 | Synthese von O ⁶ -substituierten Guaninen unter DMAP-Katalyse | 37 |
| 3.4.2 | Synthese von O ⁶ -substituierten Guaninen durch direkte Reaktion mit dem Trimethylammoniumsalz 1 | 38 |
| 3.4.3 | Versuchte Darstellung von O ⁶ -(5-Iodothenyl)guanin (ITG) | 39 |
| 3.5 | Darstellung der silylgeschützten Guanin-Derivate | 40 |
| 3.6 | Darstellung der Glucoselinker | 41 |
| 3.6.1 | Darstellung des β -Glucoselinkers | 41 |
| 3.6.1.1 | Synthese von Pentabenzoyl-D-glucose | 42 |
| 3.6.1.2 | Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucoopyranosylbromid | 43 |
| 3.6.1.3 | Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose | 43 |
| 3.6.1.4 | Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-glu- copyranosid | 44 |
| 3.6.1.5 | Darstellung von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucoopyranosid (Königs-Knorr) | 44 |
| 3.6.1.6 | Synthese von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucoopyranosid (Trichloracetimidat-Methode) | 45 |
| 3.6.2 | Darstellung des α -Glucoselinkers | 46 |
| 3.7 | Darstellung der Glucose-Konjugate | 49 |
| 3.7.1 | Synthese der geschützten Glucose-Konjugate bei 80 °C | 49 |
| 3.7.2 | Darstellung der geschützten Glucose-Konjugate bei Raumtemperatur | 51 |
| 3.7.3 | Entschützung der Guanin-Glucose-Konjugate | 52 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.8 | Darstellung der Markierungsvorläufer | 54 |
| 3.8.1 | Synthese der Glucose-konjugierten Stannylvorläufer | 54 |
| 3.8.2 | Darstellung der silylgeschützten Stannylvorläufer | 55 |
| 3.8.3 | Darstellung der an der N ⁹ -Position ungeschützten Stannylvorläufer | 57 |
| 3.9 | Tabellarische Übersicht der dargestellten Guanin-Derivate | 58 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion der Radioiodierungen | 60 |
| 4.1 | Identifizierung der radioiodierten Verbindungen | 60 |
| 4.2 | ¹³¹ I-Iodierungen der Glucose-Konjugate | 61 |
| 4.2.1 | Versuchte direkte ¹³¹ I-Iodierung von TGG | 61 |
| 4.2.2 | ¹³¹ I-Iodierung von SnTGG mit CAT unter sauren Bedingungen | 62 |
| 4.2.3 | ¹³¹ I-Iodierungen unter neutralen Bedingungen | 62 |
| 4.2.3.1 | Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹ I-Iodierung von SnBGG und SnTGG von der Reaktionszeit | 63 |
| 4.2.3.2 | Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹ I-Iodierung der Glucose-Konjugate von der CAT-Konzentration | 64 |
| 4.2.3.3 | Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹ I-Iodierung der Glucose-Konjugate von anderen Parametern | 65 |
| 4.3 | ¹³¹ I-Iodierungen der nicht-glycosylierten Guanin-Derivate | 67 |
| 4.3.1 | ¹³¹ I-Iodierungen der silylgeschützten Guanin-Derivate | 67 |
| 4.3.1.1 | Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹ I-Iodierung der silylgeschützten Guanin-Derivate von der Reaktionszeit | 68 |
| 4.3.1.2 | Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹ I-Iodierung der silylgeschützten Guanin-Derivate von der CAT-Konzentration | 69 |
| 4.3.1.3 | Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹ I-Iodierung der silylgeschützten Guanin-Derivate von anderen Reaktionsparametern | 70 |
| 4.3.2 | ¹³¹ I-Iodierungen der an der N ⁹ -Position ungeschützten Guanin-Derivate | 71 |
| 4.3.2.1 | Optimierung der RCA bei der ¹³¹ I-Iodierung von SnBG unter Variation verschiedener Reaktionsparameter | 71 |
| 4.4 | ¹³¹ I-Iodierungen mit Iodogen TM | 74 |
| 4.5 | Abtrennung der radioiodierten Produkte | 74 |
| 4.6 | Stabilität der ¹³¹ I-iodierten Guanin-Derivate | 75 |
| 4.7 | Bestimmung der spezifischen Aktivität von [¹³¹ I]IBGG | 77 |
| 4.8 | ¹²³ I-Iodierungen | 78 |
| 4.9 | Bewertung der Radioiodierungen | 81 |
| 5 | Evaluierungen | 83 |
| 5.1 | Bestimmung der Lipophilie | 83 |
| 5.2 | Bestimmung der IC ₅₀ -Werte | 84 |
| 5.3 | <i>In vitro</i> -Bindung der ¹³¹ I-iodierten Inhibitoren an MGMT | 86 |
| 5.4 | <i>Ex vivo</i> - und <i>in vivo</i> -Tierstudien | 87 |
| 5.4.1 | <i>Ex vivo</i> -Tierstudien mit [¹³¹ I]IBG und [¹³¹ I]IBGG | 88 |
| 5.4.1.1 | <i>Ex vivo</i> -Organ- und Tumorverteilung an tumortragenden Nacktmäusen | 88 |
| 5.4.1.2 | <i>Ex vivo</i> -Organ- und Tumorverteilung an tumortragenden Nacktmäusen nach Gabe von Phloretin | 93 |
| 5.4.2 | <i>Ex vivo</i> -Tierstudien mit [¹³¹ I]ITG und [¹³¹ I]ITGG | 95 |
| 5.4.3 | Vergleich der Biodistributionen der ¹³¹ I-iodierten Thenyl- mit den Benzylguanin-Derivaten | 98 |
| 5.4.4 | <i>In vivo</i> -SPECT-Tierstudien mit [¹²³ I]IBG und [¹²³ I]IBGG | 100 |
| 6 | Experimenteller Teil | 104 |
| 6.1 | Verwendete Chemikalien und Geräte | 104 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.2 | Erläuterungen zu den NMR-Spektren | 107 |
| 6.3 | Darstellung der nicht Glucose-konjugierten Verbindungen | 107 |
| 6.3.1 | (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid | 107 |
| 6.3.2 | 4-Bromothienylalkohol | 108 |
| 6.3.3 | 5-Bromothienylalkohol | 108 |
| 6.3.4 | 5-Iodthiophen-2-carbaldehyd | 108 |
| 6.3.5 | 5-Iodthienylalkohol aus Reduktion des Aldehyds | 109 |
| 6.3.6 | 5-Iodthienylalkohol mit Bis-(trifluoracetoxy)iodbenzol-Iod-System | 109 |
| 6.3.7 | 5-Iodthienylalkohol mit Quecksilberoxid | 109 |
| 6.3.8 | O ⁶ -Thienylguanin (TG) | 110 |
| 6.3.9 | O ⁶ -(5-Iodthienyl)guanin (ITG) | 110 |
| 6.3.10 | O ⁶ -(3-Iodbenzyl)guanin (IBG) | 111 |
| 6.3.11 | O ⁶ -(4-Bromothienyl)guanin (4-BTG) | 111 |
| 6.3.12 | O ⁶ -(5-Bromothienyl)guanin (5-BTG) | 112 |
| 6.3.13 | O ⁶ -(3-Brombenzyl)guanin (BBG) | 112 |
| 6.3.14 | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin (ITGSi) | 113 |
| 6.3.15 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin (IBGSi) | 113 |
| 6.4 | Darstellung der Glucoselinkers | 114 |
| 6.4.1 | Pentabenzoyl- β -D-glucose | 114 |
| 6.4.2 | Pentabenzoyl- α -D-glucose | 114 |
| 6.4.3 | 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucofuranosylbromid | 115 |
| 6.4.4 | 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose | 115 |
| 6.4.5 | 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-glucofuranosid | 116 |
| 6.4.6 | 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucofuranosid | 117 |
| 6.4.7 | 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucofuranosid mit TMSO-triflat als Katalysator | 118 |
| 6.4.8 | 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucofuranosid mit Bortrifluorid-Etherat als Katalysator | 118 |
| 6.5 | Darstellung der Glucose-Konjugate | 119 |
| 6.5.1 | 2-Amino-6-thienyl-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucofuranosid)-purin | 119 |
| 6.5.2 | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucofuranosid)-purin | 119 |
| 6.5.3 | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucofuranosid)-purin | 120 |
| 6.5.4 | 2-Amino-6-(4-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucofuranosid)-purin | 121 |
| 6.5.5 | 2-Amino-6-(5-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucofuranosid)-purin | 121 |
| 6.5.6 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucofuranosid)-purin (Umsetzung bei Raumtemperatur) | 122 |
| 6.5.7 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucofuranosid)-purin (Umsetzung bei 80 °C) | 122 |
| 6.5.8 | 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucofuranosid)-purin | 123 |
| 6.5.9 | 2-Amino-6-thienyl-9-(octyl- α -D-glucofuranosid)-purin (TGG) | 123 |
| 6.5.10 | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl- α -D-glucofuranosid)-purin (ITGG α) | 124 |
| 6.5.11 | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl- β -D-glucofuranosid)-purin (ITGG) | 125 |
| 6.5.12 | 2-Amino-6-(4-bromothienyl)-9-(octyl- α -D-glucofuranosid)-purin (4-BTGG α) | 125 |
| 6.5.13 | 2-Amino-6-(5-bromothienyl)-9-(octyl- β -D-glucofuranosid)-purin (5-BTGG) | 126 |
| 6.5.14 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucofuranosid)-purin (IBGG) | 127 |
| 6.5.15 | 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucofuranosid)-purin (IBGG) | 127 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6.6 | Darstellung der Markierungsvorläufer | 128 |
| 6.6.1 | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)- purin (SnTGSi) mittels präparativer Dünnschichtchromatographie | 128 |
| 6.6.2 | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)- purin (SnTGSi) mittels Säulenchromatographie | 129 |
| 6.6.3 | 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxyme- thyl)-purin (SnBGSi) mittels präparativer Dünnschichtchromatographie | 129 |
| 6.6.4 | 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxyme- thyl)-purin (SnBGSi) mittels Säulenchromatographie | 130 |
| 6.6.5 | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin (SnTGG) | 130 |
| 6.6.6 | 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)- purin (SnBGG) | 131 |
| 6.6.7 | 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9H-purin (SnBG) | 131 |
| 6.7 | Radioiodierungen | 133 |
| 6.7.1 | Identifizierung der radioiodierten Produkte | 133 |
| 6.7.2 | HPLC-Abtrennung der radioiodierten Verbindungen | 134 |
| 6.7.3 | ^{131}I -Iodierung von SnTGG mit Chloramin T im Sauren | 134 |
| 6.7.4 | Allgemeine Vorschrift zur ^{131}I -Iodierung mit CAT im Neutralen | 134 |
| 6.7.5 | Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnTGG | 134 |
| 6.7.6 | Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnBGG | 134 |
| 6.7.7 | Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnTGSi | 134 |
| 6.7.8 | Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnBGSi | 135 |
| 6.7.9 | Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnBG | 135 |
| 6.7.10 | ^{131}I -Iodierung mit Iodogen TM als Oxidationsmittel | 135 |
| 6.7.11 | Bestimmung der spezifischen Aktivität | 135 |
| 6.7.12 | Radioiodierungen mit [^{123}I]Iodid | 135 |
| 6.8 | Bestimmung der Lipophilie | 136 |
| 6.8.1 | Bestimmung der Lipophilie mit der HPLC-Methode | 136 |
| 6.8.2 | Bestimmung der Lipophilie mit der Scheidetrichter-Methode | 136 |
| 6.9 | <i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Evaluierungen | 137 |
| 6.9.1 | Bestimmung der IC ₅₀ -Werte | 137 |
| 6.9.2 | <i>In vitro</i> -Bindung der ^{131}I -iodierten Inhibitoren an MGMT | 137 |
| 6.9.3 | <i>Ex vivo</i> -Biodistributionsstudien mit den nca ^{131}I -iodierten Verbindungen an tumortragenden Nacktmäusen | 137 |
| 6.9.4 | <i>Ex vivo</i> -Biodistributionsstudien mit nca [^{131}I]IBG und [^{131}I]IBGG nach Gabe von Phloretin an tumortragenden Nacktmäusen | 138 |
| 6.9.5 | <i>In vivo</i> -Biodistributionsstudien mit nca [^{123}I]IBG und [^{123}I]IBGG an tumor- tragenden Nacktmäusen mittels Kleintier-SPECT | 138 |
| 7 | Zusammenfassung | 140 |
| 8 | Literatur | 145 |
| 9 | Anhang | 153 |
| A | Verwendete Abkürzungen | 153 |
| B | Radiochemische Ausbeuten bei den Radioiodierungen | 154 |
| C | Organ- und Tumorverteilung von [^{131}I]IBG und [^{131}I]IBGG | 157 |

| | | |
|----------|--|------------|
| D | Organ- und Tumorverteilung von [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG | 160 |
| E | Biodistribution von [¹²³I]IBGG | 163 |
| F | Abbildungsverzeichnis | 164 |
| G | Tabellenverzeichnis | 167 |

1 Einleitung

1.1 Radioaktive Markierungsisotope in den Lebenswissenschaften

Als erster erkannte der ungarische Chemiker Georg von Hevesy (1885 - 1966) die fundamentale Bedeutung von Radionukliden zur Aufklärung physiologischer und chemischer Prozesse. Er verwendete radioaktive Isotope wie ^{32}P und ^{212}Pb , um den Metabolismus von Pflanzen und Tieren *in vivo* zu verfolgen, ohne ihn dabei zu beeinflussen [1]. Für seine Arbeiten über die Verwendung von Isotopen als Indikatoren bei der Erforschung chemischer Prozesse in den Lebenswissenschaften wurde er 1943 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Heute gilt das auf von Hevesy zurückgehende Tracerkonzept als Fundament für die medizinische Diagnostik mittels Emissionstomographie.

Das sogenannte Tracerkonzept in der Nuklearmedizin bedient sich biochemisch relevanter Moleküle, bei denen stabile Atome durch Radionuklide ersetzt werden. Es werden zwei unterschiedliche Konzepte benutzt, das des Isotopentracers und das des Analogtracers. Beim Isotopentracer wird ein stabiles Isotop in einem Molekül gegen ein Radionuklid desselben Elements ausgetauscht. Da sich Isotope normalerweise nicht in ihren chemischen Eigenschaften unterscheiden, ändern sich durch diese Art der radioaktiven Markierung die pharmakokinetischen Eigenschaften des Moleküls nicht [2]. Die meisten in biologischen Systemen vorkommenden Moleküle enthalten Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff, weswegen die Isotope ^{11}C -Kohlenstoff, ^{15}O -Sauerstoff und ^{13}N -Stickstoff als Isotopentracer besonders geeignet scheinen. Die kurzen Halbwertszeiten dieser Nuklide (Tab. 1) schließen jedoch länger andauernde komplizierte Synthesen und die Untersuchung von langen Stoffwechselprozessen aus. Eine Alternative ist die Verwendung eines Analogtracers, bei dem sich die eingesetzten Radionuklide ähnlich den ersetzten Atomen oder Gruppen verhalten. Für solche Fremdmarkierungen gilt das Struktur-Analogie-Prinzip, wonach keine große sterische Änderung stattfindet, solange die ausgetauschten Atome oder Gruppen von ähnlicher Größe sind. So weist z. B. Brom eine ähnliche Größe auf wie eine Methylgruppe und ^{18}F -Fluor wie ein H-Atom. Obwohl nach diesem Prinzip isosterische Verbindungen erhalten werden, ergeben sich häufig Unterschiede in der Ladungsverteilung und der Lipophilie, wodurch sich das physiologische Verhalten der Substanzen deutlich verändern kann. Die veränderten Eigenschaften des Tracers können allerdings auch positive Auswirkungen haben. So erhöht der Ersatz einer Hydroxylgruppe durch Fluor, das ähnliche elektronische Eigenschaften besitzt, die metabolische Stabilität einer Substanz und die Einführung eines Halogenatoms, wie Brom oder Iod, in einen aromatischen Ring die Lipophilie. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Radionuklide zur Markierung organischer Moleküle und ihre Zerfallscharakteristika [3–5] zusammengestellt.

Bei den meisten Radiopharmaka handelt es sich um organische Verbindungen, die in idealer Weise eine stabile Kohlenstoff-Radionuklid-Bindung besitzen, wie sie beispielsweise Halogene ausbilden. Eine weitere Radionuklidgruppe mit interessanten Zerfallscharakteristika sind Metalle wie ^{99m}Tc -Technetium, $^{67/68}\text{Ga}$ -Gallium oder ^{111}In -Indium, die sich allerdings in den meisten Fällen nur über Komplexe an organische Moleküle binden lassen. Dies bringt oft stark veränderte Eigenschaften des Moleküls mit sich.

Mit metallischen Radionukliden lässt sich das Struktur-Analogie-Prinzip nicht so leicht fortführen, da Metalle selten eine stabile Bindung mit Kohlenstoff eingehen und daher über oft störende Komplexkäfige, die eine hohe *in vivo*-Komplexstabilität garantieren müssen, fixiert werden müssen. Dies ist in sofern nachteilig, da es gerade unter den Metallen Radionuklide mit ausgezeichneten Zerfallseigenschaften gibt, von denen einige als Generatorkerne leicht zugänglich sind. Nützliche metallische Radionuklide sind unter anderem ^{99m}Tc -Technetium, $^{67/68}\text{Ga}$ -Gallium, ^{111}In -Indium, ^{90}Y -Yttrium und $^{186/188}\text{Re}$ -Rhenium. Das bekannteste Generatorkern ist ^{99m}Tc -Technetium, das aus ^{99}Mo -Molybdän entsteht und bei nuklearmedizinischen Routineuntersuchungen nicht mehr wegzudenken ist [6].

Tabelle 1: Wichtige „organische“ Radionuklide zur Markierung medizinisch relevanter Moleküle

| Nuklid | Halbwertszeit $t_{1/2}$ / min | Zerfallsart (% Häufigkeit) | $E_{\beta,max}$ / MeV | Haupt- γ -Linien / keV (% Häufigkeit) |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---|
| ^{11}C | 20,3 | β^+ (99,8) EC (0,2) | 0,96 | 511 (162) |
| ^{13}N | 9,96 | β^+ (100) | 1,19 | 511 (200) |
| ^{15}O | 2,03 | β^+ (99,9) EC (0,1) | 1,70 | 511 (200) |
| ^{18}F | 109,7 | β^+ (96,9) EC (3,1) | 0,63 | 511 (194) |
| ^{76}Br | 16,7 h | β^+ (57,2) EC (42,8) | 3,60 | 559,1 (72,3) 657,0 (15,5) 1216,1 (8,68) 2950,6 (7,59) |
| ^{120g}I | 1,35 h | β^+ (56,0) EC (44,0) | 4,0 | 560,4 (73,0) 641,1 (9,1) 1523,0 (11,0) |
| ^{123}I | 13,02 h | EC (100) | - | 27,5 (45,9) 159,0 (83,3) 529,0 (1,39) |
| ^{124}I | 4,18 d | EC (77,1) β^+ (22,9) | 2,14 | 27,5 (30,7) 602,7 (61,0) 722,8 (10,1) 1509,5 (3,01) 1691,0 (10,5) |
| ^{125}I | 60,14 d | EC (100) | - | 27,5 (74,1) 35,5 (6,66) |
| ^{131}I | 8,02 d | β^- (100) | 0,61 (90,4) 0,33 (6,9) | 80,0 (2,62) 284,3 (6,1) 364,5 (81,2) 637,0 (7,3) |

In der nuklearmedizinischen Anwendung von Radionukliden werden heute moderne computergestützte diagnostische Verfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder die Einzel-Photonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) [7], genutzt, um durch Einsatz kurzlebiger, radioaktiv markierter Verbindungen komplexe Stoffwechselvorgänge *in vivo* zu verfolgen. Die Radionuklide werden hierbei häufig zur Markierung von organischen Molekülen benutzt, aber auch teilweise in ihrer anorganischen Form eingesetzt. Das ideale Radionuklid für eine *in vivo*-Diagnostik sollte kein α - oder β^- -Strahler sein, da diese Teilchen auf Grund stark ionisierender Eigenschaften im Körpergewebe dieses nicht ohne Wechselwirkung durchdringen und von den Detektorsystemen registriert werden können. Zum anderen können sie auf zellulärer Ebene große Schäden anrichten, eine Eigenschaft, die man sich bei der Tumorthherapie zu Nutze macht. Außerdem sollte das diagnostisch verwendete Radionuklid entweder γ -Quanten im Energiebereich von etwa 100 - 300 keV emittieren, da dort die Ansprechwahrscheinlichkeit der heute bei der SPECT üblichen Kristallde-

tektoren am größten ist, oder es sollte ein Positronenemitter sein (PET). Das Positron rekombiniert nach wenigen Millimetern im Körpergewebe mit seinem Antiteilchen, dem Elektron, unter Emission zweier 511 keV γ -Quanten, welche dann in PET-Systemen registriert werden. Die Halbwertszeit der verwendeten Nuklide sollte einige Minuten bis Stunden betragen. Je kürzer die Halbwertszeit, desto geringer ist die Strahlenbelastung für den Patienten, was auch wiederholte Untersuchungen, z. B. zur Therapiekontrolle, erlaubt.

1.2 Verwendung von Radioiod in den Lebenswissenschaften

Auf Grund ihrer Strahlungscharakteristika und ihrer Halbwertszeiten eignen sich von den über 30 radioaktiven Iodisotopen nur wenige für eine Anwendung als Tracer. Häufige Anwendung in den Lebenswissenschaften finden die Isotope ^{123}I -Iod ($t_{1/2} = 13,2$ h), ^{125}I -Iod ($t_{1/2} = 60,14$ d) und ^{131}I -Iod ($t_{1/2} = 8,02$ d).

Das Iodisotop mit der Massenzahl 123, das unter Elektroneneinfang (EC, electron capture) zerfällt, eignet sich von den oben genannten Nukliden am besten für eine *in vivo*-Anwendung mittels SPECT. Mit 13,2 h besitzt es eine Halbwertszeit, die einerseits noch zeitaufwändige Synthesen zulässt, andererseits aber auch kurz genug ist, um die Strahlenbelastung für einen Patienten bei einer Anwendung in der Nuklearmedizin gering zu halten. Gleichzeitig besitzt ^{123}I -Iod zu 83 % eine für die Ansprechwahrscheinlichkeit der Natriumiodid-Detektoren ideale γ -Linie von 159 keV. Da es auch γ -Linien > 500 keV besitzt, werden die SPECT-Messungen jedoch komplizierter als z. B. für das typische SPECT-Nuklid ^{99m}Tc -Technetium. ^{123}I -Iod zerfällt zu 100 % durch Elektroneneinfang, so dass abgesehen von Konversions- und Augerelektronen (im Mittel 14,9 pro Zerfall [8]) keine gewebeschildigende Partikelemission auftritt [3, 9].

Wegen seiner längeren Halbwertszeit von 60,14 d und seiner schwachen γ -Strahlung von nur 35,5 keV wird ^{125}I -Iod, das unter Elektroneneinfang zerfällt, hauptsächlich für *in vitro*-Untersuchungen wie z. B. Radioimmunoassays (RIAs) verwendet. Diese häufig in der Medizin angewandte immunologische *in vitro*-Methode dient zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen (Nano- bis Piktogramm-Bereich), unter anderem von Erreger-Antigenen, Hormonen und Enzymen. Neuerdings benutzt man ^{125}I -Iod auch für therapeutische Zwecke, da seine niederenergetische Strahlung, vor allem Augerelektronen, nur eine sehr kurze Reichweite in Gewebe, etwa in der Größenordnung eines Zelldurchmessers, besitzt. Pro Zerfall werden im Mittel 24,9 Elektronen emittiert [8]. Befindet sich das ^{125}I -Iod an seinem Bestimmungsort, z. B. im Zellkern einer Tumorzelle, so kann es dort gezielt die DNA zerstören, ohne dass seine schwache Strahlung das umliegende Gewebe erreichen kann. Hierfür muss allerdings ein Tracer gefunden werden, der eine möglichst quantitative Akkumulation des ^{125}I -Iod im Zellkern ermöglicht. So wurden z. B. Studien mit dem Thymidin-Analogon 5-[^{125}I]Iod-2'-deoxyuridin durchgeführt, das sich schnell in teilenden Zellen anreichert und hoch zytotoxisch ist [9]. Die Zerfallseigenschaften des ^{125}I -Iod bringen hierbei jedoch einige Probleme mit sich, die einen klinischen Einsatz des Radiotherapeutikums limitieren. Zum einen ist die Halbwertszeit von 60 d deutlich länger als wünschenswert, da nur sich schnell teilende Zellen die Substanz aufnehmen und ruhende Zellen nicht getötet werden. Zum anderen wird das Uridin-Derivat *in vivo* schnell dehalogeniert, wonach die Substanz nicht mehr ihren Zweck erfüllen kann. Dies führte zur Untersuchung anderer geeigneterer Substanzen, die eine Akkumulation des ^{125}I -Iod am Zielort gewährleisten sollen [10–13].

Der als Reaktornuklid leicht zugängliche β^- -Strahler ^{131}I -Iod ist eines der ersten in der Medizin angewendeten Radionuklide und wird häufig für therapeutische Anwendungen benutzt. Die mittlere Reichweite der emittierten Elektronen von 910 μm in Gewebe ist gut geeignet zur Behandlung kleiner Tumore [14]. Außerdem emittiert ^{131}I -Iod eine 364,5 keV γ -Linie (81,2 %), die zwar nicht ideal

für die SPECT-Bildgebung ist, aber dennoch eine semiquantitative Bestimmung der Verteilung des Radiotherapeutikums erlaubt [15]. Am häufigsten wird ^{131}I -Iod zur Radioiodtherapie der Schilddrüse eingesetzt.

Außerhalb der medizinischen Anwendung wird ^{131}I -Iod zur Entwicklung neuer iodierter Tracer bzw. neuer Markierungstechniken verwendet.

Um Radioiodverbindungen mittels PET evaluieren zu können, gewinnt ^{124}I -Iod und in geringerem Umfang auch ^{120g}I -Iod an Bedeutung [16, 17]. Auf Grund seiner Zerfallseigenschaften ist ^{124}I -Iod kein besonders geeignetes PET-Nuklid (siehe Tabelle 1). Zum einen emittiert es nur zu 22 % Positronen und zum anderen bewirken die lange Halbwertszeit von 4,2 d, die zwar die Untersuchung langsamer metabolischer, physiologischer und biochemischer Prozesse erlaubt [18], und die hochenergetischen γ -Strahlen eine hohe Strahlenexposition des Patienten.

Das Radioiodisotop ^{120g}I -Iod emittiert einen höheren Anteil an Positronen (56 %) [19], verfügt aber über eine kurze Halbwertszeit von 1,35 h. Die maximale Energie der emittierten Positronen ist mit 4,0 MeV noch höher als die der Positronen von ^{124}I -Iod ($E_{\beta,max} = 2,14$ MeV), doch PET-Phantomstudien haben gezeigt, dass ein Einsatz für PET-Untersuchungen am Menschen möglich ist [20]. Ein großes Problem für den Gebrauch von ^{120g}I -Iod sind seine hohen Herstellungskosten, da das Target-Nuklid ^{120}Te -Tellur angereichert werden muss und sehr teuer ist. Eine Optimierung der Targetchemie, die von Qaim et al. durchgeführt wurde [21], kann die Verwendung von ^{120g}I -Iod jedoch vielleicht attraktiver machen.

1.3 Herstellung medizinisch relevanter Iodisotope

Im Folgenden werden die gängigen Verfahren zur Herstellung der wichtigen Radioiodisotope ^{123}I -Iod und ^{131}I -Iod beschrieben. Ganz kurz wird auch auf die Herstellung der Positronenemitter ^{120g}I -Iod und ^{124}I -Iod eingegangen.

Besondere Bedeutung kommt hierbei dem ^{123}I -Iod zu, das ein ideales Nuklid für die Einzel-Photonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) ist. Dank seiner Halbwertszeit von 13,2 h wird ^{123}I -Iod von verschiedenen kommerziellen Zyklotronbetreibern als Iodid für Markierungszwecke oder direkt als ^{123}I -Iod-markiertes Radiopharmakon angeboten. Von einer kostengünstigen Herstellung und einem günstigen Vertrieb hängt es unter anderem ab, ob sich dieses Nuklid in der nuklearmedizinischen Diagnostik gegenüber dem zur Zeit deutlich preiswerteren Generatorkern ^{99m}Tc -Technetium durchsetzen kann.

1.3.1 Iod-123

^{123}I -Iod gehört zu den neutronenarmen Kernen und kann daher vorzugsweise aus Kernreaktionen mit beschleunigten geladenen Teilchen erzeugt werden. Bei den Herstellungsmethoden unterscheidet man den **direkten Weg** (^{123}I -Iod entsteht als unmittelbares Produkt der Kernreaktion) und den **indirekten Weg** (^{123}I -Iod entsteht als Tochternuklid eines zuvor in einer Kernreaktion hergestellten instabilen Mutternuklides). Für die Produktion von ^{123}I -Iod wurden etwa 25 Kernreaktionen untersucht. In Tabelle 2 sind die wichtigsten zusammengestellt [22].

Direkte Methoden

An einem Niederenergiezyklotron (< 12 MeV Protonen) kann ^{123}I -Iod aus ^{123}Te -Tellur hergestellt werden [23], an einem Zyklotron mit mittlerer Energie (< 21 MeV Protonen) aus ^{124}Te -Tellur, worüber umfangreiche Kernreaktionsdaten sowie Versuche zur Targetpräparation und chemischen Aufarbeitung des Targets vorliegen [24–27]. In beiden Fällen muss hoch angereichertes Targetmaterial verwendet werden. Die Abtrennung des ^{123}I -Iod erfolgt beispielsweise durch Trockendestillation, wie in Abbildung 1 dargestellt [21].

Tabelle 2: Kernreaktionen zur Darstellung von ^{123}I -Iod

| <i>Direkte Reaktionen</i> | | |
|---------------------------------------|------------------------|--|
| Reaktion | Projektilenergie / MeV | Dicke Targetausbeute / MBq/ μAh |
| $^{123}\text{Te}(p,n)^{123}\text{I}$ | 14 \rightarrow 10 | 130 |
| $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$ | 26 \rightarrow 23 | 392 |

| <i>Indirekte Reaktionen</i> | | | |
|---------------------------------------|------------------------|---|--------------------------|
| Reaktion | Projektilenergie / MeV | Dicke Targetausbeute ^a / MBq/ μAh | $t_{1/2}$ (Mutternuklid) |
| $^{127}\text{I}(p,5n)^{123}\text{Xe}$ | 65 \rightarrow 45 | 777 | 2,08 h |
| $^{124}\text{Xe}(p,x)^{123}\text{Xe}$ | 29 \rightarrow 23 | 414 | 2,08 h |

^abezogen auf eine Zerfallszeit von 7 h für ^{123}Xe

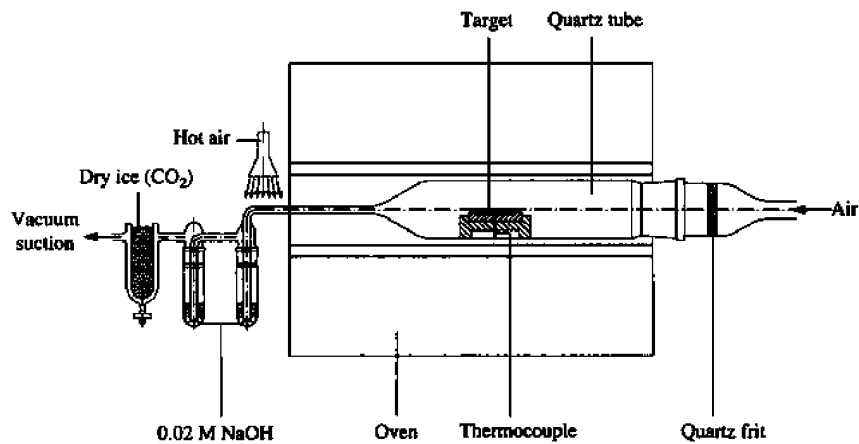


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung einer Quarz-Destillationsapparatur zur Abtrennung von Radioiod aus einem bestrahlten Te-Target

Der Nachteil des (p,n)-Prozesses ist die niedrige Ausbeute an ^{123}I -Iod und die relativ hohe Verunreinigung durch ^{124}I -Iod, besonders wenn ^{123}Te -Tellur von niedrigem Anreicherungsgrad verwendet wird. Die Verunreinigung durch ^{124}I -Iod ist bei der Produktion aus ^{124}Te -Tellur noch höher. Für die Produktion von isotopenreinerem ^{123}I -Iod müssen indirekte Produktionsmethoden angewendet werden.

Indirekte Methoden

Bei den indirekten Methoden wird zunächst ^{123}Xe -Xenon hergestellt, das mit einer Halbwertszeit von 2,08 h unter Elektroneneinfang bzw. Positronenzerfall in das gewünschte Isotop ^{123}I -Iod übergeht (Abb. 2). Nachdem das Radioxenon etwa 7 h abgeklungen ist, wird das Maximum an ^{123}I -Iod erhalten.

Eine Möglichkeit einer indirekten Erzeugung von ^{123}I -Iod ist die Verwendung von ^{127}I -Iod als Targetmaterial [27], wofür ein Hochenergiezyklotron (> 21 MeV Protonen) benötigt wird. Das bei der Bestrahlung des Natriumiodid-Targets [28] entstandene ^{123}Xe -Xenon kann *on-line* durch einen Heliumstrom aus dem Target abgeführt werden [29]. Nach einer Abklingzeit von 7 h wird das noch nicht zerfallene ^{123}Xe -Xenon erwärmt und abgepumpt, während das ^{123}I -Iod zurückbleibt [30]. Dies ist ein Prozess mit relativ hohen Ausbeuten und die einzige Verunreinigung erfolgt durch ^{125}I -Iod (0,25 %), das aus, in einer Nebenreaktion entstehendem, ^{125}Xe -Xenon gebildet wird [22].

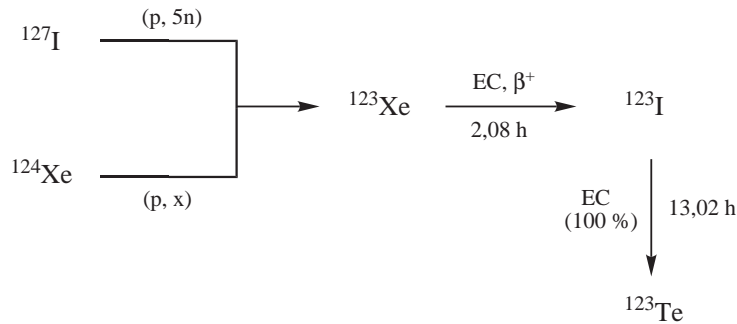


Abbildung 2: Bildung von ^{123}I -Iod aus indirekten Reaktionen

Die Methode, mit der das reinste ^{123}I -Iod erhalten wird, benutzt ^{124}Xe -Xenon als Targetmaterial. Diese Kernreaktion kann an einem Zyklotron mittlerer Energie durchgeführt werden. Die natürliche Häufigkeit von ^{124}Xe -Xenon beträgt nur 0,1 %, weswegen hoch angereichertes ^{124}Xe -Xenon sehr teuer ist. Die Produktionsmethode wurde in Vancouver (Kanada) und in Karlsruhe optimiert und [^{123}I]Iodid ist mittlerweile kommerziell erhältlich. Das in dieser Arbeit verwendete ^{123}I -Iod wurde über diese Kernreaktion hergestellt.

1.3.2 Iod-131

Bei ^{131}I -Iod handelt es sich um ein typisches neutronenreiches Reaktornuklid, das zum einen über **Neutroneneinfangreaktionen** hergestellt werden kann und zum anderen als Produkt der **Kernspaltung** schwerer Kerne auftritt.

Die Produktion des ^{131}I -Iods erfolgt heute hauptsächlich über Neutroneneinfang an ^{130}Te -Tellur. Dabei können als Targetmaterial elementares Tellur, Tellurdioxid oder wasserlösliche Tellurverbindungen wie Tellursäuren verwendet werden. Das natürliche Tellur besteht zu 33,8 % aus ^{130}Te -Tellur, weswegen bei der Verwendung von nicht weiter angereichertem Material auch die Iodisotope mit den Massenzahlen 127 und 129 entstehen. Eine Isotopenanreicherung von ^{130}Te -Tellur ist daher erstrebenswert, da sonst ^{131}I -Iod mit einer schlechteren spezifische Aktivität erhalten wird. Das Targetmaterial befindet sich in Kapseln aus Aluminium, die in einem Kernreaktor bestrahlt werden. Die Bestrahlung erfolgt bei Neutronenflussdichten zwischen 10^{12} bis 10^{14} n/cm²s und dauert zwischen einigen Tagen und Wochen. In Abbildung 3 ist die Bildung von ^{131}I -Iod durch Neutroneneinfang dargestellt.

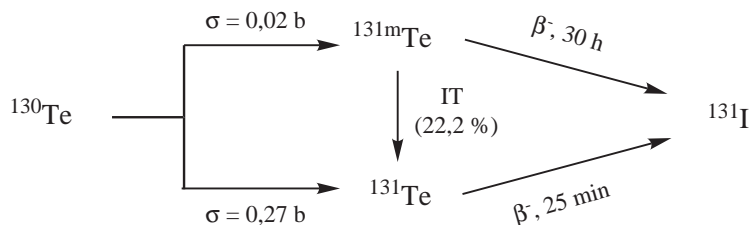


Abbildung 3: Bildung von ^{131}I -Iod durch Neutroneneinfang an ^{130}Te -Tellur

Die Bestrahlung mit Neutronen führt vorwiegend zu ^{131}Te -Tellur im Grundzustand, das als β^- -Strahler mit einer Halbwertszeit von 25 Minuten zum gewünschten ^{131}I -Iod zerfällt. Mit etwa 7 % entsteht auch das metastabile ^{131m}Te -Tellur, das entweder mit einer Halbwertszeit von 30 h direkt zu ^{131}I -Iod zerfällt oder zunächst in seinen Grundzustand übergeht und daraus zum ^{131}I -Iod zerfällt.

Die Aufarbeitung und Isolierung des ^{131}I -Iod variieren je nach Targetmaterial und Hersteller [31]. Häufig wird nach nasschemischem Lösen des Targetmaterials das vorwiegend als Iodid vorliegende ^{131}I -Iod zu elementarem Iod oxidiert, wonach sich das Iod abdestillieren oder in unpolare Lösungsmittel wie Tetrachlorkohlenstoff, Benzol oder Toluol extrahieren lässt. Das bei der Destillation freiwerdende Iod wird in einer alkalischen Natriumsulfidlösung aufgefangen oder bei der Extraktion aus dem organischen Lösungsmittel zurückextrahiert. Mehrere Oxidations- und Reduktionsprozesse können durchgeführt werden, bis das ^{131}I -Iod die gewünschte Reinheit besitzt. Bei einem Tellurdi-oxidtarget ist auch eine direkte trockene Destillation möglich (analog Abb. 1).

In einem alternativen Verfahren gewinnt man ^{131}I -Iod als Produkt der Kernspaltung schwerer Kerne, wo es mit einer isobaren Ausbeute von 2,9 % entsteht. In Abbildung 4 ist das Ende dieser Zerfallskette dargestellt.

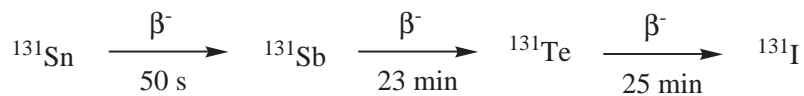


Abbildung 4: ^{131}I -Iod aus der Kernspaltung

Von Nachteil ist hier zum einen, dass das Iod wegen seiner im Vergleich zu den anderen Spaltelementen kurzen Halbwertszeit von 8,02 d ohne größere Abklingzeiten aus den bestrahlten Urantargets bzw. Brennelementen herausgelöst und von einer Vielzahl anderer hochaktiver Spaltprodukte abgetrennt werden muss. Dies erfordert spezielle Bleizellen und Manipulatoren. Zum anderen ist das erhaltene ^{131}I -Iod auch immer mit Iodisotopen der Massen 127 und 129 verunreinigt, die mit einer Spaltausbeute von 0,16 % bzw. 0,54 % entstehen [31]. Auch kürzerlebige Isotope wie ^{133}I -Iod (6,70 %) entstehen bei der Kernspaltung, und wegen ^{133}I -Iod ($t_{1/2} = 20,8 \text{ h}$) muss eine gewisse Abklingzeit eingehalten werden, um die radionuklidische Reinheit des ^{131}I -Iod zu erhöhen.

Die Aufarbeitung und Isolierung von ^{131}I -Iod erfolgen bei dieser Methode zumeist durch nasschemisches Lösen des uranhaltigen Targets. Das ^{131}I -Iod wird mittels Wasserdampf und Luft abdestilliert und das so erhaltene ^{131}I -Iod-haltige Kondensat durch nachfolgende Reinigungsprozesse, wie elektrochemische, chromatographische oder adsorptive Verfahren, aufgereinigt.

1.3.3 Iod-124 und Iod-120g

Bei ^{124}I -Iod und ^{120g}I -Iod handelt es sich um neutronenarme Nuklide, die durch Kernreaktionen mit beschleunigten geladenen Teilchen hergestellt werden können.

Für die Herstellung von ^{124}I -Iod wurden mehrere mögliche Kernreaktionen intensiv untersucht. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Produktionsrouten [22].

Tabelle 3: Kernreaktionen zur Herstellung von ^{124}I -Iod

| Reaktion | Projektilenergie / MeV | Dicke Targetausbeute / MBq/ μAh | Verunreinigung / % | |
|---------------------------------------|------------------------|--|--------------------|------------------|
| | | | ^{123}I | ^{125}I |
| $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ | 12 \rightarrow 8 | 16 | 1,0 | < 0,1 |
| $^{124}\text{Te}(d,2n)^{124}\text{I}$ | 14 \rightarrow 10 | 17,5 | - | 1,7 |
| $^{125}\text{Te}(p,2n)^{124}\text{I}$ | 21 \rightarrow 15 | 81 | 7,4 | 0,9 |

Zunächst wurde der (d,2n)-Prozess an ^{124}Te -Tellur verwendet [33–35], aber hier sind die Verunreinigungen durch das langlebige ^{125}I -Iod sehr hoch. Nach genauer Untersuchung der (p,n)-Reaktion

an ^{124}Te -Tellur [26] wurde dies die Methode der Wahl [21]. Die Verunreinigung durch ^{125}I -Iod ist sehr gering und auch die durch ^{123}I -Iod ist vertretbar. Desweiteren kann man die Reaktion an einem niederenergetischen Zyklotron durchführen, allerdings ist die Ausbeute bei dieser Reaktion ziemlich klein. Eine Reaktion, bei der die Ausbeute hoch ist, ist die erst kürzlich untersuchte (p,2n)-Reaktion an ^{125}Te -Tellur [36], bei der die Verunreinigungen durch die beiden anderen Iodisotope allerdings deutlich größer sind. Außerdem benötigt man für diese Reaktion ein Zyklotron mittlerer Energie. Welche der diskutierten Kernreaktionen letztendlich angewendet wird, hängt primär davon ab, wie hoch die Verunreinigung durch ^{125}I -Iod sein darf.

Die Aufarbeitung erfolgt mittels trockener Destillation. Das isolierte Produkt wird entweder gleich in 0,01 M Natriumhydroxidlösung eingeleitet oder zunächst auf einer Säule adsorbiert und danach mit verdünnter Natronlauge eluiert. Die erhaltenen Ausbeuten an ^{124}I -Iod betragen etwa 500 MBq, was für den lokalen Einsatz in der Nuklearmedizin genügt, aber nicht ausreichend für eine weitere Distribution des Radioisotops ist.

Die Herstellung von ^{120g}I -Iod wurde über zwei verschiedene Produktionsrouten untersucht. Die eine ist ein (p,n)-Prozess an ^{120}Te -Tellur und die andere eine (p,3n)-Reaktion an ^{122}Te -Tellur [37, 38]. Da man für die erste Reaktion ein niederenergetisches Zyklotron benutzen kann und die Verunreinigungen durch andere Iodisotope gering sind, wird sie bevorzugt. Als einzige Verunreinigung konnte hierbei das Auftreten des isomeren Zustandes ^{120m}I -Iod ($t_{1/2} = 53$ min) mit 4,0 % festgestellt werden [21]. Ein großes Problem ist allerdings der hohe Preis des zur Bestrahlung benötigten angereicherten ^{120}Te -Tellur. Erfahrungen mit den anderen Iodisotopen haben jedoch gezeigt, dass es möglich ist, das Targetmaterial maximal und zyklisch zu nutzen.

1.4 Emissionstomographie

Unter den bildgebenden Verfahren in der Medizin haben die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Einzel-Photonen-Emissions-Computer-Tomographie (SPECT) einen festen Platz. Im Gegensatz zu anderen diagnostischen Verfahren, wie der magnetischen Resonanztomographie und der Röntgen-Computer-Tomographie (CT), die primär morphologische Zustände erfassen, sind die PET und die SPECT in der Lage, biochemische Prozesse auf nichtinvasive Weise *in vivo* darzustellen. Das i.v. applizierte Radiopharmakon reichert sich im Zielorgan an und emittiert entsprechend dem Zerfall seines Radionuklids eine γ -Strahlung, die von außen detektiert wird. Handelt es sich bei dem verwendeten Radionuklid um einen Positronenemitter, so nutzt man die PET, ist es ein Gammastrahler, verwendet man die SPECT.

Bei **PET** handelt es sich um das genauere, aber auch deutlich teurere Verfahren. Hierbei sendet das Radionuklid ein Positron aus, das nach wenigen Millimetern im Körpergewebe (abhängig von der Energie des Positrons) mit einem Elektron rekombiniert. Bei der anschließenden Vernichtung von Materie mit Antimaterie wird die Ruhemasse der beiden Teilchen überwiegend in Form von zwei 511 keV γ -Quanten frei, die in einem Winkel von nahezu 180° ausgestrahlt werden [39], also in entgegengesetzte Raumrichtungen. Die γ -Strahlung durchdringt das Körpergewebe leicht und kann von außen durch zwei gegenüberliegende, in Koinzidenz geschaltete Detektoren nachgewiesen werden. Dadurch ist ein ortsabhängiger Nachweis möglich, denn die zwei gegenüberliegenden Detektoren registrieren nur dann ein Zerfallsereignis, wenn sie gleichzeitig, also innerhalb der Koinzidenzauflösungszeit von wenigen Nanosekunden, getroffen werden. Daher ist eine schnelle und genaue Ortsbestimmung der Strahlenquelle möglich, weswegen PET besonders zur Messung schneller Stoffwechselfvorgänge und hoher Ortsauflösung geeignet ist. Durch eine vorangehende Transmissionsmessung können regionale Aktivitätskonzentrationen quantitativ erfasst werden. Die horizontale Auflösung heutiger PET-Kameras liegt zwischen 4 - 6 mm mit Schichtdicken von 8 - 10 mm [40]. Bei der Verwendung von kurzlebigen Positronenstrahlern wie ^{11}C -Kohlenstoff, ^{15}O -Sauerstoff und ^{13}N -

Stickstoff, deren Halbwertszeiten im Bereich von Minuten liegen, muss die Radionuklidproduktion direkt vor Ort erfolgen. Werden längerlebige Nuklide wie ^{18}F -Fluor verwendet, kann das Radioisotop zentral produziert und von dem Zyklotronbetreiber an mehrere PET-Zentren geliefert werden („Satellitenkonzept“).

SPECT ist das verbreitetere und kostengünstigere Verfahren. Hier werden zur Markierung der Pharmaka Radionuklide benutzt, deren dominante γ -Linie zwischen 100 - 300 keV liegt, da die Ansprechwahrscheinlichkeit der γ -Detektoren (mit Thallium dotierte Natriumiodid-Kristalle) in diesem Energiebereich am größten ist. Wegen der fehlenden Korrektur auf Adsorption der relativ niederenergetischen Photonen sind bei der SPECT nur semiquantitative Aussagen möglich. Die Radionuklide emittieren ihre γ -Quanten statistisch in alle Raumrichtungen. Deshalb müssen Kollimatoren, das sind Schlitz- bzw. Lochblenden aus Schwermetallen, vor den Detektoren angeordnet werden, um eine Richtungszuordnung zu erhalten [41]. Nur die γ -Quanten, die senkrecht durch die Kollimatoren dringen, erreichen auch den Detektor. Bei einer SPECT-Aufnahme rotieren eine oder mehrere Szintillationskameras um den zu untersuchenden Körperbereich und erzeugen dabei Schichtaufnahmen. Heute werden häufig Dreikopfkameras benutzt, bei denen eine Einzelaufnahme etwa 20 Minuten dauert. Es gibt mittlerweile auch schon SPECT-Tomographen mit 4 Köpfen, bei denen die Aufnahmezeiten kürzer sind. Schnell ablaufende Stoffwechselvorgänge lassen sich mit SPECT jedoch nicht gut messen. Aus den gewonnenen Daten wird mit Hilfe eines Computersystems ein aussagekräftiges Bild erzeugt. In Abbildung 5 sind der Aufbau und das Messprinzip einer SPECT-Kamera schematisch dargestellt [42].

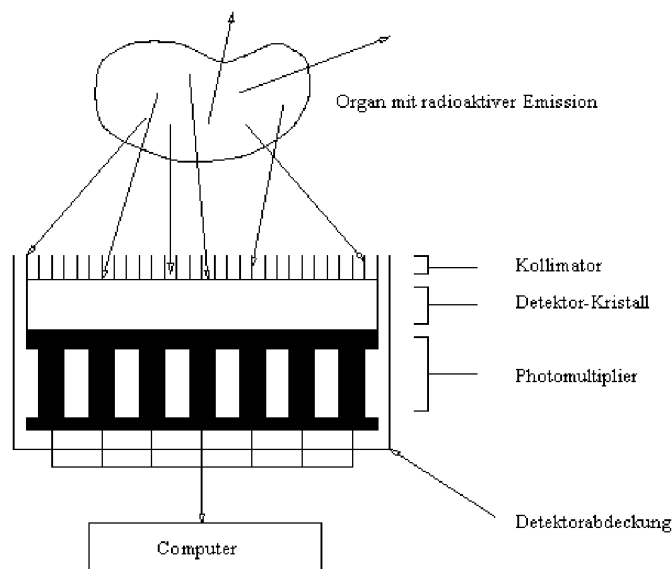


Abbildung 5: Aufbau und Messprinzip einer SPECT-Kamera

Die Qualität einer SPECT- und auch einer PET-Aufnahme hängt entscheidend von der Leistungsfähigkeit des verwendeten Computers und dem Datenverarbeitungsprogramm ab.

Dank einiger geeigneter und im Unterschied zur PET langlebiger, kommerziell distributierter und kostengünstiger γ -Strahler (Tab. 4) hat die SPECT einen festen Platz unter den bildgebenden Verfahren der Medizin [40]. Ein ideales SPECT-Nuklid sollte außer seinen γ -Quanten möglichst keine Partikel emittieren, da diese die Strahlenbelastung des Patienten unnötig erhöhen würden. Einen besonderen Stellenwert in der Reihe der SPECT-Nuklide besitzt ^{99m}Tc -Technetium, das sowohl hervorragende Zerfallseigenschaften besitzt und zudem als Generatorkern kostengünstig und an jedem Ort verfügbar ist. Selbst das nachteilige Bindungsverhalten als Metall verhinderte nicht, dass ^{99m}Tc -Technetium zum meist verwendeten Radionuklid in der nuklearmedizinischen Diagnostik wurde.

Tabelle 4: Wichtige SPECT-Nuklide

| Nuklid | $t_{1/2}$ / h | Zerfallsart (% Häufigkeit) | dominante γ -Linie / keV (% Häufigkeit) |
|-------------------|---------------|-------------------------------|---|
| ^{99m}Tc | 6,02 | IT (> 95) | 141 (95) |
| ^{123}I | 13,2 | EC (100) | 159 (83,3) |
| ^{201}Tl | 73,1 | EC (100) | 69 - 82 (96) |
| ^{67}Ga | 78,3 | EC (100) | 93 (40) 184 (24) 296 (22) |
| ^{111}In | 67,9 | EC (100) | 245 (94) 171 (90) |

Es ist eine Vielzahl von ^{99m}Tc -Technetium-Markierungsbestecken entwickelt worden, in denen das Metall über geeignete Komplexbindungen an ein Biomolekül geknüpft wird.

1.5 Kernchemische Aspekte bei der Verwendung von Radionukliden

Bei einer nuklearmedizinischen Untersuchung sollen pharmakodynamische bzw. toxische Wirkungen des Radiopharmakons ausgeschlossen werden. Das Ziel ist, kleinste Substanzmengen im Nanogramm-Bereich zu applizieren. Um dies zu erreichen, benötigt man eine hohe spezifische Aktivität. Die spezifische Aktivität einer radioaktiven Substanz ist als Aktivität bezogen auf die gesamte Stoffmenge isotoper Atome definiert und wird meistens in MBq/mmol oder MBq/mg angegeben. Die maximal erreichbare spezifische Aktivität hängt von der Halbwertszeit des jeweiligen Radionuklides ab. In Bezug auf die Nuklidreinheit werden drei Klassen unterschieden:

- **trägerfrei** („carrier free“, c.f.)
- **ohne zugesetzten Träger** („no carrier added“, n.c.a.)
- **geträgert** („carrier added“, c.a.).

Als trägerfrei wird bezeichnet, wenn die radioaktiven Isotope weder durch gewollt zugegebene noch ungewollt eingeschleppte nichtradioaktive Isotope „verdünnt“ vorliegen. Dieser Zustand kann vor allem erreicht werden, wenn das betreffende Element in der Natur nicht vorkommt, wie z. B. Technetium oder Astat, da sonst eine Einschleppung nicht-radioaktiver Isotope kaum zu verhindern ist. Das Ausmaß der Verdünnung hängt von der Häufigkeit des betreffenden Elementes in der Umgebung ab. So wird z. B. bei Kohlenstoff das bis zu 10^4 -fache der aktiven Isotope eingeschleppt, beim verhältnismäßig seltenen Fluor hingegen nur das 10^3 -fache [7].

Deshalb wird bei kernchemischen Synthesen häufig der Begriff „n.c.a.“ verwendet, um zu verdeutlichen, dass zwar kein Träger zugesetzt wurde, das Einschleppen aus der Umgebung aber nicht verhindert werden konnte.

Bei kurzlebigen Radionukliden mit hoher spezifischer Aktivität arbeitet man im nanomolaren Bereich oder darunter, was auf die Reaktionsabläufe einen entscheidenden Einfluss hat. So können Probleme durch Adsorptionseffekte an der Gefäßwand oder Nebenreaktionen mit minimalen Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien auftreten. Infolge der niedrigen Produktkonzentration tritt eine zweite Reaktion mit dem n.c.a Radionuklid nicht auf. Dies zeigt sich z. B. bei der elektrophilen Radioiodierung von Tyrosin. Während hier nur das Monoradioiodtyrosin entsteht, wird bei einer „kalten“ präparativen elektrophilen Iodierung auch immer zu einem gewissen Prozentsatz das zweifach iodierte Produkt gebildet.

Eigentlich handelt es sich bei einer radioaktiven Markierung um eine bimolekulare Reaktion, also eine Reaktion 2. Ordnung. Bei n.c.a. Markierungen jedoch, bei denen das Radionuklid im subnanomolaren Bereich eingesetzt wird, beobachtet man immer eine Kinetik pseudo-erster Ordnung, da die Konzentration des Markierungsvorläufers gegenüber der des Radionuklides so groß ist, dass sie als konstant angenommen werden kann.

Aus den genannten Besonderheiten der n.c.a. Chemie folgen spezielle, sich von den gängigen Methoden der präparativen organischen Chemie unterscheidende Synthesetechniken. Für die meist kurzlebigen Radionuklide kommen nur schnelle, unkomplizierte und hocheffiziente Verfahren in Frage, bei denen günstiger Weise erst im letzten Schritt das Radionuklid eingeführt wird. Eine Produktreinigung erfolgt meistens mit schnellen chromatographischen Methoden wie HPLC oder über Kartuschensysteme.

1.6 Methoden zur Radioiodierung organischer Moleküle

Es gibt heute eine Vielzahl mit Radioiod markierter Verbindungen. Dank der problemlosen Routineproduktion von ^{123}I -Iod und ^{131}I -Iod stehen der Nuklearmedizin heute eine Vielzahl von interessanten mit Radioiod markierten Produkten für *in vitro*- und *in vivo*-Anwendungen zur Verfügung. Dies ist auf die vergleichsweise einfachen, trägerfrei anwendbaren Markierungsmethoden zurückzuführen, die in den vergangenen 40 bis 50 Jahren entwickelt wurden. Einen Überblick über Radioiodierungsmethoden geben eine Vielzahl von Übersichtsartikeln [43–46]. Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Arten, das Radioiod in ein organisches Molekül einzuführen, die elektrophile oder die nukleophile Substitution.

1.6.1 Elektrophile Substitution

1.6.1.1 Direkte elektrophile Substitution

Die häufigste Anwendung findet eine direkte elektrophile aromatische Substitution, da sie an aktivierten, aromatischen Systemen meist problemlos in hohen Ausbeuten erfolgt. Im Gegensatz zu den meisten aliphatischen Iodverbindungen zeigt die aromatische Kohlenstoff-Iod-Bindung eine zufriedenstellende chemische Stabilität. Es wurde eine Vielzahl von speziellen Techniken entwickelt, die alle eine *in situ*-Oxidation von Iodid zur Erzeugung eines positivierten „ I^+ “, das für die elektrophile Substitution benötigt wird, zum Ziel haben. Auf Grund seiner Flüchtigkeit, seiner fehlenden Trägerfreiheit sowie der damit verbundenen maximalen radiochemischen Ausbeute von nur 50 % eignet sich molekulares Radioiod nicht zur Radioiodierung.

Iodat-Methode

Bei der Iodat-Methode fungiert inaktives Iodat, das der aktiven Natriumiodid-Lösung zugesetzt wird, als Oxidationsmittel. Da es sich bei Iodat um ein sanftes Oxidationsmittel handelt, ist diese Methode besonders zur Markierung empfindlicher Substanzen, wie z. B. Proteinen, von Nutzen. Zum Beenden der Reaktion wird das überschüssige Iodat mit Bisulfit zu Iodid reduziert, das sich leicht chromatographisch oder über Ionenaustauscher vom radioiodierten Biomolekül abtrennen lässt. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die spezifische Aktivität des erhaltenen Produktes meistens nicht hoch ist.

Die Iodat-Methode hat u. a. bei der Radioiodierung der aromatischen Aminosäure α -Methylthyrosin zu 3-Radioiod-L- α -methylthyrosin (IMT), einem Radiopharmakon, das in der Diagnostik von Glioblastomen Bedeutung hat, Anwendung gefunden. Bei der IMT-Produktion lassen sich radiochemische Ausbeuten von 80 - 95 % erreichen [47].

Chloramin-T (CAT)-Methode

Die schon 1962 von Hunter und Greenwood [48, 49] beschriebene CAT-Methode ist heute einer der geläufigsten Wege zur Radioiodierung von aktivierten Aromaten. Bei Chloramin-T handelt es sich um ein einfach N-chloriertes p-Toluolsulfonsäureamid, das in wässriger basischer Lösung zunächst Hypochlorit und daraus, wie auch in wässriger saurer Lösung, Interhalogenverbindungen als oxidierende Spezies bildet (Abb. 26) [43, 44, 50].

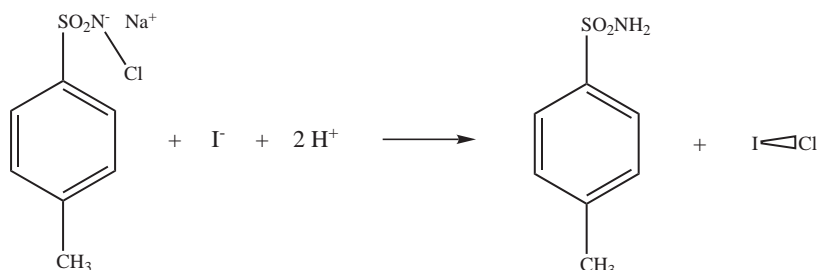


Abbildung 6: Oxidation mit CAT

Als Nachteil der CAT-Methode können sich die vergleichsweise starken Oxidationsbedingungen und die durch das Chlor möglichen chlorierten Nebenprodukte erweisen. Als Folge können besonders bei empfindlicheren Molekülen eine Reihe von ungewollten Nebenreaktionen auftreten. Daher ist man bestrebt, die Konzentration des CAT so gering wie möglich, die Reaktionsdauer kurz und die Reaktionsstemperatur niedrig zu halten [45, 46].

Um diese Nachteile zu mindern, kann man polymergebundenes Chloramin-T verwenden, das unter dem Handelsnamen Iodobeads™ angeboten wird. Iodobeads™ sind Polymerkügelchen, die nach Reaktionsende leicht aus der Reaktionsmischung entfernt werden können. Da das CAT-Molekül hier an eine Polymermatrix gebunden ist, handelt es sich bei der Oxidation um eine Zweiphasenreaktion, die schonender verläuft als bei CAT in homogener Lösung.

Die Aktualität der CAT-Methode erkennt man an der großen Anzahl an Veröffentlichungen, in denen CAT als Oxidationsmittel verwendet wird [51–53]. Darüber hinaus wird CAT auch häufig bei Radio-bromierungen [54, 55] verwendet.

Iodogen™-Methode

Iodogen™ ist der Handelsname für 1,3,4,6-Tetrachloro-3α,6α-diphenylglycouril, eine Substanz mit vier funktionellen N-Chlor-Gruppen (Abb. 7).

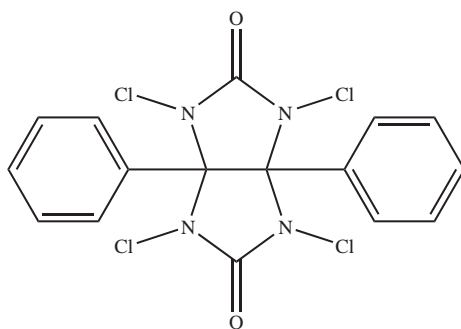


Abbildung 7: Iodogen™

Entwickelt wurde diese Methode zur schonenden Radioiodierung von Proteinen und Zellmembranen im Jahre 1978 [56]. Da Iodogen™ in Wasser fast nicht löslich ist, findet in wässriger Lösung eine Zweiphasenreaktion statt. Das Oxidationsmittel wird vor der Reaktion als dünner Film an der Reaktionsgefäßinnenwand abgeschieden. Mit Zugabe der wässrigen Eduktlösung beginnt die Zweiphasen-

reaktion bei Raumtemperatur, die durch den geringen Kontakt zwischen Oxidationsmittel und Edukt bzw. Produkt besonders schonend verläuft. Die Abtrennung des Oxidationsmittels geschieht durch Entnahme der Reaktionslösung, wobei das IodogenTM an der Gefäßwand haften bleibt [43, 56, 57]. Mit dieser Methode erzielt man mit gut wasserlöslichen Substanzen im Allgemeinen ähnlich gute radiochemische Ausbeuten wie mit CAT als Oxidationsmittel. Ein Problem ist die Selbstradioiodierung des Oxidationsmittels [58], die zu einem gewissen Umfang stattfinden kann. Das radioiodierte IodogenTM ist außerdem etwas wasserlöslich und kann so in die Reaktionslösung gelangen, was die Aufarbeitung erschwert.

Hauptsächlich wird IodogenTM für die Radioiodierung von Proteinen verwendet, wo man, wenn möglich, aber auch lieber CAT verwendet, da mit IodogenTM Tyrosin-Reste, die sich nicht an der Oberfläche des Proteins befinden, nicht iodiert werden [43].

N-Chlorsuccinimid

Neben Chloramin-T und IodogenTM eignen sich noch weitere N-halogenierte organische Verbindungen für die *in situ*-Oxidation von Radioiod, wie z. B. N-Chlorsuccinimid (NCS), das sowohl für Radioiodierungen als auch Radiobromierungen und Radioastatierungen eingesetzt wurde [59–61]. Die Oxidation erfolgt auch hier vermutlich über Interhalogenverbindungen [62]. Ein Vorteil von NCS ist, dass es phenolische Verbindungen nicht halogeniert und daher keine chlorierten Nebenprodukte entstehen. Ein Nachteil kann sein, dass nur geringe Mengen Wasser (< 10 %) in der Reaktionslösung vorhanden sein dürfen, damit die Oxidation nicht gestört wird [44].

Wasserstoffperoxid in Eisessig

Bei der Verwendung von Wasserstoffperoxid in Eisessig wird *in situ* Peressigsäure gebildet, die als Oxidationsmittel wirkt und eine schonende Methode zur Radioiodierung darstellt. Wichtig ist, dass die Persäure erst *in situ* dargestellt wird, damit ihre Konzentration niedrig ist. Beim Einsatz käuflicher Persäure tritt häufig eine Zerstörung des Eduktes auf. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine chlorierten Nebenprodukte auftreten, wie z. B. bei der Verwendung von IodogenTM und Chloramin-T oder seinen Derivaten. Die erzielten radiochemischen Ausbeuten können bei dieser Methode allerdings deutlich niedriger sein. So wurden bei der Radioiodierung von Anisol als Modellsubstanz nur radiochemische Ausbeuten bis zu 25 % erzielt [63]. Manchmal ist es auch nötig, die Reaktionstemperatur deutlich zu erhöhen und die Reaktionszeit auszudehnen, um gute radiochemische Ausbeuten zu erhalten [64].

Enzymatische Methoden

Eine sehr schonende Variante zur Radioiodierung von empfindlichen Biomolekülen ist die Verwendung von Enzymen, wie z. B. Lactoperoxidase, zur Oxidation. Die Denaturierung von Proteinen unter diesen Reaktionsbedingungen ist gering und es konnten Ausbeuten bis zu 85 % erzielt werden [43]. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass das Enzym selbst auch radioiodiert werden kann [43, 44]. Besonders wenn das Zielprotein ein ähnliches Molekulargewicht besitzt wie das Enzym, ist eine Abtrennung der beiden voneinander sehr schwierig. Um dieses Problem zu umgehen, kann ein Festphasengebundenes Enzym verwendet werden [65, 66]. Ein weiterer unumgänglicher Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass das Enzym deutlich teurer und schlechter verfügbar ist, als organische Oxidationsmittel wie Chloramin-T.

1.6.1.2 Elektrophile Substitution durch Demetallierungsreaktionen

Bei den oben beschriebenen direkten elektrophilen aromatischen Substitutionen tritt als Abgangsgruppe ein Proton aus dem aromatischen Ring aus. Dies hat zur Folge, dass in der Regel mit einer Mischung von Substitutionsisomeren zu rechnen ist, worunter die radiochemische Ausbeute leidet. Außerdem erfordert die nicht regioselektive Iodierung zusätzlich eine Trennung der Substitutionsisomeren. Die direkte elektrophile Substitution kann auch nur an aktivierten Aromaten wie z. B. Phenol, Anilin und Anisol durchgeführt werden, eine direkte Iodierung von deaktivierten Aromaten wie Nitrobenzol ist unmöglich.

Auf der Suche nach besseren Abgangsgruppen fand man in Organometallverbindungen, besonders denen der IV. Hauptgruppe des Periodensystems, geeignete Derivate zur regioselektiven Iodierung. Entsprechend dem elektropositiven Charakter der Metalle und der daraus resultierenden Polarisierung der Kohlenstoff-Metall-Bindung wird die Bindung für einen elektrophilen Angriff aktiviert. Daher erhält man meist hohe radiochemische Ausbeuten bei gleichzeitiger Regioselektivität. Die Instabilität der Kohlenstoff-Metall-Bindung ermöglicht zudem kurze Reaktionszeiten und milde Reaktionsbedingungen [46, 63, 67]. Mit Abstand am häufigsten werden Zinnabgangsgruppen eingesetzt, aber es werden auch Bor-, Quecksilber- und Thalliumverbindungen verwendet [43, 67]. Da viele Metalle sowie deren Organoverbindungen toxisch sind, muss bei einer Radiopharmakaproduktion gewährleistet werden, dass der Markierungsvorläufer vollständig vom Produkt abgetrennt wird.

Radioiododestannylierung

Auf Grund der Aktualität der Methoden soll im Weiteren nur näher auf die Destannylierung eingegangen werden. Diese findet eine breite Anwendung, was eine Vielzahl von Veröffentlichungen in der neueren Literatur zeigt [64, 68–70]. Auch für die Radioiodierung von komplizierten Molekülen, wie z. B. Cobalamin-Derivaten [71], ist sie die Methode der Wahl.

Als Abgangsgruppe dient bei der Destannylierung eine Trialkylzinngruppe, meistens eine Tri-n-butylstannyl-Gruppe, aber es werden auch Trimethylstannyl-Gruppen eingesetzt. Zur Erzeugung der elektrophilen Iodspezies aus Iodid können mit Einschränkungen die oben genannten Oxidationsmittel verwendet werden. Die Vorteile dieser Methode sind zum einen die hohen spezifischen Aktivitäten, die erreicht werden können. Zum anderen ist der experimentelle Aufwand der Radioiodierung gering und es wird in einer schnellen Reaktion unter milden Reaktionsbedingungen regioselektiv das gewünschte Produkt gebildet. Die radiochemischen Ausbeuten, die erreicht werden können, sind in der Regel sehr hoch. Der Mechanismus der Iododestannylierung ist in Abbildung 8 dargestellt [72].

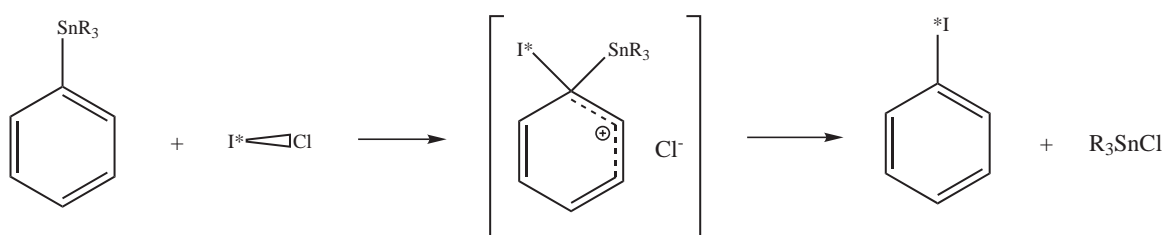


Abbildung 8: Mechanismus der Iododestannylierung

Bei der Herstellung des Trialkylzinnaromaten variieren die Ausbeuten sehr stark je nach Verbindung. Die Stannylierung erfolgt aus der entsprechenden Brom- oder Iodverbindung entweder mit Hexaalkyldistannan und einem Palladiumkatalysator oder mit Trialkylzinnchlorid nach vorangehender Lithiierung des Aromaten. Wenn man von der iodierten Verbindung ausgeht, muss man bei der Abtrennung des stannylierten Produktes darauf achten, dass keine Kontamination durch das iodierte Edukt vorliegt, da sonst die spezifische Aktivität des radioiodierten Produktes stark verringert wird. Der stannylierte Markierungsvorläufer ist in der Regel bei Lagerung unter einer Argonschutzgasatmosphäre bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ über lange Zeit stabil.

1.6.2 Nukleophile Substitution

Die zweite Art von Radioiodierungen erfolgt über eine nukleophile Substitution, bei der das Radioiodid ohne Oxidation umgesetzt wird. Der regioselective Halogenaustausch kann sowohl isotop (ein vorhandenes Iodat in der Verbindung wird durch ein radioaktives ersetzt) oder nichtisotop (ein Bromatom wird durch ein radioaktives Iodat substituiert) erfolgen. Für diese Austauschreaktionen wird viel Energie benötigt, was sehr hohe Reaktionstemperaturen voraussetzt. Bei der Radioiododeiodierung reichen Temperaturen von 160 °C aus, während der Bromidaustausch erst bei Temperaturen über 200 °C stattfindet [73]. Dafür müssen geeignete Lösungsmittel oder Schmelzen verwendet werden, die zusätzlich auch ein saures Milieu schaffen. Die drastischen Reaktionsbedingungen limitieren die Anwendbarkeit dieser Methode, da sie zu Zersetzungen des Eduktes und Produktes führen können.

Bei einer Radioiododeiodierung müssen große Mengen an Vorläufer eingesetzt werden, weswegen die erreichten spezifischen Aktivitäten sehr niedrig sind. Bei einem Austausch von Brom mit Radioiod können n.c.a.-Synthesen durchgeführt werden. Schwierigkeiten bei dieser Methode kann die Abtrennung des radioiodierten Produktes vom Bromvorläufer bereiten.

Eine größere Bedeutung als die oben genannten Austauschreaktionen hat die nukleophile Substitution unter Kupfer(I)-Katalyse erlangt. Dabei kommt dem Kupfer(I) die Aufgabe zu, in einem Übergangskomplex durch seine elektronenziehende Wirkung auf die Abgangsgruppe und den benachbarten aromatischen Kohlenstoff einen nukleophilen Angriff der Eintrittsgruppe zu ermöglichen. In Abbildung 9 ist der von Moerlein [74] vorgeschlagene Reaktionsmechanismus dargestellt.

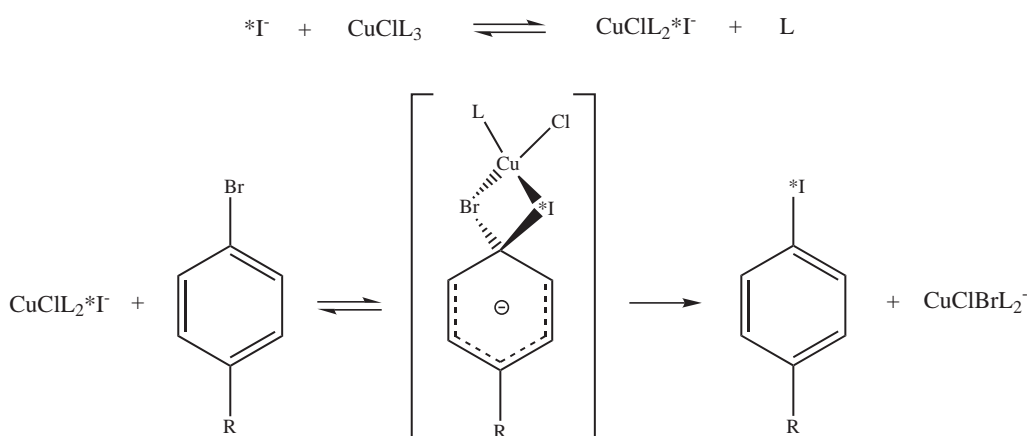


Abbildung 9: Mechanismus der Kupfer(I)-katalysierten nukleophilen Substitution

Bei seinen Untersuchungen über nichtisotope Austauschreaktionen von Brom gegen Radioiod zeigte sich, dass bei der Katalyse mit geringen Mengen $CuCl$ eine hohe Trägerfreiheit und radiochemische Ausbeuten bis zu 80 % bei einer Temperatur von 140 °C und einer Reaktionszeit von 30 Minuten erzielt werden können.

Wenn ein Molekül gegenüber höheren Temperaturen stabil ist, kann der nukleophile Substitutionsweg unter Kupfer(I)-Katalyse durchaus eine Alternative darstellen, zumal ein Stannylvorläufer, der für eine elektrophile Substitution meistens benötigt wird, nicht von allen Verbindungen leicht herstellbar ist. Nach dieser Methode wird z. B. auch m-Iodbenzylguanidin, das zur Tumor- und Herzdiagnostik eingesetzt wird, hergestellt [75].

Ein Beispiel für eine Radioiododeiodierung ist die Darstellung von o- $[^{123}I]$ Iodhippursäure [76], bei der radiochemische Ausbeuten von > 99 % erreicht wurden.

1.7 O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT)

In der modernen Chemotherapie werden Tumore bevorzugt durch Chemotherapeutika wie Alkylantien oder Cis- und Carboplatin bekämpft. Eine häufig verwendete Stoffklasse bildet die der Alkylantien, die eine Methylierung oder eine Chlorethylierung der DNA an unterschiedlichen Stellen bewirken. Zu den chloralkylierenden Zytostika zählt beispielsweise Carmustin und zu den methylierenden Temozolomid und Streptozotocin (Abb. 10).

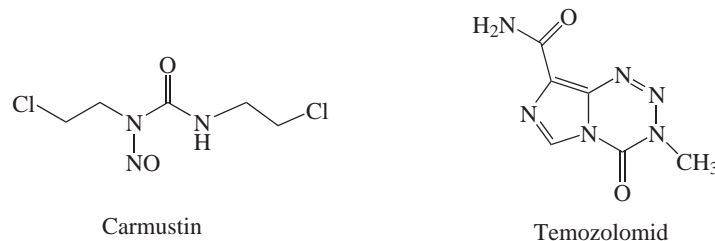


Abbildung 10: Beispiele für alkylierende Zytostatika

Der unter dem Handelsnamen Carmustin bekannte 1,3-bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (BCNU) kann eine Chlorethylgruppe übertragen und Temozolomid nach metabolischer Aktivierung eine Methylgruppe.

So werden zu etwa 70 % die N⁷-Position und zu 5 % die O⁶-Position in Guanin verändert, zu 25 % andere Stellen in der DNA [77]. Zwar ist die Alkylierung der O⁶-Position nicht sehr häufig, sie bewirkt jedoch die größten Schäden. In Abbildung 25 ist die DNA-Base Guanin mit Markierung der Angriffspositionen durch Alkylantien dargestellt.

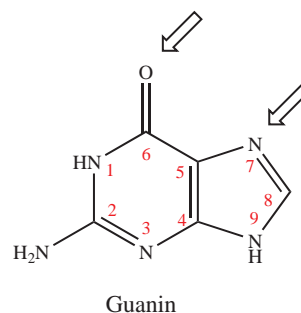


Abbildung 11: Übertragungspositionen für Alkylgruppen an Guanin

Das im Fall der Verwendung von Chloralkylantien entstehende O⁶-Chlorethylguanin ist unbeständig und lagert sich zu 1,O⁶-Ethanoguanin um [78]. Dieses führt innerhalb von 10 - 18 h zur Bildung einer Bindung zwischen N-1 des Guanins und N-3 des Cytosins im gegenüberliegenden DNA-Strang („interstrand crosslink“). Die Guanin-Cytosin-Bindung ist schlecht reparierbar und führt zu einem Stopp der DNA-Synthese. Nun kommt es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen und zur Induktion des Tumorsuppressorgens p53, das u. a. auch das Tumorsuppressorgen p21 induziert. Letztendlich führt die Induktion dieser Tumorsuppressorgene zu apoptotischem und nekrotischem Zelltod.

Durch das im zweiten Fall entstehende O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) kommt es zur Unterbrechung von H-Brückenbindungen, aber keiner gravierenden Torsion der DNA-Doppelhelix [78]. Die entstehende O⁶-MeG-Thymin-Fehlpaarung führt zu einer Guanin-Adenin-Punktmutation während der nächsten DNA-Replikation. Die Zytotoxizität wird jedoch über Prozessierung der O⁶-MeG-Thymin-Fehlpaarung durch die „Mismatch“-Reparatur hervorgerufen [79]. Diese Reparatur führt zu langen Einzelstrang-Bereichen, die während der Replikation in Doppelstrangbrüche umgewandelt werden können. Die „Mismatch“-Reparatur findet immer am neu synthetisierten Strang statt, was bedeu-

tet, dass O⁶-MeG erhalten bleibt und Thymin entfernt wird. Die Doppelstrangbrüche, hervorgerufen durch die „Mismatch“-Reparatur, bewirken die Induktion von p53 und p21 und somit apoptotischen Zelltod.

Sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten gibt es einen Reparaturmechanismus, durch den die durch Alkylantien induzierten Schäden wieder revertiert werden können. An diesem Mechanismus ist das Protein O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT) beteiligt [80–84]. MGMT bindet an die DNA, scannt nach Alkylierungen und ist in der Lage, selektiv den Methyl- bzw. Chlorethylrest des Guanins auf den Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms zu transferieren [78]. Die alkylierte MGMT verlässt die DNA und wird abgebaut, was in malignen Zellen deutlich schneller geschieht als in normalen Lymphozyten. Die Reparatur erfolgt sehr schnell; bereits 10 Minuten nach der DNA-Alkylierung sind > 90 % repariert. In gesunden Körperzellen ist diese Reparatur wünschenswert, doch sie erfolgt auch bei allen menschlichen Tumorarten. Wenn MGMT im Tumor in größeren Konzentrationen vorhanden ist, wird die Wirkung von Alkylantien zur Chemotherapie daher stark herabgesetzt.

Untersuchungen von Pegg et al. ergaben, dass die Konzentration von MGMT bei verschiedenen Spezies und auch in unterschiedlichen Organen der gleichen Spezies variiert [85]. So sind allgemein die Konzentrationen in menschlichen Zellen höher als bei Nagern, in Leber und Milz gibt es höhere Konzentrationen als im Gehirn und im Knochenmark [86–88].

MGMT wird auch in allen menschlichen Tumorarten exprimiert, wobei die Konzentrationen jedoch von Tumor zu Tumor der gleichen Art stark schwanken können. Besonders hohe Konzentrationen von MGMT wurden in Darm-, Pankreas-, Lungen- und Hirntumoren sowie in Melanomen festgestellt [78]. Es zeigte sich auch häufig, dass die MGMT-Konzentration im Tumor größer ist, als die des umgebenden gesunden Gewebes [89]. Kaina et al. fanden auch heraus, dass der MGMT-Status von Mensch zu Mensch stark verschieden ist und bei einzelnen Versuchspersonen in einem Zeitraum von 42 Tagen bis zu 200 % schwankte [90].

Bislang kann der MGMT-Status nur auf invasivem Wege durch die Entnahme von Tumorgewebe quantifiziert werden. Es wäre jedoch erstrebenswert, auch eine nicht-invasive Messmethode für die Quantifizierung des MGMT-Status in Tumorgewebe zu erhalten, damit man eine Therapie durch Zytostatika besser planen kann.

1.7.1 Das MGMT-Enzym und sein Mechanismus

Das MGMT-Enzym kommt sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Organismen vor und wurde in mindestens 28 unterschiedlichen Spezies gefunden [91]. Am besten untersucht sind hierunter die *ada* MGMT des Bakteriums *Escherichia coli* und die menschliche MGMT, von denen Kristallstrukturanalysen durchgeführt wurden [92, 93]. Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine sind am C-Terminus homolog und besonders im aktiven Zentrum, in dem die Substrate gebunden werden, sehr ähnlich, aber dennoch gibt es Unterschiede, die auch zu unterschiedlichen Reaktivitäten mit diversen Substraten führen [94]. Bei der *ada* MGMT handelt es sich um ein 19 kDa Protein [93], während die menschliche MGMT ein 21 kDa Protein ist [92]. Das Protein hat eine komplexe Sekundärstruktur aus α -Helices, β -Faltblattstrukturen und „random coil“-Strukturen. Im Allgemeinen liegt das aktive Zentrum, das unter anderem aus den Aminosäuren Prolin, Cystein, Histidin und Asparagin besteht, im Inneren des Proteins. Zur Anlagerung der DNA, aber auch kleinerer Moleküle wie O⁶-Methylguanin, ist eine Konformationsänderung der MGMT erforderlich, was von Chan et al. durch Circular-Dichroismus- und Fluoreszenzanalysen belegt wurde [95]. Eine mögliche Struktur für die Wechselwirkung der menschlichen MGMT mit O⁶-Methylguanin in der DNA, gestützt auf Kristallstrukturdaten und Struktur-Wirkungs-Studien, ist in Abbildung 12 dargestellt [94].

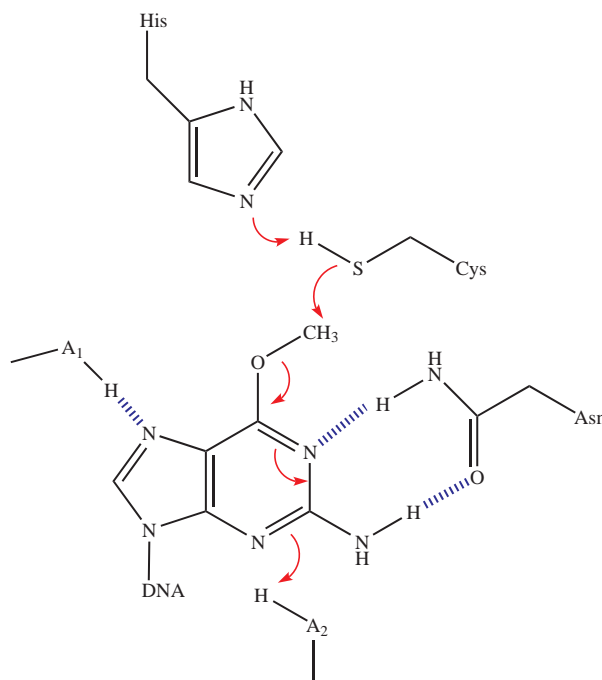


Abbildung 12: Alkylübertragungsreaktion zur MGMT

Bei der Alkylübertragung handelt es sich um eine säurekatalysierte S_N2 -Reaktion, bei der das Cystein-Thiolat als Nukleophil fungiert. Der S_N2 -Mechanismus wird durch die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der Dealkylierung von O^6 -Alkylguaninen durch MGMT bestätigt, die in der Reihenfolge Methyl > Ethyl > Isopropyl abnehmen [96–98]. Da bei einem S_N1 -Mechanismus eine positive Ladung am Alkylrest stabilisiert werden müsste, lässt die Reihenfolge der Reaktionsgeschwindigkeiten auf einen S_N2 -Mechanismus schließen.

Die Alkylübertragung ist irreversibel, das heißt, dass das Protein nicht mehr zurückgewonnen werden kann. Man bezeichnet es deshalb auch als „Selbstmordenzym“, wobei es im eigentlichen Sinne gar kein Enzym ist, da dieses in der Lage wäre, sich zu regenerieren. Wenn ein MGMT-Molekül ein Molekül O^6 -Methylguanin repariert hat, ist es also nicht mehr in der Lage, weitere Reparaturen durchzuführen. Es löst sich von der DNA und wird schnell metabolisiert [99]. Um wieder neue MGMT zur Verfügung zu haben, muss diese folglich durch Proteinbiosynthese in der Zelle neu hergestellt werden. Wie in neuesten Studien festgestellt wurde, folgt die Alkylübertragung zur MGMT einer Sättigungskinetik erster Ordnung [100] und nicht wie zunächst angenommen einer Kinetik zweiter Ordnung [94, 98, 101].

Die Details des Alkyltransfers waren lange Zeit umstritten [84, 93, 102]. In einer neuen Arbeit wurden von Spratt et al. zur Aufklärung der für die Bindung und Reaktion des Substrates wichtigen Gruppen intensive Struktur-Wirkungs-Studien mit derivatisierten Oligodeoxynukleotid- O^6 -Methylguanin-Analoga mit menschlicher MGMT durchgeführt [94] und mit früheren Studien mit *ada* MGMT verglichen [103]. Es stellte sich heraus, dass für die Bindung des Guanin-Derivates zur menschlichen MGMT die Stickstoffatome 1, 7 und 2 des Guanins ausschlaggebend sind, die eine Stabilisierung des Bindungskomplexes bewirken können oder für die Orientierung des O^6 -Methylguanins aus der DNA heraus in das aktive Zentrum des Enzyms hinein verantwortlich sind. Diese Bindung entsteht durch Wasserstoffbrücken zwischen N-1 und N-2 des Guanins und Arginin der MGMT sowie zwischen N-7 und der Aminosäure A_1 . Für den Transfer der Alkylgruppe auf den Thiolatrest der MGMT sind das Sauerstoffatom an Position 6 und das Stickstoffatom an Position 3 des Guanins ausschlaggebend. Der Methyltransfer wird durch Deprotonierung des Cysteinrestes durch die benachbarte Aminosäure

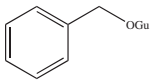
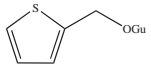
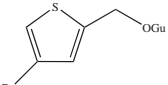
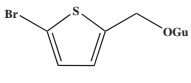
Histidin beschleunigt. Die durch den Transfer entstehende negative Ladung an O-6 des Guanins wird durch die elektronegativen Stickstoffatome 1 und 3 stabilisiert oder durch Transfer eines Protons von einer Aminosäure A₂ des aktiven Zentrums der MGMT auf Stickstoff 3. Bei Untersuchungen mit *ada* MGMT wurden Änderungen des Guanin-Derivates in den Positionen 3 und 7 weitgehend toleriert, was wohl daher kommt, dass das aktive Zentrum in der bakteriellen MGMT flexibler ist als in der menschlichen. Ansonsten ist der Mechanismus der gleiche.

1.7.2 MGMT-Inhibitoren

MGMT kann nicht nur in DNA eingebaute, sondern auch freie O⁶-substituierte Guanine dealkylieren. Bei der Übertragungsreaktion des Restes an der O⁶-Position des Guanins auf den Thiolatrest der MGMT handelt es sich, wie schon erwähnt, um eine nukleophile Substitution vom S_N2-Typ. So haben Guanine mit O⁶-Substituenten wie Ethyl-, Propyl- oder Butyl-Gruppen schon geringere Aktivitäten gegenüber MGMT als O⁶-MeG, während Isopropyl- und 2-Hydroxyethyl-Derivate kaum noch Aktivität zeigen [104]. In der Reihe Benzyl - Allyl - Methyl weist das Benzylderivat die höchste Aktivität gegenüber MGMT auf [105], was auch mit der Reaktivitätsreihenfolge für S_N2-Reaktionen übereinstimmt. Die Aktivität einer Substanz gegenüber MGMT wird meistens über den IC₅₀-Wert ausgedrückt, der angibt, bei welcher Konzentration an Inhibitor (in nM) die Hälfte der Proteine belegt ist. Je nach Methode des MGMT-Assays können die IC₅₀-Werte für die gleiche Verbindung deutlich schwanken. Deshalb ist es günstig, immer den Wert einer Referenzsubstanz mit anzugeben.

Nachdem 1990 von Pegg et al. herausgefunden wurde, dass es sich bei O⁶-Benzylguanin (BG) um einen sehr guten Inhibitor der MGMT (2000-fach besser als O⁶-MeG) handelt [105], wurde eine Vielzahl unterschiedlichster Guanin-Derivate synthetisiert und bezüglich ihrer Aktivität gegenüber MGMT untersucht. Einen aktuellen Überblick über die MGMT-Inhibitoren gibt ein Übersichtsartikel von McElhinney et al. [104], die auch führend in der Entwicklung der Inhibitoren waren. In einer Studie wurde z. B. untersucht, wie sich die IC₅₀-Werte von BG-Derivaten ändern, wenn Substituenten am Benzolring eingeführt werden. Dabei wurde herausgefunden, dass Substituenten in der para- und meta-Position gut toleriert werden, wogegen sich Substituenten in der ortho-Position auf Grund sterischer Effekte sehr nachteilig auswirken. Ein direkter Zusammenhang zwischen der elektronischen Struktur der Substituenten und der Aktivität der Inhibitoren zur MGMT ließ sich nicht nachweisen. Neben BG-Derivaten wurden auch heteroaromatische Reste an der O⁶-Position des Guanins getestet, wie z. B. Pyridinringe oder Thenylreste. Es zeigte sich, dass sich ein Thenylring noch vorteilhafter auf die Aktivität zur MGMT auswirkt als ein Benzylring (Tab. 5). Auch bei den Thenylderivaten wirkt sich eine Substitution in ortho-Position drastisch auf die IC₅₀-Werte aus, während eine Substitution in Position 4 und 5, z. B. durch Brom, zu potenteren Inhibitoren als O⁶-Thenylguanin führt. In Tabelle 5 sind ausgewählte Inhibitoren mit ihren *in vitro*-IC₅₀-Werten aufgelistet [104, 106].

Tabelle 5: *In vitro*-IC₅₀-Werte ausgewählter O⁶-substituierter Guanine bezüglich MGMT

| Inhibitor | Abkürzung | IC ₅₀ / nM |
|---|-----------|-----------------------|
|  | BG | 40 |
|  | TG | 18 |
|  | 4-BTG | 4 |
|  | 5-BTG | 5 |

Auch Substituenten am Puringerüst können die Aktivität eines Derivates gegenüber MGMT gravierend verändern. Es wurde herausgefunden, dass Substituenten an der N⁷-Position des Guanins eine Bindung an die MGMT verhindern. Lediglich ein Methylrest scheint klein genug zu sein, um noch eine mäßige Aktivität gegenüber MGMT zu ermöglichen [107]. An der N⁹-Position hingegen, die auch in der DNA substituiert ist, werden diverse Substituenten toleriert. Nur polare Substituenten verringern die Aktivität der Inhibitoren stark. Lipophile Gruppen, unabhängig von ihrer Größe, werden weitestgehend akzeptiert. Bei der Untersuchung von Nukleosiden, die besser wasserlöslich sind als die Guanin-Derivate, wurde herausgefunden, dass die Aktivität im Allgemeinen 40 - 50 mal schlechter ist als die der unkonjugierten Derivate [104]. Generell werden die inhibitorischen Eigenschaften der Guanin-Derivate bei einer Konjugation an der Position 9 schlechter, aber wenn dadurch andere Eigenschaften wie die Löslichkeit der Verbindung oder die Selektivität für das Tumorgewebe erhöht werden, kann das in Kauf genommen werden [108].

Da ein starker Zusammenhang zwischen der MGMT-Konzentration eines Tumors und seiner Resistenz gegenüber alkylierenden und chloralkylierenden Zytostatika besteht, wurden zunächst Untersuchungen durchgeführt, die MGMT-Aktivität dieser Zellen durch eine Vorbehandlung mit Streptozotocin, einer methylierenden Substanz, auszuschalten, und danach die eigentliche Chemotherapie mit Carmustin durchzuführen [109, 110]. In Zellkulturen war diese Methode erfolgreich [111], und auch in klinischen Studien der Phase I wurde durch die Gabe von Streptozotocin eine bedeutende Verringerung der MGMT-Konzentration im Tumor erreicht. Die systemischen Nebenwirkungen bei der anschließenden Gabe von Carmustin waren jedoch deutlich erhöht, was dazu führte, dass diese Strategie nicht mehr weiter verfolgt wurde [109]. Diese Methode wurde durch die Gabe von BG als Inhibitor abgelöst.

Schon 1990/91 fanden Pegg et al. heraus, dass MGMT von BG inhibiert und dadurch die Zytotoxizität von alkylierenden und chloralkylierenden Agentien potenziert wird [112, 113]. In menschlichen Tumorxenograften wird MGMT durch BG innerhalb von 30 Minuten ausgeschaltet und bleibt es für 6 - 8 h. Nach dieser Zeit wird MGMT durch Proteinsynthese neu hergestellt, was durch wiederholte Gabe von BG verhindert werden kann. Therapeutische Dosen von BG sind nicht toxisch, doch schon in präklinischen Studien zeigte sich, dass die maximale tolerierte Dosis des Nitrosoharnstoffes nur etwa 25 % der Dosis, die ohne vorherige Inhibierung durch BG gegeben werden kann, betragen würde [114, 115]. In klinischen Studien der Phase I wurde die benötigte Dosis BG für die vollständige Ausschaltung der MGMT ermittelt, ebenso die maximal tolerierte Dosis Carmustin (20 % der Dosis bei alleiniger Gabe) [116]. Es wurden mehrere klinische Studien der Phase II mit dieser Kombination und unterschiedlichen Tumorarten gestartet. In einer Studie mit unterschiedlichen Nitrosoharnstoff-resistenten Hirntumoren konnte keine Tumorregression beobachtet werden, was wahrscheinlich an der starken Reduzierung der Dosis von Carmustin lag, die wegen der Nebenwirkungen nötig war [117]. Die Ergebnisse der anderen Phase II-Studien sind noch nicht bekannt. Desweiteren werden zur Zeit noch klinische Studien der Phase I mit der Kombination BG und Temozolomid durchgeführt [118, 119], die recht vielversprechend sind.

In England wurden klinische Studien der Phase I mit 4-BTG als Inhibitor und Temozolomid durchgeführt. Da 4-BTG ein potenterer Inhibitor ist als BG, sind die benötigten Dosen zur kompletten Inhibierung der MGMT deutlich niedriger (10 mg/m² vs. 120 mg/m² für BG [116]) und die Dosis des Temozolomids muss nicht so stark reduziert werden (75 % der alleinigen Dosis) [120, 121]. Zur Zeit werden klinische Studien der Phase II mit dieser Kombination durchgeführt.

1.7.3 Glucose-konjugierte MGMT-Inhibitoren

Wie die bisherigen Studien zeigen, wäre es wünschenswert, Inhibitoren der MGMT zu haben, die selektiv im Tumorgewebe angereichert werden und dadurch die MGMT in gesundem Gewebe nicht so stark blockieren. Andernfalls besteht kein Schutz mehr für die gesunden Zellen gegen systemische Nebenwirkungen der Chemotherapie, was zu einer drastischen Reduktion der Dosis des alkylierenden oder chloralkylierenden Zytostatikums führen würde.

Um ein besseres „Tumor-Targeting“ zu erreichen, sind verschiedene Ansätze denkbar, die vor allem in jüngster Zeit untersucht wurden. Ein möglicher Ansatz ist die Kopplung an ein Steroid, was die Aufnahme in Tumore, die Steroide aufnehmen, begünstigen und zu einer selektiven Blockierung der MGMT im Tumor führen sollte [107]. Ein sehr neuer Ansatz ist die Kopplung von BG oder seinem Deoxyguanosin-Derivat an eine Glucuronsäure über das N-2 des Guanins. Es wurde gezeigt, dass diese Derivate selbst keine Aktivität mehr gegenüber MGMT besitzen, aber durch β -Glucuronidase in BG bzw. das Deoxyguanosin umgewandelt werden, die wiederum in der Lage sind, MGMT zu inhibieren [124]. Wenn die Konzentrationen an β -Glucuronidase in einem nekrotischen Tumor ausreichend hoch sind, sollte der MGMT-Inhibitor selektiv im Tumorgewebe freigesetzt werden. Ein anderer Ansatz der gleichen Gruppe um Moschel ist die Verwendung von Folsäurederivaten, die eine ausreichende Aktivität gegenüber MGMT besitzen und selektiv in solchem Tumorgewebe angereichert werden sollten, das verstärkt Folsäurerezeptoren exprimiert [125].

Ein weiterer Ansatz beruht auf dem erhöhten Glucoseumsatz von Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen. Damit verbunden sind in Tumorzellen die Glucosetransporter stärker exprimiert, was zu einer selektiveren Aufnahme des Inhibitors in die Tumorzelle führen sollte, wenn das Inhibitor-molekül an ein Glucosemolekül gekoppelt ist. Ein zusätzlicher Nachteil der bisher beschriebenen unkonjugierten Guanin-Derivate ist ihre schlechte Wasserlöslichkeit, welche die Bioverfügbarkeit der Substanz einschränkt. Durch die Glycosylierung wird die Wasserlöslichkeit der Moleküle erhöht. Reinhard et al. [122, 123] führten umfangreiche Studien hinsichtlich der Aktivität verschiedener Glucose-Derivate von MGMT-Inhibitoren durch, die mit Alkyl-Linkerketten unterschiedlicher Länge an die N⁹-Position gekoppelt waren. Die Alkyllinker wurden verwendet, um die Aktivität nicht durch den Einfluss der polaren Glucopyranoside zu verschlechtern. Es wurden Spacer der Längen 2, 4, 6, 8, 10 und 12 verwendet und nach Kopplung an verschiedene MGMT-Inhibitoren ihre IC₅₀-Werte bestimmt. Insbesondere wurden die Untersuchungen mit O⁶-(4-Bromothienyl)guanin (4-BTG) durchgeführt (Abb. 13), das einen IC₅₀-Wert von 9 nM¹ [123] besitzt.

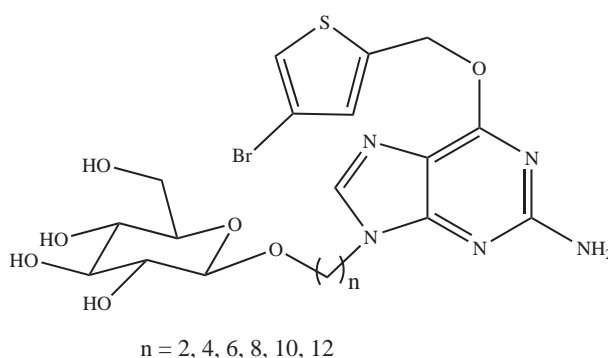


Abbildung 13: Glucosekonjugiertes O⁶-(4-Bromothienyl)guanin

Es zeigte sich, dass bei Spacerlängen von 2 - 6 Methylengruppen die Aktivitäten gegenüber MGMT dramatisch sanken - auf IC₅₀-Werte von 450 nM -, während bei 8 - 12 Methylengruppen nur eine

¹Der von Reihardt et al. [123] gemessene IC₅₀-Wert für 4-BTG unterscheidet sich von dem in Tabelle 5 angegeben, der von McElhinney et al. [104] bestimmt wurde, auf Grund der Verwendung unterschiedlicher MGMT-Essays zur Bestimmung.

Verschlechterung der Aktivitäten um den Faktor 3 auftrat (IC_{50} -Werte von 30 nM).

Zusätzlich wurden Molecular-Modelling-Rechnungen durchgeführt, um die Wechselwirkungsenergien der MGMT-Inhibitor-Komplexe zu bestimmen und eine Aussage über deren dreidimensionale Struktur machen zu können. Dabei fanden Reinhard et al. heraus, dass der O^6 -Substituent, in diesem Falle der 4-Bromophenylrest, eine Position mit einer Wechselwirkungsenergie von - 7,2 kcal/mol innerhalb der Bindungstasche des Enzyms im aktiven Zentrum einnimmt, was etwa 30 % der totalen Stabilisierungsenergie von Enzym-Ligand (- 23,7 kcal/mol) entspricht. Der Alkylanker liefert etwa 19 % und das Purinsystem 51 % der Stabilisierungsenergie.

Das Inhibitormolekül formt eine tunnelartige Tasche im aktiven Zentrum der MGMT, die den Guaninanteil des Liganden aufnimmt. Die bevorzugte Orientierung dirigiert dann den Alkylspacer entlang einer hydrophoben Spalte auf der Proteinoberfläche. Hierbei ist die Wechselwirkungsenergie von Alkylspacer und Glucose mit der Bindungsspalte bedeutend niedriger als die Wechselwirkung des Guaninanteils mit dem Bindungstunnel. Die Rechnungen zeigten auch, dass bei der Verwendung von zu kurzen Spacern die relativ große Glucose nur schlecht in die Bindungsspalte passt. Die maximale Wechselwirkungsenergie mit dem N^9 -Substituent wird bei einem Decylspacer erreicht, während sich bei einem Dodecylspacer die Glucose schon außerhalb der Bindungsspalte befindet und kaum noch zur bindenden Wechselwirkung beitragen kann. Ein weiterer Nachteil von zu langen Linkerketten ist, dass die Löslichkeit der Moleküle wieder abnimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und gemessenen Werten herrscht. Trotz der geringeren Aktivitäten gegenüber MGMT sollten dennoch die Vorteile der Glucosekonjugate durch eine höhere Selektivität bezüglich der Aufnahme in die Tumorzellen und eine bessere Wasserlöslichkeit überwiegen. Dieses Konzept sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden.

1.7.4 Radioaktiv-markierte MGMT-Inhibitoren

Da eine Chemotherapie mit Alkylantien oder Chloralkylantien durch eine hohe Konzentration an MGMT im Tumorgewebe uneffektiv wird, wäre es wünschenswert, den MGMT-Status des Tumors vor der Therapie quantifizieren zu können, um den Nutzen abwägen zu können. Dadurch könnte die Behandlung optimal auf den vorhandenen Tumor abgestimmt werden. PET-Untersuchungen wären prinzipiell zu einer solchen Quantifizierung geeignet und in geringerem Umfang auch SPECT-Untersuchungen. Hierfür müssen allerdings MGMT-aktive Substrate gefunden werden, die eine hohe Selektivität für Tumorgewebe besitzen und zusätzlich auch noch leicht radioaktiv zu markieren sind. Um verschiedene MGMT-Inhibitoren bezüglich ihrer Effizienz *in vivo* zu testen, könnte man deren Biodistribution nicht-invasiv durch PET- bzw. SPECT-Messungen mit den entsprechenden radioaktiv markierten Substanzen untersuchen.

Erste Ansätze wurden in unserer Arbeitsgruppe mit der ^{18}F -Fluorethylierung von BG an N-9 und N-7 unternommen [126, 127]. Es wurden für beide Verbindungen *ex vivo* Biodistributionsstudien mit Nacktmäusen durchgeführt, die MEX(+)- und MEX(-)-Tumore trugen, das heißt Tumore, die MGMT exprimieren und solche, die keine MGMT exprimieren. Diese Versuche zeigten, dass beide Verbindungen für PET-Untersuchungen ungeeignet sind, was unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass die radioaktive Markierung nicht am Rest an O-6 des Guanins durchgeführt wurde. Auf die MGMT wird nur der Rest an O-6 übertragen, was bedeutet, dass das radiofluorierte Molekül nach der Übertragung des Benzylrestes auf die MGMT wieder aus der Zelle ausgeschieden wird. Die Radioaktivitätsverteilung dieser beiden Verbindungen spiegelte somit nicht die Verteilung von MGMT im Organismus wieder. Für eine Darstellung der MGMT ist es somit essentiell, dass die radioaktive Markierung am Rest an O-6 des Guanins stattfindet.

In der Gruppe um Vaidyanathan wurden kurz darauf zwei markierte BG-Derivate untersucht, O^6 -(4- ^{18}F)Fluorbenzyl)guanin und O^6 -(3- ^{131}I)Iodbenzyl)guanin (^{131}I)IBG) [128]. Die Darstellung des ^{18}F -Fluorderivates erfolgte nicht, wie sonst meistens üblich, durch abschließende Radiofluorierung

des Moleküls in einem letzten (oder vorletzten) Schritt der Synthese. Es wurde 4-[¹⁸F]Fluorbenzaldehyd synthetisiert, der nach der Radiosynthese zum Alkohol reduziert werden mußte und danach an das Guanin gekoppelt wurde. Diese Syntheseführung ist sehr aufwändig und dauert etwa 2 h, was bei der kurzen Halbwertszeit von ¹⁸F-Fluor ungünstig scheint. Die Darstellung von [¹³¹I]IBG erfolgte aus dem an N-9 geschützten Stannylvorläufer mit Wasserstoffperoxid in Eisessig als Oxidationsmittel und anschließender Entschützung in sehr guten Ausbeuten. Beide Verbindungen wurden bezüglich ihrer Aktivität gegenüber MGMT untersucht, die in der gleichen Größenordnung lag wie die von BG. In einem anderen Versuch wurde nachgewiesen, dass die radioaktiv markierten Reste an der O⁶-Position wirklich auf die MGMT übertragen werden. Im Jahre 2004 publizierte die gleiche Gruppe *ex vivo* Biodistributionsstudien von [¹³¹I]IBG an tumortragenden Nacktmäusen [129]. Die *in vivo*-Eigenschaften des Inhibitors waren nicht optimal und es wurde festgestellt, dass es wünschenswert wäre, einen Inhibitor zu erhalten, der sowohl weniger lipophil als auch metabolisch stabiler ist.

In unserer Arbeitsgruppe wurden die ersten Glucose-konjugierten MGMT-Inhibitoren mit ¹⁸F-Fluor markiert [130]. Da eine direkte nukleophile Fluorierung an einem nicht-aktivierten Aromaten nicht möglich ist, wurden zwei Pyridinlderivate dargestellt. Das Isonicotinsäure-Derivat (2-FPGG) ist in Abbildung 14 dargestellt, bei der anderen Verbindung handelt es sich um das Nicotinsäure-Derivat (6-FPGG).

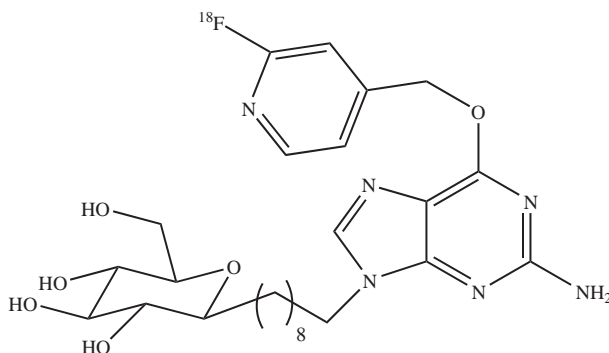


Abbildung 14: 2-Amino-6-(2-[¹⁸F]fluor-pyridin-4-ylmethoxy)-9-(octyl-β-D-glucopyranosid)-purin, 2-FPGG

Die Markierungsvorläufer beider Verbindungen waren die entsprechenden Chlorderivate, die an den Hydroxylgruppen der Glucoseeinheit durch Benzoylgruppen geschützt waren. Die Entschützung erfolgte nach erfolgter Radiofluorierung. Die IC₅₀-Werte sowohl der nichtkonjugierten als auch der Glucose-konjugierten Verbindungen lagen im nM-Bereich, waren aber etwa 6-fach schlechter als der IC₅₀-Wert der Referenzsubstanz BG [131]. Ein weiteres Problem dieser beiden Verbindungen war die schlechte radiochemische Ausbeute bei der ¹⁸F-Fluorierung (im Mittel 5 % nach HPLC-Abtrennung). Aus beiden Gründen schien eine weitere Untersuchung dieser Derivate nicht sinnvoll.

Eine weitere Arbeit in unserer Gruppe beschäftigte sich mit einer Radioiodierung zweier Glucose-konjugierter O⁶-(3-Brombenzyl)guanin-Derivat (C2-Glucoselinker und C8-Glucoselinker) zum entsprechenden radioiodierten Iodbenzylguanin-Derivat [132]. Hierfür wurde ein nukleophiler Brom-Iod-Austausch an den O⁶-(3-Brombenzyl)guanin-Derivaten durchgeführt. Während bei dem nicht-glycosylierten Guanin-Derivat das gewünschte [¹³¹I]IBG noch in einer RCA von bis zu 74 % erhalten werden konnte, stellte sich die Radioiodierung der Glucose-Konjugate als deutlich schwieriger dar. Da zur Markierung die vollgeschützten Glucose-Konjugate eingesetzt wurden, kam es unter den Reaktionsbedingungen zu Entschützungs- und wahrscheinlich auch Zersetzungsreaktionen, was zu einem komplizierten Produktgemisch vieler ¹³¹I-iodierten Verbindungen und niedrigen RCA führte. Daher konnten diese Verbindungen noch nicht weiter untersucht werden und es sollte eine andere Möglichkeit zum Erhalt dieser Derivate gefunden werden.

Eine Reihe von ^{11}C -markierten BG-Derivaten wurde von der Gruppe um Hutchins untersucht [133–135]. Es wurden unterschiedliche Derivate dargestellt, die zum Teil eine Benzyl- oder Methylgruppe am N-9 des Guanins aufwiesen. Unter den dargestellten Verbindungen hatten das para- und meta-substituierte O⁶-([^{11}C]Methoxymethyl)guanin die höchsten Aktivitäten gegenüber MGMT, in der gleichen Größenordnung wie BG. Die radiochemischen Ausbeuten für diese beiden Derivate waren allerdings niedrig, da es in Nebenreaktionen auch zur Alkylierung der N⁹- und N⁷-Position des Guanins kam. Außerdem bringt eine Verwendung von ^{11}C zur Markierung auch immer das Problem der Verfügbarkeit und der sehr kurzen Halbwertszeit mit sich.

2 Problemstellung

Die O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT) ist ein Enzym, das in der Lage ist, Schäden an der O⁶-Position von Guanin in der DNA zu reparieren. In der Therapie von Tumoren, die gegen Alkylantien und Chloralkylantien resistent sind, gibt es den Ansatz, vor der eigentlichen Chemotherapie die im Tumor vorhandene MGMT durch einen geeigneten Inhibitor auszuschalten und so die Tumore empfindlich gegenüber dem Zytostatikum zu machen. Bisher war dieser Ansatz noch nicht sehr erfolgreich.

Zur Entwicklung neuer MGMT-Inhibitoren wäre es hilfreich, die Biodistribution dieser Verbindungen in Tierversuchen und später die *in vivo*-Verteilung in Tier oder Mensch durch eine geeignete radioaktive Markierung des Inhibitors ermitteln zu können.

Zur Zeit existiert kein nicht-invasives Verfahren zur Visualisierung des O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase-Status eines Tumors. Diese Information kann aber für die Planung einer Therapie mit Alkylantien oder Chloralkylantien sehr wichtig sein. Prinzipiell ist mit Emissions-tomographischen Verfahren (PET oder SPECT) eine nicht-invasive Quantifizierung von biochemischen Prozessen möglich. Zu diesem Zweck wurden schon verschiedene Inhibitoren der MGMT mit ¹⁸F-Fluor, ¹¹C-Kohlenstoff und ¹³¹I-Iod dargestellt, die sich aber aus diversen Gründen nicht eignen. Ein Grund war ihre unzureichende Selektivität für Tumorgewebe gegenüber normalem Gewebe.

Parallel zur Validierung der bisher vorhandenen MGMT-Inhibitoren ist es wichtig, neue Strategien zur Synthese alternativer Verbindungen zu entwickeln. Ziel wäre die Verbesserung der Selektivität der Inhibitoren für Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe. Hierfür sind mehrere Ansätze denkbar. Ein Konzept für ein besseres „Tumor-Targeting“ ist die Kopplung des MGMT-Inhibitors an ein Glucosemolekül. Wegen der vermehrten Expression von Glucosetransportern in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen sollten sowohl die Tumorselektivität erhöht als auch die pharmakologischen Eigenschaften verbessert werden. Bislang wurde dieses Konzept noch nicht validiert.

Ziel dieser Arbeit war es, O⁶-derivatisierte Guanine, die über einen C₈-Linker an der N⁹-Position an ein Glucosemolekül konjugiert sind, für eine Untersuchung folgender Fragestellungen zu synthetisieren:

1. Darstellung und Untersuchung potenterer Inhibitoren der MGMT zur Therapie
2. nicht-invasive Bestimmung des MGMT-Status *in vivo*.

Die Konjugation über den Octylspacer an ein Glucosemolekül soll die Aufnahme in die Tumorzelle und die *in vivo*-Eigenschaften des Inhibitors verbessern. Durch die Wahl von acht Methylengruppen als Spacer wird die Aktivität der Substrate gegenüber der MGMT nicht sehr stark erniedrigt.

Um auch einen Vergleich zwischen einem Glucose-konjugierten MGMT-Inhibitor, dessen Glucoseeinheit β -glycosidisch an die Alkylkette geknüpft ist, und einem mit einer α -glycosidischen Bindung zu bekommen, sollten die α -Glucosekonjugate von O⁶-(4-Bromophenyl)guanin (4-BTG) und O⁶-(5-Iodophenyl)guanin (ITG) dargestellt werden. Ihre Aktivitäten gegenüber MGMT sollten mit den IC₅₀-Werten der jeweiligen β -Glucosekonjugate verglichen werden.

Geeignete Iodisotope erlauben es, *ex vivo*-Biodistributionsstudien (¹³¹I) und bildgebende Untersuchungen *in vivo* mittels SPECT (¹²³I) durchzuführen. Das iodierte Derivat sollte einerseits eine hohe Aktivität gegenüber MGMT besitzen, andererseits aber auch leicht mit hohen radiochemischen Ausbeuten radioiodierbar sein. Zum Vergleich sollten auch die nicht-konjugierten Inhibitoren radioiodiert werden.

Die radioaktive Markierung muss am Substituenten an der O⁶-Position des Guanins stattfinden, damit eine irreversible Übertragung der radioaktiven Gruppe auf die MGMT erfolgen kann. Da es sich bei O⁶-Benzylguanin (BG) um einen guten Inhibitor der MGMT handelt (IC₅₀ = 35 nM [131]) und auch

schon nachgewiesen wurde, dass O⁶-(3-Iodbenzyl)guanin (IBG) eine vergleichbare Aktivität gegenüber MGMT besitzt (IC₅₀ = 20 nM [131]), sollte das entsprechende Glucosekonjugat 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-β-D-glucopyranosid)-purin **29** (IBGG) dargestellt werden.

Einer der potentesten bislang bekannten Inhibitoren der MGMT ist jedoch O⁶-(5-Bromothienyl)guanin (5-BTG) mit einem IC₅₀-Wert von 5 nM [104]. Da aber weder ⁷⁶Br-Brom noch ⁷⁷Br-Brom kommerziell erhältlich sind, sollten der neue Inhibitor (ITG) und sein entsprechendes Glucose-Konjugat 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl-β-D-glucopyranosid)-purin **27** (ITGG) hergestellt werden. In Abbildung 15 sind Beispiele der zu synthetisierenden MGMT-Inhibitoren dargestellt.

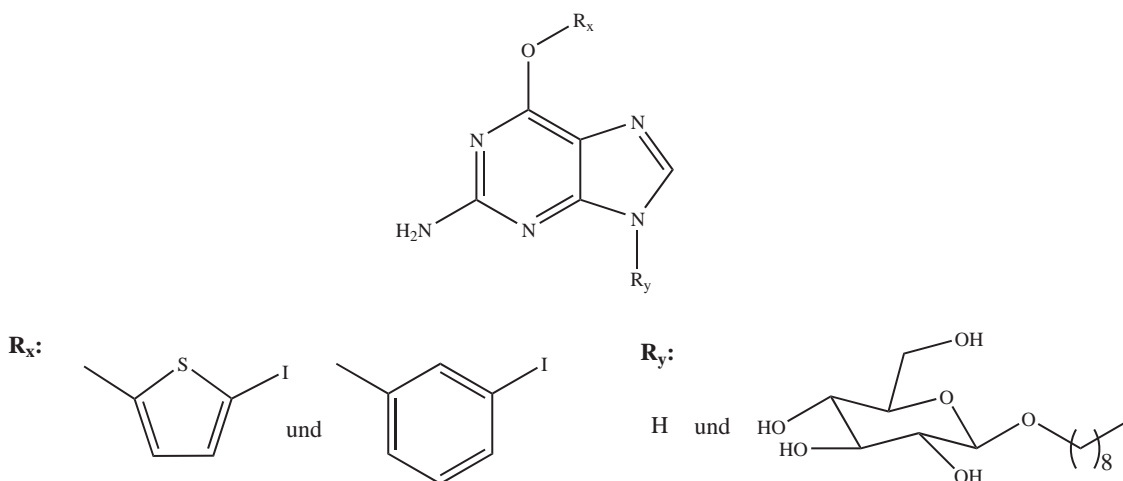


Abbildung 15: Beispiele der zu synthetisierenden Guanin-Derivate

Für die Radioiodierungen mussten geeignete Markierungsvorläufer dargestellt werden. Denkbar wäre hier bei ITG und ITGG eine direkte Radioiodierung am Thienylrest, die vorwiegend in der 5-Position erfolgen sollte. Eine regioselektive Methode zur Radioiodierung ist jedoch die Verwendung einer Trialkylstannyl-Abgangsgruppe, weswegen von den vier Guanin-Derivaten die Stannylvorläufer SnTGG, SnTGSi, SnBGG und SnBGSi hergestellt werden sollten. Bei den nicht-Glucosekonjugierten Inhibitoren musste dafür zunächst eine Schützung der N⁹-Position des Guanins vorgenommen werden. Die radioaktiven Markierungen mit ¹³¹I-Iod sollten unter Variation geeigneter Reaktionsparameter, wie z. B. Oxidationsmittel, pH-Wert, Vorläuferkonzentration und Reaktionsdauer, optimiert werden. Unter den optimierten Bedingungen sollten danach auch Radioiodierungen mit ¹²³I-Iod durchgeführt werden.

Um eine Eignung der ^{131/123}I-iodierten Verbindungen für die genannten Zielstellungen zu validieren, sollten verschiedene biologische Fragestellungen beantwortet werden. Die Durchführung entsprechender biologischer Experimente sollte erste Aussagen über den potentiellen Einsatz der Derivate zur nicht-invasiven Bestimmung des MGMT-Status eines Tumors und der möglichen besseren Eignung der Substanzen zur Blockierung der MGMT vor einer Chemotherapie durch Alkylantien oder Chloralkylantien ermöglichen.

Von den inaktiven Standardverbindungen sollten erstens die IC₅₀-Werte bezüglich der MGMT bestimmt werden, um herauszufinden, ob die Derivate ausreichend potent sind und sich für die weiteren geplanten Untersuchungen eignen.

Ein grundlegendes Experiment sollte zweitens beweisen, dass der radioaktive Rest an der O⁶-Position der Guanin-Derivate selektiv auf die MGMT übertragen wird, was für alle weiteren Einsätze der Inhibitoren essentiell ist.

Drittens sollten die *in vivo*-Eigenschaften der ¹³¹I-iodierten Substanzen in *ex vivo*-Biodistributionsstudien an gesunden und an tumortragenden Nacktmäusen untersucht und miteinander verglichen werden.

Viertens sollte herausgefunden werden, über welche Transporter die Derivate in Zellen aufgenommen werden. Nach Gabe des entsprechenden Transporterhemmstoffes sollte dazu die Biodistribution der ¹³¹I-iodierten Inhibitoren in tumortragenden Nacktmäusen erneut bestimmt werden. Mit den ¹²³I-iodierten Verbindungen sollte schließlich eine *in vivo*-Bildgebung der Organverteilung in tumortragenden Nacktmäusen mittels einer Kleintier-SPECT-Kamera erfolgen.

3 Ergebnisse und Diskussion der organischen Synthesen

3.1 Methoden zur Darstellung von O⁶-substituierten Guanin-Derivaten

Zur Synthese von O⁶-substituierten Guaninen werden in der Literatur viele Wege beschrieben. In Kürze wird hierüber ein Übersichtsartikel erscheinen, der diese Methoden zusammenfaßt [136]. Eine schon früh bekannte Möglichkeit war die Synthese von O⁶-Benzylguanin (BG) nach Bowles et al. [137], die 2-Amino-6-chlor-purin bei 130 °C mit dem deprotonierten Alkohol, der an die O⁶-Position gekoppelt werden soll, umzusetzen. Als Lösungsmittel wird überschüssiger Alkohol verwendet, die Deprotonierung erfolgt mit elementarem Natrium (Abb. 16).

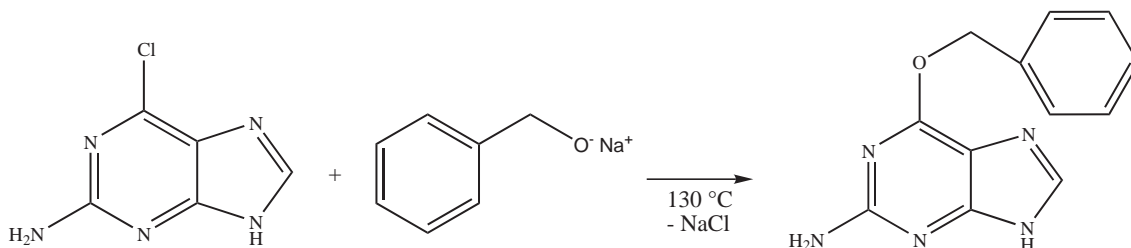


Abbildung 16: Darstellung von BG nach Bowles et al.

Diese Methode erfordert, nicht zuletzt auf Grund der hohen Reaktionstemperaturen, recht drastische Reaktionsbedingungen und ist daher ungeeignet für empfindlichere Alkohole. Da es sich bei Chlor in der 6-Position des Guanins allerdings um eine schlechte Abgangsgruppe handelt, sind die hohen Reaktionstemperaturen nötig, damit eine Reaktion eintritt. Da zudem der Alkohol gleichzeitig als Lösungsmittel verwendet wird, ist der Einsatz teurer oder schwer herzustellender Alkohole nicht ratsam. Bei der Trimethylammonium-Gruppe in der 6-Position des Guanins handelt es sich um eine bessere Abgangsgruppe. Die Darstellung dieses Guanin-Vorläufers wurde als erstes von Kilburis und Lister beschrieben [138], die für die Synthese gasförmiges Trimethylamin einkondensierten. Die Verwendung des Trimethylammoniumsalzes zur Kopplung von Alkoholen an die 6-Position des Guanins wurde als erstes von McElhinney et al. beschrieben [106], die mit dieser Methode auch Heteroarylalkohole koppeln konnten (Abb. 17).

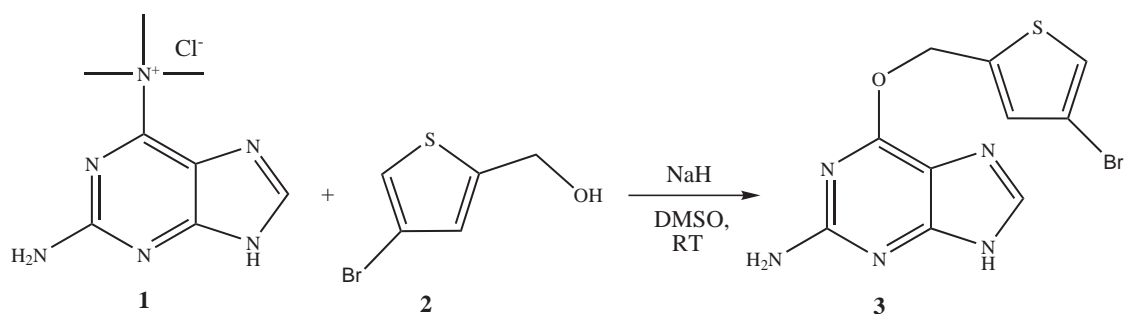


Abbildung 17: Darstellung von O⁶-(4-Bromophenyl)guanin 3 (4-BTG) nach McElhinney et al.

Auch hier wird die Kopplung mit dem deprotonierten Alkohol durchgeführt, allerdings bei Raumtemperatur. Die Deprotonierung des Alkohols erfolgt mit Natriumhydrid und als Lösungsmittel wird DMSO verwendet. Daher sollte auch die Umsetzung empfindlicherer Alkohole möglich sein.

Bei den Arbeiten von Schirmmayer et al. [139] zeigte sich jedoch, dass die Umsetzung von Chlorheteroaryl-Alkoholen, wie (2-Chlorpyridin-4-yl)methanol, nach der Methode von McElhinney noch mit moderaten Ausbeuten gelingt, bei Fluorheteroaryl-Alkoholen, die eine verringerte Nucleophilie besitzen, allerdings versagt. Auch erhöhte Reaktionstemperaturen bis 80 °C erbrachten keinen

Reaktionsumsatz. Daher wurde 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator zugesetzt und die Reaktion bei 60 °C und langen Reaktionszeiten (72 h) durchgeführt. Die Kopplung erfolgt zwischen (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** und dem zuvor deprotonierten Alkohol in DMSO (Abb. 18).

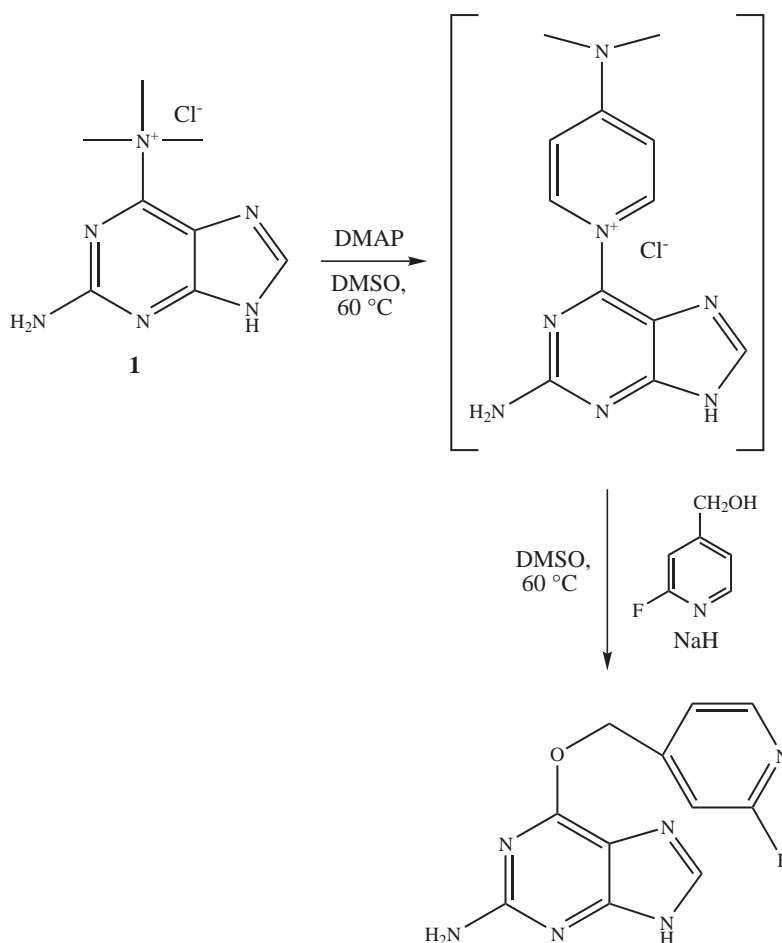


Abbildung 18: Darstellung von 2-Amino-6-(2-fluor-pyridin-4-ylmethoxy)-9H-purin nach Schirmmacher et al.

Über die Bildung eines Intermediats aus DMAP und dem Guanin wird eine bessere Abgangsgruppe erhalten und die Kopplung mit dem deprotonierten Alkohol erleichtert. So war es möglich, sowohl mit Chlorheteroaryl-Alkoholen als auch mit Fluorheteroaryl-Alkoholen gute Ausbeuten bis zu 85 % zu erzielen.

Auf die anderen Methoden zur Darstellung von O⁶-substituierten Guanin-Derivaten soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden, da sie in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurden.

3.2 Darstellung von (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid

Die zur Zeit beste Abgangsgruppe zur Substitution von Guaninen in der 6-Position ist die Trimethylammoniumgruppe, mit der die Kopplung mit dem deprotonierten Alkohol in DMSO stattfinden kann. Zunächst wurde das Trimethylammoniumsalz **1** in einer recht aufwändigen Methode durch Reaktion mit kondensiertem gasförmigem Trimethylamin (TMA) hergestellt [138]. Um diesen Schritt zu vermeiden, wurde von Schirmmacher et al. [139] eine neue Methode entwickelt, bei der kommerziell erhältliche ethanolische Trimethylaminlösung verwendet wird (Abb. 19). Hierfür wird 2-Amino-6-chlorpurin in möglichst wenig trockenem DMSO gelöst und die TMA-Lösung bei Raumtemperatur

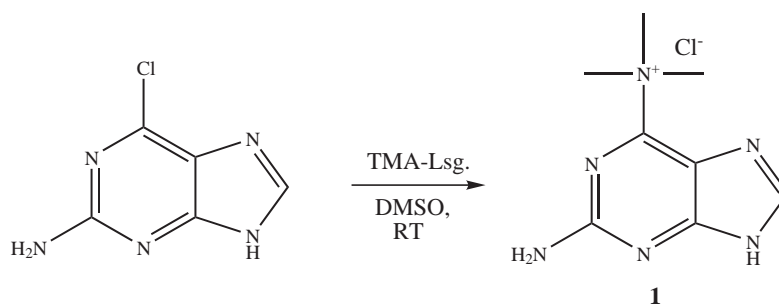


Abbildung 19: Darstellung von (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1**

zugegeben. Eine Erhöhung der Reaktionszeit von 11 auf 42 h bewirkte eine Steigerung der Ausbeute auf 90 %. Das Produkt fällt als weißer Niederschlag aus, wird im Vakuum abfiltriert und mit Essigester und Diethylether gewaschen.

3.3 Darstellung der Alkohole zur Kopplung an die O⁶-Position des Guanins

Die zur Kopplung an Guanin benutzten Alkohole und ihre im Folgenden verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Zur Kopplung verwendete Alkohole und ihre Abkürzungen

| R_I-CH₂OH | R_{II}-CH₂OH | R_{III}-CH₂OH | R_{IV}-CH₂OH | R_V-CH₂OH | R_{VI}-CH₂OH |
|---------------------------------------|--|---|--|---------------------------------------|--|
| | | | | | |

3-Iodbenzylalkohol (R_I-CH₂OH) für die Synthesen der Iodbenzyl-Derivate war kommerziell erhältlich, ebenso Thenylalkohol (R_{II}-CH₂OH) und 3-Brombenzylalkohol (R_{VI}-CH₂OH). Bei den Bromthienylalkoholen (R_{IV,V}-CH₂OH) war der jeweilige Aldehyd erhältlich und musste zum Alkohol reduziert werden. Für die Darstellung des 5-Iodothiophenylalkohols (R_{III}-CH₂OH) war zum entsprechenden Zeitpunkt der Aldehyd käuflich nicht erhältlich. Es wurde versucht, diesen über mehrere Reaktionswege herzustellen, einmal ausgehend von 2-Iodthiophen und zum anderen ausgehend von Thenylalkohol.

3.3.1 Synthese der Bromthienylalkohole

Analog einer Vorschrift von Reinhard et al. [123] wurden die entsprechenden Aldehyde, 4-Bromthiophen-2-carbaldehyd bzw. 5-Bromthiophen-2-carbaldehyd, mit Natriumborhydrid zu den Alkoholen reduziert (Abb. 20).

Entgegen der Vorschrift waren die beiden Alkohole nach der dort beschriebenen Aufarbeitung nicht sauber und wurden deshalb im Vakuum destilliert. 4-Bromthienylalkohol wurde so als farbloser Feststoff in 47 % Ausbeute erhalten. 5-Bromthienylalkohol war nach der Destillation noch nicht sauber und wurde daher weiter säulenchromatographisch (Essigester:n-Hexan, 2:1, R_f = 0,45) gereinigt. Der gewünschte Alkohol wurde als orange Flüssigkeit in einer Ausbeute von 58 % erhalten.

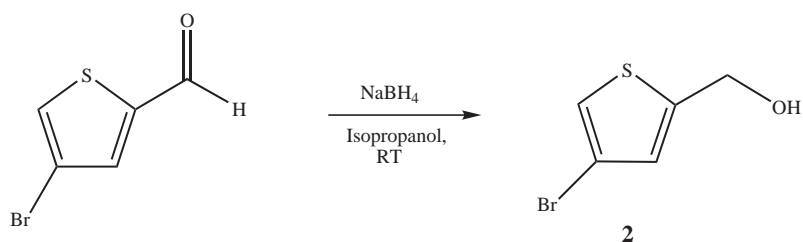


Abbildung 20: Darstellung von 4-Bromothiophenylalkohol

3.3.2 Darstellung von 5-Iodothiophenylalkohol

Bei allen Reaktionen mit iodierten Verbindungen wurde soweit möglich unter Lichtausschluss gearbeitet.

Für eine Darstellung von 5-Iodothiophenylalkohol schienen zwei verschiedene Wege möglich, entweder eine Umsetzung von 2-Iodthiophen zum entsprechenden Aldehyd mit anschließender Reduktion oder eine Iodierung von Thiophenylalkohol. Zunächst wurde erstere Variante untersucht. Analog einer Vorschrift von Polívka et al. [140] wurde 2-Iodthiophen mit Dimethylformamid (DMF) und Phosphorylchlorid umgesetzt (Abb. 21).

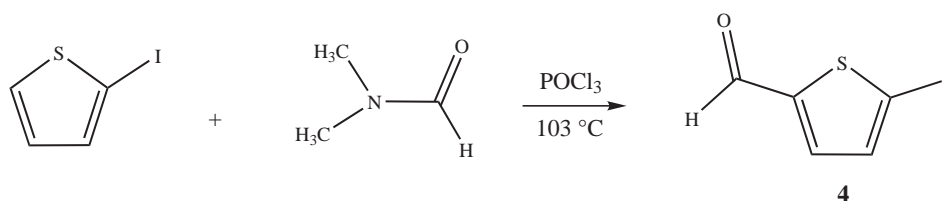


Abbildung 21: Synthese von 5-Iodthiophen-2-carbaldehyd 4

Nach Aufarbeitung konnte 5-Iodthiophen-2-carbaldehyd **4** als bräunlicher Feststoff in 39 % Ausbeute erhalten werden. Wegen der drastischen Reaktionsbedingungen, die ursprünglich für Thiophen entwickelt wurden, kam es jedoch auch zu einer Deiodierung von Edukt und Produkt, weswegen diese Strategie nicht sehr geeignet war. Der erhaltene Aldehyd konnte problemlos, wie oben beschrieben, mit Natriumborhydrid reduziert werden, wobei auf eine Aufreinigung mittels Vakuumdestillation wegen der möglichen Instabilität der Iodverbindung verzichtet wurde. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit n-Hexan:Essigester, 6:1 ($R_f = 0,22$). 5-Iodothiophenylalkohol **5** konnte als braune Flüssigkeit in einer Ausbeute von 73 % erhalten werden. Wegen der schlechten Reproduzierbarkeit des ersten Reaktionsschrittes wurde nach einer alternativen Synthesestrategie gesucht.

Der zweite mögliche Weg der Darstellung von **5** geht von Thiophenylalkohol aus, der iodiert werden muss (Abb. 22). Eine Iodierungsmethode für aromatische Systeme benutzt das Bis-(trifluoracetoxy)iodbenzol-Iod-System, was zunächst von Merkushev et al. allgemein für Aromaten beschrieben wurde [141] und später von D'Auria et al. für die Iodierung von Thiophenderivaten [142]. Durch die Reaktion von Bis-(trifluoracetoxy)iodbenzol mit Iod bildet sich Trifluoracetylhypiodid, das in einer elektrophilen Substitution mit dem Aromaten reagieren kann. Die milden Reaktionsbedingungen schienen vielversprechend, um den gewünschten 5-Iodothiophenylalkohol aus Thiophenylalkohol darzustellen. Nach säulenchromatographischer Reinigung (siehe oben) konnten aber nur 9 % des Alkohols erhalten werden.

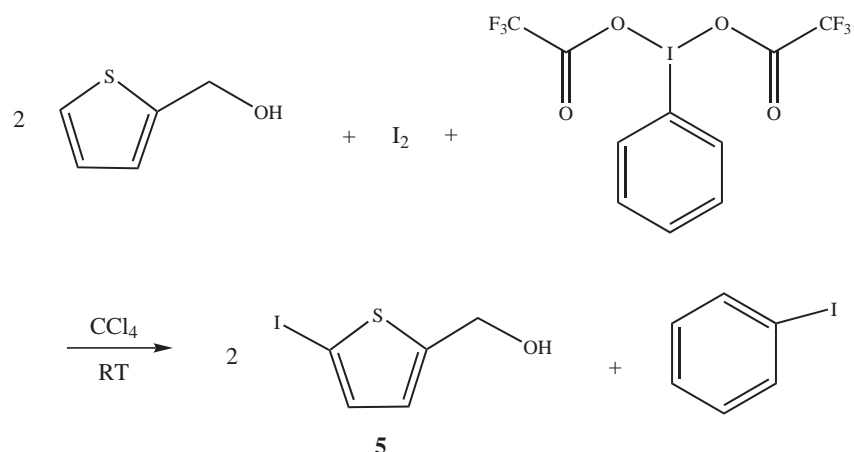


Abbildung 22: Darstellung von 5-Iodothenylalkohol **5** durch Iodierung mit dem Bis-(trifluoracetoxy)iodobenzol-Iod-System

Eine andere Methode zur Iodierung aromatischer Systeme ist die Verwendung von Quecksilberoxid und Iod als Iodierungsagens. Analog einer Vorschrift von D'Auria et al. [143] wurde Thenylalkohol unter Verwendung dieser Methode iodiert (Abb. 23).

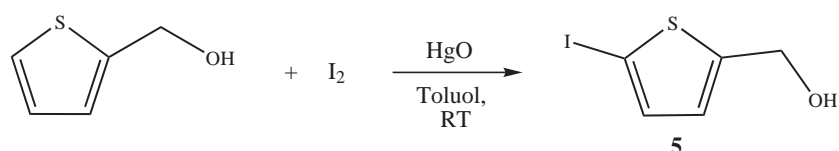


Abbildung 23: Darstellung von 5-Iodothenylalkohol **5** durch Iodierung mit Quecksilberoxid und Iod

Nach säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan:Essigester, 6:2, $R_f = 0,38$) konnte der gewünschte 5-Iodothenylalkohol in einer Ausbeute von 93 % als gelbe Flüssigkeit erhalten werden.

3.4 Darstellung der O⁶-substituierten Guanine

3.4.1 Synthese von O⁶-substituierten Guaninen unter DMAP-Katalyse

Wie oben erwähnt (3.1), ist eine Kopplung von weniger nukleophilen Heteroaryl-Alkoholen an die 6-Position des Guanins bislang nur unter Verwendung von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator bei erhöhten Reaktionstemperaturen von 60 °C möglich [139]. Bei DMAP handelt es sich um einen sehr guten Katalysator, u. a. für Acylierungen und Alkylierungen [144–146]. Es wird beispielsweise zur Acylierung, Tritylierung, Silylierung und auch zur Bildung von Heterocyclen eingesetzt [147, 148]. In der Biochemie wird es zur Schützung von Hydroxylgruppen verwendet.

Bei der Katalyse der Substitution an der 6-Position von Guanin bildet sich intermediär ein DMAP-Guanin-Addukt, das mit dem zugesetzten deprotonierten Alkohol weiterreagiert (Abb. 18). Unter Verwendung dieser Methode wurden in der vorliegenden Arbeit die Guanin-Derivate O⁶-Thenylguanin **6** (TG) und O⁶-(4-Bromothienyl)guanin **3** (4-BTG) dargestellt (Abb. 24).

Der jeweilige Alkohol (R_{II}-CH₂OH bzw. R_{IV}-CH₂OH) wurde im Überschuss eingesetzt und zur Kopplung an (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** mit Natriumhydrid deprotoniert. Die Umsetzung konnte dabei nach einer Reaktionszeit von 27 h (TG) bzw. 48 h (4-BTG) durch Zusatz von Eisessig beendet werden. Die Aufarbeitung der beiden Guaninderivate erfolgte unterschiedlich. Bei TG wurde das Produkt nach [106] durch Zusatz von Diethylether ausgefällt. Es konnte als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 63 % erhalten werden. Da sich aber auch immer ein Teil des

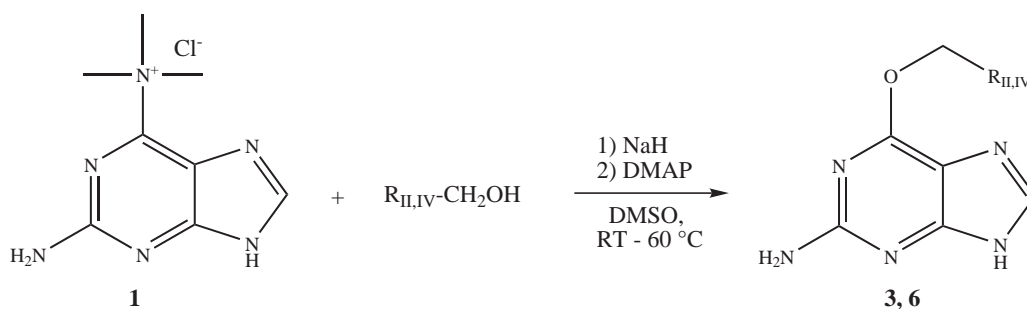


Abbildung 24: Darstellung der Guanin-Derivate TG und 4-BTG

Produktes in der Diethyletherphase löst, wurde die Aufarbeitung von 4-BTG nach [139] durchgeführt. Nach Adsorption des Rohproduktes auf Kieselgel erfolgte die Reinigung mittels Säulenchromatographie (Toluol:Methanol, 4:1, $R_f = 0,22$) und anschließender Umkristallisation aus Methanol. 4-BTG wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 41 % erhalten.

3.4.2 Synthese von O⁶-substituierten Guaninen durch direkte Reaktion mit dem Trimethylammoniumsalz 1

Der Großteil der in dieser Arbeit hergestellten O⁶-substituierten Guanin-Derivate wurde durch direkte Umsetzung des deprotonierten Alkohols mit (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid 1 in DMSO erhalten (Abb. 25).

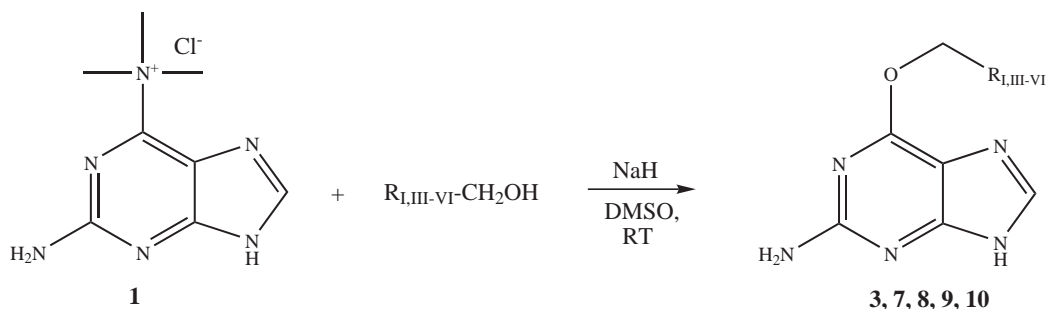
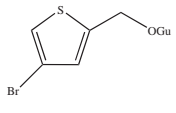
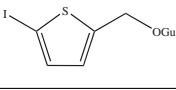
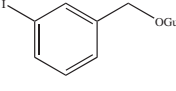
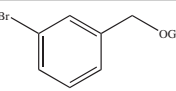
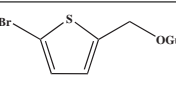


Abbildung 25: Darstellung der Guanin-Derivate ITG, IBG, 4-BTG, 5-BTG und BBG

Wegen der Empfindlichkeit mancher iodierter Verbindungen gegenüber Licht und erhöhten Temperaturen war es für diese Derivate nicht sinnvoll, eine Kopplung unter DMAP-Katalyse durchzuführen, die Reaktionstemperaturen von 60 °C erfordert. Die Reaktionsführung erfolgte weitestgehend nach [106], aber mit zusätzlichen Vorkehrungen für die iodierten Verbindungen, wie z. B. Lichtabschluss. Zudem wurden die Reaktionszeiten stark ausgedehnt auf bis zu 72 h. Die Aufarbeitung erfolgte hier in allen Fällen analog [106] durch Ausfällen mit Diethylether, da eine säulenchromatographische Reinigung die Entfernung des Lösungsmittels DMSO vorausgesetzt hätte, wofür erhöhte Temperaturen benötigt werden. In Tabelle 7 sind die dargestellten O⁶-substituierten Guanine mit ihren Ausbeuten aufgelistet.

Da die Ausbeuten bei der Darstellung von 4-BTG unter DMAP-Katalyse nicht gut waren, wurde die Synthese auch auf dem direkten Weg probiert, weil es auch bei Bromsubstituenten unter erhöhten Reaktionstemperaturen zur Dehalogenierung kommen kann. Die Ausbeute war allerdings mit 10 % vs. 41 % deutlich schlechter. Auch ITG ließ sich nur mit maximalen Ausbeuten von 40 % herstellen, die sich auch durch Verlängerung der Reaktionszeit nicht verbessern ließen, was an der Empfindlichkeit der Iodthyenyl-Derivate liegen kann. Das bromierte Benzylderivat BBG und auch 5-BTG

Tabelle 7: Ausbeuten der nach der direkten Methode synthetisierten Guanine

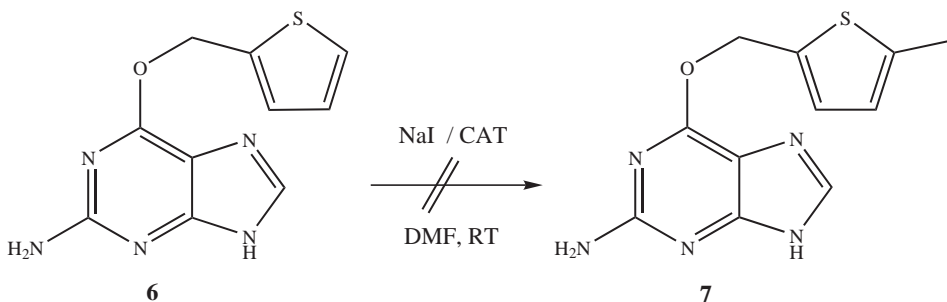
| | Verbindung | Name | Abkürzung | Ausbeute / % |
|-----------|---|---------------------------------------|-----------|--------------|
| 3 |  | O ⁶ -(4-Bromophenyl)guanin | 4-BGT | 10 |
| 7 |  | O ⁶ -(5-Iodothienyl)guanin | ITG | 40 |
| 8 |  | O ⁶ -(3-Iodbenzyl)guanin | IBG | 97 |
| 9 |  | O ⁶ -(3-Brombenzyl)guanin | BBG | 93 |
| 10 |  | O ⁶ -(5-Bromophenyl)guanin | 5-BTG | 87 |

wurden in sehr guten Ausbeuten erhalten. Für die Darstellung von IBG gibt es in der Literatur eine Vorschrift [128], die in dieser Arbeit optimiert wurde. So bewirkte eine Verlängerung der Reaktionszeit eine Steigerung der Ausbeute auf 97 % (vs. 60 %).

3.4.3 Versuchte Darstellung von O⁶-(5-Iodothienyl)guanin (ITG)

Wegen der anfänglichen Probleme, 5-Iodothienylalkohol zu erhalten, wurde die Darstellung von ITG auch durch Iodierung von TG versucht. Zunächst wurde das Bis-(trifluoracetoxy)iodbenzol-Iod-System (siehe 3.3.2) verwendet. Die Reaktion wurde analog der Iodierung von Thienylalkohol durchgeführt. Wegen der schlechten Löslichkeit von TG in Tetrachlorkohlenstoff wurde als Lösungsmittel allerdings DMF verwendet. Laut DC-Kontrolle (Toluol:Ethanol, 4:1, R_f = 0,56) hatte sich das gewünschte Produkt ITG gebildet, doch nach säulenchromatographischer Aufarbeitung konnte es nicht isoliert werden.

Eine sehr häufige Methode zur elektrophilen Radioiodierung ist die Verwendung von Chloramin-T (CAT) als Oxidationsmittel (siehe 1.6.1.1). In der Literatur ist auch eine makroskopische Iodierung mit CAT und Natriumiodid beschrieben [53]. Analog dieser Vorschrift wurde TG mit Natriumiodid und CAT in DMF umgesetzt (Abb. 26).

**Abbildung 26:** Versuchte Darstellung von ITG durch Iodierung von TG mit CAT als Oxidationsmittel

Nach Ansäuern der Reaktionslösung mit 0,1 N Salzsäure und Extraktion mit Essigester konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden, was daran liegen kann, dass sich durch das Ansäuern aus der Aminogruppe des Guanins das Hydrochlorid gebildet hat, welches in Wasser löslich ist. Doch auch nach einer Neutralisation der wässrigen Phase konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Schon vor dem Ansäuern der Reaktionslösung war der pH-Wert 4, da Iodierungen mit CAT häufig in saurem Milieu durchgeführt werden. Wie sich später bei den Radioiodierungen herausstellte, kommt es im Säuren zu einer quantitativen Abspaltung und Iodierung des Restes an der O⁶-Position des Guanins (siehe 4.2.2). Es zeigte sich auch bei den Radioiodierungen, dass eine direkte Iodierung des Thienylringes ohne Abgangsgruppe nicht möglich ist (siehe 4.2.1). Daher war eine Darstellung von ITG durch Iodierung von TG unter diesen Bedingungen nicht möglich.

3.5 Darstellung der silylgeschützten Guanin-Derivate

Für eine Darstellung der Markierungsvorläufer der unkonjugierten Guanin-Derivate wurde angenommen, dass es nötig ist, die N⁹-Position des Guanins mit einer geeigneten Schutzgruppe zu versehen. Von Vaidyanathan et al. [128] wurde in der Literatur die Darstellung eines geeigneten Guanin-Derivates beschrieben. Versuche dieser Gruppe, BBG, das keine Schutzgruppe an der N⁹-Position hatte, direkt zu stannylisieren, schlugen jedoch fehl, wahrscheinlich wegen der schlechten Löslichkeit der freien Guaninbasen. Unter den von ihnen untersuchten Schutzgruppen für die N⁹-Position wählten sie die Trimethylsilylethoxymethyl-Schutzgruppe (SEM) aus, die als Schutzgruppe für Aminfunktionen verwendet werden kann [149–151]. Die SEM-geschützten Guanine weisen eine höhere Löslichkeit als ihre freien Basen auf und lassen sich daher besser umsetzen und aufarbeiten. Die Darstellung des SEM-geschützten IBG 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(2-trimethylsilylanyl-ethoxymethyl)-purin **12** (IBGSi) wurde in [128] durch Deprotonierung des IBG mit Natriumhydrid oder Kalium-tert-butylat und anschließender Umsetzung mit Trimethylsilylethoxymethylchlorid durchgeführt. Basierend auf eigenen Versuchen [130] und Berichten aus der Literatur [152] scheint die Wahl von Natriumhydrid zur Deprotonierung ungeeignet. Zu einem gewissen Anteil wird bei einer Deprotonierung und anschließenden Umsetzung von Guaninen auch immer das, in diesem Falle unerwünschte, N⁷-Isomer gebildet (Abb. 27).

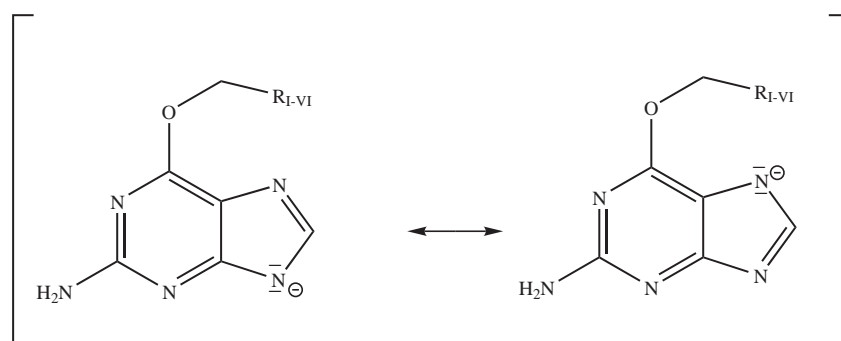


Abbildung 27: An N-9 und N-7 deprotoniertes Guanin-Derivat

Durch die Wahl der Reaktionsbedingungen kann dieser Anteil allerdings kontrolliert werden. So wird zum Beispiel bei der Verwendung von Natriumhydrid als Base bei der Alkylierung von 6-(β -Methoxyethoxy)guanin mit 4-Brombutylacetat bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C ein Verhältnis von N⁹- zu N⁷-Isomer von 3:1 erhalten. Bei der Verwendung von Lithiumhydrid als Base in der gleichen Reaktion wird ein Verhältnis von 15:1 erhalten. Damit ist Lithiumhydrid als Base wesentlich besser geeignet. Die Ausbeute in [128] für IBGSi beträgt nur 26 %, was mit Sicherheit auf eine Bildung des N⁷-Isomeren zurückzuführen ist, auch wenn es nicht isoliert wurde.

In dieser Arbeit wurde für alle Deprotonierungen an der N⁹-Position Lithiumhydrid verwendet. Für

die Darstellung von 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin **11** (ITGSi) und IBGSi wurden ITG bzw. IBG in DMF gelöst und mit Lithiumhydrid und SEM-chlorid umgesetzt (Abb. 28).

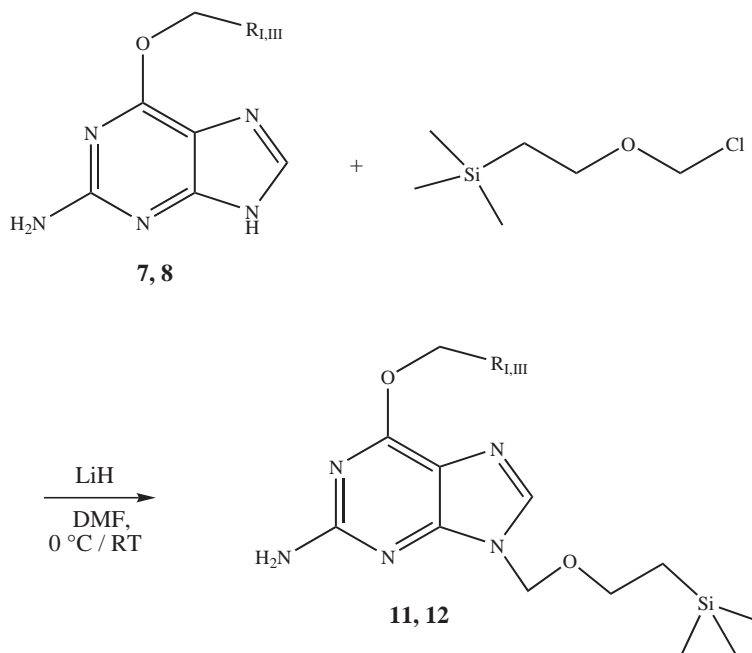


Abbildung 28: Darstellung von ITGSi und IBGSi

Die beiden Derivate konnten nach säulenchromatographischer Aufarbeitung mit n-Hexan:Essigester (3:2, $R_f(\text{ITGSi}) = 0,31$, $R_f(\text{IBGSi}) = 0,25$) als gelbe Öle isoliert werden. Die Ausbeute von ITGSi betrug 36 % und die von IBGSi 35 %, was geringfügig besser ist als die in der Literatur [128] beschriebene.

Die Entschützung der N⁹-Position der Guanin-Derivate zu den freien Guanin-Basen erfolgt nach der Radioiodierung.

3.6 Darstellung der Glucoselinker

Um die Löslichkeit, die *in vivo*-Eigenschaften und das „Tumor-Targeting“ der O⁶-derivatisierten Guanine zu verbessern, wurde der Ansatz der Konjugation an einen Zuckerlinker an der N⁹-Position des Guanins verfolgt. Als optimal bezüglich der Aktivität gegenüber MGMT und der Löslichkeit der Substanz hatte sich in vorherigen Arbeiten eine Kettenlänge von 8 Methyleneinheiten zwischen der Glucose- und der Guanineinheit erwiesen [123]. Daher sollte 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** hergestellt werden. In allen bisherigen Arbeiten wurden nur β -glycosidisch geknüpfte Glucoselinker untersucht, MGMT-Inhibitoren mit einem α -glycosidischen Glucoselinker jedoch noch nicht. Es wurde deshalb 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid **19** hergestellt und es sollten Guanin-Derivate mit diesem Glucoselinker synthetisiert werden, um die Aktivität gegenüber MGMT mit den entsprechenden β -Glucose-Konjugaten zu vergleichen.

3.6.1 Darstellung des β -Glucoselinkers

Um eine glycosidische Bindung selektiv an der gewünschten Hydroxylgruppe des Zuckers zu erzielen, müssen die anderen Hydroxylgruppen geschützt werden. Die Schutzgruppen müssen so gewählt

werden, dass sie selektiv abgespalten werden können und das Zielmolekül unter den dazu notwendigen Reaktionsbedingungen stabil ist. Für die gewünschten Guanin-Derivate waren nur Schutzgruppen geeignet, die sich unter basischen Bedingungen abspalten lassen, da die O⁶-Etherbindung säurelabil und instabil gegenüber reduktiven Bedingungen ist. Daher wurden für die Glucoseeinheit Benzoyl-Schutzgruppen gewählt.

3.6.1.1 Synthese von Pentabenzoyl-D-glucose

Ein häufig verwendeter erster Schritt in der Synthese von komplizierteren Glucose-Derivaten ist die Schützung aller Hydroxylgruppen, z. B. durch Umsetzung mit Benzoylchlorid. Je nach Reaktionsbedingungen erhält man bei der Veresterung von D-Glucose mit Benzoylchlorid bevorzugt entweder das β -Anomer, das α -Anomer oder ein Racemat.

Bei der Umsetzung von D-Glucose mit Benzoylchlorid bei Raumtemperatur und danach bei 60 °C in Pyridin konnte das β -Anomer isoliert werden (Abb. 29).

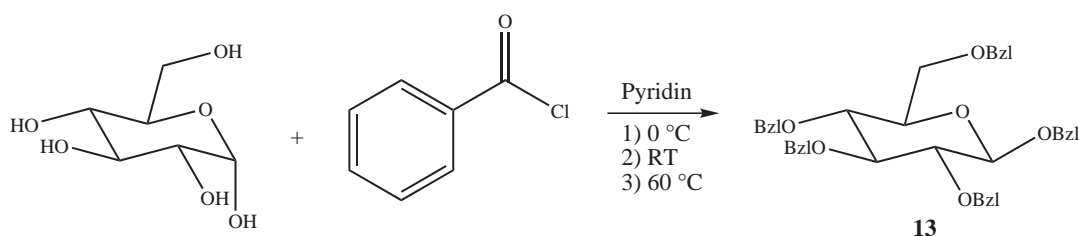


Abbildung 29: Darstellung von Pentabenzoyl- β -D-glucose **13**

Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel Pyridin weitestgehend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit Essigester extrahiert und nach Umkristallisation aus Aceton wurde Pentabenzoyl- β -D-glucose als weißes Pulver erhalten. Da die Ausbeute nur 33 % betrug und das Lösungsmittel Pyridin bis zum Schritt der Umkristallisation nicht vollständig entfernt werden konnte, was die Aufarbeitung erschwerte, wurde nach einer anderen Synthesestrategie zur Darstellung der perbenzoylierten Glucose gesucht.

In der Literatur [153] wurde ein Syntheseweg beschrieben, bei dem ein Lösungsmittelsystem aus Dichlormethan und Pyridin in einem Verhältnis von 2:1 verwendet wurde (Abb. 30).

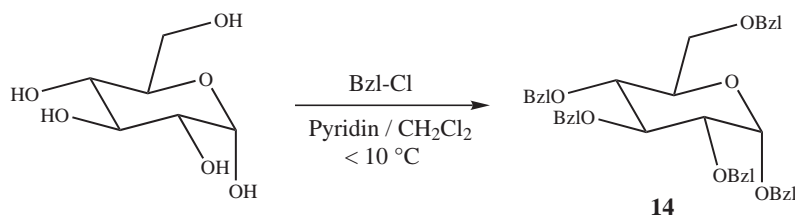


Abbildung 30: Darstellung von Pentabenzoyl- α -D-glucose **14**

Der Zusatz des Benzoylchlorids erfolgte bei -8 °C so, dass die Reaktionslösung immer kälter als 10 °C war. Danach wurde die Reaktionsmischung für 22 h bei 4 °C gelagert. Die organische Phase wurde gewaschen und nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das gewünschte Produkt als weißer, flockiger Feststoff in 55 % Ausbeute erhalten werden. Es handelte sich hierbei um das α -Anomer, was durch das ¹H-NMR-Spektrum bestätigt wurde. Das H-Atom an C-1 der Glucose hatte eine chemische Verschiebung von 6,83 ppm und eine Aufspaltung des Dubletts von 3,68 Hz. Bei dem zuvor hergestellten β -Anomer **13** wies das H-Atom an C-1 eine chemische Verschiebung von 6,28 ppm und eine Aufspaltung des Dubletts von 8,09 Hz auf. Das Signal eines H-Atoms in der equatorialen Position, wie es bei

dem α -Anomer der Fall ist, erscheint im Gegensatz zu einem axialen H-Atom bei sonst gleicher Umgebung Tieffeld-verschoben [154]. Die Unterschiede in den Kopplungskonstanten zwischen beiden Anomeren kommen von den unterschiedlichen Winkeln zwischen H-1 und H-2. Bei trans-diaxialen Wasserstoffatomen beträgt dieser Winkel 180° (α -Anomer), bei equatorial-equatorialer Ausrichtung 60° (β -Anomer). Die Abhängigkeit der Größe einer Kopplungskonstante vom dihedralen Winkel wird gut von der Karplus-Relation beschrieben. Anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Daten konnte somit belegt werden, dass es sich bei der im ersten Syntheseweg dargestellten Verbindung um Pentabenzoyl- β -D-glucose handelt und im zweiten Syntheseweg um Pentabenzoyl- α -D-glucose. Die nachfolgenden Synthesen wurden mit beiden Anomeren durchgeführt.

3.6.1.2 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosylbromid

Durch Umsetzung von perbenzoylierter D-Glucose mit Bromwasserstoff in Eisessig kann man selektiv nur die 1-Position des Zuckers bromieren (Abb. 31), weil das C-1-Atom durch den anomeren Effekt am reaktivsten ist.

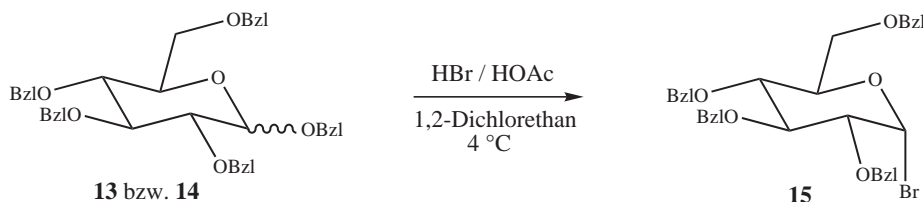


Abbildung 31: Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosylbromid **15**

Nach einer Literaturvorschrift [153] erfolgte die Umsetzung mit Pentabenzoyl- β -D-glucose in Dichlorethan bei 4 °C. Nach Aufarbeitung wurde selektiv das α -Bromid **15** ($\delta = 6,86$ ppm, $^3J = 4,04$ Hz) in einer Ausbeute von 92 % als flockiger, weißer Feststoff erhalten. Auch bei Einsatz von Pentabenzoyl- α -D-glucose wurde das α -Bromid erhalten. β -Halogenierte Zucker sind wegen des anomeren Effektes nicht stabil und müssen, wenn sie benötigt werden, *in situ* hergestellt werden.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosylbromid **15** kann in einer Glycosid-Synthese nach Königs-Knorr mit 1-Bromooctanol umgesetzt werden oder noch weiter derivatisiert werden.

3.6.1.3 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose

Für die Darstellung eines Trichloracetimidat-Derivates muss zunächst aus dem α -Bromid **15** die 1-OH-Glucose hergestellt werden. Durch Umsetzung des Bromids in Aceton mit Wasser unter Zusatz von Natriumiodid tritt eine Reaktion selektiv nur am C-1 der Glucose ein (Abb. 32).

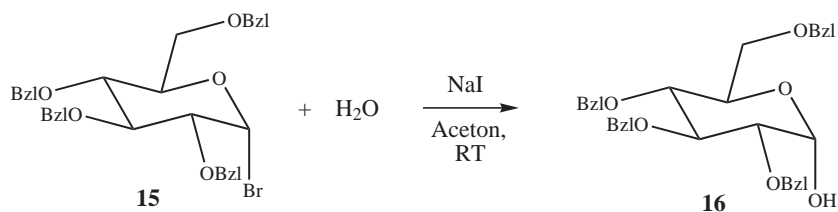


Abbildung 32: Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose **16**

Nach säulenchromatographischer Reinigung mit n-Hexan:Essigester (5:2, $R_f = 0,22$) konnte **16** als flockiger, weißer Feststoff in einer Ausbeute von 76 % isoliert werden. Bei diesem Derviat handelt es sich wiederum um das α -Anomer ($\delta = 6,61$ ppm, $^3J = 3,68$ Hz).

3.6.1.4 Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-gluco-pyranosid

Eine mittlerweile immer bedeutender werdende Methode der Knüpfung von β -glycosidischen Bindungen ist die Trichloracetimidat-Methode nach Schmidt et al., die der Königs-Knorr-Methode oft überlegen ist [155]. Hierfür muss das entsprechende Trichloracetimidat-Derivat ausgehend von dem am C-1 entschützten Zucker hergestellt werden (Abb. 33).

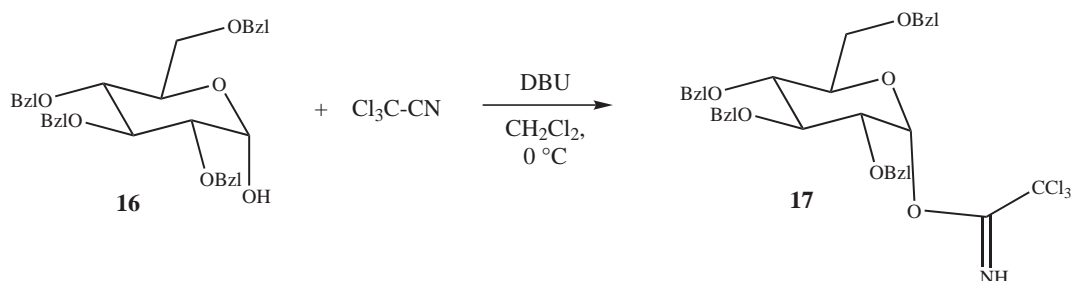


Abbildung 33: Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-gluco-pyranosid **17**

Nach Deprotonierung mit einer Base reagiert der anomere Sauerstoff mit der Dreifachbindung des Trichloracetnitrils zum Trichloracetimidat. Welches Anomer hierbei entsteht, hängt überwiegend von der verwendeten Base ab. Mit einer schwachen Base wird in einer schnellen Reaktion unter kinetischer Kontrolle das β -Trichloracetimidat gebildet, wohingegen beim Einsatz von starken Basen wie Natriumhydrid bevorzugt das thermodynamisch stabilere α -Trichloracetimidat gebildet wird. So wurde bei der Reaktion von **16** mit Trichloracetnitril und DBU als Base das α -Anomer **17** ($\delta = 6,82\text{ ppm}$, $^3\text{J} = 3,68\text{ Hz}$) gebildet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde **17** in einer Ausbeute von 95 % als gelber, flockiger Feststoff erhalten. Das Produkt ist luftempfindlich und sollte unter einer Argonschutzgasatmosphäre bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

3.6.1.5 Darstellung von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-gluco-pyranosid (Königs-Knorr)

Die älteste und immer noch am häufigsten benutzte Methode zur stereoselektiven Synthese von β -Glycosiden ist die von Königs-Knorr. Als Glycosyl-Donoren werden Glycosylbromide oder -chloride eingesetzt, die mit dem entsprechenden Alkohol unter Zusatz eines Silbersalzes wie Silbercarbonat oder Silbertriflat reagieren (Abb. 34). Zur Bildung eines Carbeniumions wird das Bromid in 1-Position des Zuckers durch den Zusatz von Silbersalzen abgespalten. Durch die benachbarte Schutzgruppe, in diesem Fall die Benzoylschutzgruppe, wird diese Zwischenstufe durch Bildung eines Oxoniumions stabilisiert. Nun kann ein Angriff des zugesetzten Alkohols nur aus der β -Position erfolgen und es wird selektiv ein β -Glycosid erhalten. Eine mögliche Nebenreaktion, die aber bei Verwendung großer Schutzgruppen, wie Benzoyl- oder Pivaloylschutzgruppen, weitestgehend unterdrückt wird, ist die Bildung von Orthoestern durch Angriff des Alkohols an der Schutzgruppe. Diese Reaktion ist jedoch in den meisten Fällen reversibel, so dass letztendlich doch das gewünschte β -Glycosid gebildet wird [157].

Die Synthese von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-gluco-pyranosid **18** wurde, wie in früheren Arbeiten [158], analog einer Literaturvorschrift [123] durch Umsetzung des Glucosylbromids **15** mit 1-Bromooctanol in trockenem Nitromethan unter Zusatz von Silberphosphat bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Abfiltrieren des Silberbromids, Adsorption des Rohproduktes auf Kieselgel und säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan:Essigester, 2:1) konnte nur eine Fraktion mit einem R_f -Wert von 0,47 isoliert werden. $^1\text{H-NMR}$ -Messungen zeigten, dass es sich hierbei nicht um den gewünschten β -Glucoselinker **18** handelte. In [158] hatte **18** einen R_f -Wert von 0,67 unter

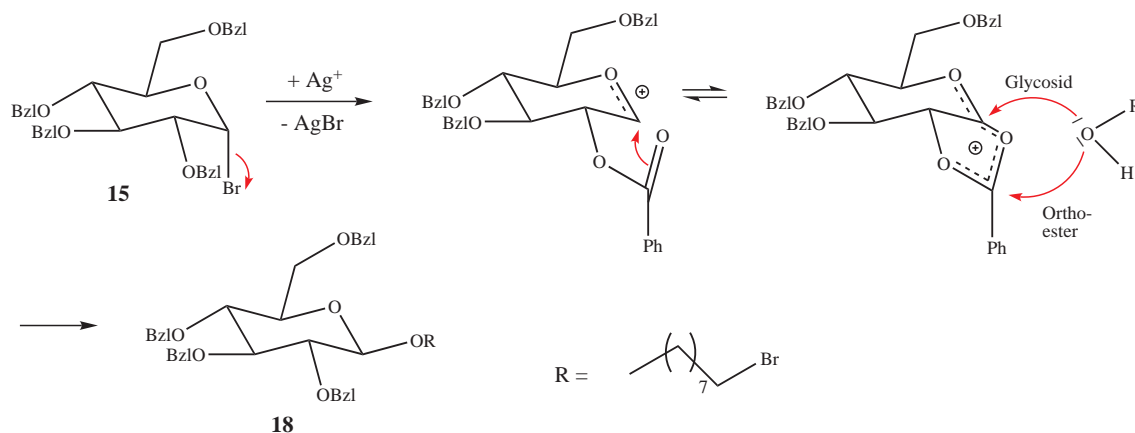


Abbildung 34: Mechanismus der diastereoselektiven Synthese von β -Glycosiden nach Königs-Knorr [156] am Beispiel der Darstellung von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18**

den gleichen Laufmittelbedingungen und es bildete sich immer ein Nebenprodukt mit einem R_f -Wert von 0,47. Es wurde angenommen, dass es sich bei dem Nebenprodukt um den Orthoester handelt, der unter den gegebenen Reaktionsbedingungen auch gebildet werden kann. Die chemische Verschiebung dieser Verbindung für H-1 betrug 5,81 ppm ($^3J = 2,74$ Hz), während die des β -Linkers 4,81 ppm ($^3J = 8,08$ Hz) betrug. Die nun isolierte Verbindung besitzt ein Dublett bei $\delta = 6,62$ ppm ($^3J = 3,90$ Hz), was zu stark zu tieferem Feld verschoben ist, als dass es sich um den Orthoester handeln könnte. Die chemische Verschiebung entspricht in etwa der der 1-OH-Glucose **16** ($\delta = 6,61$ ppm), nur die Kopplungskonstante ($^3J = 3,68$ Hz) stimmt mit dieser nicht gut überein. Wahrscheinlich handelt es sich bei den aus dieser Reaktion isolierten Fraktionen um **16** verunreinigt mit 1-Bromooctanol, was die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vorhandenen Signale des 1-Bromooctanols erklären würde.

Die Reaktion wurde mehrfach unter Verwendung von selbst hergestelltem oder kommerziell erhältlichem 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosylbromid **15** und verschiedenen Chargen 1-Bromooctanol und Silberphosphat durchgeführt. Der gewünschte β -Glucoselinker **18** konnte unter diesen Reaktionsbedingungen nicht mehr isoliert werden.

Bei einer Glycosidsynthese nach Königs-Knorr ist es möglich, eine Vielzahl von verschiedenen Silbersalzen zu verwenden, die unterschiedliche Gegenionen besitzen. Daher wurde in einem anderen Versuch Silbertriflat als Katalysator verwendet, das unter den üblicherweise verwendeten Katalysatoren eine sehr hohe Reaktivität aufweist [157]. Analog einer Literaturvorschrift [159] wurden 1-Bromooctanol und Silbertriflat in Dichlormethan mit dem Glucosylbromid **15** bei Raumtemperatur umgesetzt. Laut DC-Kontrolle (siehe oben) bildete sich der gewünschte β -Glucoselinker, doch er konnte mittels Säulenchromatographie nicht isoliert werden.

3.6.1.6 Synthese von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid (Trichloracetimidat-Methode)

Daher wurde nach einer neuen Methode zur Synthese von β -Glycosiden gesucht. Eine immer häufiger verwendete Methode ist die unter Einsatz eines Trichloracetimidats als Glycosyl-Donor. Bei den Trichloracetimidaten handelt es sich um starke Glycosyl-Donatoren, die unter relativ milden Bedingungen mit den Glycosyl-Akzeptoren reagieren [160]. Zur Katalyse reichen geringe Mengen einer Lewis-Säure, wie Bortrifluorid-Etherat oder TMSO-triflat, aus. Bei der Verwendung von geschützten Zuckern mit Nachbargruppen-Beteiligung werden selektiv die β -Glycoside gebildet (Abb. 35).

Zunächst wurde die Umsetzung des Trichloracetimidates **17** mit 1-Bromooctanol und TMSO-triflat als Katalysator in Acetonitril bei 0 °C durchgeführt. Allerdings konnten trotz säulenchromatogra-

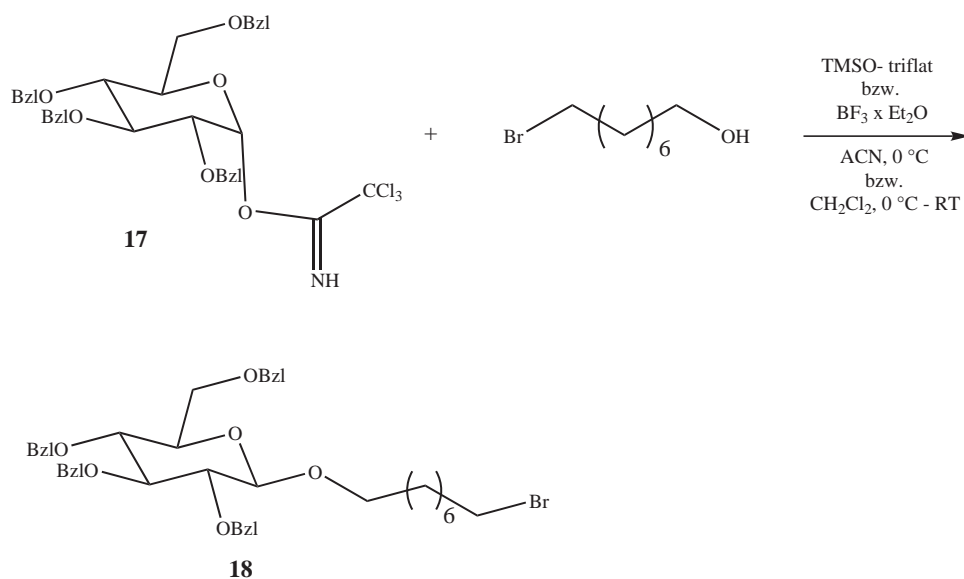


Abbildung 35: Darstellung von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** nach der Acetimidat-Methode unter Verwendung von TMSO-triflat oder Bortrifluorid-Etherat als Katalysator

phischer Reinigung (n-Hexan:Essigester, 3:1, $R_f = 0,35$), durch die der gewünschte β -Glucoselinker **18** zwar in 21 % Ausbeute erhalten wurde, nicht alle Verunreinigungen abgetrennt werden. Auch Umkristallisationen aus Ethanol erbrachten kein sauberes Produkt. Als Nebenprodukt wurde das 1-OH-Glucose-Derivat **16** in einer Ausbeute von 57 % erhalten. Daher wurde im nächsten Versuch Bortrifluorid-Etherat als Katalysator verwendet, welches eine schwächere Lewis-Säure als TMSO-triflat darstellt.

Analog einer Literaturvorschrift [155] wurden bei dieser Reaktion die beiden Edukte in trockenem Dichlormethan gelöst und der Katalysator Bortrifluorid-Etherat bei 0 °C zugegeben. Danach wurde die Reaktion bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie mit n-Hexan:Essigester, 2:1 ($R_f = 0,68$) und der gewünschte β -Glucoselinker **18** konnte in einer Ausbeute von 57 % als gelbliches Öl isoliert werden. Mit einer chemischen Verschiebung des H-1 von 4,81 ppm und einer Kopplungskonstanten von 8,09 Hz konnte das Produkt einwandfrei als ein β -Glycosid identifiziert werden. Die $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren stimmten mit denen überein, die von in früheren Arbeiten [158] erhaltenem β -Glucoselinker vorhanden waren.

3.6.2 Darstellung des α -Glucoselinke

Die Darstellung von α -Glycosiden gestaltet sich normaler Weise deutlich schwieriger als die von β -Glycosiden. Wenn an C-2 des Zuckers keine Nachbargruppen-aktive Schutzgruppe vorhanden ist, sollte ein, z. B. durch Zusatz von Tetraalkylammoniumbromid, *in situ* generiertes β -Halogenid in einer S_N2 -Reaktion zu einem α -Glycosid reagieren [161]. Die hochreaktiven β -Halogenide reagieren deutlich schneller als die entsprechenden α -Glycoside. Diese sogenannte *in situ*-Anomerisierung ist in Abbildung 36 dargestellt.

Bei Vorhandensein einer Nachbargruppen-aktiven Schutzgruppe, wie einer Benzoyl- oder Acetyl-Schutzgruppe, am C-2 des Zuckers sollte eigentlich vorwiegend das β -Glycosid entstehen (Abb. 34). In der Literatur gibt es jedoch auch einige Beispiele, die zeigen, dass auch bei Anwesenheit einer Acetyl-Schutzgruppe unter verschiedenen Reaktionsbedingungen nicht immer nur das β -Glycosid gebildet wird. So kann z. B. bei der Umsetzung eines acetyl-geschützten Glucuronsäure-Bromids in Gegenwart von TMSO-triflat auch das α -Glycosid gebildet werden [162], sowie bei der Umsetzung des

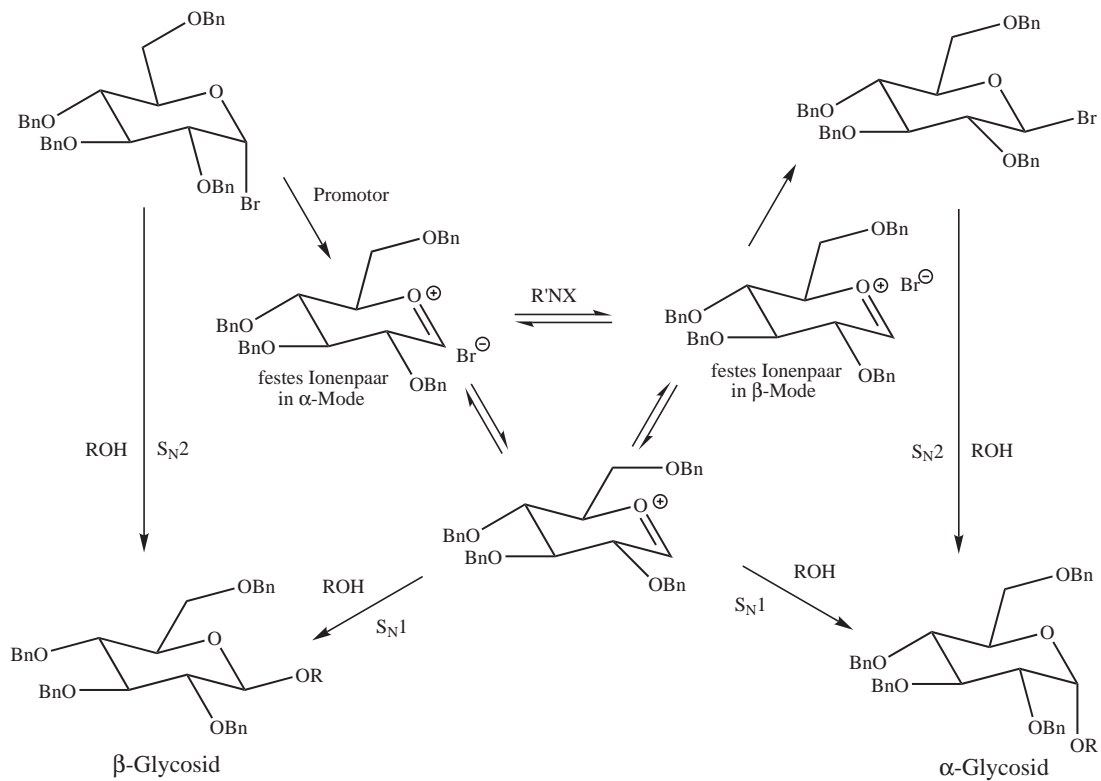


Abbildung 36: *in situ* Anomerisierung

gleichen Zuckers in Gegenwart von Silbercarbonat oder bei der Umsetzung eines acetyl-geschützten 1-OH-Glucuronsäure-Derivates in Gegenwart von Bortrifluorid-Etherat [163]. Eine Methode zur stereoselektiven Synthese von α -Glycosiden unabhängig von der benachbarten Schutzgruppe ist die Umsetzung von 1-O-Trimethylsilyl- α -glucose-Derivaten [164].

Eine andere Möglichkeit der Darstellung von Glycosiden ist die Umsetzung von peracetylierten oder perbenzoylierten Zuckern mit einem Glycosyl-Akzeptor in Gegenwart von Zinntetrachlorid (Abb. 37) [165, 166].

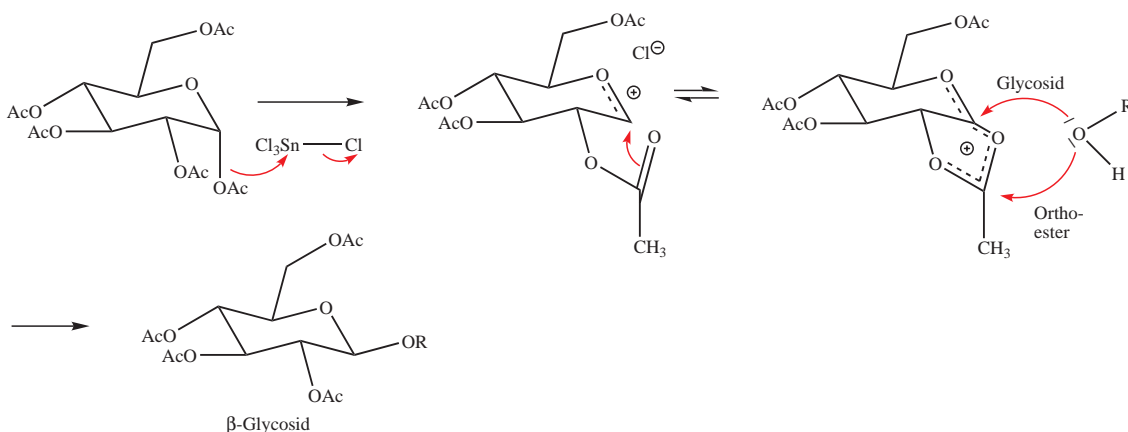


Abbildung 37: Mechanismus der Glycosylierung in Gegenwart von Zinntetrachlorid

Diese Lewis-Säure aktiviert das anomere Zentrum des Zuckers durch Entfernung der Gruppe an C-1 und daraus resultierende Bildung eines Carbeniumions. Durch eine teilnehmende Nachbargruppe

kann ein Oxoniumion gebildet werden und es entsteht vorwiegend das β -Glycosid. Diese Methode wurde schon bei vielen Molekülen erfolgreich angewendet [159, 167].

Analog einer Literaturvorschrift [159] wurde Pentabenzoyl- β -D-glucose in trockenem Dichlormethan bei 0 °C mit Zinntetrachlorid versetzt. Später wurde 1-Bromooctanol in Dichlormethan/Acetonitril zugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 38).

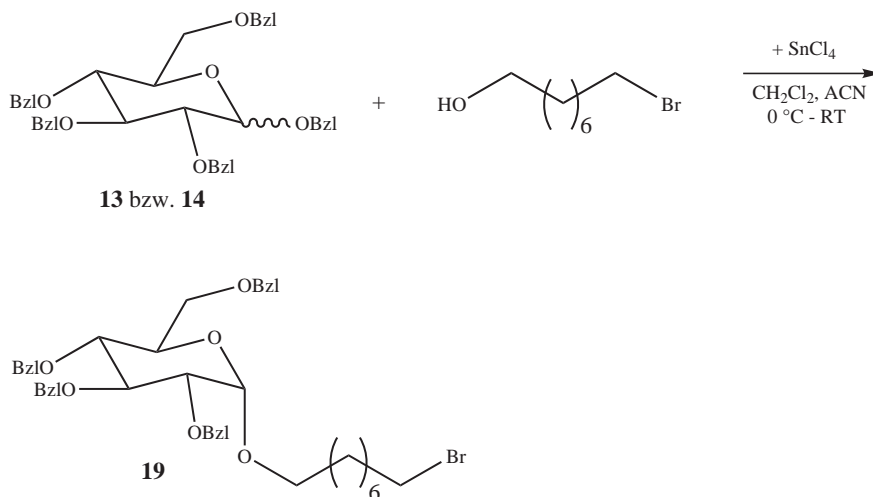


Abbildung 38: Umsetzung von Pentabenzoyl-D-glucose mit 1-Bromooctanol in Gegenwart von Zinntetrachlorid

Nach der dort beschriebenen Aufarbeitungsmethode wurde nach Umfällen aus Ethanol ein gelbliches Öl in einer Ausbeute von 95 % erhalten. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte, dass es sich bei der isolierten Substanz nicht um den β -Glucoselinker **18** handelte. Die chemische Verschiebung von H-1 betrug 5,41 ppm (vs. 4,81 ppm für **18**) mit einer Aufspaltung des Dubletts von 5,67 Hz (vs. 8,09 Hz für **18**). Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum wurde für C-1 eine chemische Verschiebung von 95,54 ppm (vs. 101,24 ppm für **18**) erhalten (Tab. 8).

Tabelle 8: NMR-Daten für das C-1-Atom von **18** und **19**

| | $\delta(\text{H-1}) / \text{ppm}$ | $^3J_{1,2} / \text{Hz}$ | $\delta(\text{C-1}) / \text{ppm}$ |
|-----------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| 18 | 4,81 | 8,09 | 101,24 |
| 19 | 5,41 | 5,67 | 95,54 |

Diese Daten sprechen eindeutig dafür, dass es sich bei dem isolierten Produkt **19** um 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid **19** handelt, obwohl die Benzoyl-Schutzgruppe Nachbargruppen-aktiv ist. Theoretisch könnte sich bei der Reaktion auch der Orthoester gebildet haben, doch dann müßte im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ein Signal bei etwa 105 ppm für das quartäre Kohlenstoffatom erscheinen. In diesem ppm-Bereich war in dem $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum kein Signal zu sehen. Bei der Reaktion muss selektiv das Carbeniumion und nicht das unter Beteiligung der Nachbarschutzgruppe gebildete Oxoniumion mit 1-Bromooctanol reagiert haben, damit der erhaltene α -Glucoselinker **19** entstanden sein kann. Auch bei Einsatz von Pentabenzoyl- α -D-Glucose wurde selektiv der α -Glucoselinker **19** in einer Ausbeute von 70 % gebildet.

Es gibt auch in der Literatur Fälle, bei denen unter Verwendung von Zinntetrachlorid und einem Glycosyl-Donor mit Acetyl- und Benzoyl-Schutzgruppen teilweise das α -Glycosid gebildet wurde. So wurde bei der Umsetzung von acetyl-geschützter Thioribofuranose in Gegenwart von Zinntetrachlorid eine Mischung aus α - und β -Glycosid gebildet [168], wie auch bei der Umsetzung von 1-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranose [169]. Hier wurde der Anteil an α -Glycosid jedoch mit 8 % angegeben.

Mit dem α -Glucoselinker wurden Glucose-konjugierte Derivate von 4-BTG, ITG und TGG hergestellt und mit den jeweiligen β -Glucose-Konjugaten bezüglich ihrer Aktivität gegenüber MGMT untersucht.

3.7 Darstellung der Glucose-Konjugate

Es sollten sowohl Guanin-Glucose-Konjugate mit dem β -Glucoselinker hergestellt werden als auch solche mit dem α -Glucoselinker. Von IBG, BBG und 5-BTG wurden die β -Glucose-Konjugate hergestellt, von TG und 4-BTG die α -Glucose-Konjugate und von ITG sowohl das α - als auch das β -Glucose-Konjugat. Das zum Vergleich der Aktivität gegenüber MGMT benötigte β -Glucose-Konjugat von 4-BTG wurde in vorherigen Arbeiten [131] hergestellt. Zur Kopplung der Glucoselinker an das Guanin wurden zwei unterschiedliche Reaktionsbedingungen verwendet, zum einen eine Reaktion bei 80 °C und zum anderen eine Reaktion bei Raumtemperatur.

3.7.1 Synthese der geschützten Glucose-Konjugate bei 80 °C

Analog einer Vorschrift von Reinhard et al. [123] wurden die geschützten Glucose-Konjugate 2-Amino-6-thenyl-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin **20**, 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **21**, 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **22** sowie 2-Amino-6-(5-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **23** hergestellt (Abb. 39).

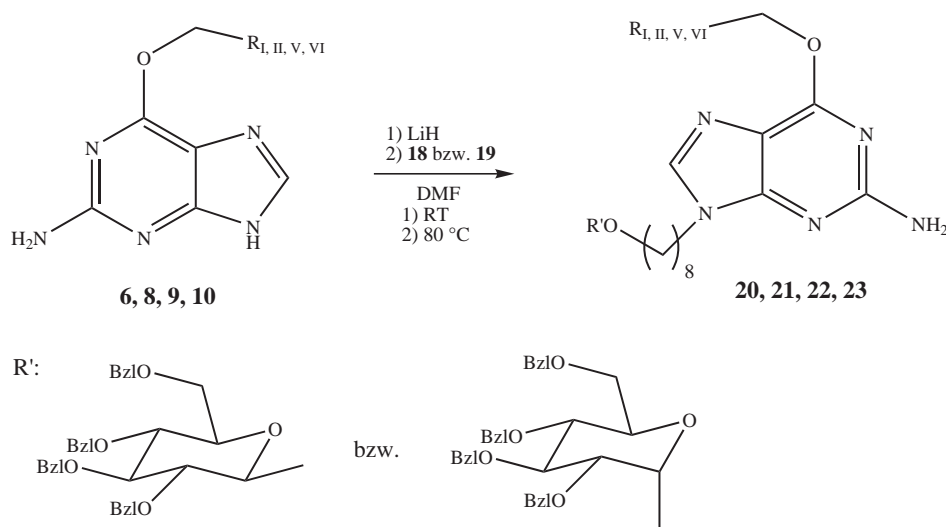


Abbildung 39: Darstellung der geschützten Guanin-Glucose-Konjugate **20**, **21**, **22** und **23**

Bei der Aufarbeitung wurden Änderungen gegenüber der Literaturvorschrift vorgenommen, sie erfolgte wie in [158]. Vor der Reaktion wurden alle Edukte sowie Rührfisch und Molekularsieb für 24 h im Vakuum getrocknet. Die Deprotonierung der Guaninkomponente erfolgt mit Lithiumhydrid als Base, um eine möglichst selektive Deprotonierung nur an der N⁹-Position des Guanins zu erreichen und nicht an der N⁷-Position, wie oben beschrieben (siehe 3.5). Zu der deprotonierten Guaninkomponente wurde nach 1 h, in der die Reaktionstemperatur auf 80 °C erhöht wurde, der entsprechende Glucoselinker **18** oder **19** schnell zugegeben und nicht, wie bei Reinhard et al. beschrieben, langsam zugegeben. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (n-Hexan:Aceton, 1:1) verfolgt und die Reaktion je nach Verbindung nach 3,5 bis 6,5 h beendet, weil entweder kein weiterer Umsatz mehr beobachtet werden konnte oder weil teilweise auch eine Entschützung der

Glucose-Einheit auftrat. Die Aufarbeitung erfolgte säulenchromatographisch (n-Hexan:Aceton, 1:1) nach Adsorption der Reaktionsmischung auf Kieselgel. In Tabelle 9 sind die R_f -Werte und die erzielten Ausbeuten der synthetisierten Derivate aufgeführt.

Tabelle 9: R_f -Werte (n-Hexan:Aceton, 1:1) und Ausbeuten der dargestellten Guanin-Glucose-Konjugate

| Konjugat | R_f -Wert | Ausbeute / % |
|-----------|-------------|--------------|
| 20 | 0,67 | 50 |
| 21 | 0,56 | 11 |
| 22 | 0,60 | 36 |
| 23 | 0,52 | 14 |

In den meisten Fällen sind die Ausbeuten dieser Reaktionen moderat. Die erhaltenen Verbindungen waren gelbliche oder orange Öle, bis auf das TG-Derivat **20**, das als weißer, flockiger Feststoff isoliert werden konnte. Nur bei diesem Derivat konnten gute Ausbeuten erzielt werden, was daran liegen kann, dass an dem Rest an der O⁶-Position des Guanins kein Halogensubstituent vorhanden ist, wie bei den anderen Verbindungen. Besonders aromatische Iod-Substituenten sind sehr empfindlich gegenüber Licht und Wärme, wogegen Brom-Substituenten eine deutlich höhere Stabilität aufweisen. Zur Untersuchung, ob die schlechten Ausbeuten des IBG-Konjugates an einer möglichen Instabilität der Iod-Kohlenstoffbindung unter den gegebenen Reaktionsbedingungen liegt, wurde die Reaktion mit dem entsprechenden Bromderivat BBG durchgeführt. Die Ausbeute für diese Guanin-Glucose-Verbindung (**22**) war mit 36 % deutlich besser als die des entsprechenden Iod-Derivates **21** (11 %). Diese Tatsache bestätigt die Vermutung, dass ein großes Problem bei der Kopplung des Guanins an den Glucoselinker die Instabilität der Iod-Kohlenstoff-Bindung im IBG unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ist. Daher wurde die Synthese des IBG-Derivates auch noch bei Raumtemperatur durchgeführt. Wenn man die Ausbeuten der beiden bromhaltigen Verbindungen BBG und 5-BTG in dieser Kopplungsreaktion vergleicht, fällt auf, dass die des 5-BTG deutlich schlechter ist als die des Benzyl-Derivates. Dieses Verhalten der Thenyl-Derivate gegenüber den Benzyl-Derivaten wurde während der ganzen vorliegenden Arbeit beobachtet. Die Thenyl-Derivate sind immer empfindlicher und weniger stabil als die vergleichbaren Benzyl-Derivate.

Ein weiterer Grund für die generell moderaten Ausbeuten ist die schlechte Löslichkeit des Lithiumhydrids in DMF. Es wurde bei der Deprotonierung der Guanin-Komponente immer eine Suspension erhalten und nie eine klare Lösung. Desweiteren ist auch die teilweise Bildung des entsprechenden N⁷-Isomers zu berücksichtigen, die zu einem gewissen Anteil mit Sicherheit stattgefunden hat, auch wenn es nicht isoliert werden konnte. Dass es sich bei den isolierten Verbindungen um die N⁹-Isomere handelt, zeigt ein Vergleich der ¹³C-NMR-Verschiebungen von C-4, C-5 und C-8 des Guanins mit denen eindeutig charakterisierter Verbindungen. In Tabelle 10 sind die gemessenen ¹³C-NMR-Verschiebungen von **21** und **23** und der Vergleichsbereich der von Reinhard et al. dargestellten N⁹-Isomere [123] und der aus vorherigen Arbeiten [130] aufgeführt. Von Verbindungen **20** und **22** wurden keine ¹³C-NMR-Spektren gemessen.

Tabelle 10: ¹³C-NMR-Verschiebungen der dargestellten Verbindungen und Literaturvergleich

| Verbindung | 21 | 23 | Vergleich (Reinhard) | Vergleich (eigene Arbeit) |
|------------------|-----------|-----------|----------------------|---------------------------|
| C-4 / ppm | 154,72 | 154,84 | 153-155 | 154-155 |
| C-5 / ppm | 113,94 | 113,85 | 114-116 | 113-115 |
| C-8 / ppm | 139,73 | 140,92 | 138-140 | 139-140 |

Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen zeigt, dass es sich bei den synthetisierten Verbindungen eindeutig um die N⁹-Isomere handelt.

In sehr seltenen Fällen konnte eine teilweise Entschützung der Glucoseeinheit unter den Bedingungen der Kopplungsreaktion beobachtet werden, die sehr viel ausgeprägter war, wenn mehr als ein Äquivalent Lithiumhydrid zugegeben wurde. Dies kommt daher, dass Lithiumhydrid auch zu einem gewissen Anteil an den Carbonylfunktionen der Benzoyl-Schutzgruppen angreifen kann und diese von den Glucose-Hydroxylgruppen abgespalten werden. Da zumindest bei der Aufarbeitung Wasser nicht ganz ausgeschlossen werden kann, entsteht das teilweise oder vollentschützte Glucose-Konjugat.

3.7.2 Darstellung der geschützten Glucose-Konjugate bei Raumtemperatur

Wegen der möglichen Instabilität der iodierten Derivate gegenüber Licht und Wärme wurde die Kopplung von ITG, IBG und auch 4-BTG an die entsprechenden Glucoselinker unter modifizierten Bedingungen durchgeführt. Die Synthesen fanden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur statt und die Reaktionszeiten wurden deutlich verlängert. Auf diese Weise wurden 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **24**, 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin **25**, 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **21** und 2-Amino-6-(4-bromothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin **26** dargestellt (Abb. 40).

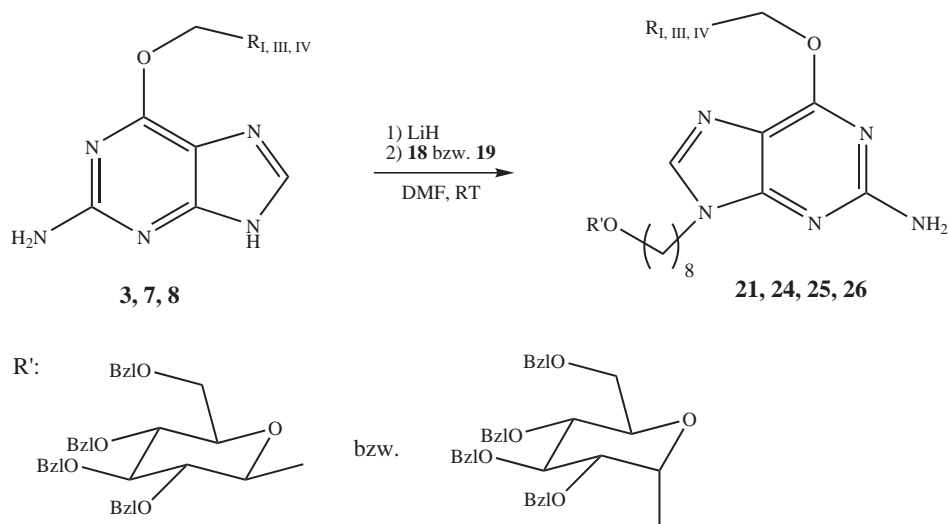


Abbildung 40: Darstellung der geschützten Glucose-Konjugate **21**, **24**, **25** und **26**

Nach Reaktionszeiten von 21 bis 23 h je nach Verbindung wurden die Reaktionen beendet, wenn mittels dünnschichtchromatographischer Kontrolle (n-Hexan:Essigester, 1:1 bzw. 2:3 für **26**) kein weiterer Umsatz mehr beobachtet werden konnte. Die Aufarbeitung erfolgte analog der Methode, die bereits bei der anderen Reaktionsführung beschrieben wurde. Die Ausbeuten und die R_f -Werte der dargestellten Verbindungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: R_f -Werte (n-Hexan:Aceton, 1:1 bzw. 2:3 für **26**) und Ausbeuten der bei Raumtemperatur dargestellten Guanin-Glucose-Konjugate

| Konjugat | R_f -Wert | Ausbeute / % |
|-----------|-------------|--------------|
| 21 | 0,56 | 15 |
| 24 | 0,55 | 53 |
| 25 | 0,53 | 37 |
| 26 | 0,58 | 24 |

Auch bei dieser Modifikation der Reaktionsführung sind die Ausbeuten in den meisten Fällen moderat. Die Verbindungen wurden als gelbe bis orange Öle isoliert. Die beste Ausbeute erzielte das β -Glucose-Konjugat von ITG mit 53 % und auch eine gute Ausbeute das entsprechende α -Konjugat. Die Ausbeute des IBG-Derivates ist etwas besser als die bei 80 °C erzielte (15 vs. 11 %). Auch für das entsprechende 4-BTG-Derivat konnte eine bessere Ausbeute erzielt werden als für das 5-BTG-Derivat bei 80 °C (24 vs. 14 %). Es hat sich somit gezeigt, dass für empfindliche Verbindungen die Reaktion bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss günstiger ist.

Die generell moderaten Ausbeuten lassen sich wieder auf die gleichen Ursachen zurückführen, die oben genannt wurden (3.7.1). Auch bei dieser Reaktionsführung konnten die entsprechenden N⁷-Isomere nicht isoliert werden. Dass es sich bei den isolierten Verbindungen eindeutig um die N⁹-Isomere handelt zeigt wiederum ein Vergleich der ¹³C-NMR-Verschiebungen (Tab. 12). Von **26** wurde kein ¹³C-NMR-Spektrum gemessen.

Tabelle 12: ¹³C-NMR-Verschiebungen der dargestellten Verbindungen und Literaturvergleich

| Verbindung | 24 | 25 | Vergleich (Reinhard) | Vergleich (eigene Arbeit) |
|------------|--------|--------|-------------------------|------------------------------|
| C-4 / ppm | 154,83 | 154,81 | 153-155 | 154-155 |
| C-5 / ppm | 113,91 | 113,92 | 114-116 | 113-115 |
| C-8 / ppm | 140,31 | 140,32 | 138-140 | 139-140 |

Eine teilweise Entschützung der Glucoseeinheit konnte bei diesen Synthesen nicht beobachtet werden.

3.7.3 Entschützung der Guanin-Glucose-Konjugate

Die erhaltenen Glucose-Konjugate waren alle an den Hydroxylgruppen der Glucoseeinheit durch Benzoylgruppen geschützt. Für die Darstellung der stannylierten Markierungsvorläufer ist eine Schützung dieser Funktionen nicht notwendig und für die nachfolgenden Radioiodierungen auch nicht. Außerdem sollten die meisten Glucose-Konjugate, außer dem TG- und dem BGG-Derivat (**20** und **22**), bezüglich ihrer Aktivität gegenüber MGMT untersucht werden, was eine Entschützung voraussetzt. Daher wurden alle Guanin-Glucose-Konjugate in einer Zemplén-Reaktion entschützt und es wurden die Konjugate 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin **27** (ITGG), 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin **28** (ITGG α), 2-Amino-6-(3-iodbenzyl-oxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin **29** (IBGG), 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin **30** (BBGG), 2-Amino-6-thenyl-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin **31** (TGG), 2-Amino-6-(4-bromothenyl)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin **32** (4-BTGG α) und 2-Amino-6-(5-bromothenyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin **33** (5-BTGG) erhalten. Bei der Zemplén-Reaktion handelt es sich um eine Transesterifizierung durch katalytische Mengen an Natriummethanolat. Ihr Mechanismus ist in Abbildung 41 dargestellt:

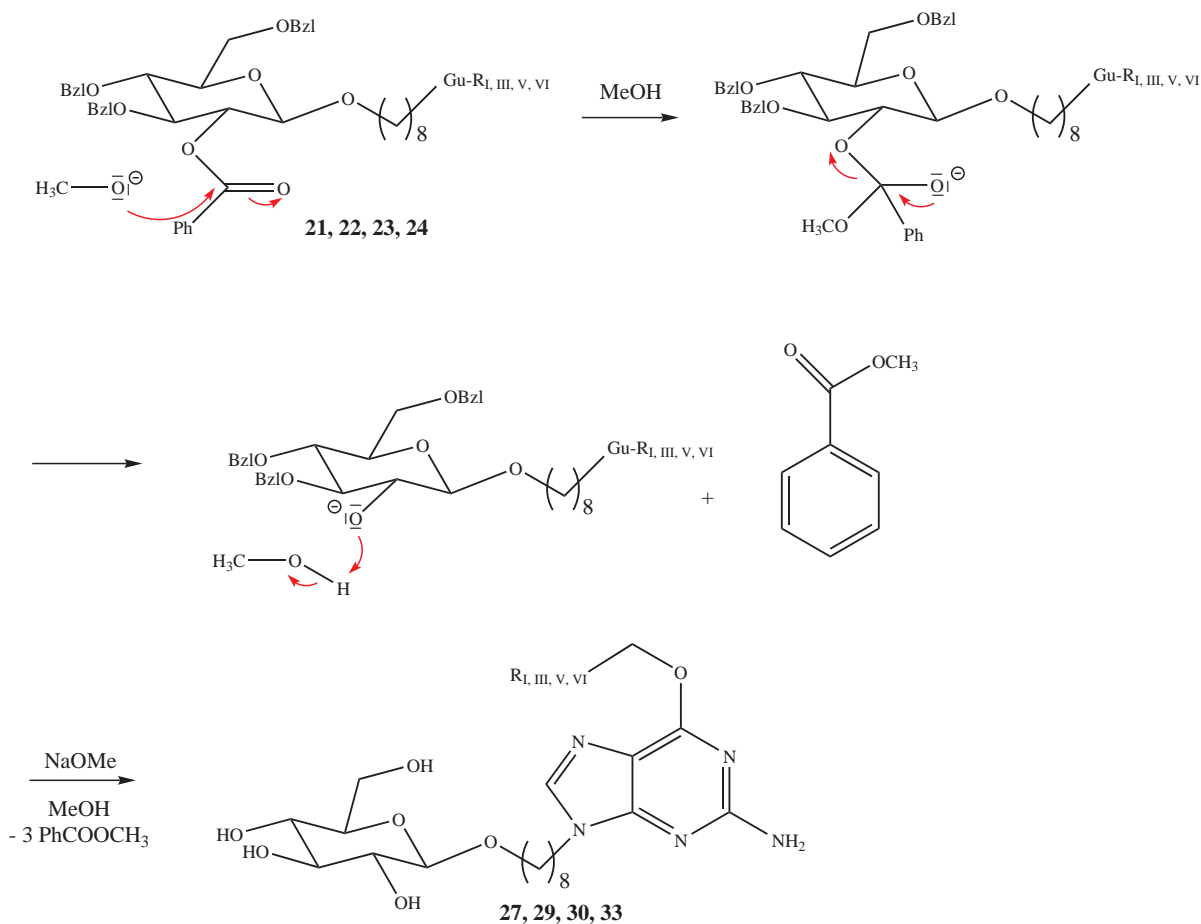


Abbildung 41: Mechanismus der Zemplén-Reaktion am Beispiel der Debenzoylierung der Guanin- β -Glucose-Konjugate

Analog zu vorherigen Arbeiten wurden die geschützten Verbindungen **20** - **26** in trockenem Methanol unter leichtem Erwärmen gelöst. Zur Debenzoylierung wurde frisch hergestellte 0,1 M Natriummethanolatlösung zugegeben und der Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie (Chloroform:Methanol, 5:1) verfolgt. Je nach Verbindung wurde die Reaktion nach 2 - 4,5 h durch Zusatz von saurem Ionenaustauscherharz (Dowex 50 WX 2) beendet. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch. Die R_f -Werte und die Ausbeuten der entschützten Konjugate sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: R_f -Werte (Chloroform:Methanol, 5:1) und Ausbeuten der entschützten Guanin-Glucose-Konjugate

| Konjugat | Abkürzung | R_f -Wert | Ausbeute / % |
|-----------|-----------------|-------------|--------------|
| 27 | ITGG | 0,66 | 56 |
| 28 | ITGG α | 0,33 | 41 |
| 29 | IBGG | 0,54 | 64 |
| 30 | BBGG | 0,47 | 76 |
| 31 | TGG | 0,38 | 52 |
| 32 | 4-BTGG α | 0,40 | 59 |
| 33 | 5-BTGG | 0,47 | 60 |

Alle Verbindungen konnten als weiße bis gelbliche flockige Feststoffe in guten Ausbeuten isoliert werden. Die so erhaltenen Verbindungen wurden teilweise stannylisiert, direkt als Markierungsvorläufer eingesetzt (TGG) oder bezüglich ihrer Aktivität gegenüber MGMT evaluiert.

3.8 Darstellung der Markierungsvorläufer

Eine sehr verbreitete Methode der Radioiodierung verwendet Markierungsvorläufer mit einer Trialkylstannyl-Einheit als Abgangsgruppe. Durch die Destannylierungsreaktion ist eine regioselektive Radioiodierung unter milden Reaktionsbedingungen möglich (siehe 1.6.1.2), was bei der direkten Radioiodierung ohne eine Abgangsgruppe nicht gegeben ist. Wenn eine Darstellung der entsprechenden Zinnverbindungen möglich ist, ist der Radioiododestannylierung immer der Vorzug vor allen anderen Radioiodierungsmethoden zu geben. Daher sollten die Stannylvorläufer der Glucose-konjugierten Guanin-Derivate ITGG und IBGG und der nicht-konjugierten Derivate ITG und IBG hergestellt werden, die hierfür an der N⁹-Position geschützt waren (ITG_{Si} und IBG_{Si}). Zur Vereinfachung der Radioiodierungen sollten später auch die Stannylvorläufer der freien Guanin-Basen ITG und IBG dargestellt werden.

3.8.1 Synthese der Glucose-konjugierten Stannylvorläufer

Zur Stannylierung können entweder die entsprechenden Iod- oder die Bromverbindungen verwendet werden. Die Umsetzung erfolgt häufig mit Hexabutyldistannan oder mit Hexamethyldistannan, je nachdem welche Zinnabgangsgruppe bevorzugt wird, unter Einsatz eines Palladiumkatalysators. Da zu einer Radioiodierung nur sehr geringe Mengen des Markierungsvorläufers benötigt werden (etwa 25 µg), ist es prinzipiell möglich, die Synthese der Zinnverbindung im Mikromaßstab durchzuführen. Die Darstellung von 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(octyl-β-D-glucopyranosid)-purin **34** (SnTGG) wurde zunächst durch Umsatz von 3 mg ITGG in Triethylamin mit Hexabutyldistannan unter Katalyse durch Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) versucht. Nach Erhitzen der Reaktionsmischung auf 90 °C unter Lichtausschluss und unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurde nach 1,5 h das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in Acetonitril aufgenommen. Vor der Aufreinigung mittels analytischer HPLC (System I, LiChrosphere-Säule, siehe 6.1) wurde der Palladiumkatalysator über einen Spritzenfilter (Porenweite 1 µm) abfiltriert. Als Eluens wurde 100 % Acetonitril verwendet und nach Injektion von jeweils 200 µL eine Fraktion mit einer Retentionszeit von 11,5 Minuten isoliert. Bei der Analyse mittels ESI-MS zeigte sich jedoch, dass es sich hierbei um verunreinigtes ITGG handelte. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde keine Stannylierung des ITGG erreicht, was zumindest teilweise an der sehr schlechten Löslichkeit des Eduktes in Triethylamin lag.

Daher wurde in einem weiteren Versuch die Darstellung von SnTGG analog [128] durchgeführt. Diese Reaktion erfolgte in etwas größerem Maßstab unter Einsatz von 66 mg ITGG, das in Dioxan gelöst wurde. Als Katalysator wurde Dichloro-bis(triphenylphosphin)palladium(II) verwendet. Die Reaktion erfolgte bei 104 °C mit Hexabutyldistannan und wurde nach 3,5 h beendet. Nach Entfernen des Dioxans im Vakuum wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen und über einen Spritzenfilter (Porenweite 1 µm) der Palladiumkatalysator abfiltriert. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt in Chloroform gelöst und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (Chloroform:Methanol, 4,5:1) gereinigt. Von den detektierten Fraktionen konnte nur die mit einem R_f-Wert von 0,50 dem gewünschten Produkt SnTGG entsprechen. Von ihr wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen. Es zeigte sich jedoch, dass es unter den Reaktionsbedingungen zu einer Deiodierung des Thenytringes ohne Stannylierung gekommen war, weswegen sich nur TGG isolieren ließ. Da die Iod-Kohlenstoffbindung für die erforderlichen Reaktionsbedingungen der Stannylierungsreaktion nicht stabil genug war und auf diesem Wege SnTGG nicht hergestellt werden konnte, wurde 5-BTGG dargestellt, in der Hoffnung, aus der Bromverbindung die gewünschte Zinnverbindung zu erhalten.

Um eine Aufreinigung der stannylierten Verbindungen mittels Säulenchromatographie zu ermöglichen, wurden die Ansätze bei der Darstellung von SnTGG aus 5-BTGG und 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(octyl-β-D-glucopyranosid)-purin **35** (SnBGG) aus IBGG vergrößert. Die

Umsetzung von 5-BTGG bzw. IBGG erfolgte, wie oben beschrieben, mit Hexabutyldistannan und Dichloro-bis(triphenylphosphin)palladium-(II) in Dioxan bei 104 °C (Abb. 42).

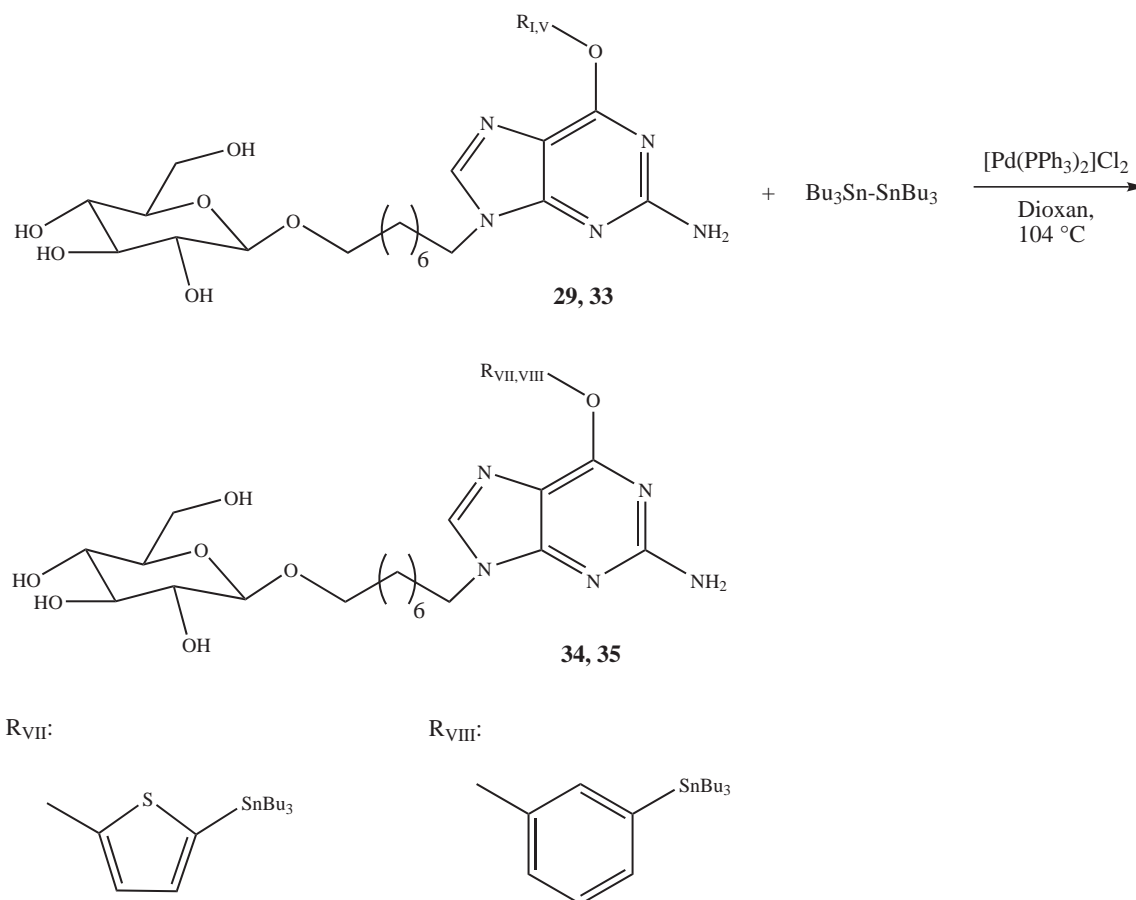


Abbildung 42: Darstellung der Verbindungen SnTGG und SnBGG

Nach etwa 4 h Reaktionszeit wurde der Palladiumkatalysator über einen Spritzenfilter (Porenweite 1 μ m) abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (Chloroform:Methanol, 4,5:1), wobei SnTGG einen R_f -Wert von 0,51 aufwies und SnBGG einen R_f -Wert von 0,62. Auf diese Weise konnten die Glucose-konjugierten Stannylvorläufer als weißer, flockiger Feststoff in 74 % Ausbeute (SnTGG) bzw. als gelbes Öl in einer Ausbeute von 97 % (SnBGG) isoliert werden. Die Iod-Kohlenstoff-Bindung im Iodbenzylring war gegenüber den erforderlichen Reaktionsbedingungen nicht so empfindlich wie die im Iodothyrylring, es trat keine ungewollte Deiodierung ohne gleichzeitige Stannylierung auf. Eine Darstellung von SnBGG unter Verwendung von dem bromierten Guanin-Derivate BBGG musste nicht durchgeführt werden. Die Brom-Kohlenstoff-Bindung des 5-BTGG war stabil genug, um die Bildung des gewünschten SnTGG zu ermöglichen. Die Stannylvorläufer können empfindlich sein und sollten daher unter einer Argon-schutzgasatmosphäre bei -18 °C gelagert werden. Unter diesen Lagerungsbedingungen sind sie für lange Zeit stabil.

3.8.2 Darstellung der silylgeschützten Stannylvorläufer

Zur Darstellung der radioiodierten Guanin-Derivate von ITG und IBG wurden auch die entsprechenden Stannylvorläufer benötigt. In der Literatur war die Darstellung des silylgeschützten O⁶-(3-Trimethylstannylbenzyl)guanin beschrieben worden [128]. Wie oben erwähnt (3.5), hielten diese Autoren eine vorherige Schützung der N⁹-Position des Guanins vor der Stannylierung für zwingend

notwendig, da die zunächst versuchte Stannylierung des ungeschützten O⁶-(3-Brombenzyl)guanin (BBG) nicht gelang. Um die Löslichkeit des Guanin-Derivates zu erhöhen, führten sie die SEM-Schutzgruppe an N-9 ein. Damit eine analoge Synthesestrategie verfolgt werden konnte, wurden daher zunächst die silylgeschützten Derivate ITGSi und IBGSi dargestellt. Die Stannylierungsreaktion wurde, wie in der Literatur beschrieben, mit der entsprechenden Iodverbindung und Hexabutyl-distannan (statt Hexamethyldistannan) und Dichloro-bis(triphenylphosphin)palladium-(II) als Katalysator in Dioxan durchgeführt, um die Markierungsvorläufer 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(2-trimethylsilyl-ethoxymethyl)-purin **36** (SnTGSi) und 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyl-oxy)-9-(2-trimethylsilyl-ethoxymethyl)-purin **37** (SnBGSi) zu erhalten (Abb. 43).

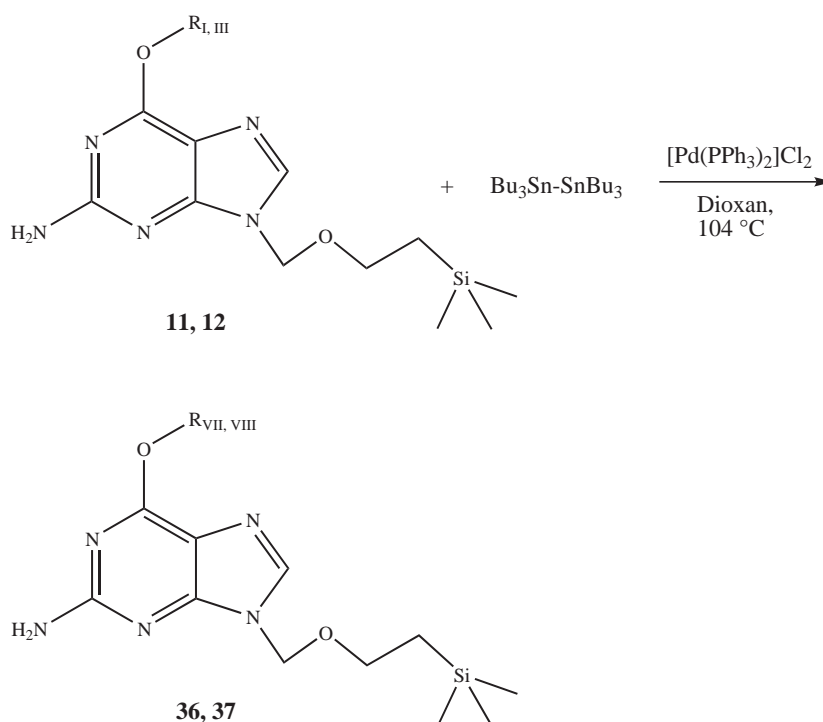


Abbildung 43: Darstellung von SnTGSi und SnBGSi

Die in der Literatur beschriebene aufwändige Aufarbeitung der Rohprodukte wurde vereinfacht. Nach etwa 2 h Reaktionszeit bei 104 °C wurde das Dioxan im Vakuum entfernt und der Rückstand zum Abfiltrieren des Palladiumkatalysators (Spritzenfilter, Porenweite 1 μm) in Essigester aufgenommen. Die Aufreinigung des jeweiligen Rohproduktes erfolgte nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels und Aufnehmen in Dichlormethan mittels präparativer DC (n-Hexan:Essigester, 3:2), wobei SnTGSi einen R_f-Wert von 0,48 aufwies und SnBGSi einen R_f-Wert von 0,46. So konnte SnTGSi als gelbes Öl in einer Ausbeute von 18 % erhalten werden und SnBGSi als farbloses Öl in einer Ausbeute von 30 %.

Um größere Substanzmengen zu erhalten, wurden beide Synthesen auch mit einem doppelten Ansatz durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung ohne vorherige Entfernung des Palladiumkatalysators auf Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch gereinigt. Zur Entfernung lipophiler Verunreinigungen, wie des überschüssigen Hexabutyl-distannan, erfolgte die Elution zunächst mit 100 % n-Hexan, eine Methode, die sich bei anderen Stannylierungsreaktionen bewährt hatte [71]. Die Isolation von SnTGSi und SnBGSi erfolgte wie zuvor beschrieben mit n-Hexan:Essigester (3:2), wobei das Thenylderivat in einer Ausbeute von 7 % als gelbes Öl isoliert werden konnte und das Benzyl-derivat in 45 % Ausbeute als weißer, kristalliner Feststoff. Wie die moderaten Ausbeuten dieser Stannylierungsreaktionen zeigen, ist die Darstellung der Zinnverbindungen nicht in allen Fällen ohne Probleme möglich.

Die Entschützung der Guanin-Derivate erfolgt nach der Radioiodierung durch Reaktion mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF).

3.8.3 Darstellung der an der N⁹-Position ungeschützten Stannylvorläufer

Bei Radioiodierungen mit [¹³¹I]Iod stellt die Entschützung der am N-9 silylgeschützten Guanin-Derivate, die etwa 30 Minuten dauert, nach erfolgter Radioiodierung auf Grund der Halbwertszeit des Iodisotopes kein Problem dar. Dennoch ist der zusätzliche Reaktionsschritt (siehe 4.3.1) aufwändiger und zeitintensiver, als es eine direkte Radioiodierung der freien Guanin-Derivate wäre. Bei der Verwendung von [¹²³I]Iod mit einer kürzeren Halbwertszeit wäre es auch wünschenswert, nach der Iodierung nicht noch die Entschützung des Guanin-Derivates durchführen zu müssen. Kürzlich wurde von der Gruppe um Vaidynathan die erfolgreiche Stannylierung des freien IBG berichtet [129]. Analog dieser Vorschrift wurden die Umsetzungen von IBG und ITG mit Hexabutyldistannan zu den Markierungsvorläufern 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9H-purin **38** (SnBG) und 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9H-purin **39** (SnTG) versucht (Abb. 44).

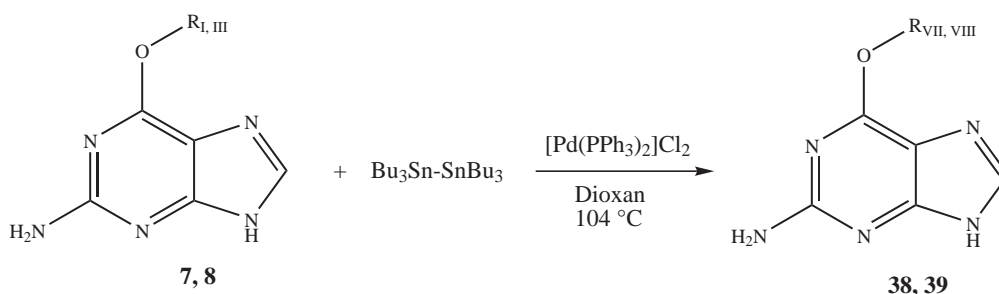


Abbildung 44: Darstellung von SnBG und SnTG

Die jeweilige Reaktionsmischung wurde auf 104 °C erwärmt, wobei sich sowohl IBG als auch ITG erst bei dieser Temperatur vollständig löste. Nach der in der Literatur angegebenen Reaktionszeit von 1 - 2 h konnte mittels DC-Kontrolle (Essigester:Methanol, 95:5) noch keinerlei Reaktion beobachtet werden, auch die typische Schwarzfärbung der Reaktionsmischung, die bei allen Stannylierungsreaktionen stattgefunden hatte, erfolgte nicht. Daher wurde die Reaktionszeit auf 23 - 25 h ausgedehnt, wonach auch Schwarzfärbung auftrat. Die Reinigung erfolgte nach Adsorption auf Kieselgel, wie bereits beschrieben (4.5), säulenchromatographisch zunächst durch Elution mit 100 % n-Hexan. Für die Isolation von SnBG wurde ein Laufmittelgemisch von Essigester:Methanol (95:5) verwendet, wobei SnBG einen R_f-Wert von 0,50 aufwies. Auf diese Weise wurde SnBG als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 24 % erhalten.

Die Isolation von SnTG wurde mit einem Laufmittelgemisch aus Essigester:n-Hexan:Methanol von 4:1:0,5 versucht. Es konnten Fraktionen mit einem R_f-Wert von 0,67 isoliert werden, aus denen ein gelblicher Feststoff in einer Ausbeute von 25 % erhalten wurde. Die Untersuchungen der erhaltenen Verbindung mittels NMR-Spektroskopie zeigten jedoch, dass es sich nicht um das gewünschte Produkt SnTG handelte. So wurde im ¹¹⁹Sn-NMR-Spektrum kein Signal detektiert und im ¹H-NMR-Spektrum keine Signale, die der Guanineinheit oder der CH₂-Gruppe des Restes an der O⁶-Position zugeordnet werden können. Es wurden lediglich Signale im aromatischen Bereich detektiert, die auf die Anwesenheit von Iodthiophen hinweisen könnten. Doch im ESI-MS-Spektrum konnte keine Masse detektiert werden, die Iodthiophen entspricht.

Die Darstellung des nichtgeschützten stannylierten Guanin-Derivates war damit nur im Falle von SnBG möglich, welches später zu den Radioiodierungen eingesetzt wurde.

3.9 Tabellarische Übersicht der dargestellten Guanin-Derivate

In Tabelle 14 sind die dargestellten Guanin-Derivate mit ihren Verbindungsnummern, chemischen Namen und eventuellen Abkürzungen zusammengefasst.

Tabelle 14: Dargestellte Guanin-Derivate

| Nummer | IUPAC-Name | Trivialname | Abkürzung |
|--------|---|--|-----------|
| 3 | 2-Amino-6-(4-bromthiophen-2-yl-methoxy)-9H-purin | O ⁶ -(4-Bromothienyl)guanin | 4-BTG |
| 6 | 2-Amino-6-(thiophen-2-yl-methoxy)-9H-purin | O ⁶ -Thienylguanin | TG |
| 7 | 2-Amino-6-(5-iodthiophen-2-yl-methoxy)-9H-purin | O ⁶ -(5-Iodothienyl)guanin | ITG |
| 8 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9H-purin | O ⁶ -(3-Iodbenzyl)guanin | IBG |
| 9 | 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9H-purin | O ⁶ -(3-Brombenzyl)guanin | BBG |
| 10 | 2-Amino-6-(5-bromthiophen-2-yl-methoxy)-9H-purin | O ⁶ -(5-Bromothienyl)guanin | 5-BTG |
| 11 | 2-Amino-6-(5-iodthiophen-2-yl-methoxy)-9-(2-trimethylsilyl-ethoxymethyl)-purin | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(2-trimethylsilyl-ethoxymethyl)-purin | ITGSi |
| 12 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(2-trimethylsilyl-ethoxymethyl)-purin | - | IBGSi |
| 20 | 2-Amino-6-(thiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-thienyl-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin | - |
| 21 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin | - | - |
| 22 | 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin | - | - |
| 23 | 2-Amino-6-(5-bromthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(5-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin | - |
| 24 | 2-Amino-6-(5-iodthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin | - |
| 25 | 2-Amino-6-(5-iodthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin | - |
| 26 | 2-Amino-6-(4-bromthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(4-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin | - |
| 27 | 2-Amino-6-(5-iodthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | ITGG |

| Nummer | IUPAC-Name | Trivialname | Abkürzung |
|---------------|---|--|------------------|
| 28 | 2-Amino-6-(5-iodthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin | ITGG α |
| 29 | 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | - | IBGG |
| 30 | 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | - | BBGG |
| 31 | 2-Amino-6-(thiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-thenyl-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin | TGG |
| 32 | 2-Amino-6-(4-bromthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(4-bromothenyl)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin | 4-BTGG α |
| 33 | 2-Amino-6-(5-bromthiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(5-bromothenyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | 5-BTGG |
| 34 | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thiophen-2-yl-methoxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | SnTGG |
| 35 | 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin | - | SnBGG |
| 36 | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thiophen-2-yl-methoxy)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin | SnTGSi |
| 37 | 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin | - | SnBGSi |
| 38 | 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9H-purin | - | SnBG |
| 39 | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thiophen-2-yl-methoxy)-9H-purin | 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9H-purin | SnTG |

4 Ergebnisse und Diskussion der Radioiodierungen

Die Markierungsvorläufer wurden in Portionen von 50 μg in Eppendorf-Gefäßen abgepackt. Direkt vor der Markierung wurden sie standardmässig in 50 μL absolutem Ethanol gelöst, so dass eine Konzentration der Markierungsvorläufer von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ resultierte. Diese Konzentration wurde lediglich bei der Untersuchung der Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute (RCA) von der Markierungsvorläuferkonzentration und der Verwendung von IodogenTM als Oxidationsmittel variiert.

Für die Radioiodierungen wurde ein entsprechendes Aliquot der Natrium^{[131]I}iodid- bzw. der Natrium^{[123]I}iodid-Lösung entnommen und mit einer geeigneten Menge Wasser verdünnt, so dass die für die jeweilige Markierung gewünschte Aktivitätsmenge vorlag. Von dieser wässrigen Lösung wurden bei allen Radioiodierungen jeweils 10 μL eingesetzt. Die Markierungsreaktionen wurden immer bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Radioiodierungen wurden zunächst unter Verwendung von ^{[131]I}iodid optimiert, bevor eine Markierung mit ^{[123]I}iodid durchgeführt wurde.

4.1 Identifizierung der radioiodierten Verbindungen

Die Identifizierung aller radioiodierten Produkte erfolgte sowohl mittels Radio-HPLC als auch Radio-DC unter den zuvor mit den inaktiven Standardverbindungen ermittelten Bedingungen.

Bei der Methode der Radio-DC erfolgte die Identifizierung der Produkte über ihre R_f -Werte. Unter allen hier verwendeten Laufmittelbedingungen ist der R_f -Wert von ^{[131]I}iodid bzw. ^{[123]I}iodid 0,0. Zur Entwicklung der Radio-DCs wurde eines der folgenden Laufmittelgemische verwendet:

- **Glucose-Konjugate:** Chloroform:Methanol, 4:1 (A)
- **nicht-glycosylierte Derivate:** Toluol:Methanol, 4:1 (B).

In Tabelle 15 sind die R_f -Werte der radioiodierten Produkte unter den entsprechenden Bedingungen zusammengefasst.

Tabelle 15: R_f -Werte der radioiodierten Verbindungen

| Verbindung | R_f -Wert | |
|--------------|-------------|-------------|
| | Bedingung A | Bedingung B |
| ITG | - | 0,29 |
| ITGSi | - | 0,37 |
| ITGG | 0,45 | - |
| IBG | - | 0,31 |
| IBGSi | - | 0,45 |
| IBGG | 0,52 | - |

Bei der Methode der Radio-HPLC erfolgte die Identifizierung der Produkte über ihre Retentionszeiten t_R unter den entsprechenden Laufmittelbedingungen. Um eine sichere Identifizierung zu gewährleisten, wurde der radioaktiven Reaktionslösung ein wenig der inaktiven Standardverbindung zugesetzt und der so erhaltene Peak im UV-Chromatogramm dem im Radioaktivitätschromatogramm zugeordnet. Zur Trennung wurden zwei unterschiedliche HPLC-Säulen benutzt, entweder eine LiChrospher RP-18-Säule oder eine SDV-Säule (siehe 4.5). Die Elution der radioiodierten Produkte erfolgte je nach Verbindung mit einem der folgenden Laufmittel:

- **Glucose-Konjugate:** linearer Gradient: beginnend mit 90 % Wasser und 10 % Acetonitril, innerhalb von 20 min auf 100 % Acetonitril, 20 bis 30 min 100 % Acetonitril; Flussrate: 1 mL/min (LiChrospher) bzw. 0,5 mL/min (SDV) (C)

- **nicht-glycosylierte Derivate:** isokratisch: 67 % Wasser, 33 % Acetonitril; Flussrate: 1 mL/min (LiChrospher) bzw. 0,5 mL/min (SDV) (**D**).

Eine Übersicht über die Retentionszeiten der radioiodierten Produkte für die beiden unterschiedlichen Säulen gibt Tabelle 16.

Tabelle 16: Retentionszeiten t_R der radioiodierten Verbindungen

| Verbindung | t_R / min | | | |
|-------------|--------------------|------------|--------------------|------------|
| | Bedingung C | | Bedingung D | |
| | <i>LiChrospher</i> | <i>SDV</i> | <i>LiChrospher</i> | <i>SDV</i> |
| ITG | - | - | 10,4 | 11,6 |
| ITGG | 10,7 | 12,6 | - | - |
| IBG | - | - | 12,2 | 13,5 |
| IBGG | 11,2 | 12,1 | - | - |

Die Bestimmung der radiochemischen Ausbeute (RCA) erfolgte mittels Auswertung der Radioaktivitätschromatogramme der DC oder der HPLC. Bei allen Produkten, außer den nicht-glycosylierten, entschützten Derivaten, stimmten die auf beide Arten ermittelten RCA innerhalb eines Fehlerbereiches von < 5 % überein. Daher wurde die Bestimmung der RCA routinemässig mittels Radio-DC durchgeführt. Bei den nicht-glycosylierten Derivaten, die entschützt wurden, musste die Bestimmung der RCA allerdings mittels HPLC erfolgen, weil das silylgeschützte radioiodierte Derivat und das freie Guanin-Derivat unter den entsprechenden Bedingungen sehr ähnliche R_f -Werte aufwiesen.

4.2 ¹³¹I-Iodierungen der Glucose-Konjugate

4.2.1 Versuchte direkte ¹³¹I-Iodierung von TGG

Prinzipiell sollte eine direkte elektrophile Iodierung am Thenylring des Guanin-Derivates bevorzugt zu einer Iodierung in der 5-Position des Ringes führen. Daher wurde eine ¹³¹I-Iodierung von TGG zu [¹³¹I]ITGG α unter Verwendung von CAT als Oxidationsmittel unter neutralen Bedingungen versucht (Abb. 45). Hierzu wurde zu dem in absolutem Ethanol gelösten Markierungsvorläufer (25 μ g) ein Aliquot von 10 μ L der [¹³¹I]Iodidlösung, 10 μ L einer Phosphatpufferlösung (pH 7,0) und CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer) gegeben. Nach 5 Minuten Reaktionszeit konnte aber weder beim Zusatz von 10 μ L CAT noch beim Zusatz von 15 μ L CAT eine Bildung von [¹³¹I]ITGG α beobachtet werden. Die Untersuchung der Radio-DCs zeigte zu etwa 60 % unumgesetztes [¹³¹I]Iodid und zu etwa 40 % einen Spot mit einem R_f -Wert von 0,97, der 5-Iodothenylalkohol zugeordnet werden konnte. Bei diesem Molekül war folglich eine Radioiodierung zu [¹³¹I]ITGG α nicht möglich. Ein weiterer möglicher Nachteil bei der direkten Radioiodierung ohne Abgangsgruppe ist außerdem, dass wahrscheinlich nicht nur das 5-Iodisomer entstanden wäre, sondern zu einem gewissen Anteil auch das 4- bzw. 3-Iodisomer.

Daher sollte in dieser Arbeit eine regioselektive und schonende Methode der Radioiodierung angewendet werden. Eine solche Methode ist die elektrophile Radioioddestannylierung, die häufig die Methode der Wahl (siehe 1.6.1.2) ist. Daher wurden alle folgenden Radioiodierungen mit den Stannylverbindungen als Markierungsvorläufer durchgeführt.

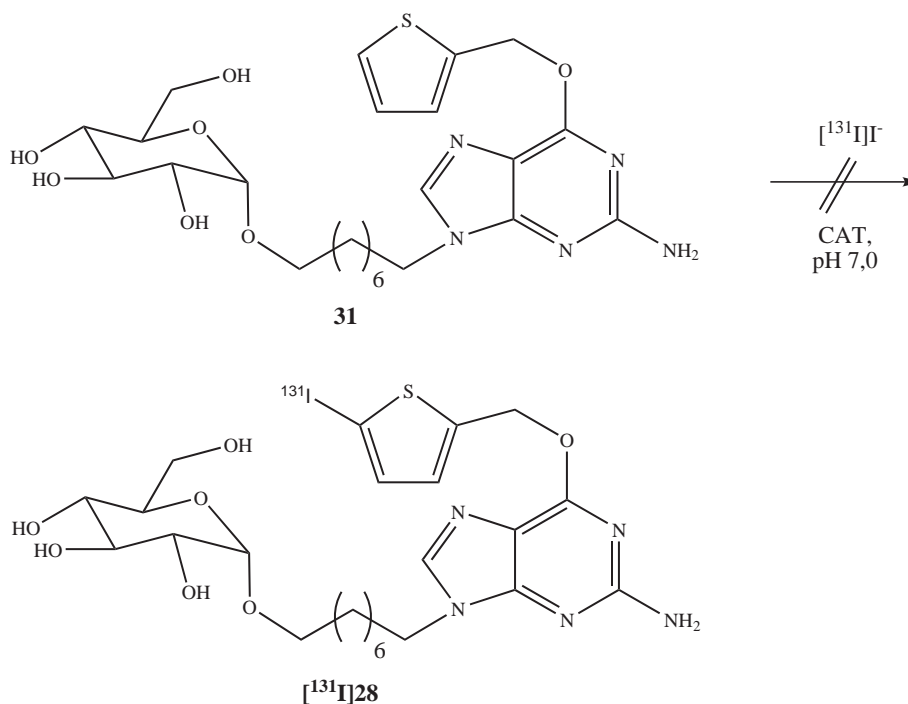


Abbildung 45: Versuchte direkte elektrophile ¹³¹I-Iodierung von TGG

4.2.2 ¹³¹I-Iodierung von SnTGG mit CAT unter sauren Bedingungen

Häufig werden elektrophile Radioiodierungen mit CAT als Oxidationsmittel unter sauren Bedingungen durchgeführt. In einem ersten Versuch der Darstellung von [¹³¹I]ITGG wurde daher SnTGG (25 µg) in absolutem Ethanol mit der [¹³¹I]Iodidlösung, 2 N Salzsäure (3 µL) und CAT (10 µL, 1,5 mg/mL in Wasser) versetzt. Nach 3 Minuten Reaktionszeit konnten mittels Radio-DC nur 1 % des gewünschten Produktes [¹³¹I]ITGG detektiert werden, in einer Ausbeute von 90 % wurde 5-[¹³¹I]Iodothienylalkohol gebildet. Unter den sauren Bedingungen fand zwar eine Radioiodierung in der gewünschten Position statt, doch das Molekül war unter diesen Bedingungen nicht stabil und die Etherbindung an der O⁶-Position des Guanins wurde gespalten. In der Literatur wurde schon eine Instabilität von O⁶-Benzylguanin gegenüber TFA beschrieben. Allerdings gibt es unterschiedliche Aussagen über die Säurestabilität von O⁶-substituierten Guanin-Derivaten. Während Safadi et al. auch eine Säurestabilität von O⁶-Benzylguanin beobachteten [170], konnten Vaidyanathan et al. keine Abspaltung von 3-[¹³¹I]Iodobenzylalkohol bei der Behandlung von [¹³¹I]IBGSi mit TFA feststellen [128], was sie auf die Wasserfreiheit der Reaktionsmischung zurückführten. Unter HPLC-Bedingungen, bei denen dem Laufmittel 0,1 % TFA zugesetzt waren, konnten sie weder bei dem Iodobenzyl- noch bei dem Fluorbenzylguanin-Derivat eine Abspaltung des jeweiligen Alkohols beobachten.

4.2.3 ¹³¹I-Iodierungen unter neutralen Bedingungen

Wegen der Säureinstabilität der Guanin-Derivate wurden die weiteren Radioiodierungen unter neutralen Bedingungen durch Verwendung eines Phosphatpuffers (pH 7,0) durchgeführt. In Abbildung 46 ist allgemein die Radioiodierungsreaktion der Glucose-Konjugate dargestellt. Zur Optimierung der RCA wurden verschiedene Reaktionsparameter, wie z. B. die Reaktionszeit, die Vorläuferkonzentration und die Konzentration an CAT variiert.

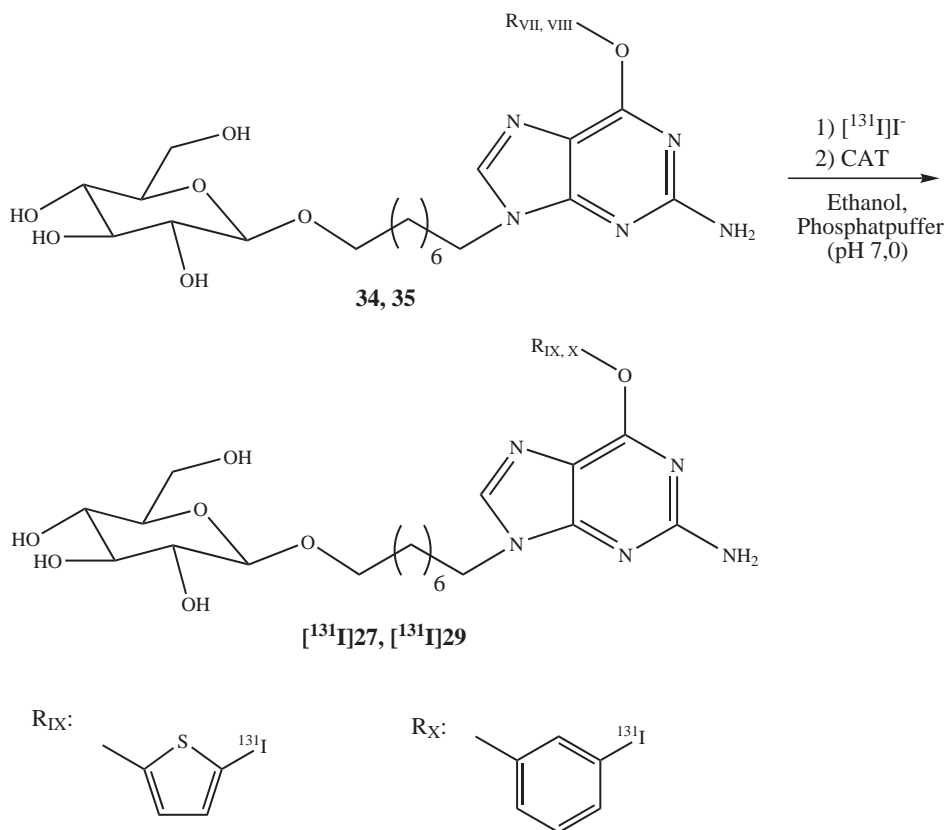


Abbildung 46: ^{131}I -Iodierung von SnTGG bzw. SnBGG unter neutralen Bedingungen und Verwendung von CAT als Oxidationsmittel

4.2.3.1 Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG von der Reaktionszeit

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung der Glucose-Konjugate von der Reaktionszeit wurden jeweils 1 Minute, 3 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten nach Zugabe der CAT-Lösung Aliquots der Reaktionslösung auf eine DC-Platte aufgetragen und die Radio-DCs untersucht. In Abbildung 47 ist die RCA von ^{131}I IBGG und ^{131}I ITGG in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen.

Unter diesen Reaktionsbedingungen waren die RCA beider Verbindungen zu allen untersuchten Zeitpunkten sehr gut. Bei der Darstellung von ^{131}I IBGG kam es zwischen 1 und 3 Minuten Reaktionszeit noch zu einem Anstieg der RCA um etwa 10 %, danach wurde sie nur noch wenig besser. Bei der Darstellung von ^{131}I ITGG erhöhte sich die RCA nach 1 Minute Reaktionszeit nur noch unwesentlich. Nach 5 Minuten Reaktionszeit konnte für ^{131}I IBGG eine RCA von etwa 89 % erzielt werden und für ^{131}I ITGG von etwa 90 %. Für die Untersuchung anderer Parameter zur Optimierung der RCA wurden im Folgenden Aliquots nach 3 und 5 Minuten Reaktionszeit untersucht. Wenn die radioiodierte Verbindung isoliert werden sollte, wurde immer eine Reaktionszeit von 5 Minuten gewählt, da die RCA mit längeren Reaktionszeiten kaum noch zunahm.

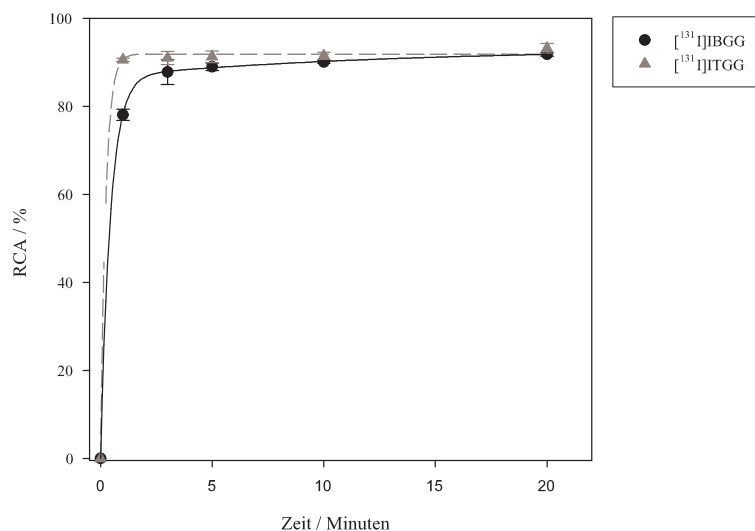


Abbildung 47: Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGG und SnTGG von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 µL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

4.2.3.2 Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung der Glucose-Konjugate von der CAT-Konzentration

Da es sich bei CAT um ein starkes Oxidationsmittel handelt, kann es bei zu hohen CAT-Konzentrationen zu einer Zersetzung des radioiodierten Produktes und des Markierungsvorläufers kommen, was einen starken Einfluss auf die RCA hätte. Daher wurde das Verhalten der RCA von [¹³¹I]BGG und [¹³¹I]ITGG bei Zusatz von 2,5 µL, 5 µL, 7,5 µL, 10 µL und 15 µL CAT nach 5 Minuten Reaktionszeit untersucht (Abb. 48).

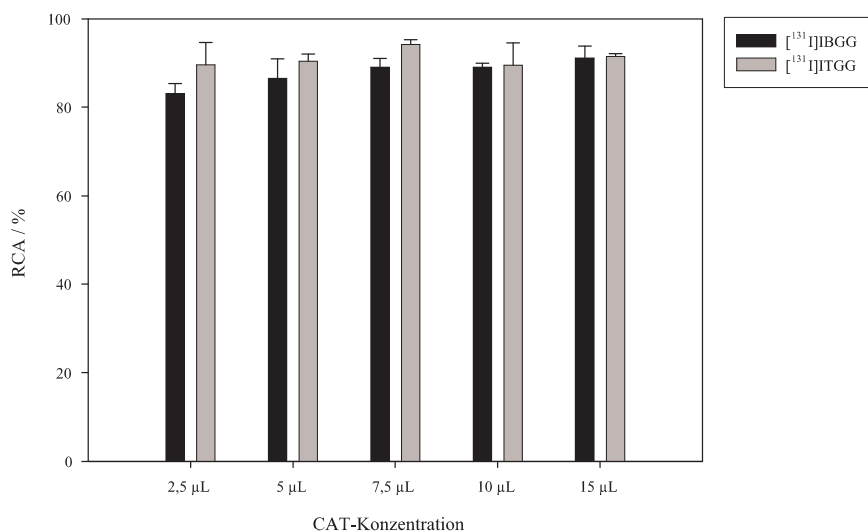


Abbildung 48: Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGG und SnTGG von der CAT-Konzentration (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)), Reaktionszeit 5 Minuten)

Bei beiden Verbindungen führte eine höhere CAT-Konzentration nur geringfügig zu einer Steigerung der bei 2,5 µL bereits erreichten sehr hohen RCA. Die geringfügige Steigerung der RCA bei einem Zusatz von mehr als 2,5 µL CAT-Lösung deutet darauf hin, dass bei 2,5 µL nicht genug Oxidationsmittel vorhanden war, um das [¹³¹I]Iodid effektiv in seine elektrophile Spezies umzuwandeln. Bei

[¹³¹I]ITGG wurde bei einer CAT-Konzentration von 7,5 μL ein Maximum in der RCA erreicht, bei 10 und 15 μL kam es wieder zu einem Absinken der RCA. Bei [¹³¹I]IBGG kam es auch bei höheren CAT-Konzentrationen noch zu einer Steigerung der RCA, die jedoch sehr gering war.

Unter allen Bedingungen konnte keine wesentliche Spaltung der Etherbindung an der O⁶-Position des Guanins beobachtet werden, da nur sehr wenig des jeweiligen ¹³¹I-iodierten Alkohols detektiert werden konnte. Als optimale CAT-Konzentration für [¹³¹I]IBGG wurde 10 μL gewählt, um eine unnötige Menge an CAT zu vermeiden. Für [¹³¹I]ITGG erwies sich eine CAT-Konzentration von 7,5 μL als optimal.

4.2.3.3 Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung der Glucose-Konjugate von anderen Parametern

Zur Optimierung der RCA wurden außer der Reaktionszeit und der CAT-Konzentration auch noch andere Parameter untersucht, wie die Vorläuferkonzentration, die Konzentration an Phosphatpuffer, die Verwendung einer CAT-Lösung in Wasser und die Verdünnung des [¹³¹I]Iodid-Aliquots mit Phosphatpuffer statt Wasser.

Bei der Untersuchung der Vorläuferkonzentration wurde der Markierungsvorläufer zum einen in 50 μL absolutem Ethanol gelöst und in einem anderen Versuch in 75 μL. Daraus resultierte bei Verwendung von 25 μL dieser Lösung zur Radioiodierung eine Menge von 25 bzw. 16,7 μg des Markierungsvorläufers. Die RCA für [¹³¹I]IBGG und [¹³¹I]ITGG unter den beiden Bedingungen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration (10 μL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

| Vorläuferkonzentration / μg | RCA / % | | | |
|-----------------------------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | [¹³¹ I]IBGG | | [¹³¹ I]ITGG | |
| | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| 25 | 86 ± 5 | 89 ± 1 | 89 ± 6 | 90 ± 5 |
| 16,7 | 77 ± 4 | 86 ± 4 | 91 ± 0,5 | 92 ± 1 |

Bei [¹³¹I]IBGG kam es durch eine Verringerung der Vorläuferkonzentration zu einer Verschlechterung der RCA, vor allem nach 3 Minuten Reaktionszeit. Bei [¹³¹I]ITGG war dies nicht der Fall, die RCA wurde sogar geringfügig besser. Aus diesen Untersuchungen ergab sich eine optimale Konzentration von 25 μg Markierungsvorläufer für beide Verbindungen.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der RCA von der Menge an zugesetztem Phosphatpuffer, also bei unterschiedlichen pH-Werten, wurden Versuche mit 25 μL, 10 μL und 5 μL Phosphatpuffer durchgeführt. In Tabelle 18 sind die so erhaltenen RCA aufgeführt. Nach 3 Minuten Reaktionszeit war die RCA bei beiden Verbindungen bei einem Zusatz von 25 μL Puffer, was einem pH-Wert von 7,7 entspricht, geringfügig schlechter als bei 10 μL (pH 7,9). Bei [¹³¹I]IBGG war nach dieser Reaktionszeit die RCA bei Zusatz von 5 μL (pH 8,1) am besten. Nach 5 Minuten Reaktionszeit bestätigte sich dieser Trend nicht mehr, nun war die RCA bei Zusatz von 25 μL und 5 μL Puffer für [¹³¹I]IBGG geringfügig besser als bei der mittleren Pufferkonzentration. Bei [¹³¹I]ITGG war nach beiden Reaktionszeiten die RCA bei der mittleren Pufferkonzentration (pH 7,9) am besten. Während bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGG eine Schwankung des pH-Wertes zwischen 7,7 und 8,1 keinen wesentlichen Unterschied in der RCA zu machen schien, war bei SnTGG ein pH-Wert von 7,9 optimal, da die RCA hier etwas besser war.

Tabelle 18: RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Phosphatpuffer (Vorläuferkonzentration $25\ \mu\text{g}$, $10\ \mu\text{L}$ ^{131}I Iodid-Lösung, $10\ \mu\text{L}$ CAT ($1,5\ \text{mg/mL}$ in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

| Puffer / μL | pH- Wert | RCA / % | | | |
|---------------------------|-------------|------------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| | | ^{131}I IIBGG | | ^{131}I ITGG | |
| | | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| 25 | 7,7 | 83 ± 4 | $91 \pm 0,5$ | 83 ± 4 | 88 ± 1 |
| 10 | 7,9 | 86 ± 5 | 89 ± 1 | 89 ± 6 | 90 ± 5 |
| 5 | 8,1 | 88 ± 1 | $90 \pm 0,5$ | $85 \pm 0,5$ | $87 \pm 0,5$ |

Bei allen Radioiodierungen konnte beobachtet werden, dass die Reaktionslösung mit zunehmendem Wasseranteil trüb wurde, was auf ein Ausfallen des Markierungsvorläufers zurückgeführt werden kann, der nur sehr schlecht in Wasser löslich ist. In den meisten Fällen führte dieses Ausfallen nicht zu einer wesentlichen Verschlechterung der RCA. Im Fall von ^{131}I ITGG schien sich ein höherer Wasseranteil allerdings nachteilig auf die RCA auszuwirken. Die weiteren Radioiodierungen der Glucose-Konjugate wurden daher immer mit einem Pufferzusatz von $10\ \mu\text{L}$ durchgeführt.

In einem anderen Versuch wurde die Abhängigkeit der RCA davon untersucht, ob das CAT in Wasser oder in Phosphatpuffer gelöst war, was auch einen unterschiedlichen pH-Wert der Lösung zur Folge hat. Die RCA für die beiden Glucose-Konjugate bei Zusatz von $10\ \mu\text{L}$ einer CAT-Lösung in Wasser ($1,5\ \text{mg/mL}$) oder in Phosphatpuffer ($1,5\ \text{mg/mL}$) sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der zugesetzten CAT-Lösung (Vorläuferkonzentration $25\ \mu\text{g}$, $10\ \mu\text{L}$ ^{131}I Iodid-Lösung, $10\ \mu\text{L}$ Phosphatpuffer (pH 7,0))

| CAT in | pH- Wert | RCA / % | | | |
|-----------|-------------|------------------------|--------------|-----------------------|------------|
| | | ^{131}I IIBGG | | ^{131}I ITGG | |
| | | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| Wasser | 8,1 | 86 ± 2 | 90 ± 2 | 77 ± 12 | 88 ± 3 |
| Puffer | 7,9 | 83 ± 4 | $91 \pm 0,5$ | 83 ± 4 | 88 ± 1 |

Bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG wirkte sich die Verwendung der unterschiedlichen CAT-Lösungen kaum aus. Bei der Darstellung von ^{131}I ITGG war die RCA nach 3 Minuten Reaktionszeit bei der Verwendung der wässrigen CAT-Lösung jedoch geringfügig schlechter. Nach 5 Minuten Reaktionszeit war dies nicht mehr zu beobachten. Für die weiteren ^{131}I -Iodierungen wurde immer die gepufferte CAT-Lösung verwendet, zumal die RCA dabei reproduzierbarer waren als bei CAT in Wasser.

In einem anderen Experiment wurde das ^{131}I Iodid-Aliquot nicht wie üblich mit Wasser, sondern mit Phosphatpuffer verdünnt und der Reaktion $10\ \mu\text{L}$ davon zugesetzt. Die RCA für ^{131}I IIBGG und ^{131}I ITGG nach 3 und nach 5 Minuten Reaktionszeit bei Verwendung der unterschiedlichen ^{131}I Iodid-Lösungen sind in Tabelle 20 dargestellt. Es konnte kaum ein Unterschied beobachtet werden. Nach 5 Minuten Reaktionszeit waren die RCA für beide Verbindungen bei der Verwendung der gepufferten Aktivitätslösung geringfügig besser. Da aber bei einer neutralen Iodid-Lösung (pH 7,0) die Gefahr einer Freisetzung von Iod deutlich größer ist als bei einer alkalischen Lösung, wurde das ^{131}I Iodid-Aliquot bei den weiteren Iodierungen immer mit Wasser verdünnt.

Bei den unterschiedlichen Verdünnungen der ^{131}I Iodid-Lösung konnte kein wesentlicher Unterschied in den RCA bei einer starken oder schwachen Verdünnung der Aktivitätslösung beobachtet werden. Auch die Verwendung von Aktivitätslösungen mit höherer Volumenaktivität ($7,4\ \text{GBq/mL}$ ($370\ \text{MBq-Charge}$) vs. $1,48\ \text{MBq/mL}$ ($185\ \text{MBq-Charge}$)) wirkte sich kaum nachteilig auf die RCA

Tabelle 20: RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der ^{131}I -Iodid-Lösung (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer(pH 7,0)))

| [^{131}I]Iodid in | RCA / % | | | |
|---------------------------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|
| | [^{131}I]BGG | | [^{131}I]TGG | |
| | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| Wasser | 86 \pm 5 | 89 \pm 1 | 89 \pm 6 | 90 \pm 5 |
| Puffer | 85 \pm 5 | 92 \pm 1 | 90 \pm 1 | 92 \pm 1 |

aus. Die Schwankungen in den RCA bei Verwendung unterschiedlicher Iodid-Chargen fielen meistens sehr gering aus (< 1 %).

4.3 ^{131}I -Iodierungen der nicht-glycosylierten Guanin-Derivate

4.3.1 ^{131}I -Iodierungen der silylgeschützten Guanin-Derivate

Für die ^{131}I -Iodierungen der nicht-glycosylierten Guanin-Derivate wurden zunächst die an der N⁹-Position mit einer SEM-Schutzgruppe versehenen Stannylvorläufer SnBGSi und SnTGSi verwendet. Auch bei diesen Verbindungen wurden die Radioiodierungen unter neutralen Bedingungen und Verwendung eines Phosphatpuffers (pH 7,0) und CAT als Oxidationsmittel durchgeführt. Die allgemeine Markierungsreaktion der silylgeschützten Guanin-Derivate ist in Abbildung 49 dargestellt.

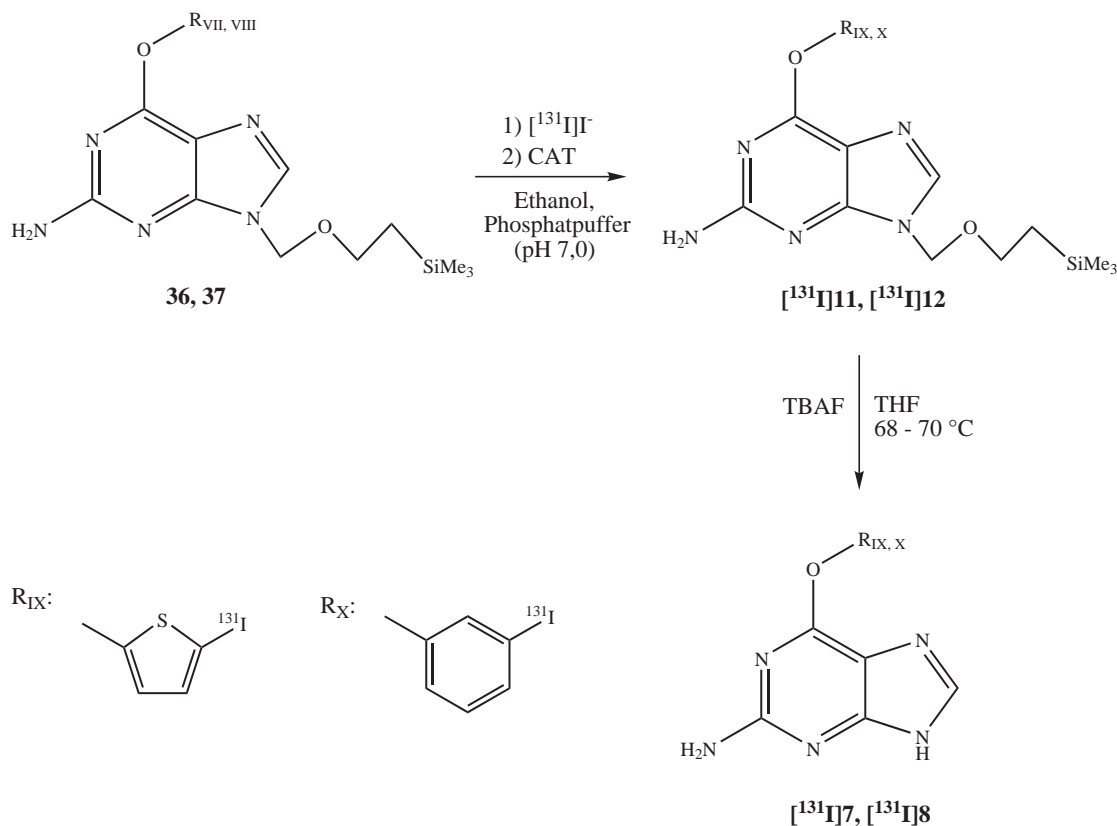


Abbildung 49: ^{131}I -Iodierung von SnBGSi und SnTGSi mit anschließender Entschützung an N-9

Nach dem Schritt der Radioiodierung musste bei diesen Verbindungen noch die Entschützung der N⁹-

Position erfolgen, um [^{131}I]IBG und [^{131}I]ITG zu erhalten. Hierfür wurden in der Literatur zwei Möglichkeiten für [^{131}I]IBGSi beschrieben [128]. Zum einen konnte die Entschützung angeblich durch Umsatz mit TFA bei Raumtemperatur erreicht werden, ohne dass der Rest an der O⁶-Position abgespalten wurde. Die RCA bei dieser Reaktion betragen allerdings nur 55 - 60 %, wobei 15 - 20 % des [^{131}I]IBGSi gar nicht reagierten. Die andere Möglichkeit war die Entschützung mit TBAF in THF bei 70 °C für 25 Minuten, wobei Ausbeuten von 70 - 90 % angegeben wurden.

Wegen der bereits beobachteten Säureinstabilität der untersuchten Verbindungen wurde diese Reaktionsführung in der vorliegenden Arbeit immer zur Entschützung verwendet. Nach der ^{131}I -Iodierung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 50 μL der TBAF-Lösung in THF versetzt. Die Reaktion wurde nach 25 Minuten bei 68 - 70 °C durch erneutes Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum beendet. Das Rohprodukt wurde in absolutem Ethanol aufgenommen und mittels HPLC gereinigt. So konnte [^{131}I]IBG in Ausbeuten von 74 - 91 % und [^{131}I]ITG in Ausbeuten von 59 - 78 % isoliert werden. Bei [128] wurde die Aufarbeitung mittels Normalphasen-HPLC durchgeführt, wobei bei der direkten Entschützung nach der Radioiodierung immer ein UV-aktives Nebenprodukt mit [^{131}I]IBG koeluierte, bei dem es sich wahrscheinlich um O⁶-(3-Trimethylstannylnbenzyl)guanin handelte. Daher wurde das Zwischenprodukt [^{131}I]IBGSi mittels HPLC isoliert und erst im Anschluss die Entschützung durchgeführt, was allerdings größere Aktivitätsverluste mit sich bringt als eine einmalige HPLC-Isolierung. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Isolation der radioiodierten Substanzen mittels RP-HPLC. Da bei der Abtrennung der beiden Verbindungen [^{131}I]IBG und [^{131}I]ITG kein koeluiender UV-aktiver Peak detektiert werden konnte, wurden die Zwischenprodukte [^{131}I]IBGSi und [^{131}I]ITGSi nach der Radioiodierung nicht mittels HPLC isoliert, sondern gleich entschützt. Die Bestimmung der RCA der silylgeschützten Derivate bei den Optimierungen dieser ^{131}I -Iodierungen erfolgte mittels Radio-DC. Für die Bestimmung der RCA der entschützten Substanzen [^{131}I]IBG und [^{131}I]ITG wurde die Methode der Radio-HPLC gewählt, da die analog mit Radio-DC ermittelten Werte, auf Grund der zu ähnlichen R_f -Werte der geschützten und der entschützten Derivate, nicht gut übereinstimmten.

Für den Schritt der ^{131}I -Iodierung wurden die RCA unter Variation von verschiedenen Reaktionsparametern, wie z. B. der Reaktionszeit, der Vorläuferkonzentration und der Konzentration an CAT, optimiert.

4.3.1.1 Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung der silylgeschützten Guanin-Derivate von der Reaktionszeit

Um die optimale Reaktionszeit für die ^{131}I -Iodierung von SnBGSi und SnTGSi zu ermitteln, wurden die RCA in Abhängigkeit von der Reaktionszeit ermittelt. Hierzu wurden nach 1 Minute, 3 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten Aliquots entnommen und mittels Radio-DC untersucht. In Abbildung 50 ist exemplarisch die RCA von [^{131}I]IBGSi sowie ihre Abhängigkeit von der [^{131}I]Iodidkonzentration und der Bildung von 3- ^{131}I Iodbenzylalkohol dargestellt.

Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde bis zu 5 % 3- ^{131}I Iodbenzylalkohol abgespalten. Die RCA von [^{131}I]IBGSi stieg auf ca. 95 % nach 5 Minuten Reaktionszeit an und ändert sich danach kaum noch. Auch die Konzentration von nicht umgesetztem [^{131}I]Iodid und von abgespaltenem Iodbenzylalkohol änderte sich nach 5 Minuten nur geringfügig. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen wurde auch für [^{131}I]ITGSi eine Reaktionszeit von 5 Minuten als optimal ermittelt, hier wurde eine RCA von etwa 90 % erreicht. Auch bei [^{131}I]ITGSi kam es zu einer Abspaltung von 5- ^{131}I Iodothethylalkohol, was eine Untersuchung der RCA in Abhängigkeit von der CAT-Konzentration als sinnvoll erscheinen ließ.

Bei der Optimierung der RCA der silylgeschützten Derivate wurden im Folgenden immer Untersuchungen nach 3 und 5 Minuten Reaktionszeit durchgeführt. Wenn eine Entschützung und anschließende Abtrennung des ^{131}I -iodierten Produktes stattfinden sollte, wurde immer eine Reaktionszeit von 5 Minuten gewählt.

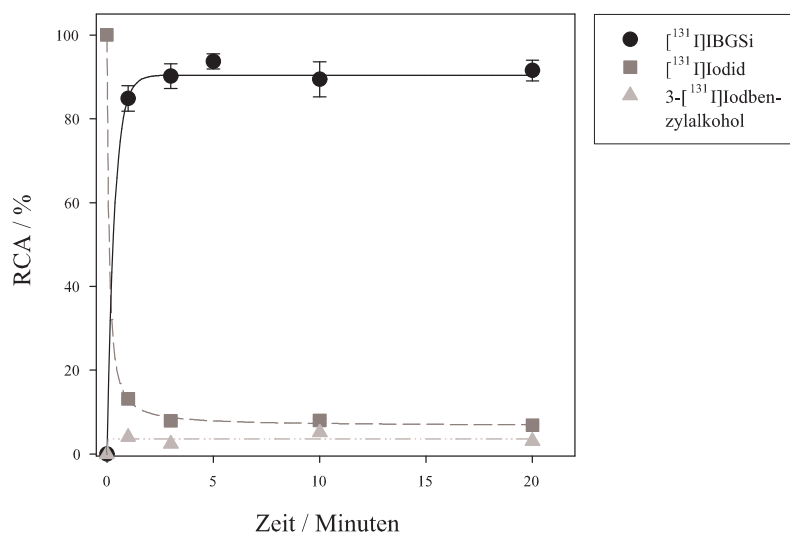


Abbildung 50: Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGSi von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 µL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

4.3.1.2 Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung der silylgeschützten Guanin-Derivate von der CAT-Konzentration

Zur Untersuchung der RCA von [¹³¹I]IBGSi und [¹³¹I]ITGSi in Abhängigkeit von der CAT-Konzentration wurden jeweils 2,5 µL, 5 µL, 7,5 µL, 10 µL und 15 µL der gepufferten CAT-Lösung (1,5 mg/mL) als Oxidationsmittel verwendet. In Abbildung 51 ist die RCA bei den unterschiedlichen CAT-Konzentrationen nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten dargestellt.

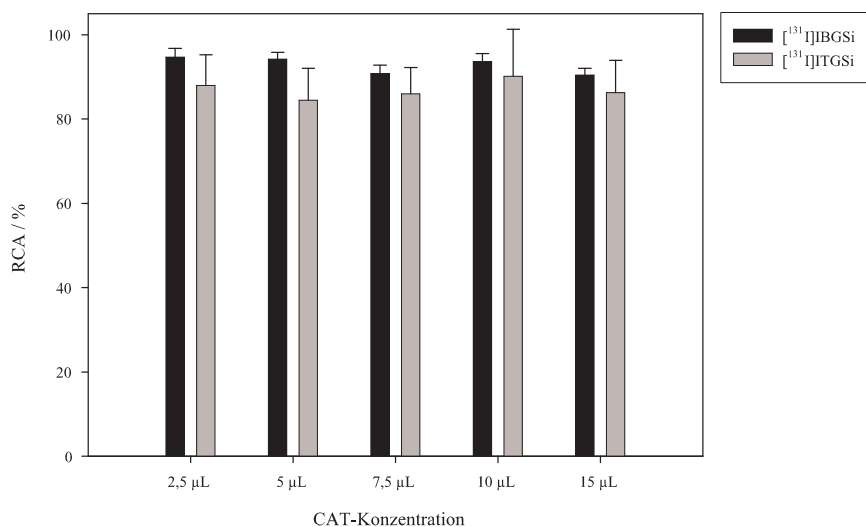


Abbildung 51: Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGSi und SnTGSi von der CAT-Konzentration (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)), Reaktionszeit 5 Minuten)

Bei beiden Verbindungen kam es bei höheren CAT-Konzentrationen zu einer geringfügig erhöhten Abspaltung der jeweiligen radioiodierten Alkohole, was zu einem Absinken der RCA führte. Schon mit einem CAT-Zusatz von 2,5 µL konnten optimale RCA erzielt werden. Wenn nach der

¹³¹I-Iodierung noch die Entschützung an der N⁹-Position durchgeführt wurde, zeigte sich auch, dass eine möglichst geringe CAT-Konzentration vorteilhaft ist, da das Oxidationsmittel bis zur endgültigen Isolation der freien Guanin-Base in der Reaktionsmischung verbleibt und vor allem bei den zur Entschützung benötigten höheren Temperaturen zu Zersetzungreaktionen führen kann. Daher wurden alle weiteren Radioiodierungen mit einem CAT-Zusatz von nur 2,5 µL durchgeführt.

4.3.1.3 Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung der silylgeschützten Guanin-Derivate von anderen Reaktionsparametern

Wie schon bei den Glucose-Konjugaten wurde die RCA bei der ¹³¹I-Iodierung der silylgeschützten Guanin-Derivate auch in Abhängigkeit anderer Reaktionsparameter, wie z. B. der Konzentration an Markierungsvorläufer, der Konzentration an Phosphatpuffer und der Verdünnung des [¹³¹I]Iodid-Aliquots mit Phosphatpuffer statt mit Wasser untersucht.

Wie oben beschrieben (siehe 4.2.3.3) wurden zur Untersuchung der Abhängigkeit der RCA von der Vorläuferkonzentration in einem Versuch 25 µg des jeweiligen Stannylvorläufers eingesetzt und in einem anderen nur 16,7 µg. Die RCA für beide Verbindungen nach 3 und 5 Minuten Reaktionszeit sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGSi und SnTGSi in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration (10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 µL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

| Konzentration / µg | RCA / % | | | |
|--------------------|--------------------------|--------|--------------------------|---------|
| | [¹³¹ I]IBGSi | | [¹³¹ I]ITGSi | |
| | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| 25 | 92 ± 3 | 94 ± 2 | 85 ± 9 | 90 ± 11 |
| 16,7 | 91 ± 2 | 93 ± 1 | 83 ± 2 | 85 ± 2 |

In allen Fällen waren die RCA unter Verwendung von nur 16,7 µg Markierungsvorläufer etwas schlechter als bei der Verwendung von 25 µg. Für alle weiteren ¹³¹I-Iodierungen der silylgeschützten Markierungsvorläufer wurde daher eine Vorläuferkonzentration von 25 µg gewählt.

Für die Untersuchungen der RCA in Abhängigkeit von der Menge an zugesetztem Phosphatpuffer, also unterschiedlichem pH-Wert, wurden 25 µL, 10 µL bzw. 5 µL der Phosphatpuffer-Lösung zugesetzt. Die RCA für beide Verbindungen sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGSi und SnTGSi in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Phosphatpuffer (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

| Puffer / µL | pH-Wert | RCA / % | | | |
|-------------|---------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | | [¹³¹ I]IBGSi | | [¹³¹ I]ITGSi | |
| | | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| 25 | 7,7 | 93 ± 4 | 92 ± 0,5 | 78 ± 7 | 76 ± 5 |
| 10 | 7,9 | 92 ± 3 | 94 ± 2 | 85 ± 9 | 90 ± 11 |
| 5 | 8,1 | 94 ± 0,5 | 95 ± 0,5 | 80 ± 0,5 | 82 ± 0,5 |

Während sich die RCA bei der Darstellung von [¹³¹I]IBGSi in einem pH-Bereich von 7,7 - 8,1 unabhängig verhielten, kam es bei der Darstellung von [¹³¹I]ITGSi zu Schwankungen in den RCA. Hier war die RCA bei Zusatz von 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,9) am besten. Wie auch bei den Glucose-

Konjugaten konnte bei einem höheren Anteil an wässrigem Lösungsmittel in der Reaktionsmischung eine stärkere Trübung der Lösung beobachtet werden, was auf ein Ausfallen des Markierungsvorläufers zurückzuführen ist. Vor allem bei [¹³¹I]ITGSi schien dies mit einer Reduzierung der RCA einherzugehen. Für alle weiteren ¹³¹I-Iodierungen der silylgeschützten Guanin-Derivate wurde daher ein Phosphatpuffer-Zusatz von 10 µL (pH 7,9) gewählt.

Die Abhängigkeit der RCA für [¹³¹I]IBGSi und [¹³¹I]ITGSi bei der Verdünnung des [¹³¹I]Iodid-Aliquots mit Phosphatpuffer oder mit Wasser ist in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGSi und SnTGSi in Abhängigkeit von der [¹³¹I]Iodid-Lösung (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 µL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

| [¹³¹ I]Iodid in | RCA / % | | | |
|--------------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|---------|
| | [¹³¹ I]IBGSi | | [¹³¹ I]ITGSi | |
| | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| Wasser | 92 ± 3 | 94 ± 2 | 85 ± 9 | 90 ± 11 |
| Puffer | 90 ± 5 | 92 ± 3 | 81 ± 3 | 81 ± 5 |

Bei beiden Verbindungen waren die RCA bei der Verwendung der gepufferten [¹³¹I]Iodid-Lösung etwas schlechter, wobei dieses Verhalten bei [¹³¹I]ITGSi stärker ausgeprägt war als bei [¹³¹I]IBGSi. Daher wurde bei den weiteren ¹³¹I-Iodierungen keine gepufferte [¹³¹I]Iodid-Lösung verwendet, zumal die Gefahr einer Iodfreisetzung unter neutralen Bedingungen größer ist als unter alkalischen.

Bei den unterschiedlich starken Verdünnungen der [¹³¹I]Iodid-Lösung für die verschiedenen Markierungszwecke und bei der Verwendung von [¹³¹I]Iodid-Chargen mit verschiedenen Volumenaktivitäten (siehe 4.2.3.3) konnte auch bei den silylgeschützten Guanin-Derivaten kein Unterschied in den RCA beobachtet werden.

4.3.2 ¹³¹I-Iodierungen der an der N⁹-Position ungeschützten Guanin-Derivate

Zur Darstellung von [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]ITG mussten die silylgeschützten Stannylvorläufer SnBGSi und SnTGSi nach der ¹³¹I-Iodierung an der N⁹-Position entschützt werden. Durch die Entschützung dauerte die Synthese der ¹³¹I-iodierten freien Guanin-Basen insgesamt etwa 45 Minuten, da die Entschützungreaktion etwa 30 Minuten in Anspruch nahm. Dies ist bei der Halbwertszeit des Iod-131 mit 8,02 d und auch bei der Verwendung von Iod-123 ($t_{1/2} = 13,02$ h) prinzipiell kein Problem. Dennoch ist grundsätzlich eine weitere Reaktion nach der radioaktiven Markierung wenn möglich zu vermeiden. Daher wurde die Darstellung der an der N⁹-Position des Guanins ungeschützten Markierungsvorläufer SnBG und SnTG für eine direkte ¹³¹I-Iodierung versucht. Wie oben beschrieben (3.8.3) gelang dies im Fall von SnBG, bei SnTG jedoch nicht.

Die RCA von SnBG wurde in gleicher Weise optimiert wie die der Glucose-Konjugate und die der silylgeschützten Derivate. Nach Vorhandensein von SnBG wurden alle weiteren Radioiodierungen zu dem entsprechenden IBG-Derivat immer mit diesem Markierungsvorläufer durchgeführt.

4.3.2.1 Optimierung der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBG unter Variation verschiedener Reaktionsparameter

Alle ¹³¹I-Iodierungen von SnBG wurden unter Verwendung eines Ethanol-Phosphatpuffer-Systems und CAT als Oxidationsmittel durchgeführt (Abb. 52).

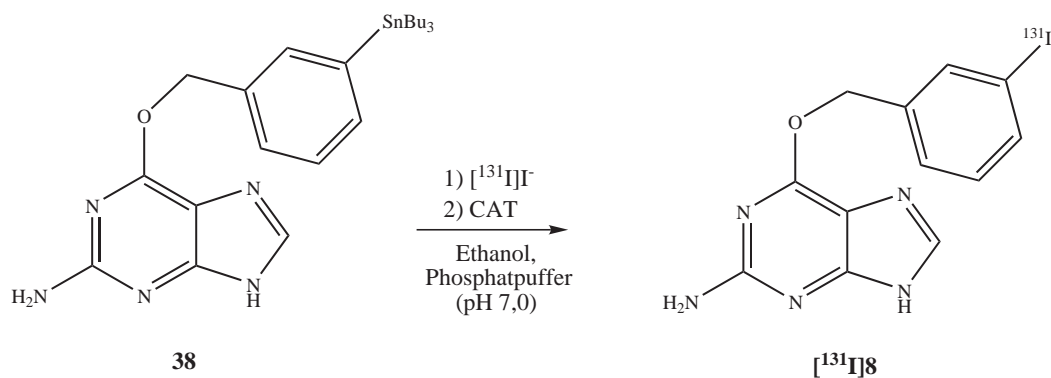


Abbildung 52: ¹³¹I-Iodierung von SnBG

Die Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBG von verschiedenen Parametern, wie der Reaktionszeit, der CAT-Konzentration und des Zusatzes an Phosphatpuffer, wurde untersucht. Bei der Abhängigkeit von der Reaktionszeit wurden die RCA nach 1 Minute, 3 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei den anderen Guanin-Derivaten bestimmt (Abb. 53).

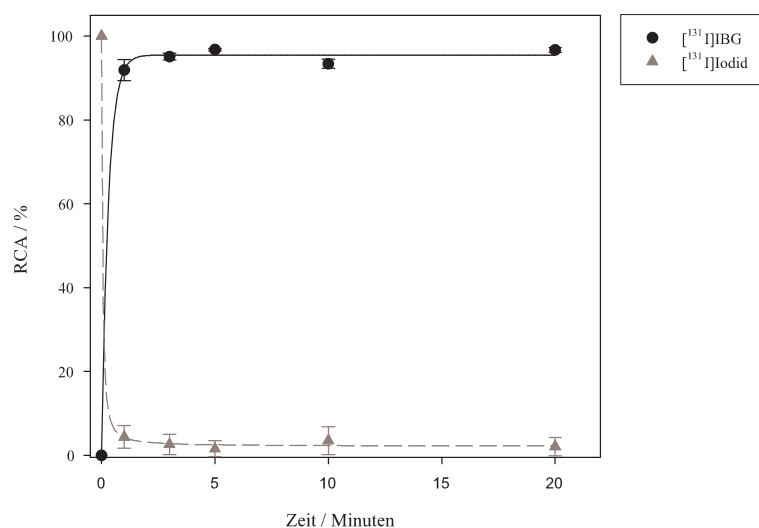


Abbildung 53: Abhängigkeit der RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBG von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 µL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

Mit längeren Reaktionszeiten als 1 Minute konnte nur noch ein geringfügiger Anstieg der RCA beobachtet werden. Auch für diese Verbindung erwies sich eine Reaktionszeit von 5 Minuten als optimal und wurde bei Reaktionen zur Isolierung von [¹³¹I]IBG gewählt. Bei der Bestimmung der RCA in Abhängigkeit von anderen Reaktionsparametern wurden Aliquots nach 3 und nach 5 Minuten untersucht. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte keine Abspaltung von 3-[¹³¹I]Iodbenzylalkohol beobachtet werden.

Die Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBG von der CAT-Konzentration nach 3 und 5 Minuten Reaktionszeit ist in Abbildung 54 dargestellt.

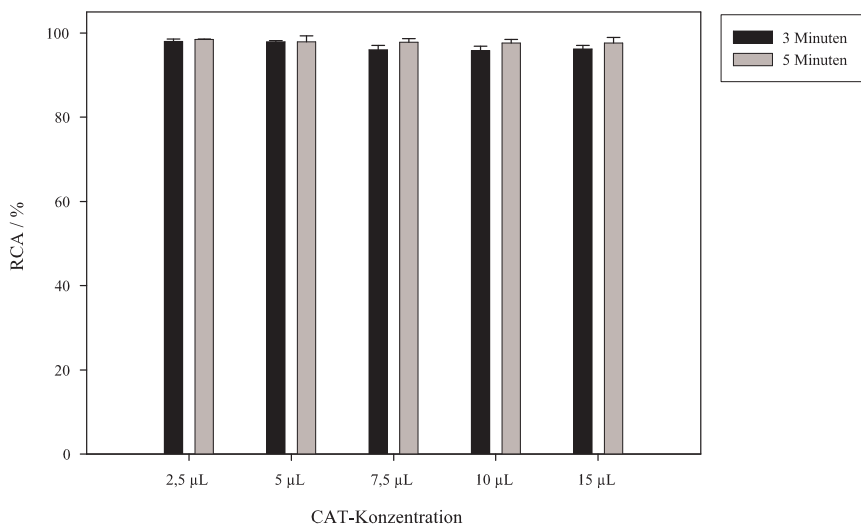


Abbildung 54: Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBG von der CAT-Konzentration (Vorläuferkonzentration $25 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{L}$ Phosphatpuffer (pH 7,0), CAT ($1,5 \text{ mg/mL}$ in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

Die RCA waren stets $> 98 \%$, wobei Effekte bei der Variation der CAT-Konzentration innerhalb des Fehlerbereiches lagen. Bei diesem Markierungsvorläufer kam es bei keiner CAT-Konzentration zu einer Abspaltung von 3- ^{131}I Iodbenzylalkohol. Für die Isolierung von ^{131}I IBG wurde im Weiteren immer ein CAT-Zusatz von $2,5 \mu\text{L}$ gewählt.

Als weiterer Reaktionsparameter wurde noch der Zusatz an Phosphatpuffer, also dem pH-Wert, untersucht. Die RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBG bei Zusatz von 25 bzw. $10 \mu\text{L}$ Phosphatpuffer sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBG in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Phosphatpuffer (Vorläuferkonzentration $25 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{L}$ ^{131}I Iodid-Lösung, $10 \mu\text{L}$ CAT ($1,5 \text{ mg/mL}$ in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

| Puffer / μL | pH-Wert | RCA / % | |
|------------------------|---------|------------|------------|
| | | 3 min | 5 min |
| 25 | 7,7 | 95 ± 2 | 97 ± 1 |
| 10 | 7,9 | 96 ± 1 | 98 ± 1 |

Die RCA bei Zusatz von $25 \mu\text{L}$ (pH 7,7) bzw. $10 \mu\text{L}$ (7,9) Phosphatpuffer waren unverändert. Daher wurde immer ein Pufferzusatz von $10 \mu\text{L}$ gewählt, um das Injektionsvolumen auf die HPLC möglichst klein zu halten und eventuellen Löslichkeitsproblemen der Verbindung bei der Reaktion vorzubeugen.

Aus dem Markierungsvorläufer SnBG ließ sich ^{131}I IBG nahezu unabhängig von den Reaktionsparametern in sehr guten RCA herstellen.

4.4 ¹³¹I-Iodierungen mit Iodogen™

Eine andere Möglichkeit zur Radioiodierung ist die Verwendung von Iodogen™ als Oxidationsmittel (siehe 1.6.1.1) an Stelle von CAT. Dadurch, dass in diesem Fall das Oxidationsmittel an der Wand des Reaktionsgefäßes adsorbiert vorliegt, verläuft die elektrophile Radioiodierung in einem heterogenen Zweiphasensystem. Daher wird der Kontakt zwischen Oxidationsmittel und Markierungsvorläufer bzw. radioiodiertem Produkt minimiert, wodurch störende Nebenreaktionen weniger stark ausgeprägt sind. Die Reaktionsbedingungen sind somit sehr schonend und auch die Abtrennung des radioiodierten Produktes kann sich so leichter gestalten, da das Oxidationsmittel im Reaktionsgefäß zurückbleibt. Wegen der Empfindlichkeit der Guanin-Derivate wurden auch ¹³¹I-Iodierungen der Glucose-Konjugate und der silylgeschützten Verbindungen mit Iodogen™ durchgeführt.

Hierfür wurde der jeweilige Stannylvorläufer in 30 µL absolutem Ethanol gelöst (1,7 µg/µL) und die Hälfte dieser Lösung für die Markierung eingesetzt. Der Anteil an organischem Lösungsmittel bei Iodierungen mit Iodogen™ sollte möglichst gering gehalten werden, damit das Oxidationsmittel nicht von der Wand des Reaktionsgefäßes gelöst wird. Der Markierungsvorläufer wurde mit 10 µL der [¹³¹I]Iodid-Lösung und 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0) gemischt und danach in das Reaktionsgefäß mit Iodogen™ gegeben. Die RCA für die vier Verbindungen sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: RCA bei der ¹³¹I-Iodierung von SnBGG, SnTGG, SnBGSi und SnTGSi mit Iodogen™ (Vorläuferkonzentration 25 µg in 15 µL EtOH, 10 µL [¹³¹I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0))

| Zeit / Min. | RCA / % | | | |
|----------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | [¹³¹ I]BGG | [¹³¹ I]TGG | [¹³¹ I]BGSi | [¹³¹ I]TGSi |
| 3 | 85 ± 4 | 77 ± 18 | 80 ± 5 | 75 ± 1 |
| 5 | 89 ± 3 | 85 ± 7 | 88 ± 5 | 77 ± 2 |

Für alle Verbindungen waren die RCA mit Iodogen™ um bis zu 10 % schlechter als unter Verwendung von CAT als Oxidationsmittel. Lediglich bei [¹³¹I]BGG war dieser Effekt nicht sehr ausgeprägt. Allerdings waren die RCA nicht so reproduzierbar wie mit CAT. Ein Grund für die verminderten Ausbeuten kann die sehr schlechte Wasserlöslichkeit der Guanin-Derivate sein, die bei der zwangsläufigen Verringerung des organischen Anteils im Lösungsmittelsystem stärker zum Tragen kommen kann. Da die Separation der radioiodierten Verbindungen mittels HPLC etabliert war und die RCA mit CAT für alle Verbindungen gut bis sehr gut waren, wurden die Reaktionsbedingungen unter Verwendung von Iodogen™ nicht optimiert, auch wenn diese Methode die Isolation radioiodierter Produkte möglicherweise vereinfacht hätte.

4.5 Abtrennung der radioiodierten Produkte

Um mit den radioiodierten Verbindungen weitere Untersuchungen durchführen zu können, wurden sie mittels HPLC abgetrennt. Die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen unter den jeweiligen HPLC-Bedingungen sind in Tabelle 16 (Abschnitt 4.1) aufgeführt. Zur Isolierung wurden die Fraktionen, die das radioiodierte Produkt enthielten, aufgefangen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in dem jeweiligen, für die weiteren Untersuchungen geeigneten Lösungsmittel aufgenommen.

Zunächst wurden die Abtrennungen mit einer LiChrospher-RP-18-Säule durchgeführt. Dabei trat jedoch das Problem auf, dass etwa die Hälfte der injizierten Aktivität im HPLC-System und auf der Säule zurückblieb. Zum einen verursachte dies einen großen Verlust der radioiodierten Verbindung und zum anderen musste das HPLC-System sehr lange gespült werden, bis eine verlässliche Injektion der nächsten Probe, sei es zur Analytik oder zur Abtrennung, durchgeführt werden konnte. Dieses Problem wurde auch schon in der Literatur beschrieben. So hatten Wilbur et al. bei der Isolierung eines

^{131}I -iodierten Cobalamins ein ähnliches Problem [71]. Das radioiodierte Produkt wurde unspezifisch an die zunächst verwendete RP-18-Säule wie auch an die Spritzenkanülen gebunden. Diese Autoren konnten das Problem lösen, indem sie eine PRP-1-Säule verwendeten. Hierbei handelt es sich um eine HPLC-Säule, die auf einer Polystyrol-divinylbenzol-Matrix basiert, aber ähnliche Eigenschaften aufweist wie eine RP-18-Säule. Daher wurde eine Abtrennung der ^{131}I -iodierten Guanin-Derivate mit einer solchen Säule, einer SDV-Säule (siehe 6.1), durchgeführt. Da die Aktivitätsbilanz bei dieser Abtrennung deutlich besser war, nur etwa 7 % der insgesamt injizierten Aktivität verblieben im System, wurde sowohl für die Analytik als auch die Abtrennungen der radioiodierten Verbindungen im Weiteren eine SDV-Säule verwendet.

4.6 Stabilität der ^{131}I -iodierten Guanin-Derivate

Um eine radioiodierte Substanz längerfristig verwenden zu können, ist es wichtig, geeignete Lagerungsbedingungen zu finden, unter denen sie stabil gegen Radiolyse und Zersetzung ist. Für eine Verwendung der Substanzen in Tier- oder Zellversuchen müssen sie in einem geeigneten Lösungsmittel wie physiologischer Kochsalzlösung oder einem Phosphatpuffer appliziert werden. Da die radioiodierten Guanin-Derivate nur sehr schlecht wasserlöslich sind, wurden die Verbindungen zunächst in trockenem DMSO angelöst und mit dem entsprechenden wässrigen Lösungsmittel versetzt, bis eine Konzentration von 1 % DMSO resultierte. Zur Untersuchung der Stabilität der radioiodierten Verbindungen wurden Aliquots der jeweiligen Produktlösungen mittels Radio-HPLC untersucht und ihre radiochemische Reinheit bestimmt.

In einem ersten Versuch wurde [^{131}I]IBGG ohne Lösungsmittel für 24 h bei 5 °C gelagert, wobei jedoch festgestellt wurde, dass sich 10 % des Produktes zersetzt hatten. Diese Zersetzung wird auch in der Literatur erwähnt, wo beschrieben wird, dass bei einer ungelösten markierten Substanz eine stärkere Radiolyse stattfindet als in Lösung [171].

In einem weiteren Versuch wurden die radioiodierten Verbindungen in physiologischer Kochsalzlösung mit 1 % DMSO bei 5 °C gelagert. Die Stabilität der Verbindungen ist in Abbildung 55 dargestellt.

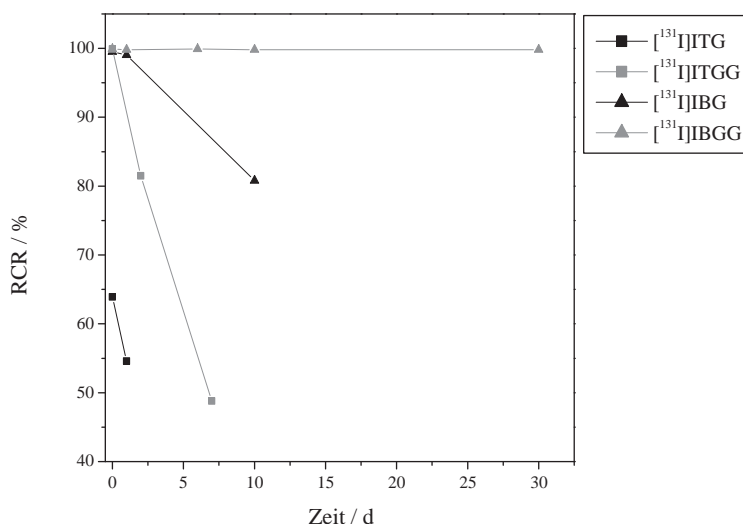


Abbildung 55: Stabilität der ^{131}I -iodierten Verbindungen in physiologischer Kochsalzlösung (1 % DMSO)

Nur bei [^{131}I]IBGG konnte über einen Zeitraum von 30 Tagen keinerlei Instabilität beobachtet werden. Bei [^{131}I]IBG trat zunächst nur geringe Radiolyse auf, doch nach 10 Tagen wurden hier 20 %

$[^{131}\text{I}]$ Iodid detektiert. Die Iodothényl-Derivate $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ waren unter diesen Lagerungsbedingungen noch wesentlich instabiler. Bei $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$ trat sofortige Abspaltung von $[^{131}\text{I}]$ Iodid auf, während die radiochemische Reinheit von $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ nach 1 h 99,9 % betrug, nach 7 Tagen jedoch nur noch 49 %. Daher war es nicht ratsam, weitere Versuche mit den ^{131}I -iodierten Iodothénylguanin-Derivaten in physiologischer Kochsalzlösung durchzuführen.

Ein anderes geeignetes Lösungsmittel für *in vivo*-Experimente ist Phosphatpuffer (pH 7,0). Die Stabilität der Substanzen $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ in Phosphatpuffer (pH 7,0), der 1 % absolutes DMSO enthielt, unter Lagerung bei 5 °C ist in Abbildung 56 dargestellt.

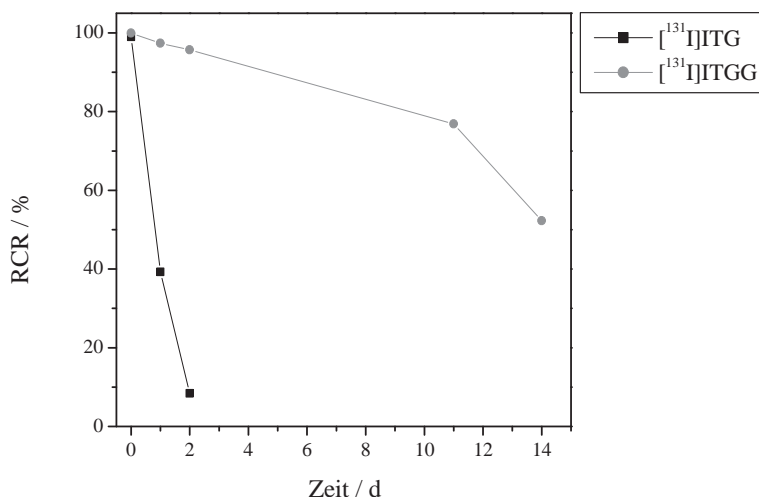


Abbildung 56: Stabilität von $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ in Phosphatpuffer (pH 7,0; 1 % DMSO)

Bei der Untersuchung der radiochemischen Reinheit beider Verbindungen nach 1 h konnte kein freies $[^{131}\text{I}]$ Iodid beobachtet werden. Nach 1 Tag jedoch war bei $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$ nur noch 40 % der ^{131}I -iodierten Verbindung intakt und nach 2 Tagen nur noch 8 %. Bei $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ trat die Zersetzung nicht so schnell ein: nach 2 Tagen waren noch 96 % intakt, nach 12 Tagen immerhin noch 77 %. Der zwar für *in vivo* Experimente geeignete Phosphatpuffer war somit aber nicht für eine längere Lagerung der ^{131}I -iodierten Iodothénylguanin-Derivate einsetzbar. Daher wurden weitere Stabilitätsuntersuchungen in absolutem Ethanol durchgeführt.

Für alle ^{131}I -iodierten Guanin-Derivate wurde die Stabilität bei einer Lagerung in absolutem Ethanol bei 5 °C über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 57 zusammengefasst.

Die Stabilität der ^{131}I -iodierten Substanzen in absolutem Ethanol war sehr gut, es konnten bei einer Lagerung bis zu 30 Tagen fast keine Abspaltung von $[^{131}\text{I}]$ Iodid beobachtet werden. Lediglich bei $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$ war nach 30 Tagen 1 % $[^{131}\text{I}]$ Iodid detektierbar. Die optimale Stabilität der radioiodierten Verbindungen in Ethanol kann daran liegen, dass es sich bei Ethanol um einen Radikalfänger handelt [171]. Dadurch kann eine potentielle Radiolyse unterbunden werden. Auch die Löslichkeit dieser Substanzen ist in Ethanol deutlich besser als in einem wässrigen Lösungsmittel. Eine längerfristige Lagerung der ^{131}I -iodierten Guanin-Derivate erfolgte daher in absolutem Ethanol bei 5 °C. Vor allem für die Iodothénylguanin-Derivate empfiehlt es sich, das Ethanol erst kurz vor dem geplanten Experiment durch Phosphatpuffer zu ersetzen. Hierfür wurde entweder das Ethanol komplett im Vakuum entfernt oder das vorhandene Ethanol auf eine, für das jeweilige Experiment geeignete, Konzentration mit dem entsprechenden wässrigen Medium verdünnt. Auch bei den Iodbenzylguanin-Derivaten bietet sich das Entfernen des Ethanols erst kurz vor dem Versuch an. Diese Substanzen können in physiologischer Kochsalzlösung appliziert werden.

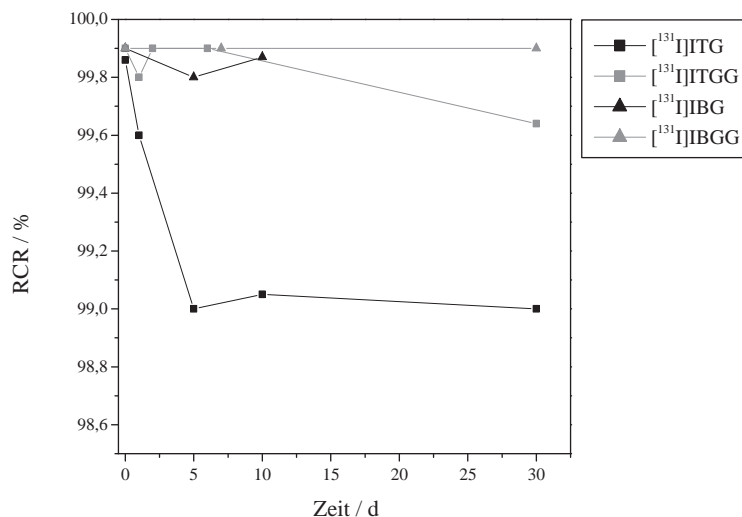


Abbildung 57: Stabilität der ¹³¹I-iodierten Verbindungen in absolutem Ethanol

Generell wurde immer darauf geachtet, dass die radioiodierten Substanzen möglichst wenig dem Licht ausgesetzt waren, um einer eventuellen fotokatalytischen Deiodierung vorzubeugen.

Als optimale Lagerungsbedingungen für alle ¹³¹I-iodierten Derivate zeigte sich eine Verwendung von absolutem Ethanol als Lösungsmittel verbunden mit einer Temperatur von 5 °C unter Lichtausschluss. Bei der Verwendung von anderen Lösungsmitteln unter identischen Bedingungen wurde immer beobachtet, dass das entsprechende ¹³¹I-iodierte Glucose-Konjugat stabiler ist als das nicht-glycosylierte Derivat. Dieses Verhalten zeigte sich später auch in den *ex vivo*-Biodistributionsstudien an tumortragenden Nacktmäusen (siehe 5.4.1.1 und 5.4.2).

4.7 Bestimmung der spezifischen Aktivität von [¹³¹I]IBGG

Besonders für die Applikation eines Tracers in neurologischen Fragestellungen, aber auch bei toxischen Verbindungen ist es wichtig, eine hohe spezifische Aktivität des Radioliganden zu erzielen (siehe 1.5). Exemplarisch wurde die spezifische Aktivität von [¹³¹I]IBGG bestimmt. Hierfür wurde zunächst mit der kalten Standardverbindung IBGG eine Kalibrationsgerade für den UV-Detektor der HPLC, mit der die Bestimmung der spezifischen Aktivität durchgeführt werden sollte, erstellt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde eine Probe der [¹³¹I]IBGG-Lösung mit bekannter Aktivität injiziert und das UV-Chromatogramm ausgewertet. Mit Hilfe der Kalibrationsgeraden konnte so die Menge an inaktivem IBGG in der Probe berechnet werden. Für [¹³¹I]IBGG ergab sich nach diesen Berechnungen eine spezifische Aktivität von 38,0 GBq/μmol. Die spezifische Aktivität der ¹³¹I-iodierten Verbindung hängt hauptsächlich von der spezifischen Aktivität der zur Markierung eingesetzten [¹³¹I]Iodid-Lösung ab. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass die spezifische Aktivität der verwendeten [¹³¹I]Iodid-Lösung zwischen 0,74 - 74 GBq/μmol schwanken kann [176], während die theoretisch erreichbare spezifische Aktivität von [¹³¹I]Iodid 110 GBq/μmol beträgt [43]. Die erreichte spezifische Aktivität von [¹³¹I]IBGG ist somit relativ hoch und für die Anwendung als Inhibitor eines Enzyms durchaus ausreichend. Auch im Vergleich zu [¹²⁵I]Iodid, welches das am häufigsten in *in vitro* Experimenten eingesetzte Radioiodisotop ist und eine theoretische und spezifische Aktivität von > 90 GBq/μmol [43] und eine erreichbare von 55 - 111 GBq/μmol [177] besitzt, ist die erzielte spezifische Aktivität von [¹³¹I]IBGG gut. Bei der Verwendung von [¹²³I]Iodid hingegen können theoretische spezifische Aktivitäten von 8880 GBq/μmol und praktische von 4440 - 7400 GBq/μmol erreicht werden [178], was bei einem Einsatz von [¹³¹I]Iodid natürlich gar nicht möglich ist.

4.8 ^{123}I -Iodierungen

Um mit einer radioiodierten Verbindung *in vivo*-Bildgebung betreiben zu können, muss die Substanz mit einem geeigneten Iodisotop markiert werden. Für Untersuchungen mittels SPECT wird das Isotop Iod-123 verwendet (siehe 1.2 und 1.4). Damit die Guanin-Derivate in einer *in vivo*-Untersuchung mit einer Kleintier-SPECT-Kamera getestet werden konnten, musste daher eine Markierung der Substanzen mit ^{123}I Iodid durchgeführt werden. Das ^{123}I Iodid war als Natriumiodid-Lösung, die einen pH-Wert von 12-13 hatte, kommerziell erhältlich. Je nach Charge schwankte hierbei die Volumenaktivität zwischen 16,17 GBq/mL und 51,74 GBq/mL, die spezifische Aktivität wurde nicht bestimmt.

Für die ^{123}I -Iodierungen wurden zunächst die für die Markierung mit ^{131}I Iodid optimierten Reaktionsbedingungen verwendet. Da hier im Gegensatz zu den ^{131}I -Iodierungen keine ausführlichen systematischen Untersuchungen durchgeführt werden sollten, wurden manche Synthesen nur einmal durchgeführt. Bei den ^{123}I -Iodierungen zeigte sich, dass die RCA für alle Verbindungen deutlich unter den mit ^{131}I Iodid erreichten lagen (Abb. 58).

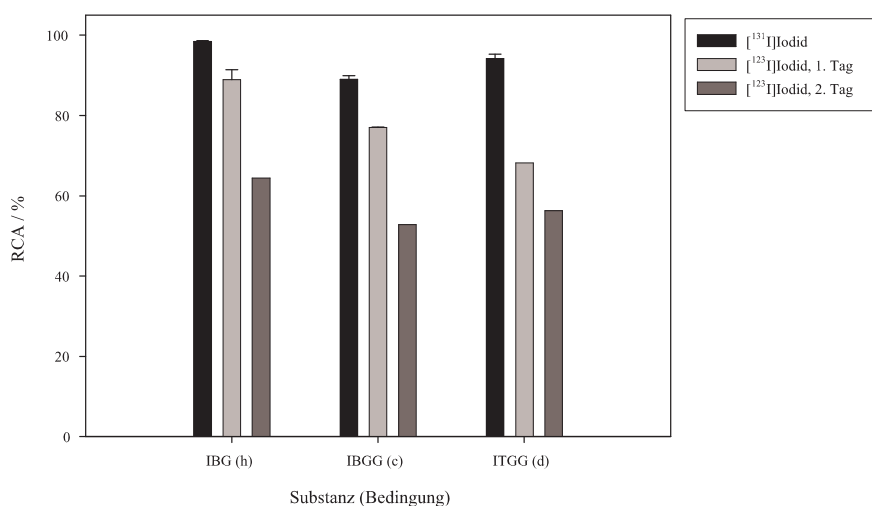


Abbildung 58: Vergleich der RCA bei der ^{131}I -Iodierung und der ^{123}I -Iodierung (Reaktionszeit 5 Minuten, Reaktionsbedingungen siehe Anhang B)

Bei Verwendung der ^{123}I Iodidcharge mit einer Volumenaktivität von 51,74 GBq/mL betrug die Verringerung der RCA je nach Verbindung bis zu 26 %. Eine weitere Beobachtung war, dass sich die RCA am Tag nach der ^{123}I Iodidlieferung nochmals deutlich erniedrigte. Dieser Befund wurde erhalten, als 10 μL der verdünnten Lösung, die am Tag zuvor angesetzt worden war, zur ^{123}I -Iodierung verwendet wurden.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob sich die RCA auch bei Verwendung einer Aktivitätslösung, deren ^{123}I Iodid-Aliquot am zweiten Tag frisch aus dem Vorratsgefäß entnommen und verdünnt worden war, noch deutlich gegenüber der des Vortages verschlechterte (Abb. 59). Diese Untersuchung zeigte, dass für ^{123}I IBG und ^{123}I IBGG die RCA mit dem frisch entnommenen Aliquot ^{123}I Iodid-Lösung besser waren als mit dem über Nacht in verdünnter Lösung gelagerten. Sie waren jedoch trotzdem schlechter als die am ersten Tag erhaltenen RCA. Auch bei ^{123}I ITGG war die RCA mit der frisch entnommenen Lösung besser, genauso gut wie die am ersten Tag erhaltene.

Die schlechteren radiochemischen Ausbeuten bei den ^{123}I -Iodierungen im Vergleich zu den ^{131}I -Iodierungen sind vor allem auf radiochemische Verunreinigungen in der ^{123}I Iodid-Lösung zurückzuführen. Bedingt durch die hohe Volumenaktivität dieser Lösungen kommt es verstärkt zu Autoradiolyseprozessen, die zur Bildung von ^{123}I Iodat und ^{123}I Periodat führen. Diese höher oxidierten Iodspezies können nicht mehr an der elektrophilen Radioiodierung teilnehmen und bedingen so-

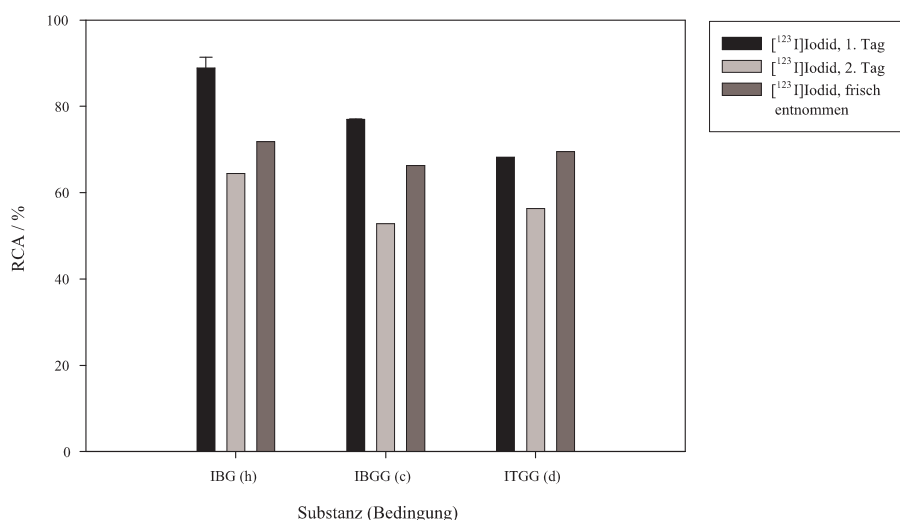


Abbildung 59: Vergleich der RCA bei der ¹²³I-Iodierung mit [¹²³I]Iodid-Lösungen unterschiedlichen Alters (Reaktionszeit 5 Minuten, Reaktionsbedingungen siehe Anhang B)

mit schlechtere Ausbeuten. Bei [¹³¹I]Iodid ist die Volumenaktivität der Lösung deutlich geringer (7,4 GBq/mL vs. 51,7 GBq/mL), weshalb die Autoradiolyse nicht sehr hoch ist. Die Qualität von unterschiedlichen kommerziell erhältlichen [¹²³I]Iodidlösungen wurde in der Literatur schon hinreichend sowohl mittels Radio-DC als auch Radio-HPLC untersucht [172–174]. So wurde auch nachgewiesen, dass sich in den gelieferten wässrigen Lösungen zusätzlich diverse anorganische Ionen, wie z. B. Bromid, Nitrat, Oxalat, Phosphat und Sulfat in stark variierenden Konzentrationen befinden können. Je länger eine [¹²³I]Iodid-Lösung gelagert wurde, desto stärker waren die Autoradiolyseprozesse, desto höher der Gehalt an [¹²³I]Iodat und [¹²³I]Periodat und daraus folgend um so geringer die RCA der gewünschten ¹²³I-iodierten Verbindungen. Die Lösung, die über Nacht in einem durchsichtigen Eppendorf-Gefäß gelagert war, alterte scheinbar schneller, als die unter Lichtausschluss gelagerte Stammlösung. Daher waren am zweiten Tag die RCA mit der frisch entnommenen [¹²³I]Iodid-Lösung höher als die mit der am Tag zuvor entnommenen [¹²³I]Iodid-Lösung.

Ein weiterer Einfluss, der die schlechteren RCA mit [¹²³I]Iodid bedingte, könnte der pH-Wert der [¹²³I]Iodid-Lösung sein. So hatte die angelieferte Natrium[¹²³I]iodid-Lösung einen pH-Wert von 12–13, während die Natrium[¹³¹I]iodid-Lösung einen pH-Wert von 7–11 hatte. In der Literatur wurden Arbeiten zur Radiobromierung mit CAT als Oxidationsmittel beschrieben, die zeigten, dass die RCA bei einem pH-Wert der Reaktionslösung > 7 drastisch geringer wurden [54]. Dieses Verhalten konnte bei den ¹³¹I-Iodierungen nicht beobachtet werden, bei denen auch bei einem pH-Wert von 8,1 noch sehr gute RCA erzielt werden konnten (siehe 4.2.3.3). Da bei den [¹³¹I]Iodid-Lösungen, die einen pH-Wert von 7–11 hatten, durch den Zusatz von 10 µL Phosphatpuffer keine Neutralisierung erreicht werden konnte (pH 7,9), kann dies bei Verwendung der [¹²³I]Iodid-Lösungen, die einen pH-Wert von 12–13 hatten, auch nicht der Fall sein. Daher wurde dieser Sachverhalt durch Versuche mit einem höheren Phosphatpufferanteil geprüft. Statt eines Zusatzes von 10 µL Phosphatpuffer wurden 20 µL zugegeben (Abb. 60).

Durch den Zusatz von 20 µL Phosphatpuffer statt 10 µL konnte bei keiner der ¹²³I-iodierten Verbindungen eine Steigerung der RCA beobachtet werden, sie wurden sogar schlechter. Dies spiegelte das gleiche Verhalten wieder, das auch bei den meisten ¹³¹I-Iodierungen gesehen wurde. Durch einen höheren wässrigen Anteil in der Reaktionslösung wurden die RCA wegen eines Ausfallens des Markierungsvorläufers schlechter. Ein eventueller Effekt, den der pH-Wert der Reaktionslösung auf die RCA haben könnte, konnte durch ein stärkeres Abpuffern der Lösung nicht kompensiert werden.

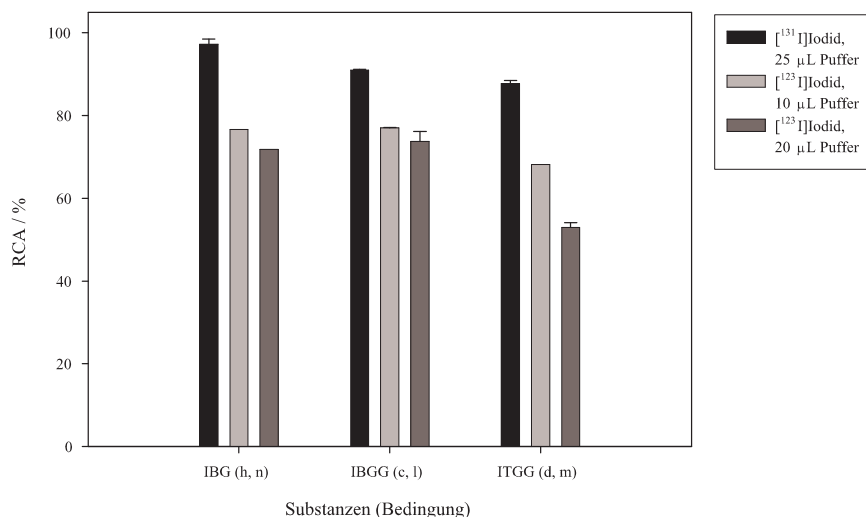


Abbildung 60: Abhängigkeit der RCA bei der ¹²³I-Iodierung vom Zusatz an Phosphatpuffer (Reaktionszeit 5 Minuten, Reaktionsbedingung siehe Anhang B)

Um die Reaktionszeit für die ¹²³I-Iodierungen zu optimieren, wurden die RCA der ¹²³I-iodierten Guanin-Derivate in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Exemplarisch ist in Abbildung 61 die RCA von [¹²³I]IBGG nach verschiedenen Reaktionszeiten dargestellt. Bei allen ¹²³I-iodierten Verbindun-

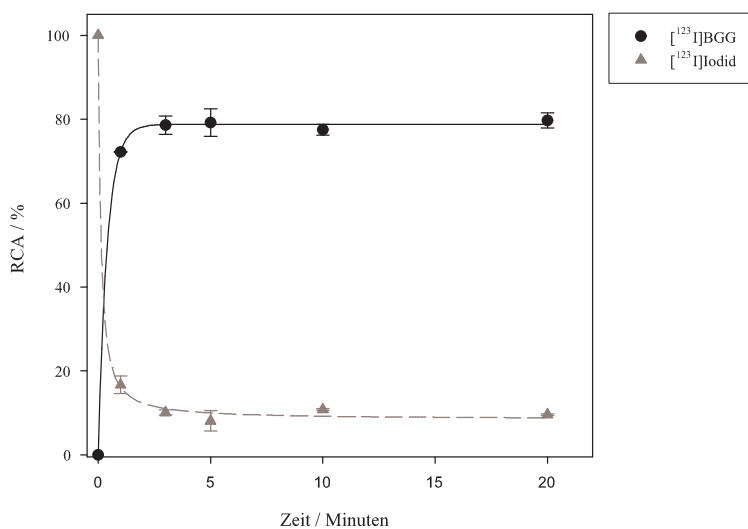


Abbildung 61: Abhängigkeit der RCA bei der ¹²³I-Iodierung von SnBGG von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 µg, 10 µL [¹²³I]Iodid-Lösung, 10 µL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 µL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)))

gen zeigte sich, wie zuvor auch bei den ¹³¹I-iodierten Verbindungen, dass die RCA bis zu einer Reaktionszeit von 3 Minuten stark anstieg und sich danach nur noch geringfügig änderte. Daher wurde für die ¹²³I-Iodierungen ebenfalls eine Reaktionszeit von 5 Minuten gewählt.

Bei der Verwendung von unterschiedlichen Chargen von [¹²³I]Iodid konnten im Gegensatz zu den ¹³¹I-Iodierungen drastische Unterschiede in den RCA der jeweiligen Verbindungen beobachtet werden. In Tabelle 26 ist dieses Verhalten für [¹²³I]IBG und [¹²³I]IBGG aufgezeigt.

Tabelle 26: Abhängigkeit der RCA bei der ¹²³I-Iodierung von SnBG und SnBGG von der Verwendung unterschiedlicher [¹²³I]Iodid-Chargen (Reaktionszeit 5 Minuten, optimierte Reaktionsbedingungen)

| Charge ^a | RCA / % | |
|---------------------|------------------------|-------------------------|
| | [¹²³ I]IBG | [¹²³ I]IBGG |
| 1 | 89 ± 14 | 77 ± 0,5 |
| 2 | 50 ± 6 | - |
| 3 | - | 62 |

^aVolumenaktivität: Charge 1: 51,74 GBq/mL; Charge 2: 16,17 GBq/mL; Charge 3: 33,21 GBq/mL

Dieses Verhalten der RCA spricht für eine stark schwankende Qualität der [¹²³I]Iodid-Lösungen. Außerdem zeigte sich, dass die [¹²³I]Iodid-Charge mit der kleinsten Volumenaktivität die geringsten RCA bedingte und die mit der größten Volumenaktivität die höchsten RCA. In anderen Arbeiten wurde ebenfalls beobachtet, dass der Zusammenhang zwischen Volumen und Aktivitätsmenge einer Natrium[¹²³I]iodid-Lösung ein Indikator dafür ist, wie frisch die Lösung ist [175]. Einschränkend zu dieser Beobachtung wird jedoch angemerkt, dass das [¹²³I]Iodid nach seiner Produktion säulenchromatographisch gereinigt wird, wobei auch das Elutionsvolumen variiert werden kann. Was bei der Verwendung der unterschiedlichen [¹²³I]Iodid-Chargen zusätzlich mittels HPLC beobachtet werden konnte, war bei Charge 2 und 3 die Bildung von radioaktiven Nebenprodukten, die weder bei den ersten ¹²³I-Iodierungen noch bei den ¹³¹I-Iodierungen beobachtet werden konnten.

Die Verbindungen [¹²³I]IBG und [¹²³I]IBGG konnten wie die ¹³¹I-iodierten Verbindungen mit hohen radiochemischen Reinheiten > 99,9 % mittels HPLC isoliert werden. Bei diesen Verbindungen konnte ebenfalls bei einer Lagerung in absolutem Ethanol bei 5 °C nach 1 Tag keinerlei Instabilität festgestellt werden. Eine Isolierung von [¹²³I]ITGG wurde nicht durchgeführt, da diese Verbindung nicht in einer SPECT-Untersuchung eingesetzt werden sollte. Daher wurden mit dem Stannylvorläufer SnTGSi keine systematischen Untersuchungen durchgeführt, da dieser zudem noch hätte entschützt werden müssen, um die gewünschte Verbindung [¹²³I]ITG zu erhalten. Die Darstellungen von [¹²³I]IBG fanden alle mit dem Markierungsvorläufer SnBG statt, so dass nach der Iodierung keine Entschützung an der N⁹-Position mehr durchgeführt werden musste.

4.9 Bewertung der Radioiodierungen

Eine Übersicht über die radiochemischen Ausbeuten unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen bei den Radioiodierungen der fünf Stannylvorläufer SnBGSi, SnBGG, SnBG, SnTGSi und SnTGG befindet sich im Anhang (siehe B).

Die ¹³¹I-Iodierungen aller Verbindungen verliefen mit guten bis sehr guten radiochemischen Ausbeuten bei kurzen Reaktionszeiten von 5 Minuten. Für alle Verbindungen war die Verwendung von CAT als Oxidationsmittel bei pH 7,0 vorteilhafter als der Einsatz von Iodogen™. Bei den nicht-glycosylierten silylgeschützten Derivaten war die Verwendung einer möglichst geringen Konzentration an CAT vorteilhaft, während dies bei den Glucose-Konjugaten keine großen Auswirkungen hatte. Durch den Schritt der Entschützung an der N⁹-Position verschlechterten sich die RCA für [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]ITG um etwa 15 %, weswegen die direkte ¹³¹I-Iodierung von SnBG um so vorteilhafter war. Der Einsatz unterschiedlicher Chargen [¹³¹I]Iodid führte zu keinen drastischen Veränderungen in den RCA. Bei einer Lagerung in absolutem Ethanol bei 5 °C waren alle Substanzen bis zu 1 Monat stabil gegenüber Radiolyse und anderen Zersetzungsreaktionen.

Zu den ^{123}I -Iodierungen lässt sich sagen, dass sie generell schlechtere RCA ergaben als die ^{131}I -Iodierungen und diese sich auch noch von Charge zu Charge stark änderten. Daher waren die ^{123}I -Iodierungen der Guanin-Derivate nicht so gut reproduzierbar wie die ^{131}I -Iodierungen. Dank der sehr guten Radioiodierungsausbeuten dieser Guanin-Derivate konnte aber auch bei den ^{123}I -Iodierungen immer genügend Aktivität für die entsprechenden weiter geplanten Untersuchungen mit diesen Substanzen isoliert werden.

5 Evaluierungen

Sowohl mit den inaktiven Standardverbindungen IBG, IBGG, ITG und ITGG als auch mit ihren entsprechenden ^{131}I -iodierten bzw. in geringem Umfang ^{123}I -iodierten Derivaten wurden zahlreiche biochemisch und biologisch relevante Evaluierungen durchgeführt.

5.1 Bestimmung der Lipophilie

Ein sehr entscheidender Faktor für die Wirkung einer Substanz ist ihre Fähigkeit, an den gewünschten Zielort zu gelangen. Von großer Bedeutung hierfür ist die Lipophilie der Verbindung, die zum einen einen Hinweis auf eventuelle Plasmapbindungen geben kann, und zum anderen entscheidend für die Fähigkeit einer Substanz ist, Zellmembranen zu passieren. Die Lipophilie eines Moleküls ist daher ein wichtiger Hinweis darauf, wie sich die Substanz *in vivo* verhalten kann. Daher wurde die Lipophilie der vier MGMT-Inhibitoren IBG, IBGG, ITG und ITGG bestimmt.

Die experimentelle Bestimmung der Lipophilie erfolgt über die Ermittlung des logP-Wertes der Substanz. Der logP-Wert ist der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten (engl.: „partition coefficient“) der Verbindung in einem Octanol-Wasser-System. Er kann mit verschiedenen Methoden experimentell bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die logP-Werte der Guanin-Derivate zum einen mittels der HPLC-Methode mit den inaktiven Substanzen bei einem pH-Wert von 7,4 ermittelt. Zum anderen erfolgte die Bestimmung auch mittels der Scheidetrichter-Methode mit den ^{131}I -iodierten Derivaten bei pH-Werten zwischen 5 und 9,4.

Das Verhalten der logP-Werte bei unterschiedlichen pH-Werten ist interessant, da es zu Protonierungen oder Deprotonierungen des Moleküls kommen kann, wodurch es deutlich besser in die wässrige Phase gelangen kann. Da die Guanin-Derivate an den Stickstoffatomen potentiell protoniert oder deprotoniert werden können, wurde dieses Verhalten getestet. In Abbildung 62 ist exemplarisch die Abhängigkeit der logP-Werte von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ vom pH-Wert der wässrigen Lösung dargestellt. Eine Tabelle mit den ermittelten logP-Werten mittels der Scheidetrichter-Methode befindet sich in 6.8.2.

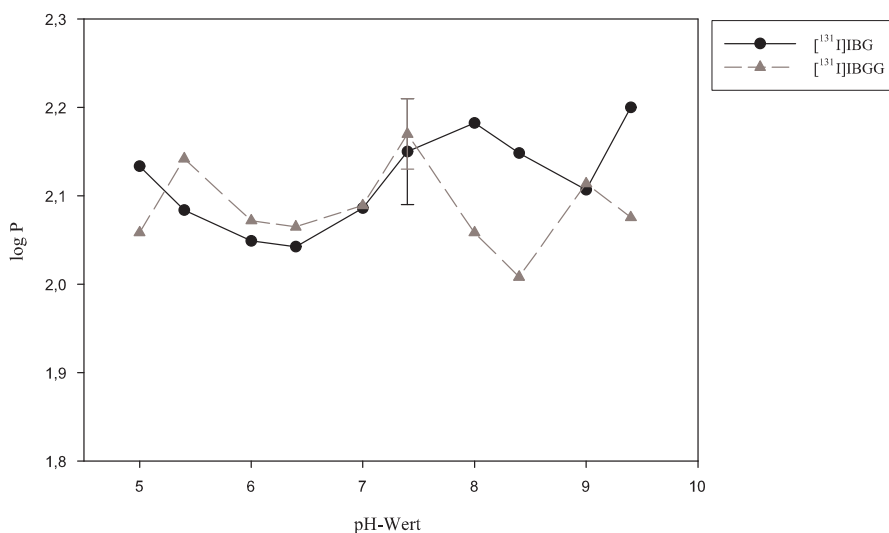


Abbildung 62: Abhängigkeit des logP-Wertes von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ vom pH-Wert

Wie anhand der Abbildung zu sehen ist, änderten sich die logP-Werte der beiden ^{131}I -iodierten Derivate im untersuchten pH-Bereich von 5 - 9,4 im Rahmen des Fehlers kaum. Daraus kann man schließen, dass in diesem pH-Bereich weder Protonierungen noch Deprotonierungen der Moleküle stattfanden, da sich dies in einer Erniedrigung der logP-Werte widerspiegeln würde.

Bei der Untersuchung für die Iodothénylguanin-Derivate erhielt man das gleiche Resultat. Eine Änderung des pH-Wertes der wässrigen Lösung führte auch hier nicht zu einer Änderung des logP-Wertes.

Für das Verhalten der Substanzen *in vivo* ist vor allem der physiologische pH-Wert von pH 7,4 interessant. Bei diesem pH-Wert fanden auch die Bestimmungen der logP-Werte mittels der HPLC-Methode statt. Tabelle 34 stellt die bei pH 7,4 mit der HPLC- und mit der Scheidetrichter-Methode erhaltenen logP-Werte einander gegenüber.

Tabelle 27: logP-Werte der MGMT-Inhibitoren bei pH 7,4

| Substanz | logP | |
|-------------|------|-----------------|
| | HPLC | Scheidetrichter |
| IBG | 1,93 | 2,15 ± 0,06 |
| IBGG | 2,23 | 2,17 ± 0,04 |
| ITG | 1,57 | 1,85 ± 0,02 |
| ITGG | 1,83 | 2,09 ± 0,07 |

Die Fehler bei der HPLC-Methode liegen zwischen 5-10 %. Die mit den beiden unterschiedlichen Methoden ermittelten logP-Werte stimmten relativ gut überein. Sowohl bei den Iodbenzyl- als auch bei den Iodothénylguanin-Derivaten wiesen die Glucose-Konjugate einen etwas höheren logP-Wert auf als die unkonjugierten Derivate. Das bedeutet, dass sie etwas lipophiler sind als die freien Guanin-Derivate, was nicht unbedingt zu erwarten war. Es war eigentlich das Ziel, die Lipophilie der Verbindungen durch die relativ polare Glucose-Einheit zu verringern. Dieser Effekt wurde anscheinend durch die Verwendung des Kohlenstoffspacers mit 8 Methyleneinheiten wieder rückgängig gemacht. Um eine ausreichende Aktivität der Guanin-Derivate gegenüber MGMT zu gewährleisten, musste aber diese Kettenlänge gewählt werden (siehe 1.7.3). Die Tatsache, dass die Glucose-Konjugate anscheinend nicht weniger lipophil sind als die nicht-konjugierten Guanin-Derivate, muss allerdings nicht zwangsläufig dazu führen, dass die *in vivo*-Eigenschaften nicht dennoch vorteilhaft sein können.

5.2 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Da es sich bei den dargestellten Guanin-Derivaten um Inhibitoren eines Enzyms handelt, ist die wohl wichtigste biologische Untersuchung zunächst die Bestimmung der Aktivität, mit der diese Inhibitoren das Zielenzym hemmen. Deshalb wurde zunächst von allen dargestellten Guanin-Derivaten ihr IC₅₀-Wert gegenüber MGMT bestimmt. Wenn die Aktivität gegenüber MGMT nicht ausreichend gewesen wäre, hätte man mit den entsprechenden Inhibitoren keine weiteren Studien, wie z. B. Radioiodierungen der Substanz oder andere biologische Evaluierungen, mehr durchgeführt. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte fand am Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz statt.

Die Inhibition der MGMT durch die verschiedenen Guanin-Derivate wurde mit HeLa S3-Zellextrakt (*in vitro*) oder intakten HeLa S3-Zellen (*in vivo*) untersucht, indem diese zunächst mit dem Inhibitor inkubiert wurden. Während der Inkubation wird die Konzentration an nicht-blockierter MGMT durch Arylübertragung von den Guanin-Derivaten auf das Protein vermindert. Um diesen Anteil bestimmen zu können, wird ein Überschuss einer [³H]methylierten DNA-Probe zugesetzt. Durch Ausfällen des Proteins und anschließendes Wiederauflösen kann die Radioaktivität, die in dem Protein gebunden ist, bestimmt werden. Die dabei gemessene Aktivität ist abhängig von der Zahl der Proteine, die durch Übertragung des radioaktiven Methylrestes der DNA-Probe blockiert worden ist. Bei der Aufarbeitung der Reaktionslösung wird jedoch nicht nur das radioaktiv markierte, sondern auch das durch den Inhibitor blockierte Enzym ausgefällt. Daher ist das Verhältnis von gemessener Aktivität zur Gesamtmasse an ausgefallenem Protein davon abhängig, wieviel durch den Inhibitor blockiertes Enzym

vor der Zugabe der DNA-Probe vorhanden war. So ist das Verhältnis von gemessener Aktivität zur Gesamtmasse an ausgefälltem Protein ein Maß für die durch den Inhibitor blockierte MGMT. Ist das Verhältnis klein, so liegt im Niederschlag nur wenig tritiertes Enzym vor, das heißt, der Großteil der vorliegenden MGMT ist durch den Inhibitor blockiert. Im Gegensatz dazu bedeutet ein großes Aktivitäts-Masse-Verhältnis, dass nur wenig MGMT durch den Inhibitor blockiert wurde.

In Tabelle 28 sind die IC₅₀-Werte der untersuchten Guanin-Derivate [131] und falls vorhanden ein Vergleich mit Literaturwerten anderer Gruppen zusammengefasst.

Tabelle 28: IC₅₀-Werte der MGMT-Inhibitoren

| Inhibitor | IC₅₀ / nM <i>in vitro</i> ¹ | IC₅₀ / nM <i>in vivo</i> | IC₅₀ / nM Literatur |
|----------------------------------|---|---|--|
| BG | 300 | 35 | 40 ² |
| IBG | 100 | 20 | 15 ³ |
| IBGG | 450 | 400 | - |
| 4-BTG | 9 | 4 | 4 ² |
| 4-BTGGα | 450 | 80 | - |
| 4-BTGGβ | 30 | 10 | - |
| ITG | 750 | 50 | - |
| ITGGα | 1300 | 140 | - |
| ITGGβ | 800 | 360 | - |

¹ MGMT-Konzentration: 588 ± 86 fmol/mg

² [106]

³ [128]

Die Untersuchungen wurden mit einem HeLa S3-Zellextrakt durchgeführt, der einen MGMT-Konzentration von 588 ± 86 fmol/mg aufwies. Als interne Standardverbindung ist auch der IC₅₀-Wert von BG aufgeführt, das schon in klinischen Studien der Phase II getestet wurde [117]. Ein Vergleich der gemessenen *in vivo*-IC₅₀-Werte mit schon aus der Arbeit anderer Gruppen bekannten Werten zeigt eine gute Übereinstimmung. Wie man sieht, war die Aktivität der nicht-glycosylierten Guanin-Derivate gegenüber MGMT vergleichbar (ITG) oder sogar noch besser (IBG und 4-BTG) als die des BG. Bei der Glucose-Konjugation wurden Derivate mit dem β -Glucoselinker und solche mit dem α -Glucoselinker untersucht. Durch die Glucose-Konjugation kam es bei allen Derivaten zu einer Verringerung der Aktivität gegenüber MGMT, wie sie auch schon von Reinhard et al. [123] beschrieben wurde (Abb. 63).

Im Fall der Iodbenzylguanin-Derivate führte die Konjugation mit dem β -Glucoselinker zu einer Verschlechterung des *in vitro*-IC₅₀-Wertes um einen Faktor 4,5, während sich die IC₅₀-Werte von ITG und dem β -Glucose-Konjugat nur geringfügig unterschieden. Zum Vergleich der IC₅₀-Werte von α - und β -Glucose-Konjugaten wurden die (4-Bomothenyl)guanin- und die Iodothenylguanin-Derivate untersucht. Im Zellextrakt wurde durch die Konjugation an den α - im Vergleich zum β -Glucoselinker eine deutliche Verringerung der Aktivität dieser Inhibitoren gegenüber MGMT festgestellt, wobei dieser Effekt bei den BTG-Derivaten stärker ausgeprägt war. Beim MGMT-Essay mit intakten Zellen konnte dieses Verhalten bei den ITG-Derivaten nicht mehr beobachtet werden, während es bei den BTG-Derivaten immer noch stark ausgeprägt war. Für die weiteren Untersuchungen wurden daher immer die β -Glucose-Konjugate verwendet.

Durch die Glucose-Konjugation der Guanin-Derivate kam es zwar zu einer Verringerung der Aktivität gegenüber MGMT, doch auch diese IC₅₀-Werte lagen immer noch im nM-Bereich.

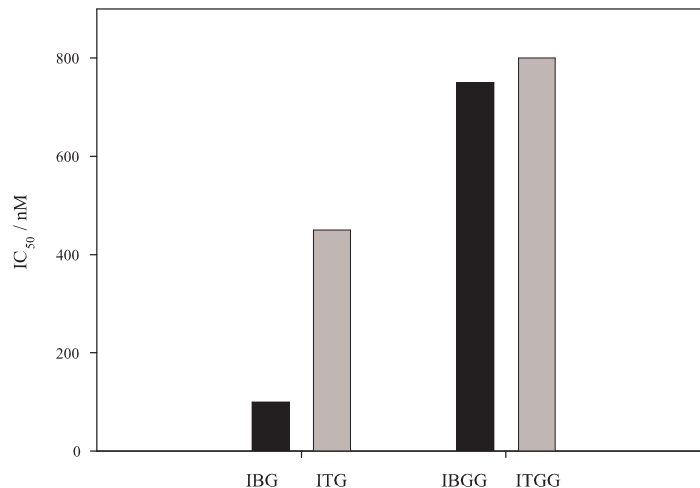


Abbildung 63: Vergleich der *in vitro*-IC₅₀-Werte von IBG, ITG und ihren β -Glucose-Konjugaten

5.3 *In vitro*-Bindung der ¹³¹I-iodierten Inhibitoren an MGMT

Damit die ¹³¹I-iodierten Inhibitoren als potentielle Tracer des MGMT-Status *in vivo* eingesetzt werden können, ist es essentiell, dass die radioaktiv markierte Gruppe an der O⁶-Position des Guanins auch wirklich auf die MGMT übertragen wird. Ansonsten würde lediglich das Anfluten der markierten Substanz in der Zelle dargestellt. Für [¹³¹I]IBG wurde die Übertragung der radioaktiven Gruppe auf MGMT bereits in der Literatur beschrieben [128], für die neuen Verbindungen [¹³¹I]IBGG, [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG wurde dies aber bislang nicht untersucht. Daher wurde die *in vitro*-Bindung der ¹³¹I-iodierten Inhibitoren an die MGMT geprüft. Diese Untersuchungen wurden im Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Analog [128] wurde die Bindung der ¹³¹I-iodierten Inhibitoren an gereinigte humane MGMT geprüft. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindung diente BSA. Hierfür wurden die ¹³¹I-iodierten Inhibitoren und unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen inaktiven Standardsubstanz mit dem gereinigten Protein inkubiert. Nach Ausfällung des Proteins und Messung der daran gebundenen Radioaktivität konnte das Verhältnis zwischen der insgesamt eingesetzten und der gebundenen Aktivität bestimmt werden, was ein Maß für die Bindung des Inhibitors an MGMT ist. In Abbildung 64 ist die Bindung der ¹³¹I-iodierten Guanin-Derivate an MGMT bei steigender Konzentration an inaktiver Standardverbindung dargestellt.

Bei einer Konzentration von 1 μ M IBG waren 97 % des [¹³¹I]IBG an MGMT gebunden, was sich bei höheren Konzentrationen an IBG verringerte. Im Versuch mit [¹³¹I]IBGG banden bei einer Konzentration von 1 μ M IBGG nur 20 % an MGMT, wobei dies mit höherem Trägerzusatz ebenfalls noch geringer wurde. Wegen der unterschiedlichen Konzentrationen an MGMT in diesen Essays (130 pmol/mg) und den Essays zur Bestimmung der IC₅₀-Werte (588 ± 86 fmol/mg) kann man die theoretisch aus diesen Abbildungen erhaltenen IC₅₀-Werte nicht mit denen aus Tabelle 28 vergleichen. Aber innerhalb der Essays unter jeweils gleichen Bedingungen ist ein Vergleich der Verbindungen untereinander möglich. Das Verhalten der beiden ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitoren in ihrer Bindung zur MGMT spiegelt ihre unterschiedlichen Fähigkeiten MGMT zu inhibieren wieder, die schon bei der Ermittlung der IC₅₀-Werte beobachtet wurden. Auch hierbei zeigte sich, dass IBGG ein nicht so potenter Inhibitor ist wie das nicht-glycosyliertes Derivat (vgl. Tab. 28). Die Bindung der beiden Derivate an MGMT war spezifisch, da nur wenig Aktivität an BSA gebunden wurde.

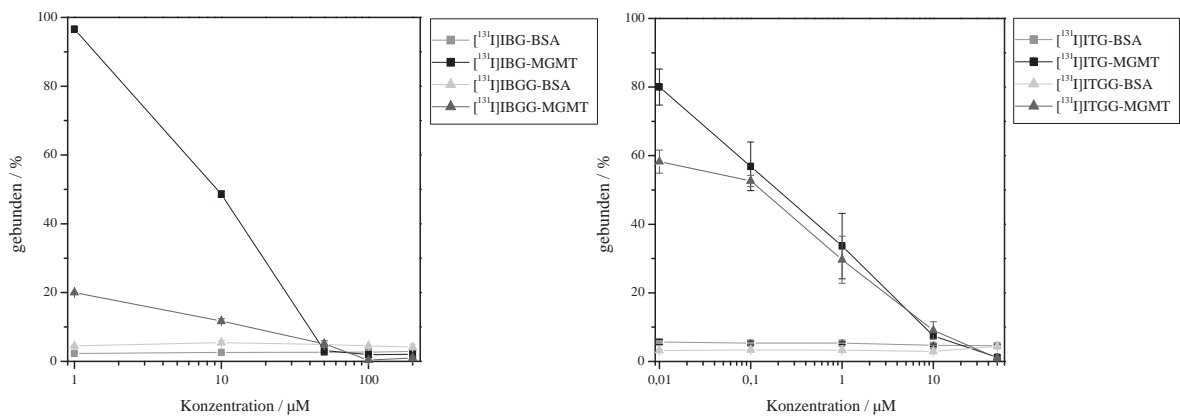


Abbildung 64: Bindung der ^{131}I -iodierten Inhibitoren an gereinigte MGMT (MGMT-Konzentration: 130 pmol/mg)

Für ^{131}I ITG war das Maximum, das an MGMT band, 80 % bei einer Konzentration von 0,01 μM inaktivem ITG. Bei der gleichen Konzentration an inaktivem ITGG banden 58 % des ^{131}I ITGG an MGMT. Mit höheren Konzentrationen der inaktiven Standardverbindungen nahm auch hier die Bindung der radioaktiven Guanin-Derivate zur MGMT ab. Auch in diesem Fall wurde nur wenig Aktivität an BSA gebunden, was bewies, dass die Bindung der Substrate an die MGMT spezifisch ist. Es zeigte sich, dass die Unterschiede in der Bindung an MGMT bei diesen beiden Verbindungen nicht so groß waren wie bei den Iodbenzylguanin-Derivaten. Dieses Verhalten bestätigte wiederum die bereits bestimmten IC_{50} -Werte der MGMT-Inhibitoren, wobei auch hier wegen der unterschiedlichen Konzentrationen an MGMT kein direkter Vergleich mit den theoretisch aus den Bindungssays der ^{131}I -iodierten Verbindungen erhaltenen IC_{50} -Werten erfolgen kann. Während bei den Iodbenzylguanin-Derivaten die Aktivität des Glucose-Konjugats gegenüber MGMT um einen Faktor 4,5 geringer war, war dieser Unterschied bei den Iodothylenylguanin-Derivaten bei weitem nicht so ausgeprägt.

Mit diesem Experiment konnte bewiesen werden, dass die Bindung der dargestellten Guanin-Derivate an MGMT spezifisch ist, was für eine weitere Untersuchung der Verbindungen essentiell ist. Zudem wurden die IC_{50} -Werte der Verbindungen noch einmal bestätigt.

5.4 *Ex vivo-* und *in vivo-*Tierstudien

Auf Grund der Daten der durchgeführten biologischen Evaluierungen wurde eine Testung der ^{131}I -iodierten Guanin-Derivate in Tierversuchen mit tumortragenden Nacktmäusen durchgeführt. Für ^{131}I IBG wurde die Organ- und Tumorverteilung in Nacktmäusen kürzlich beschrieben [129]. Während die ^{131}I -Aufnahme in den Tumor (TE-671 Rhabdomyosarcoma-Xenograft) geringer war als die in einige andere Organe, muss dies nicht zwangsläufig ein Problem bei der potentiellen Nutzung von ^{131}I IBG als Tracer zur Quantifizierung der MGMT-Konzentration in Tumoren darstellen. Es wäre jedoch erstrebenswert, einen Radioliganden zu erhalten, dessen Aufnahme in den Tumor selektiver ist, der metabolisch stabiler ist und der schneller aus dem Blut in die Organe verteilt wird. Um dies zu erreichen, wurden die Glucose-Konjugate der Guanin-Derivate hergestellt. Um die Verbindungen miteinander vergleichen zu können, wurde sowohl mit den ^{131}I -iodierten Iodbenzyl- als auch den Iodothylenylguanin-Derivaten die *ex vivo*-Organ- und Tumorverteilung bestimmt. Mit den ^{123}I -iodierten Iodbenzylguanin-Derivaten wurden zusätzlich auch *in vivo*-Kleintier-SPECT-Untersuchungen durchgeführt.

Bei allen Tierversuchen wurden männliche, athymische Nacktmäuse eingesetzt, denen subkutan ein Tumor in die Flanke implantiert war. Es wurden verschiedene Tumorarten untersucht:

- **MEX(+):** MGMT Expressing Xenograft; HeLa S3-Zellen
- **MEX(-):** HeLa MR-Zellen; MGMT defizient
- **Glioblastom**

Die Tumore wurden den Mäusen im Insitut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz implantiert. Die Injektion der ^{131}I -iodierten Derivate, die Tötung der Tiere, die Organentnahme, die Probenaufbereitung und die Messung der Proben wurden im Insitut für Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Pro Zeitpunkt und Verbindung wurden insgesamt zwischen 3 und 10 Mäusen verwendet, an einem Versuchstag mindestens 3 Mäuse pro Zeitpunkt. Als Kontrolle diente pro Zeitpunkt und Versuch auch immer mindestens eine gesunde Nacktmaus.

5.4.1 *Ex vivo*-Tierstudien mit [^{131}I]IBG und [^{131}I]IBGG

Auf Grund der besseren IC_{50} -Werte der Iodbenzylguanin-Derivate im Zellextrakt gegenüber den Iodothénylguanin-Derivaten (siehe 5.2) wurden die ersten Verteilungsstudien mit [^{131}I]IBG und dem Glucose-Konjugat [^{131}I]IBGG durchgeführt.

5.4.1.1 *Ex vivo*-Organ- und Tumorverteilung an tumortragenden Nacktmäusen

Zunächst wurden Nacktmäuse untersucht, denen in die eine Flanke subkutan ein MEX(+)-Tumor implantiert war und in zwei Fällen in die andere Flanke auch ein MEX(-)-Tumor. Die HeLa S3- bzw. HeLa MR-Zellen wurden etwa 10 Tage vor dem Versuch unter die Haut injiziert. Innerhalb dieser Zeit bildeten sich die Tumore.

Die Mäuse wurden mit KetanestTM narkotisiert und n.c.a [^{131}I]IBG bzw. [^{131}I]IBGG in die Schwanzvene appliziert. Die ^{131}I -iodierten Iodbenzylguanin-Derivate wurden immer in physiologischer Kochsalzlösung mit 1 % DMSO injiziert. Anschließend wurde nach 0,5 h, 1 h, 4 h und 8 h p.i. die Organverteilung untersucht. Im Falle der Biodistribution nach 8 h wurden bis auf eine Maus, der [^{131}I]IBGG appliziert wurde, nur gesunde Mäuse evaluiert. Die ^{131}I -Aufnahme in die unterschiedlichen Gewebe wurde als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) ermittelt.

In Abbildung 65 ist die ^{131}I -Verteilung nach der Injektion von [^{131}I]IBG in den entnommenen Geweben dargestellt.

Die Tumoraufnahme von [^{131}I]IBG erreichte 1 h nach Injektion ein Maximum von $0,83 \pm 0,04$ % ID/g. Die Aufnahme in die anderen Organe war relativ hoch im Vergleich zur Tumoraufnahme, da auch in normalem Gewebe von Mensch, Ratte und Maus MGMT in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert wird [179]. Die starke Aufnahme von [^{131}I]IBG in die Leber kann auch durch den Metabolismus von BG erklärt werden. Der erste Schritt des Abbaus von BG ist die Oxidation durch Cytochrom P450 in der Leber zu O⁶-Benzyl-8-oxoguanin [180], das selbst auch ein potenter Inhibitor der MGMT ist [181]. Der weitere Metabolismus involviert die Debenzylierung von O⁶-Benzyl-8-oxoguanin zu 8-Oxoguanin in der Leber, auch durch CYP450 [181]. Ein wichtiger Abbauweg von [^{131}I]IBG scheint zudem die Deiodierung zu sein, da die Aufnahme von [^{131}I]Iodid in die Schilddrüse zu allen Zeitpunkten sehr hoch war. Nur beim 8 h-Wert war die Akkumulation gering, was an einer Wiederausscheidung des Iodids aus der Schilddrüse liegt. Auch die relativ hohen Anreicherungen im Magen sprechen für eine Deiodierung des Moleküls, da im Magen unspezifisch [^{131}I]Iodid aufgenommen werden kann. Eine starke *in vivo*-Deiodierung des Moleküls ist für seinen potentiellen Einsatz als Radiotracer nicht erstrebenswert, da die Übertragung der ^{131}I -iodierten Gruppe von der O⁶-Position des Guanin-Derivates auf die MGMT beobachtet werden soll.

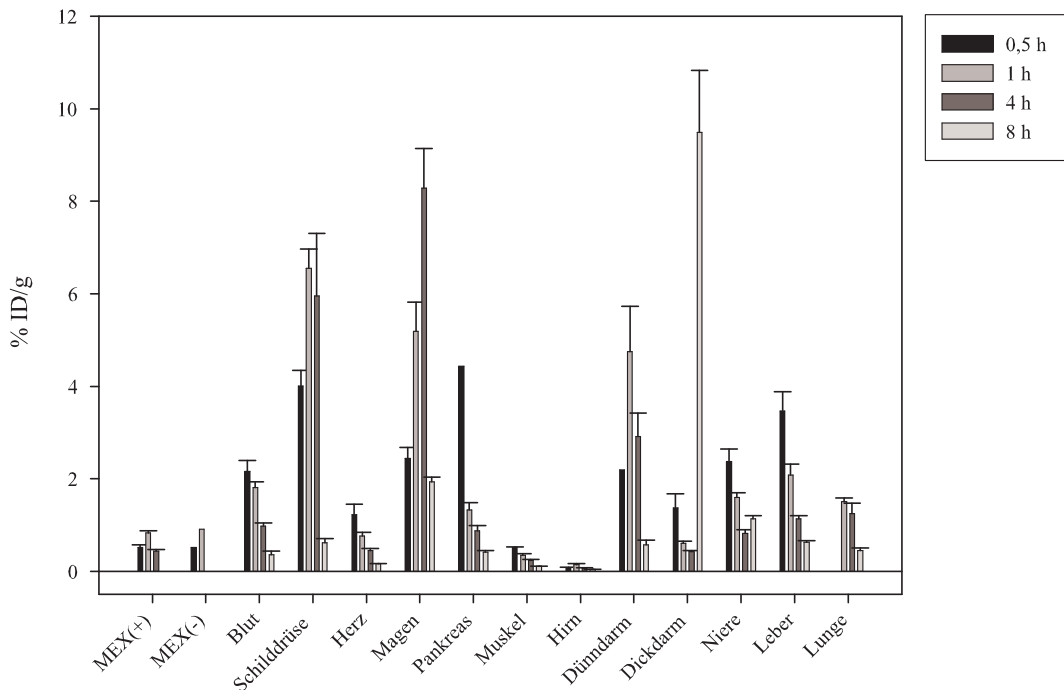


Abbildung 65: Verteilung von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und teilweise auch MEX(-)-Tumoren

Ein weiterer Aspekt ist die Fähigkeit von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, da es hierzu in der Literatur sehr widersprüchliche Aussagen gibt. Eine Gruppe berichtete über die Unterdrückung der MGMT-Aktivität und die Anwesenheit von O^6 -Benzyl-2'-deoxyguanosin und seiner Metaboliten im Rattenhirn und zogen daraus den Schluss, dass dieser Inhibitor die Blut-Hirn-Schranke durchdringt [182]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass O^6 -Benzyl-N-acetylguanosin nicht im zentralen Nervensystem von Nacktmäusen verteilt wurde und folglich die Blut-Hirn-Schranke nicht gut durchdringen konnte [183]. Eine weitere Studie mit Primaten untersuchte die Pharmakokinetik in Plasma und der Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit (CSF) mit BG und anderen Analoga [184]. Es wurde berichtet, dass die Penetration in die CSF bei allen untersuchten MGMT-Inhibitoren gering war. Die Aufnahme von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ ins Gehirn war in den vorliegenden Tierstudien gering mit einem Maximum von $0,14 \pm 0,03$ % ID/g 1 h Stunde nach Injektion. Generell muss bei so geringen Werten der % ID/g auch beachtet werden, dass die beobachtete Aktivitätsakkumulation zum Großteil vom Blutfluss in dem entsprechenden Gewebe verursacht sein kann, was die eigentliche Aufnahme noch geringer ausfallen lässt. Somit durchdrang $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ die Blut-Hirn-Schranke wahrscheinlich kaum, was auch die Ergebnisse von [183] und [184] bestätigte, die ähnliche Verbindungen einsetzten. Die von Vaidyanathan et al. [129] festgestellte Verteilung von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ war größtenteils vergleichbar, wie z. B. die Aufnahme in die Nieren und die Verteilung im Blut. Auch die Tumoraufnahme war im vorliegenden Experiment etwas geringer und verzögert im Vergleich zu [129], wo 0,5 h p.i. ein Maximum von $1,38 \pm 0,34$ % ID/g berichtet wurde. Die sehr hohe Aufnahme von über 18 % ID/g in den Dünndarm nach 30 Minuten ließ sich allerdings nicht beobachten. Eine mögliche Ursache hierfür kann die Verwendung von PBS als Injektionsmedium sein. In der Literatur wurde schon beschrieben, dass die Wahl des Injektionsmediums einen Unterschied in den Verteilungsmustern von BG-Derivaten in Nacktmäusen hervorrufen kann [185].

Die ^{131}I -Verteilung nach der Injektion von $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ in den untersuchten Organen nach den unterschiedlichen Zeitpunkten ist in Abbildung 66 dargestellt.

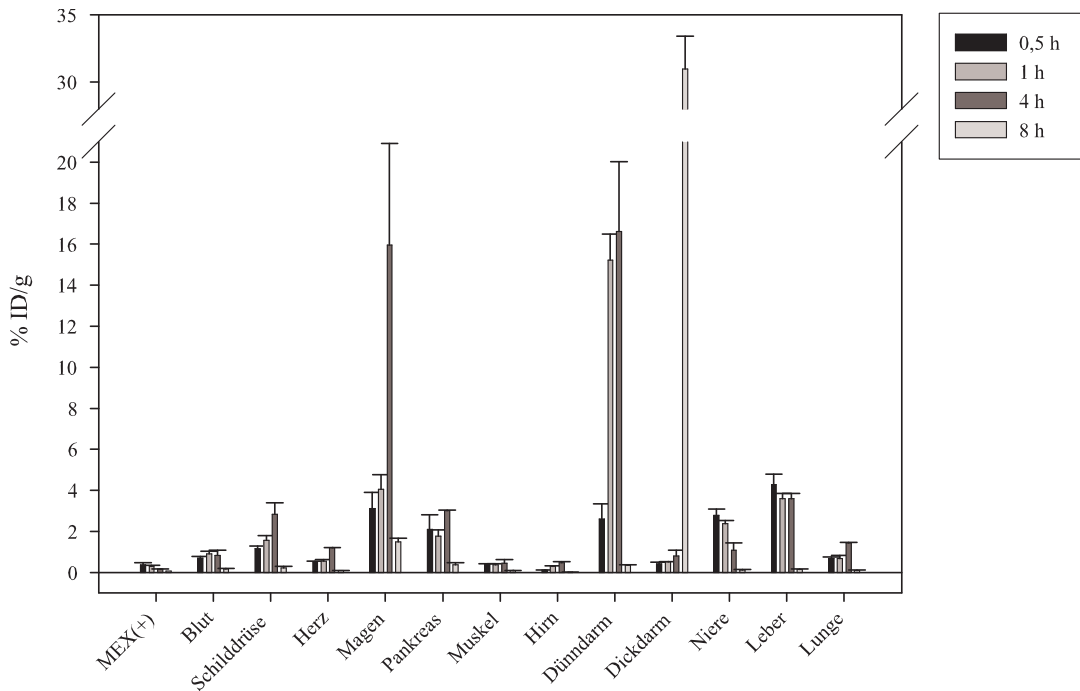


Abbildung 66: Verteilung von $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren

Die Aufnahme von $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ in normales Gewebe, wie z. B. Leber und Nieren, war vergleichbar zu $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$. In das gastrointestinale System hingegen wurde 4 und 8 h p.i. deutlich mehr aufgenommen, vergleichbar zu den kürzlich beschriebenen Ergebnissen für $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ [129]. Diese Aufnahme liegt im erwarteten Bereich, da MGMT auch in normalem Gewebe exprimiert wird, besonders in Leber und Darm [85, 179]. Die Anreicherung von $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ im Gehirn erreichte 4 h nach Injektion ein Maximum von $0,48 \pm 0,04$ % ID/g, was mehr war als für $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$. Weiterhin ließ sich feststellen, dass für das Glucose-Konjugat die Aufnahme von $[^{131}\text{I}]\text{Iodid}$ in die Schilddrüse zu allen Zeitpunkten deutlich geringer war als für $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ (Abb. 67), z. B. $1,57 \pm 0,22$ % ID/g nach 4 h vs. $6,55 \pm 0,42$ % ID/g.

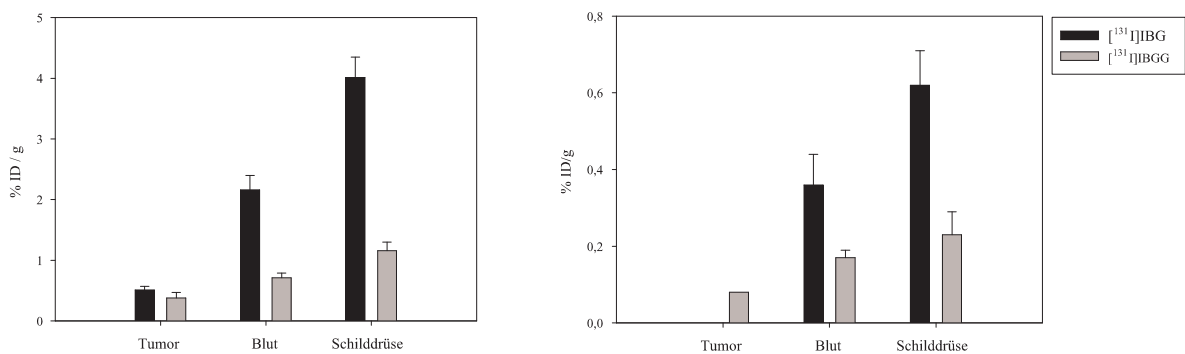


Abbildung 67: Vergleich von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ in ausgewählten Organen (0,5 h p.i. (links) und 8 h p.i. (rechts))

Da eine Deiodierung des Moleküls im Körper für einen potentiellen Tracer der MGMT nicht günstig ist, scheint das Glucose-Konjugat in dieser Hinsicht vorteilhaft zu sein. Bei beiden Verbindungen ist die Aktivitätsakkumulation in der Schilddrüse deutlich geringer als bei den früheren Zeitpunkten, was auf eine Wiederausscheidung des $[^{131}\text{I}]\text{Iodids}$ schliessen lässt. Die Verteilung von $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ nach i.v.-Injektion aus dem Blut in die anderen Gewebe war auch schneller als für das nicht-glycosylierte

Analogon, eine weitere Eigenschaft, die erreicht werden sollte. Bei $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ war die Tumoraufnahme 30 Minuten nach Injektion maximal mit einer ID/g von $0,54 \pm 0,10 \%$ und nahm nach 1 h, 4 h und 8 h kontinuierlich ab. Dies war zwar geringer als die Tumoraufnahme von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$, aber wie erwähnt war die Verteilung aus dem Blut für das Glucose-Konjugat schneller, was zu einem deutlich besseren Tumor-Blut-Verhältnis von 0,76 zu 0,24 für $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ 30 Minuten nach der Injektion führte (Tab. 29).

Tabelle 29: Tumor-Blut-Verhältnisse (MEX(+)-Tumor) von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$

| Inhibitor | Tumor-Blut-Verhältnis | | | |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------|
| | 0,5 h | 1 h | 4 h | 8 h |
| $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ | $0,76 \pm 0,05$ | $0,38 \pm 0,04$ | $0,20 \pm 0,02$ | 0,47 |
| $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ | $0,24 \pm 0,02$ | $0,46 \pm 0,04$ | $0,45 \pm 0,03$ | - |

Dies ist ein sehr wichtiger Faktor für einen potentiellen Einsatz des Inhibitors als Tracer für die Quantifizierung des MGMT-Status eines Tumors *in vivo*. Nach 1 h und 4 h war das Verhältnis für $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ besser, aber zu keinem Zeitpunkt so gut wie für $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ nach 30 Minuten. Generell wird normaler Weise ein Imaging bei späteren Zeitpunkten vorgezogen, da das Signal-Untergrund-Verhältnis besser ist. Bei einer spezifischen Bindung einer radioaktiven Substanz im oder am Tumor wird das Tumor-Blut-Verhältnis in der Regel besser, da immer mehr Aktivität aus dem Blut ausgeschieden wird. Das Verhalten von $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ ist daher ungewöhnlich, vom 8 h-Wert abgesehen, der auch nur mit einem Tumor bestimmt werden konnte, sinkt das Tumor-Blut-Verhältnis mit der Zeit. Zu frühen Zeitpunkten ist eine Verwendung von $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ günstiger, möchte man allerdings bei späteren Zeitpunkten messen, ist $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ besser geeignet.

Für beide Verbindungen nahmen die Aktivitätskonzentrationen in den meisten Geweben 8 h nach der Injektion ab, nur im Dickdarm nahmen sie zu. Dies lässt den Schluss zu, dass die Ausscheidung dieser Verbindungen nicht nur renal erfolgte, sondern auch heterobilär. Die primär renale Ausscheidung wurde durch die relativ hohe Anreicherung in den Nieren, aber vor allem durch die sehr hohe Aktivitätskonzentration im Urin (siehe 5.4.1.2 und 5.4.4), der in späteren Experimenten auch entnommen wurde, nachgewiesen.

Für beide Verbindungen wurden auch verschiedene Tumorarten untersucht. Bei $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ waren dies MEX(+)- und Glioblastom-Xenografte, bei $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ auch zusätzlich noch MEX(-)-Tumore (siehe oben). Ein Vergleich der Aufnahme der beiden ^{131}I -iodierten Inhibitoren in die unterschiedlichen Tumorarten 1 h p.i. ist in Abbildung 68 dargestellt.

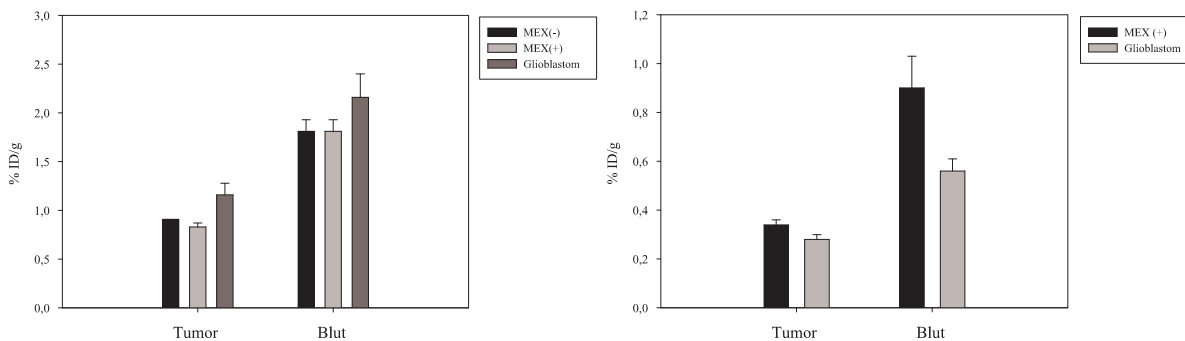


Abbildung 68: Vergleich der Aufnahme von $[^{131}\text{I}]\text{IBG}$ (links) und $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ (rechts) in unterschiedliche Tumorarten (1 h p.i.)

Bei einem Vergleich zwischen einem MEX(+)- und einem MEX(-)-Tumor würde man erwarten, dass

man im MEX(+)-Tumor, der 588 ± 86 fmol/mg MGMT exprimiert [131], eine höhere Aufnahme des ^{131}I -iodierten Inhibitors sieht. Im Fall von ^{131}I IBG konnte man dieses Verhalten allerdings nicht beobachten. Dies kann zum einen daran liegen, dass mit dem MEX(-)-Tumor auch nur eine Nacktmaus untersucht werden konnte, da das schlechte Anwachsen dieser Xenografte in einer schlechten Verfügbarkeit dieser Tumore resultierte. Daher war für diese Tumorart keinerlei Statistik gegeben. In anderen Versuchen mit den ^{131}I -iodierten Iodothénylguanin-Derivaten wurde allerdings auch bei hinreichender Statistik im Vergleich zwischen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren nicht der erhoffte Unterschied gesehen (siehe 5.4.2). Die Ursache für dieses Verhalten liegt wahrscheinlich darin begründet, dass zur Absättigung der MGMT eine Menge von 10 - 20 μmol des Inhibitors vorhanden sein muss [186]. Da die ^{131}I -iodierten Substanzen n.c.a. injiziert wurden, d. h. ohne Trägerzusatz, waren die applizierten Mengen sehr gering. Aus der ermittelten spezifischen Aktivität von ^{131}I IBGG konnte man eine resultierende Konzentration der ^{131}I -iodierten Substanz von circa 20 nmol berechnen, die man in etwa auch für die anderen ^{131}I -iodierten Inhibitoren annehmen kann. Mit dieser Konzentration war keine Sättigung der MGMT zu erreichen, weswegen man wahrscheinlich keinen Unterschied zwischen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren beobachten konnte. Im Experiment von Vaidyanathan et al. [129] wurde einer Gruppe Nacktmäuse 30 Minuten vor der Injektion von ^{131}I IBG eine Dosis von 0,22 mg inaktivem IBG in die Schwanzvene injiziert. Hier konnte beobachtet werden, dass die Aufnahme der ^{131}I -iodierten Verbindung in den Tumor ($1,94 \pm 0,39$ % ID/g vs. $1,38 \pm 0,34$ % ID/g) und auch andere Gewebe, ausser Magen und Schilddrüse, erhöht wurde. Dieses Verhalten wurde zum einen damit begründet, dass die höhere Konzentration an IBG die Übertragung der ^{131}I -iodierten Gruppe auf die MGMT begünstigte, da es sich hierbei um eine Reaktion 2. Ordnung handelt [94]. Zum anderen wurde die verringerte Aufnahme in Schilddrüse und Magen durch die verringerte Deiodierung des ^{131}I -iodierten Inhibitors wegen der generell höheren Konzentration an iodierter Substanz erklärt. Diese Befunde bestätigen die Vermutung, dass der fehlende Unterschied in der Aufnahme in MEX(+)- bzw. MEX(-)-Tumore der in dieser Arbeit untersuchten ^{131}I -iodierten MGMT-Inhibitoren in einer zu geringen Konzentration der radioaktiv markierten Substanz begründet liegen könnte. Da es sich bei einem MEX(+)-Xenograft nicht um einen auch im Menschen vorkommenden Tumor handelt, wurden desweiteren Untersuchungen mit einer Glioblastom-Zelllinie durchgeführt. Während für ^{131}I IBG die Aufnahme in das Glioblastom-Xenograft größer war als in den MEX(+)-Tumor ($1,16 \pm 0,12$ % ID/g vs. $0,83 \pm 0,04$ % ID/g), war das Verhalten bei ^{131}I IBGG umgekehrt ($0,28 \pm 0,02$ % ID/g vs. $0,34 \pm 0,02$ % ID/g). Das Tumor-Blut-Verhältnis war für ^{131}I IBG ($0,54 \pm 0,09$) und für ^{131}I IBGG ($0,50 \pm 0,02$) kaum unterschiedlich. Bei dieser Tumorart war die Tumoraufnahme für das Glucose-Konjugat deutlich schlechter als für das nicht-konjugierte Derivat. Daher konnte auch kein besseres Tumor-Blut-Verhältnis für ^{131}I IBGG im Vergleich zu ^{131}I IBG erhalten werden, wie es bei dem MEX(+)-Tumormodell der Fall war.

In den vorliegenden Versuchen zeigte sich, dass die Tumor-Absolutaufnahme unabhängig von der Tumorart für ^{131}I IBG höher war als für das Glucose-Konjugat ^{131}I IBGG, was die unterschiedlichen IC_{50} -Werte der beiden Inhibitoren reflektiert (siehe 5.2). Bei einem Vergleich zwischen einem MEX(+)-Tumor und einem Glioblastom konnte bei ^{131}I IBG eine erhöhte Aufnahme in das Glioblastom beobachtet werden, während es sich bei ^{131}I IBGG umgekehrt verhielt. Ein Unterschied in der Aufnahme von ^{131}I IBG in einen MEX(+)- im Vergleich zu einem MEX(-)-Tumor konnte nicht gesehen werden. Obwohl die Absolut-Tumoraufnahme für das Glucose-Konjugat ^{131}I IBGG niedriger war als für ^{131}I IBG wurde im MEX(+)-Tumormodell wegen der schnelleren Verteilung von ^{131}I IBGG aus dem Blut ein besseres Tumor-Blut-Verhältnis 0,5 h p.i. für dieses erhalten. Auch die *in vivo*-Deiodierung war für ^{131}I IBGG deutlich weniger ausgeprägt, ein weiterer Vorteil.

Tabellen mit den ermittelten Werten für die Tumor- und Organverteilung der beiden Inhibitoren ^{131}I IBG und ^{131}I IBGG, sowie weitere vergleichende Abbildungen der Biodistributionen der beiden Substanzen sind in Anhang C zu finden.

5.4.1.2 *Ex vivo*-Organ- und Tumorverteilung an tumortragenden Nacktmäusen nach Gabe von Phloretin

In *in vitro*-Essays wurde herausgefunden, dass sowohl [¹³¹I]IBG als auch [¹³¹I]IBGG, zumindest teilweise, über den Natrium-abhängigen Glucose-Transporter in die Zellen aufgenommen werden. Daher sollten Organ- und Tumorverteilungsstudien durchgeführt werden, bei denen den Nacktmäusen vor dem ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitor ein Hemmstoff dieses Glucose-Transporters injiziert wurde, um möglicher Weise die Aufnahme der ¹³¹I-iodierten Verbindungen zu vermindern. Ein solcher Hemmstoff ist Phloretin - ein Flavonoid. Es wurde 30 Minuten vor dem ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitor in die Schwanzvene injiziert. Die Bestimmung der Organverteilung wurde 1 h nach Injektion der ¹³¹I-iodierten Substanz vorgenommen, wobei 4 - 5 Mäuse pro Verbindung getestet wurden. Zur Kontrolle wurden pro Verbindung auch 4 Mäuse nur der ¹³¹I-iodierte Inhibitor appliziert. Alle Mäuse in diesen Experimenten trugen Glioblastom-Xenografte subkutan in der rechten Flanke.

In Abbildung 69 ist ein Vergleich der Organ- und Tumorverteilung von [¹³¹I]IBG bei mit Phloretin vorbehandelten Mäusen und solchen, die nur das ¹³¹I-iodierte Guanin-Derivat injiziert bekamen, dargestellt.

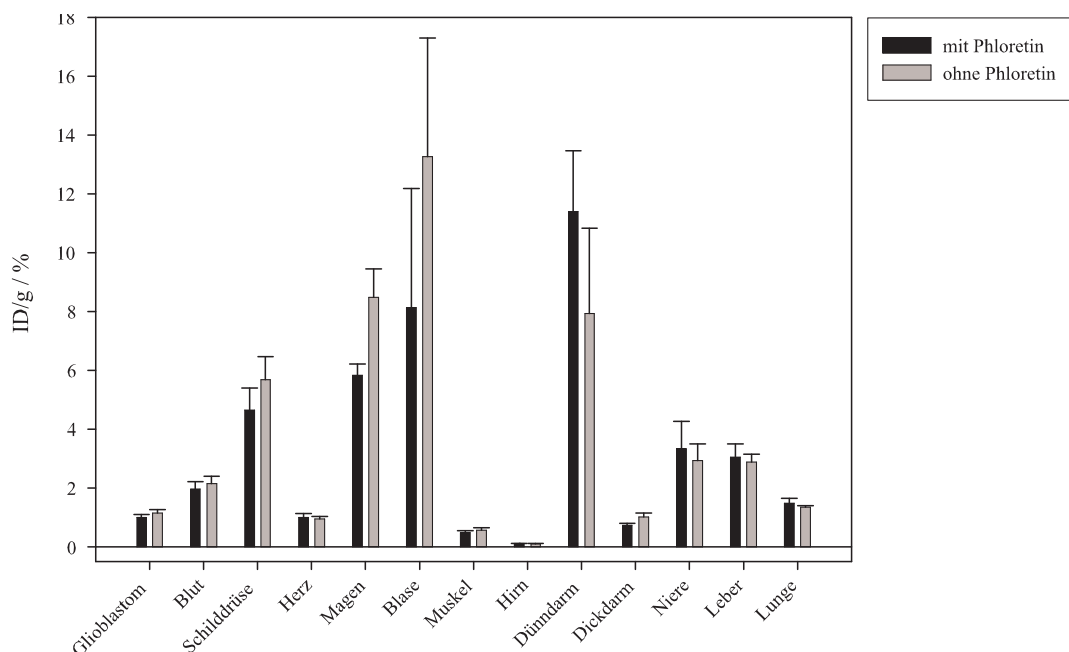


Abbildung 69: Vergleich der Tumor- und Organverteilung von [¹³¹I]IBG bei mit Phloretin behandelten Mäusen und Kontrollmäusen (1 h p.i.)

Wenn man die erhaltenen ¹³¹I-Verteilungen betrachtet, kann man bei den meisten Organen im Rahmen des Fehlers keinen Unterschied zwischen den mit Phloretin behandelten und den unbehandelten Mäusen feststellen. Die Aufnahme in den Tumor war zwar bei den mit Phloretin behandelten Mäusen geringer ($1,01 \pm 0,09$ % ID/g vs. $1,16 \pm 0,12$ % ID/g), doch die Unterschiede lagen im Rahmen der Fehlergrenze. Bei der Blase war auch ein Unterschied zu sehen, die Werte konnten prinzipiell jedoch nicht miteinander verglichen werden. Zur Bestimmung der Anreicherung von [¹³¹I]IBG im Urin wurde die komplette Blase der Mäuse entnommen. Da viele von ihnen kurz nach dem Tod uriniert hatten, konnte man keine verlässliche Aussage über die eigentlich im Urin vorhandene Aktivität erhalten, was auch in entsprechend großen Fehlern resultierte.

Lediglich bei Schilddrüse, Magen und eventuell Dickdarm kann von einer nenneswerten Beeinflussung der Organverteilung von [¹³¹I]IBG durch Phloretin gesprochen werden. Für Schilddrüse und

Magen ist dieses Resultat auch nicht erstaunlich, da bekannt ist, dass die 5-Iodthyronin-Deiodase durch Phloretin gehemmt wird [187]. Dadurch wird wohl auch weniger [¹³¹I]Iodid aus [¹³¹I]IBG freigesetzt, was die verringerte Aufnahme in die Schilddrüse und in den Magen, in den unspezifisch Iodid aufgenommen werden kann, erklärt. Die möglicher Weise verringerte Aufnahme von [¹³¹I]IBG in den Dickdarm kann nicht so leicht erklärt werden. Zwar erfolgt die Resorption von Phloretin bei einer oralen Gabe in Ratten über den Dünndarm [188], doch erstens wurde die Substanz i.v. injiziert und zweitens müsste man dann vor allen Dingen zunächst im Dünndarm einen Unterschied in der Aktivitätsakkumulation sehen. Im Dünndarm sah man jedoch, von den großen Fehlern abgesehen, eher den umgekehrten Trend, nämlich dass die Aufnahme von [¹³¹I]IBG durch Phloretin verstärkt wurde.

Das Experiment mit der Gabe von [¹³¹I]IBGG bei mit Phloretin vorbehandelten und bei unbehandelten Mäusen ist in Abbildung 70 zusammengefasst.

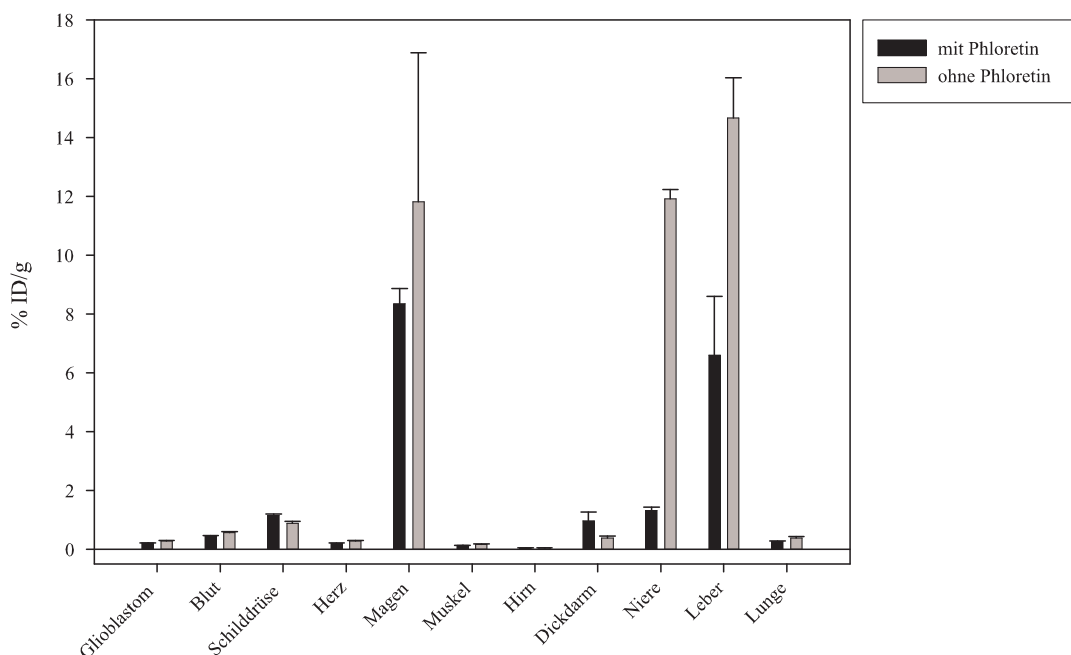


Abbildung 70: Vergleich der Tumor- und Organverteilung von [¹³¹I]IBGG bei mit Phloretin behandelten Mäusen und Kontrollmäusen

Die Aktivitätsakkumulation im Dünndarm war bei allen Mäusen sehr hoch, über 100 % ID/g. Generell wurde bei [¹³¹I]IBGG in allen Versuchen eine große Akkumulation im Dünndarm beobachtet (etwa 16 % ID/g nach 1 h). Man konnte keinen Unterschied bei den mit Phloretin behandelten und den unbehandelten Mäusen erkennen.

In den meisten untersuchten Geweben konnte auch bei [¹³¹I]IBGG im Rahmen des Fehlers kein Unterschied zwischen behandelter und Kontrollmaus beobachtet werden. Bei der Tumoraufnahme fiel der Unterschied noch geringer aus als bei [¹³¹I]IBG, was durchaus durch die sehr geringe Tumoraufnahme überhaupt von $0,22 \pm 0,01$ % ID/g (mit Phloretin) bzw. $0,28 \pm 0,02$ % ID/g (Kontrolle) erklärt werden kann. Einen definitiven Effekt durch Phloretin bei der Organverteilung konnte in Nieren, Leber und auch im Magen beobachtet werden. Die verringerte Aufnahme im Magen wurde schon oben erläutert. In diesem Fall konnte kein Einfluss auf die Aufnahme in die Schilddrüse gesehen werden, es wurde bei Behandlung mit Phloretin sogar mehr [¹³¹I]Iodid akkumuliert als im Kontrollfall. Eine Erklärung für den geringen Unterschied könnte die generell viel geringere *in vivo*-Deiodierung von [¹³¹I]IBGG im Vergleich zu [¹³¹I]IBG sein.

Die deutlich verringerte Aufnahme von [¹³¹I]IBGG in die Nieren ($1,32 \pm 0,11$ % ID/g vs. $11,92 \pm 0,32$ % ID/g) kann durch die Interaktion von Phloretin mit den GLUT2-Transportern, die in der Niere vorhanden sind, erklärt werden [189]. Durch diese Interaktion kann eine vermehrte Glucose-Ausscheidung über den Urin erfolgen, da die Reabsorption der Glucose verringert wird [188]. Da allerdings die Aufnahme in die Nieren der Kontrollmäuse auch höher war als in den anderen Tierstudien mit [¹³¹I]IBGG, relativiert sich der Unterschied wieder, doch auch dort war die mittlere Aufnahme in die Nieren höher ($2,38 \pm 0,15$ % ID/g, siehe 5.4.1.1 und Anhang C) als bei den mit Phloretin behandelten Mäusen.

Sowohl bei [¹³¹I]IBG als auch bei [¹³¹I]IBGG konnte in der Tumoraufnahme kein Unterschied zwischen den mit Phloretin vorbehandelten und den unbehandelten Mäusen gesehen werden. Da die Aufnahme in die Tumore generell aber immer relativ gering war, war es nicht möglich innerhalb des Fehlerrahmens einen großen Effekt zu sehen. Bei Organen, in die generell mehr Aktivität aufgenommen wurde, konnte, zumindest teilweise, auch eine Beeinflussung der Aufnahme der ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitoren durch Phloretin beobachtet werden. Das unterschiedliche Verhalten dieser Beeinflussung auf die Verteilung von [¹³¹I]IBG bzw. [¹³¹I]IBGG liegt wahrscheinlich in den doch verschiedenen Aufnahmemechanismen der beiden MGMT-Inhibitoren begründet, die wohl nur zum Teil von den Natrium-abhängigen Glucose-Transportern bestimmt werden. Vielleicht hätte mit einer höheren Dosis Phloretin auch ein größerer Unterschied in der Aufnahme der ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitoren mit und ohne Gabe von Phloretin beobachtet werden können.

Tabellen mit den in diesen Experimenten ermittelten Werten für die ¹³¹I-Verteilung in den unterschiedlichen Geweben befinden sich in Anhang C.

5.4.2 *Ex vivo*-Tierstudien mit [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG

Die Aktivitäten der Iodothénylguanin-Derivate gegenüber MGMT waren zwar im Zellextrakt geringer als für die Iodbenzylguanin-Derivate, doch in intakten Zellen, die auch in *in vivo*- bzw. *ex vivo*-Tierexperimenten vorliegen, wurden für beide Verbindungen vergleichbare IC₅₀-Werte bestimmt (siehe 5.2). Daher wurden auch mit den ¹³¹I-iodierten Thénylguanin-Derivaten *ex vivo*-Tumor- und Organverteilungsstudien an Nacktmäusen, die subkutane MEX(+)- und MEX(-)-Tumore in den Flanken trugen, durchgeführt. Als Zeitpunkte wurden 0,5 h, 1 h und 4 h nach Injektion analog zu den Iodbenzylguanin-Derivaten gewählt.

In Abbildung 71 ist die ¹³¹I-Verteilung in den untersuchten Organen nach der Injektion von n.c.a. [¹³¹I]ITG dargestellt. Die Aufnahme von [¹³¹I]ITG in beide Tumore erreichte 1 h p.i. ein Maximum von $1,08 \pm 0,03$ % ID/g (MEX(+)) bzw. $1,07 \pm 0,04$ % ID/g (MEX(-)). Auch bei diesen beiden ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitoren konnte man keinen Unterschied zwischen MEX(+)- und MEX(-)-Tumor beobachten. Da die ¹³¹I-iodierten Substanzen aber wiederum n.c.a. injiziert wurden, konnte nicht die zur Sättigung der MGMT benötigte Konzentration an Inhibitor erreicht werden (siehe 5.4.1.1) und daraus resultierend auch kein Unterschied in der Aufnahme der beiden Tumore. Bei dieser Verbindung war die Aufnahme in die meisten normalen Gewebe nicht sehr viel höher als in den Tumor. So war z. B. die Leberaufnahme gering mit einem Maximum von $0,95 \pm 0,04$ % ID/g nach 30 Minuten. Dafür war jedoch die Akkumulation in Schilddrüse und Magen sehr hoch mit einem Maximum in der Schilddrüse von $8,72 \pm 0,47$ % ID/g nach 1 h, was auf eine sehr starke *in vivo*-Deiodierung dieses Guanin-Derivates schließen lässt. Wie schon erwähnt, ist ein solches Verhalten für einen potentiellen Radioliganden zur Bestimmung des MGMT-Status von Tumoren nicht günstig. Die Aufnahme von [¹³¹I]ITG ins Gehirn war, wie schon die von [¹³¹I]IBG, sehr gering mit einem Maximum von $0,14 \pm 0,002$ % ID/g nach 30 Minuten. Daraus kann man schließen, dass auch [¹³¹I]ITG die Blut-Hirn-Schranke nur sehr geringfügig durchdringen konnte. Ausser im Magen nahm die Anreicherung

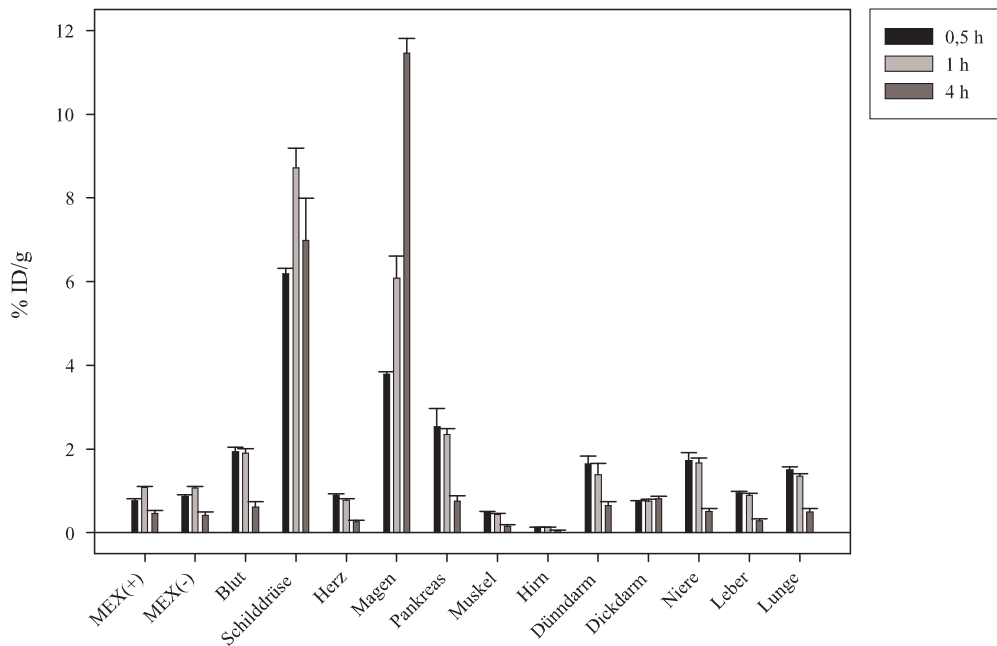


Abbildung 71: Kinetik der Tumor- und Organverteilung von $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$ bei Mäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren

der ^{131}I -iodierten Substanz in allen Geweben zum Zeitpunkt 4 h nach Injektion ab.

Die Ergebnisse des entsprechenden Versuches mit $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ sind in Abbildung 72 zusammengestellt.

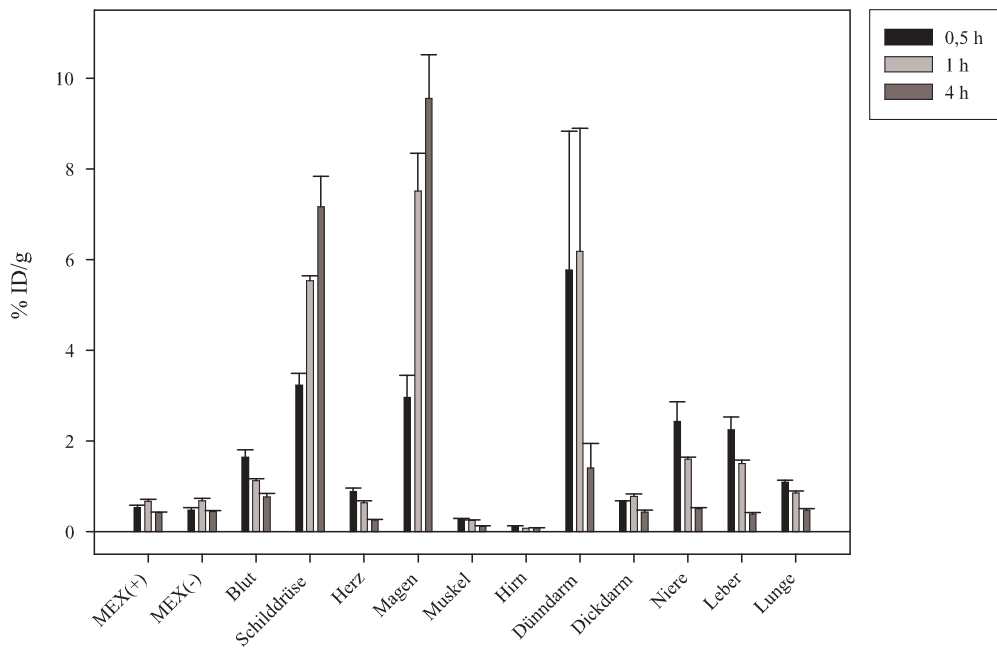


Abbildung 72: Kinetik der Tumor- und Organverteilung von $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ bei Mäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren

Wie schon bei den ^{131}I -iodierten Iodbenzylguanin-Derivaten beobachtet werden konnte, war die Tumoraufnahme des Glucose-Konjugates $[^{131}\text{I}]\text{ITGG}$ mit einem Maximum von $0,67 \pm 0,04$ % ID/g (MEX(+)) bzw. $0,68 \pm 0,05$ % ID/g (MEX(-)) nach 1 h geringer als die von $[^{131}\text{I}]\text{ITG}$. Auch bei

diesem MGMT-Inhibitor konnte kein Unterschied zwischen der Aufnahme in einen MEX(+)- und einen MEX(-)-Tumor beobachtet werden. Im Vergleich zu den Tumoren war die Akkumulation der ^{131}I -Aktivität in den meisten normalen Geweben relativ hoch, wie z. B. in Leber, Nieren und Dünndarm. Sie waren häufig höher als bei ^{131}I ITG. Die Aufnahme ins Gehirn war vergleichbar mit der von ^{131}I ITG und erreichte 30 Minuten nach Injektion ein Maximum von $0,12 \pm 0,01$ % ID/g. Auch diese Substanz war kaum in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen.

Bei Betrachtung der Anreicherung von ^{131}I Iodid in der Schilddrüse konnte, wie schon bei den ^{131}I -iodierten Iodbenzylguanin-Derivaten, beobachtet werden, dass das Glucose-Konjugat eine höhere *in vivo*-Stabilität aufwies (Abb. 73), so betrug z. B. die Anreicherung 1 h p.i. $5,53 \pm 0,11$ % ID/g vs. $8,72 \pm 0,47$ % ID/g.

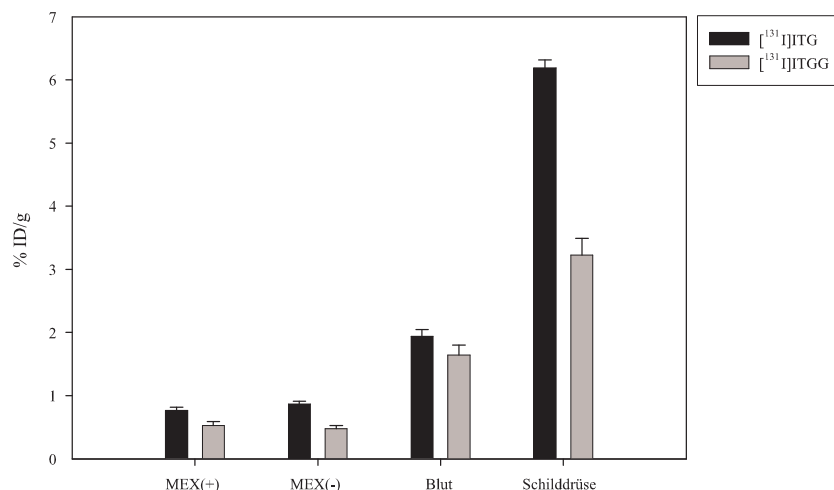


Abbildung 73: Vergleich der Verteilung von ^{131}I ITG und ^{131}I ITGG (0,5 h p.i.)

Auch die Aufnahme in den Magen war bei diesen beiden Verbindungen für das Glucose-Konjugat geringer. Da eine geringe *in vivo*-Deiodierung von Vorteil ist, wäre ^{131}I ITGG als potentiellm Tracer in diesem Vergleich der Vorzug gegenüber ^{131}I ITG zu geben. Die Verteilung von ^{131}I ITGG nach i.v.-Injektion aus dem Blut in die anderen Gewebe erfolgte allerdings nur geringfügig schneller als bei ^{131}I ITG. Daher konnte zu keinem untersuchten Zeitpunkt ein besseres Tumor-Blut-Verhältnis erreicht werden (Tab. 30).

Tabelle 30: Tumor-Blut-Verhältnisse (MEX(+)-Tumor) von ^{131}I ITG und ^{131}I ITGG

| Inhibitor | Tumor-Blut-Verhältnis | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | 0,5 h | 1 h | 4 h |
| ^{131}I ITGG | $0,32 \pm 0,03$ | $0,60 \pm 0,02$ | $0,55 \pm 0,02$ |
| ^{131}I ITG | $0,40 \pm 0,04$ | $0,57 \pm 0,04$ | $0,74 \pm 0,05$ |

Bei diesen Tumor-Blut-Verhältnissen konnte allerdings beobachtet werden, dass sie zu späteren Zeitpunkten besser wurden (^{131}I ITG) bzw. annähernd gleich blieben (^{131}I ITGG), was im Falle von ^{131}I IBGG nicht gesehen werden konnte.

Da die ^{131}I -Aufnahmen in die meisten Organe bei ^{131}I ITG nicht wesentlich höher waren als in die Tumore, wäre wahrscheinlich die Verwendung von ^{131}I ITG im Vergleich der Iodothénylguanin-Derivate günstiger.

Tabellen mit allen ermittelten Werten der Biodistributionen von ^{131}I ITG und ^{131}I ITGG, sowie weitere Abbildungen sind in Anhang D zu finden.

5.4.3 Vergleich der Biodistributionen der ^{131}I -iodierten Thyryl- mit den Benzylguanin-Derivaten

Nachdem sowohl die ^{131}I -iodierten Thyrylguanin- als auch die Benzylguanin-Derivate unter den gleichen Bedingungen getestet wurden, wurden die jeweiligen Verbindungen bezüglich ihrer Biodistribution verglichen. Die Aufnahme von ^{131}I]ITG bzw. ^{131}I]IBG in ausgewählte Gewebe 30 Minuten nach Injektion ist in Abbildung 74 dargestellt.

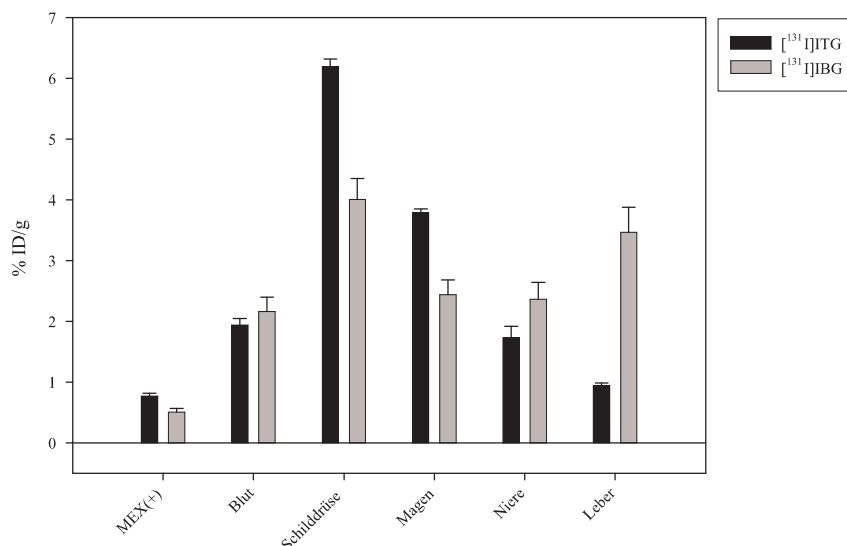


Abbildung 74: Vergleich der Verteilung von ^{131}I]ITG und ^{131}I]IBG in ausgewählten Organen (0,5 h p.i.)

Die Aufnahme von ^{131}I]ITG in den MEX(+)-Tumor ist höher als die von ^{131}I]IBG. Zusammen mit der etwas schnelleren Verteilung der Aktivität aus dem Blut ergibt sich somit ein besseres Tumor-Blut-Verhältnis für das ^{131}I -iodierte Thyrylguanin-Derivat von 0,40 vs. 0,24. Dieser Trend bestätigt sich bei allen untersuchten Zeitpunkten. Auch die Aufnahme in die Nieren und in die Leber ist für ^{131}I]ITG geringer. Dahingegen ist jedoch die *in vivo*-Deiodierung stärker, was in der höheren ^{131}I]Iodid-Aufnahme in Schilddrüse und auch den Magen zu erkennen ist. Diese größere Instabilität der Iodothyryl- gegenüber der Iodbenzylguanin-Derivate wurde schon in den Stabilitätsbetrachtungen der ^{131}I -iodierten Verbindungen erkennbar (siehe 4.6). Da es für einen potentiellen Radiotracer wichtig ist, dass möglichst wenig Deiodierung des Moleküls stattfindet, wurde ^{131}I]IBG der Vorzug für weitere Tierstudien gegeben.

Der entsprechende Vergleich für die Glucose-Konjugate ^{131}I]ITGG und ^{131}I]IBGG ist in Abbildung 75 aufgeführt. Die Aufnahme von ^{131}I]ITGG in den MEX(+)-Tumor ist etwas höher als bei ^{131}I]IBGG. Da die Verteilung aus dem Blut für ^{131}I]ITGG aber deutlich langsamer ist als für das entsprechende Iodbenzylguanin-Derivat, resultiert ein wesentlich schlechteres Tumor-Blut-Verhältnis von 0,32 vs. 0,76 nach 30 Minuten. Auch bei den anderen untersuchten Zeitpunkten ist dieses Verhältnis für ^{131}I]ITGG immer deutlich schlechter. Nachteilig für ^{131}I]ITGG wirkt sich zudem die verstärkte Aufnahme von ^{131}I]Iodid in die Schilddrüse aus, die auch in diesem Fall die schon zuvor beobachteten größeren Instabilitäten der Iodothyrylguanin-Derivate bestätigen. Die Akkumulation in Leber und Nieren ist für ^{131}I]ITGG günstiger als für ^{131}I]IBGG. Wenn man diese Fakten vergleicht, handelt es sich bei ^{131}I]IBGG definitiv um die wesentlich geeignetere Verbindung für einen Einsatz in weiteren *in vivo*-Experimenten.

Bei Betrachtung der IC_{50} -Werte der MGMT-Inhibitoren fällt auf, dass die unterschiedlichen Tumoraufnahmen größtenteils gut erklärt werden können. Bei einem Vergleich der jeweiligen nicht-konjugierten Guanin-Derivate mit ihren Glucose-Konjugaten reflektiert sich die Aktivität der Inhi-

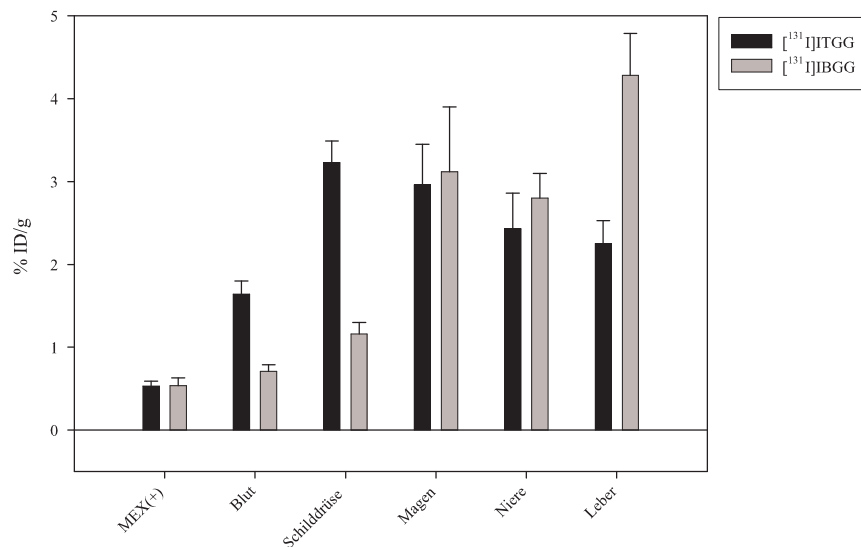


Abbildung 75: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]ITGG und [¹³¹I]IBGG in ausgewählten Organen (0,5 h p.i.)

bitoren gegenüber MGMT. Sowohl die Tumoraufnahme als auch die Aktivität gegenüber MGMT sind für die nicht-konjugierten Derivate besser als für die glycosylierten Inhibitoren. Auch bei einem Vergleich von ITGG mit IBGG zeigt sich der Trend der IC₅₀-Werte. So sind die *in vivo*-IC₅₀-Wert von ITGG und IBGG fast identisch (360 vs. 400 nM) und die Tumoraufnahme ist praktisch gleich (0,53 ± 0,06 vs. 0,54 ± 0,10 % ID/g). Wenn man allerdings die nicht-konjugierten Guanin-Derivate untereinander vergleicht, würde man anhand der IC₅₀-Werte erwarten, dass die Aufnahme von ITG in den Tumor schlechter ist als die von IBG, da ITG einen *in vivo*-IC₅₀-Wert von 50 nM besitzt und IBG einen von 20 nM. In den Tumor hingegen wird jedoch 0,5 h p.i. 0,77 ± 0,05 % ID/g [¹³¹I]ITG und nur 0,51 ± 0,06 % ID/g [¹³¹I]IBG aufgenommen.

Auf Grund der Ergebnisse wurden für alle weiteren Tierstudien, die nach dem Zeitpunkt dieses Vergleichs noch durchgeführt werden sollten, wie z. B. die Untersuchung mit dem Hemmstoff Phloretin oder die Kleintier-SPECT-Untersuchungen, die Iodbenzylguanin-Derivate verwendet.

5.4.4 *In vivo*-SPECT-Tierstudien mit [^{123}I]IBG und [^{123}I]IBGG

Mit den MGMT-Inhibitoren [^{123}I]IBG und [^{123}I]IBGG wurden *in vivo*-SPECT-Untersuchungen an einer Kleintier-SPECT-Kamera durchgeführt. Bei der SPECT-Kamera handelte es sich um eine kombinierte PET- und SPECT-Kamera - den YAP-(S)PET-Kleintierscanner der Firma ISE (Abb. 76, [190]).

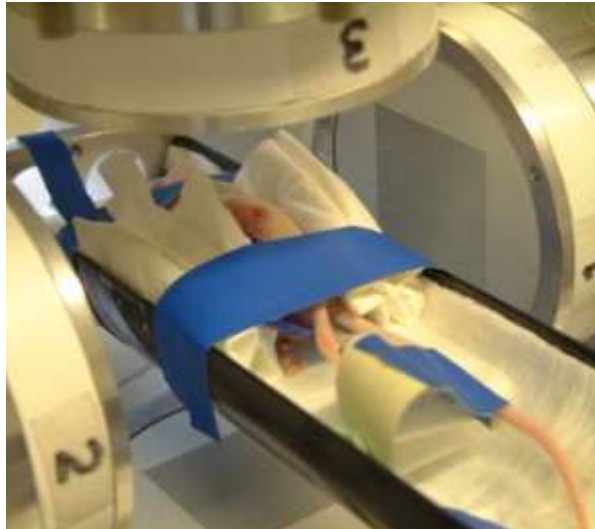


Abbildung 76: Bild des ISE YAP-(S)PET-Scanners mit Nacktmaus, der [^{123}I]IBG injiziert worden war

Für die Nutzung der Kamera im SPECT-Modus wurden auf die Detektoren Kollimatoren aus Blei aufgebracht.

Pro Verbindung wurden jeweils 2 Nacktmäuse, die subkutan einen MEX(+)-Tumor in der linken Flanke und einen MEX(-)-Tumor in der rechten Flanke trugen, untersucht. Während der gesamten Untersuchung waren die Mäuse mittels eines intraperitonealen Zugangs mit KetanestTM narkotisiert. Zunächst wurden dynamische Messungen der Tumorregion durchgeführt und im Anschluss daran ein Ganzkörperscan. Da das Messfenster der Kamera einen Bereich von 4×4 cm umfasst, wurden hierfür zwei Messpositionen verwendet. Bei den Mäusen, denen [^{123}I]IBGG injiziert worden war, wurde nach der SPECT-Untersuchung noch die *ex vivo*-Tumor- und Organverteilung an ausgewählten Geweben bestimmt.

Für die Kalibration des Scanners wurde ein planares Phantom mit einer [^{123}I]Iodid-Lösung bekannter Aktivität gemessen. Es zeigte sich, dass die höherenergetischen γ -Linien (> 500 keV) von Iod-123, die zwar nur mit sehr geringen Häufigkeiten < 1 % vorkommen [5], von den verwendeten Bleikollimatoren vor den Detektoren im Gegensatz zu der niederenergetischeren Strahlung nicht zurückgehalten werden, weswegen sich ihre Wirkung potenziert. Desweiteren treten durch eine Wechselwirkung der niederenergetischen γ -Strahlen des Iod-123 mit den Bleikollimatoren drei weitere γ -Peaks bei 57, 85 und 191 keV auf. Ein mit der SPECT-Kamera aufgenommenes Energiespektrum zeigt Abbildung 77.

Durch diese Effekte wurden die Energiekalibrationsspektren für die einzelnen Detektorkristalle so kompliziert, dass eine Auswertung und nachfolgende Kalibration der Kamera bislang unmöglich war. Durch die fehlende Kalibration ist zwar keine Quantifizierung der Daten möglich und die SPECT-Bilder enthalten Artefakte, doch qualitative Aussagen können dennoch gemacht werden.

Ein Schnittbild einer SPECT-Aufnahme von einer der beiden Mäuse, denen [^{123}I]IBG injiziert worden war, ist in Abbildung 78 dargestellt. Auf Grund der Größe des Messfensters lag die Maus während der Messung auf der rechten Seite. Das Bild wurde aus einer 3D-Projektion des dynamischen Scans der Tumorregion entnommen. In Richtung der oberen Bildkante lag der Kopf der Maus. Relativ mit-

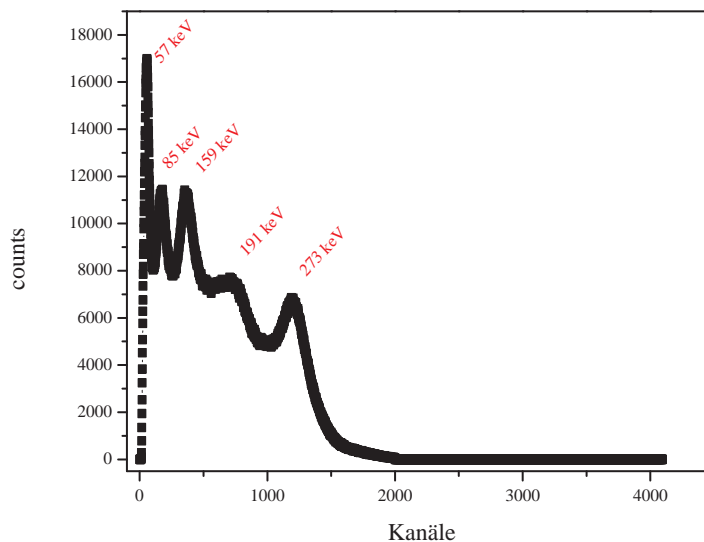


Abbildung 77: Mit der SPECT-Kamera aufgenommenes Energiespektrum einer [^{123}I]Iodid-Lösung

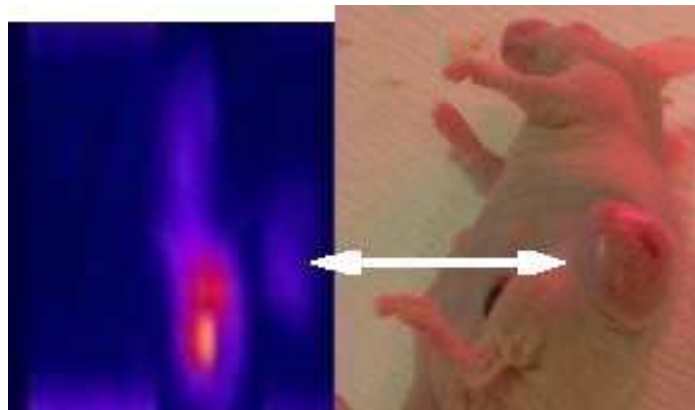


Abbildung 78: Schnittbild einer mit [^{123}I]IBG injizierten Maus (etwa 1 h p.i.); der Pfeil kennzeichnet die Stelle des Tumors

tig im unteren Teil des Bildes kann man sehr gut die Blase der Maus erkennen und etwas darüber die Nieren. Weiter ausserhalb kann man eine deutlich geringere Aktivitätsanreicherung sehen, die von der Lage her dem MEX(+)-Tumor der Maus entspricht. Dieser Tumor befand sich während der Messung oberhalb des sonstigen Körpers der Maus. Auf Grund der Positionierung der Maus war der MEX(-)-Tumor, der auf der Unterseite der Maus lokalisiert war, nicht zu erkennen. Die Aktivitätsansammlungen im oberen mittigen Teil des Bildes stammen vom Gastrointestinaltrakt. Die Schilddrüse kann auf diesem Schnittbild nicht gesehen werden, da sie ausserhalb des Messfensters lag, wohingegen sie im Ganzkörperscan deutlich beobachtet wurde.

In einem weiteren Versuch wurde zwei Mäusen [^{123}I]IBGG injiziert. Ein Schnittbild aus dem dynamischen Scan der Tumorregion einer der beiden Mäuse ist in Abbildung 79 zu sehen.

Auch dieses Bild stammt aus einer 3D-Projektion der SPECT-Aufnahme. Die Maus liegt wiederum auf der rechten Seite, so dass sich der MEX(+)-Tumor oberhalb der Maus befindet und sie auf dem MEX(-)-Tumor liegt. Der Kopf der Maus befindet sich Richtung oberer Bildrand. Auch hier ist die sehr hohe Aktivitätsakkumulation in der Blase der Maus zu erkennen. Die Nieren und der Gastrointestinaltrakt sind auch zu sehen, jedoch nicht so gut abgegrenzt wie bei [^{123}I]IBG. Etwas weiter ausserhalb kann eine deutlich geringere Aktivitätsanreicherung beobachtet werden, die von der Lage her dem MEX(+)-Tumor entspricht. Auch bei dieser Verbindung konnte der MEX(-)-Tumor auf

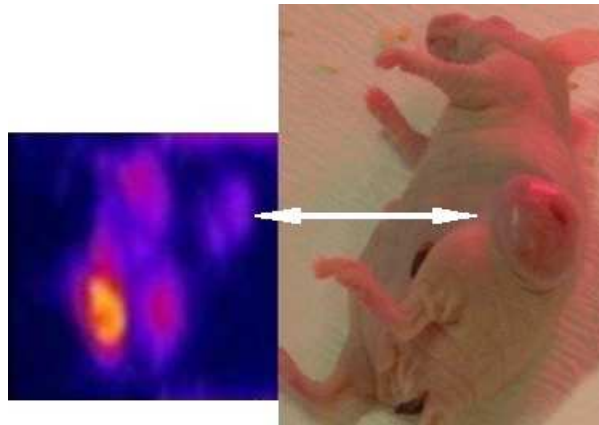


Abbildung 79: Schnittbild einer mit $[^{123}\text{I}]\text{IBGG}$ injizierten Maus (etwa 1 h p.i.); der Pfeil kennzeichnet die Stelle des Tumors

Grund der Liegeposition der Maus nicht erkannt werden. Bei der Ganzkörpermessung konnte die Schilddrüse erkannt werden, die bei dem vorliegenden Bild ausserhalb des Messfensters lag.

Nach der SPECT-Untersuchung wurde von diesen beiden Mäusen die *ex vivo*-Organverteilung von ausgewählten Geweben bestimmt, der Todeszeitpunkt lag zwischen 3,5 und 4 h nach Injektion. In Abbildung 80 ist ein Vergleich der mit $[^{123}\text{I}]\text{IBGG}$ und der mit $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ 4 h p.i. erhaltenen Biodistributionen dargestellt.

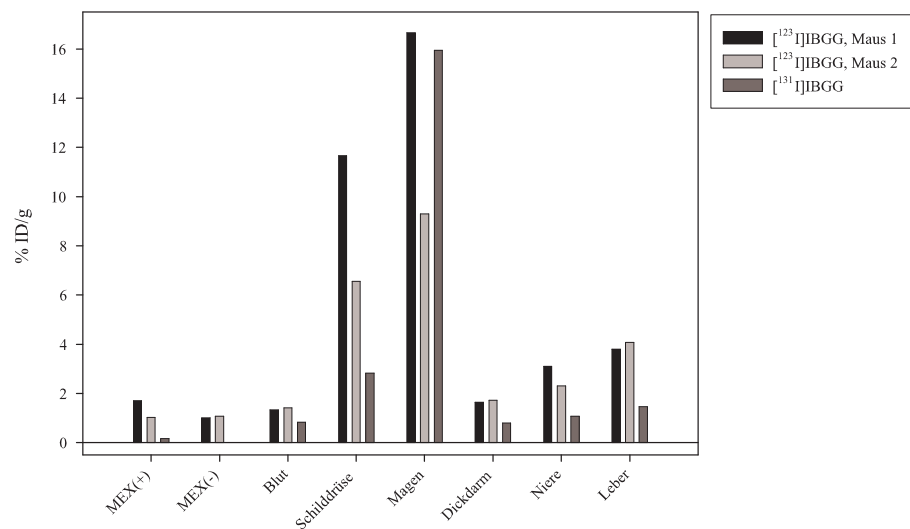


Abbildung 80: Vergleich der Verteilung von $[^{123}\text{I}]\text{IBGG}$ und $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ in ausgewählten Organen etwa 4 h p.i.

Die erhaltenen Werte sind beim Einsatz von $[^{123}\text{I}]\text{IBGG}$ teilweise sehr unterschiedlich zu den mit $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ gefundenen. So ist in allen Geweben, ausser im Magen von Maus 2, eine größere Aktivitätsakkumulation zu sehen als bei den Mäusen mit $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die $[^{123}\text{I}]\text{IBGG}$ -Mäuse während der ganzen Zeit, in der die radioaktive Substanz im Körper war, mit KetanestTM narkotisiert waren. Die $[^{131}\text{I}]\text{IBGG}$ -Mäuse hingegen wurden nur zur Injektion der radioaktiven Substanz betäubt und waren nach etwa 30 Minuten wieder wach. Der Metabolismus und die Ausscheidung der radioaktiven Verbindung der narkotisierten Mäuse schien langsamer zu sein als bei den wachen Mäusen. Daher waren die Aktivitätsakkumulationen nach der gleichen Zeit der Injektion bei diesen Mäusen noch höher. Die Anreicherungen in den Tumoren waren bei den SPECT-Mäusen

jedoch deutlich höher als bei den mit [^{131}I]IBGG untersuchten, egal zu welchem Zeitpunkt. Da die Tumore bei den meisten Mäusen immer relativ groß waren und die ID/g verglichen wurden, können die errechneten Anreicherungen geringer sein als im Vergleich mit kleineren Tumoren. Ausserdem besteht bei größeren Tumoren eher die Wahrscheinlichkeit, dass sie teilweise nekrotisch sind als bei kleineren. Die Tumore der SPECT-Mäuse waren im Vergleich kleiner als die der sonst untersuchten Mäuse. Deshalb war die Tumoraufnahme von [^{123}I]IBGG wohl größer als sonst beobachtet. Bei den SPECT-Mäusen wurde zusätzlich auch der Urin auf seine Aktivitätsanreicherung hin untersucht. Da beide Mäuse nicht direkt nach ihrem Tod urinierten, konnte nur der Urin und nicht die ganze Blase entnommen werden. Die Anreicherung von [^{123}I]IBGG bzw. seinen radioaktiven Abbauprodukten lag zwischen 60 und 140 % ID/g nach etwa 4 h, was dafür spricht, dass die Ausscheidung der Substanz überwiegend renal erfolgte.

Bei einem Vergleich der mit den Substanzen [^{123}I]IBG und [^{123}I]IBGG erhaltenen SPECT-Bildern konnte man keinen Vorteil bei der Verwendung von [^{123}I]IBGG erkennen. Da die Qualität der Aufnahmen aber wegen der mangelnden Kalibration nicht gut ist, sollte man die erhaltenen Bilder nicht zu überbewerten.

Eine Tabelle mit der Biodistribution von [^{123}I]IBGG befindet sich in Anhang E.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Die dünnenschichtchromatographischen Analysen wurden auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Firma Merck durchgeführt, wobei die Detektion im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm oder durch Anfärben mit Iod erfolgte.

Für die säulenchromatographischen Trennungen wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0,040-0,063 mm) der Firma Merck verwendet.

Zur Erzeugung eines Hochvakuums wurde eine Drehschieberpumpe RZ 5 der Firma VACUUBRAND benutzt, das Vakuum betrug etwa 1×10^{-3} mbar.

Die Charakterisierung der inaktiven synthetisierten Substanzen erfolgte mittels ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und/oder ¹¹⁹Sn-NMR-Spektroskopie. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten mittels FD- oder ESI-Technik. Die radioaktiven Verbindungen wurden durch Radio-DC und Radio-HPLC charakterisiert.

Die folgenden Geräte wurden verwendet:

- **¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und ¹¹⁹Sn-NMR-Spektroskopie:**
300-MHz-FT-NMR Spektrometer, AC 300 (Bruker Analytik GmbH)
400-MHz-FT-NMR Spektrometer, DRX 400 (Bruker Analytik GmbH)
Lösungsmittel: DMSO-d₆, CDCl₃, D₂O
- **FD-Massenspektrometrie:**
MAT90-Spektrometer (Finnigan)
- **ESI-Massenspektrometrie:**
Navigator (ThermoQuest); Proben: 0,1 mg/mL in Acetonitril
- **HPLC-System I:**
Pumpe: Waters 1525 binäre HPLC-Pumpe
UV-Detektor: Waters 2487 dual wavelength absorbance detector (254 nm)
Aktivitätsdetektor: NaI(Tl)-Detektor M2102 (Messelektronik Dresden)
Injektionsventil: Rheodyne, Typ 8125
Software: Breeze (Waters)
- **HPLC-System II:**
Pumpe: Dionex P680A HPLC-Pumpe
UV-Detektor: Dionex UVD170U (254 nm)
Aktivitätsdetektor: NaI(Tl)-Detektor GABI (Raytest)
Injektionsventil: Dionex P680
Software: CM-PCS-1 (Dionex), GINA STAR (Raytest)
- **HPLC-System III:**
Pumpe: Sykam S1100
UV-Detektor: Sykam S3200 (254 nm)
Injektionsventil: RH9010
Software: Axxiom Chromatographie Datensystem Pyramid (Sykam)
- **HPLC-Säulen:**
LiChrospher 100 RP 18 5μ EC (250 × 4 mm), CS-Chromatographie Service GmbH, Flussrate: 1 mL/min
SDV 10000 10μ (125 × 4 mm), Polymer Standards Service GmbH, Flussrate: 0,5 mL/min

- **Radioaktivitätsdetektion (DC):**
Instant Imager (Packard Canberra), Software: InstantImager (Packard Canberra)
- **Radioaktivitätsdetektion (Organe):**
Germanium-Detektor-System (Ortec), Software: GammaVision 5.0 (Ortec)

Die verwendeten Chemikalien wurden vor Gebrauch nicht weiter gereinigt. Trockene Lösungsmittel wurden über Molekularsieb aufbewahrt. Tabelle 31 gibt einen Überblick über die am häufigsten benutzten Chemikalien.

Tabelle 31: Reinheitsgrade und Lieferanten der wichtigsten Chemikalien

| Chemikalie | Reinheitsgrad / % | Hersteller |
|--|-------------------|------------------|
| Aceton | reinst | Riedel-de Haën |
| 2-Amino-6-chlorpurin | 97 | Aldrich |
| Benzoylchlorid | > 99,5 | Fluka |
| Bis-(trifluoracetoxy)-iodbenzol | 97 | Aldrich |
| Bortrifluorid-etherat | purum | Fluka |
| 3-Brombenzylalkohol | > 98 | Merck |
| 1-Bromoctanol | > 97 | Fluka |
| 1-Brom-2,3,4,6,-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid | - | Aldrich |
| 4-Bromthiophen-2-aldehyd | 90 | Acros Organics |
| 5-Bromthiophen-2-carbaldehyd | > 95 | Aldrich |
| Bromwasserstoff in Eisessig | 45 | Lancaster |
| Chloramin T | p.a. | Fluka |
| Chloroform | p.a. | Merck |
| Chloroform-d ₁ | 99,8 | Deutero |
| Deuteriumoxid | 99,9 | Deutero |
| 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) | 98 | Aldrich |
| 1,2-Dichlorethan | p.a. | Merck |
| Dichlormethan | zur Synthese | Merck |
| Dichlormethan | absolut | Fluka |
| Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid | 15 % Pd | Acros Organics |
| Diethylether | p.a. | Fisher Chemicals |
| 4-(Dimethylamino)-pyridin | > 98 | Fluka |
| Dimethylformamid (DMF) | \geq 99,5 | Fluka |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | \geq 99 | Fluka |
| Dimethylsulfoxid-d ₆ | \geq 99,8 | Deutero |
| Dioxan | absolut | Fluka |
| Dowex 50 WX 2 | - | Fluka |
| Essigsäure | 100 | Merck |
| Essigsäureethylester | > 99 | Fluka |
| Ethanol | absolut | Merck |
| D-(+)-Glucose-Monohydrat | \geq 99 | Fluka |
| Hexabutyldistannan | > 95 | Fluka |
| n-Hexan | 96 | Merck |
| Iod | 99,9 | Aldrich |
| 3-Iodbenzylalkohol | 99 | Aldrich |
| Iodogen | - | Sigma |
| 2-Iodothiophen | \geq 98 | Fluka |

| Chemikalie | Reinheitsgrad / % | Hersteller |
|---|-------------------|----------------|
| Isopropanol | p.a. | Merck |
| Lithiumhydrid | 97 | Merck |
| Methanol | p.a. | Riedel-de Haën |
| Methanol | absolut | Fluka |
| Natriumborhydrid | 98 | Acros Organics |
| Natriumchlorid | zur Analyse | Merck |
| Natriumhydrid, Suspension | 60 | Merck |
| Natriumiodid | reinst | Merck |
| Nitromethan | > 99 | Fluka |
| Phosphorylchlorid | ≥ 99 | Merck |
| Puffertabletten, pH 7,0 | - | Fluka |
| Pyridin | > 99 | Merck |
| Quecksilberoxid, gelb | 99+ | Aldrich |
| Silberphosphat | 98 | Aldrich |
| Silbertriflat | > 99 | Aldrich |
| Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) | 1 M, THF | Fluka |
| Tetrachlorkohlenstoff | p.a. | Riedel-de Haën |
| Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0) | 99 | Aldrich |
| Thiophen-2-methanol | ≥ 98 | Fluka |
| Toluol | p.a. | Acros Organics |
| 2,2,2-Trichloracetonitril | 98 | Aldrich |
| Triethylamin | ≥ 99,5 | Fluka |
| Trimethylamin-Lösung | 4,2 M, Ethanol | Fluka |
| 2-Trimethylsilylethoxymethylchlorid | ≥ 95 | Fluka |
| Trimethylsilyltriflat (TMSO-triflat) | > 99 | Fluka |
| Zinntetrachlorid, rauchend | ≥ 98 | Fluka |

Die Radioiodierungen mit Iod-131 wurden mit einer Natrium^[131I]iodidlösung in verdünnter Natronlauge (pH 7-11) der Firma Amersham Biosciences, Braunschweig, (IBS.30) durchgeführt. Je nach Verwendungszweck der radioiodierten Verbindungen wurde eine Charge ^[131I]Iodid mit 185 MBq (Volumen 120 µL) oder 370 MBq (Volumen 50 µL) verwendet. Die Radioiodierungen mit Iod-123 wurden mit einer Natrium^[123I]iodidlösung (pH 12-13) der Firma ZAG - Zyklotron AG, Karlsruhe, durchgeführt. Die Gesamtaktivität der Lösung betrug etwa 2,3 GBq, das Volumen schwankte zwischen 50 - 210 µL.

6.2 Erläuterungen zu den NMR-Spektren

Bei den Zuordnungen der chemischen Verschiebungen in den NMR-Spektren wurden folgende Abkürzungen benutzt:

- **H bzw. C:** entsprechendes Atom bei einfachen Verbindungen
- **G:** Atome am Guaningerüst
- **R:** Atome am Rest, der an die O⁶-Position des Guanins geknüpft ist
- funktionelle Gruppen entsprechend ihrer üblichen Abkürzungen
- **S:** Atome des Silylrestes
- **Bzl:** Schutzgruppe an den Zuckerhydroxylgruppen
- **A:** Alkylgruppen des Zuckerlinkers
- **Glu:** Atome des Glucoserestes
- **B:** Atome des Tributylstannylrestes.

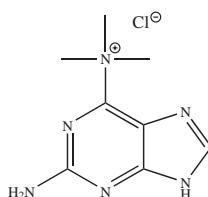
Die Aufspaltung der Signale in den ¹H-NMR-Spektren wurde mit den üblichen Abkürzungen angegeben:

- **s:** Singulett
- **d:** Dublett
- **t:** Triplet
- **dd:** Dublett vom Dublett.

Bei den Glucose-Konjugaten wurde zusätzlich auch die Kopplungskonstante ³J zwischen H-1 und H-2 der Glucose angegeben.

6.3 Darstellung der nicht Glucose-konjugierten Verbindungen

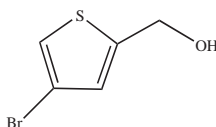
6.3.1 (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid



Durch Erwärmen und Ultraschallbehandlung wurden 7,15 g 2-Amino-6-chlorpurin (40,1 mmol) in 54 mL trockenem DMSO gelöst. Zu der klaren Lösung wurden nach Abkühlen auf Raumtemperatur 10,8 mL 4,2 M-Trimethylamin-Lösung in Ethanol (42,5 mmol) zugetropft. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurden ein zweites Mal 10,8 mL der TMA-Lösung zugetropft. Die Reaktion wurde nach 42 h beendet, der ausgefallene weiße Niederschlag abfiltriert, mit Essigester und Diethylether gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 90 % (8,23 g, 48,6 mmol).

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): (δ / ppm) 8,11 (s, 1H, G-8), 3,82 (s, 9H, CH₃)

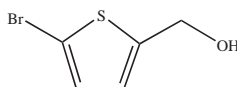
6.3.2 4-Bromothiophenylalkohol



In 160 mL iso-Propanol wurden 11,62 g 4-Bromthiophen-2-aldehyd (60,5 mmol) gelöst und 2,81 g Natriumborhydrid (73,9 mmol) zugegeben. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mL Wasser beendet und ein hierbei entstandener, flockiger Niederschlag abfiltriert. Dem Filtrat wurden 100 mL Wasser zugesetzt und das Rohprodukt wurde mit 400 mL n-Hexan extrahiert. Die gelbe organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde destilliert (109 °C, $1,7 \times 10^{-2}$ mbar), wobei eine farblose Flüssigkeit erhalten wurde, die bei 5 °C auskristallisierte. Die Ausbeute betrug 47 % (5,51 g, 28,5 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 7,21 (s, 1H, H-5), 6,93 (s, 1H, H-3), 4,81 (s, 2H, H-6), 2,02 (s, 1H, OH)

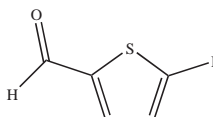
6.3.3 5-Bromothiophenylalkohol



Analog der Reduktion zu 4-Bromothiophenylalkohol wurden 12,51 g 5-Bromthiophen-2-carbaldehyd (65 mmol) mit 3,02 g Natriumborhydrid (79,5 mmol) umgesetzt. Die Aufarbeitung erfolgte analog, wobei bei der Destillation (110 °C, $5,5 \times 10^{-2}$ mbar) kein sauberes Produkt erhalten werden konnte. Daher wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Essigester:n-Hexan, 2:1, $R_f = 0,45$). Es wurde eine orange Flüssigkeit in 58 % Ausbeute (7,3 g, 37,8 mmol) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 6,92 (d, 1H, H-4), 6,73 (d, 1H, H-3), 4,75 (s, 2H, H-6), 2,51 (s, 1H, OH)

6.3.4 5-Iodthiophen-2-carbaldehyd

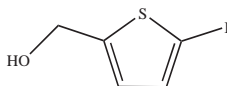


Nach Erhitzen von 7,43 g Phosphorylchlorid (48,4 mmol) auf 93 °C wurde eine Mischung von 10,30 g 2-Iodothiophen (49 mmol) und 3,8 mL DMF (49,5 mmol) zugetropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 1 h bei 103 °C gerührt und nach Abkühlen auf 50 g Eis gegeben. Die Mischung wurde mit 100 mL 1 M Natronlauge neutralisiert und das Rohprodukt mit 400 mL Chloroform extrahiert. Nach Adsorption auf Kieselgel erfolgte die Aufreinigung säulenchromatographisch (n-Hexan:Essigester, 6:1, $R_f = 0,40$), wobei ein bräunlicher Feststoff erhalten wurde. Die Ausbeute betrug 39 % (4,57 g, 19,2 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 9,81 (s, 1H, Carbonyl), 7,82 (m, 1H, H-2), 7,22 (d, 1H, H-3)

FD-MS: (m/z, % rel. Int.) 239,0 (100) $[\text{M}]^+$, 113,2 (1,6) $[\text{M-I}]^+$

6.3.5 5-Iodothienylalkohol aus Reduktion des Aldehyds



Analog der Reduktion zu den Bromothenylalkoholen wurden 4,57 g 5-Iodthiophen-2-carbaldehyd (19,2 mmol) in 56 mL iso-Propanol gelöst. Nach Zugabe von 0,80 g Natriumborhydrid (21 mmol) wurde die Mischung für 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor die Reaktion durch Zusatz von 5 mL Wasser beendet wurde. Das Rohprodukt wurde mit 300 mL n-Hexan extrahiert, Kieselgel zugegeben und durch Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum auf dem Kieselgel adsorbiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (n-Hexan:Essigester, 6:1, $R_f = 0,18$) betrug die Ausbeute einer braunen Flüssigkeit 73 % (3,35 g, 14 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 7,12 (d, 1H, H-3), 6,63 (d, 1H, H-4), 4,65 (s, 2H, H-6), 2,20 (s, 1H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 150,08 (C-2), 136,60 (C-4), 126,86 (C-3), 73,25 (C-5), 59,61 (C-6)

FD-MS: (m/z, % rel. Int.) 241,5 (100) $[\text{M}]^+$, 115,3 (1) $[\text{M-I}]^+$

6.3.6 5-Iodothienylalkohol mit Bis-(trifluoracetoxy)iodbenzol-Iod-System

Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden 2,51 g Thienylalkohol (21,9 mmol) in 27 mL Tetrachlorkohlenstoff gelöst und 2,77 g Iod (21,8 mmol) und 5,11 g Bis-(trifluoracetoxy)iodbenzol (11,9 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Nach Adsorption auf Kieselgel wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (n-Hexan:Essigester, 6:1, $R_f = 0,22$) gereinigt, wobei eine braune Flüssigkeit erhalten wurde. Die Ausbeute betrug 9 % (0,49 g, 2 mmol).

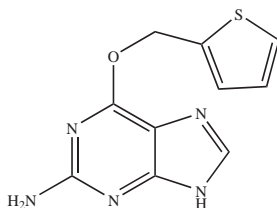
NMR- und Massendaten siehe 6.3.5

6.3.7 5-Iodothienylalkohol mit Quecksilberoxid

Zu einer Lösung von 5,10 g Thienylalkohol (44,5 mmol) in 30 mL Toluol wurden abwechselnd insgesamt 12,01 g Iod (47,3 mmol) und 10,02 g gelbes Quecksilberoxid (46,2 mmol) in kleinen Portionen zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt und anschließend filtriert. Nach Adsorption auf Kieselgel wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (n-Hexan:Essigester, 6:2, $R_f = 0,38$) gereinigt. In einer Ausbeute von 95 % (10,10 g, 42,1 mmol) wurde eine gelbe Flüssigkeit erhalten.

NMR- und Massendaten siehe 6.3.5

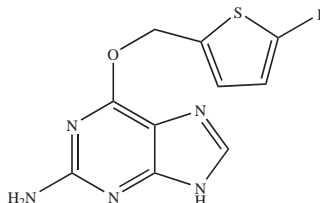
6.3.8 O⁶-Thenylguanin (TG)



Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden 3,07 g Thenylalkohol (26,16 mmol) in 3 mL trockenem DMSO gelöst und durch vorsichtige Zugabe von 0,41 g Natriumhydrid (10,01 mmol, 60 % auf Mineralöl) bei Raumtemperatur deprotoniert. Nach 1 h wurden 1,07 g (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** (4,68 mmol) und 0,22 g DMAP (1,79 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde auf 60 °C erhitzt. Nach 27 h wurde die Reaktion nach Abkühlen durch Zusatz von 0,8 mL Eisessig beendet. Die Reaktionsmischung wurde mit 140 mL Diethylether verdünnt, 1 h gerührt und für 24 h bei 4 °C gelagert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mit Diethylether und Wasser gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum (1×10^{-3} mbar) wurden 0,73 g (63 %, 2,94 mmol) eines weißen Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 12,41 (s, 1H, NH), 7,89 (s, 1H, G-8), 7,62 (d, 1H, R-6), 7,31 (d, 1H, R-3), 7,13 (t, 1H, R-4), 6,33 (s, 2H, NH₂), 5,65 (s, 2H, R-6)

6.3.9 O⁶-(5-Iodothenyl)guanin (ITG)



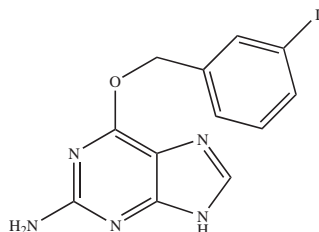
Unter einer Argonschutzgasatmosphäre und Lichtausschluss wurde zu einer Lösung von 4,51 g 5-Iodothenylalkohol (18,7 mmol) in 2 mL trockenem DMSO vorsichtig 0,31 g Natriumhydrid (7,5 mmol, 60 % auf Mineralöl) bei Raumtemperatur gegeben. Nach 1 h wurden 0,77 g (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** (3,4 mmol) zugesetzt und weitere 73 h gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurden 0,58 mL Eisessig und 100 mL Diethylether hinzugefügt. Der entstandene Niederschlag wurde nach 48 h bei 4 °C abfiltriert, mit Diethylether und Wasser gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Nach Trocknen im Hochvakuum wurden 0,51 g eines braunen Feststoffes (40 %, 1,3 mmol) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 12,51 (s, 1H, NH), 7,98 (s, 1H, G-8), 7,34 (d, 1H, R-4), 7,01 (d, 1H, R-3), 6,33 (s, 2H, NH₂), 5,64 (s, 2H, R-6)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 159,92 (G-2), 159,11 (G-6), 155,65 (G-4), 144,83 (R-2), 138,22 (G-8), 136,34 (R-4), 131,41 (R-3), 113,52 (G-5), 79,12 (R-5), 60,33 (R-6)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 768,7 (10) [2M + Na]⁺, 746,8 (7) [2M + H]⁺, 436,9 (45) [M + Na + K]⁺, 414,8 (8) [M + K]⁺, 395,8 (25) [M + Na]⁺, 373,8 (100) [M + H]⁺, 246,0 (8) [M-I + H]⁺

6.3.10 O⁶-(3-Iodbenzyl)guanin (IBG)



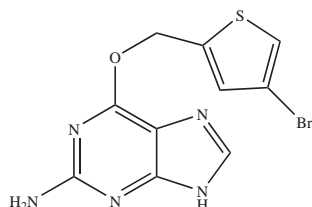
Analog zu 6.3.9 wurden 5,02 g Iodbenzylalkohol (21,4 mmol) in 2,5 mL trockenem DMSO mit 0,35 g Natriumhydrid (8,8 mmol, 60 % auf Mineralöl) deprotoniert und nach 1 h 0,92 g (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** (3,9 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 70 h beendet und IBG konnte als weißer Feststoff in 97 % Ausbeute erhalten werden (1,41 g, 3,8 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 12,47 (s, 1H, NH), 7,97 (s, 1H, G-8), 7,83 (s, 1H, R-2), 7,72 (d, 1H, R-4), 7,52 (d, 1H, R-6), 7,22 (t, 1H, R-5), 6,35 (s, 2H, NH₂), 5,45 (s, 2H, R-7)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 159,91 (G-2), 159,13 (G-6), 155,64 (G-4), 139,71 (G-8), 137,02 (R-1), 133,81 (R-2), 133,41 (R-4), 130,92 (R-5), 128,04 (R-6), 113,75 (G-5), 95,03 (R-3), 65,97 (R-7)

FD-MS: (m/z, % rel. Int.) 368,7 (31) [M + H]⁺, 367,7 (100) [M]⁺

6.3.11 O⁶-(4-Bromothienyl)guanin (4-BTG)

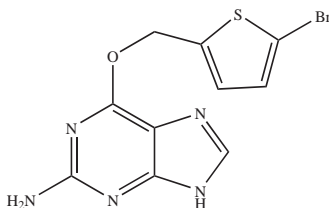


Analog zu 6.3.8 wurden 2,82 g 4-Bromothienylalkohol (14,6 mmol) in 3,5 mL trockenem DMSO mit 0,23 g Natriumhydrid (5,7 mmol, 60 % auf Mineralöl) deprotoniert. Nach 1 h wurden 0,60 g (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** (2,6 mmol) und 125 mg (1 mmol) DMAP zugesetzt und die Reaktionsmischung wurde für 48 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,45 mL Eisessig beendet und die Aufreinigung erfolgte nach Adsorption auf Kieselgel säulenchromatographisch (Toluol:Methanol, 4:1, R_f = 0,22). Da nach erfolgter Säulenchromatographie kein sauberes Produkt erhalten werden konnte, wurde das Rohprodukt aus Methanol umkristallisiert. 4-BTG konnte als weißer Feststoff in 41 % Ausbeute erhalten werden (0,35 g, 1,1 mmol).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 12,50 (s, 1H, NH), 7,89 (s, 1H, G-8), 7,62 (s, 1H, R-5), 7,44 (s, 1H, R-3), 6,41 (s, 2H, NH₂), 5,62 (s, 2H, R-6)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 160,11 (G-2), 159,09 (G-6), 155,22 (G-4), 141,13 (R-2), 138,24 (G-8), 131,05 (R-3), 125,22 (R-5), 112,31 (G-5), 108,14 (R-4), 61,07 (R-6)

6.3.12 O⁶-(5-Bromothienyl)guanin (5-BTG)

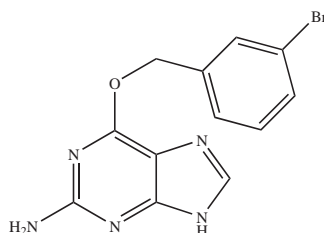


Analog zu 6.3.9 wurden 5,03 g 5-Bromothienylalkohol (25,9 mmol) in 2,9 mL trockenem DMSO gelöst und mit 0,41 g Natriumhydrid (10 mmol, 60 % auf Mineralöl) deprotoniert. Die Reaktion mit 1,05 g (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** wurde nach 72 h beendet. Nach Umkristallisieren aus Methanol wurden 1,31 g 5-BTG als weißer Feststoff erhalten (87 %, 4 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 12,52 (s, 1H, NH), 7,97 (s, 1H, G-8), 7,21 (dd, 2H, R-3,4), 6,43 (s, 2H, NH₂), 5,54 (s, 2H, R-6)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 159,61 (G-2), 159,33 (G-6), 155,73 (G-4), 141,02 (R-2), 138,35 (G-8), 130,21 (R-4), 129,92 (R-3), 113,65 (R-5), 113,33 (G-5), 61,31 (R-6)

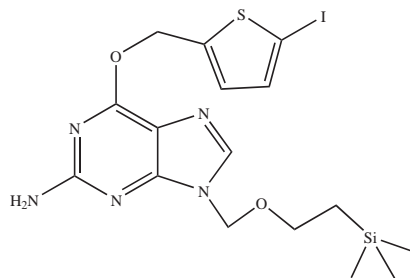
6.3.13 O⁶-(3-Brombenzyl)guanin (BBG)



Analog zu 6.3.9 wurden 5,05 g 3-Brombenzylalkohol (26,7 mmol) in 3 mL trockenem DMSO mit 0,42 g Natriumhydrid (10 mmol, 60 % auf Mineralöl) und 1,09 g (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** (4,7 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 70 h beendet und BBG wurde als weißer, kristalliner Feststoff in 93 % Ausbeute (1,42 g, 4,4 mmol) erhalten.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 12,52 (s, 1H, NH), 7,98 (s, 1H, G-8), 7,75 (s, 1H, R-2), 7,52 (t, 2H, R-4,6), 7,32 (t, 1H, R-5), 6,42 (s, 2H, NH₂), 5,54 (s, 2H, R-7)

6.3.14 2-Amino-6-(5-iodothienyl)-9-(2-trimethylsilylanyl-ethoxymethyl)-purin (ITGSi)



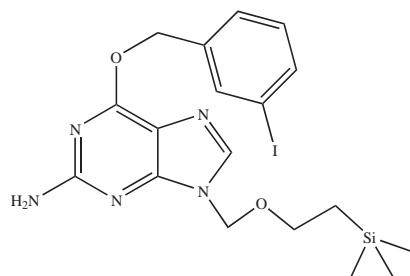
Unter einer Argonschutzgasatmosphäre und Lichtausschluss wurden 440 mg ITG (1,2 mmol) in 6,0 mL trockenem DMF gelöst. Zur Deprotonierung an N⁹ wurden 93 mg Lithiumhydrid (12 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Kühlung auf 0 °C wurden tropfenweise 198 mg 2-Trimethylsilylethoxymethylchlorid (1,2 mmol) zugesetzt und die Suspension wurde für weitere 24 h gerührt, während sie sich auf Raumtemperatur erwärmte. Durch den Zusatz von 60 mL eisgekühltem Wasser wurde die Reaktion beendet, das Rohprodukt wurde mit 150 mL Essigester extrahiert und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Adsorption auf Kieselgel erfolgte die Aufreinigung säulenchromatographisch (n-Hexan:Essigester, 3:2, R_f = 0,31). Es wurden 210 mg ITGSi (0,4 mmol) in 36 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 8,01 (s, 1H, G-8), 7,43 (d, 1H, R-4), 7,11 (d, 1H, R-3), 6,51 (s, 2H, NH₂), 5,82 (s, 2H, S-1), 5,62 (s, 2H, R-6), 3,54 (t, 2H, S-3), 0,91 (t, 2H, S-4), -0,07 (s, 9H, SiMe₃)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 160,01 (G-2), 159,61 (G-6), 155,10 (G-4), 144,82 (R-2), 140,63 (G-8), 136,42 (R-4), 131,33 (R-3), 113,11 (G-5), 78,62 (R-5), 71,51 (S-1), 65,93 (S-3), 61,12 (R-6), 17,43 (S-4), -1,13 (SiMe₃)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 1029,3 (7) [2M + Na]⁺, 567,2 (100) [M + Na + K + 2H]⁺, 526,2 (63) [M + Na]⁺, 504,3 (23) [M + H]⁺, 446,1 (57) [M-SiMe₃ + H]⁺, 396,1 (6) [M-SEM + Na]⁺

6.3.15 2-Amino-6-(3-iodbenzyl)-9-(2-trimethylsilylanyl-ethoxymethyl)-purin (IBGSi)



Analog zu 6.3.14 wurden 400 mg IBG (1,1 mmol) in 5,5 mL trockenem DMF mit 86 mg Lithiumhydrid (11 mmol) deprotoniert und mit 183 mg 2-Trimethylsilylethoxymethylchlorid (1,1 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 23 h beendet und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (n-Hexan:Essigester, 3:2, R_f = 0,25) wurden 190 mg eines gelben Öles erhalten (35 %, 0,4 mmol).

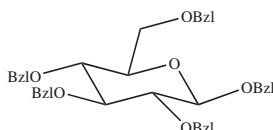
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 8,01 (s, 1H, R-2), 7,98 (s, 1H, G-8), 7,71 (d, 1H, R-4), 7,54 (d, 1H, R-6), 7,21 (t, 1H, R-5), 6,54 (s, 2H, NH_2), 5,53 (s, 2H, S-1), 5,46 (s, 2H, R-7), 3,51 (t, 2H, S-3), 0,91 (t, 2H, S-4), -0,12 (s, 9H, SiMe_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 160,21 (G-2), 160,13 (G-6), 154,91 (G-4), 140,58 (G-8), 139,61 (R-1), 137,03 (R-2,4), 130,91 (R-5), 128,02 (R-6), 113,72 (G-5), 95,02 (R-3), 71,53 (S-2), 66,12 (R-7), 65,91 (S-3), 17,42 (S-4), -1,13 (SiMe_3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 520,4 (83) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 498,3 (26) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 440,3 (100) $[\text{M} - (\text{CH}_2)_2\text{SiMe}_3 + 2\text{Na}]^+$

6.4 Darstellung der Glucoselinkers

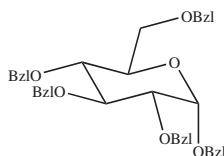
6.4.1 Pentabenzoyl- β -D-glucose



In 100 mL trockenem Pyridin wurden 15,03 g D-Glucose-Monohydrat (76 mmol) gelöst und bei 0 °C 60 mL Benzoylchlorid (416 mmol) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionsmischung für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und für 1 h bei 60 °C. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der so erhaltene Rückstand in Natriumchloridlösung aufgenommen. Der Niederschlag löste sich nicht ganz. Die Suspension wurde mit 400 mL Essigester extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Umkristallisation aus Aceton wurden 17,47 g Pentabenzoyl- β -D-glucose (33 %, 25 mmol) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 8,02 (m, 5H, Bzl), 7,81 (m, 7H, Bzl), 7,54 (m, 18H, Bzl), 6,28 (d, 1H, Glu-1, $^3\text{J} = 8,09$ Hz), 6,13 (t, 1H, Glu-3), 5,94 (t, 1H, Glu-4), 5,81 (dd, 1H, Glu-2), 4,72 (dd, 1H, Glu-6b), 4,51 (dd, 1H, Glu6a), 4,42 (m, 1H, Glu-5)

6.4.2 Pentabenzoyl- α -D-glucose

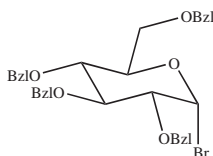


In einem Dreihalskolben wurden 63 mL trockenes Pyridin und 52,5 mL trockenes Dichlormethan auf -8 °C gekühlt. Innerhalb von 15 Minuten wurden 63,51 g eisgekühltes Benzoylchlorid (450 mmol) verdünnt mit 53 mL trockenem Dichlormethan zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurden 25,02 g α -D-Glucose-Monohydrat (126 mmol) so zugesetzt, dass die Temperatur der Reaktionsmischung 10 °C nicht überschreitet. Die Reaktionsmischung wurde für 22 h bei 4 °C gelagert, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Beim Waschen der organischen Phase mit insgesamt 450 mL 2 M Schwefelsäure löste sich der Niederschlag auf. Danach wurde die organische Phase mit Wasser (300 mL), gesättigter

Natriumhydrogencarbonatlösung (450 mL) und Wasser (450 mL) gewaschen. Wegen der schlechten Phasentrennung beim Waschen mit Wasser wurde Natriumchlorid zugesetzt. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Trocknen im Hochvakuum lieferte den Zucker als weißen, flockigen Feststoff in 55 % Ausbeute (48,44 g, 69,3 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 8,01 (m, 5H, Bzl), 7,45 (m, 25H, Bzl), 6,83 (d, 1H, Glu-1, $^3\text{J} = 3,68$ Hz), 6,31 (t, 1H, Glu-3), 5,83 (t, 1H, Glu-4), 5,64 (dd, 1H, Glu-2), 4,62 (m, 2H, Glu-6b, Glu-5), 4,45 (dd, 1H, Glu-6a)

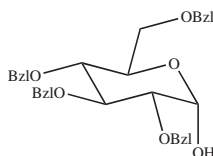
6.4.3 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosylbromid



Unter leichtem Erwärmen wurden 7,05 g Pentabenzoyl- β -D-glucose (10 mmol) in 25 mL Dichloroethan gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 14 mL 45 %iger Bromwasserstoff in Eisessig (78,8 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 15 h bei 4 °C gelagert und danach in 200 mL Eiswasser gegeben. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (300 mL) und Wasser (300 mL) gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Trocknen im Hochvakuum (1×10^{-3} mbar) ergab 6,03 g eines flockigen, weißen Feststoffes (9,1 mmol) in 92 % Ausbeute. Auch bei Einsatz von Pentabenzoyl- α -D-glucose wurde das α -Bromid erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 8,02 (m, 13H, Bzl), 7,41 (m, 17H, Bzl), 6,86 (d, 1H, Glu-1, $^3\text{J} = 4,04$ Hz), 6,33 (t, 1H, Glu-3), 5,82 (t, 1H, Glu-4), 5,30 (dd, 1H, Glu-2), 4,72 (m, 2H, Glu-6b, Glu-5), 4,51 (dd, 1H, Glu-6a)

6.4.4 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose



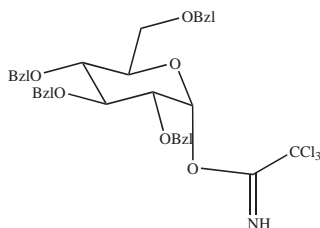
Zu einer Lösung von 10,01 g 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosylbromid (15,2 mmol) in 35 mL Aceton wurden 10 mL Wasser zugesetzt, bis die Lösung trüb blieb. Nach Zugabe von 0,45 g Natriumiodid (3 mmol) wurde die Reaktionsmischung für 80 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 25 mL Wasser aufgenommen. Nach Extraktion des Rohproduktes mit 300 mL Essigester wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (n-Hexan:Essigester, 5:2, $R_f = 0,22$). Trocknen im Hochvakuum lieferte das gewünschte Produkt in 76 % Ausbeute (6,90 g, 11,6 mmol) als flockigen, weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 8,01 (m, 8H, Bzl), 7,46 (m, 12H, Bzl), 6,61 (d, 1H, Glu-1, $^3\text{J} = 3,68$ Hz), 6,21 (t, 1H, Glu-3), 5,72 (t, 1H, Glu-4), 5,68 (t, 1H, Glu-2), 5,41 (dd, 2H, Glu-6), 4,61 (m, 1H, Glu-5), 1,61 (s, 1H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 165,09 (Bzl, Carbonyl), 132,94 (Bzl), 129,61 (Bzl), 128,23 (Bzl), 90,29 (Glu-1), 72,02 (Glu-3), 69,91 (Glu-5), 69,25 (Glu-2), 67,64 (Glu-4), 62,66 (Glu-6)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 661,6 (28) $[\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^+$, 634,8 (19) $[\text{M} + \text{K}]^+$, 619,4 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 392,6 $(\text{M-2Bzl} + 4\text{H})^+$, 220,2 (66) $[\text{M-4Bzl} + \text{Na} + \text{K}]^+$

6.4.5 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-glucopyranosid



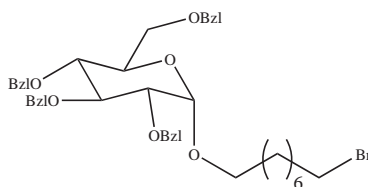
Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden 1,90 g 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose (3,2 mmol) in 19 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Kühlen auf 0 °C wurden 1,37 g Trichloracetnitril (9,5 mmol) und 48 μL DBU (0,3 mmol) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0 °C gerührt bis mit DC (n-Hexan:Essigester, 3:1) keine 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose mehr detektiert werden konnte. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und beim Trocknen im Hochvakuum wurde das saubere Produkt in 95 % Ausbeute (2,21 g, 3 mmol) als gelber, flockiger Feststoff erhalten. 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-glucopyranosid ist luftempfindlich und wurde unter Argon bei -18 °C gelagert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 8,61 (s, 1H, NH), 8,02 (m, 8H, Bzl), 7,42 (m, 12H, Bzl), 6,82 (d, 1H, Glu-1, $^3\text{J} = 3,68$ Hz), 6,33 (t, 1H, Glu-3), 5,81 (t, 1H, Glu-4), 5,62 (dd, 2H, Glu-2), 4,61 (m, 2H, Glu-6b, Glu-5), 4,53 (dd, 1H, Glu-6a)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 165,45 (Bzl, Carbonyl), 160,34 (CCl_3), 133,37 (Bzl), 133,10 (Bzl), 129,73 (Bzl), 128,25 (Bzl), 92,93 (Glu-1), 70,51 (Glu-3), 70,00 (Glu-5), 68,47 (Glu-2), 67,65 (Glu-4), 62,29 (Glu-6)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 762,22 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 675,70 (22) $[\text{M-Bzl} + \text{K}]^+$, 533,64 (33) $[\text{M-2Bzl} + \text{H}]^+$, 451,50 (35) $[\text{M-3Bzl} + \text{Na} + \text{K}]^+$, 435,49 (38) $[\text{M-3Bzl} + \text{Na}]^+$, 392,60 (72) $[\text{M-2Bzl-Im} + 4\text{H}]^+$, 374,55 (91) $[\text{M-3Bzl-CCl}_3]^+$, 364,43 (77) $[\text{M-4Bzl} + \text{K}]^+$

6.4.6 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid



Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden in 169 mL trockenem Dichlormethan 7,03 g Pentabenzoyl- β -D-glucose (10 mmol) gelöst. Nach Kühlen auf 0 °C wurden 3,5 mL Zinntetrachlorid (30,2 mmol) zugegeben und nach weiterem Rühren für 20 Minuten bei der gleichen Temperatur 4,21 g 1-Bromooctanol (20 mmol) verdünnt mit 84,5 mL trockenem Dichlormethan und 84,5 mL trockenem Acetonitril schnell zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Eisbad entfernt und die Reaktionsmischung für 26 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und vorsichtig unter Rühren in gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben. In der wässrigen Phase bildete sich hierbei ein weißer Niederschlag. Das Rohprodukt wurde mit 300 mL Dichlormethan extrahiert und die organische Phase mit Wasser gewaschen, bis das Washwasser einen neutralen pH-Wert erreichte. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Umkristallisation aus Ethanol lieferte den α -Glucoselinker als gelbliches Öl in 95 % Ausbeute (7,51 g, 9,5 mmol). Auch bei Einsatz von Pentabenzoyl- α -D-glucose wurde der α -Linker erhalten.

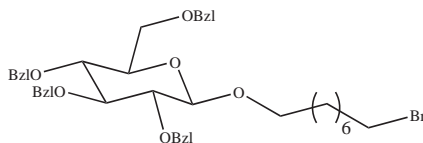
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 8,01 (m, 10H, Bzl), 7,31 (m, 10H, Bzl), 6,22 (t, 1H, Glu-3), 5,74 (t, 1H, Glu-4), 5,41 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 5,67$ Hz), 5,31 (dd, 1H, Glu-2), 4,62 (dd, 2H, Glu-6a), 4,44 (m, 1H, Glu-6b, Glu-5), 3,81 (m, 1H, A-1b), 3,52 (m, 1H, A-1a), 3,39 (m, 2H, A-8), 1,79 (t, 2H, A-7), 1,62 (m, 2H, A-2), 1,53 (t, 2H, A-6), 1,36 (m, 2H, A-3), 1,26 (t, 4H, A-4,5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 165,98 (Bzl, Carbonyl), 165,59 (Bzl, Carbonyl), 165,14 (Bzl, Carbonyl), 133,12 (Bzl), 130,01 (Bzl), 128,95 (Bzl), 127,55 (Bzl), 95,54 (Glu-1), 72,51 (Glu-3), 70,11 (Glu-5), 69,23 (Glu-2), 68,54 (Glu-4), 67,95 (A-1), 62,54 (Glu-6), 33,51 (A-8), 32,44 (A-7), 29,52 (A-2), 29,41 (A-5), 28,95 (A-4), 28,12 (A-6), 25,83 (A-3)

$^1\text{H-}^1\text{H-Korrelationsspektrum}$ (400 MHz, CDCl_3):

| Proton | $^1\text{H-Korrelation mit}$ |
|--------|------------------------------|
| Glu-1 | Glu-2 |
| Glu-2 | Glu-1, Glu-3 |
| Glu-3 | Glu-2, Glu-4 |
| Glu-4 | Glu-3, Glu-5 |
| Glu-5 | Glu-4, Glu-6 |
| Glu-6 | Glu-5 |
| A-1b | A-1a, A-2 |
| A-1a | A-1b, A-2 |
| A-2 | A-1a, A-1b, A-3 |
| A-3 | A-2, A-4 |
| A-4 | A-3, A-5 |
| A-5 | A-4, A-6 |
| A-6 | A-5, A-7 |
| A-7 | A-6, A-8 |
| A-8 | A-7 |

6.4.7 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid mit TMSO-triflat als Katalysator



Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden 3,05 g 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-glucopyranosid (4 mmol) in 30 mL trockenem Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 0,52 g 1-Bromooctanol (2,5 mmol) und nach 30 Minuten 0,1 mL TMSO-triflat (1 mmol) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h bei der gleichen Temperatur gerührt. Durch Zusatz von 2 mL halbkonzentrierter Natriumhydrogencarbonatlösung und Rühren für 1,5 h wurde die Reaktion beendet, wobei ein weißer Niederschlag entstand. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 45 mL Chloroform aufgenommen. Nach Waschen mit 90 mL Wasser wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (n-Hexan:Essigester, 3:1, $R_f = 0,35$). Der β -Glucoselinker konnte zwar als gelbes Öl in 21 % Ausbeute erhalten werden (0,68 g, 0,9 mmol), jedoch nicht sauber isoliert werden, auch nicht nach Umkristallisation aus Ethanol. Als Nebenprodukt wurden 1,38 g 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-D-glucose (57 %, 2,3 mmol) als weißer, flockiger Niederschlag erhalten.

6.4.8 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid mit Bortrifluorid-Etherat als Katalysator

Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden 3,31 g 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-glucopyranosid (4,5 mmol) und 0,58 g 1-Bromooctanol (2,8 mmol) in 3,5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wurden 0,34 mL Bortrifluorid-Etherat (4,5 mmol) zugegeben und nach Entfernen des Eisbades wurde die Reaktionsmischung für 4,5 h gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde die Lösung in 50 mL eiskalte, gesättigte Natriumcarbonatlösung gegeben und das Rohprodukt mit 150 mL Diethylether extrahiert. Nach Waschen mit 180 mL Wasser und Trocknen über Natriumsulfat wurde das Rohprodukt auf Kieselgel adsorbiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (n-Hexan:Essigester, 2:1, $R_f = 0,68$) und der β -Glucoselinker konnte sauber in 57 %iger Ausbeute als gelbes Öl isoliert werden (2,03 g, 2,6 mmol).

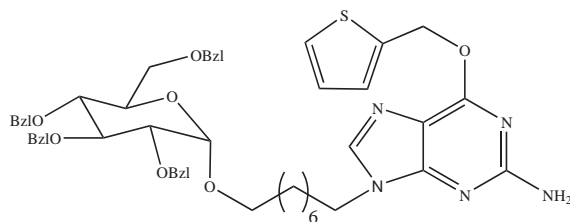
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 8,01 (m, 8H, Bzl), 7,51 (m, 12H, Bzl), 5,92 (t, 1H, Glu-3), 5,73 (t, 1H, Glu-4), 5,52 (t, 1H, Glu-2), 4,81 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 8,09$ Hz), 4,61 (dd, 1H, Glu-6a), 4,44 (dd, 1H, Glu-6b), 4,23 (t, 1H, Glu-5), 3,92 (m, 1H, A-1b), 3,55 (m, 1H, A-1b), 3,33 (t, 2H, A-8), 1,62 (t, 2H, A-7), 1,54 (m, 2H, A-2), 1,32 (m, 2H, A-6), 1,24 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): (δ / ppm) 165,95 (Bzl, Carbonyl), 165,64 (Bzl, Carbonyl), 164,85 (Bzl, Carbonyl), 133,11 (Bzl), 129,63 (Bzl), 128,85 (Bzl), 128,22 (Bzl), 101,24 (Glu-1), 72,93 (Glu-3), 72,11 (Glu-5), 71,82 (Glu-2), 70,13 (A-1), 69,82 (Glu-4), 63,14 (Glu-6), 33,75 (A-8), 32,63 (A-7), 29,21 (A-2), 28,85 (A-5), 28,31 (A-4), 27,83 (A-6), 25,54 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 811,21 (60) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 579,33 (39) $[\text{M} - (\text{Br} - (\text{CH}_2)_8 - \text{OH}) + \text{H}]^+$, 231,01 (100) $[\text{Br} - (\text{CH}_2)_8 - \text{O} + \text{Na}]^+$

6.5 Darstellung der Glucose-Konjugate

6.5.1 2-Amino-6-(5-thenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin

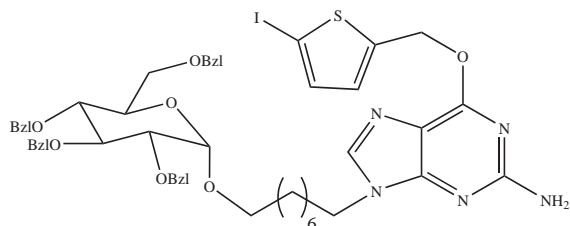


Für die Darstellungen der geschützten Glucose-Konjugate wurden über Nacht alle zur Synthese verwendeten Edukte, sowie Rührfisch und Molekularsieb im Hochvakuum getrocknet. Die Reaktion wurde unter einer Argonschutzgasatmosphäre durchgeführt.

In 36,5 mL trockenem DMF wurden 0,96 g TG (3,9 mmol) gelöst und der Lösung wurde Molekularsieb zugesetzt. Durch Zusatz von 29 mg Lithiumhydrid (3,9 mmol) wurde das Guaninderivat an N⁹ deprotoniert. Es entstand eine gelbe, trübe Lösung, die innerhalb von 1 h auf 80 °C erwärmt wurde. Nun wurden 3,01 g 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid **19** (3,9 mmol), gelöst in 23,7 mL trockenem DMF, schnell zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3,5 h bei der gleichen Temperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von Kieselgel und Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum auf dieses adsorbiert. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch (n-Hexan:Aceton, 1:1, R_f = 0,67) und das geschützte Glucose-Konjugat von TG konnte als weißer, flockiger Feststoff in 50 % Ausbeute (1,85 g, 1,9 mmol) isoliert werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 7,98 (d, 2H, G-8, R-5), 7,74 (m, 10H, Bzl), 7,54 (m, 10H, Bzl), 7,32 (d, 1H, R-3), 7,01 (t, 1H, R-4), 6,53 (s, 2H, NH₂), 6,03 (t, 1H, Glu-3), 5,65 (t, 2H, R-6, Glu-4), 5,44 (m, 2H, Glu-2, Glu-1), 4,53 (m, 2H, Glu-6), 4,02 (t, 1H, Glu-5), 3,82 (m, 1H, A-1a), 3,52 (m, 1H, A-1b), 3,33 (s, 2H, A-8), 1,69 (m, 2H, A-7), 1,53 (m, 2H, A-2), 1,25 (m, 2H, A-6), 1,12 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

6.5.2 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin



Die zur Synthese benötigten Chemikalien wurden, wie in 6.5.1 beschrieben, vorbereitet. Die Reaktion wurde unter einer Argonschutzgasatmosphäre unter Lichtausschluss durchgeführt. In 10 mL trockenem DMF mit Molekularsieb wurden 0,41 g ITG (1,1 mmol) gelöst und mit 8 mg Lithiumhydrid (1,1 mmol) deprotoniert. Nach 70 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurden 0,83 g 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid **19** (1,1 mmol), gelöst in 6,5 mL trockenem DMF, schnell zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 21 h bei Raumtemperatur gerührt und danach durch Zusatz von Kieselgel und Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum auf Kieselgel adsorbiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Säulenchromatographie (Aceton:n-Hexan,

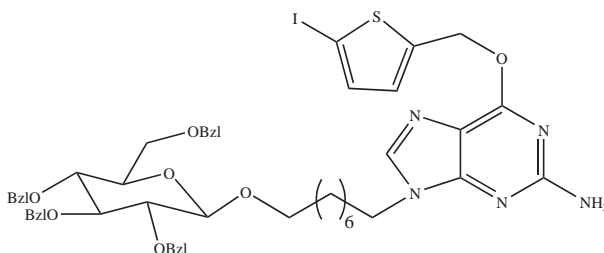
1:1, $R_f = 0,53$). Das gewünschte Produkt wurde als orangefarbenes Öl in 37 % Ausbeute erhalten (0,43 g, 0,4 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,97 (s, 1H, G-8), 7,84 (m, 7H, Bzl), 7,54 (m, 13H, Bzl), 7,21 (d, 1H, R-4), 7,02 (d, 1H, R-3), 6,54 (s, 2H, NH_2), 6,02 (t, 1H, Glu-3), 5,72 (t, 1H, Glu-4), 5,63 (s, 2H, R-6), 5,43 (m, 2H, Glu-2, Glu-1), 4,52 (m, 2H, Glu-6), 3,95 (t, 1H, Glu-5), 3,81 (m, 1H, A-1a), 3,54 (m, 1H, A-1b), 3,32 (s, 2H, A-8), 1,69 (m, 2H, A-7), 1,59 (m, 2H, A-2), 1,25 (m, 2H, A-6), 1,11 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 165,64 (Bzl, Carbonyl), 165,11 (Bzl, Carbonyl), 164,97 (Bzl, Carbonyl), 159,62 (G-2), 159,54 (G-6), 154,81 (G-4), 144,94 (R-2), 140,32 (G-8), 136,32 (R-4), 133,94 (Bzl), 131,32 (R-3), 129,55 (Bzl), 113,92 (G-5), 113,32 (R-5), 95,43 (Glu-1), 71,65 (Glu-3), 70,91 (Glu-5), 69,32 (Glu-2), 68,12 (Glu-4), 67,45 (A-1), 66,72 (R-6), 61,02 (Glu-6), 42,93 (A-8), 36,05 (A-7), 31,06 (A-2), 29,45 (A-5), 28,98 (A-4), 26,22 (A-6), 25,71 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 1102,3 (10) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1080,2 (6) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 664,5 (28) $[\text{M-Bzl} + \text{H}]^+$, 623,5 (100) $[\text{M-Glu} + \text{Na}]^+$

6.5.3 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin



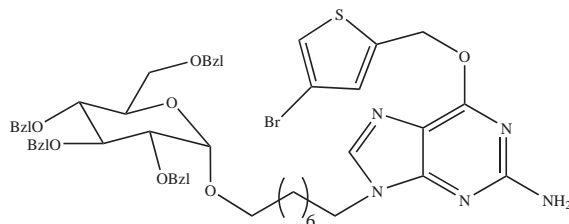
Die Synthese wurde analog der in 6.5.2 beschriebenen durchgeführt. Es wurden 0,41 g ITG (1,1 mmol) in 6,5 mL trockenem DMF mit 8 mg Lithiumhydrid (1,1 mmol) und 0,81 g 1-(8-Bromocetyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** (1,1 mmol) umgesetzt. Nach 23 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung auf Kieselgel adsorbiert. Das geschützte β -Glucose-Konjugat wurde in einer Ausbeute von 53 % (0,60 g, 0,6 mmol) als gelborangefarbenes Öl nach säulenchromatographischer Aufreinigung (n-Hexan:Aceton, 1:1, $R_f = 0,55$) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 8,01 (s, 1H, G-8), 7,81 (m, 5H, Bzl), 7,72 (m, 2H, Bzl), 7,51 (m, 13H, Bzl), 7,21 (d, 1H, R-4), 7,01 (d, 1H, R-3), 6,52 (s, 2H, NH_2), 6,03 (t, 1H, Glu-3), 5,65 (t, 3H, Glu-4, R-6), 5,31 (t, 1H, Glu-2), 5,21 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 8,07$ Hz), 4,51 (m, 2H, Glu-6), 3,98 (t, 1H, Glu-5), 3,85 (m, 1H, A-1a), 3,60 (m, 1H, A-1b), 3,33 (s, 2H, A-8), 1,62 (m, 2H, A-7), 1,42 (m, 2H, A-2), 1,05 (m, 2H, A-6), 0,98 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 165,62 (Bzl, Carbonyl), 165,36 (Bzl, Carbonyl), 164,99 (Bzl, Carbonyl), 164,82 (Bzl, Carbonyl), 159,62 (G-2), 159,53 (G-6), 154,83 (G-4), 144,91 (R-2), 140,31 (G-8), 136,33 (R-4), 133,92 (Bzl), 131,31 (R-3), 129,48 (Bzl), 129,02 (Bzl), 113,91 (G-5), 113,21 (R-5), 100,11 (Glu-1), 71,92 (Glu-3), 70,98 (Glu-5), 69,32 (Glu-2), 68,13 (Glu-4), 67,44 (A-1), 66,72 (R-6), 61,02 (Glu-6), 42,93 (A-8), 36,04 (A-7), 31,01 (A-2), 29,44 (A-5), 28,92 (A-4), 26,26 (A-6), 25,71 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 1113,7 (13) $[\text{M} + \text{K}]^+$, 1102,8 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1080,8 (77) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 502,4 (9) $[\text{M-Glu} + \text{H}]^+$, 375,8 (19) $[\text{M-C8Glu} + 2\text{H}]^+$

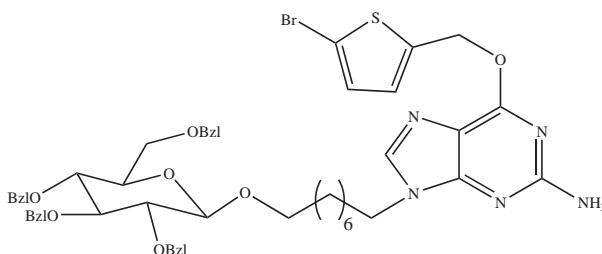
6.5.4 2-Amino-6-(4-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin



Analog zu 6.5.2 wurden 0,55 g 4-BTG (1,7 mmol) in 16 mL trockenem DMF mit 13 mg Lithiumhydrid (1,7 mmol) und 1,29 g 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid **19** (1,7 mmol) in 10 mL trockenem DMF für 22 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Aufreinigung durch Säulenchromatographie erfolgte nach Adsorption auf Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch von Aceton:n-Hexan, 2:3 ($R_f = 0,58$). Das gewünschte Produkt konnte in 24 % Ausbeute (0,41 g, 0,4 mmol) isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 8,01 (d, 2H, G-8, R-5), 7,85 (m, 7H, Bzl), 7,54 (m, 14H, Bzl, R-3), 6,53 (s, 2H, NH_2), 6,03 (t, 1H, Glu-3), 5,62 (t, 3H, Glu-4, R-6), 5,42 (m, 2H, Glu-2, Glu-1), 4,52 (m, 2H, Glu-6), 3,91 (t, 1H, Glu-5), 3,81 (m, 1H, A-1a), 3,52 (m, 1H, A-1b), 3,33 (s, 2H, A-8), 1,62 (m, 2H, A-7), 1,54 (m, 2H, A-2), 1,31 (s, 2H, A-6), 1,13 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

6.5.5 2-Amino-6-(5-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin

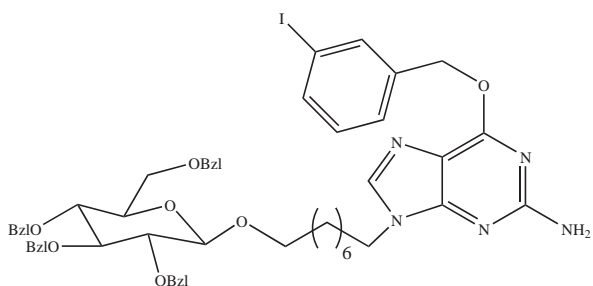


Analog zu 6.5.1 wurden 0,35 g 5-BTG (1,1 mmol) in 10 mL trockenem DMF mit 8 mg Lithiumhydrid (1,1 mmol) deprotoniert und nach 1 h, in der die Temperatur auf 80 °C erhöht wurde, wurden 0,85 g 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** (1,1 mmol) in 6,5 mL trockenem DMF zugesetzt. Nach weiteren 6,5 h Rühren bei der gleichen Temperatur wurde die Reaktion beendet und das Lösungsmittel nach Zusatz von Kieselgel im Hochvakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (n-Hexan:Aceton, 1:1, $R_f = 0,52$). Das geschützte β -Glucose-Konjugat von 5-BTG konnte in einer Ausbeute von 14 % als gelborangefarbenes Öl isoliert werden (150 mg, 0,2 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,95 (s, 1H, G-8), 7,85 (m, 4H, Bzl), 7,55 (m, 16H, Bzl), 7,17 (d, 1H, R-4), 7,13 (d, 1H, R-3), 6,51 (s, 2H, NH_2), 5,98 (t, 1H, Glu-3), 5,60 (m, 3H, Glu-4, R-6), 5,34 (t, 1H, Glu-5), 5,15 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 7,92$ Hz), 4,49 (m, 2H, Glu-6), 3,92 (t, 1H, Glu-5), 3,76 (m, 1H, A-1a), 3,53 (m, 1H, A-1b), 2,86 (s, 2H, A-8), 1,59 (m, 2H, A-7), 1,39 (m, 2H, A-2), 1,23 (m, 2H, A-6), 0,97 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 165,62 (Bzl, Carbonyl), 165,35 (Bzl, Carbonyl), 164,98 (Bzl, Carbonyl), 164,82 (Bzl, Carbonyl), 159,59 (G-2), 159,50 (G-6), 154,84 (G-4), 150,16 (R-2), 140,92 (G-8), 140,41 (R-4), 133,73 (Bzl), 130,22 (R-3), 129,48 (Bzl), 129,01 (Bzl), 113,85 (G-5), 113,32 (R-5), 100,08 (Glu-1), 73,34 (R-6), 72,12 (Glu-4), 71,03 (Glu-5), 69,66 (A-1), 69,49 (Glu-2), 62,93 (Glu-3), 61,37 (Glu-6), 42,93 (A-8), 36,03 (A-7), 31,03 (A-2), 29,86 (A-4), 28,71 (A-5), 26,14 (A-6), 25,43 (A-3)

6.5.6 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin (Umsetzung bei Raumtemperatur)



Die Synthese wurde, wie in 6.5.2 beschrieben, mit 0,52 g IBG (1,4 mmol) in 13,5 mL trockenem DMF, 11 mg Lithiumhydrid (1,4 mmol) und 1,11 g 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** (1,4 mmol) in 8,6 mL trockenem DMF durchgeführt. Nach 22 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktion beendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Adsorption auf Kieselgel mittels Säulenchromatographie (n-Hexan:Aceton, 1:1, $R_f = 0,56$). Das gewünschte β -Glycosid wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 15 % (0,23 g, 0,2 mmol) erhalten.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 7,98 (d, 2H, G-8, R-2), 7,81 (m, 6H, R-4, Bzl), 7,51 (m, 16H, Bzl), 7,22 (t, 1H, R-5), 6,52 (s, 2H, NH_2), 6,03 (t, 1H, Glu-3), 5,64 (t, 1H, Glu-4), 5,52 (s, 2H, R-7), 5,31 (t, 1H, Glu-2), 5,23 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 7,83$ Hz), 4,54 (m, 2H, Glu-6), 3,93 (t, 1H, Glu-5), 3,82 (m, 1H, A-1a), 3,52 (m, 1H, A-1b), 2,93 (s, 2H, A-8), 1,62 (t, 2H, A-7), 1,44 (t, 2H, A-2), 1,25 (m, 2H, A-6), 1,02 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 165,63 (Bzl, Carbonyl), 165,36 (Bzl, Carbonyl), 164,99 (Bzl, Carbonyl), 164,82 (Bzl, Carbonyl), 160,02 (G-2), 159,86 (G-6), 154,72 (G-4), 139,73 (G-8), 136,93 (R-1), 133,94 (R-2), 133,72 (R-4), 130,81 (R-5), 129,48 (Bzl), 129,02 (Bzl), 128,03 (R-6), 113,94 (G-5), 100,11 (Glu-1), 94,97 (R-3), 73,33 (R-7), 72,14 (Glu-3), 71,01 (Glu-5), 69,74 (Glu-2), 69,52 (Glu-4), 66,02 (A-1), 62,92 (Glu-6), 42,94 (A-8), 36,03 (A-7), 31,05 (A-2), 29,41 (A-4), 28,71 (A-5), 26,14 (A-6), 25,43 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 1096,7 (63) $[\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^+$, 1074,7 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 391,5 (25) $[\text{M} - \text{C}_8\text{Glu} + \text{Na}]^+$

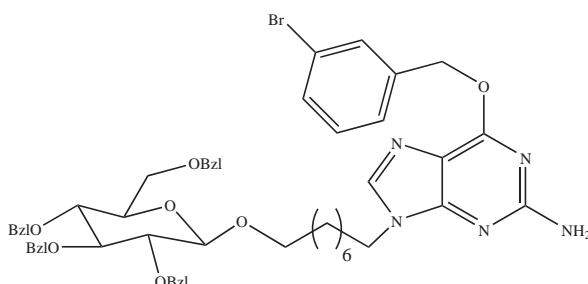
6.5.7 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin (Umsetzung bei 80 °C)

Wegen der geringen Ausbeuten bei 6.5.6 wurde die gleiche Umsetzung noch bei einer Temperatur von 80 °C (wie in 6.5.1) durchgeführt. In 13,5 mL trockenem DMF wurden 0,52 g IBG (1,4 mmol) mit

11 mg Lithiumhydrid (1,4 mmol) und 1,11 g 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** (1,4 mmol) in 8,5 mL trockenem DMF umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 4,5 h beendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurden 0,17 g des geschützten β -Glucose-Konjugats von IBG erhalten (11 %, 0,2 mmol).

NMR- und Massendaten siehe 6.5.6

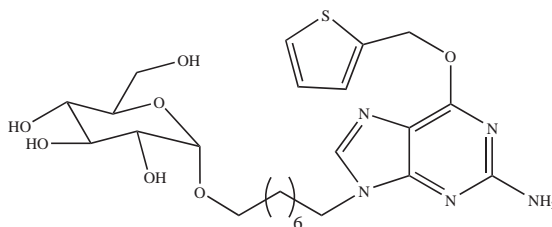
6.5.8 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin



Die Synthese wurde, wie in 6.5.1 beschrieben, mit 0,24 g BBG (0,76 mmol) in 7 mL trockenem DMF, 6 mg Lithiumhydrid (0,76 mmol) und 0,61 g 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** (0,76 mmol) in 4,5 mL trockenem DMF durchgeführt. Die Zugabe des β -Glucoseliners erfolgte bei 80 °C. Die Reaktionsmischung wurde für 4 h gerührt und das Lösungsmittel nach Zusatz von Kieselgel im Hochvakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (n-Hexan:Aceton, 1:1, $R_f = 0,60$) wurden 0,28 g geschütztes β -Glucose-Konjugat (36 %, 0,27 mmol) als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,97 (d, 2H, G-8, R-2), 7,85 (m, 6H, Bzl), 7,53 (m, 17H, Bzl, R-4, R-5, R-6), 6,52 (s, 2H, NH_2), 6,03 (t, 1H, Glu-3), 5,61 (t, 1H, Glu-4), 5,54 (s, 2H, R-7), 5,43 (t, 1H, Glu-2), 5,13 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 7,72$ Hz), 4,53 (m, 2H, Glu-6), 4,03 (t, 1H, Glu-5), 3,82 (m, 1H, A-1a), 3,64 (m, 1H, A-1b), 2,94 (s, 2H, A-8), 1,56 (m, 2H, A-7), 1,38 (m, 2H, A-2), 1,21 (m, 2H, A-6), 0,96 (m, 6H, A-3, A-4, A-5)

6.5.9 2-Amino-6-thenyl-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin (TGG)



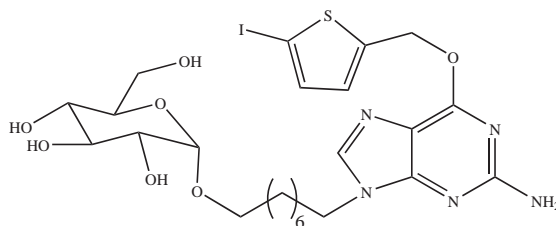
Unter leichtem Erwärmen im Wasserbad wurden 1,47 g 2-Amino-6-thenyl-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin **20** (1,5 mmol) in 6,5 mL trockenem Methanol gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 0,94 mL einer frisch hergestellten Natriummethanatlösung zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und der Umsatz mittels

DC (Chloroform:Methanol, 5:1) ermittelt. Auf Grund des unzureichenden Umsatzes wurden nochmals 0,5 mL Natriummethanolatlösung zugegeben. Nach 3,5 h wurde die Reaktion durch Zusatz von Dowex 50 WX 2 neutralisiert und nach Abfiltrieren das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch (Chloroform:Methanol, 5:1, $R_f = 0,38$). Das α -Glucose-Konjugat TGG wurde nach Trocknen im Vakuum (1×10^{-3} mbar) als weißer, flockiger Feststoff in einer Ausbeute von 52 % isoliert (0,43 g, 0,8 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,97 (s, 1H, G-8), 7,62 (d, 1H, R-5), 7,31 (d, 1H, R-3), 7,13 (t, 1H, R-4), 6,54 (s, 2H, NH_2), 5,71 (s, 2H, R-6), 4,86 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 5,48$ Hz), 4,72 (d, 1H, Glu-3), 4,61 (d, 1H, Glu-4), 4,54 (t, 1H, Glu-2), 4,03 (t, 1H, Glu-5), 3,62 (m, 2H, Glu-6), 3,41 (m, 2H, A-8), 3,31 (s, 4H, OH), 3,24 (m, 1H, A-1a), 3,11 (m, 1H, A-1b), 1,82 (t, 2H, A-7), 1,54 (m, 2H, A-2), 1,32 (m, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 159,74 (G-2), 159,72 (G-6), 154,74 (G-4), 140,28 (G-8), 138,73 (R-2), 129,19 (R-3), 127,80 (R-5), 126,99 (R-4), 98,74 (Glu-1), 79,44 (R-6), 73,53 (Glu-3), 73,00 (Glu-5), 72,23 (Glu-2), 70,61 (Glu-4), 67,03 (A-1), 61,33 (Glu-6), 42,93 (A-8), 29,45 (A-7), 29,29 (A-2), 28,98 (A-5), 28,74 (A-4), 26,25 (A-6), 25,84 (A-3)

6.5.10 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin (ITGG α)



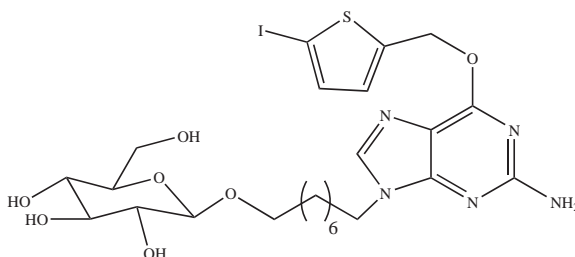
Zum Schutz vor Deiodierungen wurde die Reaktion unter Lichtausschluss durchgeführt. Analog zu 6.5.9 wurden 410 mg 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin **25** (0,38 mmol) in insgesamt 8 mL trockenem Methanol suspendiert. Es wurden 0,5 mL einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung zugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für 4,5 h gerührt, wobei nach circa 1 h Rühren eine klare Lösung entstand. Die säulenchromatographische Reinigung (Chloroform:Methanol, 5:1, $R_f = 0,33$) und das Trocknen im Hochvakuum lieferten 104 mg ITGG α (41 %, 0,16 mmol) als gelblicher, flockiger Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,98 (s, 1H, G-8), 7,35 (d, 1H, R-4), 7,13 (d, 1H, R-3), 6,54 (s, 2H, NH_2), 5,64 (s, 2H, R-6), 4,84 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 5,48$ Hz), 4,72 (d, 1H, Glu-3), 4,61 (t, 1H, Glu-4), 4,44 (t, 1H, Glu-2), 4,01 (t, 1H, Glu-5), 3,62 (m, 2H, Glu-6), 3,41 (m, 2H, A-8), 3,21 (m, 1H, A-1a), 3,13 (m, 1H, A-1b), 1,82 (t, 2H, A-7), 1,54 (m, 2H, A-2), 1,31 (s, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 159,75 (G-2), 159,72 (G-6), 154,82 (G-4), 144,95 (R-2), 140,41 (G-8), 136,41 (R-4), 131,32 (R-3), 113,95 (G-5), 113,84 (R-5), 98,73 (Glu-1), 78,61 (Glu-3), 73,54 (Glu-5), 73,03 (Glu-2), 72,22 (Glu-4), 67,05 (A-1), 61,34 (Glu-6), 61,02 (R-6), 42,95 (A-8), 29,45 (A-7), 29,32 (A-2), 28,94 (A-5), 28,71 (A-4), 26,33 (A-6), 25,81 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 702,1 (5) $[\text{M} + \text{K}]^+$, 686,2 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 664,2 (19) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 502,1 (56) $[\text{M-Glu} + \text{H}]^+$, 400,3 (6) $[\text{M-Glu-I} + \text{Na}]^+$, 374,2 (7) $[\text{ITG} + \text{H}]^+$

6.5.11 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin (ITGG)



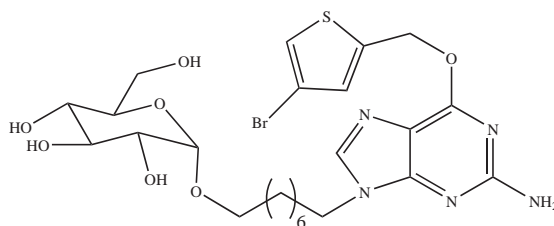
Die Reaktion wurde unter Lichtausschluss analog zu 6.5.9 mit 590 mg 2-Amino-6-(5-iodothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **24** (0,55 mmol) in 13 mL trockenem Methanol und 0,45 mL einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung durchgeführt. Nach 4 h wurde die Reaktionsmischung neutralisiert. Die Reinigung mittels Säulenchromatographie (Chloroform:Methanol, 5:1, $R_f = 0,66$) lieferte 200 mg ITGG (56 %, 0,3 mmol) als gelblicher, flockiger Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 7,98 (s, 1H, G-8), 7,31 (d, 1H, R-4), 7,11 (d, 1H, R-3), 6,52 (s, 2H, NH₂), 5,62 (s, 2H, R-6), 5,01 (dd, 1H, Glu-3), 4,91 (d, 1H, Glu-4), 4,52 (t, 1H, Glu-2), 4,11 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 7,83$ Hz), 4,03 (t, 1H, Glu-5), 3,72 (dd, 1H, Glu-6a), 3,63 (dd, 1H, Glu-6b), 3,43 (m, 2H, A-8), 3,31 (s, 5H, OH), 3,24 (m, 1H, A-1a), 3,13 (m, 1H, A-1b), 1,81 (m, 2H, A-7), 1,54 (m, 2H, A-2), 1,31 (m, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 159,61 (G-2), 159,52 (G-6), 154,82 (G-4), 144,92 (R-2), 140,43 (G-8), 136,43 (R-4), 131,32 (R-3), 113,83 (G-5), 113,21 (R-5), 103,11 (Glu-1), 79,42 (Glu-3), 73,53 (Glu-5), 73,02 (Glu-2), 72,22 (Glu-4), 67,04 (A-1), 61,33 (Glu-6), 61,02 (R-6), 42,95 (A-8), 29,43 (A-7), 29,31 (A-2), 28,93 (A-5), 28,72 (A-4), 26,34 (A-6), 25,85 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 702,1 (5) [M + K]⁺, 686,2 (100) [M + Na]⁺, 664,2 (19) [M + H]⁺, 502,1 (56) [M-Glu + H]⁺, 374,2 (7) [M-C8-Glu + H]⁺

6.5.12 2-Amino-6-(4-bromothenyl)-9-(octyl- α -D-glucopyranosid)-purin (4-BTGG α)

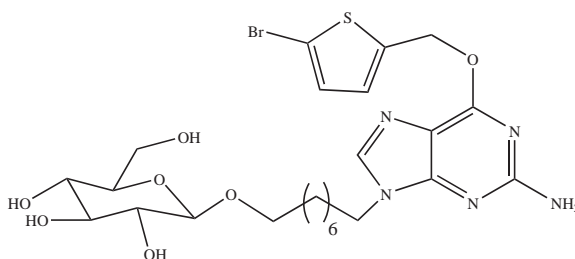


Analog zu 6.5.9 wurden 410 mg 2-Amino-6-(4-bromothenyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid)-purin **26** (0,4 mmol) in 7 mL trockenem Methanol gelöst und mit 0,45 mL einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung versetzt. Erst bei Zusatz der Natriummethanolatlösung trat vollständige Lösung des Eduktes ein. Die Reaktionsmischung wurde nach 2 h neutralisiert und nach säulenchromatographischer Reinigung (Chloroform:Methanol, 5:1, $R_f = 0,40$) wurde BTGG α als beigefarbener, flockiger Feststoff in 59 % Ausbeute erhalten (144 mg, 0,23 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,95 (s, 1H, G-8), 7,74 (s, 1H, R-5), 7,33 (s, 1H, R-3), 6,54 (s, 2H, NH_2), 5,65 (s, 2H, R-6), 4,92 (d, 1H, Glu-1, $^3\text{J} = 5,48$ Hz), 4,73 (d, 1H, Glu-3), 4,62 (t, 1H, Glu-4), 4,44 (t, 1H, Glu-2), 4,01 (t, 1H, Glu-5), 3,62 (m, 2H, Glu-6), 3,43 (m, 2H, A-8), 3,21 (m, 1H, A-1a), 3,05 (m, 1h, A-1b), 1,84 (m, 2H, A-7), 1,54 (m, 2H, A-2), 1,24 (m, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 159,66 (G-2), 159,51 (G-6), 154,84 (G-4), 140,92 (G-8), 140,41 (R-2), 131,15 (R-3), 125,54 (R-5), 113,85 (G-5), 108,39 (R-4), 98,75 (Glu-1), 73,51 (Glu-3), 73,05 (Glu-5), 72,22 (Glu-2), 70,61 (Glu-4), 67,08 (A-1), 61,33 (R-6), 60,94 (Glu-6), 43,05 (A-8), 29,48 (A-7), 29,35 (A-2), 29,05 (A-5), 28,74 (A-4), 26,31 (A-6), 25,84 (A-3)

6.5.13 2-Amino-6-(5-bromothienyl)-9-(octyl- β -D-gluco-pyranosid)-purin (5-BTGG)



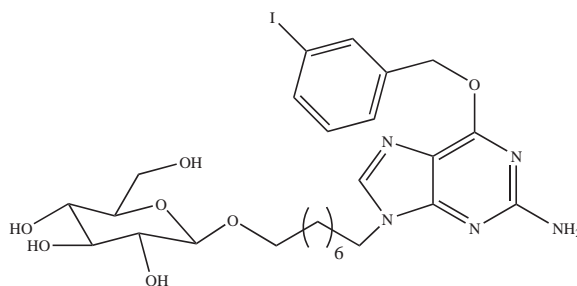
Wie in 6.5.9 beschrieben, wurden 130 mg 2-Amino-6-(5-bromothienyl)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-gluco-pyranosid)-purin **23** (0,13 mmol) in 5,5 mL trockenem Methanol mit 0,24 mL einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung versetzt. Vollständige Klärung der Lösung trat erst bei Zugabe der Methanolatlösung ein. Nach 4,5 h wurde die Reaktionsmischung neutralisiert und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Chloroform:Methanol, 5:1, $R_f = 0,47$) gereinigt. Nach Trocknen im Vakuum (1×10^{-3} mbar) konnte 5-BTGG als gelblicher, flockiger Feststoff in einer Ausbeute von 60 % isoliert werden (48 mg, 0,08 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,88 (s, 1H, G-8), 7,16 (d, 1H, R-4), 7,14 (d, 1H, R-3), 6,50 (s, 2H, NH_2), 5,59 (s, 2H, R-6), 4,92 (d, 1H, Glu-3), 4,87 (dd, 1H, Glu-4), 4,45 (t, 1H, Glu-2), 4,10 (d, 1H, Glu-1, $^3\text{J} = 7,63$ Hz), 3,99 (t, 1H, Glu-5), 3,74 (dd, 1H, Glu-6a), 3,65 (dd, 1H, Glu-6b), 3,40 (m, 2H, A-8), 3,33 (s, 5H, OH), 3,12 (m, 1H, A-1a), 2,94 (m, 1H, A-1b), 1,76 (m, 2H, A-7), 1,49 (m, 2H, A-2), 1,25 (m, 8H, A-6, A-5, A-4, A-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 159,58 (G-2), 159,49 (G-6), 154,84 (G-4), 140,91 (R-2), 140,44 (G-8), 130,24 (R-4), 129,92 (R-3), 113,82 (G-5), 113,32 (R-5), 103,10 (Glu-1), 77,05 (Glu-3), 73,70 (Glu-5), 70,36 (Glu-2), 68,78 (Glu-4), 67,68 (A-1), 61,36 (Glu-6, R-6), 42,95 (A-8), 29,47 (A-7), 29,46 (A-2), 29,02 (A-5), 28,73 (A-4), 26,23 (A-6), 25,67 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 656,06 (13) $[\text{M} + \text{K}]^+$, 640,13 (85) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 616,11 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 374,10 (12) $[\text{M-C}_8\text{Glu} + 2 \text{Na}]^+$

6.5.14 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin (IBGG)



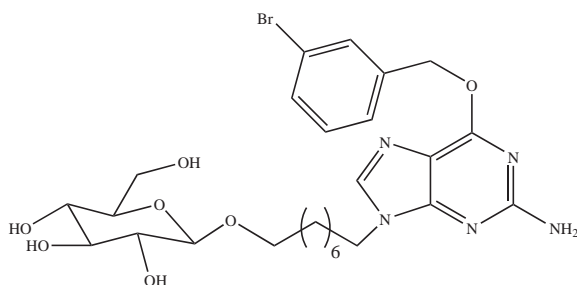
Unter Lichtausschluss wurden analog zu 6.5.9 180 mg 2-Amino-6-(3-iodbenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **21** (0,17 mmol) in 5 mL trockenem Methanol mit 0,1 mL einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde nach 2,5 h neutralisiert. Es wurden 70 mg IBGG (64 %, 0,11 mmol) nach säulenchromatographischer Reinigung (Chloroform:Methanol, 5:1, $R_f = 0,54$) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,97 (s, 2H, G-8, R-2), 7,75 (d, 1H, R-4), 7,51 (d, 1H, R-6), 7,21 (t, 1H, R-5), 6,54 (s, 2H, NH_2), 5,42 (s, 2H, R-7), 4,94 (t, 1H, Glu-3), 4,83 (t, 1H, Glu-4), 4,52 (t, 1H, Glu-2), 4,11 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 7,82$ Hz), 4,02 (t, 1H, Glu-5), 3,74 (dd, 1H, Glu-6a), 3,65 (dd, 1H, Glu-6b), 3,42 (m, 2H, A-8), 3,32 (s, 5H, OH), 3,13 (m, 1H, A-1a), 2,96 (m, 1H, A-1b), 1,72 (t, 2H, A-7), 1,52 (t, 2H, A-2), 1,23 (m, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 160,02 (G-2), 159,97 (G-6), 154,72 (G-4), 140,33 (G-8), 139,74 (R-1), 136,92 (R-2, R-6), 130,95 (R-5), 128,02 (R-4), 113,95 (G-5), 103,11 (Glu-1), 95,02 (R-3), 79,42 (Glu-3), 77,32 (Glu-5), 73,72 (Glu-2), 70,11 (Glu-4), 68,83 (A-1), 66,02 (R-7), 61,43 (Glu-6), 42,94 (A-8), 29,41 (A-7), 29,02 (A-2), 28,74 (A-5), 28,31 (A-4), 26,21 (A-6), 25,72 (A-3)

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 680,5 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 658,5 (19) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 496,4 (39) $[\text{M-Glu} + \text{H}]^+$

6.5.15 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin (IBGG)



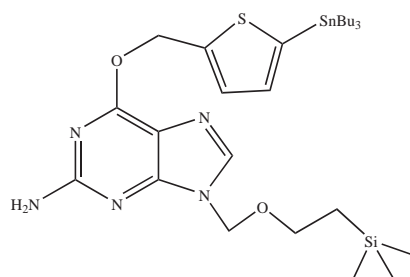
Analog zu 6.5.9 wurden 270 mg 2-Amino-6-(3-brombenzyloxy)-9-(octyl-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid)-purin **22** (0,26 mmol) in 8 mL trockenem Methanol mit 0,23 mL einer frisch hergestellten Natriummethanolatlösung umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 3,5 h beendet. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung (Chloroform:Methanol, 5:1, $R_f = 0,47$) wurden 120 mg BBGG (0,2 mmol) als weißer, flockiger Feststoff erhalten, was einer Ausbeute von 76 % entspricht.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 7,89 (s, 1H, G-8), 7,74 (s, 1H, R-2), 7,55 (q, 2H, R-4, R-6), 7,43 (t, 1H, R-5), 6,55 (s, 2H, NH₂), 5,54 (s, 2H, R-7), 4,96 (m, 2H, Glu-4, Glu-3), 4,52 (t, 1H, Glu-2), 4,13 (d, 1H, Glu-1, ³J = 7,92 Hz), 4,03 (t, 1H, Glu-5), 3,75 (dd, 1H, Glu-6a), 3,64 (dd, 1H, Glu-6b), 3,41 (m, 2H, A-8), 3,31 (s, 5H, OH), 3,13 (m, 1H, A-1a), 2,98 (m, 1H, A-1b), 1,84 (m, 2H, A-7), 1,54 (m, 2H, A-2), 1,31 (m, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 160,01 (G-2), 159,84 (G-6), 154,72 (G-4), 140,33 (G-8), 139,81 (R-1), 131,12 (R-5, R-4), 130,92 (R-2), 127,65 (R-6), 121,93 (R-3), 113,94 (G-5), 103,12 (Glu-1), 79,44 (Glu-3), 77,12 (Glu-5), 73,75 (Glu-2), 70,31 (Glu-4), 68,85 (A-1), 66,12 (R-7), 61,43 (Glu-6), 42,96 (A-8), 29,41 (A-7, A-2), 29,08 (A-5), 28,74 (A-4), 26,21 (A-6), 25,71 (A-3)

6.6 Darstellung der Markierungsvorläufer

6.6.1 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin (Sn-TGSI) mittels präparativer Dünnschichtchromatographie



Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden 50 mg ITGSI (0,1 mmol) in 4 mL trockenem Dioxan gelöst und 371 mg Hexabutyldistannan (0,64 mmol) und 35 mg Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid (0,05 mmol) zugegeben. Die Suspension wurde auf 105 °C erhitzt und 2 h gerührt. Dabei färbte sich schwarz. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in 2 mL Essigester aufgenommen. Der Katalysator wurde über einen Spritzenfilter (Porenweite 1 μm) abgetrennt, wobei eine orange, klare Lösung erhalten wurde. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte die weitere Reinigung des Rohproduktes mittels präparativer DC (n-Hexan:Essigester, 3:2, R_f = 0,48). Es wurden 12 mg eines gelben Öles erhalten (18 %, 0,018 mmol). Das Produkt ist luftempfindlich und muss unter Argon bei -18 °C gelagert werden.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 7,98 (s, 1H, G-8), 7,41 (d, 1H, R-4), 7,11 (d, 1H, R-3), 6,64 (s, 2H, NH₂), 5,71 (s, 2H, S-1), 5,45 (s, 2H, R-6), 3,61 (t, 2H, S-3), 1,64 (dd, 6H, B-2), 1,31 (dd, 6H, B-3), 1,13 (t, 6H, B-1), 0,91 (m, 11H, S-4, B-4), -0,10 (s, 9H, SiMe₃)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) 160,14 (G-2), 159,89 (G-6), 154,91 (G-4), 140,73 (G-8), 132,24 (R-2), 131,75 (R-3), 129,12 (R-4), 115,01 (G-5), 77,23 (R-5), 71,34 (S-2), 65,84 (S-3), 61,25 (R-6), 28,05 (B-2), 26,54 (B-3), 17,43 (S-4), 13,92 (B-4), 10,72 (B-1), -1,11 (SiMe₃)

¹¹⁹Sn-NMR (149 MHz, DMSO-d₆): (δ / ppm) -40,92

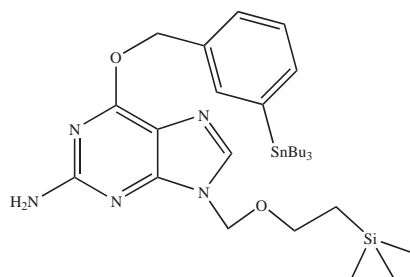
ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 690,7 (5) [M + Na]⁺, 668,7 (100) [M + H]⁺, 610,6 (10) [M-Bu + H]⁺, 342,5 (35) [M-SnBu₃-SiMe₃ + Na + K]⁺, 276,4 (40) [SnBu₂ + K]⁺

6.6.2 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin (SnTGSi) mittels Säulenchromatographie

Unter einer Argonschutzgasatmosphäre wurden 100 mg ITGSi (0,2 mmol) in 6 mL trockenem Dioxan mit 742 mg Hexabutyldistannan (1,3 mmol) und 70 mg Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid (0,1 mmol) bei 105 °C für 2,5 h umgesetzt. Die Suspension wurde auf Kieselgel adsorbiert und mittels Säulenchromatographie gereinigt. Nach Waschen der Säule mit etwa 50 mL reinem n-Hexan wurde das Produkt mittels n-Hexan:Essigester (3:2, $R_f = 0,48$) als Eluent isoliert. Es wurden 6 mg SnTGSi (7 %, 9×10^{-3} mmol) als gelbes Öl erhalten.

NMR- und Massendaten siehe 6.6.1

6.6.3 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin (SnBGSi) mittels präparativer Dünnschichtchromatographie



Wie in 6.6.1 beschrieben, wurden 50 mg IBGSi (0,1 mmol) in 3 mL trockenem Dioxan gelöst und mit 371 mg Hexabutyldistannan (0,64 mmol) und 35 mg Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid (0,05 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 1,5 h beendet und das Rohprodukt nach oben beschriebener Aufarbeitung mittels präparativer DC (n-Hexan:Essigester, 3:2, $R_f = 0,46$) gereinigt. Es wurden 20 mg SnBGSi (30 %, 0,03 mmol) als farbloses Öl erhalten. Der Stannylvorläufer ist luftempfindlich und wurde unter einer Argonschutzgasatmosphäre bei -18 °C gelagert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 7,99 (s, 1H, G-8), 7,65 (s, 1H, R-2), 7,43 (m, 3H, R-4, R-5, R-6), 6,54 (s, 2H, NH_2), 5,53 (s, 2H, S-1), 5,45 (s, 2H, R-7), 3,62 (t, 2H, S-3), 1,52 (dd, 6H, B-2), 1,31 (dd, 6H, B-3), 1,13 (t, 6H, B-1), 0,92 (m, 11H, S-4, B-4), 0,13 (s, 9H, SiMe_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 160,13 (G-2), 159,95 (G-6), 154,92 (G-4), 141,63 (R-3), 140,72 (G-8), 136,42 (R-1), 136,33 (R-4), 136,15 (R-5), 128,64 (R-2), 128,21 (R-6), 115,09 (G-5), 71,53 (S-2), 67,23 (R-7), 65,81 (S-3), 28,83 (B-2), 26,91 (B-3), 17,44 (S-4), 13,83 (B-4), 9,42 (B-1), -1,13 (SiMe_3)

$^{119}\text{Sn-NMR}$ (149 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) -42,12

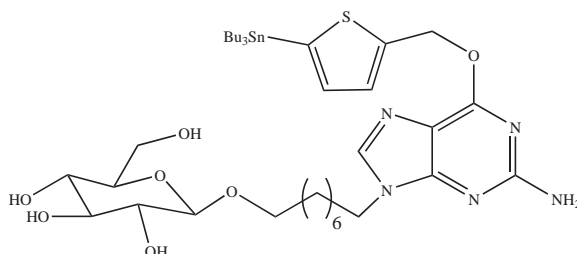
ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 725,62 (39) $[\text{M} + \text{Na} + \text{K}]^+$, 684,5 (100) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 662,4 (58) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 604,5 (33) $[\text{M-Bu} + \text{H}]^+$, 569,3 (6) $[\text{M-2Bu} + \text{Na}]^+$, 454,4 (26) $[\text{M-2Bu-Si} + \text{K}]^+$, 276,1 (43) $[\text{SnBu}_2 + \text{K}]^+$, 219,9 (79) $[\text{HSnBu} + \text{K}]^+$

6.6.4 2-Amino-6-(3-(tri-n-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(2-trimethylsilanyl-ethoxymethyl)-purin (SnBGSi) mittels Säulenchromatographie

Wie in 6.6.2 beschrieben, wurden zu 100 mg IBGSi (0,2 mmol) in 6 mL trockenem Dioxan 742 mg Hexabutyldistannan (1,3 mmol) und 70 mg Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid (0,1 mmol) gegeben. Die Suspension wurde bei 105 °C 2,5 h gerührt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionsmischung auf Kieselgel adsorbiert und mittels Säulenchromatographie gereinigt. Zunächst erfolgte die Elution mit n-Hexan und zur Elution des Produktes mit n-Hexan:Essigester (3:2 $R_f = 0,46$). SnBGSi konnte als weißer, kristalliner Feststoff in einer Ausbeute von 45 % (59 mg, 0,09 mmol) isoliert werden.

NMR- und Massendaten siehe 6.6.3

6.6.5 2-Amino-6-(5-(tri-n-butylstannyl)-thenyl)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin (SnTGG)



Analog der Reaktion in 6.6.1 wurden unter einer Argonschutzgasatmosphäre 108 mg 5-BTGG (0,18 mmol) in 5 mL trockenem Dioxan gelöst und mit 649 mg Hexabutyldistannan (1,1 mmol) und 61 mg Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid (0,09 mmol) bei 105 °C für 4 h umgesetzt. Nach Abkühlen wurden der Katalysator über einen Spritzenfilter (Porenweite 1 μm) abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Säulenchromatographie (Chloroform:Methanol, 4,5:1, $R_f = 0,51$). SnTGG konnte in einer Ausbeute von 74 % (107 mg, 0,13 mmol) als weißer, flockiger Feststoff isoliert werden. Da die Stannylverbindung luftempfindlich ist, wurde sie unter einer Argonschutzgasatmosphäre bei -18 °C gelagert.

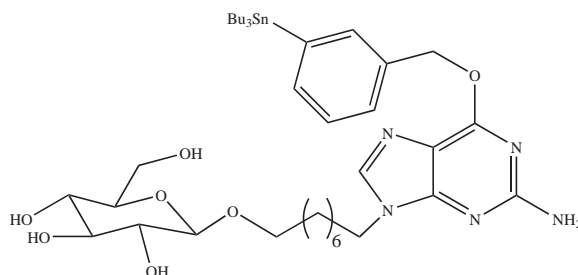
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 7,86 (s, 1H, G-8), 7,73 (d, 1H, R-4), 7,64 (d, 1H, R-3), 6,45 (s, 2H, NH_2), 5,71 (s, 2H, R-6), 4,93 (dd, 1H, Glu-3), 4,82 (d, 1H, Glu-4), 4,41 (t, 1H, Glu-2), 4,11 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 7,90$ Hz), 4,01 (t, 1H, Glu-5), 3,72 (dd, 1H, Glu-6a), 3,63 (dd, 1H, Glu-6b), 3,51 (m, 2H, A-8), 3,33 (s, 5H, OH), 3,12 (m, 1H, a-1a), 2,95 (m, 1H, A-1b), 1,74 (m, 2H, A-7), 1,60 (dd, 6H, B-2), 1,50 (dd, 6H, B-3), 1,31 (m, 2H, A-2), 1,13 (m, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6), 1,03 (t, 6H, B-1), 0,86 (m, 9H, B-4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 159,79 (G-2), 159,36 (G-6), 156,92 (G-4), 142,32 (R-2), 140,22 (G-8), 128,92 (R-4), 121,91 (R-3), 118,23 (R-5), 112,11 (G-5), 100,33 (Glu-1), 77,02 (Glu-3), 74,72 (Glu-5), 73,73 (Glu-2), 70,31 (Glu-4), 68,61 (A-1), 61,32 (Glu-6), 60,21 (R-6), 42,93 (A-8), 29,41 (A-7), 28,82 (A-2), 28,02 (B-2, A-5), 27,92 (A-4), 26,82 (A-6), 26,51 (A-3), 21,29 (B-3), 13,93 (B-4), 9,92 (B-1)

$^{119}\text{Sn-NMR}$ (149 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) -41,32

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 850,7 (5) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 827,2 (4) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 597,4 (53) $[\text{M-Glu-Bu} + 3\text{H}]^+$, 481,4 (8) $[\text{M-Glu-3Bu} + \text{H}]^+$, 332,2 (100) $[\text{HSnBu} + \text{K} + 2\text{H}]^+$, 276,1 (93) $[\text{SnBu}_2 + \text{K}]^+$, 220,0 (33) $[\text{HSnBu} + \text{K}]^+$

6.6.6 2-Amino-6-(3-(tri-*n*-butylstannyl)-benzyloxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin (Sn-BGG)



Wie in 6.6.5 beschrieben, wurden 87 mg IBGG (0,13 mmol) in 4 mL trockenem Dioxan mit 487 mg Hexabutyldistannan (0,83 mmol) und 46 mg Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid (0,07 mmol) bei 105 °C für 4 h umgesetzt. Der Katalysator wurde über einen Spritzenfilter (Porenweite 1 μ m) abgetrennt und nach Säulenchromatographie (Chloroform:Methanol, 4,5:1, $R_f = 0,62$) wurde SnBGG in einer Ausbeute von 97 % (110 mg, 0,13 mmol) als gelbes Öl isoliert. Der Stannylvorläufer ist luftempfindlich und wurde unter Argon bei -18 °C aufbewahrt.

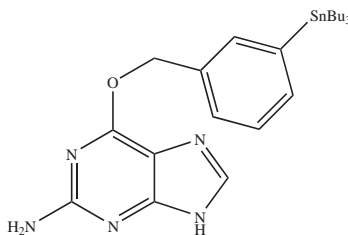
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 7,95 (s, 1H, R-2), 7,90 (s, 1H, G-8), 7,62 (d, 1H, R-4), 7,51 (d, 1H, R-6), 7,42 (t, 1H, R-5), 6,45 (s, 2H, NH₂), 5,52 (s, 2H, R-7), 5,02 (dd, 1H, Glu-3), 4,91 (d, 1H, Glu-4), 4,52 (t, 1H, Glu-2), 4,21 (d, 1H, Glu-1, $^3J = 7,63$ Hz), 3,99 (t, 1H, Glu-5), 3,82 (dd, 1H, Glu-6a), 3,61 (dd, 1H, Glu-6b), 3,32 (s, 5H, OH), 3,41 (m, 2H, A-8), 3,21 (m, 1H, A-1a), 3,03 (m, 1H, A-1b), 1,72 (m, 2H, A-7), 1,62 (q, 6H, B-2), 1,51 (m, 2H, A-2), 1,33 (m, 6H, B-3), 1,23 (t, 6H, B-1), 1,11 (m, 8H, A-3, A-4, A-5, A-6), 0,93 (m, 9H, B-4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) 159,75 (G-2), 159,36 (G-6), 156,31 (G-4), 140,11 (G-8), 132,33 (R-3), 131,82 (R-1), 130,92 (R-5), 129,11 (R-4), 128,43 (R-2), 127,76 (R-6), 114,59 (G-5), 103,11 (Glu-1), 77,12 (Glu-3), 75,12 (Glu-5), 73,73 (Glu-2), 70,31 (Glu-4), 68,62 (A-1), 67,11 (R-7), 61,32 (Glu-6), 42,90 (A-8), 29,54 (A-7), 28,82 (A-2), 28,32 (A-4), 27,93 (B-2, A-5), 26,92 (A-6), 26,53 (A-3), 21,21 (B-3), 13,91 (B-4), 9,42 (B-1)

$^{119}\text{Sn-NMR}$ (149 MHz, DMSO- d_6): (δ / ppm) -41,93

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 880,5 (12) [M + Na + K]⁺, 557,5 (13) [M-Glu + Na]⁺, 529,4 (9) [M-Glu + H]⁺, 413,3 (23) [M-Glu-2Bu + H]⁺, 230,1 (69) [SnBu₂ + H]⁺, 120,9 (100) [SnH₂ + H]⁺

6.6.7 2-Amino-6-(3-(tri-*n*-butylstannyl)-benzyloxy)-9H-purin (SnBG)



Analog der Reaktion in 6.6.1 wurden 100 mg IBG (0,27 mmol) in 6 mL trockenem Dioxan mit 1,57 g Hexabutyldistannan (2,7 mmol) und 60 mg Bis(triphenylphosphin)palladium-(II)-chlorid (0,09 mmol)

umgesetzt. IBG löste sich erst bei 50 °C vollständig. Die Reaktionsmischung wurde bei 105 °C 23 h gerührt und die nun dunkle Reaktionsmischung auf Kieselgel adsorbiert. Bei der säulenchromatographischen Reinigung wurde zunächst mit n-Hexan eluiert. Die Isolation des Produktes erfolgte mit Essigester:Methanol (95:5, $R_f = 0,50$), wobei 34 mg SnBG (0,06 mmol) als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 24 % erhalten wurden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 12,51 (s, 1H, NH), 7,80 (s, 1H, G-8), 7,55 (s, 1H, R-2), 7,39 (m, 3H, R-4, R-5, R-6), 6,27 (s, 2H, NH_2), 1,49 (q, 6H, B-2), 1,26 (q, 6H, B-3), 1,03 (t, 6H, B-1), 0,82 (t, 9H, B-4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) 160,15 (G-2), 159,92 (G-6), 155,48 (G-4), 141,64 (R-3), 138,01 (G-8), 136,28 (R-1), 131,69 (R-4), 129,07 (R-2), 128,57 (R-6), 128,22 (R-5), 113,80 (G-5), 67,04 (R-7), 28,83 (B-2), 26,92 (B-3), 13,76 (B-4), 9,40 (B-1)

$^{119}\text{Sn-NMR}$ (149 MHz, DMSO-d_6): (δ / ppm) -42,15

ESI-MS: (m/z, % rel. Int.) 570,29 (5) $[\text{M} + \text{K}]^+$, 553,87 (18) $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 532,19 (100) $[\text{M} + \text{H}]^+$

6.7 Radioiodierungen

Die Markierungsvorläufer wurden durch Aufteilen einer entsprechenden Menge der jeweiligen Stammlösung in trockenem Methanol und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum zu Portionen von 50 μg in Eppendorf-Gefäßen abgepackt. Die Gefäße wurden mit Argon geflutet, in Folie eingeschweißt und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Radioiodierungen wurden die abgepackten Markierungsvorläufer in 50 μL absolutem Ethanol gelöst, so dass eine Konzentration der Stannylverbindung von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ resultierte.

Je nach Zweck der Radioiodierung wurde ein Aliquot von 5 - 10 μL der $\text{Na}[^{131}\text{I}]\text{I}$ -Lösung mit Wasser verdünnt, um die gewünschte Aktivitätsmenge zu erhalten. Von der verdünnten Lösung wurden pro Radioiodierung 10 μL eingesetzt. Für die Iodierungen mit Iod-123 wurde genauso verfahren.

6.7.1 Identifizierung der radioiodierten Produkte

Die Identifizierung der radioiodierten Produkte erfolgte sowohl mittels Radio-DC als auch Radio-HPLC. Für die Radio-DC wurden bei den entsprechenden Reaktionszeiten Aliquots von 5 μL entnommen und ohne zu Quenchen auf eine zurechtgeschnittene DC-Folie (60 F₂₅₄, Merck) aufgetragen. Die DC-Folien wurden über eine Laufstrecke von 6 cm in dem für die jeweilige Verbindung geeigneten Laufmittel entwickelt. Die so erhaltene Radio-DC wurde am Instant Imager ausgewertet. Eine Identifizierung der Produkte erfolgte über ihre R_f -Werte, die unter identischen Bedingungen zuvor mit den kalten Standardverbindungen ermittelt wurden. Unter allen Laufmittelbedingungen ist der R_f -Wert von $[\text{}^{131}\text{I}]\text{Iodid}$ bzw. $[\text{}^{123}\text{I}]\text{Iodid}$ 0,0. Zur Entwicklung der Radio-DCs wurde eines der folgenden Laufmittelgemische verwendet:

- **Glucose-Konjugate:** Chloroform:Methanol, 4:1 (A)
- **nicht-glycosylierte Derivate:** Toluol:Methanol, 4:1 (B)

Die so erhaltenen R_f -Werte sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Zur Identifizierung der radioiodierten Produkte mittels HPLC wurden das System I und eine der beiden angegebenen HPLC-Säulen (siehe 6.1) verwendet. Die Identifizierung der Produkte erfolgte über ihre Retentionszeiten t_R unter den entsprechenden Laufmittelbedingungen. Die Retentionszeiten wurden zuvor mit den inaktiven Standardverbindungen bestimmt. Um eine sichere Identifizierung zu gewährleisten, wurde der radioaktiven Reaktionslösung ein wenig der inaktiven Standardverbindung zugesetzt und der so erhaltene Peak im UV-Chromatogramm dem im Radioaktivitätschromatogramm zugeordnet. Für die Identifizierung und die Qualitätskontrolle der radioiodierten Verbindungen wurden Aliquots der Reaktions- bzw. der Produktlösung von 20 μL injiziert. Die Elution erfolgte je nach Verbindung mit einem der folgenden Laufmittel:

- **Glucose-Konjugate:** linearer Gradient: beginnend mit 90 % Wasser und 10 % Acetonitril, innerhalb von 20 min auf 100 % Acetonitril, 20 bis 30 min 100 % Acetonitril; Flussrate: 1 mL/min (LiChrospher) bzw. 0,5 mL/min (SDV) (C)
- **nicht-glycosylierte Derivate:** isokratisch: 67 % Wasser, 33 % Acetonitril; Flussrate: 1 mL/min (LiChrospher) bzw. 0,5 mL/min (SDV) (D).

Die Retentionszeiten der Verbindungen unter diesen Bedingungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Die Bestimmung der radiochemischen Ausbeute (RCA) erfolgte entweder mittels Auswertung der Radioaktivitätschromatogramme der DC oder der HPLC.

6.7.2 HPLC-Abtrennung der radioiodierten Verbindungen

Zur Isolierung des radioaktiven Produktes wurde die gesamte Reaktionslösung auf die HPLC aufgegeben. Für die Elution wurde das jeweils für die Verbindung geeignete Laufmittelsystem gewählt und die Fraktion, die das radioiodierte Produkt enthielt, aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum (etwa 1×10^{-1} mbar) bei < 30 °C entfernt und die zurückbleibende Aktivität in einem für die weiteren Untersuchungen geeigneten Lösungsmittel aufgenommen. Zur Lagerung war absolutes Ethanol am besten geeignet, für Tier- oder Zellversuche wurde physiologische Kochsalzlösung mit 1 % DMSO oder Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 % DMSO verwendet. Zur Qualitätskontrolle wurde ein Aliquot der so erhaltenen radioaktiven Lösung erneut auf die HPLC aufgegeben und auf radiochemische Reinheit geprüft.

6.7.3 ^{131}I -Iodierung von SnTGG mit Chloramin T im Sauren

Zu 25 μL des Markierungsvorläufers SnTGG in 25 μL absolutem Ethanol wurden in einem Eppendorf-Gefäß 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 3 μL 2 N HCl und 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Wasser) gegeben. Nach 3 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde die RCA mittels Radio-DC bestimmt. Die RCA von [^{131}I]ITGG betrug 1 %. Unter den sauren Bedingungen wurde [^{131}I]Iodothethylalkohol abgespalten.

6.7.4 Allgemeine Vorschrift zur ^{131}I -Iodierung mit CAT im Neutralen

In einem Eppendorf-Gefäß wurden zu 25 μL einer ethanolischen Lösung des jeweiligen Stannylvorläufers (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 10 μL der [^{131}I]Iodid-Lösung gegeben. Die Zugabe des Phosphatpuffers (pH 7,0) wurde zwischen 10 und 25 μL variiert und die der CAT-Lösung (1,5 mg/mL in Wasser oder Phosphatpuffer, pH 7,0) zwischen 2,5 - 15 μL . Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur und die RCA wurde nach 1, 3, 5, 10 und 20 Minuten untersucht. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurde ein Aliquot von 5 μL auf eine DC-Folie aufgetragen. Sollte eine HPLC-Abtrennung des Produktes erfolgen, wurde die gesamte Reaktionslösung auf die HPLC aufgegeben und verfahren wie in 6.7.2 beschrieben.

6.7.5 Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnTGG

Zu 25 μL der ethanolischen Lösung von SnTGG (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurden 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0) und 7,5 μL CAT-Lösung (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer) gegeben. Die Reaktionslösung wurde nach 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die HPLC aufgegeben und die Produktfraktion aufgefangen. [^{131}I]ITGG konnte in einer Ausbeute von 94 ± 1 % und einer radiochemischen Reinheit $> 99,9$ % isoliert werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 6.7.2 beschrieben.

6.7.6 Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnBGG

Die optimierte Radioiodierung von SnBGG erfolgte analog der von SnTGG (siehe 6.7.5), aber es wurden 10 μL CAT-Lösung (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer) verwendet. Nach 5 Minuten betrug die radiochemische Ausbeute von [^{131}I]IBGG 89 ± 1 % mit einer radiochemischen Reinheit $> 99,2$ %.

6.7.7 Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnTGSi

Zu 25 μL der ethanolischen Lösung von SnTGSi (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurden 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0) und 2,5 μL CAT-Lösung (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer) gegeben. Nach 5

Minuten bei Raumtemperatur betrug die radiochemische Ausbeute von [^{131}I]ITGSi $88 \pm 7 \%$. Zur Entschützung an N⁹ wurde das Lösungsmittel im Vakuum (etwa 1×10^{-1} mbar) bei $< 30 \text{ }^\circ\text{C}$ entfernt und zum Rückstand $50 \mu\text{L}$ Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1 M in THF) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 25 Minuten auf $68 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt, anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Aufnahme der Aktivität in $20 \mu\text{L}$ absolutem Ethanol wurde diese auf die HPLC aufgegeben und die Produktfraktion aufgefangen. [^{131}I]ITG konnte in einer radiochemischen Ausbeute von $72 \pm 5 \%$ und einer radiochemischen Reinheit $> 99 \%$ isoliert werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie oben (6.7.2) beschrieben.

6.7.8 Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnBGSi

Die optimierte Radioiodierung erfolgte analog der von SnTGSi (siehe 6.7.7). Nach 5 Minuten wurde [^{131}I]IBGSi in einer radiochemischen Ausbeute von $95 \pm 2 \%$ erhalten. Nach der Entschützung an der N⁹-Position des Guanins und HPLC-Aufreinigung konnte [^{131}I]IBG in $82 \pm 7 \%$ radiochemischer Ausbeute und einer radiochemischen Reinheit von $> 99,4 \%$ isoliert werden.

6.7.9 Optimierte ^{131}I -Iodierung von SnBG

Zu $25 \mu\text{L}$ der ethanolischen Lösung von SnBG ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurden $10 \mu\text{L}$ [^{131}I]Iodid-Lösung, $10 \mu\text{L}$ Phosphatpuffer (pH 7,0) und $2,5 \mu\text{L}$ CAT-Lösung ($1,5 \text{ mg/mL}$ in Phosphatpuffer) gegeben. Die Reaktionslösung wurde nach 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die HPLC aufgegeben und die Produktfraktion aufgefangen. [^{131}I]IBG konnte in einer Ausbeute von $99 \pm 0,5 \%$ und einer radiochemischen Reinheit $> 99,9 \%$ isoliert werden. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in 6.7.2 beschrieben.

6.7.10 ^{131}I -Iodierung mit IodogenTM als Oxidationsmittel

In ein mit $10 \mu\text{g}$ IodogenTM beschichtetes Glasvial wurden $15 \mu\text{L}$ einer ethanolischen Lösung des jeweiligen Markierungsvorläufers ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), $10 \mu\text{L}$ [^{131}I]Iodid-Lösung und $10 \mu\text{L}$ Phosphatpuffer (pH 7,0) gegeben. Die radiochemische Ausbeute wurde nach 3 und 5 Minuten mittels Radio-DC bestimmt.

6.7.11 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von [^{131}I]IBGG wurde mit HPLC-System II und der LiChrospher-Säule (siehe 6.1) eine UV-Kalibrationsgerade mit der inaktiven Standardverbindung IBGG ($0,5 \text{ mg/mL}$, $0,1 \text{ mg/mL}$, $0,05 \text{ mg/mL}$ und $0,01 \text{ mg/mL}$) bei 254 nm aufgenommen. Durch Injektion einer Probe von [^{131}I]IBGG bekannter Aktivität und Auswertung des UV-Chromatogramms kann die spezifische Aktivität der Verbindung berechnet werden.

6.7.12 Radioiodierungen mit [^{123}I]Iodid

Die ^{123}I -Iodierungen wurden jeweils unter den Bedingungen durchgeführt, die bei den ^{131}I -Iodierungen als optimal für den entsprechenden Markierungsvorläufer ermittelt wurden (siehe 6.7.5 - 6.7.9). Die radiochemischen Ausbeuten wurden nach 3 und 5 Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur bestimmt.

6.8 Bestimmung der Lipophilie

6.8.1 Bestimmung der Lipophilie mit der HPLC-Methode

Von Substanzen mit bekanntem logP-Wert wird über die Ermittlung der Retentionszeiten und die Bestimmung der Totzeit des HPLC-Systems die Kapazität K der jeweiligen Substanz bestimmt. Durch Erstellen einer Kalibrationsgeraden der ermittelten logK-Werte gegen die logP-Werte kann nach Bestimmung der Kapazität der zu untersuchenden Verbindung ihr logP-Wert berechnet werden. Für die Lipophilie-Bestimmung wurden eine LiChrospher-Säule und HPLC-System III verwendet (siehe 6.1). Als Laufmittel wurde Sörensenpuffer (Phosphatpuffer (pH 7,4) und Methanol, 25:75) benutzt. Die Totzeit des Systems wurde mit Ascorbinsäure bestimmt, die Kalibrationsgerade mit Benzaldehyd, Anisol, Toluol, 4-Bromanisol und 4-Iodanisol erstellt. Im gleichen System wurden die Retentionszeiten der zu untersuchenden Substanzen IBG, IBGG, ITG und ITGG bestimmt. Die Retentionszeiten aller Verbindungen wurden doppelt ermittelt und zur Auswertung der Mittelwert herangezogen. In Tabelle 33 sind die Retentionszeiten und die daraus errechneten Kapazitäten der Kalibrationssubstanzen zusammengefasst.

Tabelle 33: Substanzen zur Kalibration

| Substanz | logP | t _R / min | logK |
|---------------|-------|----------------------|-------|
| Ascorbinsäure | -1,67 | 1,99 | - |
| Benzaldehyd | 1,48 | 3,25 | -0,20 |
| Anisol | 2,11 | 4,60 | 0,12 |
| Toluol | 2,73 | 6,73 | 0,38 |
| 4-Bromanisol | 3,05 | 7,12 | 0,41 |
| 4-Iodanisol | 3,24 | 8,45 | 0,51 |

Die Retentionszeiten der zu untersuchenden Substanzen und die daraus errechneten Kapazitäten und logP-Werte sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Retentionszeiten und logP-Werte der MGMT-Inhibitoren

| Inhibitor | t _R / min | logK | logP |
|-----------|----------------------|-------|------|
| IBG | 4,02 | 0,01 | 1,93 |
| IBGG | 4,65 | 0,12 | 2,23 |
| ITG | 3,43 | -0,14 | 1,57 |
| ITGG | 3,83 | -0,03 | 1,83 |

6.8.2 Bestimmung der Lipophilie mit der Scheidetrichter-Methode

Mit den ¹³¹I-iodierten Substanzen wurde der Verteilungskoeffizient zwischen einer Octanol- und einer Wasserphase bestimmt, der ein Maß für die Lipophilie einer Substanz darstellt. Für die pH-Werte zwischen 5 und 8 wurde ein Kaliumdihydrogenphosphat-Natriumhydrogenphosphat-Puffersystem verwendet, für die pH-Werte zwischen 8,4 und 9,4 ein Glycin-Natronlauge-Puffersystem. Zu 1,5 mL der Pufferlösung und 150 µL n-Octanol (mit Wasser gesättigt) wurden jeweils 4,5 µL der ¹³¹I-iodierten Verbindung in absolutem Ethanol gegeben. Das Zweiphasensystem wurde für 3 Minuten bei Raumtemperatur durchmischt und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert. Auf eine DC-Folie wurden ein Aliquot von 2,5 µL der organischen Phase und 5 µL der wässrigen Phase aufgegeben. Die Radioaktivitätsverteilung in den beiden Phasen wurde mittels Radio-DC bestimmt. Die logP-Werte sind in Tabelle 35 zusammengefasst.

Tabelle 35: logP-Werte der radioiodierten Verbindungen nach der Scheidetrichter-Methode

| Substanz | logP | | | | | | | | | |
|-------------------------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|------|--------|
| | pH 5 | pH 5,4 | pH 6 | pH 6,4 | pH 7 | pH 7,4 | pH 8 | pH 8,4 | pH 9 | pH 9,4 |
| [¹³¹ I]IBG | 2,13 | 2,08 | 2,04 | 2,04 | 2,08 | 2,15 | 2,18 | 2,14 | 2,10 | 2,20 |
| [¹³¹ I]IBGG | 2,06 | 2,14 | 2,07 | 2,06 | 2,09 | 2,17 | 2,06 | 2,01 | 2,11 | 2,08 |
| [¹³¹ I]ITG | 1,82 | 1,83 | 1,81 | 1,86 | 1,85 | 1,85 | 1,88 | 1,85 | 1,84 | 1,86 |
| [¹³¹ I]ITGG | 2,07 | 2,08 | 1,96 | 2,00 | 1,98 | 2,09 | 2,13 | 2,05 | 2,03 | 2,11 |

6.9 *In vitro*- und *in vivo*-Evaluierungen

6.9.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte wurde im Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Zur Bestimmung der Inhibition von MGMT durch die verschiedenen Substanzen wurde HeLa S3 Zellextrakt (588 ± 86 fmol/mg Protein) verwendet, als Negativkontrolle HeLa MR Zellextrakt. Der Zellextrakt wurde mit definierten Mengen der zu untersuchenden Substanzen bei 37 °C in einer standardisierten Pufferlösung (pH 7,4) für 30 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten wurde ein Überschuss einer DNA-Probe, die zuvor mit [³H]Methylnitrosoharnstoff methyliert worden war (80000 cpm/Probe), zugesetzt. Nach 90 Minuten Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zusatz von TCA beendet, wobei das Protein (MGMT) ausgefällt wurde. Der Niederschlag wurde in 0,1 M Natronlauge aufgelöst und die Radioaktivität gemessen. Das Verhältnis von gemessener Aktivität zur Gesamtmasse an ausgefallenem Protein ist ein Maß für die durch den Inhibitor blockierte MGMT. Die Assays wurden auch mit intakten Zellen durchgeführt. In Tabelle 28 sind die so erhaltenen IC₅₀-Werte aufgelistet.

6.9.2 *In vitro*-Bindung der ¹³¹I-iodierten Inhibitoren an MGMT

Die Übertragungsstudien wurde im Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Zur Verifizierung, dass der radioiodierte Alkohol an O⁶ des Guanins wirklich auf MGMT übertragen wird, wurde gereinigte, menschliche MGMT verwendet. Zu 10 µg des gereinigten Proteins in einem Standardpuffersystem (pH 7,4) wurden etwa 50000 Counts des zu untersuchenden ¹³¹I-iodierten Inhibitors ([¹³¹I]IBG, [¹³¹I]IBGG, [¹³¹I]ITG, [¹³¹I]ITGG) und unterschiedliche Konzentrationen des jeweiligen inaktiven Inhibitors gegeben. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindung wurde der gleiche Assay mit BSA durchgeführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde das Protein durch Zusatz von 200 µg Träger-BSA und 1 mL kalter 12 %iger TCA ausgefällt. Das ausgefallte Protein wurde abfiltriert und mit 5 %iger TCA gewaschen. Die Radioaktivität, die auf dem Filter zurückblieb, wurde gemessen und ins Verhältnis zur jeweils eingesetzten Aktivität gesetzt. Der Assay wurde für jede Verbindung zweimal durchgeführt.

6.9.3 *Ex vivo*-Biodistributionsstudien mit den nca ¹³¹I-iodierten Verbindungen an tumortragenden Nacktmäusen

Die Tumore wurden den Mäusen im Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz implantiert.

Alle Biodistributionsstudien wurden mit männlichen, athymischen Nacktmäusen (Charles River), die 4 - 6 Wochen alt waren und etwa 25 g wogen, durchgeführt. Den tumortragenden Mäusen wurden 10 - 13 Tage vor dem Tierversuch subkutan MEX(+)- und MEX(-)-Zellen (HeLa S3 bzw. HeLa MR) in die rechte bzw. die linke Flanke injiziert. Pro Zeitpunkt und Verbindung wurden 4 - 8 Mäuse untersucht, von denen mindestens eine gesund war. Zur Injektion der n.c.a. ^{131}I -iodierten Substanz (^{131}I IBG, ^{131}I IBGG, ^{131}I ITG bzw. ^{131}I ITGG) wurden die Mäuse mit Ketanest STM anästhesiert. Pro Maus wurden etwa 400 kBq der radioaktiven Substanz in 250 μL physiologischer Kochsalzlösung mit 1 % DMSO in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden 0,5 h, 1 h, 4 h bzw. 8 h nach der Injektion (p.i.) des ^{131}I -iodierten MGMT-Inhibitors durch Genickbruch getötet. Die interessierenden Organe (Blut, Herz, Schilddrüse, Magen, Pankreas, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere, Lunge, Muskel und Gehirn) und die Tumore wurden entnommen und das Blut wurde abgetupft. Zur Bestimmung der injizierten Aktivitätsmenge wurde auch die Aktivität der Einstichstelle im Schwanz untersucht. Nach der Gewichtsbestimmung wurden die Proben durch Zusatz von Kalilauge und Ultraschallbehandlung bei 60 °C für 30 Minuten homogenisiert. Die im jeweiligen Organ gespeicherte Radioaktivität wurde an einem Germanium-Detektor (siehe 6.1) gemessen. Mit Hilfe von Injektionsstandards bekannter Radioaktivität wurde am gleichen Detektor eine Kalibrationsgerade erstellt. Die aus den Messungen der Proben erhaltenen Counts pro Sekunde (cps) konnten somit in Aktivitäten umgerechnet werden. Die ^{131}I -Aktivitätsaufnahme in die einzelnen Organe wurde als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) berechnet.

6.9.4 Ex vivo-Biodistributionsstudien mit nca ^{131}I IBG und ^{131}I IBGG nach Gabe von Phloretin an tumortragenden Nacktmäusen

Bei diesem Versuch wurden den Mäusen 10 - 13 Tage vor dem Tierversuch subkutan Glioblastom-Zellen in die rechte Flanke injiziert. Nach Betäubung mit Ketanest STM wurden jeweils 4 Mäusen (^{131}I IBGG) bzw. 5 Mäusen (^{131}I IBG) 30 Minuten vor der Injektion der radioaktiven Substanz 100 μL Phloretin-Lösung (40 mg/mL in physiologischer Kochsalzlösung mit 50 % DMSO) in die Schwanzvene injiziert. Als Kontrolle wurde jeweils 4 Mäusen nur die radioaktive Substanz appliziert. Pro Maus wurden etwa 900 kBq der nca ^{131}I -iodierten Substanz in 200 μL physiologischer Kochsalzlösung mit 1 % DMSO injiziert. Als Todeszeitpunkt wurde 1 h p.i. der radioiodierten Verbindung gewählt. Die Mäuse wurden wie oben beschrieben (6.9.3) getötet, die gleichen Organe entnommen und die Aktivitätsverteilung als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) bestimmt.

6.9.5 In vivo-Biodistributionsstudien mit nca ^{123}I IBG und ^{123}I IBGG an tumortragenden Nacktmäusen mittels Kleintier-SPECT

Bei der SPECT-Kamera handelt es sich um den I.S.E. YAP-(S)PET-Kleintierscanner. Zur Kalibration des Gerätes wurde ein planares Phantom mit einer ^{123}I Iodid-Lösung gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der YAP-(S)PET-Software von I.S.E.

Es wurden die gleichen Mäuse verwendet wie in 6.9.3 beschrieben. Pro Verbindung wurden zwei Mäuse untersucht. Zur Injektion der radioaktiven Substanzen ^{123}I IBG und ^{123}I IBGG wurden die Mäuse mit Ketanest STM anästhesiert. Es wurden zwischen 60 und 89 MBq der ^{123}I -iodierten Substanz injiziert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während der ganzen Untersuchung wurde den Mäusen ein intraperitonealer Zugang gelegt, über den das Anästhetikum nach Bedarf nachdosiert werden konnte. Zunächst wurden mit den Mäusen 1 h lang dynamische Scans der Tumorregion durchgeführt, danach ein statischer Scan des ganzen Körpers. Nach erfolgter Untersuchung wurden die Mäuse durch eine Überdosis des Narkotikums getötet. Bei den Mäusen, die ^{123}I IBGG injiziert bekommen hatten, wurde nach der SPECT-Untersuchung noch die *ex vivo*-Biodistribution an ausgewählten Organen

untersucht. Hierfür wurden die Proben wie oben beschrieben (6.9.3) homogenisiert und die Radioaktivitätsverteilung gemessen. Die erhaltenen Counts pro Sekunde wurden mittels einer Kalibrationsgeraden mit ^{123}I -Injektionsstandards in Aktivitäten umgerechnet. Die ^{123}I -Aktivitätsaufnahme in die einzelnen Organe wurde als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) berechnet.

7 Zusammenfassung

Eine häufig angewandte Art der Chemotherapie ist der Einsatz von alkylierenden oder chloralkylierenden Zytostatika, die u. a. eine Veränderung an der O⁶-Position des Guanins hervorrufen. Dies führt zur Apoptose der Tumorzellen. Wenn ein Tumor jedoch eine hohe Konzentration an O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT) besitzt, wird die beabsichtigte Wirkung der Zytostatika durch Reparatur der Veränderung an der O⁶-Position des Guanins durch MGMT wieder rückgängig gemacht. In diesem Falle wäre die Wahl von alkylierenden oder chloralkylierenden Medikamenten zur Chemotherapie nicht geeignet. Dies zu beurteilen setzt ein Verfahren zur Analytik der MGMT-Konzentration im konkreten Tumor/Patienten voraus.

Bislang ist die Bestimmung des MGMT-Status eines Tumors nur durch Entnahme von Gewebeprobe möglich. Es gibt keine Möglichkeit diesen nicht-invasiv *in vivo* zu ermitteln. Untersuchungen verschiedener radioaktiv markierter Inhibitoren der MGMT zu diesem Zweck waren aus diversen Gründen bislang nicht sehr erfolgreich [126–129, 133–135]. Um die Tumoraufnahme der MGMT-Inhibitoren zu verbessern, wurde u.a. auf das Konzept der Glucose-Konjugation zurückgegriffen, da eine Tumorzelle im Vergleich zu einer gesunden Zelle einen erhöhten Stoffwechselumsatz aufweist [123]. Die zunächst dargestellten ¹⁸F-fluorierten Guanin-Glucose-Derivate wurden wegen der schlechten radiochemischen Ausbeuten und der im Vergleich zu anderen MGMT-Inhibitoren geringeren Aktivität gegenüber MGMT jedoch nicht weiter untersucht [130, 131].

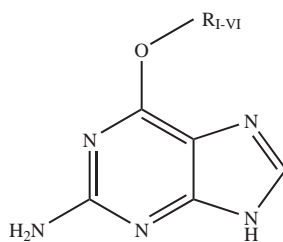
Ziel dieser Arbeit war es daher, an der N⁹-Position von Guanin Glucose-konjugierte neuartige O⁶-(Hetero)aryl-Guanin-Derivate zu synthetisieren, die mit geeigneten Radioiodisotopen markiert werden sollten. Um einen Vergleich mit den entsprechenden nicht-glycosylierten Verbindungen durchführen zu können, sollten auch diese dargestellt und radioiodiert werden. Wenn die Derivate positive *in vitro*-Eigenschaften (Inhibitionsaktivitäten) aufwiesen, sollten vergleichende *ex vivo*-Biodistributionsstudien an tumortragenden Nacktmäusen mit den ¹³¹I-iodierten Substanzen durchgeführt werden und gegebenenfalls auch *in vivo*-Kleintier-SPECT-Untersuchungen mit den entsprechenden ¹²³I-iodierten MGMT-Inhibitoren, um eine Aussage über ihre Eignung als potentielle Tracer des MGMT-Status eines Tumors *in vivo* zu erhalten.

Standardverbindungen

Für die Synthese der Standardverbindungen mussten zunächst die zur Kopplung an die O⁶-Position des Guanins benötigten Alkohole dargestellt werden, sofern sie nicht kommerziell erhältlich waren. Die Kopplung der Alkohole an die O⁶-Position des Guanins erfolgte entweder mit dem durch Natriumhydrid deprotonierte Alkohol und (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid **1** bei Raumtemperatur nach [106] oder bei der Verwendung von weniger reaktiven Alkoholen, die nicht instabil gegenüber erhöhten Temperaturen sind, unter DMAP-Katalyse bei 60 °C nach [139]. Die Guanin-Derivate O⁶-(5-Iodothienyl)guanin **7** (ITG), O⁶-(3-Iodbenzyl)guanin **8** (IBG), O⁶-(3-Brombenzyl)guanin **9** (BBG), O⁶-(4-Bromothienyl)guanin **3** (4-BTG), O⁶-(5-Bromothienyl)guanin **10** (5-BTG) und O⁶-Thienylguanin **6** (TG) konnten in Ausbeuten zwischen 40 und 97 % dargestellt werden (Abb. 81).

Diese Verbindungen wurden mit einem α - und/oder β -Glucose-Linker an der N⁹-Position umgesetzt. Teilweise wurden sie auch entweder direkt oder nach Schützung der N⁹-Position des Guanins zu den entsprechenden Markierungsvorläufern SnTGSi, SnBGSi oder SnBG umgesetzt.

Zum Erhalt der Glucose-Konjugate wurden die Guanin-Derivate im nächsten Schritt nach Deprotonierung an der N⁹-Position des Guanins durch Lithiumhydrid mit 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid **18** und/oder 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosid **19** umgesetzt, wobei die jeweils an der Glucose-Einheit benzylierten Verbindungen erhalten wurden. Die Umsetzung erfolgte entweder nach einer optimierten Synthesevorschrift [123] bei 80 °C oder bei Raumtemperatur. Die geschützten Guanin-Glucose-Konjugate wurden in moderaten Ausbeuten zwischen 14 und 50 % erhalten.



3, 6 - 10

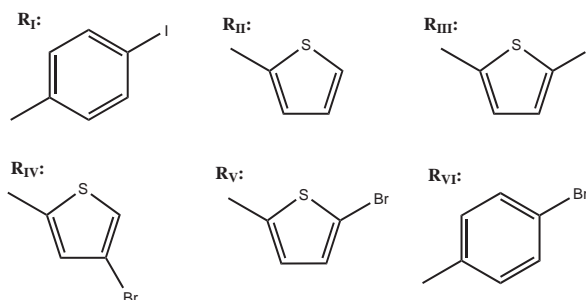


Abbildung 81: Dargestellte O⁶-substituierte Guanin-Derivate

Für die Verwendung der Derivate als Standardverbindungen oder für weitere Synthesen wurden die Substanzen an der Glucose-Einheit durch Zusatz von Natriummethanolat debenzoyliert. So wurden ITGG, ITGG α , IBGG, BBGG, TGG, 4-BTGG α und 5-BTGG in Ausbeuten zwischen 41 und 76 % dargestellt. Von diesen Verbindungen wurden teilweise die IC₅₀-Werte bestimmt, sie wurden zur Darstellung der Markierungsvorläufer eingesetzt oder selbst als Markierungsvorläufer verwendet.

IC₅₀-Werte

Um eine Aussage über die Aktivität der Guanin-Derivate gegenüber MGMT machen zu können, wurden die IC₅₀-Werte bestimmt. Generell war die Aktivität der Glucose-Konjugate gegenüber MGMT geringer als die der korrespondierenden nicht-glycosylierten Guanin-Derivate. In den meisten Fällen war die Aktivität der β -Glucose-Konjugate um einen Faktor 3 - 4,5 geringer. Nur bei ITG und seinem β -Glucose-Derivat war der Unterschied der beiden IC₅₀-Werte minimal. Es zeigte sich auch, dass die Aktivität der α -Glucose-Konjugate gegenüber MGMT noch einmal deutlich geringer war als die der β -Glucose-Konjugate, bei den 4-BTGG-Derivaten um einen Faktor > 10. Daher wurden für die Radioiodierungen und alle weiteren Untersuchungen immer die β -Glucose-Konjugate eingesetzt. Da alle IC₅₀-Werte im nM-Bereich waren, stand einer weiteren Untersuchung der Iodbenzyl- und der Iodothynguanin-Derivate nichts im Wege.

Markierungsvorläufer

Für die Darstellung der nicht-glycosylierten Markierungsvorläufer musste zunächst eine Schutzgruppe an der N⁹-Position der Guanin-Derivate eingeführt werden. Ähnlich einer von Vaidyanathan et al. [128] beschriebenen Vorschrift wurden die Guanin-Derivate ITG und IBG mit 2-Trimethylsilylethoxymethylchlorid umgesetzt und ITGSi bzw. IBGSi in moderaten Ausbeuten erhalten.

Die Radioiodierungen sollten elektrophil unter Einsatz der Stannylvorläufer durchgeführt werden. Für Stannilyierungsreaktionen am Aromaten werden häufig die Iod- oder Brom-haltigen entsprechenden Verbindungen mit Hexabutyl-distannan und einem Palladiumkatalysator umgesetzt. Wegen der unzureichenden Stabilität von ITGG musste die Darstellung von SnTGG mit 5-BTGG erfolgen, bei den anderen Derivaten war eine Verwendung der jeweiligen iodierten Substanzen zur Stannilyierung erfolgreich. Die Markierungsvorläufer SnTGG, SnBGG, SnTGSi und SnBGSi konnten in Ausbeuten zwischen 45 und 97 % erhalten werden. Die Entschützung der silylgeschützten Verbindungen

SnTGSi und SnBGSi erfolgte nach der Radioiodierung. Generell ist es jedoch erstrebenswert, nach der radioaktiven Markierung nur noch die Abtrennung des gewünschten Produktes durchführen zu müssen. Daher wurde analog einer Synthesevorschrift [129] auch die Darstellung der an N⁹-Position des Guanins ungeschützten Stannyl-Guanin-Derivate SnBG und SnTG versucht. Im Falle von SnBG gelang dies auch, bei SnTG jedoch nicht.

Radioiodierungen

Alle Radioiodierungen wurden zunächst unter Verwendung von [¹³¹I]Iodid optimiert. Eine direkte ¹³¹I-Iodierung von TGG, das keine Abgangsgruppe besitzt, war nicht erfolgreich. Daher wurden für die Radioiodierungen im Weiteren die stannylierten Markierungsvorläufer dargestellt, die unter milden Reaktionsbedingungen regioselektiv radioiodiert werden können.

Als Oxidationsmittel wurde Chloramin T (CAT) benutzt. Eine Verwendung von IodogenTM als Oxidationsmittel wirkte sich nachteilig auf die RCA aus, die Ergebnisse waren auch nicht so reproduzierbar wie mit CAT. Eine ¹³¹I-Iodierung unter sauren Bedingungen war nicht erfolgreich, da es hierbei zu einer nahezu quantitativen Abspaltung und Radioiodierung des Restes an der O⁶-Position des Guanins kam. Deshalb mussten neutrale Reaktionsbedingungen verwendet werden. Die optimierten radiochemischen Ausbeuten (RCA) der ¹³¹I-iodierten Verbindungen lagen zwischen 72 und 99 % mit radiochemischen Reinheiten > 99 % für alle Verbindungen.

Bei den Radioiodierungen der silylgeschützten Derivate war eine möglichst geringe CAT-Konzentration entscheidend, da es sonst zu einer Abspaltung des Restes an der O⁶-Position des Guanins kommen konnte. Die Entschützung von [¹³¹I]ITGSi und [¹³¹I]IBGSi wurde mit TBAF in THF bei etwa 70 °C durchgeführt. [¹³¹I]IBG wurde alternativ auch mit dem Markierungsvorläufer SnBG dargestellt.

Eine Lagerung der ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitoren in absolutem Ethanol war über einen Zeitraum von mehr als einem Monat ohne Zersetzungen der Verbindungen möglich. Für die entsprechenden *in vitro*- oder *in vivo*-Evaluierungen wurden [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]IBGG in physiologischer Kochsalzlösung mit 1 % DMSO aufgenommen, [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG in Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 % DMSO.

Für die ¹²³I-Iodierungen wurden die mit [¹³¹I]Iodid erhaltenen optimierten Reaktionsbedingungen verwendet. Die RCA waren zwischen 10 - 40 % schlechter als die mit [¹³¹I]Iodid erzielten und zudem abhängig von der verwendeten [¹²³I]Iodidcharge und ihrem Alter ab.

Bindungsstudie an MGMT

Für den Einsatz der radioiodierten Verbindungen als potentielle Tracer des MGMT-Status eines Tumors *in vivo* ist es essentiell, dass der radioaktiv markierte Rest an der O⁶-Position des Guanins auch wirklich auf die MGMT übertragen wird. Dies war für [¹³¹I]IBG in der Literatur beschrieben worden [128], für die anderen Inhibitoren jedoch nicht bekannt. Ein *in vitro*-Experiment konnte beweisen, dass die Bindung der Inhibitoren spezifisch an die MGMT erfolgte. Dieser Versuch validierte auch noch einmal die schon gemessenen IC₅₀-Werte der Substanzen, die bei IBG und IBGG um einen Faktor von 4,5 verschieden sind, bei ITG und ITGG jedoch kaum. So war auch das Verhältnis an [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]IBGG, das an MGMT gebunden wurde, sehr unterschiedlich, das von [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG weniger.

Biodistributionsstudien an tumortragenden Nacktmäusen

Für die Tierversuche wurden Nacktmäuse verwendet, die subkutan ein oder zwei Tumore trugen (MEX(+), MEX(-), Glioblastom). Als Todeszeitpunkte wurden 0,5 h, 1 h, 4 h und bei den ¹³¹I-iodierten Benzylguanin-Derivaten auch 8 h nach Injektion (p.i.) gewählt.

Iodbenzylguanin-Derivate

Die Verteilung von [¹³¹I]IBG in den Experimenten unterschied sich kaum von der kürzlich publizierten [129]. Die Aufnahme in den Tumor erreichte 1 h p.i. ein Maximum ($0,83 \pm 0,04$ % ID/g). Die Aufnahme von [¹³¹I]Iodid in die Schilddrüse war zu allen Zeitpunkten sehr hoch, was auf eine starke Deiodierung der Substanz im Körper schließen lässt.

Für [¹³¹I]IBGG war die Aufnahme in den Tumor (Max.: $0,54 \pm 0,10$ % ID/g, 0,5 h p.i.) zwar geringer als für [¹³¹I]IBG, doch die Verteilung von [¹³¹I]IBGG aus dem Blut war schneller als die von [¹³¹I]IBG. Daher erhält man für das Glucose-Konjugat ein besseres Tumor-Blut-Verhältnis als für [¹³¹I]IBG 0,5 h p.i. (0,76 vs. 0,24). Für [¹³¹I]IBG war es zu keiner Zeit so gut wie für [¹³¹I]IBGG nach 0,5 h. Für den Einsatz eines Radioliganden in der bildgebenden Diagnostik ist ein gutes Tumor-Blut-Verhältnis ausschlaggebend für einen geringen Untergrund. Auch die Deiodierung von [¹³¹I]IBGG war zu allen Zeitpunkten deutlich geringer als die von [¹³¹I]IBG. Dies ist sehr vorteilhaft, da eine starke Deiodierung der Substanz im Körper nicht wünschenswert ist.

Bei einem Vergleich von MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren zeigte sich keine stärkere Anreicherung von [¹³¹I]IBG im MEX(+)-Tumor. Auch in den Studien mit den ¹³¹I-iodierten Thynguanin-Derivaten bestätigte sich dieser Trend. Da alle ¹³¹I-iodierten Substanzen n.c.a. injiziert wurden, also ohne Zusatz von Träger, war die Konzentration der Substanzen zu gering für eine Absättigung der MGMT [186], was erklären könnte, warum kein Unterschied zwischen MEX(+)- und MEX(-)-Tumor gesehen werden konnte. Bei der Verwendung der Glioblastom-Zelllinie war die Aufnahme von [¹³¹I]IBG in den Tumor größer als bei dem MEX(+)-Tumor, für [¹³¹I]IBGG hingegen genau umgekehrt. Bei diesem Tumormodell war das Tumor-Blut-Verhältnis für beide Verbindungen nahezu identisch (0,54 für [¹³¹I]IBG vs. 0,50 für [¹³¹I]IBGG 1 p.i.). Da in diesem Experiment nur der Zeitpunkt nach 1 h untersucht wurde, kann man nicht wissen, ob das Verhältnis für [¹³¹I]IBGG zu einem anderen Zeitpunkt nicht besser ist, wie es auch bei dem MEX(+)-Tumormodell war. Dieses Verhalten muss in weiteren Studien noch untersucht werden.

In *in vitro*-Experimenten wurde herausgefunden, dass die Guanin-Derivate zumindest teilweise über den Natrium-abhängigen Glucosetransporter in die Zellen aufgenommen werden. In Experimenten, bei denen den Mäusen vor der Injektion von [¹³¹I]IBG bzw. [¹³¹I]IBGG Phloretin als Hemmstoff für diesen Transporter injiziert wurde, konnte bei den meisten Organen kein nennenswerter Unterschied in der Verteilung mit und ohne Gabe von Phloretin 1 h p.i. beobachtet werden. Sowohl bei [¹³¹I]IBG als auch bei [¹³¹I]IBGG konnte in der Tumoraufnahme kein Unterschied zwischen den mit Phloretin vorbehandelten und den unbehandelten Mäusen gesehen werden. Da die Aufnahme in die Tumore generell aber immer relativ gering war, war es schwer innerhalb des nicht zu vermeidenden Fehlerrahmens einen großen Effekt zu sehen. Einen nennenswerten Unterschied konnte man bei [¹³¹I]IBGG in der Aufnahme in Nieren und Leber beobachten, was im Falle der Nieren durch eine Interaktion von Phloretin mit den GLUT2-Transportern, die auch in der Niere vorkommen, erklärt werden kann [189]. Bei [¹³¹I]IBG kann lediglich bei Schilddrüse und Magen von einem Unterschied gesprochen werden, bei den mit Phloretin vorbehandelten Mäusen wurde eine geringere Aktivitätsaufnahme beobachtet, was durch die Hemmung, die Phloretin auch auf die 5-Iodthyronin-Deiodase ausübt [187], erklärt werden kann. Bei Organen, in die generell mehr Aktivität aufgenommen wurde, konnte, zumindest teilweise, auch eine Beeinflussung der Aufnahme der ¹³¹I-iodierten MGMT-Inhibitoren durch Phloretin beobachtet werden. Das unterschiedliche Verhalten dieser Beeinflussung auf die Verteilung von [¹³¹I]IBG bzw. [¹³¹I]IBGG liegt wahrscheinlich in den doch verschiedenen Aufnahmemechanismen der beiden MGMT-Inhibitoren begründet, die wohl nur zum Teil von den Natrium-abhängigen Glucose-Transportern bestimmt werden.

Iodothynguanin-Derivate

Für [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG konnte kein Unterschied in der Aufnahme in die beiden Tumorarten MEX(+) und MEX(-) beobachtet werden. Bei [¹³¹I]ITG war die Akkumulation in den meisten Organen nicht sehr viel höher als in den Tumoren. Wie schon bei den ¹³¹I-iodierten Benzylguanin-Derivaten war die Aufnahme für das Glucose-Konjugat [¹³¹I]ITGG in die Tumore geringer. Im Ver-

gleich zu den Tumoren war die Aufnahme von [¹³¹I]ITGG in die meisten normalen Gewebe relativ hoch, häufig sogar höher als im Vergleich mit [¹³¹I]ITG. Die Akkumulation in der Schilddrüse war jedoch auch hier für das Glucose-Konjugat geringer. Im Gegensatz zu den ¹³¹I-iodierten Benzylguanin-Derivaten war die Verteilung aus dem Blut für [¹³¹I]ITGG nicht schneller, weshalb zu keinem Zeitpunkt ein günstigeres Tumor-Blut-Verhältnis für das Glucose-Konjugat erzielt werden konnte.

Vergleich der Iodbenzyl- mit den Iodothénylguanin-Derivaten

Da die *in vivo*-Eigenschaften der ¹³¹I-iodierten Benzylguanin-Derivate besser waren als die der Thénylguanin-Derivate, wurden weitere Versuche, wie die Untersuchungen mit Phloretin oder die *in vivo*-SPECT-Studien, mit diesen durchgeführt.

In vivo-Kleintier-SPECT-Studien

Mit den ¹²³I-iodierten MGMT-Inhibitoren [¹²³I]IBG und [¹²³I]IBGG wurden Untersuchungen der *in vivo*-Biodistribution in Nacktmäusen mit MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren mit einer Kleintier-SPECT-Kamera, mit der man sowohl im PET- als auch im SPECT-Modus messen kann, durchgeführt. Auf Grund von höherenergetischen γ -Linien von Iod-123 und Wechselwirkungen der Strahlung mit den Bleikollimatoren der Kamera wurden die Energiespektren des Isotops so kompliziert, dass eine Kalibration des Gerätes auf Iod-123 bislang nicht möglich war. Was bei allen Mäusen und beiden Verbindungen qualitativ beobachtet werden konnte, war eine starke Anreicherung der Substanzen in der Blase, auch die Nieren konnten gut gesehen werden. In der Region, in der der MEX(+)-Tumor lag, sah man bei [¹²³I]IBG und bei [¹²³I]IBGG eine schwache Anreicherung. Generell schien die Auflösung bei den SPECT-Aufnahmen mit [¹²³I]IBGG nicht so gut zu sein wie die mit [¹²³I]IBG, und man konnte keinen Vorteil bei der Verwendung von [¹²³I]IBGG erkennen. Wegen der noch nicht gelösten Probleme mit der Kalibration der SPECT-Kamera sollte man den erhaltenen Bildern jedoch nicht zu viel Bedeutung beimessen.

Schlussfolgerung

Weil die chemischen Synthesen und die Radioiodierungen der darzustellenden Guanin-Derivate erfolgreich durchgeführt werden konnten, eignen sich diese Inhibitoren prinzipiell als Radioliganden und konnten bereits für einige *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen verwendet werden. Auch die IC₅₀-Werte, die bei allen Verbindungen im nM-Bereich lagen und teilweise sogar besser waren als der von O⁶-Benzylguanin, das in klinischen Studien der Phase II eingesetzt wurde und wird [117], lassen diese Substanzen vielversprechend erscheinen. So war der IC₅₀-Wert von IBGG zwar um einen Faktor 4,5 höher als der von IBG, doch durch bessere *in vivo*-Eigenschaften, die man durch die Glucose-Konjugation erreichen möchte, kann dieser Nachteil möglicher Weise kompensiert werden. Der Unterschied zwischen ITG und ITGG, was die Aktivität gegenüber MGMT betrifft, war zudem deutlich geringer ausgeprägt. Die erste *in vitro*-Untersuchung mit den ¹³¹I-iodierten Inhibitoren zeigte eindeutig, dass die Substanzen spezifisch an MGMT gebunden werden. Dieses Verhalten ist essentiell für einen Einsatz der Inhibitoren als potentielle Tracer des MGMT-Status *in vivo*. Als großer Vorteil der Glucose-Derivatisierung zeigte sich in den *ex vivo*-Studien, dass die Glucose-Konjugate deutlich weniger im Körper deiodiert werden als die freien Guanin-Basen. Weitere Versuche, vor allem mit anderen Tumorarten, müssen zum einen zeigen, ob sich das Guanin-Glucose-Konjugat IBGG, dank seiner besseren *in vivo*-Eigenschaften im Vergleich zu IBG, als potentieller Tracer des MGMT-Status eines Tumors eignet. Zum anderen muss eine Korrelation zwischen der Zellaufnahme der radioiodierten Glucose-Konjugate und der intrazellulären MGMT-Konzentration sowie der Expression von Glucosetransportern bestätigt werden. Zum dritten kann auch ein alternatives Konzept des „Tumor-Targetings“ verfolgt werden, um möglicherweise noch geeignetere MGMT-Inhibitoren zu erhalten.

8 Literatur

- [1] C. Keller, Radiochemie, Studienbücher, 2. Auflage, Salle-Sauerländer (1981)
- [2] K. H. Lieser, Einführung in die Kernchemie, 3. neubearb. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 53, (1991)
- [3] S. M. Qaim, *Radiochimica Acta* **30**, 147-162, (1982)
- [4] W. Seelmann-Eggebert, G. Pfenning, H. Münzle, H. Klewe-Nebenius, Karlsruher Nuklidkarte, 5. Auflage, Karlsruhe (1981)
- [5] U. Reus, W. Westmeier, *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **29**, 193-406, (1983)
- [6] R. Alberto, U. Abram, A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, F. Rösch, Handbook of Nuclear Chemistry **4**, 211-248, (2004)
- [7] G. Stöcklin in: Handbuch der medizinischen Radiologie, Band 15/1 B, Emissions-Computertomographie mit kurzlebigen Zyklotron-produzierten Radionukliden, Springer Verlag, Berlin (1989)
- [8] R. W. Howell, *Med. Phys.* **19**, 1371, (1992)
- [9] G. Stöcklin, *Appl. Radiat. Isot.* **28**, 131-148, (1977)
- [10] W. D. Bloomer, W. H. McLaughlin, R. D. Neirinckx, S. J. Adelstein, P. R. Gordon, T. J. Ruth, A. P. Wolf, *Science* **212**, 340, (1981)
- [11] E. R. De Sombre, B. Shafii, R. N. Hanson, P. C. Kuivanen, A. Hughes, *Cancer Res.* **52**, 5752, (1992)
- [12] A. Hughes, S. J. Gatley, E. R. De Sombre, *J. Nucl. Med.* **34**, 272, (1993)
- [13] C. J. Squire, L. J. Baker, G. R. Clark, R. F. Martin, J. White, *Nucl. Acid Res.* **28**, 1252, (2000)
- [14] M. R. Zalutsky, A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, F. Rösch, Handbook of Nuclear Chemistry **4**, 338, (2004)
- [15] G. Akabani, C. J. Reist, I. Cokgor, A. H. Friedman, H. S. Friedman, R. E. Coleman, D. D. Bigner, M. R. Zalutsky, *J. Nucl. Med.* **40**, 631, (1999)
- [16] K. Langen, H. H. Coenen, N. Roosen, P. Kling, O. Muzik, H. Herzog, T. Kuwert, G. Stöcklin, L. E. Feinendegen, *J. Nucl. Med.* **31**, 281-286, (1990)
- [17] J. Zweit, S. K. Luthra, F. Brady, P. Carnochan, R. J. Ott, T. Jones, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **37**, 823-825, (1995)
- [18] M. A. Bakir, J. W. Babich, J. M. Styles, C. J. Dean, S. A. Eccles, R. M. Lambrecht, *J. Nucl. Med.* **31**, 777, (1990)
- [19] E. Browne, R. B. Firestone, Table of Radioactive Isotopes, Wiley, New York, (1986)
- [20] H. R. Herzog, A. Hohn, S. M. Qaim, L. Tellmann, H. H. Coenen, *J. Nucl. Med.* **40**, 124 (Abstract), (1999)
- [21] S. M. Qaim, A. Hohn, T. Bastian, K. M. El-Azoney, G. Blessing, S. Spellerberg, B. Scholten, H. H. Coenen, *Appl. Radiat. Isot.* **58**, 69, (2003)

- [22] S. M. Qaim, A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, F. Rösch, Handbook of Nuclear Chemistry **4**, 68, (2004)
- [23] B. Scholten, S. M. Qaim, G. Stöcklin, *Appl. Radiat. Isot.* **40**, 127, (1989)
- [24] K. Kondo, R. M. Lambrecht, A. P. Wolf, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **28**, 395-401, (1977)
- [25] R. van den Bosch, J. J. M. De Goeij, J. A. van der Heide, J. F. W. Tertoolen, H. M. J. Theelen. C. Zegers, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **28**, 255-261, (1977)
- [26] B. Scholten, Z. Kovács, F. Tárkányi, S. M. Qaim, *Appl. Radiat. Isot.* **46**, 255, (1995)
- [27] A. Hermanne, K. Gul, M. G. Mustafa, F. M. Nortier, P. Oblozinsky, S. M. Qaim, B. Scholten, S. Takács, F. Tárkányi, Charged Particle Cross Section Database for Medical Radioisotope Production, IAEA-TECDOC-1211, Wien, 153-233, (2001)
- [28] R. Weinreich, O. Schult, G. Stöcklin, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **25**, 523-543, (1974)
- [29] J. Godart, J. Barat, A. Menthe, J. Brière, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **28**, 967-969, (1977)
- [30] J. Jungerman, M. Laguns-Solar, *J. Radioanal. Chem.* **65**, 31-45, (1981)
- [31] S. Mirzadeh, L. F. Mausner, M. A. Garland, A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, F. Rösch, Handbook of Nuclear Chemistry **4**, 33-39, (2004)
- [32] G. Stöcklin, Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie **20**, 4.Auflage, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, (1981)
- [33] R. M. Lambrecht, M. Sajjad, M. A. Qureshi, S. J. Al-Yanbawi, *J. Radioanalyt. Nucl. Chem. Lett.* **127**, 143, (1988)
- [34] R. Weinreich, E. J. Knust, *J. Radioanalyt. Nucl. Chem. Lett.* **213**, 253, (1996)
- [35] E. J. Knust, K. Dutschka, R. Weinreich, *Appl. Radiat. Isot.* **52**, 181, (2000)
- [36] A. Hohn, F. M. Nortier, B. Scholten, T. N. van der Walt, H. H. Coenen, S. M. Qaim, *Appl. Radiat. Isot.* **55**, 149, (2001)
- [37] A. Hohn, H. H. Coenen, S. M. Qaim, *Appl. Radiat. Isot.* **49**, 1493, (1998)
- [38] A. Hohn, B. Scholten, H. H. Coenen, S. M. Qaim, *Appl. Radiat. Isot.* **49**, 93, (1998)
- [39] H. J. Ache, *Angew. Chemie* **84**, 235, (1972)
- [40] H. Schicha, Kompendium der Nuklearmedizin, Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York, (1991)
- [41] D. E. Kuhl, *Radiology* **121**, 405-413, (1976)
- [42] <http://www.physics.ubc.ca/mirg/home/tutorial/tutorial.html>
- [43] M. Eisenhut, W. Mier, A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, F. Rösch, Handbook of Nuclear Chemistry **4**, 257-277, (2004)
- [44] D. S. Wilbur, *Bioconjugate Chem.* **3**, 433-470, (1992)
- [45] R. H. Seevers, R. E. Counsell, *Chem. Rev.* **82**, 575-590, (1982)
- [46] H. H. Coenen, S. M. Moerlein, G. Stöcklin, *Radiochim. Acta* **34**, 47-68, (1983)

- [47] M. Henze, A. Mohammed, H. Schlemmer, K. K. Herfarth, W. Mier, M. Eisenhut, J. Debus, U. Haberkorn, *Eur. J. Nucl. Med.* **29**, 1455, (2002)
- [48] W. M. Hunter, F. C. Greenwood, *Nature* **194**, 495-496, (1962)
- [49] W. M. Hunter, F. C. Greenwood, J. S. Glover, *Biochem. J.* **89**, 114-115, (1963)
- [50] C. Krummeich, M. Holschbach, G. Stöcklin, *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 929-935, (1994)
- [51] A. Hussian, R. Awad, P. A. Crooks, L. W. Dittert, *Analytical Biochem.* **214**, 495-499, (1993)
- [52] E. Mounetou, C. Cussacs, F. Mathieu, J.-C. Maurizis, P. Labarre, M.-F. Moreau, A. Veyre, J.-C. Madelmont, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **36**, 1215-1225, (1995)
- [53] L. Aguilar-Bryan, D. A. Nelson, Q. A. Vu, M. B. Humphrey, A. E. Boyd III, *J. Biol. Chem.* **265**, 8218-8224, (1990)
- [54] J. Sundin, V. Tolmachev, J. Kozirowski, J. Carlsson, H. Lundqvist, S. Welt, S. Larson, A. Sundin, *Nucl. Med. Biol.* **26**, 923-929, (1999)
- [55] V. Tolmachev, A. Bruskin, I. Sivaev, H. Lundqvist, S. Sjöberg, *Radiochim. Acta* **90**, 229-235, (2002)
- [56] P. I. Fraker, J. C. Speck, *Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-856, (1978)
- [57] M. A. K. Markwell, C. F. Fox, *Biochemistry* **17**, 4807-4817, (1978)
- [58] T. Ünak, Z. Akgün, Y. Yildirim, Y. Duman, G. Erenel, *Appl. Radiat. Isot.* **54**, 749-752, (2001)
- [59] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, P. M. Pathare, S. A. Weerawarna, *Bioconjugate Chem.* **8**, 572-584, (1997)
- [60] D. S. Wilbur, M. D. Hylarides, *Nucl. Med. Biol.* **18**, 363-365, (1991)
- [61] D. S. Wilbur, M.-K. Chyan, D. K. Hamlin, B. B. Kegley, R. Risler, P. M. Pathare, J. Quinn, R. L. Vessella, C. Foulon, M. Zalutsky, T. J. Wedge, M. F. Hawthorne, *Bioconjugate Chem.* **15**, 203-223, (2004)
- [62] D. S. Wilbur, K. W. Anderson, *J. Org. Chem.* **47**, 358-359, (1982)
- [63] S. M. Moerlein, W. Beyer, G. Stöcklin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 779-786, (1988)
- [64] D. W. McPherson, H. Luo, J. Kropp, F. F. Knapp Jr., *Appl. Radiat. Isot.* **51**, 411-417, (1999)
- [65] G. S. David, R. A. Reisfeld, *Biochemistry* **13**, 1014, (1974)
- [66] S. L. Karonen, P. Morsky, M. Siren, U. Seuderling, *Anal. Biochem.* **67**, 1-10, (1975)
- [67] G. W. Kabalka, R. S. Varma, *Tetrahedron* **45**, 6601-6621, (1989)
- [68] R. N. Waterhouse, T. Gotsick, G. W. Kabalka, M. M. Goodman, J. C. O'Brien, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **37**, 17-20, (1995), Abstract
- [69] I. Günther, H. Hall, C. Halldin, C.-G. Swahn, L. Farde, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **37**, 49-50, (1995), Abstract
- [70] L. Staelens, R. Oltenfreiter, B. Cornelissen, P. Blanckaert, F. De Vos, D. Deforce, R. A. Dierckx, G. Slegers, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **48**, 101-108, (2005)

- [71] D. S. Wilbur, D. K. Hamlin, P. M. Pathare, S. Heusser, R. L. Vessella, K. R. Buhler, J. E. Stray, J. Daniel, E. V. Quadros, P. McLoughlin, A. C. Morgan, *Bioconjugate Chem.* **7**, 461-474, (1996)
- [72] S. M. Moerlein, H. H. Coenen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1941-1947, (1985)
- [73] J. Liefhold, M. Eisenhut, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **23**, 1239, (1986)
- [74] S. M. Moerlein, *Radiochim. Acta* **50**, 55-61, (1990)
- [75] A. M. Wafelman, M. C. P. Konings, C. A. Hoefnagel, R. A. A. Maes, J. H. Beijnen, *Appl. Radiat. Isot.* **45**, 997-1007, (1994)
- [76] H. Sinn, W. Maier-Borst, H. Elias, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **28**, 809-812, (1977)
- [77] B. J. Denny, R. T. Wheelhouse, M. F. G. Stevens, L. L. H. Tsang, J. A. Slack, *Biochemistry* **33**, 9045-9051, (1994)
- [78] S. L. Gerson, *J. Clin. Oncol.* **20**, 2388-2399, (2002)
- [79] G. Aquilina, P. Hess, P. Branch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8905-8909, (1994)
- [80] I. Preuss, I. Eberhagen, S. Haas, R. Eibl, M. Kaufmann, M. Minckwitz, B. Kaina, *Int. J. Cancer* **61**, 321-326, (1995)
- [81] I. Preuss, S. Haas, U. Eichborn, I. Eberhagen, M. Kaufmann, T. Beck, R. Eibl, P. Dall, T. Bauknecht, J. Hengstler, B. Wittig, W. Deppold, B. Kaina, *Cancer Detection and Prevention* **20(2)**, 130-136, (1996)
- [82] I. Preuss, R. Thust, B. Kaina, *Int. J. Cancer* **65**, 506-512, (1996)
- [83] K. Becker, C. Kregel, B. Kaina, *Cancer Res.* **57**, 3335-3338, (1997)
- [84] A. E. Pegg, M. Dolan, R. Moschel, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **51**, 167-215, (1995)
- [85] A. E. Pegg, T. L. Byers, *FASEB Journal* **6**, 2302-2310, (1992)
- [86] J. R. Silber, A. Blank, M. S. Bobola, *Clin. Cancer Res.* **5**, 807-814, (1999)
- [87] S. L. Gerson, W. Phillips, M. Kastan, *Blood* **88**, 1649-1655, (1996)
- [88] G. P. Margison, A. C. Povey, B. Kaina, M. F. Santibanez Korel, *Carcinogenesis* **24**, 625-635, (2003)
- [89] N. H. Zaidi, L. Liu, S. L. Gerson, *Clin. Cancer Res.* **2**, 577-584, (1996)
- [90] K. Jansen, U. Eichhorn-Grombacher, K. Schlink, S. Nitzsche, F. Oesch, B. Kaina, *Arch. Toxicol.* **75**, 306-312, (2001)
- [91] S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucl. Acid Res.* **25**, 3389-3402, (1997)
- [92] J. E. A. Wibley, A. E. Pegg, P. C. E. Moody, *Nucl. Acid Res.* **28**, 393-401, (2000)
- [93] M. H. Moore, J. M. Gulbis, E. J. Dodson, B. Demple, P. Moody *EMBO Journal* **13(7)**, 1495-1501, (1994)
- [94] T. E. Spratt, J. D. Wu, D. E. Levy, S. Kanugula, A. E. Pegg *Biochemistry* **38**, 6801-6806, (1999)
- [95] C. L. Chan, Z. Wu, T. Ciardelli, A. Eastman, E. Bresnick, *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 193-200, (1993)

- [96] K. Morimoto, M. E. Dolan, Scicchitano, D., A. E. Pegg, *Carcinogenesis* **6**, 1027-1031, (1985)
- [97] D. B. Yarosh, S. Hurst-Calderone, M. A. Babich, R. S. Day III, *Cancer Res.* **46**, 1663-1668, (1986)
- [98] R. J. Graves, B. F. L. Li, P. F. Swann, *Carcinogenesis* **10**, 661-666, (1989)
- [99] M. Xu-Welliver, A. E. Pegg, *Carcinogenesis* **23**, 823-830, (2002)
- [100] A. S. Meyer, M. D. McCain, Q. Fang, A. E. Pegg, T. E. Spratt, *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 1405-1409, (2003)
- [101] P. Georgiadis, C. A. Smith, P. F. Swann, *Cancer Res.* **51**, 5843-5850, (1991)
- [102] K. Kohda, I. Terashima, N. Sawada, I. Nozaki, M. Yasuda, Y. Kawazoe *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 8-9, (1992)
- [103] T. E. Spratt, C. R. Campbell, *Biochemistry* **33**, 11364-11371, (1994)
- [104] R. S. McElhinney, T. B. H. McMurry, G. P. Margison, *Mini Rev. Med. Chem.* **3**, 471-485, (2003)
- [105] M. E. Dolan, R. C. Moschel, A. E. Pegg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5368-5372, (1990)
- [106] R. S. McElhinney, D. J. Donnelly, J. E. McCormick, J. Kelly, A. J. Watson, J. A. Rafferty, R. H. Elder, M. R. Middleton, M. A. Willington, T. B. H. McMurry, G. P. Margison, *J. Med. Chem.* **41**, 5265-5271, (1998)
- [107] M.-Y. Chae, M. G. McDougall, M. E. Dolan, K. Swenn, A. E. Pegg, R. C. Moschel, *J. Med. Chem.* **37**, 342-347, (1994)
- [108] A. E. Pegg, L. Chung, R. C. Moschel, *Biochem. Pharmacol.* **53**, 1559-1564, (1997)
- [109] J. K. Willson, J. R. Haaga, J. E. Trey, *J. Clin. Oncol.* **13**, 2301-2308, (1995)
- [110] D. C. Smith, S. L. Gerson, L. Liu, *Clin. Cancer Res.* **2**, 1129-1134, (1996)
- [111] B. W. Futscher, K. C. Micetich, D. M. Barnes, R. I. Fisher, L. C. Erickson, *Cancer Commun.* **1**, 65-73, (1989)
- [112] M. E. Dolan, L. Stine, R. B. Mitchell, *Cancer Commun.* **2**, 371-377, (1990)
- [113] M. E. Dolan, R. B. Mitchell, C. Mummert, *Cancer Res.* **51**, 3367-3372, (1991)
- [114] S. L. Gerson, E. Zborowska, K. Norton, *Biochem. Pharmacol.* **46**, 483-491, (1993)
- [115] M. E. Dolan, A. E. Pegg, N. D. Biser, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **32**, 221-225, (1993)
- [116] T. P. Spiro, S. L. Gerson, L. Liu, *Cancer Res.* **59**, 2402-2410, (1999)
- [117] J. A. Quinn, J. Pluda, M. E. Dolan, *J. Clin. Oncol.* **9**, 2277-2283, (2002)
- [118] J. A. Quinn et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 103, (2003)
- [119] H. Friedman et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 311, (2003)
- [120] M. R. Middleton, M. Ranson, S. M. Lee, J. Bridgewater, R. S. McElhinney, T. B. H. McMurry, N. Thatcher, G. Halbert, S. Armstrong, G. P. Margison, *Proc. AACR, San Fransisco* **43**, 909, (2002)
- [121] M. R. Middleton, G. P. Margison, *Lancet Oncol.* **4**, 37-44, (2003)

- [122] J. Reinhard, U. Eichhorn, M. Wiessler, B. Kaina, *Int. J. Cancer* **93**, 373-379, (2001)
- [123] J. Reinhard, W. E. Hull, C.-W. von der Lieth, U. Eichhorn, H.-C. Kliem, B. Kaina, M. Wiessler, *J. Med. Chem.* **44**, 4050-4061, (2001)
- [124] G. Wei, N. A. Loktionova, A. E. Pegg, R. C. Moschel, *J. Med. Chem.* **48**, 256-261, (2005)
- [125] M. E. Nelson, N. A. Loktionova, A. E. Pegg, R. C. Moschel, *J. Med. Chem.* **47**, 3887-3891, (2004)
- [126] E. Nesseler, R. Schirmacher, W. Hamkens, F. Rösch, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **42**, Suppl. 1, S198-200, (1999)
- [127] R. Schirmacher, E. Nesseler, W. Hamkens, U. Eichhorn, M. Schreckenberger, B. Kaina, F. Rösch, *Appl. Radiat. Isot.* **56**, 511-517, (2002)
- [128] G. Vaidyanathan, D. J. Affleck, C. M. Cavazos, S. P. Johnson, S. Shankar, H. S. Friedman, M. O. Colvin, M. R. Zalutsky, *Bioconjugate Chem.* **11**, 868-875, (2000)
- [129] G. Vaidyanathan, D. J. Affleck, J. Norman, P. Welsh, W. Liu, S. P. Johnson, H. S. Friedman, M. R. Zalutsky, *Bioconjugate Chem.* **15**, 402-408, (2004)
- [130] R. Schirmacher, U. Mühlhausen, B. Wängler, E. Schirmacher, J. Reinhard, G. Nagel, B. Kaina, M. Piel, M. Wießler, F. Rösch, *Tetrahedron Lett.* **43**, 6301-6304, (2002)
- [131] B. Kaina, U. Mühlhausen, A. Piee-Staffa, M. Christmann, R. Garcia-Boy, F. Rösch, R. Schirmacher, *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **311**, 585-593, (2004)
- [132] S. Heil, Synthese und ¹³¹I-Markierung glucosekonjugierter O-6-halogenbenzylsubstituierter Guanine, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, (2002)
- [133] X. Liu, Q.-H. Zheng, X. Fei, J.-Q. Wang, D. W. Ohannesian, L. C. Erickson, K. L. Stone, T. D. Martinez, K. D. Miller, G. D. Hutchins, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **45**, 1239-1252, (2002)
- [134] X. Liu, Q.-H. Zheng, X. Fei, J.-Q. Wang, D. W. Ohannesian, L. C. Erickson, K. L. Stone, G. D. Hutchins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 641-644, (2003)
- [135] Q.-H. Zheng, X. Liu, X. Fei, J.-Q. Wang, D. W. Ohannesian, L. C. Erickson, K. L. Stone, G. D. Hutchins, *Nucl. Med. Biol.* **30**, 405-415, (2003)
- [136] R. Schirmacher, E. Schirmacher, U. Mühlhausen, B. Kaina, B. Wängler, *Cur. Org. Synth.* **2**, 215-230, (2005)
- [137] W. Bowles, F. Schneider, L. Lewis, R. Robins, *J. Med. Chem.* **6**, 471-480, (1963)
- [138] J. Kilburis, J. H. Lister, *J. Chem. Soc.* **95**, 3942, (1971)
- [139] R. Schirmacher, B. Wängler, E. Schirmacher, T. August, F. Rösch, *Synthesis* **4**, 538-542, (2002)
- [140] Z. Polívka, M. Budesínský, J. Holubek, B. Schneider, Z. Sedivý, E. Svátek, O. Matousová, J. Metys, M. Valchár, R. Soucek, M. Protiva, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **54**, 2443-2469, (1989)
- [141] E. B. Merkushev, N. D. Simakhina, G. M. Koveshnikova, *Synthesis* **6**, 486-487, (1980)
- [142] M. D'Auria, G. Mauriello, *Tetrahedron Lett.* **36**, 4883-4884, (1995)
- [143] M. D'Auria, A. De Mico, F. D'Onofrio, G. Piancatelli, *J. Org. Chem.* **52**, 5243-5247, (1987)

- [144] E. Scriven, *Chem. Soc. Rev.* **12**, 129-161, (1983)
- [145] A. Hassner, L. R. Krepski, V. Alexanian, *Tetrahedron* **34**, 2069-2076, (1978)
- [146] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* **90**, 602-615, (1978)
- [147] R. W. Adamiak, E. Biala, B. Skalski, *Nucl. Acids Res.* **13**, 2989, (1985)
- [148] R. W. Adamiak, E. Biala, Z. Gnadiec, S. Mielewczyk, *Chem. Scr.* **25**, 3, (1986)
- [149] N. Chida, T. Suzuki, S. Tanaka, I. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **40**, 2573-2576, (1999)
- [150] B. H. Lipschutz, W. Vaccaro, B. Huff, *Tetrahedron Lett.* **27**, 4095-4098, (1986)
- [151] J. P. Whitten, D. P. Matthews, J. R. McCarthy, *J. Org. Chem.* **51**, 1891-1894, (1986)
- [152] J. Kjellberg, M. Liljenberg, N. G. Johansson, *Tetrahedron Lett.* **27(7)**, 877-880, (1986)
- [153] A. I. Vogel, B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. G. Smith, A. R. Tatchell, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5. Auflage, Prentice Hall, 646-648, (1996)
- [154] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 199-208, (2000)
- [155] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 86-90, (2000)
- [156] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **94**, 184-201, (1982)
- [157] R. W. Binkley, *Modern Carbohydrate Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 298-322, (1988)
- [158] U. Mühlhausen, Synthese und ^{18}F -Markierung von glucosekonjugierten O^6 -Heteroarylmethyl-Guanin-Derivaten sowie neuer MGMT-Inhibitoren zur Visualisierung des O^6 -Methylguanin-DNA-methyltransferase-Status *in vivo*, Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, (2002)
- [159] C. Du Mortier, O. Varela, R. M. de Lederkremer, *Carbohydrate Res.* **189**, 79-86, (1989)
- [160] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **98**, 213-236, (1986)
- [161] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 82-83, (2000)
- [162] B. Fischer, A. Nudelman, M. Ruse, J. Herzig, H. E. Gottlieb, *J. Org. Chem.* **49**, 4988-4993, (1984)
- [163] K. Ramu, J. K. Baker, *J. Med. Chem.* **38**, 1911-1921, (1925)
- [164] L.-F. Tietze, R. Fischer, *Tetrahedron Lett.* **22**, 3239-3242, (1981)
- [165] S. Hanessian, J. Banoub, *Methods Carb. Chem.* **8**, 243-245, (1980)
- [166] C. Gallo-Rodriguez, O. Varela, R. M. de Lederkremer, *J. Org. Chem.* **61**, 1886-1889, (1996)
- [167] C. Gallo-Rodriguez, O. Varela, R. M. de Lederkremer, *Carbohydrate Res.* **305**, 163-170, (1998)
- [168] P. Franchetti, S. Marchetti, L. Cappellacci, H. N. Jayaram, J. A. Yalowitz, B. M. Goldstein, J.-L. Barascut, D. Dukhna, J.-L. Imbach, M. Grifantini, *J. Med. Chem.* **43**, 1264-1270, (2000)

- [169] N. Hamamichi, T. Miyasaka, *J. Org. Chem.* **56**, 3731-3734, (1991)
- [170] M. Safadi, D. S. Bindra, T. Williams, R. C. Moschel, V. Stella, *Int. J. Pharm.* **90**, 239-246, (1993)
- [171] Amersham Bioscience, Radiochemical Decomposition - A Guide to the Properties and Storage of Radiolabelled Compounds, 11
- [172] M. Sajjad, R. M. Lambrecht, M. A. Bakir, *Nucl. Med. Biol.* **15**, 721-722, (1988)
- [173] M. Sajjad, R. M. Lambrecht, M. A. Bakir, *Radiochimica Acta* **50**, 123-127, (1990)
- [174] D. H. Hunter, K. Mueller, G. Wong Won, *J. Label. Compds. Radiopharm.* **37**, 684-685, (1995)
- [175] C. Krummeich, Zur trägerfreien (n.c.a.), regioselektiven Radioiodierung aromatischer Systeme, Berichte des Forschungszentrums Jülich 3263, (1996)
- [176] D. Bier, persönliche Kommunikation
- [177] Amersham Bioscience, biodirectory, (2004)
- [178] D. Bier, K. Dutschka, E. J. Knust, *Nucl. Med. Biol.* **23**, 373-376, (1996)
- [179] S. L. Gerson, J. E. Trey, K. Miller, N. A. Berger, *Carcinogenesis* **7**, 745-749, (1986)
- [180] L. Long, M. E. Dolan, *Clin. Cancer Res.* **7**, 4239-4244, (2001)
- [181] L. Long, R. C. Moschel, M. E. Dolan, *Biochem. Pharmacol.* **61**, 721-726, (2001)
- [182] D. M. Kokkinakis, R. C. Moschel, T. H. Vuong, M. V. Reddy, S. C. Schold, A. E. Pegg, *In Vivo* **10**, 297-306, (1996)
- [183] C. Cussac, E. Mounetou, M. Rapp, J. C. Madelmont, J. C. Maurizis, P. Labarre, P. Chollet, J. L. Chabard, D. Godeneche, J. P. Baudry, *Drug Met. Disp.* **22**, 637-642, (1994)
- [184] L. Long, S. L. Berg, S. K. Roy, C. L. McCully, H.-W. Song-Yoo, R. C. Moschel, F. M. Balis, M. E. Dolan, *Clin. Canc. Res.* **6**, 3662-3669, (2000)
- [185] M. E. Dolan, A. E. Pegg, R. C. Moschel, R. R. Vishnuvajjala, K. P. Flora, M. R. Grever, H. S. Friedman, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **35**, 121-126, (1994)
- [186] M. Christmann, persönliche Kommunikation
- [187] E. G. Movius, M. M. Phyllaier, J. Robbins, *Endocrinology* **124**, 1988-1997, (1989)
- [188] V. Crespy, O. Aprikian, C. Morand, C. Besson, C. Manach, C. Demingné, C. Rémésy, *J. Nutr.* **132**, 3227-3230, (2002)
- [189] A. L. Olson, J. E. Pessin, *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 235-256, (1996)
- [190] Foto von F. Rösch

9 Anhang

A Verwendete Abkürzungen

Tabelle 36: In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen

| Abkürzung | Bedeutung |
|-----------|--|
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| c.a. | carrier added - geträgert |
| CAT | Chloramin T |
| c.f. | carrier free - trägerfrei |
| CSF | Cerebral Spinal Fluid - Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en |
| DC | Dünnschicht-Chromatographie |
| DMAP | 4-Dimethylaminopyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EC | Electron Capture - Elektroneneinfang |
| ESI | Elektronspray Ionisation |
| EtOH | Ethanol |
| FD | Felddesorption |
| HPLC | High Pressure Liquid Chromatography |
| i.v. | intravenös |
| MS | Massenspektrometrie |
| MGMT | O ⁶ -Methylguanin-DNA-methyltransferase |
| n.c.a. | no carrier added - ohne Trägerzusatz |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| p.i. | post injection - nach Injektion |
| RCA | Radiochemische Ausbeute |
| SEM | 2-Trimethylsilylethoxymethylchlorid |
| SPECT | Single-Photon-Emission-Computer-Tomography - Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie |
| TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TFA | Trifluoressigsäure |

B Radiochemische Ausbeuten bei den Radioiodierungen

Tabelle 37: Zur Radioiodierung verwendete Reaktionsbedingungen

| Bedingung | Vorläufer / μg | Aktivität in | Puffer^a / μL | CAT_P^b / μL | CAT_W^c / μL | Iodogen / μg |
|------------------|---|-------------------------|--|---|---|---|
| a | 25 | Wasser | 25 | - | 10 | - |
| b | 25 | Wasser | 25 | 10 | - | - |
| c | 25 | Wasser | 10 | 10 | - | - |
| d | 25 | Wasser | 10 | 7,5 | - | - |
| e | 25 | Wasser | 10 | 5 | - | - |
| f | 25 | Puffer | 10 | 10 | - | - |
| g | 25 | Wasser | 10 | - | - | 10 |
| h | 25 | Wasser | 10 | 2,5 | - | - |
| i | 25 | Wasser | 10 | 15 | - | - |
| j | 16,7 | Wasser | 10 | 10 | - | - |
| k | 25 | Wasser | 5 | 10 | - | - |
| l | 25 | Wasser | 20 | 10 | - | - |
| m | 25 | Wasser | 20 | 7,5 | - | - |
| n | 25 | Wasser | 20 | 5 | - | - |

^aPhosphatpuffer, pH 7,0

^b1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)

^c1,5 mg/mL in Wasser

Tabelle 38: RCA bei den ¹³¹I-Iodierungen

| Bedingung | RCA / % | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------|----------|---------------------|----------|----------------------|----------|----------------------|----------|-----------------------|----------|--|--|
| | ¹³¹ IJBGSi | | ¹³¹ IJBG | | ¹³¹ IJBGG | | ¹³¹ IJTGG | | ¹³¹ IJTGSi | | | |
| | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min | | |
| a | 90 ± 4 | 94 ± 4 | - | - | 86 ± 2 | 90 ± 2 | 77 ± 12 | 88 ± 3 | 82 ± 5 | 77 ± 5 | | |
| b | 93 ± 4 | 92 ± 0,5 | 95 ± 2 | 97 ± 1 | 83 ± 4 | 91 ± 0,5 | 83 ± 4 | 88 ± 1 | 78 ± 7 | 76 ± 5 | | |
| c | 92 ± 3 | 94 ± 2 | 96 ± 1 | 98 ± 1 | 86 ± 5 | 89 ± 1 | 89 ± 6 | 90 ± 5 | 85 ± 9 | 90 ± 11 | | |
| d | 89 ± 2 | 91 ± 2 | 96 ± 1 | 98 ± 1 | 86 ± 1 | 89 ± 2 | 92 ± 2 | 94 ± 1 | 86 ± 6 | 86 ± 6 | | |
| e | 93 ± 2 | 94 ± 2 | 98 ± 0,5 | 98 ± 1 | 85 ± 3 | 87 ± 4 | 89 ± 0,5 | 90 ± 2 | 82 ± 10 | 85 ± 8 | | |
| f | 90 ± 5 | 92 ± 3 | - | - | 85 ± 5 | 92 ± 1 | 90 ± 1 | 92 ± 1 | 81 ± 3 | 81 ± 5 | | |
| g | 80 ± 5 | 88 ± 5 | - | - | 85 ± 5 | 89 ± 3 | 77 ± 18 | 85 ± 7 | 75 ± 1 | 77 ± 2 | | |
| h | 94 ± 1 | 95 ± 2 | 98 ± 1 | 99 ± 0,5 | 80 ± 1 | 83 ± 2 | 89 ± 5 | 90 ± 5 | 87 ± 8 | 88 ± 7 | | |
| i | 89 ± 2 | 90 ± 2 | 96 ± 1 | 98 ± 1 | 87 ± 4 | 91 ± 3 | 90 ± 0,5 | 92 ± 1 | 84 ± 6 | 86 ± 8 | | |
| j | 91 ± 2 | 93 ± 1 | - | - | 77 ± 4 | 86 ± 4 | 91 ± 0,5 | 92 ± 1 | 83 ± 2 | 85 ± 2 | | |
| k | 94 ± 0,5 | 95 ± 0,5 | - | - | 88 ± 1 | 90 ± 0,5 | 85 ± 0,5 | 87 ± 0,5 | 80 ± 0,5 | 82 ± 0,5 | | |

Tabelle 39: RCA bei den ^{123}I -Iodierungen

| Bedingung | RCA / % | | | | | | | | | |
|-----------|----------------------|---------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|------------------------|-------|-------|-------|
| | ^{123}I JBG | | ^{123}I JBGG | | ^{123}I JTGG | | ^{123}I JTGSi | | | |
| | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min | 3 min | 5 min |
| c | 79 | 82 | 69 ± 16 | 68 ± 11 | 63 ± 13 | 64 ± 13 | - | - | - | - |
| d | - | - | - | - | 64 ± 7 | 65 ± 7 | - | - | - | - |
| e | 74 ± 1 | 75 ± 3 | - | - | - | - | 67 | 70 | - | - |
| h | 77 ± 18 | 81 ± 14 | - | - | - | - | 78 | 77 | - | - |
| l | - | - | 71 ± 0,5 | 74 ± 2 | - | - | - | - | - | - |
| m | - | - | - | - | 53 ± 1 | 53 ± 1 | - | - | - | - |
| n | 65 ± 8 | 70 ± 2 | - | - | - | - | - | - | - | - |

C Organ- und Tumorverteilung von [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]IBGG

Tabelle 40: Verteilung von [¹³¹I]IBG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und teilweise MEX(-)-Tumoren

| Gewebe | % ID/g (n = 3-7) | | | |
|-------------|------------------|-------------|--------------|--------------|
| | 0,5 h | 1 h | 4 h | 8 h |
| MEX(+) | 0,51 ± 0,06 | 0,83 ± 0,04 | 0,44 ± 0,03 | - |
| MEX(-) | 0,51 | 0,91 | - | - |
| Blut | 2,16 ± 0,24 | 1,81 ± 0,12 | 0,98 ± 0,06 | 0,36 ± 0,08 |
| Schilddrüse | 4,01 ± 0,34 | 6,55 ± 0,42 | 5,95 ± 1,36 | 0,62 ± 0,09 |
| Herz | 1,23 ± 0,22 | 0,76 ± 0,08 | 0,45 ± 0,04 | 0,16 ± 0,01 |
| Magen | 2,44 ± 0,24 | 5,19 ± 0,63 | 8,28 ± 0,86 | 1,93 ± 0,11 |
| Dünndarm | 2,19 ± 0,31 | 4,75 ± 0,98 | 2,91 ± 0,51 | 0,57 ± 0,10 |
| Dickdarm | 1,37 ± 0,31 | 0,61 ± 0,04 | 0,43 ± 0,02 | 9,49 ± 1,34 |
| Pankreas | 4,43 ± 0,45 | 1,33 ± 0,15 | 0,87 ± 0,12 | 0,42 ± 0,03 |
| Nieren | 2,37 ± 0,27 | 1,60 ± 0,10 | 0,82 ± 0,08 | 0,24 ± 0,01 |
| Leber | 3,47 ± 0,41 | 2,08 ± 0,24 | 1,14 ± 0,06 | 0,63 ± 0,03 |
| Muskel | 0,51 ± 0,02 | 0,34 ± 0,04 | 0,24 ± 0,02 | 0,11 ± 0,002 |
| Lunge | - | 1,51 ± 0,07 | 1,25 ± 0,22 | 0,45 ± 0,05 |
| Gehirn | 0,08 ± 0,01 | 0,14 ± 0,03 | 0,07 ± 0,007 | 0,04 ± 0,004 |

Tabelle 41: Verteilung von [¹³¹I]IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren

| Gewebe | % ID/g (n = 4-10) | | | |
|-------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 0,5 h | 1 h | 4 h | 8 h |
| MEX(+) | 0,54 ± 0,10 | 0,34 ± 0,02 | 0,17 ± 0,01 | 0,08 |
| Blut | 0,71 ± 0,08 | 0,90 ± 0,13 | 0,83 ± 0,26 | 0,17 ± 0,02 |
| Schilddrüse | 1,16 ± 0,14 | 1,57 ± 0,22 | 2,83 ± 0,57 | 0,23 ± 0,06 |
| Herz | 0,54 ± 0,02 | 0,56 ± 0,08 | 1,21 ± 0,003 | 0,10 ± 0,004 |
| Magen | 3,12 ± 0,78 | 4,05 ± 0,73 | 15,95 ± 4,95 | 1,49 ± 0,18 |
| Dünndarm | 2,60 ± 0,75 | 15,21 ± 1,29 | 16,61 ± 3,41 | 0,35 ± 0,03 |
| Dickdarm | 0,43 ± 0,06 | 0,53 ± 0,01 | 0,81 ± 0,27 | 30,97 ± 2,45 |
| Pankreas | 2,10 ± 0,71 | 1,76 ± 0,31 | 3,03 ± 0,005 | 0,39 ± 0,09 |
| Nieren | 2,80 ± 0,30 | 2,38 ± 0,15 | 1,08 ± 0,37 | 0,12 ± 0,02 |
| Leber | 4,28 ± 0,51 | 3,60 ± 0,25 | 1,47 ± 0,48 | 0,15 ± 0,02 |
| Muskel | 0,40 ± 0,03 | 0,38 ± 0,04 | 0,46 ± 0,16 | 0,10 ± 0,007 |
| Lunge | 0,69 ± 0,08 | 0,68 ± 0,16 | 1,44 ± 0,03 | 0,11 ± 0,01 |
| Gehirn | 0,12 ± 0,005 | 0,30 ± 0,02 | 0,48 ± 0,04 | 0,03 ± 0,002 |

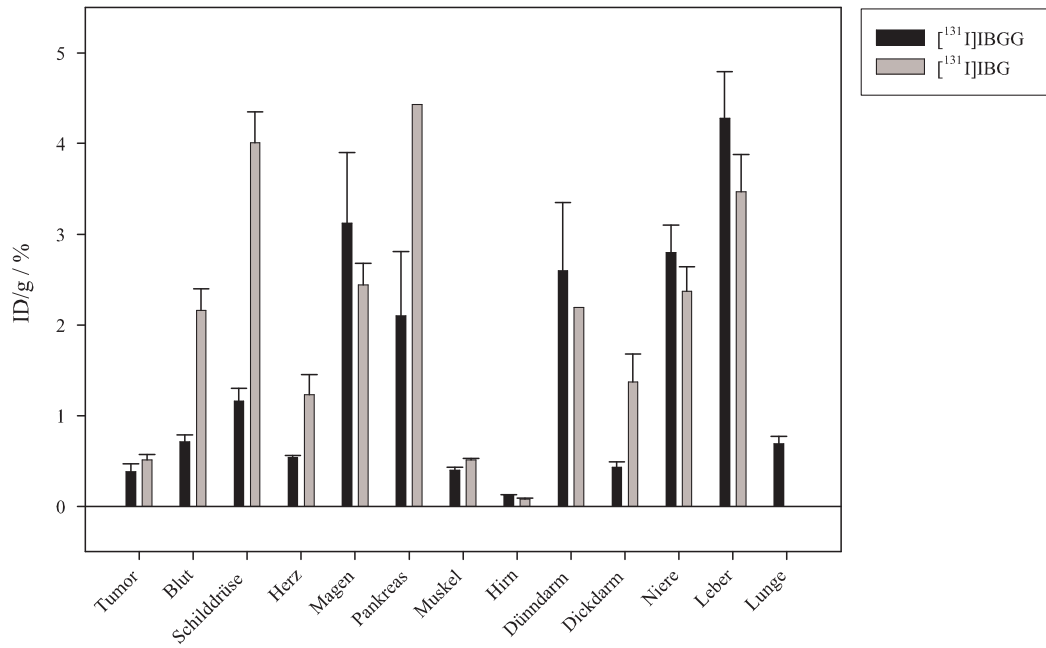


Abbildung 82: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]IBGG und [¹³¹I]IBG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 0,5 h p.i.

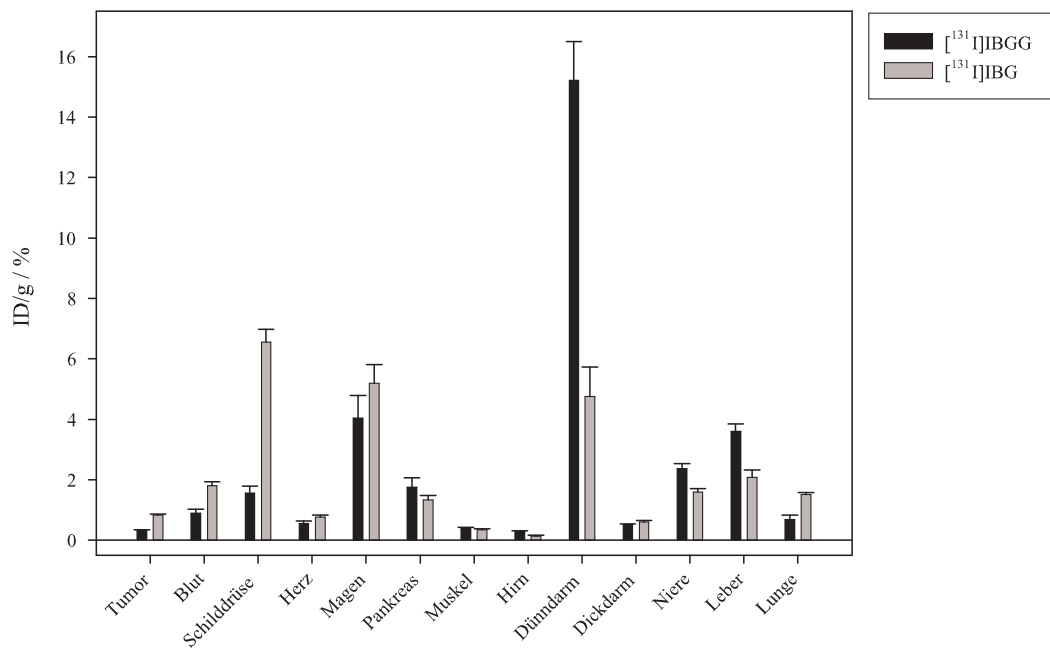


Abbildung 83: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 1 h p.i.

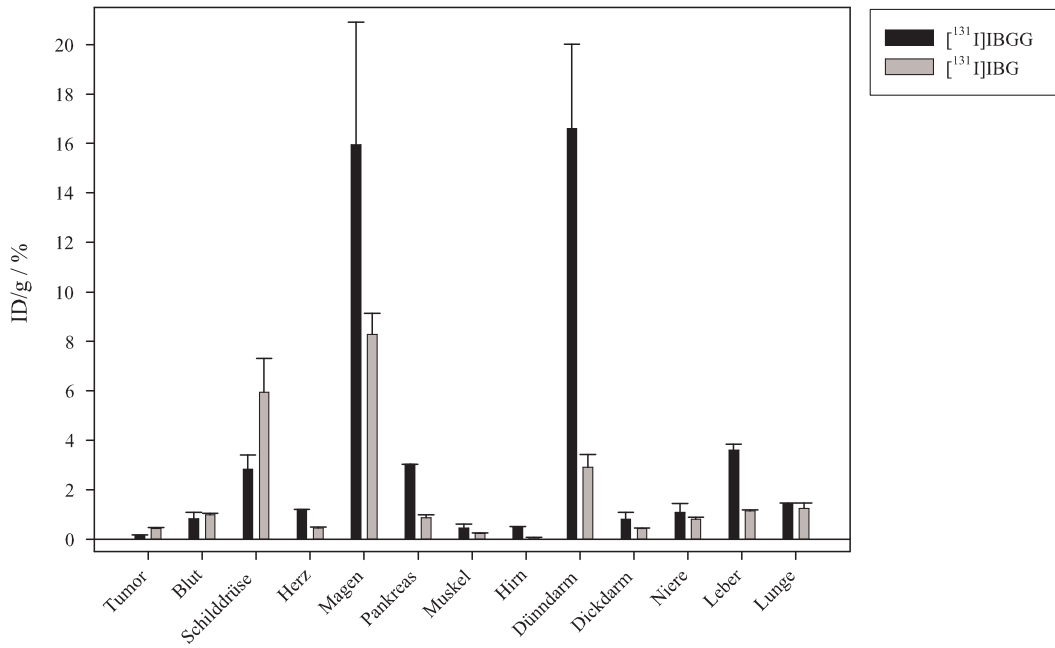


Abbildung 84: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 4 h p.i.

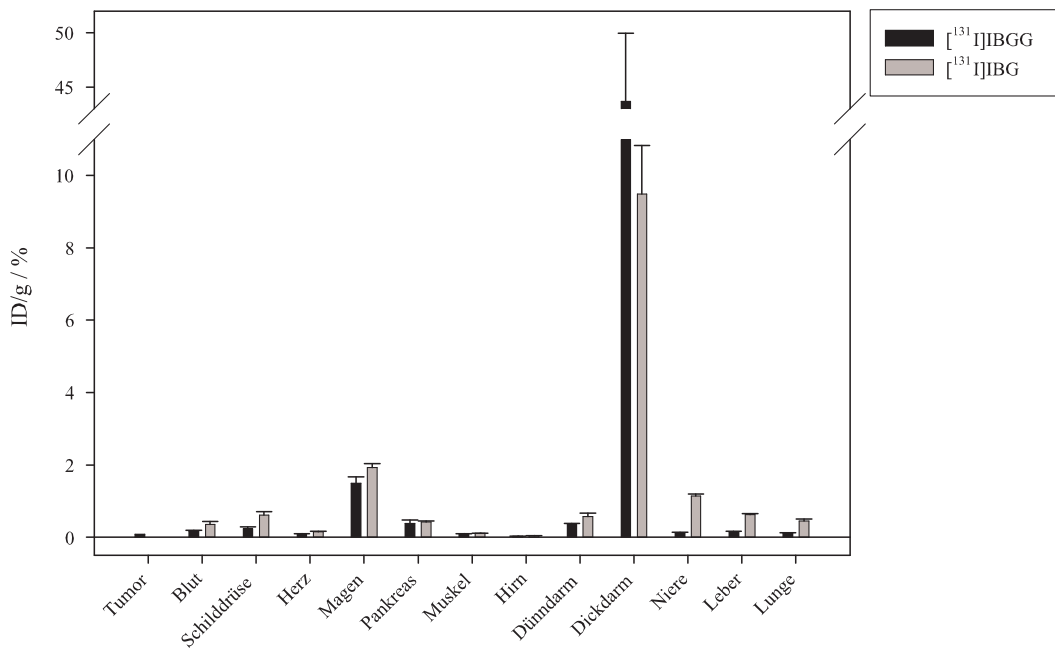


Abbildung 85: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]IBG und [¹³¹I]IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 8 h p.i.

D Organ- und Tumorverteilung von [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG

Tabelle 42: Verteilung von [¹³¹I]ITG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren

| Gewebe | % ID/g (n = 4) | | |
|-------------|----------------|--------------|--------------|
| | 0,5 h | 1 h | 4 h |
| MEX(+) | 0,77 ± 0,05 | 1,08 ± 0,03 | 0,46 ± 0,07 |
| MEX(-) | 0,87 ± 0,04 | 1,07 ± 0,04 | 0,42 ± 0,08 |
| Blut | 1,94 ± 0,11 | 1,91 ± 0,10 | 0,62 ± 0,13 |
| Schilddrüse | 6,19 ± 0,13 | 8,72 ± 0,47 | 6,99 ± 1,00 |
| Herz | 0,90 ± 0,03 | 0,78 ± 0,03 | 0,26 ± 0,04 |
| Magen | 3,79 ± 0,06 | 6,08 ± 0,53 | 11,46 ± 0,35 |
| Dünndarm | 1,64 ± 0,19 | 1,39 ± 0,27 | 0,65 ± 0,10 |
| Dickdarm | 0,75 ± 0,02 | 0,76 ± 0,04 | 0,81 ± 0,06 |
| Nieren | 1,73 ± 0,19 | 1,67 ± 0,11 | 0,51 ± 0,07 |
| Leber | 0,95 ± 0,04 | 0,90 ± 0,04 | 0,29 ± 0,05 |
| Muskel | 0,49 ± 0,02 | 0,44 ± 0,02 | 0,16 ± 0,03 |
| Lunge | 1,50 ± 0,08 | 1,36 ± 0,05 | 0,50 ± 0,08 |
| Gehirn | 0,14 ± 0,002 | 0,13 ± 0,006 | 0,05 ± 0,009 |

Tabelle 43: Verteilung von [¹³¹I]ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren

| Gewebe | % ID/g (n = 4) | | |
|-------------|----------------|-------------|--------------|
| | 0,5 h | 1 h | 4 h |
| MEX(+) | 0,53 ± 0,06 | 0,67 ± 0,04 | 0,42 ± 0,01 |
| MEX(-) | 0,48 ± 0,05 | 0,68 ± 0,05 | 0,44 ± 0,02 |
| Blut | 1,64 ± 0,16 | 1,12 ± 0,05 | 0,77 ± 0,07 |
| Schilddrüse | 3,23 ± 0,26 | 5,53 ± 0,11 | 7,17 ± 0,67 |
| Herz | 0,89 ± 0,07 | 0,64 ± 0,04 | 0,26 ± 0,01 |
| Magen | 2,96 ± 0,49 | 7,51 ± 0,83 | 9,55 ± 0,97 |
| Dünndarm | 5,77 ± 3,06 | 6,18 ± 2,72 | 1,41 ± 0,54 |
| Dickdarm | 0,68 ± 0,004 | 0,78 ± 0,05 | 0,43 ± 0,04 |
| Nieren | 2,43 ± 0,43 | 1,60 ± 0,04 | 0,51 ± 0,02 |
| Leber | 2,25 ± 0,28 | 1,50 ± 0,08 | 0,39 ± 0,03 |
| Muskel | 0,28 ± 0,01 | 0,25 ± 0,01 | 0,12 ± 0,004 |
| Lunge | 1,09 ± 0,04 | 0,85 ± 0,05 | 0,48 ± 0,03 |
| Gehirn | 0,12 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 |

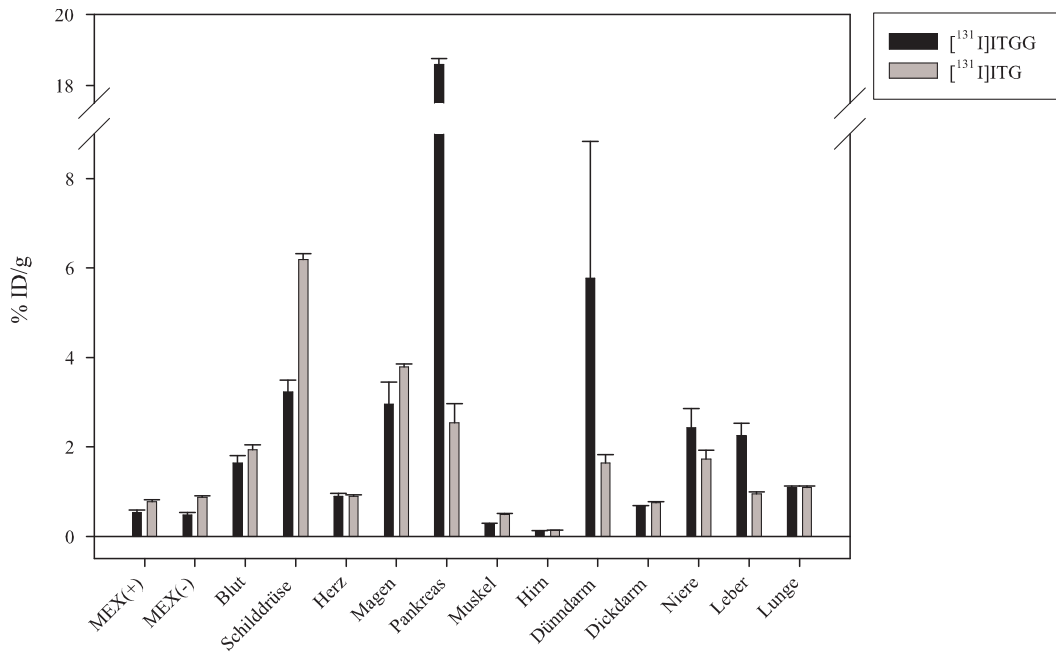


Abbildung 86: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren 0,5 h p.i.

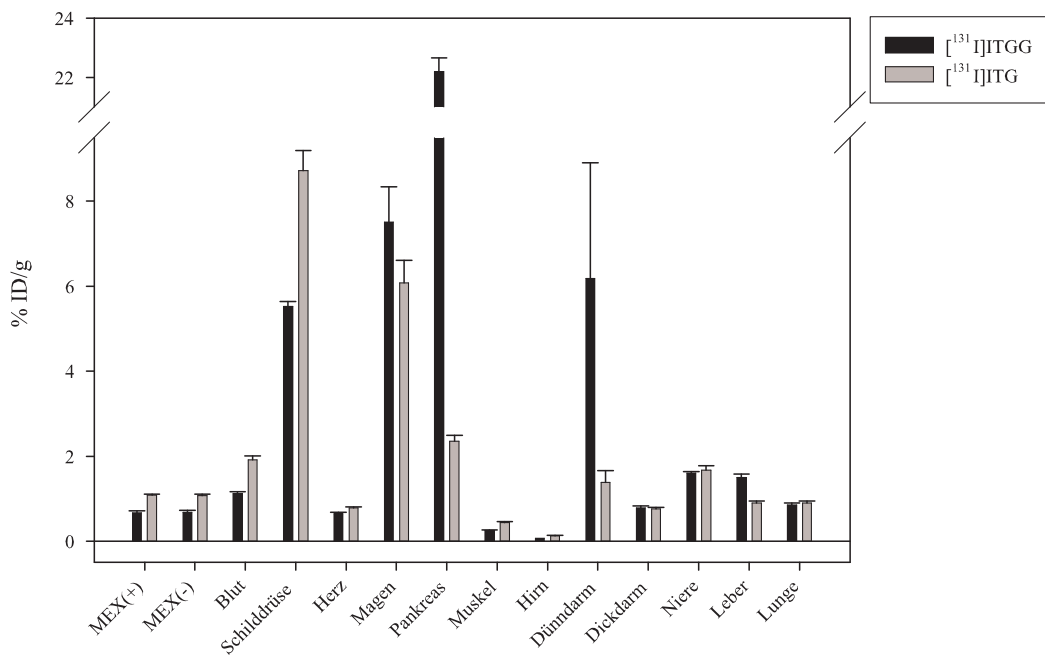


Abbildung 87: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren 1 h p.i.

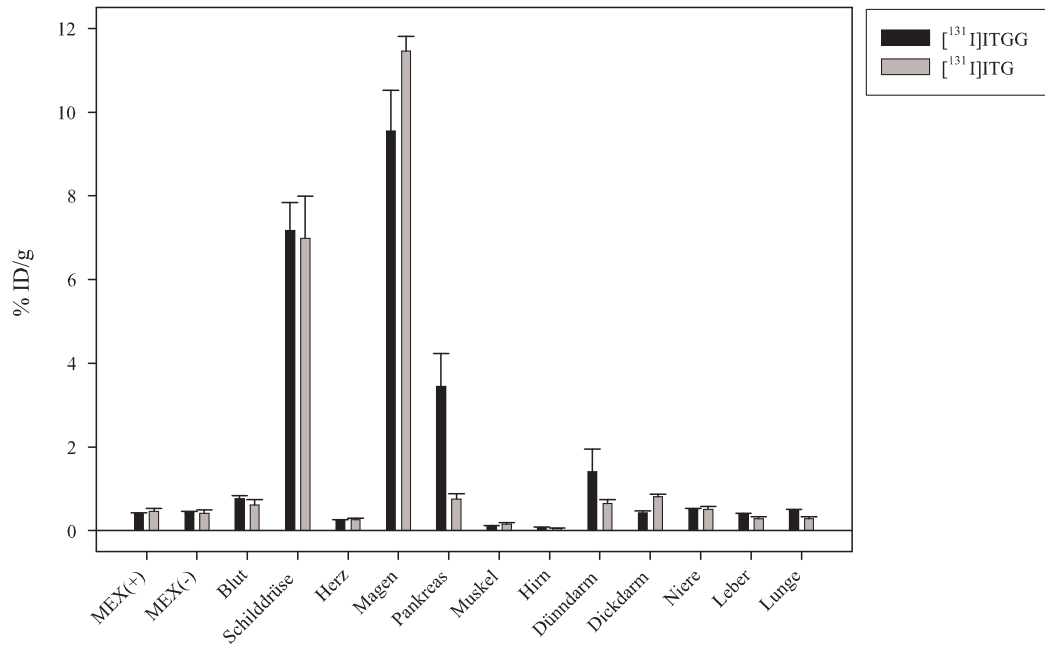


Abbildung 88: Vergleich der Verteilung von [¹³¹I]ITG und [¹³¹I]ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren 4 h p.i.

E Biodistribution von [¹²³I]IBGG

Tabelle 44: Verteilung von [¹²³I]IBGG in ausgewählten Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren

| Gewebe | % ID/g | |
|-------------|----------------------|-----------------------|
| | <i>Maus 1 (4 h)</i> | <i>Maus 2 (3,5 h)</i> |
| MEX(+) | 1,71 | 1,02 |
| MEX(-) | 1,01 | 1,08 |
| Blut | 1,34 | 1,42 |
| Schilddrüse | 11,66 | 6,55 |
| Magen | 16,66 | 9,30 |
| Dickdarm | 1,65 | 1,72 |
| Nieren | 3,10 | 2,31 |
| Leber | 3,80 | 4,08 |
| Gehirn | 0,13 | 0,06 |

F Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Vereinfachte Darstellung einer Quartz-Destillationsapparatur zur Abtrennung von Radioiod aus einem bestrahlten Te-Target | 10 |
| 2 | Bildung von ^{123}I -Iod aus indirekten Reaktionen | 11 |
| 3 | Bildung von ^{131}I -Iod durch Neutroneneinfang an ^{130}Te -Tellur | 11 |
| 4 | ^{131}I -Iod aus der Kernspaltung | 12 |
| 5 | Aufbau und Messprinzip einer SPECT-Kamera | 14 |
| 6 | Oxidation mit CAT | 17 |
| 7 | Iodogen TM | 17 |
| 8 | Mechanismus der Iododestannylierung | 19 |
| 9 | Mechanismus der Kupfer(I)-katalysierten nukleophilen Substitution | 20 |
| 10 | Beispiele für alkylierende Zytostatika | 21 |
| 11 | Übertragungspositionen für Alkylgruppen an Guanin | 21 |
| 12 | Alkylübertragungsreaktion zur MGMT | 23 |
| 13 | Glucosekonjugiertes O ⁶ -(4-Bromothienyl)guanin | 26 |
| 14 | 2-Amino-6-(2-[^{18}F]fluor-pyridin-4-ylmethoxy)-9-(octyl- β -D-glucopyranosid)-purin , 2-FPGG | 28 |
| 15 | Beispiele der zu synthetisierenden Guanin-Derivate | 31 |
| 16 | Darstellung von BG nach Bowles et al. | 33 |
| 17 | Darstellung von O ⁶ -(4-Bromothienyl)guanin 3 (4-BTG) nach McElhinney et al. | 33 |
| 18 | Darstellung von 2-Amino-6-(2-fluor-pyridin-4-ylmethoxy)-9H-purin nach Schirrmacher et al. | 34 |
| 19 | Darstellung von (2-Amino-9H-purin-6-yl)-trimethyl-ammoniumchlorid 1 | 35 |
| 20 | Darstellung von 4-Bromothienylalkohol | 36 |
| 21 | Synthese von 5-Iodthiophen-2-carbaldehyd 4 | 36 |
| 22 | Darstellung von 5-Iodothienylalkohol 5 durch Iodierung mit dem Bis-(trifluoracetoxyl)iodbenzol-Iod-System | 37 |
| 23 | Darstellung von 5-Iodothienylalkohol 5 durch Iodierung mit Quecksilberoxid und Iod | 37 |
| 24 | Darstellung der Guanin-Derivate TG und 4-BTG | 38 |
| 25 | Darstellung der Guanin-Derivate ITG, IBG, 4-BTG, 5-BTG und BBG | 38 |
| 26 | Versuchte Darstellung von ITG durch Iodierung von TG mit CAT als Oxidationsmittel | 39 |
| 27 | An N-9 und N-7 deprotoniertes Guanin-Derivat | 40 |
| 28 | Darstellung von ITGSi und IBGSi | 41 |
| 29 | Darstellung von Pentabenzoyl- β -D-glucose 13 | 42 |
| 30 | Darstellung von Pentabenzoyl- α -D-glucose 14 | 42 |
| 31 | Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosylbromid 15 | 43 |
| 32 | Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- α -D-glucose 16 | 43 |
| 33 | Darstellung von 2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl-1-(2,2,2-trichloracetimidat)- α -D-glucopyranosid 17 | 44 |
| 34 | Mechanismus der diastereoselektiven Synthese von β -Glycosiden nach Königs-Knorr [156] am Beispiel der Darstellung von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid 18 | 45 |
| 35 | Darstellung von 1-(8-Bromooctyl)-2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosid 18 nach der Acetimidat-Methode unter Verwendung von TMSO-triflat oder Bortrifluorid-Etherat als Katalysator | 46 |
| 36 | <i>in situ</i> Anomerisierung | 47 |
| 37 | Mechanismus der Glycosylierung in Gegenwart von Zinntetrachlorid | 47 |

| | | |
|----|---|----|
| 38 | Umsetzung von Pentabenzoyl-D-glucose mit 1-Bromooctanol in Gegenwart von Zinntetrachlorid | 48 |
| 39 | Darstellung der geschützten Guanin-Glucose-Konjugate 20 , 21 , 22 und 23 | 49 |
| 40 | Darstellung der geschützten Glucose-Konjugate 21 , 24 , 25 und 26 | 51 |
| 41 | Mechanismus der Zemplén-Reaktion am Beispiel der Debenzoylierung der Guanin- β -Glucose-Konjugate | 53 |
| 42 | Darstellung der Verbindungen SnTGG und SnBGG | 55 |
| 43 | Darstellung von SnTGSi und SnBGSi | 56 |
| 44 | Darstellung von SnBG und SnTG | 57 |
| 45 | Versuchte direkte elektrophile ^{131}I -Iodierung von TGG | 62 |
| 46 | ^{131}I -Iodierung von SnTGG bzw. SnBGG unter neutralen Bedingungen und Verwendung von CAT als Oxidationsmittel | 63 |
| 47 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 64 |
| 48 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG von der CAT-Konzentration (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)), Reaktionszeit 5 Minuten) | 64 |
| 49 | ^{131}I -Iodierung von SnBGSi und SnTGSi mit anschließender Entschützung an N-9 | 67 |
| 50 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGSi von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 69 |
| 51 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGSi und SnTGSi von der CAT-Konzentration (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0)), Reaktionszeit 5 Minuten) | 69 |
| 52 | ^{131}I -Iodierung von SnBG | 72 |
| 53 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBG von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 72 |
| 54 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBG von der CAT-Konzentration (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 73 |
| 55 | Stabilität der ^{131}I -iodierten Verbindungen in physiologischer Kochsalzlösung (1 % DMSO) | 75 |
| 56 | Stabilität von [^{131}I]ITG und [^{131}I]ITGG in Phosphatpuffer (pH 7,0; 1 % DMSO) | 76 |
| 57 | Stabilität der ^{131}I -iodierten Verbindungen in absolutem Ethanol | 77 |
| 58 | Vergleich der RCA bei der ^{131}I -Iodierung und der ^{123}I -Iodierung (Reaktionszeit 5 Minuten, Reaktionsbedingungen siehe Anhang B) | 78 |
| 59 | Vergleich der RCA bei der ^{123}I -Iodierung mit [^{123}I]Iodid-Lösungen unterschiedlichen Alters (Reaktionszeit 5 Minuten, Reaktionsbedingungen siehe Anhang B) | 79 |
| 60 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{123}I -Iodierung vom Zusatz an Phosphatpuffer (Reaktionszeit 5 Minuten, Reaktionsbedingung siehe Anhang B) | 80 |
| 61 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{123}I -Iodierung von SnBGG von der Zeit (Vorläuferkonzentration 25 μg , 10 μL [^{123}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 80 |
| 62 | Abhängigkeit des logP-Wertes von [^{131}I]IBG und [^{131}I]IBGG vom pH-Wert | 83 |
| 63 | Vergleich der <i>in vitro</i> -IC ₅₀ -Werte von IBG, ITG und ihren β -Glucose-Konjugaten | 86 |

| | | |
|----|---|-----|
| 64 | Bindung der ^{131}I -iodierten Inhibitoren an gereinigte MGMT (MGMT-Konzentration: 130 pmol/mg) | 87 |
| 65 | Verteilung von ^{131}I IBG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und teilweise auch MEX(-)-Tumoren | 89 |
| 66 | Verteilung von ^{131}I IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren | 90 |
| 67 | Vergleich von ^{131}I IBG und ^{131}I IBGG in ausgewählten Organen (0,5 h p.i. (links) und 8 h p.i. (rechts)) | 90 |
| 68 | Vergleich der Aufnahme von ^{131}I IBG (links) und ^{131}I IBGG (rechts) in unterschiedliche Tumorarten (1 h p.i.) | 91 |
| 69 | Vergleich der Tumor- und Organverteilung von ^{131}I IBG bei mit Phloretin behandelten Mäusen und Kontrollmäusen (1 h p.i.) | 93 |
| 70 | Vergleich der Tumor- und Organverteilung von ^{131}I IBGG bei mit Phloretin behandelten Mäusen und Kontrollmäusen | 94 |
| 71 | Kinetik der Tumor- und Organverteilung von ^{131}I ITG bei Mäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren | 96 |
| 72 | Kinetik der Tumor- und Organverteilung von ^{131}I ITGG bei Mäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren | 96 |
| 73 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I ITG und ^{131}I ITGG (0,5 h p.i.) | 97 |
| 74 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I ITG und ^{131}I IBG in ausgewählten Organen (0,5 h p.i.) | 98 |
| 75 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I ITGG und ^{131}I IBGG in ausgewählten Organen (0,5 h p.i.) | 99 |
| 76 | Bild des ISE YAP-(S)PET-Scanners mit Nacktmaus, der ^{123}I IBG injiziert worden war | 100 |
| 77 | Mit der SPECT-Kamera aufgenommenes Energiespektrum einer ^{123}I Iodidlösung | 101 |
| 78 | Schnittbild einer mit ^{123}I IBG injizierten Maus (etwa 1 h p.i.); der Pfeil kennzeichnet die Stelle des Tumors | 101 |
| 79 | Schnittbild einer mit ^{123}I IBGG injizierten Maus (etwa 1 h p.i.); der Pfeil kennzeichnet die Stelle des Tumors | 102 |
| 80 | Vergleich der Verteilung von ^{123}I IBGG und ^{131}I IBGG in ausgewählten Organen etwa 4 h p.i. | 102 |
| 81 | Dargestellte O^6 -substituierte Guanin-Derivate | 141 |
| 82 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I IBG und ^{131}I IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 0,5 h p.i. | 158 |
| 83 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I IBG und ^{131}I IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 1 h p.i. | 158 |
| 84 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I IBG und ^{131}I IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 4 h p.i. | 159 |
| 85 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I IBG und ^{131}I IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren 8 h p.i. | 159 |
| 86 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I ITG und ^{131}I ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren 0,5 h p.i. | 161 |
| 87 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I ITG und ^{131}I ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren 1 h p.i. | 161 |
| 88 | Vergleich der Verteilung von ^{131}I ITG und ^{131}I ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren 4 h p.i. | 162 |

G Tabellenverzeichnis

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Wichtige „organische“ Radionuklide zur Markierung medizinisch relevanter Moleküle | 7 |
| 2 | Kernreaktionen zur Darstellung von ^{123}I -Iod | 10 |
| 3 | Kernreaktionen zur Herstellung von ^{124}I -Iod | 12 |
| 4 | Wichtige SPECT-Nuklide | 15 |
| 5 | <i>In vitro</i> -IC ₅₀ -Werte ausgewählter O ⁶ -substituierter Guanine bezüglich MGMT | 24 |
| 6 | Zur Kopplung verwendete Alkohole und ihre Abkürzungen | 35 |
| 7 | Ausbeuten der nach der direkten Methode synthetisierten Guanine | 39 |
| 8 | NMR-Daten für das C-1-Atom von 18 und 19 | 48 |
| 9 | R _f -Werte (n-Hexan:Aceton, 1:1) und Ausbeuten der dargestellten Guanin-Glucose-Konjugate | 50 |
| 10 | ^{13}C -NMR-Verschiebungen der dargestellten Verbindungen und Literaturvergleich | 50 |
| 11 | R _f -Werte (n-Hexan:Aceton, 1:1 bzw. 2:3 für 26) und Ausbeuten der bei Raumtemperatur dargestellten Guanin-Glucose-Konjugate | 51 |
| 12 | ^{13}C -NMR-Verschiebungen der dargestellten Verbindungen und Literaturvergleich | 52 |
| 13 | R _f -Werte (Chloroform:Methanol, 5:1) und Ausbeuten der entschützten Guanin-Glucose-Konjugate | 53 |
| 14 | Dargestellte Guanin-Derivate | 58 |
| 15 | R _f -Werte der radioiodierten Verbindungen | 60 |
| 16 | Retentionszeiten t _R der radioiodierten Verbindungen | 61 |
| 17 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration (10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 65 |
| 18 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Phosphatpuffer (Vorläuferkonzentration 25 μg, 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 66 |
| 19 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der zugesetzten CAT-Lösung (Vorläuferkonzentration 25 μg, 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0)) | 66 |
| 20 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG und SnTGG in Abhängigkeit von der [^{131}I]Iodid-Lösung (Vorläuferkonzentration 25 μg, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 67 |
| 21 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGSi und SnTGSi in Abhängigkeit von der Vorläuferkonzentration (10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 70 |
| 22 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGSi und SnTGSi in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Phosphatpuffer (Vorläuferkonzentration 25 μg, 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 70 |
| 23 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGSi und SnTGSi in Abhängigkeit von der [^{131}I]Iodid-Lösung (Vorläuferkonzentration 25 μg, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0), 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 71 |
| 24 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBG in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Phosphatpuffer (Vorläuferkonzentration 25 μg, 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL CAT (1,5 mg/mL in Phosphatpuffer (pH 7,0))) | 73 |
| 25 | RCA bei der ^{131}I -Iodierung von SnBGG, SnTGG, SnBGSi und SnTGSi mit Iodogen TM (Vorläuferkonzentration 25 μg in 15 μL EtOH, 10 μL [^{131}I]Iodid-Lösung, 10 μL Phosphatpuffer (pH 7,0)) | 74 |

| | | |
|----|---|-----|
| 26 | Abhängigkeit der RCA bei der ^{123}I -Iodierung von SnBG und SnBGG von der Verwendung unterschiedlicher [^{123}I]Iodid-Chargen (Reaktionszeit 5 Minuten, optimierte Reaktionsbedingungen) | 81 |
| 27 | logP-Werte der MGMT-Inhibitoren bei pH 7,4 | 84 |
| 28 | IC ₅₀ -Werte der MGMT-Inhibitoren | 85 |
| 29 | Tumor-Blut-Verhältnisse (MEX(+)-Tumor) von [^{131}I]IBG und [^{131}I]IBGG | 91 |
| 30 | Tumor-Blut-Verhältnisse (MEX(+)-Tumor) von [^{131}I]ITG und [^{131}I]ITGG | 97 |
| 31 | Reinheitsgrade und Lieferanten der wichtigsten Chemikalien | 105 |
| 33 | Substanzen zur Kalibration | 136 |
| 34 | Retentionszeiten und logP-Werte der MGMT-Inhibitoren | 136 |
| 35 | logP-Werte der radioiodierten Verbindungen nach der Scheidetrichter-Methode | 137 |
| 36 | In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen | 153 |
| 37 | Zur Radioiodierung verwendete Reaktionsbedingungen | 154 |
| 38 | RCA bei den ^{131}I -Iodierungen | 155 |
| 39 | RCA bei den ^{123}I -Iodierungen | 156 |
| 40 | Verteilung von [^{131}I]IBG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und teilweise MEX(-)-Tumoren | 157 |
| 41 | Verteilung von [^{131}I]IBGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)-Tumoren | 157 |
| 42 | Verteilung von [^{131}I]ITG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren | 160 |
| 43 | Verteilung von [^{131}I]ITGG in unterschiedlichen Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren | 160 |
| 44 | Verteilung von [^{123}I]IBGG in ausgewählten Organen bei Nacktmäusen mit subkutanen MEX(+)- und MEX(-)-Tumoren | 163 |